

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию Вирияса Эдуарда Даниэлевица
«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

Анализ сложных смесей органических соединений не только относится к важнейшим задачам аналитической химии, но и крайне необходим во многих практических областях, в частности многокомпонентного анализа медикобиологических объектов. Одним из наиболее мощных инструментов решения таких задач является масс-спектрометрия в сочетании с адекватными методами разделения. Цель данного исследования – разработать методологию скрининга физиологически активных веществ (ФАВ) на основе нового метода - масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения.

Актуальность темы исследования

Хотя понятие скрининг подразумевает как бы облеченный характер анализа и наличие более серьезного подтверждающего метода, роль его в анализе, особенно в тех его областях, где требуется высокая производительность и высокая достоверность, таких как медицина, фармакология, допинг-контроль и т.п., исключительно высока, так именно в процессе такого анализа принимаются важнейшие решения о соответствии или несоответствии образцов. Поэтому для скрининга в таких областях используются наиболее совершенные приборы, оборудование и методики, обеспечивающие достоверность результатов.

Существующая методология обнаружения ФАВ, реализуемая методами ГХ-МС, ГХ-МС/МС, ГХ/МСВР и ВЭЖХ-МС/МС, не отвечает в полной мере современным требованиям многокомпонентного скрининга методами хромато-масс-спектрометрии. С другой стороны, появились новые приборы с расширенными аналитическими возможностями, в частности, масс-спектрометрия сверхвысокого разрешения (МССВР) с измерением точной массы ионов при регистрации полного масс-спектра. Данная работа посвящена решению задачи усовершенствования скрининга ФАВ в сложных смесях на основе хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения, так что актуальность ее не вызывает сомнений.

Новизна и достоверность результатов.

Автором успешно решена основная проблема увеличения экспрессности и упрощения схемы анализа при скрининге физиологически активных веществ – использование ВЭЖХ с исключением стадии дериватизации и повышение достоверности результатов за счет использования МССВР.

Изучена природа матричного эффекта, обусловленного подавлением ионизации компонентами матрицы и преимущественным накоплением ионов мешающих

компонентов матрицы в при формировании пакетов ионов для орбитальной ионной ловушке. Изучены и сформулированы способы уменьшения матричного эффекта разнообразными методами: селективного протонирования, подавления ионизации мешающих компонентов матрицы, использованием оптимальных схем градиентного элюирования.

Важный момент – возможность изучения схем распада при ЭИ сложных молекул на основании использования точных масс. Помимо общего знания путей распада это позволяет сделать оптимальный выбор переходов для МС/МС.

Предложена общая методология хромато-масс-спектрометрического скрининга ФАВ на основе сочетания ВЭЖХ и МССВР с химической ионизацией при атмосферном давлении (ХИАД), фотохимической ионизацией при атмосферном давлении (ФХИАД) и химической ионизацией, индуцированной электрораспылением (ХИИЭР), обеспечивающего быстрое обнаружение широкого спектра широкого спектра ФАВ в сложных смесях с использованием точно измеренного m/z путем снижения матричных эффектов за счет селективного протонирования и подавления ионизации мешающих компонентов матрицы.

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

Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, вполне обоснованы тем, что базируются на тщательной проработке постановки задачи, большой экспериментальной работе, использовании современной прецизионной аппаратуры и максимальном учете всех аспектов аналитической процедуры.

Практическая значимость

Разработанная автором методология обнаружения ФАВ в сложных смесях, в том числе биологических объектах, методом ВЭЖХ- в сочетании с ХИАД, ФХИАД, ХИИЭР, применима для скрининга ФАВ, экспрессного определения широкого спектра биоорганических соединений без стадии дериватизации при проведении метаболомных и медико-биологических исследований, санитарного контроля продуктов питания, судебно-медицинской, криминалистической, токсикологической и клинической экспертиз.

Применение МССВР с точным измерением масс ионов при регистрации полного масс-спектра открывает возможность ретроспективного анализа.

Следует отметить, что полученные автором принципиальные результаты по природе матричного эффекта при сочетании ВЭЖХ и МССВР и способам его уменьшения закончились разработкой аналитических методик и их валидацией по международному стандарту.

Благодаря разработанным в работе подходам в реализации масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения с ХИАД, ФХИАД, ХИИЭР и минимизации эффекта «пространственного заряда», предложены новые способы быстрого скрининга стимуляторов, наркотиков, бета-блокаторов, бета-2-агонистов, диуретиков, маскирующих агентов, модуляторов метаболизма, кортикостероидов и анаболических стероидов

методами высокотемпературной и высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией сверхвысокого разрешения.

Общая оценка содержания диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, пяти глав с обсуждением полученных результатов, выводов и списка цитируемой литературы из 224 назв. Работа изложена на 267 страницах, содержит 45 рисунков и 23 таблицы.

Во введении обоснована актуальность работы, ее цели и задачи.

