

ОТЗЫВ

Официального оппонента

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 масштабной разработке принципиально новой и альтернативной методологии дифференциального детектирования и определения экзогенных физиологически активных веществ (ФАВ) в биологических жидкостях на основе комбинации ВЭЖХ с масс-спектрометрией ультравысокого разрешения (система Орбитрэп), позволяющей преодолеть ограничения, свойственные обычно применяемым методам ГХ/МС.

Актуальность выбранной темы

Наблюдаемый уже многие десятилетия интенсивный поиск и развитие высокочувствительных, селективных и экспрессных методов детектирования и определения ФАВ в биологических объектах свидетельствует об исключительной важности задачи, поставленной в диссертации. В этом плане особенно остро стоит принципиальная аналитическая проблема быстрого установления фактов применения допинговых препаратов, которая до сих пор не решена в общем виде. Задача в данном случае усугубляется еще и тем, что постоянно пополняется арсенал ФАВ новыми соединениями с различной структурой и физико-химическими свойствами и, следовательно, постоянно возникает новая проблема их нецелевого анализа. К настоящему времени сформировалось четкое понимание того, что названные аналитические задачи можно решать только с помощью методов на базе онлайнового сочетания

хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования. До последнего времени для этого применяли газовую хроматомасс-спектрометрию. Однако очень часто этим методом трудно напрямую обнаруживать в сложных по составу биологических жидкостях сами запрещенные в спорте ФАВ, а также высокополярные продукты их метаболизма, причем его применение требует трудо- и время-затратной пробоподготовки, в частности, дериватизации. Стало совершенно очевидным, что преодоление этих недостатков и, в частности, обеспечение экспрессности анализа ФАВ лежат на пути использования комбинации высокоэффективной жидкостной хроматографии/тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ/МС), в общем случае не требующих специальных манипуляций с образцами. Главным достоинством этого метода является возможность анализа полярных и термолабильных соединений в режиме полного сканирования, что позволяет получать значительный объем масс-спектрометрических данных в ходе одного анализа, тем самым обеспечивая его высокую производительность. Особенно перспективным и многообещающим является использование в масс-спектрометрическом окончании таких комбинаций приборов с высоким и сверхвысоким разрешением, которые для каждого компонента смеси позволяют получать важнейшую характеристику молекул и их фрагментов, а именно, высокоточную массу и, следовательно, устанавливать элементный состав как детектируемого аналита, так и фрагментных ионов. Однако, для эффективного использования таких систем при анализе ФАВ необходимо преодолеть ряд существенных недостатков, что требует специальных разносторонних исследований. Именно поэтому безусловно **являются актуальными** решаемые Э.Д.Вирюсом в диссертационной работе задачи, позволившие разработать и развить универсальные методологические принципы и приемы при экспрессном обнаружении ФАВ и продуктов их биопревращения в биологических матрицах, основанные на фундаментальных закономерностях

фотохимической ионизации при атмосферном давлении и электрораспылении и реализуемых в масс-спектрометрах сверхвысокого разрешения..

Структура диссертации Э.Д. Вирюса соответствует рекомендациям ВАК РФ и включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть, пять глав обсуждения собственных результатов, заключение и список цитируемой литературы (224 наименования). Обзор литературы состоит из двух частей, посвященных современному состоянию исследований в области скрининга ФАВ и продуктов их биотрансформации в биологических жидкостях с применением различных аналитических методов и критическому анализу достоинств и ограничений орбитальной ионной ловушки, обеспечивающей сверхвысокое разрешение как масс-спектрометрического детектора. Каждая глава обсуждения результатов начинается с истории вопроса и постановки задачи, что облегчает понимание и анализ результатов работы. Диссертация изложена на 267 стр., содержит 45 рисунков, 23 таблицы и Приложение, содержащее масс-спектры всех исследованных соединений.

