

УТВЕРЖДАЮ:

Директор ГЕОХИ РАН

Академик Ю.А. Костицын



Итого 2020 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ордена Ленина и Ордена Октябрьской Революции Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской академии наук (ГЕОХИ РАН).

Диссертация «Развитие жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения как метода скрининга физиологически активных веществ в сложных по составу смесях» выполнена в Федеральном Государственном Бюджетном Учреждении «Антидопинговом Центре» Министерства спорта Российской Федерации.

В период подготовки диссертации **Вирюс Эдуард Даниэлевич** работал в лаборатории функциональной протеомики и метаболомики Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научно-исследовательского института общей патологии и патофизиологии» (ФГБНУ «НИИОПП»).

Э.Д. Вирюс окончил в 1994 г. физико-химический факультет Московского института стали и сплавов по специальности «физико-химические исследования металлургических процессов». В 2002 году защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата химических наук на кафедре аналитической химии химического факультета Московского Государственного Университета по теме «Идентификация следовых количеств компонентов в сложных смесях методами хромато-масс-спектрометрии и tandemной хромато-масс-спектрометрии» по специальности аналитическая химия (диплом КТ 081811, выдан 12 июля 2002 года)

(Выписка из протокола расширенного семинара при дирекции от 4 марта 2020 г.)

Присутствовали 25 человек: академик РАН Мясоедов Б.Ф. (Президиум РАН), чл.-корр. РАН Колотов В.П., д.т.н. Севастьянов В.С., д.т.н. Зуев Б.К., д.х.н. Шкинев В.М., д.х.н. Гречников А.А., д.х.н. Долгоносков А.М. (все - ГЕОХИ РАН), д.х.н. Бродский Е.С. (Ин-т проблем экологии и эволюции им. Северцова), д.м.н., к.х.н. Проскурнина Е.В. (Медико-генетический центр им. Бочкова), д.х.н. Григорьев А.М. («Бюро судебно-медицинской экспертизы»), д.х.н. Ревельский А.И. (МГУ),

д.х.н. Родин И.А. (МГУ), д.ф.-м.н. Сысоев А.А. (НИЯУ МИФИ), к.г.-м.н. Шиловбеева С.Н., к.х.н. Догадкин Д.Н., к.х.н. Захарченко Е.А., к.т.н. Тимонина О.К. и другие сотрудники ГЕОХИ РАН.

Председатель: академик РАН Мясоедов Б.Ф.

Слушали: доклад Вирюса Э.Д. по диссертационной работе на тему: «Развитие жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения как метода скрининга физиологически активных веществ в сложных по составу смесях», представленной на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия.

Краткое содержание доклада.

Цель диссертационной работы заключалась в обосновании и развитии принципиально новой методологии быстрого хромато-масс-спектрометрического скрининга широкого спектра экзогенных физиологически активных веществ (ФАВ) в биологических жидкостях, опираясь на ряд оригинальных решений в жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения, обеспечивающих надежное и достоверное обнаружение ФАВ в сложных по составу смесях. Основные задачи работы включали:

- Создание методологии хромато-масс-спектрометрического скрининга, обеспечивающей точное измерение масс в режиме полного сканирования для обнаружении широкого спектра ФАВ в сложных по составу смесях без трудоемкой подготовки образцов к анализу;
- Разработка способов выявления и оценки матричных эффектов, характерных для жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой;
- Разработка подходов снижения матричных эффектов в масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения при использовании химической и фотохимической ионизации при атмосферном давлении, а также химической ионизации, индуцированной электрораспылением, за счет селективного протонирования определяемых ФАВ и подавления ионизации мешающих компонентов;
- Разработка и верификация способов скрининга физиологически активных веществ в медико-биологических пробах на основе точного измерения m/z протонированных молекул и фрагментных ионов в режиме полного сканирования.

В докладе приведена разработанная методология скрининга ФАВ в сложных по составу смесях на основе жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой и рассмотрены основные результаты, полученные при решении поставленных задач. Определена роль матричных эффектов в обнаружении ФАВ методом ВЭЖХ-орбитальной ионной ловушки в сложных по составу смесях и обоснован поиск подходов их снижения. Предложены экспериментальные способы их оценки для ВЭЖХ-орбитальной ионной ловушки. Представлены результаты снижения матричного

эффекта за счет сочетания ВЭЖХ-орбитальной ионной ловушки с химической ионизацией при атмосферном давлении (ХИАД), фотохимической ионизации при атмосферном давлении (ФХИАД) и химической ионизации, индуцированной электрораспылением (ХИИЭР), обеспечивающего условия для селективного переноса протонов и подавления ионизации мешающих компонентов матрицы. Показано снижения матричного эффекта до 5 % за счет селективного протонирования ФАВ в газовой фазе при сочетании метода ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с ФХИАД и до 12 % за счет подавления ионизации мешающих компонентов матрицы при сочетании ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с ХИИЭР. На основе предложенных подходов разработаны 3 способа скрининга ФАВ в биологических средах (моче):

- методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в сочетании с ХИАД на основе точного измерения масс фрагментных ионов и протонированных молекул на уровне 2 ppm с пределом обнаружения 0.05 – 0.1 нг/мл, на примере стероидов и N-алкил-β-гидрокси-арилоксипропиламинов (29 соединений);

- методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в сочетании с ФХИАД на основе точного измерения масс протонированных молекул на уровне 2 ppm с пределом обнаружения 0.5 – 2 нг/мл, на примере определения стероидов (57 соединений) в условиях, обеспечивающих селективное протонирование аналитов в газовой фазе;

- методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в сочетании ХИИЭР на основе точного измерения масс фрагментных ионов и протонированных молекул на уровне 2 ppm с пределами обнаружения 0.2 – 250 нг/мл, на примере стероидов, бензотиодиазинов, N-алкил-β-гидрокси-арилоксипропиламинов, катехоламинов, фенилалкиламинов, (β-гидроксифенилэтил)аминов, производных бензамида (120 соединений) в условиях, обеспечивающих подавление ионизации мешающих компонентов матрицы.

Расширены возможности ВЭЖХ-МСВР/ОЛ как метода скрининга ФАВ в сложных по составу смесях благодаря повышению точности измерения масс за счет снижения матричных эффектов. Для интегрирования разработанной методологии скрининга ФАВ с референсными методами анализа предложено оценивать выход реакции дериватизации, позволяющий выбрать наиболее адекватный референсный метод для подтверждающего анализа, и способ снижения подавления ионизации компонентами матрицы для ВЭЖХ-МС/МС на основе твердофазной экстракции с магнитными частицами.

После доклада Вириусу Э.Д. были заданы следующие вопросы:

Колотов В.П.

Вы привели в презентации симметричные хроматографические пики. Что они признаны доказать?

Долгоносов А.М.

Сформулируйте научную новизну работы.

Шкинев В.М.

Какие подходы используют в других странах?

Принципиальное отличие работы от др. подходов?

Зуев Б.К.

Что сделано в области жидкостной хроматографии?

Севастьянов С.В.

Как Вы можете прокомментировать то, что Макаровым уже придумано решение поставленной в Вашей работе проблемы путем усовершенствования самого масс-спектрометра?

Мясоедов Б.Ф.

Сформулируйте по-крупному, что дает разработанный в диссертации подход к масс-спектрометрическому определению химических соединений?

При обсуждении работы выступили:

Член-корр. РАН, д.х.н. Колотов В.П. высказал мнение, что в докладе нужно начинать с методологии, поскольку она является одной из изюминок диссертации и имеет ключевое значение в работе, и только затем подкреплять данную методологию различными методами и методическими решениями. В.П. Колотов также отметил, что следовало бы уделить большее внимание заключительной части, где речь идет о методах, поддерживающих данную методологию с точки зрения подтверждения результатов скрининга. Было рекомендовано сделать слайды «самоговорящими» и более понятными, чтобы они не вызывали вопросов. Он предложил начать доклад с крупного обобщения и сделать его логически понятным. Он также предложил доработать выводы. С учетом сделанных замечаний рекомендовал работу к защите с условием, что замечания к докладу будут приняты.

д.х.н. Гречников А.А. (рецензент, рецензия прилагается).

Рецензент отметил, что работа удовлетворяет требованиям ВАК к докторским диссертациям и может быть представлена к защите на диссертационном совете. Вместе с тем Гречников А.А. согласился с замечаниями член-корр. РАН Колотова В.П. и рекомендовал выдвинуть фундаментальную задачу, посвященную методологии скрининга, на первый план постановочно-мотивационной части доклада. Кроме того, рецензент указал, что необходимо дополнительно поработать с выводами и высказал мнение, что нужно тщательно продумать риторику доклада, а также правильно расставить акценты.

д.х.н. Родин И.А. (МГУ, рецензент, рецензия прилагается).

Учитывая квалификационную составляющую диссертационной работы, рецензент отметил, что Э.Д. Вирюс является известным

высококвалифицированным специалистом в области органической масс-спектрометрии. По объему и важности полученных результатов работа соответствует всем требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям, а работа Э.Д. Вирюса, несомненно, заслуживает представления в совет ГЕОХИ РАН на соискание ученой степени доктора химических наук.

В связи с отсутствием д.х.н., профессора В.Г. Заикина (Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева) рецензия была зачитана секретарем семинара Е.А.Захарченко (рецензия прилагается). Рецензент отметил, что

Вирюс Э.Д. разработал принципиально новые подходы к обнаружению ультрамалых концентраций ФАВ и продуктов их биопревращения, основанных на фундаментальных закономерностях ионизации аналитов, которые реализуются на масс-спектрометрах сверхвысокого разрешения. Владимир Георгиевич подчеркнул, что Э.Д. Вирюсом разработаны новые методологические принципы, позволяющие наиболее эффективно использовать сочетание ВЭЖХ с масс-спектрометрией сверхвысокого разрешения для определения ФАВ и продуктов их метаболизма в живом организме. Работа, несомненно, рекомендуется для представления в совет на соискание степени доктора химических наук.

д.х.н. Григорьев А.М. («Бюро судебно-медицинской экспертизы») отметил, что хотя доклад имеет шероховатости, работа имеет очень большое практическое значение для судебно-медицинской экспертизы. Он также подчеркнул, что предлагаемые Вирюсом Э.Д. решения применимы не только для орбитальной ионной ловушки. Он напомнил, что с проблемами матричных эффектов также сталкиваются при использовании классической ионной ловушки.