В первой главе рассмотрены методология скрининга ФАВ в медико-биологических объектах методами ГХ и ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрией и возможности усовершенствования применяемых методов и ограничения ОЛ и намечены подходы к скринингу широкого спектра ФАВ в биологических объектах сложного состава методом МСВР.

Анализ требований к скринингу ФАВ, проделанный автором, показал, что он должен основываться на следующих принципах:

1. применение ВЭЖХ, что, в отличие от ГХ, не требует дериватизации.
2. высокая селективность и чувствительность, т.е. использование масс-спектрометрии высокого разрешения или МС/МС.
3. универсальность
4. относительная простота методологии и интерпретации.
5. возможность получения большого объема информации.

Этим требованиям удовлетворяет сочетание ВЭЖХ с масс-спектрометрией сверхвысокого разрешения возможностью с возможностью точного измерения масс ионов при сканировании полного масс-спектра и использования различных эффективных методов ионизации. Но, как и всякий сложный метод, он тоже имеет определенные ограничения.

В соответствии с этим автором была поставлена цель разработать новую методологию хроматомасс-спектрометрического скрининга физиологически активных веществ в биологических жидкостях, удовлетворяющую вышеперечисленным требованиям.

Потребовалось изучить роль матричного эффекта как основного препятствия реализации методологии; возможность применения различных методов ионизации и различных приемов для ликвидации или уменьшения матричного эффекта: селективного протонирования с использованием химической ионизации при атмосферном давлении (ХИАД) и (ФХИАД) и подавления ионизации мешающих компонентов матрицы с использованием химической ионизации, индуцированной электрораспылением (ХИИЭР).

Во второй главе перечислены реагенты и аппаратура, которые применялись в ходе выполнения работы. Описана экспериментальная часть: оборудование и методики экспериментов, условия для газовой хроматографии и жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией низкого и высокого разрешения.

В главе 3 изучены особенности сочетания высокоэффективной жидкостной хроматографии с орбитальной ионной ловушкой для анализа физиологически активных веществ. Изучена природа характерного для такого сочетания матричного эффекта,

который является основным препятствием использования этого метода для скрининга ФАВ в сложных смесях, в частности, экстрактах из мочи. Показано, что матричный эффект обусловлен ограниченной емкостью С-ловушки, используемой для формирования пакетов ионов, поступающих в орбитальную ионную ловушку, пространственным зарядом и подавлением ионизации компонентами матрицы.

В главе 4 описаны разработанные автором способы решения задачи уменьшения матричного эффекта путем использования химической ионизации при атмосферном давлении при оптимальной программе градиентного элюирования. Найдены хроматографические условия, приводящие к уменьшению «перегрузки» орбитальной ионной ловушки в условиях ХИАД. Достигнутая точность измерений масс свидетельствует о решении задачи минимизации эффекта «пространственного заряда» для выбранных соединений.

В главе 5 описан способ селективного протонирования с использованием фотохимической ионизации при атмосферном давлении без использования добавок и с добавками (наиболее эффективная добавка - изопропанол), увеличивающими селективность ионизации аналитов. Для скрининга анаболических стероидов применена высокотемпературная хроматография на графитизированном углеродном сорбенте в сочетании с МССВР. Проведена валидация и апробация предложенных способов определения ФАВ.

В главе 6 решена задача скрининга широкого круга ФАВ - стимуляторов, наркотиков, бета-блокаторов, бета-2-агонистов, диуретиков, маскирующих агентов, модуляторов метаболизма, кортикостероидов и анаболических стероидов в моче - на основе использования химической ионизации, инициируемой электрораспылением (ХИИЭР). Подавление ионизации мешающих компонентов матрицы обеспечивается использованием в качестве модификатора подвижной фазы летучего основания - гидроксида аммония, являющегося одновременно и газом-реагентом для ХИИЭР. Добавление гидроксида аммония способствует уменьшению «перегрузки» С-ловушки, так как в этих условиях в ней оказываются только ионы соединений с большим сродством к протону в газовой фазе, чем у гидроксида аммония.

В седьмой главе представлена в общем виде новая методология хромато-масс-спектрометрического скрининга широкого спектра ФАВ на основе сочетания МССВР с ФХИАД, ХИАД и ХИИЭР, основанная на использовании ВЭЖХ с ФХИАД, ХИАД и ХИИЭР в условиях, обеспечивающих снижение матричного эффекта за счет селективного протонирования молекул определяемых соединений и подавления ионизации мешающих компонентов матрицы, и достоверной идентификации определяемых веществ по точным массам протонированных и осколочных ионов. Также показана возможность снижения матричного эффекта при электрораспылительной ионизации благодаря твердофазной экстракции на магнитных частицах и предложен подход для выявления аналитов, которые предпочтительно определять методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии.