Научная новизна данной диссертационной работы определяется разработанными новыми методологическими принципами, позволяющими наиболее эффективно использовать мощную комбинированную технику на базе жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии высокого разрешения для экспрессного анализа широкого массива ФАВ и продуктов их метаболизма в биологических жидкостях. Впервые был масштабно продемонстрирован и разносторонне исследован потенциал применения для таких анализов высокоэффективных и завоевывавших огромную популярность масс-спектрометров, реализованных на базе орбитальной ионной ловушки (Орбитрэп), которые позволяют определять массы ионов с высокой точностью и проводить манипуляции с ионами в тандемном режиме. Для случая детектирования ФАВ и продуктов их биотрансформации был впервые проведен сопоставительный анализ эффективности трех методов ионизации при атмосферном давлении: ФХИАД, ХИАД и ХИИЭР (химическая ионизация при электрораспылении). При этом для случая

скрининга 57 стероидных соединений показано, что наибольшую чувствительность их детектирования в моче обеспечивают первые два из них благодаря возможности селективного протонирования. ХИИЭР оказался особенно эффективным при скрининге стимуляторов, наркотиков, бета-блокаторов, бета-2-агонистов, диуретиков, маскирующих агентов, модуляторов метаболизма (суммарно 137 соединений).

Принципиально важным вопросом, которому диссертант уделил пристальное внимание в работе, был поиск путей минимизации матричных эффектов, препятствующих детектированию ФАВ и проявляющихся в названных комбинациях ВЭЖХ/МС. Впервые охарактеризованы причины и роль таких эффектов в связи с переполнением орбитальной ионной ловушки ионами мешающих компонентов матрицы. Был обоснован и продемонстрирован подход для снижения матричного эффекта в случае ХИИЭР. Ряд важных модификаций был успешно применен в технике ВЭЖХ, например, применение градиентного элюирования и использование фазы с графитизированным углеродом, что позволило дифференциально и с более низким пределом обнаружения детектировать ФАВ.

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием комбинаций ультрасовременных высокочувствительных инструментальных приборов, проведением экспериментов на большом наборе конкретных соединений разной структуры, статистической обработкой массива данных. Работа прошла надежную апробацию: отдельные ее результаты докладывались и обсуждались на международных, российских и региональных конференциях (более 20 конференций), на ряде из которых автор выступал с устными сообщениями. По материалам диссертации получено 3 патента на изобретение и опубликована 21 статья в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации диссертационных исследований. Предложенные автором подходы к детектированию анаболических стероидов, блокаторов, диуретиков апробировались и получили высокую

оценку при проведении по инициативе ВАДА межлабораторных испытаний (2009-2012 гг.).

Практическая значимость результатов работы Э.Д.Вирюса состоит в создании оригинальных и универсальных методологических подходов, направленных на развитие комбинированного метода ВЭЖХ с масс-спектрометрией сверхвысокого разрешения на базе орбитальной ловушки (Орбитрэп) и такими методами ионизации как ХИАД, ФХИАД, ХИИЭР. При этом упор сделан на увеличение экспрессности и сокращение времени анализа при высокочувствительном одновременном определении различных ФАВ, других биоорганических соединений и их метаболитов в сложнейших по химическому составу биологических жидкостях. Полученные результаты открывают новые перспективы для использования ВЭЖХ/МС в различных биохимических и медицинских анализах, в метаболомике, допинг-контроле, криминалистике, судебно-медицинской экспертизе, экологическом мониторинге, контроле пищевых продуктов и других областях.

По существу проведенного Э.Д. Вирюсом исследования принципиальных замечаний нет. Можно отметить лишь следующие несущественные моменты:

1. Кажется чрезмерно обстоятельным и подробным изложение в литературном обзоре принципов функционирования орбитальной ионной ловушки. Хотя диссертация написана хорошим языком, в ней иногда попадаются устаревшие масс-спектральные термины, например, электронный удар, родительский ион.
2. В таблице 14 (стр.129) довольно произвольно приведены структуры и расположение зарядов, хотя они и не противоречат расчетным и определенным массам. На стр. 140 и 146 двум разным рисункам присвоен один и тот же номер 25.