Проф., д.ф.-м.н. Сысоев А.А. (МИФИ) отметил, что он давно знаком с результатами работы Вирюса Э.Д., которые неоднократно были представлены на съездах Всероссийского масс-спектрометрического общества, подчеркнул, что подходы, предложенные Макаровым и Вирюсом, усиливают друг друга, поскольку Вирюсу удалось решить проблему матричных эффектов в орбитальной ионной ловушке химическими методами.

д.х.н. Бродский Е.С. (Ин-т проблем экологии и эволюции им. Северцова) подчеркнул, что Вирюс Э.Д. является в нашей стране пионером в использовании орбитальной ионной ловушки в аналитической химии, которая сегодня является самым передовым масс-спектрометрическим методом. Ефим Соломонович упомянул, что имея огромный опыт решения аналитических задач данным методом, Вирюс Э.Д. не только использовал орбитальную ионную ловушку, но и значительно усовершенствовал методологию, связанную с ее применением, в области, где нужна очень высокая достоверность анализа. В заключении он отметил, что достигнутые результаты в ходе совершенствования данной методологии заслуживают быть представленными в диссертационном совете. Он согласился с мнением выступающих, что доклад требует улучшения.

д.м.н., к.х.н. Проскурнина Е.В. (Медико-генетический центр им. Бочкова)

согласилась с мнением выступающих о докладе. Вместе с тем, она отметила, что подходы, изложенные в диссертации, имеют очень большое значение для решения задач новой научной дисциплины метаболомики.

д.х.н. Ревельский А.И. (МГУ) подчеркнул, что диссертант не только успешно применял сложные передовые хромато-масс-спектрометрические, но и нашел химические решения для преодоления их ограничения.

Академик РАН Мясоедов Б.Ф. выразил свои опасения, что форма представления доклада может в целом снизить оценку работы со стороны членов диссертационного совета. Он строго рекомендовал учесть замечания, высказанные при обсуждении доклада и правильно расставить в нем акценты, а также более весомо представить выводы диссертационной работы. Вместе с тем подчеркнул, что есть высокая оценка работы специалистами и рецензентов, которая не меняется со временем и нет оснований для отказа в ее представлении к защите в диссертационном совете ГЕОХИ РАН по аналитической химии.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Заключение: диссертационная работа Вирюса Э.Д. «Развитие жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения как метода скрининга физиологически активных веществ в сложных по составу смесях» может быть представлена к защите на диссертационном совете Д 002.109.01 в ГЕОХИ РАН.

Постановили:

1. Диссертационная работа Вирюса Э.Д. «Развитие жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения как метода скрининга физиологически активных веществ в сложных по составу смесях» на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия выполнена с соблюдением требований, предъявляемых к докторским диссертациям. Полученные экспериментальные и теоретические результаты можно квалифицировать как развитие нового направления в области хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения физиологически активных веществ, имеющего важное социально-экономическое значение, в том числе в области новой научной дисциплины – метаболомики. Содержание работы соответствует специальности 02.00.02 – аналитическая химия.

Актуальность темы обусловлена растущими требованиями к быстрому обнаружению широкого спектра физиологически активных веществ (ФАВ) в медико-биологических объектах, непрерывным расширением круга определяемых ФАВ, разнообразием их физико-химических свойств и сложностью химического состава анализируемых смесей с высоким содержанием мешающих компонентов, концентрация которых на несколько порядков выше, чем концентрация

определяемых соединений и ограничениями общепринятой методологии многокомпонентного скрининга, связанными с применением методов газовой и жидкостной tandemной хромато-масс-спектрометрии. Учитывая ограничения общепринятой методологии (трудоемкая стадия разработки методик обнаружения ФАВ, узкий круг определяемых ФАВ в рамках одной методики, неретроспективность и неуниверсальность используемых методов, существенные временные затраты, связанные с расширением круга определяемых ФАВ; случайный выбор подтверждающего метода анализа, для скрининга ФАВ) был предложен метод хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой, который обеспечивает точное измерение масс в режиме полного сканирования при обнаружении широкого спектра ФАВ в сложных по составу смесях без трудоемкой подготовки образцов к анализу.

Научная новизна.

К началу данной работы метод ВЭЖХ-МСВР/ОЛ как метод скрининга ФАВ в литературе не рассматривался.

- Разработана новая методология хромато-масс-спектрометрического скрининга, обеспечивающая точное измерение m/z протонированных молекул ФАВ на уровне 2 ppm в сложных по составу смесях в режиме полного сканирования методом хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения за счет селективного протонирования определяемых соединений и подавления ионизации мешающих компонентов. Предложено использовать оценку выхода реакции дериватизации и твердофазную экстракцию на магнитных частицах для достижения высокой комплементарности разработанной методологии скрининга с общепринятыми подтверждающими методами анализа;

Разработаны способы выявления и оценки матричного эффекта, характерные для ВЭЖХ-МСВР/ОЛ. Обоснован поиск подходов к его снижению;

Предложены подходы, позволяющие снизить матричные эффекты до 5 %, характерные для ВЭЖХ-МСВР/ОЛ, за счет селективного протонирования молекул определяемых соединений и подавления ионизации мешающих компонентов с использованием ХИАД, ФХИАД и ХИИЭР;

На основе сочетания ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с ХИАД разработан способ обнаружения стероидов и N-алкил-β-гидрокси-арилоксипропиламинов (всего 29 соединений) с пределом обнаружения, лежащим в интервале 0.05 – 0.1 нг/мл, в экстрактах из мочи;

На основе сочетания ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с ФХИАД разработан способ обнаружения стероидов (всего 57 соединений) с пределом обнаружения, лежащим в интервале 0.1 – 2 нг/мл, в экстрактах из мочи;

На основе сочетания УЭЖХ-МС/ОЛ с ХИИЭР разработан способ быстрого обнаружения в экстрактах из мочи стероидов, бензотиодиазинов, N-алкил-β-гидрокси-арилоксипропиламинов, катехоламинов, фенилалкиламинов, (β-

гидроксифенилэтил)аминов и производных бензамида, (всего 120 соединений) с пределом обнаружения, лежащим в интервале 0.2 – 250 нг/мл;

Практическая значимость работы.

Разработанная новая методология хромато-масс-спектрометрического скрининга, обеспечивающая точное измерение m/z протонированных и фрагментных ионов в режиме полного сканирования, открывает новые возможности быстрого обнаружения широкого спектра ФАВ на уровне 0.1 - 200 нг/мл в сложных по составу смесях при проведении медико-биологических исследований, эколого-аналитического мониторинга, санитарного контроля продуктов питания, судебно-медицинской, криминалистической, токсикологической и клинической экспертиз методом ВЭЖХ-МСВР с орбитальной ионной ловушкой.

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием современного аналитического оборудования, систематическим характером исследования, тщательной валидацией и верификацией на реальных биологических образцах методик исследования.

Личный вклад автора

Результаты, представленные в данной работе, получены лично автором или его непосредственном участии в эксперименте, а также под его руководством. Постановка задач, обработка и интерпретация результатов выполнена автором.

Полученные экспериментальные результаты и выводы в полном объеме опубликованы в 21 статье, рекомендованных ВАК и 3 патентах. Диссертация соответствует требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям, установленным в пп. 9-11, 13-14 "Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. в ред. Постановления № 335 от 21 апреля 2016 г.)

2. Рекомендовать диссертационную работу Вирусю Э.Д. «Развитие жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения как метода скрининга физиологически активных веществ в сложных по составу смесях» на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия к защите на диссертационном совете Д 002.109.01 в ГЕОХИ РАН.

3. Рекомендовать в качестве оппонентов:

Бродского Ефима Соломоновича, д.х.н., старшего научного сотрудника, заведующего лабораторией аналитической экотоксикологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН (ИПЭЭ РАН)

Заикина Владимира Георгиевича, профессора, д.х.н., главного научного сотрудника лаборатории спектральных исследований Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ордена Трудового Красного

Знамени Института нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН (ИНХС РАН).

Родина Игоря Александровича, д.х.н., в.н.с, заместитель декана по научно-инновационной работе химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (МГУ).

4. Рекомендовать в качестве ведущей организации:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН

Результаты голосования: «за» - 25 чел., «против» - нет, «воздержалось» - нет, протокол № 4 от 4 марта 2020 года.

Председатель семинара,
академик РАН, д.х.н.



Борис Федорович Мясоедов

Секретарь семинара,
к.х.н.



Елена Александровна Захарченко

«УТВЕРЖДАЮ»

и.о. директора ФГБУ АДЦ

Мочалова Е.С.

2017 года



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения «Антидопинговый центр» по диссертации Вириуса Эдуарда Даниэлевича на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 02.00.02 – «Аналитическая химия»

Диссертация **«Развитие жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения как метода скрининга физиологически активных веществ в сложных по составу смесях»** выполнена на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Антидопинговый центр» (ФГБУ АДЦ).

В период подготовки диссертации соискатель, кандидат химических наук Вириус Эдуард Даниэлевич работал в лаборатории функциональной протеомики и метаболомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (ФГБНУ НИИОП) в должности ведущего научного сотрудника.

В 1994 г. Вириус Э.Д. окончил физико-химический факультет Московского института стали и сплавов по специальности «физико-химические исследования металлургических процессов». В 2002 г. защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата химических наук по

теме «Идентификация следовых количеств компонентов сложных смесей методами хромато-масс-спектрометрии и тандемной хромато-масс-спектрометрии» по специальности 02.00.02 – «Аналитическая химия» в диссертационном совете при Химическом факультете Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова. Научный руководитель: профессор кафедры аналитической химии Химического факультета Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова, доктор химических наук, профессор Игорь Александрович Ревельский. С 2005 по 2013 гг. работал в ФГУП АДЦ (ныне ФГБУ АДЦ) в должности ведущего научного сотрудника.

Обсуждение докторской диссертации Вирюса Э.Д. на базе ФГБУ АДЦ проводилось 31 октября 2017 года.

