

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Института
физической химии и электрохимии
им. А.Н. Фрумкина
Российской академии наук,
член-корреспондент РАН,
доктор химических наук,
профессор



А.К. Буряк

23 сентября 2020 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию 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

Диссертационная работа Э.Д. Вирюса посвящена развитию принципиально новых решений в жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения для обнаружения физиологически активных веществ в сложных по составу смесях и разработке на этой основе новой методологии хромато-масс-спектрометрического скрининга физиологически активных веществ в медико-биологических объектах.

Актуальность диссертационной работы Э.Д. Вирюса обусловлена необходимостью решения фундаментальной задачи разработки универсальной методологии обнаружения широкого спектра физиологически

активных веществ в биологических жидкостях. Сегодня быстрое и многокомпонентное обнаружение широкого круга физиологически активных веществ в сложных по составу медико-биологических объектах относится к наиболее актуальным задачам аналитической химии и требует принципиально новых решений, исключающих длительную стадию подготовки образцов к анализу. Разработанная в диссертационной работе методология многокомпонентного анализа медико-биологических объектов на основе жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения с использованием орбитальной ионной ловушки является одной из наиболее перспективных для решения этой задачи, учитывая универсальность и селективность метода. Вместе с тем, заметное проявление матричного эффекта, свойственное для данного метода, ограничивает его применение для быстрого анализа сложных по составу смесей.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, пяти глав с результатами исследования автора и выводами, заключения по работе в целом и списком цитируемой литературы (224 ссылки). Работа изложена на 267 страницах, содержит 45 рисунков и 23 таблицы.

Во введении сформулированы актуальность и цель работы, научная новизна и практическая значимость, приведены положения, выносимые на защиту.

Глава 1 (стр. 17-59) содержит обзор литературы, в котором описаны особенности общепринятые подходы к скринингу физиологически активных веществ в сложных по составу смесях на примере медико-биологических объектов и обсуждена стратегия их обнаружения. Систематизированы работы, посвященные обнаружению физиологически-активных веществ методами газовой хроматографии/масс-спектрометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии. Проанализированы возможности и ограничения жидкостной хромато-масс-спектрометрии с орбитальной ионной ловушки как метода быстрого скрининга широкого круга физиологически активных веществ в биологических объектах сложного состава. Намечены подходы к преодолению этих ограничений.

Глава 2 (стр. 60 – 92) посвящена описанию используемых реагентов и оборудования, которые применялись в ходе выполнения диссертационной работы, а также условий проведения экспериментов с использованием газовой хроматографии/масс-спектрометрии с электронной ионизацией, газовой хроматографии/тандемной масс-спектрометрии, газовой хроматографии/масс-спектрометрии высокого разрешения,

высокоэффективной жидкостной хроматографии/тандемной масс-спектрометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии высокого разрешения в сочетании с орбитальной ионной ловушкой с использованием химической и фотохимической ионизации при атмосферном давлении, а также химической ионизации, индуцированной электрораспылением.

Глава 3 (стр. 93 – 104) посвящена, исследованию ограничений орбитальной ионной ловушки, обоснованию причины и роли матричного эффекта, связанного с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии высокого разрешения в сочетании с орбитальной ионной ловушкой. В этой главе автор разрабатывает экспериментальные методы выявления матричного эффекта, характерного для высокоэффективной жидкостной хромото-масс-спектрометрии высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой. Первый метод заключается в анализе модельных смесей и конечных экстрактов, содержащих идентичные количества определяемых физиологически активных веществ, двумя независимыми хромото-масс-спектрометрическими методами с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии/тандемной масс-спектрометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой с одинаковыми источниками ионов. Второй метод выявления матричного эффекта заключается в анализе вышеуказанных смесей с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии с орбитальной ионной ловушкой в сочетании с линейной ионной ловушки. На основе полученных данных, автор приходит к выводу, что матричный эффект, затрудняющий обнаружение физиологически активных веществ в сложных по составу смесях в режиме полного сканирования, обусловлен преимущественным накоплением ионов мешающих компонентов матрицы в орбитальной ионной ловушке.

