В диссертационный совет Д 501.001.88
при федеральном государственном бюджетном
образовательном учреждении высшего
образования «Московский государственный
университет им. М.В. Ломоносова»
от Савельевой Елены Игоревны

Настоящим даю согласие выступить официальным оппонентом на защите диссертации Шевляковой Олеси Александровны на тему: «Определение флавоноидов горянки и их метаболитов методом тандемной хроматомасс-спектрометрии высокого разрешения», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

О себе сообщаю следующие сведения:

1. Савельева Елена Игоревна, гражданин РФ.
2. Доктор химических наук (20.02.23 – Поражающее действие специальных видов оружия, средства и способы защиты), заведующая лабораторией аналитической токсикологии.
3. Федеральное государственное унитарное предприятие «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека».
4. Адрес места работы:

   188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский,
   ст. Капитолово, корп. № 93, тел. 8(812) 449-61-77 доб. 240;
   esavelieva59@mail.ru
   http://www.rihophe.ru/
5. Основные работы по профилю оппонируемой диссертации:

Околов И.Н., Тахтаев Ю.В., Мяжитова А.И., Морозова Т.Е., Криворотова Н.В., Каракашев Г.В., Савельева Е.И. Определение концентрации глазных капель левофлоксацина и моксифлоксацина в содержимом влаги передней камеры глаза методом ВЭЖХ-МС // Катарактальная и рефракционная хирургия. 2012. Т. 12. № 4. С. 44-51.

Уколов А.И., Каракашев Г.В., Уколова Е.С., Савельева Е.И., Радилов А.С. Систематический токсиколого-аналитический скрининг биологических образцов методом хроматомасс-спектрометрии. Примеры обнаружения диазепама, трамадола и прозерина // Масс-спектрометрия. 2013. Т. 10. № 2. С. 120-128.

Морозова Т.Е., Каракашев Г.В., Сорокоумов П.Н., Савельева Е.И., Зенкевич И.Г. Сравнение точности метода абсолютной градуировки и модифицированного метода последовательных стандартных добавок на примере определения 3-(2,2,2-три-метил-гидразиний)-пропионовой кислоты в моче в условиях нелинейности детектирования // Аналитика и контроль. 2013. Т. 17. № 2. С. 184-189.

Сорокоумов П.Н., Савельева Е.И., Каракашев Г.В., Копейкин В.А., Радилов А.С. Определение мельдония, гамма-бутиробетаина и карнитина в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием//Разработка и регистрация лекарственных средств 2016. № 1(14) С. 176-183.

Доктор химических наук
20.02.23 – Поражающее действие специальных
видов оружия, средства и способы защиты Савельева Е.И.

Подпись доктора химических наук Е.И.Савельевой удостоверяю:
Начальник отдела кадров Никулина Е.Е.

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

НА ДИССЕРТАЦИОННУЮ РАБОТУ

ШЕВЛЯКОВОЙ ОЛЕСИ АЛЕКСАНДРОВНЫ

«ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ ГОРЯНКИ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ МЕТОДОМ ТАНДЕМНОЙ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ»

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

официальный оппонент: Савельева Елена Игоревна, доктор химических наук, заведующая лабораторией аналитической токсикологии Федерального государственного унитарного предприятия «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства (ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России)

188 663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, ст. Капитолово, корп. №93

e-mail: savelieva@rihophe.ru

т/факс (812) 449-61-77 доб.240

Исследование биологически активных соединений природного происхождения является древнейшим направлением аналитической химии. В связи с появлением новых знаний о механизмах действия биологически активных соединений и достигаемых с их помощью фармакологических эффектах аналитическая химия природных соединений получила импульс к новому витку своего развития. В полной мере это относится и к флавоноидам. Группа флавоноидов объединяет множество соединений разнообразной химической природы. До настоящего времени не все они идентифицированы, а идентифицированные не в полной мере изучены. Появились сведения как о ранее неизвестных полезных свойствах флавоноидов, так и вызываемых ими побочных эффектах. Это создает предпосылки к тому, что на основе флавоноидов будут разрабатываться не только биологически активные добавки к пище, но и лекарственные средства, что связано с необходимостью углубленного изучения качественного и количественного состава флавоноидов, содержащихся в сырье и готовых лекарственных формах. Все этапы разработки лекарственных средств на основе природных соединений требуют решения более сложных химико-аналитических задач в сравнении с монопрепаратами синтетического