На обсуждении присутствовали: и.о. директора ФГБУ АДЦ Е.С. Мочалова; заместитель начальника отдела хромато-масс-спектрометрических методов анализа (ХМСМА), кандидат химических наук, Д.В. Раков – секретарь заседания; начальник отдела пептидного допинга и анализа крови (ПДиАК), кандидат биологических наук, М.П. Никитина; заместитель начальника отдела ПДиАК, кандидат химических наук, П.В. Постников – председатель заседания; старший научный сотрудник отдела ХМСМА, кандидат химических наук, Н.Л. Бочкарёва; старший научный сотрудник отдела ПДиАК, Н.Б. Савельева; старший научный сотрудник отдела ХМСМА И.И. Подольский; научный сотрудник отдела ХМСМА, А.Л. Чуловская; заместитель декана по инновационной деятельности Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, доктор химических наук, И.А. Родин; профессор кафедры аналитической химии Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, доктор химических наук, И.А. Ревельский; главный научный сотрудник отдела лабораторных, морфологических исследований Российского центра судебно-медицинской экспертизы

Минздрава России, доктор химических наук, С.А. Савчук; профессор отделения нанотехнологий в электронике, спинтронике и фотонике офиса образовательных программ федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», доктор физико-математических наук, А.А. Сысоев; аспирант кафедры аналитической химии Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Т.М. Байгильдиев.

Слушали:

1. Доклад Вирюса Э.Д. по докторской диссертации «Развитие жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения как метода скрининга физиологически активных веществ в сложных по составу смесях»;
2. Отзыв рецензента, заведующего лаборатории аналитической экотоксикологии Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, доктора химических наук, старшего научного сотрудника Ефима Соломоновича Бродского и сообщения рецензентов по докладу и диссертации: заместителя декана по инновационной деятельности Химического факультета Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова, доктора химических наук, Игоря Александровича Родина и главного научного сотрудника отдела лабораторных, морфологических исследований Российского центра судебно-медицинской экспертизы Минздрава России, доктора химических наук, Сергея Александровича Савчука, давших положительную оценку диссертационной работе.

В ходе обсуждения диссертационной работы Вирюса Э.Д. были заданы следующие вопросы и получены развернутые ответы:

Вопрос старшего научного сотрудника отдела ХМСМА ФГБУ АДЦ Подольского И.И.:

Широко известно, что стероиды в основном выводятся в мочу в виде глюкуронидов и сульфатов. Проводили ли Вы деконъюгацию и сульфатов и глюкуронидов или чего то одного?

Ответ: Был проведен ферментативный гидролиз глюкуронидов. Непосредственно глюкурониды и сульфаты в нативном виде не определяли.

Вопрос заместителя начальника отдела ПДиАК ФГБУ АДЦ, кандидата химических наук Постникова П.В.:

Вы сказали, что разработанная методика может определять 138 соединений из Запрещенного списка ВАДА (Всемирного антидопингового агентства) – стероидов, диаретиков, бета-блокаторов, маскирующих агентов и т.д. с большей чувствительностью. Это около 30% всех запрещенных соединений. А что делать с определением остальных соединений и как их определять, если для них предложенная методика не работает? Ведь список их неуклонно растет из года в год.

Ответ: Речь не идет о ликвидации всех аналитических процедур, которые в данный момент используются в современном допинг-контроле в пользу одной процедуры. Речь идет о высвобождении ресурсов в случае появления новых классов запрещенных веществ и разгрузке тройных квадруполей, у которых чувствительность падает с числом определяемых соединений.

Вопрос старшего научного сотрудника отдела ХМСМА ФГБУ АДЦ Подольского И.И.:

Может ли Ваша методика полностью заменить процедуры, использующие метод ГХ-МС/МС в допинг-контроле?

Ответ: Нет, методика не может полностью заменить ГХ-МС/МС.

Вопрос старшего научного сотрудника отдела ХМСМА ФГБУ АДЦ Подольского И.И.:

С 2014 года ВАДА обязало все антидопинговые лаборатории определять стероидный профиль. Может ли Ваша методика использоваться для количественного определения стероидов как того требует ВАДА?

Ответ: Нет, количественный анализ не проводили, только скрининг.

Вопрос профессора кафедры аналитической химии Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, доктора химических наук, профессора, Ревельского И.А.:

Как количественно ускорился анализ с повышением температуры?

Ответ: Он ускорился в 3 раза, если сравнивать с комнатной температурой.

Вопрос старшего научного сотрудника отдела ХМСМА ФГБУ АДЦ, кандидата химических наук Бочкаревой Н.Л.:

Какое преимущество имеет ваш метод по сравнению с существующими?

Ответ: Нет необходимости в стадии дериватизации. Если сравнивать с ВЭЖХ-МС/МС – это ретроспективность анализа, то есть возможность вернуться к прошлым данным, чтобы проверить наличие новых метаболитов благодаря сканированию по точным массам. Кроме того, нет необходимости в длительном поиске оптимальных условий столкновительной диссоциации и выборе характеристичных дочерних ионов.

Вопрос профессора кафедры аналитической химии Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, доктора химических наук, профессора, Ревельского И.А.:

Кратко сформулируйте научную новизну.

Ответ: Новизна заключается в следующем:

- Изучены возможности жидкостной хроматомасс-спектрометрии с орбитальной ионной ловушкой в решении проблем масс-спектрометрии запрещенных в спорте биорегуляторов и предложен круг ее приложений в допинговом контроле;
- Найдены условия фотохимической ионизации при атмосферном давлении, обеспечивающие уменьшение влияния эффектов «подавления ионизации» и «объемного заряда», характерных для высокоэффективной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии с орбитальной ионной ловушкой, при определении анаболических стероидов;
- Показаны преимущества высокотемпературной жидкостной хроматографии на пористом графитизированном углероде для решения задач допингового контроля;
- Изучены закономерности формирования масс-спектров стимуляторов, наркотиков, бета-блокаторов, бета-2-агонистов, диуретиков, маскирующих агентов, модуляторов метаболизма и анаболических стероидов в условиях химической ионизации при электрораспылении;
- Использована химическая ионизация, индуцированная электрораспылением, для минимизации влияния эффекта «объемного заряда» при анализе проб мочи;
- Найдены оптимальные условия химической ионизации, индуцируемой электрораспылением, для определения стимуляторов, наркотиков, бета-блокаторов, бета-2-агонистов, диуретиков, маскирующих агентов, модуляторов метаболизма и анаболических стероидов;

- Предложен способ выявления «труднодериватизируемых» стероидов, основанный на установление выхода реакции дериватизации;
- Показаны преимущества магнитной сепарации, как способа уменьшения влияния эффекта подавления ионизации макрокомпонентами;
- Предложена методология быстрого скрининга физиологически активных веществ в сложных по химическому составу смесях, основанная на методе жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии с орбитальной ионной ловушкой в сочетании с различными способами ионизации.

Вопрос профессора кафедры аналитической химии Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, доктора химических наук, профессора, Ревельского И.А.:

Прошел ли способ валидацию?

Ответ: Да, согласно ISO 17025 и рекомендациям Европейской ассоциации аналитиков.

Вопрос профессора кафедры аналитической химии Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, доктора химических наук, профессора, Ревельского И.А.:

Сколько реальных образцов было проанализировано разработанной Вами методикой?

Ответ: От 3500 до 4700 проб в год с 2008 по 2012 гг.

Вопрос профессора кафедры аналитической химии Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, доктора химических наук, профессора, Ревельского И.А.:

Одобрена ли Ваша методика ВАДА?

Ответ: Исследования по изучению возможностей методики и ее применения в допинг-контроле финансировались ВАДА с 2009 по 2011 гг. ВАДА дало положительный отзыв на результаты выполненных исследований в рамках исследовательского гранта. В настоящее время имеется более 100 ссылок на статьи, опубликованные в рамках диссертационной работы. С 2008 по 2012 гг. методика использовалась в аналитической практике допинг-контроля.

Вопрос профессора кафедры аналитической химии Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, доктора химических наук, профессора, Ревельского И.А.:

Какие Вы видите пути усовершенствования методики?

Ответ: Самый очевидный путь – это ее сочетание с ультравысокоэффективной жидкостной хроматографией.

Вопрос профессора кафедры аналитической химии Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, доктора химических наук, профессора, Ревельского И.А.:

Видите ли Вы возможность минимизации времени анализа при скрининге за счет уменьшения длины колонки?

Ответ: Только при использовании сорбента с небольшим размером зерна. Иначе определяемые соединения будут мешать друг другу и способствовать возникновению эффекта «объемного заряда» в орбитальной ионной ловушке.

Вопрос главного научного сотрудника отдела лабораторных, морфологических исследований Российского центра судебно-медицинской экспертизы Минздрава России, доктора химических наук, Савчука С.А.:

Зачем нужно сверхвысокое разрешение для небольших молекул?

Ответ: Сверхвысокое разрешение способствует достижению высокой точности измерения масс. В свою очередь высокая точность позволяет достичь высокой селективности определения. Вкратце, уменьшается число «кандидатов» на точно установленную массу.

Вопрос главного научного сотрудника отдела лабораторных, морфологических исследований Российского центра судебно-медицинской экспертизы Минздрава России, доктора химических наук, Савчука С.А.:

Ухудшается ионизация матрицы, улучшается ионизация аналитов. Как это сказывается на чувствительности?

Ответ: Предел обнаружения улучшается от 8 до 76 раз в зависимости от определяемого соединения.

Вопрос главного научного сотрудника отдела лабораторных, морфологических исследований Российского центра судебно-медицинской экспертизы Минздрава России, доктора химических наук, Савчука С.А.:

На графитизированной саже ничего не терялось?

Ответ: Чтобы избежать потерь колонка нагревалась до 90°C.

Вопрос главного научного сотрудника отдела лабораторных, морфологических исследований Российского центра судебно-медицинской экспертизы Минздрава России, доктора химических наук, Савчука С.А.:

Как быть с эндогенными стероидами, они не мешают скринингу экзогенных?

Ответ: Нет, поскольку концентрация каждого отдельного эндогенного стероида меньше 10 мкг/мл и это не приводит к появлению эффекта «объемного заряда».

Вопрос главного научного сотрудника отдела лабораторных, морфологических исследований Российского центра судебно-медицинской экспертизы Минздрава России, доктора химических наук, Савчука С.А.:

Какими достоинствами обладает магнитная сепарация по сравнению с ТФЭ?

Ответ: При магнитной сепарации не наблюдается необратимой сорбции по сравнению с ТФЭ.

Отзыв доктора химических наук, Е.С. Бродского (рецензент), зачитывает секретарь заседания, заместитель начальника отдела ХМСМА, кандидат химических наук, Д.В. Раков.

Выдержка из отзыва: «Аналитическая практика в допинг-контроле всегда привлекает внимание как относящаяся к общественно значимым областям. Поэтому методы допинг-контроля непрерывно развиваются, чтобы, с одной стороны, обеспечить максимальную достоверность результатов, с другой стороны, стремиться обнаружить максимальное число запрещенных препаратов с минимальными затратами. Данная работа посвящена именно этому – развитию жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения для решения этой проблемы, поэтому актуальность ее не вызывает сомнений.