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

Заключение

Из всего сказанного однозначно следует, что по о актуальности поставленной задачи, новизне, объему и качеству выполненных исследований, достоверности и научной обоснованности полученных результатов и выводов рецензируемая работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям. Проведенное масштабное исследование относится к типу научных квалификационных работ. В ней содержится решение проблемы, имеющей важное практическое значение для развития методических основ высокочувствительного, селективного и экспрессного скрининга физиологически активных веществ в сложных по химическому составу смесях на базе комбинации жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения.

Диссертационное сочинение Вирюса Э.Д. хорошо структурировано, систематически изложено и адекватно иллюстрировано. Автореферат и публикации в рецензируемых научных изданиях из перечня ВАК, Web of Science и Scopus полностью отражают основное содержание диссертации.

Диссертационная работа Вирюса Эдуарда Даниэлевича «Развитие жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения как метода скрининга физиологически активных веществ в сложных по составу смесях» соответствует всем требованиям, предъявляемым докторским диссертациям (пункта 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»).

По тематике, предмету и методам исследования диссертационная работа Э.Д. Вирюса соответствует паспорту специальности 02.00.02 – аналитическая химия.

Автор диссертации, Вирюс Эдуард Даниэлевич, несомненно заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора химических наук по специальности 02.00.02 — аналитическая химия.

Заикин Владимир Георгиевич, доктор химических наук (по специальности 02.00.03-органическая химия), профессор, главный научный сотрудник лаборатории спектральных исследований и хроматографии 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.

Тел. 8-910-429-44-42

E-mail: zaikin@ips.as.ru

Я, Заикин Владимир Георгиевич, даю согласие на включение своих персональных данных в документы, связанные с работой диссертационного совета, и их дальнейшую обработку.

14 октября 2020 г.

В.Г. Заикин

Подпись главного научного сотрудника лаборатории спектральных исследований и хроматографии ИНХС РАН Заикина В.Г. заверяю:

Ученый секретарь ИНХС РАН, кандидат химических наук, доцент



Ю.В. Костина

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

Заикин Владимир Георгиевич

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

Доктор химических наук (по специальности 02.00.03 – органическая химия), профессор.

Полное наименование места работы, структурное подразделение и должность

Главный научный сотрудник Лаборатории спектральных исследований и хроматографии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ордена Трудового Красного Знамени Института нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук (ИНХС РАН).

Адрес и телефон места работы

119991, ГСП-1, Москва, Ленинский проспект, д. 29. Тел. 8-910-429-44-42

Email

zaikin@ips.as.ru

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

1. Горяинов С.В., Эспарза С., Борисова А.Р., Фади Х., Рысцова Е.О., Половков Н.Ю., Борисов Р.С., Заикин В.Г. Экспрессное детектирование добавок растительных жиров в сгущенном молоке методом масс-спектрометрии с «прямым анализом в реальном времени» // Масс-спектрометрия, 2020, Т. 17, № 3, С. 202-208.
2. Esparza C., Polovkov N.Y., Topolyan A.P., Borisov R.S., Zaikin V.G. Suitable analysis of α -amino acids by a direct combination of thin-layer chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in conjunction with post-chromatographic fixed-charge derivatization // Journal of Chromatography A, 2020, V. 1626, P. 461335.
3. Borisov R., Esparza C., Polovkov N., Topolyan A., Zaikin V. An approach to analysis of primary amines by a combination of thin-layer chromatography and matrix-assisted laser desorption ionization mass

spectrometry in conjunction with post-chromatographic derivatization // Journal of Separation Science, 2019, V. 42, № 22, P. 3470-3478.