Глава 4 (стр. 105 – 147) посвящена расширению возможностей метода высокоэффективной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии с орбитальной ионной ловушкой за счет создания подхода снижения матричного эффекта путем селективной ионизации определяемых соединений с использованием химической ионизации при атмосферном давлении. Показаны возможности и преимущества подхода, обеспечивающего обнаружение ФАВ в сложных по составу смесях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии

высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой в режиме полного сканирования с использованием точно измеренного m/z . На основе разработанного подхода предложен быстрый способ скрининга стероидов и N-алкил- β -гидрокси-арилоксипропиламинов в моче с использованием точного измерения m/z (на уровне 2 ppm) в режиме полного сканирования с пределом обнаружения 0.05 – 0.1 нг/мл, основанный на применении метода высокоэффективной жидкостной хроматографией/масс-спектрометрией высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой в сочетании с химической ионизацией при атмосферном давлении, обеспечивающей снижение матричного эффекта за счет селективной ионизации определяемых соединений.

Глава 5 (стр. 148 – 182) посвящена принципиально новому решению в жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения, обеспечивающему быстрое обнаружение физиологически активных веществ в сложных по составу смесях за счет снижения матричного эффекта путем селективного протонирования молекул определяемых соединений с использованием фотохимической ионизации при атмосферном давлении. В главе приведены и обсуждены результаты разработки подхода снижения матричного эффекта (до 5%) для высокоэффективной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой. Благодаря предложенному решению был разработан способ обнаружения стероидов в биологических жидкостях с пределом обнаружения 0.1 – 2 нг/мл методом высокотемпературной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой в режиме полного сканирования, основанный на селективном протонировании молекул определяемых соединений с использованием фотохимической ионизации при атмосферном давлении. Проведенное в главе сопоставление эффективности обнаружения физиологически активных веществ в биологических жидкостях методами газовой хроматографии/тандемной масс-спектрометрии, газовой хроматографии/масс-спектрометрии высокого разрешения и высокоэффективной жидкостной хроматографией/орбитальной ионной ловушкой с фотохимической ионизацией при атмосферном давлении, которая. Получены результаты, которые однозначно свидетельствует о преимуществах предлагаемого подхода, показавшего самую высокую эффективность при обнаружении биорегуляторов в биологической жидкости.

Глава 6 (стр. 183 – 204) посвящена нетривиальному решению в хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения, расширяющему возможности быстрого скрининга широкого спектра физиологически активных веществ в сложных по составу смесях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой в режиме полного сканирования с использованием точно измеренного m/z за счет снижения матричного эффекта путем подавления ионизации мешающих компонентов матрицы. Подход основан на снижении «популяции» ионов мешающих компонентов матрицы в орбитальной ионной ловушке за счет инициирования ионно-молекулярных реакций, способствующих подавлению ионизации соединений с низким сродством к протону, в условиях электрораспыления. На основе предложенного решения разработан способ скрининга стероидов, бензотиазидинов, N-алкил- β -гидрокси-арилоксипропиламинов, катехоламинов, фенилалкиламинов, (β -гидроксифенилэтил)аминов, производных бензамида (120 соединений) в моче с использованием точного измерения m/z (на уровне 2 ppm) в режиме полного сканирования с пределом обнаружения 0.2 – 250 нг/мл, основанный на применении метода ультраэффективной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой в сочетании с химической ионизацией, индуцированной электрораспылением, обеспечивающей снижение матричных эффектов за счет подавления ионизации мешающих компонентов матрицы.

Глава 7 (стр. 205 – 210) посвящена подходам достижения комплементарности новой методологии скрининга с референсными методами анализа на основе оценки выхода реакции дериватизации и способа снижения подавления ионизации компонентами матрицы для высокоэффективной жидкостной хроматографии/тандемной масс-спектрометрии на основе твердофазной экстракции с магнитными частицами. В главе сформулирована новая методология хромато-масс-спектрометрического скрининга физиологически активных веществ на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой в сочетании с фотохимической ионизацией при атмосферном давлении, химической ионизации при атмосферном давлении и химической ионизации, индуцированной электрораспылением, обеспечивающая быстрое обнаружение широкого спектра физиологически активных веществ в сложных по составу смесях с использованием точно измеренного m/z

протонированных и фрагментных ионов путем снижения влияния матричных эффектов за счет селективного протонирования определяемых соединений и подавления ионизации мешающих компонентов матрицы. Для достижения комплементарности предлагаемой методологии скрининга с существующими референсными методами анализа биологических объектов автор предлагает предварительно оценивать выход реакции дериватизации при применении ГХ-МС и использовать твердофазную экстракцию на магнитных частицах для снижения матричных эффектов, наблюдаемых при использовании ВЭЖХ-МС/МС с электрораспылительной ионизацией.