Высокие требования к экспрессности анализа и различие физико-химических свойств физиологически активных веществ, применяемых в составе допинг-препаратов, затрудняют разработку быстрого и эффективного способа очистки экстрактов. Сейчас существуют два подхода к определению таких соединений: исторически более ранний на основе газовой хромато-масс-спектрометрии и быстро развивающийся в последнее время подход на основе жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Данная диссертационная работа посвящена развитию этого метода.

Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, вполне обоснованы, поскольку базируются на тщательной проработке обширного литературного материала, точной постановке задачи, большой экспериментальной работе, использовании современной прецизионной аппаратуры и максимальном учете всех аспектов аналитической процедуры.

Достоверность результатов подтверждается систематическим характером исследования, тщательной валидацией разработанных методик, анализом образцов проб добровольцев, принимавших запрещенные препараты, а также результатами межлабораторных испытаний, организованными ВАДА.

Благодаря разработанным в работе подходам (фотохимическая ионизация при атмосферном давлении, химическая ионизация, инициируемая электрораспылением), обеспечивающим минимизацию эффекта «пространственного заряда», характерного для масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения (орбитальная ионная ловушка и масс-анализатор ионно-циклотронного резонанса), предложены новые способы быстрого скрининга стимуляторов, наркотиков, бета-блокаторов, бета-2-агонистов, диуретиков, маскирующих агентов, модуляторов метаболизма, кортикостероидов и анаболических стероидов (около 150 соединений) методами высокотемпературной и высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией сверхвысокого разрешения.

Результаты диссертационной работы вносят большой вклад в совершенствование аналитических подходов допинг-контроля, увеличивая их достоверность и расширяя арсенал возможностей Антидопинговых служб. Разработанная методика прошла валидацию и метрологическую аттестацию и показала высокую эффективность на практике. В частности, предложенный

подход, основанный на химической ионизации при атмосферном давлении, позволяет обнаружить короткоживущий метаболит оксандролонa через две недели после прекращения его приема.

Предложенные в работе подходы также открывают новые возможности для проведения медико-биологических исследований, эколого-аналитического мониторинга, санитарного контроля продуктов питания, судебно-медицинской, криминалистической, токсикологической и клинической экспертиз с применением орбитальной ионной ловушки. Кроме того, эти подходы создают условия для достоверного установления подлинности лекарственных препаратов и созданию комбинаторных библиотек на ранней стадии поиска физиологически активных веществ растительного происхождения методом хроматомасс-спектрометрии сверхвысокого разрешения. В частности, внедрение жидкостной хроматомасс-спектрометрии сверхвысокого разрешения с химической ионизацией, инициируемой электрораспылением, в клиничко-токсикологические лаборатории, работающие в отделениях интенсивной терапии, будет способствовать повышению эффективности терапевтического вмешательства.

Основные результаты работы были представлены в виде докладов на российских и международных конференциях. По материалам диссертационной работы подготовлено 3 патента и опубликована 21 статья в изданиях, рекомендуемых ВАК.

Диссертация написана хорошим языком, хорошо иллюстрирована рисунками, данные подробно представлены в таблицах.

Вместе с тем, к тексту диссертации есть замечания:

1. В литературном обзоре встречаются опечатки и неудачные выражения;

2. В таблицах отсутствует единообразие в представлении точности измерения масс;
3. В обзоре литературы старая ссылка на Руководство ВАДА по применению метода хроматомасс-спектрометрии в допинг-контроле;
4. Название работы представляется не совсем удачным. Лучше изменить на что-нибудь вроде «Методология скрининга физиологически активных веществ в сложных смесях с помощью газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения».

Однако эти замечания относятся в основном к оформлению диссертации и не влияют на значимость, достоверность и полноту результатов. Диссертационная работа Э.Д. Вирюса представляет собой законченное исследование, выполненное на высоком профессиональном уровне, решающее важные научно-практические задачи. По объему выполненных работ, актуальности, научной и практической ценности, надежности и достоверности основных выводов диссертационная работа Эдуарда Даниэлевича Вирюса «Развитие жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения как метода скрининга физиологически активных веществ в сложных по составу смесях», представленная на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия, соответствует требованиям п. 9 постановления Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. «О порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора химических наук.

Ответ на замечания рецензента:

Я соглашусь с первыми тремя замечаниями. Однако я не могу согласиться с последним замечанием о названии работы. Работа посвящена именно развитию метода.

Выступление доктора химических наук, И.А. Родин (рецензент):

«Я соглашусь с отзывом Е.С. Бродского и его высокой оценкой работы Эдуарда Даниэлевича. Работа, вне всякого сомнения, актуальная и масштабная. В ней выполнен большой объем работы. К ней проявляют большой интерес. В литературе много ссылок на работы Эдуарда Даниэлевича. Исследованиями интересуются, их цитируют. Работа, действительно, вносит большой вклад в развитие жидкостной хромато-масс-спектрометрии в плане скрининга физиологически активных веществ. В ней решена важная проблема жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения. Нет сомнения, работу надо защищать. Безусловно, я ее рекомендую к защите. Вместе с тем, я также соглашусь, что в работе есть неудачные выражения и проблемы с терминологией, но это легко исправить. В частности, не думаю, что уместно использовать термин «сверхвысокое разрешение». Я считаю, что это понятие используют, скорее всего, в маркетинговых целях. Но если Эдуард Даниэлевич сможет привести убедительные доводы, я готов изменить своё мнение по этому вопросу. Кроме того, объем реферата чрезмерен. Очевидно, его надо сокращать. Я думаю, что только за счет сокращений можно уменьшить его объем на несколько страниц. Также считаю, что в автореферате не стоит выносить пункт о «выходе реакции», как отдельное положение, выносимое на защиту. Все эти замечания относятся к оформлению работы и не снижают ее значимость.

Ответ на замечания рецензента:

Я соглашусь с большинством замечаний. Не могу согласиться с замечанием, где речь идёт о сверхвысоком разрешении. Проблема

«объемного заряда» характерна только для масс-спектрометров сверхвысокого разрешения. К ним относится орбитальная ионная ловушка и масс-анализаторы ионно-циклотронного резонанса.

Выступление доктора химических наук, С.А. Савчука (рецензент):

Зачитывает выдержку из отзыва: «Большую часть конца XX века с разной степенью успешности использовали хроматомасс-спектрометры на основе газовой хроматографии. Однако во многих случаях эта методология ограничивала возможность обнаружения высокополярных продуктов превращения запрещенных в спорте ФАВ особенно в сложных по химическому составу смесях и требовала дополнительной пробоподготовки, в частности, дериватизации. Совершенно новые перспективы в этих исследованиях открыл гибридный метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией сверхвысокого разрешения. Его важнейшим достоинством является возможность детектирования полярных соединений в режиме полного сканирования, что позволяет получать значительный объем масс-спектрометрической информации в ходе одного анализа, тем самым обеспечивая его высокую производительность. Поэтому создание принципиально новых подходов к разработке масс-спектрометрических способов обнаружения ФАВ и продуктов их превращения, основанных на фундаментальных закономерностях фотохимической ионизации при атмосферном давлении и химической ионизации при электрораспылении, безусловно следует считать актуальной задачей. Именно в этой важнейшей области аналитической химии выполнена фундаментальная работа Вирюса Э.Д. Ее основной целью было развитие жидкостной хроматомасс-спектрометрии сверхвысокого разрешения для определения широкого круга ФАВ в сложных по химическому составу матрицах.

Научная новизна проведенных исследований и полученных результатов определяется совокупностью новых подходов, обеспечивающих минимизацию эффектов «подавления ионизации» и «объемного заряда», характерных для высокоэффективной ЖХ/МС сверхвысокого разрешения с ионизацией электрораспылением. Среди них подход, основанный на фотохимической ионизации аналитов при атмосферном давлении. Он заложил основу создания высокочувствительного способа скрининга 57 стероидов в моче методом высокотемпературной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения. Второй подход основан на использовании электрораспыления/ионизации. Он позволил разработать способ скрининга стимуляторов, наркотиков, бета-блокаторов, бета-2-агонистов, диуретиков, маскирующих агентов, модуляторов метаболизма, кортикостероидов и анаболических стероидов (всего 137 соединений) методом ЖХ/МС с орбитальной ионной ловушкой. При этом дополнительно были разработаны подходы к экспрессной подготовке образцов к анализу.

Практическая значимость представленной работы состоит в том, что Вирюсом Э.Д. предложены оригинальные методологические подходы, направленные на развитие метода ВЭЖХ/МС сверхвысокого разрешения, в которых особое внимание уделено высокочувствительному определению широкого круга ФАВ в сложных по химическому составу экстрактах из биологических жидкостей.

Работа прошла надежную апробацию. Ее результаты докладывались и обсуждались на представительных международных, российских и региональных конференциях. Автор диссертации неоднократно выступал с устными сообщениями на профильных конференциях как в России, так и за рубежом. Общее число тезисов докладов на конференциях насчитывает свыше 20 наименований. По материалам диссертации получено 3 патента на

изобретение и опубликована 21 статья в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации диссертационных исследований. Разработанные способы прошли апробацию во время проведения межлабораторных испытаний, организованных ВАДА в 2009-2012 гг.

Диссертационное сочинение Вирюса Э.Д. хорошо структурировано и систематически изложено. Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертации, соответствующей паспорту научной специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

По сути проведенного Э.Д. Вирюсом исследования замечаний нет. Отдельные недочеты встречаются только в диссертационном сочинении и автореферате:

1. На странице 116 не указано соединение и регистрируемый ион, для которых отношение сигнал к шуму составляет 38000 и 100000.
2. В таблице 14 не указаны полные названия детектируемых соединений (приведены сокращения)
3. В автореферате не приведена ион-молекулярная реакция, подтверждающая обоснованность использования фотохимической ионизации при атмосферном давлении при определении анаболических стероидов.

Сделанные замечания не снижают, однако, общей, безусловно положительной, оценки диссертационного исследования Вирюса Э.Д.

Результаты могут быть использованы при проведении медико-биологических исследований, эколого-аналитического мониторинга, санитарного контроля продуктов питания, судебно-медицинской, криминалистической, токсикологической и клинической экспертиз с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией сверхвысокого разрешения.