Таким образом, в результате проведенных исследований автором достигнуто соответствие аналитической методологии в скрининге физиологически активных веществ современному уровню и новым возможностям приборного оснащения, стало возможным использование жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения как метода скрининга физиологически активных веществ в сложных смесях с получением

большой, даже избыточной информации, что дает дополнительные возможности для идентификации и сравнения с другими методами анализа, а также возможность ретроспективного анализа.

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. Автореферат соответствует содержанию диссертации.

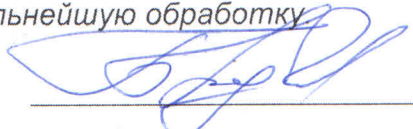
Вместе с тем, к тексту диссертации есть замечания:

1. Текст не выверен, встречаются несогласования, опечатки, неточности выражения;
С.202 – текст в конце абзаца о составе проб не согласуется с подписью к рис.42.

Однако эти замечания относятся 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.

Официальный оппонент
доктор химических наук,
старший научный сотрудник
Бродский Ефим Соломонович
заведующий лабораторией
аналитической экотоксикологии
Института проблем экологии и эволюции
им. А.Н. Северцова РАН
Москва, 119071 Ленинский проспект, 33
Тел. (499) 135 13 80. efbr@mail.ru

Я, Бродский Ефим Соломонович, даю согласие на включение своих персональных данных в документы, связанные с работой диссертационного совета, и их дальнейшую обработку.



Е.С. Бродский

27.10.2020 г.



Сведения об официальном оппоненте

диссертационной работы Вирюса Эдуарда Даниэлевича «Развитие жидкостной хромато-масс-спектрометрии как метода скрининга физиологически активных веществ в сложных по составу смесях» на соискание ученой степени доктора химических по специальности 02.00.02 – аналитическая химия

Бродский Ефим Соломонович

Ученая степень, включая отрасль наук и номер специальности, по которой защищена докторская (кандидатская) диссертация, ученое (академическое) звание

Доктор химических наук (по специальности 05.11.11 – хроматография и хроматографические приборы), старший научный сотрудник.

Полное наименование места работы, структурное подразделение и должность

Заведующий лабораторией аналитической экотоксикологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН (ИПЭЭ РАН).

Адрес и телефон места работы

119071, Москва, Ленинский проспект, д. 23. Тел. +7 (495) 954-55-34

Email

efbr@mail.ru

Список публикаций в соответствующей сфере исследований за последние 5 лет в рецензируемых журналах (не более 15)

1. Kudryavtseva A.D., Shelepchikov A.A., Brodsky E.S. Free-range chicken eggs as a bioindicator of dioxin contamination in Vietnam, including long-term agent Orange impact // Emerging Contaminants, 2020, V. 6. P. 114-123.
2. Shelepchikov A., Turbabina K., Ovcharenko V., Kozhushkevich A., Kalantaenko A., Komarov A., Brodsky E., Mir-Kadyrova E. Solid phase extraction of PCDDs/PCDFs and dioxin-like PCBs from edible oils and fats // Chemosphere, 2019, V. 231, P. 20-24.
3. Шелепчиков А.А., Овчаренко В.В., Кожушкевич А.И., Бродский Е.С., Комаров А.А., Турбабина К.А., Калантаенко А.М. Новый метод очистки жиросодержащих экстрактов при определении полибромфениловых эфиров // Журнал аналитической химии, 2019. Т. 74, № 6, С. 426-436.
4. Brodsky E.S., Shelepchikov A.A., Kalinkevich G.A., Mir-Kadyrova E.Y. Determination of total saturated and total aromatics in oils and oil products

by mass spectrometry and gas chromatography with electron ionization // Journal of Analytical Chemistry, 2018, V. 73. № 14. P. 1372-1375.

5. Шелепчиков А.А., Турбабина К.А., Бродский Е.С., Мир-Кадырова Е.Я., Овчаренко В.В., Комаров А.А. Сорбционное извлечение из жиров полихлорированных дибензо-п-диоксинов, дибензофуранов и диоксиноподобных полихлорированных бифенилов // Доклады Академии наук, 2018, Т. 481. № 5. С. 507-509.
6. Brodskii E.S., Shelepchikov A.A., Mir-Kadyrova E.Y., Kalinkevich G.A. Identification of endogenous and anthropogenic hydrocarbons in bottom deposits of peat lakes and evaluation of their contribution to the "hydrocarbon index" // Journal of Analytical Chemistry, 2017, V. 72. № 12. P. 1255-1262.
7. Бродский Е.С., Шелепчиков А.А., Калинин Г.А., Мир-Кадырова Е.Я. Об определении полихлорированных бифенилов в электроизоляционных жидкостях // Заводская лаборатория Диагностика материалов, 2017, Т. 83, № 11, С. 15-20.

Подпись:

Е.С. Бродский

Подпись Ефима Соломоновича Бродского заверяю:



Зав. канц. Т.Нол
ИПЭЭ РАН Чувашова
27.10.2020.