Выводы по диссертации свидетельствуют о том, что автор успешно справился с поставленными целью и задачами.

Научная новизна работы очевидна. Автором разработаны принципиально новая методология хромато-масс-спектрометрического скрининга широкого спектра физиологически активных веществ, обеспечивающая их быстрое определение на основе точного измерения m/z протонированных молекул и фрагментных ионов на уровне 2 ppm в сложных по составу смесях. В основе лежат разработанные решения снижения матричного эффекта при использовании метода высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой в режиме полного сканирования в сочетании как с химической ионизацией, индуцированной электрораспылением, так и химической и фотохимической ионизацией при атмосферном давлении. Методы апробированы для анализа биологических жидкостей.

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

Диссертационная работа Вирюса Э.Д. имеет как **теоретическое**, так и **практическое значение**. Предложенные и обоснованные в диссертации принципиально новые решения снижения матричного эффекта на основе фотохимической ионизации при атмосферном давлении и химической ионизации, индуцированной электрораспылением, значительно расширяют возможности аналитической высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения при проведении метаболомных и медико-биологических исследований, а также повышают эффективность

судебно-медицинской, криминалистической, токсикологической и клинической экспертиз. Разработанная диссертантом универсальная методология способствует достижению точного измерения m/z в сложных по составу смесях методом ВЭЖХ-МСВР с использованием ХИАД, ФХИАД, ХИИЭР в режиме полного сканирования. Таким образом, обеспечивается ретроспективность поиска широкого спектра метаболитов ФАВ в метаболомных исследованиях и решается проблема консервации биологического материала в метаболомных исследованиях. В данном случае расширение спектра определяемых метаболитов ФАВ не приводит к существенному увеличению временных и материальных затрат.

В рамках диссертационной работы выполнен большой объем исследований. Диссертация хорошо оформлена и содержит достаточное количество иллюстрационного материала. Автореферат диссертации правильно и полно отражает содержание диссертации. Список публикаций по теме содержит 21 статью, в том числе 12 статей в журналах, индексируемых в Международных базах данных, 9 статей в журналах, рекомендуемых ВАК, а также 3 патента.

По диссертационной работе есть **вопросы и замечания**:

1. В литературном обзоре при описании масс-спектрометрических методов скрининга стоило бы также уделить таким прямым масс-спектрометрическим методам обнаружения органических соединений, как DART и MALDI;
2. На странице 92 диссертант использует фермент β -глюкуронидазу *E.coli* для ферментативного гидролиза глюкоконъюгатов. В данном случае предпочтительнее использование β -глюкуронидазы *Helix Pomatia* с точки зрения универсальности и доступности;
3. На странице 102 в подписи к рисунку 9 не указана концентрация обнаруженного 4-хлордегидрометилтестостерона.

Высказанные замечания не затрагивают основных выводов и результатов работы, являющейся важным вкладом в развитии жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения

Заключение

Диссертационная работа Э.Д. Вирюса «Развитие жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения как метода скрининга физиологически активных веществ в сложных по составу смесях» является

научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований получены результаты, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в области аналитической химии, в том числе в новой научной дисциплины – метаболомики.

Диссертационная работа Э.Д. Вирюса соответствует паспорту специальности 02.00.02 – Аналитическая химия, пунктам 2 – «Методы химического анализа», 4 – «Методическое обеспечение химического анализа», 10 – «Анализ органических веществ и материалов» и 16 – «Клинический анализ»

По актуальности темы, уровню поставленных и решенных задач, новизне и практической значимости полученных научных результатов диссертационная работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям, установленным в п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 в ред. Постановления № 335 от 21 апреля 2016 г.

Автор диссертационной работы, Вирюс Эдуард Даниэлевич, заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

Отзыв заслушан и одобрен на секции "Поверхностные явления в коллоидно-дисперсных системах, физико-химическая механика и адсорбционные процессы" в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук (ИФХЭ РАН), протокол № 09/23 от 23 сентября 2020 г.

Председатель секции,
Академик РАН

Бой

Л.Б. Бойнович

Ученый
секретарь секции

Котова

О.А. Котова

Людмила Л.Б. Бойнович и О.А. Котова
заверено

НАЧАЛЬНИК
ОТДЕЛА КАДРОВ
МЕДВЕДЕВА Е.С.