Диссертационная работа Вирусса Эдуарда Даниэлевича «Развитие жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения как метода скрининга физиологически активных веществ в сложных по составу смесях» по объему и качеству выполненных исследований, актуальности поставленной задачи, новизне, достоверности и научной обоснованности полученных результатов и выводов полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842. Проведенное масштабное исследование относится к типу научных квалификационных работ. В ней содержится решение проблемы, имеющей важное значение для развития методических основ высокочувствительного, селективного и экспрессного скрининга физиологически активных веществ в сложных по химическому составу смесях на базе жидкостной хроматомасс-спектрометрии сверхвысокого разрешения.

Ответ на замечания рецензента:

С замечаниями Савчука С.А. согласен.

При обсуждении с оценкой представленной работы выступили:

Профессор кафедры аналитической химии Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, доктор химических наук, Ревельский И.А. и профессор отделения нанотехнологий в электронике, спинтронике и фотонике офиса образовательных программ федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», доктор физико-математических наук, Сысоев А.А.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Актуальность работы

В последнее время, особый интерес представляет хромато-масс-спектрометрия сверхвысокого разрешения, как метод скрининга широкого

круга физиологически активных веществ. Хромато-масс-спектрометрия сверхвысокого разрешения позволяет избавиться от интерференций, давая возможность аналитику построить масс-хроматограммы для точно измеренных масс характеристичных ионов, работая в режиме полного сканирования. Из существующих масс-спектрометрических методов сверхвысокого разрешения, масс-спектрометрия с орбитальной ионной ловушкой, предложенная Макаровым в 2002-м году, удачно сочетает в себе достоинства времяпролетной масс-спектрометрии и масс-спектрометрии ионно-циклотронного резонанса. Вместе с тем, анализ биологических объектов сложного состава методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с орбитальной ионной ловушкой не является тривиальной задачей. Основным препятствием к анализу экстрактов из объектов сложного состава данным методом является эффект «объемного заряда», ассоциированный с «емкостью» орбитальной ионной ловушки. Поэтому работа Вирюса Э.Д., направленная на развитие жидкостной хроматомасс-спектрометрии сверхвысокого разрешения, как метода скрининга широкого круга физиологически активных веществ в сложных по химическому составу смесях, благодаря использованию новых подходов минимизации эффекта «объемного заряда», является актуальной.

Научная новизна

– Изучены возможности жидкостной хроматомасс-спектрометрии с орбитальной ионной ловушкой в решении проблем масс-спектрометрии запрещенных в спорте биорегуляторов и предложен круг ее приложений в допинговом контроле.

– Найдены условия фотохимической ионизации при атмосферном давлении, обеспечивающие уменьшение влияния эффектов «подавления ионизации» и «объемного заряда», характерных для высокоэффективной

жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии с орбитальной ионной ловушкой, при определении анаболических стероидов

- Показаны преимущества высокотемпературной жидкостной хроматографии на пористом графитизированном углероде для решения задач допингового контроля

- Изучены закономерности формирования масс-спектров стимуляторов, наркотиков, бета-блокаторов, бета-2-агонистов, диуретиков, маскирующих агентов, модуляторов метаболизма и анаболических стероидов в условиях химической ионизации при электрораспылении

- Использована химическая ионизация, индуцированная электрораспылением, для минимизации влияния эффекта «объемного заряда» при анализе проб мочи

- Найдены оптимальные условия химической ионизации, индуцируемой электрораспылением, для определения стимуляторов, наркотиков, бета-блокаторов, бета-2-агонистов, диуретиков, маскирующих агентов, модуляторов метаболизма и анаболических стероидов

Практическая значимость

Практическая значимость представленной работы состоит в том, что предложены методологические подходы, направленные на развитие метода ВЭЖХ/МС сверхвысокого разрешения, в которых особое внимание уделено высокочувствительному определению широкого круга ФАВ в сложных по химическому составу экстрактах из биологических жидкостей.

Разработанная методика прошла валидацию и метрологическую аттестацию и показала высокую эффективность в аналитической практике допинг-контроля. В частности, предложенный подход, основанный на химической ионизации при атмосферном давлении, позволяет обнаружить короткоживущий метаболит оксандролона через две недели после прекращения его приема.

Разработанные способы прошли апробацию во время проведения межлабораторных испытаний, организованных ВАДА в 2009-2012 гг.

Предложенные в работе подходы также открывают новые возможности для проведения медико-биологических исследований, эколого-аналитического мониторинга, санитарного контроля продуктов питания, судебно-медицинской, криминалистической, токсикологической и клинической экспертиз с применением орбитальной ионной ловушки. Кроме того, эти подходы создают условия для достоверного установления подлинности лекарственных препаратов и созданию комбинаторных библиотек на ранней стадии поиска физиологически активных веществ растительного происхождения методом хроматомасс-спектрометрии сверхвысокого разрешения. В частности, внедрение жидкостной хроматомасс-спектрометрии сверхвысокого разрешения с химической ионизацией, инициируемой электрораспылением, в клинικο-токсикологические лаборатории, работающие в отделениях интенсивной терапии, будет способствовать повышению эффективности терапевтического вмешательства.

Личное участие соискателя в получении результатов

Результаты, представленные в данной работе, получены лично автором или при его непосредственном участии в эксперименте, а также под его руководством. Постановка задач, обработка и интерпретация результатов выполнена автором.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Достоверность результатов подтверждается систематическим характером исследования, тщательной валидацией разработанных методик, анализом «реальных» образцов – проб добровольцев, принимавших запрещенные препараты, а также результатами межлабораторных испытаний, организованными ВАДА.

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем ученой степени

Общее число тезисов докладов на конференциях насчитывает свыше 20 наименований. По материалам диссертации получено 3 патента на изобретение и опубликована 21 статья в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации диссертационных исследований.

Научная специальность

Диссертационная работа Вирюса Э.Д. соответствует областям исследования, указанных в пункте 2 паспорта специальности 02.00.02 – «Аналитическая химия».

Ценность научных работ

Исследование относится к типу научных квалификационных работ. В работе содержится решение проблемы, имеющей важное значение для развития методических основ высокочувствительного и селективного скрининга физиологически активных веществ в сложных по химическому составу смесях на базе жидкостной хроматомасс-спектрометрии сверхвысокого разрешения. Материалы диссертации изложены в полном объеме и имеют практическую и научную ценность.

Диссертационная работа Вирюса Эдуарда Даниэлевича «Развитие жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения как метода скрининга физиологически активных веществ в сложных по составу смесях», представленная на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 02.00.02 – «Аналитическая химия», по объему и качеству выполненных исследований, актуальности поставленной задачи, новизне, достоверности и научной обоснованности полученных результатов и выводов соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842.

Постановили

Диссертация «Развитие жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения как метода скрининга физиологически активных веществ в сложных по составу смесях» Вирюса Э.Д. рекомендуется к защите на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 02.00.02 – «Аналитическая химия» (химические науки).

Председатель заседания,
заместитель начальника
отдела ПДиАК ФГБУ АДЦ,
кандидат химических наук

Постников П.В.

Секретарь заседания,
заместитель начальника
отдела ХМСМА ФГБУ АДЦ,
кандидат химических наук

Раков Д.В.

Рецензия

на диссертационную работу Вириуса Эдуарда Даниэлевича «Развитие жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения как метода скрининга физиологически активных веществ в сложных по составу смесях», представленную на соискание учёной степени доктора химических наук по специальности 02.00.02 – «Аналитическая химия»

Высококчувствительное определение биологически активных органических соединений в пробах сложного состава является одной из наиболее актуальных задач аналитической химии и требует применения современных информативных методов анализа. В рецензируемой диссертационной работе развиваются новые подходы к решению задачи быстрого обнаружения следовых количеств физиологически активных веществ в жидких биологических образцах с использованием комбинации высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения. Тема диссертационной работы представляет большой интерес, вызываемый как разработкой экспрессных и универсальных способов масс-спектрометрического анализа сложных по химическому составу органических образцов, так и практическими аспектами применения разработанных способов в медицине и допинг-контроле. Поэтому **актуальность** таких исследований не вызывает сомнений.

Диссертационная работа изложена на 277 страницах печатного текста, состоит из введения, семи глав, выводов, списка использованной литературы из 234 наименований и трех приложений. Первая глава представляет собой литературный обзор, вторая глава – экспериментальную часть, главы 3-7 содержат оригинальные результаты. В разделе «Выводы» сформулированы основные результаты диссертации. В приложениях представлены масс-спектры исследованных соединений.

Представленные автором диссертационной работы основные научные результаты, положения и рекомендации получены впервые и отличаются несомненной **научной новизной**. Соискателем проведена количественная оценка вклада в матричный эффект процессов, связанных с особенностями методов

ионизации при атмосферном давлении, и процессов, обусловленных работой масс-анализатора с орбитальной ионной ловушкой. На этой основе предложены подходы, позволяющие значительно снизить влияние матричных эффектов на результаты анализа при определении физиологически активных веществ в экстрактах из биологических жидкостей. Проведен сравнительный анализ аналитических характеристик различных методов ионизации в сочетании с масс-анализатором сверхвысокого разрешения, на основе которого разработан и апробирован на реальных образцах целый ряд способов скрининга запрещенных физиологически активных веществ, в частности, бета-агонистов и анаболических стероидов (всего 29 соединений) с использованием метода химической ионизацией при атмосферном давлении, 57 анаболических стероидов с использованием фотохимической ионизации при атмосферном давлении, и также стимуляторов, наркотиков, бета-блокаторов, бета-2-агонистов, диуретиков, маскирующих агентов, модуляторов метаболизма и анаболических стероидов (всего 120 соединений) с использованием химической ионизации, индуцированной электрораспылением. Предложен способ выявления «труднодериватизируемых» стероидов, основанный на установление выхода реакции дериватизации

Достоверность и обоснованность научных положений, результатов и выводов обусловлена применением современных физико-химических методов исследования и высокотехнологического оборудования, большим количеством экспериментальных данных, соответствием результатов эксперимента и литературных данных, а также апробацией работы на ведущих российских и международных конференциях.

Практическое значение диссертационной работы Вирюса Э.Д. очевидно. Разработаны экспрессные, производительные и универсальные способы определения широкого круга физиологически активных веществ. Спектр потенциальных областей применения результатов работы весьма широк. Разработанные методы и подходы могут применяться в медицинской практике для терапевтического лекарственного мониторинга, для решения задач фармакокинетики, для проведения судебно-медицинской, криминалистической, токсикологической и клинической экспертиз.