4. Borisov Roman S., Esparza Cesar, Goriainov Sergei V., Zaikin Vladimir G. Suitable in-situ derivatization of alcohols by reaction with basic amines in Direct Analysis in Real Time mass spectrometry // Talanta, 2019, V. 200, P. 31-40.
5. Козлов А.В., Борисов Р.С., Заикин В.Г. Дериватизация с генерацией заряда для анализа тиолов методами масс-спектрометрии с «мягкой» ионизацией // Масс-спектрометрия, 2019, Т. 16, № 1, С. 40-48.
6. Cesar Esparza, Polovkov N.Y., Borisov R.S., Zaikin V.G. Post-chromatographic fixed-charge derivatization for the analysis of hydroxyl-containing compounds by a combination of thin-layer chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // Journal of Chromatography A, 2018, V. 1560, P. 97-103.
7. Zaikin V.G., Kozlov A.V., Borisov R.S., Shchapin I.Yu Regio-isomeric effects in tandem mass spectra of sulfonium cations generated from thiacyclane based sulfonium salts under soft ionization conditions // European Journal of Mass Spectrometry, 2018, V. 24, № 1, P. 108-115.
8. Kozlov A.V., Borisov R.S., Zaikin V.G. Soft-ionization mass spectrometric observation of isomeric effects occurring in the synthesis of bis-sulfonium salts from thiacyclanes/xylylene dibromides and collision induced dissociation of bis-sulfonium cations // International Journal of Mass Spectrometry, 2018, V. 432, P. 18-25.
9. Слюндина М.С., Борисов Р.С., Заикин В.Г. Новые реакционноспособные матрицы для анализа спиртов методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией // Масс-спектрометрия, 2018, Т. 15, № 2, С. 83-88.
10. Slyundina M.S., Polovkov N.Yu, Borisov R.S., Zaikin V.G. Tryptamine: a Reactive Matrix for MALDI Mass Spectrometry // Journal of Analytical Chemistry, 2017, V. 72, № 13, P. 1295-1299.
11. Ильюшенкова В.В., Куликова Л.Н., Борисов Р.С., Заикин В.Г. Особенности масс-спектров первого и второго порядка, регистрируемых при ионизации электрораспылением солеобразных продуктов дериватизации моно- и диолов комбинированными реагентами на основе ω -бромацилхлоридов и азотистых оснований // Масс-спектрометрия, 2017, Т. 14, № 2, с. 89-94.

12. Эспарса С.А., Половков Н.Ю., Борисов Р.С., Варламов А.В., Заикин В.Г. Пост-хроматографическая дериватизация спиртов и фенолов для их идентификации в смесях с использованием сочетания планарной хроматографии и масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией // Масс-спектрометрия, 2017, Т. 14, № 4, С. 252-258.
13. Borisov R.S., Zhilyaeva N.A., Ermilova M.M., Orekhova N.V., Yaroslavtsev A.B., Zaikin V.G. A gas chromatography/mass spectrometry study of the conversion of alicyclic alcohols on membrane-type catalysts using a pulse microreactor implanted into a gas chromatograph injector // Journal of Analytical Chemistry, 2016, V. 71, № 13, P. 1251-1259.
14. Esparza C., Borisov R.S., Varlamov A.V., Zaikin V.G. Composite glycerol/graphite/aromatic acid matrices for thin-layer chromatography/matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of heterocyclic compounds // Journal of Chromatography A, 2016, V. 1470, № 28, P. 118-122.
15. Zhilyaev D.I., Borisov R.S., Polovkov N.Yu., Zaikin V.G. N,N-Dimethylaminoalkylamines as possible derivatization agents for the analysis of small carbonyl compounds by low energy mass spectrometry // European Journal of Mass Spectrometry, 2016, V. 22, № 3, P. 151-158.

Подпись:

В.Г. Заикин

Подпись главного научного сотрудника лаборатории спектральных исследований и хроматографии ИНХС РАН Заикина В.Г. заверяю:

Ученый секретарь ИНХС РАН,

кандидат химических наук, доцент



Ю.В. Костина