Медведева



Сведения о научной организации

- | | |
|--|---|
| 1. Название организации полное и сокращенное | Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук (ИФХЭ РАН) |
| 2. Адрес | Российская Федерация, 119071, Москва, Ленинский пр-т, д.31, корп.4 |
| 3. Телефон | +7 (495) 955 44 87 |
| 4. Электронная почта | dir@phyche.ac.ru |
| 5. Web-страница | https://www.phychе.ac.ru/ |
| 6. Список печатных работ, близких по теме рецензируемой диссертации за период 2017-2020: | |
1. Sholokhova A.Yu, Shashkov M.V., Eliseeva T.V., Buryak A.K. Chromatographic and Mass Spectrometric Studies of the Features of Vanillin Desorption during Regeneration of a Highly Basic Anion Exchanger // Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces, 2020, T. 56, № 1, С. 44-48.
 2. Matyushin Dmitriy D., Sholokhova Anastasia Yu, Buryak Aleksey K. Deep Learning Driven GC-MS Library Search and Its Application for Metabolomics Analytical Chemistry, 2020, T. 92, № 17, С. 11818-11825.
 3. Pytskii I.S., Kuznetsova E.S., Buryak A.K. Application of Copper Salts to Initiate Cluster Formation of Organic Compounds by “Soft” Ionization Methods Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces, 2020, T. 56, № 2, с. 272-276
 4. Обухова Е.Н., Буряк А.К. Хромато-масс-спектрометрическое определение изомеров в допинговом контроле // Журнал аналитической химии, 2019, Т. 74, № 9, С. 652-667.
 5. Pytskii I.S., Kuznetsova E.S., Buryak A.K. Inorganic and Organic Clusters Formed upon Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization // Colloid Journal, 2018, T. 80, № 4, С. 427-438.
 6. Кузнецова Е.С., Пыцкий И.С., Буряк А.К. Аминокислоты в условиях ионизации при электрораспылении: использование хлорида никеля для инициирования кластерообразования // Сорбционные и хроматографические процессы, 2018, Т. 18, № 6, С. 853-857.
 7. Кузнецова Е.С., Пыцкий И.С., Буряк А.К. Получение ионных кластеров аминокислот в присутствии сульфата меди в условиях полевой ионизации их водно-ацетонитрильных растворов // Сорбционные и хроматографические процессы, 2018, Т. 18, № 5, С. 745-750.
 8. Milyushkin A.L., Matyushin D.D., Buryak A.K Chromatographic and Mass-

- Spectrometric Identification of Linear and Cyclic Peptides Based on Glycine // Journal of Analytical Chemistry, 2018, Т. 73, № 10, С. 999-1002.
9. Елисеева Е.В., Редькин Н.А., Гарькин В.П., Пыцкий И.С., Буряк А.К. Хромато-масс-спектрометрическое исследование реакций переарилирования и диспропорционирования диарилтеллуридов // Известия академии наук, Серия химическая, 2017, № 4, С. 636-642.
 10. Ярцев С.Д., Пыцкий И.С., Зенкевич И.Г., Буряк А.К. Хроматографическое и масс-спектрометрическое исследование поверхностей конструкционных материалов после контакта с 1,1-диметилгидразином // Журнал аналитической химии, 2017, Т. 72, № 6, С. 536-544.
 11. Пыцкий И.С., Кузнецова Е.С., Ярцев С.Д., Буряк А.К. Методические особенности масс-спектрометрического исследования окисленных металлических поверхностей // Коллоидный журнал, 2017, Том: 79, № 4, С. 479-484.
 12. Хесина З.Б., Ярцев С.Д., Пыцкий И.С., Гончарова И.С., Парамонов С.А., Милютин В.В., Некрасова Н.А., Буряк А.К. Изучение возможности количественного анализа N,N,N',N'-Тетра-Н-октиламида дигликолевой кислоты (ТОДГА) методом масс-спектрометрии МАЛДИ // Известия академии наук. Серия химическая. 2017, № 6, С. 995-998.
 13. Polunin K.E., Goncharova I.S., Ul'yanov A.V., Polunina I.A., Buryak A.K. Soft ionization mass spectrometry for studying desorption of bioactive compounds from a shungite surface // Colloid Journal, 2017, Т. 79, № 2, С. 250-257.