По работе имеются вопросы и замечания:

1. Необходимо более внимательно отнестись к метрологическим характеристикам при представлении экспериментальных данных. Не приведено ни одного градуировочного графика и непонятно, каким образом оценивали пределы обнаружения. Если по одной точке, как это описано на стр. 125 и стр. 163, то это неприемлемо. Часто отсутствуют доверительные интервалы, особенно при исследовании матричных эффектов.

2. Выбор процедуры пробоподготовки при анализе сложных по химическому составу образцов является одним из ключевых факторов, влияющих на результаты анализа. Каково были критерии при выборе использованной в работе схемы пробоподготовки при анализе биологических жидкостей? Исследовались ли другие варианты?

3. Очень кратко и схематично изложен способ минимизации эффекта подавления ионизации макрокомпонентами мочи, основанный на применении магнитных наночастиц с поверхностью, модифицированной группами C_{18} (раздел 7.2). Неясно, каков механизм «необратимой сорбции интерферирующих компонентов матрицы» (стр. 221). Для каких аналитов применим предложенный способ?

4. Текст диссертационной работы необходимо тщательно «вычитать». Он содержит значительное количество неточностей, ошибок и неоднократного дублирования одной и той же информации.

Однако приведенные замечания не снижают существенно ценность представленной работы.

Диссертационная работа соответствует всем требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям (п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335 «О внесении изменений в положение о присуждении ученых степеней»). Диссертация является законченной исследовательской работой, выполненной на высоком научном уровне, отвечает

паспорту специальности 02.00.02 – Аналитическая химия (Химические науки) и может быть **представлена к защите** на диссертационном совете Д 002.109.01.

Рецензент



А.А.Гречников



Подпись руки
удостоверено

Гречников Александр Анатольевич
Иванов Алексей Анатольевич
Зав. секцией ГЕОХИ РАН

Сведения о рецензенте:

1. Гречников Александр Анатольевич
2. Доктор химических наук (02.00.02 – «Аналитическая химия»)
3. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ордена Ленина и Ордена Октябрьской Революции Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской академии наук
4. Ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории
5. 119991, г. Москва, ул. Косыгина, д.19
6. Тел.: 499-137-4852
7. e-mail: grechnikov@geokhi.ru

Отзыв рецензента
на диссертационную работу
Вирюса Эдуарда Даниэлевича
«Развитие жидкостной хромато-масс-спектрометрии
сверхвысокого разрешения как метода скрининга физиологически активных
веществ в сложных по составу смесях»

на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности
02.00.02 – Аналитическая химия

рецензент: Заикин Владимир Георгиевич, доктор химических наук, главный научный сотрудник лаборатории спектральных исследований Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ордена Трудового Красного Знамени Института нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук (ИНХС РАН)

119991, ГСП-1, Москва, Ленинский проспект, д. 29

e-mail: zaikin@ips.as.ru
т/факс 8(495) 954-22-69

Актуальность диссертационной работы Э.Д. Вирюса обусловлена постоянным интенсивным поиском новых и усовершенствованием известных методов скрининга физиологически активных веществ (ФАВ) в сложнейших по составу биологических матрицах, направленным на создание все более чувствительных, прецизионных, селективных и экспрессных аналитических приемов. В этом плане особенно остро стоит важнейшая аналитическая проблема быстрого установления фактов применения допинговых препаратов, что и стало предметом данной диссертации. В ней предпринята разработка принципиально новых подходов к обнаружению ультрамалых концентраций ФАВ и продуктов их биопревращения, основанных на фундаментальных закономерностях ионизации аналитов, которые реализуются в масс-спектрометрах сверхвысокого разрешения.

Научная новизна проведенных Э.Д. Вирюсом исследований в рамках рецензируемой диссертации не вызывает никакого сомнения. Для экспрессного детектирования и определения широкого круга ФАВ в сложных по химическому составу объектах диссертант впервые применил гибридный метод высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения, основанной на использовании орбитальной ионной ловушки (Орбитрэп), который открыл новые перспективы в допинговом контроле. Его основным преимуществом является возможность бездериватизационного определения соединений в режиме полного сканирования, а также возможность высокоточного установления масс ионов и, следовательно, их элементного состава, что позволяет получать значительный объем масс-спектрометрических данных в ходе одного анализа, тем самым обеспечивая его высокую производительность. Впервые диссертантом системно исследованы причины матричных эффектов «подавления ионизации» и «объемного заряда», проявляющихся при электрораспылении и функционировании орбитальной ловушки и ухудшающих пределы детектирования аналитов, и предложены приемы их минимизации. Впервые проведен масштабный сопоставительный анализ результатов, получаемых с использованием различных методов ионизации - ИЭР, ХИАД, ФХИАД и др., и предложены рекомендации по их предпочтительному использованию при допинг-контроле. Так для детектирования ФАВ и продуктов их метаболизма предложено использовать два эффективных масс-спектрометрических подхода, основанных на фотохимической ионизации аналитов при атмосферном давлении и на ионизации электрораспылением. Первый из них заложил основу создания высокочувствительного способа скрининга 57 стероидных соединений в моче. Второй вариант позволил разработать способ скрининга стимуляторов, наркотиков, бета-блокаторов, бета-2-агонистов, диуретиков, маскирующих агентов, модуляторов метаболизма, кортикостероидов и анаболических стероидов (суммарно 137 соединений) методом ЖХ/МС с орбитальной

ионной ловушкой высокого разрешения. Таким образом, в диссертационной работе Э.Д.Вирюсом разработаны новые методологические принципы, позволяющие наиболее эффективно использовать комбинированную технику на базе ВЭЖХ и масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения для анализа ФАВ и продуктов их метаболизма в живом организме.

Практическая значимость работы Э.Д.Вирюса состоит в создании оригинальных и универсальных методологических подходов, направленных на развитие комбинированного метода ВЭЖХ и масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения с упором на увеличение экспрессности анализа и высокочувствительного определения различных ФАВ в сложнейших по химическому составу биологических жидкостях. Полученные результаты открывают новые перспективы для использования ВЭЖХ/МС в различных биохимических и медицинских анализах, метаболомике, допинг-контроле, криминалистике, судебно-медицинской экспертизе, экологическом мониторинге, контроле пищевых продуктов и других областях.

Работа прошла надежную апробацию. Ее результаты докладывались и обсуждались на международных, российских и региональных конференциях. По материалам диссертации получено 3 патента на изобретение и опубликована 21 статья в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации диссертационных исследований. Предложенные автором подходы апробировались также межлабораторными испытаниями, проводимыми по инициативе ВАДА (2009-2012 гг.).

Новый вариант диссертации Вирюса Э.Д. лучше структурирован и адекватно иллюстрирован. Литературный обзор полно освещает современное состояние исследований в области скрининга ФАВ и продуктов их метаболизма в биологических жидкостях с применением различных аналитических методов. Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертации, соответствующей паспорту научной специальности 02.00.02 — Аналитическая химия.

В процессе переработки внесены следующие изменения в текст диссертационного сочинения и соответственно в автореферат:

- в тексте диссертации сделан более четкий упор на создание новой методологии скрининга запрещенных веществ, которая позволила существенно уменьшить влияние матричных эффектов, связанных с применением орбитальной ионной ловушки, и повысить чувствительность анализа;

- реструктурированы главы 3-5: третья глава теперь полностью посвящена описанию проблем, возникающих при применении только ионизации электрораспылением, и имеет новое название «Ограничения высокоэффективной жидкостной хроматографии/орбитальной ионной ловушки с электрораспылительной ионизацией»; из третьей главы материал, относящийся к ХИАД и ФХИАД, перенесен в четвертую и пятую главу соответственно; в главах 3-6 более детально описаны и обсуждены результаты исследования матричных эффектов при применении орбитальной ионной ловушки в сочетании с ИЭР, ХИАД, ФХИАД и ХИИЭР;

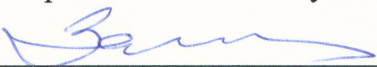
- в текст диссертации добавлены приложения, содержащие масс-спектры всех исследованных соединений в условиях ХИАД, ФХИАД и ХИИЭ, облегчающие понимание изложенных результатов;

- в автореферате стали более четкими переформулированные задачи исследований, а в положениях, выносимых на защиту, приведены численные значения, которые конкретизируют достигнутые в работе результаты.

Вместе с тем хочется отметить, что Выводы были изменены не в лучшую сторону. Автор пошел по пути конкретизации результатов исследований, почему-то исключив обобщающие положения, систематизирующие актуальные и принципиально новые методологические решения диссертанта. Нужно, однако, сказать, что все эти положения довольно убедительно изложены во вводной части диссертации. Таким образом, диссертация Э.Д. Вирюса в ее новом варианте безусловно заслуживает положительной оценки.

Резюмируя следует констатировать, что диссертационная работа Вирюса Эдуарда Даниэлевича «Развитие жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения как метода скрининга физиологически активных веществ в сложных по составу смесях» по актуальности поставленной задачи, новизне, объему и качеству выполненных исследований, достоверности и научной обоснованности полученных результатов и выводов полностью соответствует требованиям пункта 9 "Положения о присуждении ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842. Тема и содержание исследования полностью соответствует заявленной научной специальности. Проведенное масштабное исследование относится к типу научных квалификационных работ. В ней содержится решение проблемы, имеющей важное значение для развития методических основ высокочувствительного, селективного и экспрессного скрининга физиологически активных веществ в сложных по химическому составу биологических смесях на базе жидкостной хроматомасс-спектрометрии сверхвысокого разрешения. Сам же диссертант Вирюс Э.Д. заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 02.00.02 — Аналитическая химия.

Доктор химических наук по специальности 02.00.03 «Органическая химия»

 Заикин Владимир Георгиевич

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ордена Трудового Красного Знамени Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук (ИНХС РАН).

119991, ГСП-1, Москва, Ленинский проспект, д. 29,

тел. 8 (495) 954-22-69;

e-mail: zaikin@ips.ac.ru

Подпись главного научного сотрудника лаборатории спектральных исследований ИНХС РАН Заикина В.Г. удостоверяю:

Ученый секретарь ИНХС РАН, кандидат химических наук, доцент

10.01.2020



Ю.В. Костина

Костина Ю.В.

Рецензия на диссертационную работу Эдуарда Даниэлевича Вирюса
«Развитие жидкостной хромато-масс-спектрометрии
Сверхвысокого разрешения как метода скрининга
Физиологически активных веществ в сложных по
составу смесях»,

представленной на соискание ученой степени доктора химических наук по
специальности 02.00.02 – Аналитическая химия

Определение содержания физиологически активных органических соединений в биологических объектах представляет собой сложную и актуальную задачу современной аналитической химии. Оптимальным инструментом, для решения данной задачи является метод жидкостной хромато-масс-спектрометрии, однако его широкому применению препятствует отсутствие необходимой методологической базы.

В рамках настоящей работы автор осуществляет развитие жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения как метода быстрого скрининга широкого круга ФАВ в сложных по составу смесях. Предложены эффективные подходы, позволяющие решать такие серьезные проблемы метода как “матричный эффект” и “эффект пространственного заряда”.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, пяти глав с обсуждением полученных результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 227 страницах, содержит 37 рисунков и 20 таблиц.

Список использованной литературы включает 234 наименования. Литературный обзор достаточно полный и отражает тематику диссертационной работы. Представленный литературный обзор вполне соответствует своему назначению. Структура диссертации и прочие формальные критерии традиционны, содержание диссертации полностью соответствует паспорту специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

По мнению рецензента, следует отметить большой объем проделанной работы и ее научное качество. Несомненным достоинством диссертации Э.Д. Вирюса является удачное сочетание важных научных аспектов и большой практической значимости.

По работе есть ряд замечаний и вопросов.

1. Термин «Масс-спектрометрия сверхвысокого разрешения» имеет скорее маркетинговое происхождение и применение чем научное, логичным является разделение масс-спектрометрии на масс-спектрометрию низкого разрешения, где точность измерения значений m/z недостаточна для оценки брутто-формулы и масс-спектрометрию высокого разрешения, где оценка брутто-формулы возможно на основе измерения точной моноизотопной массы. Так как автор работает в режиме масс-спектрометрии высокого разрешения, предлагается

использовать именно этот термин.

2. Поскольку автор делает акцент на собственном приоритете в использовании масс-спектрометрии высокого разрешения на приборах типа “орбитальная ловушка” для быстрого скрининга широкого круга ФАВ в сложных по составу смесях, интересным было бы провести критическое сравнение возможностей предложенного подхода с возможностями подходов, основанных на использовании приборов других типов (например времяпролетных).

3. В диссертации и автореферате автор приводит интересные и важные результаты по использованию метода твердофазной экстракции с последующей магнитной сепарации частиц для снижения матричного эффекта, однако по неизвестной причине данный важный в практическом плане результат не отражен в разделе “практическая значимость” автореферата и положениях, выносимых на защиту.

Есть ряд мелких недостатков и/или опечаток.

В целом, однако, работа Э.Д. Вирюса производит положительное впечатление. Это цельная работа с реально поставленной и достигнутой научной целью. Работоспособность предложенного подхода подтверждена на действительно сложных для химического анализа объектах. Сделанные замечания носят частный характер и не снижают общей оценки работы.

Основное содержание диссертации в полной мере отражено в автореферате и опубликованных статьях.

Диссертация Э.Д. Вирюса является законченным исследованием, выполненным на высоком теоретическом и экспериментальном уровне, обладает несомненной практической направленностью и отвечает требованиям нормативных документов ВАК РФ, предъявляемым к докторским диссертациям, поэтому может быть рекомендована для рассмотрения в диссертационном совете.

Рецензент,
старший научный сотрудник,
заместитель декана по научно-инновационной работе
химического факультета,
Московского государственного университета
имени М.В. Ломоносова
доктор химических наук И.А. Родин



Отзыв рецензента

на диссертационную работу Вирюса Эдуарда Даниэлевича
«Развитие жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого
разрешения как метода скрининга физиологически активных веществ
в сложных по составу смесях»,
представленную на соискание ученой степени доктора химических наук
по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия

Актуальность темы исследования

Аналитическая практика в допинг-контроле всегда привлекает внимание как относящаяся к общественно значимым областям. Поэтому методы допинг-контроля непрерывно развиваются, чтобы, с одной стороны обеспечить максимальную достоверность результатов, с другой стороны, стремиться обнаружить максимальное число запрещенных препаратов с минимальными затратами. Данная работа посвящена именно этому – развитию жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения для решения этой проблемы, поэтому актуальность ее не вызывает сомнений.

Высокие требования к экспрессности анализа и различие физико-химических свойств физиологически активных веществ, применяемых в составе допинг-препаратов, затрудняют разработку быстрого и эффективного способа очистки экстрактов. Сейчас существуют два подхода к определению таких соединений: исторически более ранний на основе газовой хромато-масс-спектрометрии и быстро развивающийся в последнее время подход на основе жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Данная диссертационная работа посвящена развитию этого последнего метода.

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

Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, вполне обоснованы, поскольку базируются на тщательной проработке обширного литературного материала, точной постановке задачи, большой экспериментальной работе, использовании современной прецизионной аппаратуры и максимальном учете всех аспектов аналитической процедуры.

Достоверность и новизна результатов, полученных в диссертации.

Достоверность результатов подтверждается систематическим характером исследования, тщательной валидацией разработанных методик, анализом «натурных» образцов - проб добровольцев, принимавших запрещенные препараты, а также результатами межлабораторных испытаний, организованными ВАДА.

Благодаря разработанным в работе подходам (фотохимическая ионизация при атмосферном давлении, химическая ионизация, инициируемая электрораспылением), обеспечивающим минимизацию эффекта «пространственного заряда», характерного для масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения (орбитальная ионная ловушка и масс-анализатор ионно-циклотронного резонанса), предложены новые способы быстрого скрининга стимуляторов, наркотиков, бета-блокаторов, бета-2-агонистов, диуретиков, маскирующих агентов, модуляторов метаболизма, кортикостероидов и анаболических стероидов (около 150 соединений) методами высокотемпературной и высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией сверхвысокого разрешения.

Значение полученных результатов для науки и практики

Результаты диссертационной работы вносят большой вклад в совершенствование аналитических подходов допинг-контроля, увеличивая их экспрессность и достоверность и расширяя арсенал возможностей Антидопинговых служб. Разработанная методика прошла валидацию и метрологическую аттестацию и показала высокую эффективность на практике. В частности, предложенный подход, основанный на химической ионизации при атмосферном давлении, позволяет обнаружить короткоживущий метаболит оксандролона через две недели после прекращения его приема.

Предложенные в работе подходы также открывают новые возможности для проведения медико-биологических исследований, эколого-аналитического мониторинга, санитарного контроля продуктов питания, судебно-медицинской, криминалистической, токсикологической и клинической экспертиз с применением орбитальной ионной ловушки. Кроме того, эти подходы создают условия для

достоверного установления подлинности лекарственных препаратов и созданию комбинаторных библиотек на ранней стадии поиска физиологически активных веществ растительного происхождения методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии сверхвысокого разрешения. В частности, внедрение жидкостной хроматомасс-спектрометрии сверхвысокого разрешения с химической ионизацией, инициируемой электрораспылением, в клиничко-токсикологические лаборатории, работающие в отделениях интенсивной терапии, будет способствовать повышению эффективности терапевтического вмешательства.

Общая оценка содержания диссертации, ее завершенность

Диссертационная работа изложена на 229 страницах, состоит из введения, семи глав, заключения, выводов и списка использованных источников, включающего 214 ссылок, содержит 27 рисунка, 20 таблиц.

Во введении обоснована актуальность работы, ее цели и задачи.

Глава 1 представляет собой систематизацию работ, посвященных определению запрещенных в спорте физиологически активных веществ методами газовой хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией. Проанализированы возможности и ограничения орбитальной ионной ловушки и намечены подходы к скринингу широкого круга физиологически активных веществ в биологических объектах сложного состава.

В главе 2 описана экспериментальная часть: оборудование и методики экспериментов. Приведены условия экспериментов при использовании газовой и жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией низкого и высокого разрешения.

В главе 3 изучен потенциал высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с орбитальной ионной ловушкой для решения задач масс-спектрометрического обнаружения запрещенных в спорте биорегуляторов. Показано, что эффекты «пространственного заряда» и «подавления ионизации компонентами матрицы» препятствуют высокочувствительному скринингу широкого круга физиологически активных веществ в сложных смесях - экстрактах

мочи - методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения.

В главе 4 решена задача скрининга 26 «проблемных биорегуляторов» методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения с химической ионизацией при атмосферном давлении. Найдены хроматографические условия, приводящие к уменьшению «перегрузки» орбитальной ионной ловушки в условиях химической ионизации при атмосферном давлении. Благодаря этому достигнута высокая точность измерений масс, что свидетельствует о решении поставленной задачи - минимизации эффекта «пространственного заряда» для выбранных соединений. Проведена тщательная валидация и апробация предложенного способа определения.

В главе 5 представлен подход к скринингу анаболических стероидов, основанный на сочетании высокотемпературной хроматографии на графитизированном углеродном сорбенте с масс-спектрометрией на орбитальной ионной ловушке с фотохимической ионизацией при атмосферном давлении. Найдены условия для селективной фотохимической ионизации при атмосферном давлении 55 анаболических стероидов. Выполнена валидация и апробация предложенного способа определения. Проведено сравнение этого метода с существующими методами скрининга анаболических стероидов.

В главе 6 решена задача скрининга стимуляторов, наркотиков, бета-блокаторов, бета-2-агонистов, диуретиков, маскирующих агентов, модуляторов метаболизма, кортикостероидов и анаболических стероидов (всего 137 соединений) в моче, основанный на применении высокоэффективной жидкостной хроматографии/орбитальной ионной ловушки с химической ионизацией, инициируемой электрораспылением. Найдены условия, при которых наблюдается подавление ионизации мешающих компонентов матрицы и усиление ионизации определяемых соединений. Предложена химическая ионизация, инициированная электрораспылением, как способ ионизации физиологически активных веществ, запрещенных в спорте. Достигнута высокая точность измерения масс, таким образом, решена проблема «объемного заряда», характерная для орбитальной

ионной ловушки и масс-анализатора с ионно-циклотронным резонансом. Выполнена валидация и апробация предложенного подхода.

В первой части главы 7 предложен способ выявления аналитов, которые предпочтительно определять методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Во второй части главы 7 предложена магнитная сепарация как метод минимизации эффекта «подавления ионизации».

Результатом проведенных исследований стало развитие жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения как метода скрининга физиологически активных веществ в смесях сложного состава.

Публикации и апробация.

Основные результаты работы были представлены в виде докладов на российских и международных конференциях. По материалам диссертационной работы подготовлено 3 патента и опубликовано 21 статья в изданиях, рекомендуемых ВАК.

Диссертация написана хорошим языком, хорошо иллюстрирована рисунками, данные подробно представлены в таблицах.

Вместе с тем, к тексту диссертации есть замечания:

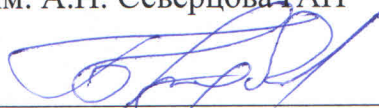
1. В литературном обзоре встречаются опечатки и неудачные выражения;
2. В таблицах отсутствует единообразие в представлении точности измерения масс;
3. В обзоре литературы старая ссылка на Руководство ВАДА по применению метода хромато-масс-спектрометрии в допинг-контроле.
4. Название работы представляется не совсем удачным. Лучше его изменить на что-нибудь вроде «Методология скрининга физиологически активных веществ в сложных смесях с помощью газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения».

Однако эти замечания относятся в основном к оформлению диссертации и не влияют на значимость, достоверность и полноту результатов. Диссертационная работа Э.Д. Вирюса представляет собой законченное исследование, выполненное на высоком профессиональном уровне, решающее важные научно-практические

задачи. По объему выполненных работ, актуальности, научной и практической ценности, надежности и достоверности основных выводов диссертационная работа Эдуарда Даниэлевича Вирюса «Развитие жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения как метода скрининга физиологически активных веществ в сложных по составу смесях», представленная на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия, соответствует требованиям п. 9 постановления Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. «О порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора химических наук, а Эдуард Даниэлевич Вирюс заслуживает присуждения ему искомой степени по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

Рецензент:

доктор химических наук,
старший научный сотрудник
Бродский Ефим Соломонович
заведующий лабораторией
аналитической экотоксикологии
Института проблем экологии и эволюции
им. А.Н. Северцова РАН



Е.С. Бродский

27.10.2017 г.

Москва, 119071

Ленинский проспект, 33

Тел. (499) 135 13 80. efbr@mail.ru



Подпись Бродского Е.С.
Заверяю, зав. канц. ИПЭЭ РАН Генер
"27" 10 2017 г.

ОТЗЫВ РЕЦЕНЗЕНТА
НА ДИССЕРТАЦИОННУЮ РАБОТУ
ВИРЮСА ЭДУАРДА ДАНИЭЛЕВИЧА
«РАЗВИТИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ
СВЕРХВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ КАК МЕТОДА СКРИНИНГА
ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В СЛОЖНЫХ ПО
СОСТАВУ СМЕСЯХ»

на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности

02.00.02 – Аналитическая химия

рецензент: Савчук Сергей Александрович, доктор химических наук, главный научный отдела лабораторных, морфологических исследований
Российского центра судебно-медицинской экспертизы Минздрава России

125284, Поликарпова 12/13
e-mail: serg-savchuk@yandex.ru
тел. 8(903) 740-93-90

Уже несколько десятилетий разработка все более эффективных, чувствительных, селективных и экспрессных методы скрининга в биологических объектах физиологически активных веществ (ФАВ), запрещенных в спорте, является исключительно важной задачей. Эти методы принципиально необходимы при установлении фактов применения допинговых препаратов. В соответствующих методологических исследованиях особенно важным является создание именно селективных и экспрессных способов анализа, исключающих длительную процедуру подготовки образцов к анализу, поскольку детектируемые соединения присутствуют в сложных по составу матрицах. К настоящему времени стало совершенно очевидным, что наиболее эффективными инструментами при разработке необходимых методик в данной области являются комбайны, включающие онлайн-хроматографическое разделение и масс-спектрометрическое детектирование. Большую часть конца XX века с разной степенью успешности использовали хроматомасс-спектрометры на основе газовой хроматографии. Однако во многих случаях эта методология

ограничивала возможность обнаружения высокополярных продуктов превращения запрещенных в спорте ФАВ особенно в сложных по химическому составу смесях и требовала дополнительной пробоподготовки, в частности, дериватизации. Совершенно новые перспективы в этих исследованиях открыл гибридный метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией сверхвысокого разрешения. Его важнейшим достоинством является возможность детектирования полярных соединений в режиме полного сканирования, что позволяет получать значительный объем масс-спектрометрической информации в ходе одного анализа, тем самым обеспечивая его высокую производительность. Поэтому создание принципиально новых подходов к разработке масс-спектрометрических способов обнаружения ФАВ и продуктов их превращения, основанных на фундаментальных закономерностях фотохимической ионизации при атмосферном давлении и химической ионизации при электрораспылении, безусловно следует считать **актуальной задачей**.

Именно в этой важнейшей области аналитической химии выполнена фундаментальная работа Вирюса Э.Д. Ее основной целью было развитие жидкостной хроматомасс-спектрометрии сверхвысокого разрешения для экспрессного определения широкого круга ФАВ в сложных по химическому составу матрицах. При этом основной упор был закономерно сделан на использовании современных высокоэффективных инструментах, объединяющих жидкостные хроматографы и масс-спектрометры с орбитальной ионной ловушкой, функционирующих в режиме химической и фотохимической ионизации при атмосферном давлении, а также химической ионизации в условиях электрораспыления.

Диссертация Вирюса Э.Д. имеет **традиционную структуру** и включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть, пять глав обсуждения собственных результатов, заключение и список цитируемой литературы.

Главы обсуждения результатов включают историю вопроса и постановку задачи, что облегчает понимание и анализ результатов работы.

Первая часть **обзора литературы** в полной мере отражает современное состояние исследований, посвященных скринингу ФАВ и продуктов их биотрансформации в биологических жидкостях различными аналитическими методами. Вторая часть обзора литературы отражает анализ достоинств и ограничений орбитальной ионной ловушки. Критически рассмотренный материал подтверждает актуальность и правомерность выполнения проведенного Э.Д. Вирюсом оригинального исследования.

Научная новизна проведенных исследований и полученных результатов определяется совокупностью новых подходов, обеспечивающих минимизацию эффектов «подавления ионизации» и «объемного заряда», характерных для высокоэффективной ЖХ/МС сверхвысокого разрешения с ионизацией электрораспылением. Среди них подход, основанный на фотохимической ионизации аналитов при атмосферном давлении. Он заложил основу создания высокочувствительного способа скрининга 57 стероидов в моче методом высокотемпературной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения. Вторым подходом основан на использовании электрораспыления/ионизации. Он позволил разработать способ скрининга стимуляторов, наркотиков, бета-блокаторов, бета-2-агонистов, диуретиков, маскирующих агентов, модуляторов метаболизма, кортикостероидов и анаболических стероидов (всего 137 соединений) методом ЖХ/МС с орбитальной ионной ловушкой. При этом дополнительно были разработаны подходы к экспрессной подготовке образцов к анализу.

Практическая значимость представленной работы состоит в том, Вирюсом Э.Д. предложены оригинальные методологические подходы, направленные на развитие метода ВЭЖХ/МС сверхвысокого разрешения, в которых особое внимание уделено экспрессности анализа и

высококчувствительному определению широкого круга ФАВ в сложных по химическому составу экстрактах из биологических жидкостей.

Работа прошла надежную апробацию. Ее результаты докладывались и обсуждались на представительных международных, российских и региональных конференциях. Автор диссертации неоднократно выступал с устными сообщениями на профильных конференциях как в России, так и за рубежом. Общее число тезисов докладов на конференциях насчитывает свыше 20 наименований. По материалам диссертации получено 3 патента на изобретение и опубликована 21 статья в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации диссертационных исследований. Разработанные способы прошли апробацию во время проведения межлабораторных испытаний, организованных ВАДА в 2009-2012 гг.

Диссертационное сочинение Вирюса Э.Д. хорошо структурировано и систематически изложено. Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертации, соответствующей паспорту научной специальности 02.00.02 — Аналитическая химия.

По сути проведенного Э.Д. Вирюсом исследования замечаний нет. Отдельные недочеты встречаются только в диссертационном сочинении и автореферате:

1. На странице 116 не указано соединение и регистрируемый ион, для которых отношение сигнал к шуму составляет 38000 и 100000.
2. В таблице 14 не указаны полные названия детектируемых соединений (приведены сокращения)
3. В автореферате не приведена ион-молекулярная реакция, подтверждающая обоснованность использования фотохимической ионизации при атмосферном давлении при определении анаболических стероидов.

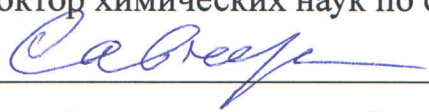
Сделанные замечания не снижают, однако, общей безусловно положительной оценки диссертационного исследования Вирюса Э.Д.

Результаты работы могут быть использованы при проведении медико-биологических исследований, эколого-аналитического мониторинга,

санитарного контроля продуктов питания, судебно-медицинской, криминалистической, токсикологической и клинической экспертиз с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией сверхвысокого разрешения.

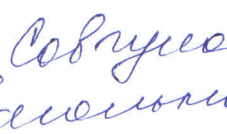
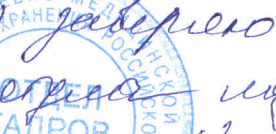
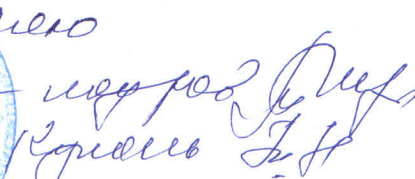
Диссертационная работа Вирюса Эдуарда Даниэлевича «Развитие жидкостной хромато-масс-спектрометрии, как метода скрининга физиологически активных веществ в сложных по составу смесях» по объему и качеству выполненных исследований, актуальности поставленной задачи, новизне, достоверности и научной обоснованности полученных результатов и выводов полностью соответствует требованиям пункта 9 "Положения о присуждении ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842. Проведенное масштабное исследование относится к типу научных квалификационных работ. В ней содержится решение проблемы, имеющей важное значение для развития методических основ высокочувствительного, селективного и экспрессного скрининга физиологически активных веществ в сложных по химическому составу смесях на базе жидкостной хроматомасс-спектрометрии сверхвысокого разрешения. Сам же диссертант Вирюс Э.Д. заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 02.00.02 — Аналитическая химия.

Доктор химических наук по специальности 02.00.02 «Аналитическая химия»

 Савчук Сергей Александрович
Российского центра судебно-медицинской экспертизы Минздрава России

125284, Поликарпова 12/13
e-mail: serg-savchuk@yandex.ru тел. 8(903) 740-93-90

Подпись главного научного сотрудника отдела лабораторных, морфологических исследований Российского центра судебно-медицинской экспертизы Минздрава России удостоверяю:

 Юриш
 Савчук
 Савчук
 Савчук