происхождения. Методики стандартизации природного сырья создаются в результате масштабных исследований, направленных на идентификацию ключевых (маркерных) компонентов и оценку допустимых границ вариабельности их качественного и количественного состава. Растения рода *Epidemium*(горянка) являются широко известным источником флавоноидов, состав которых, тем не менее, до настоящего времени исчерпывающим образом не изучен. В то же время, даже хорошо известные флавоноиды горянки характеризуются нетривиальным характером масс-спектрометрической фрагментации, что делает их интересным объектом для выполнения научно-квалификационной работы в области хроматомасс-спектрометрии. С другой стороны, валовое определение флавоноидов в растительном сырье с помощью стандартных фармакопейных методов не отвечает задачам стандартизации содержащей их пищевой и фармацевтической продукции и выявления фальсификатов. Решение этих задач требует применения современной аналитической техники, а также разработки соответствующих аналитических процедур. Таким образом, цель работы, сформулированная автором как «разработка способа определения биологически активных веществ растений рода Epimedium методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения и апробация разработанного подхода при обнаружении метаболитов флавоноидов горянки с использованием полученной из экспериментальных данных информации о путях фрагментации исследуемой группы веществ», **отвечает актуальной задаче и в полной мере соответствует научной специальности «Аналитическая химия»**.

Для достижения поставленной цели в распоряжении соискателя был жидкостный тандемный хроматомасс-спектрометр высокого разрешения, современный пакет программ для обработки данных и метаболомных исследований, установка для сверхкритической флюидной экстракции, стандартные образцы состава 7-ми наиболее известных флавоноидов горянки. Такое обеспечение исследований, с одной стороны, позволяет работать на современном уровне, конкурируя с лучшими отечественными и зарубежными лабораториями, а с другой стороны, сопряжено с повышенными требованиями, которые мы будем предъявлять к соискателю при оценке степени новизны и практической значимости достигнутых результатов.

Работа отличается логическим единством. Автором разработана оптимальная процедура для извлечения флавоноидов горянки из растительного сырья, изучены МС и МС/МС спектры 7-ми основных представителей флавоноидов горянки, установлены закономерности МС и МС/МС фрагментации этих соединений в различных режимах ионизации. Разработана и аттестована методика количественного определения эпимединов А, В и С, икариина, икаритина, икаризидов I и II в биологически активных добавках к пище, которая также может быть применена для контроля качества исходного растительного сырья и оптимизации условий изготовления продукции на его основе. Разработанная процедура отвечает насущным потребностям фармацевтической химии и может быть рекомендована для включения в Фармакопею РФ. Обоснована предпочтительность сверхкритической флюидной экстракции для извлечения флавоноидов из матриц в сравнении с другими методами, что важно не только для аналитиков, но и для технологов. Таким образом, **работа обладает безусловной практической ценностью и имеет все предпосылки для внедрения в практику**. Следует отметить, что практически все отечественные работы по теме хроматомасс-спектрометрического исследования флавоноидов горянки, имеющиеся в отрытом доступе, выполнены О.А.Шевляковой с соавторами. **Научная новизна** исследования заключается в исчерпывающем изучении масс-спектров 7-ми биологически активных компонентов горянки в различных режимах ионизации, выявлении закономерностей фрагментации икариина, икаритина, икаризидов I и II, эпимединов А и В в условиях ионизации электрораспылением. При этом установлены массовые числа характеристичных сигналов флавоноидов горянки для их группового обнаружения. Процедура определения икариина, икаритина, икаризидов I, II, эпимединов А, В и С в растительном сырье и продуктах на его основе с использованием масс-спектрометрического детектирования в режиме регистрации выбранных ионных переходов также характеризуется научной новизной. В режиме зависимого сканирования ионов-продуктов с предварительно установленными значениями нейтральных потерь удается провести и безэталонное определение некоторых флавоноидов в сложных матрицах, в частности, эпимедина С в растительном экстракте и шести метаболитов флавоноидов в моче лабораторных животных.

Алгоритм интерпретации данных, полученных методом ВЭЖХ-$МС^n$, разработанный соискателем в целях обнаружения и идентификации

флавоноидов в сложных матрицах, также можно рассматривать в ряду наиболее значимых результатов работы. Особенностью предложенного алгоритма является то, что при интерпретации масс-спектрометрической информации учитываются только продукт-ионы с предварительно установленными значениями нейтральных потерь. К числу его безусловных достоинств, помимо простоты подхода, относится также минимизация ложноположительных ответов при идентификации. К числу недостатков – узость охвата возможных структурных вариаций. В частности, при идентификации метаболитов флавоноидов в моче (таблица 21) были обнаружены только продукты гидроксилирования. В то же время, из литературных источников нам известно, что метаболизм флавоноидов горянки существенно сложнее. С точки зрения оппонента, раздел работы, посвященный идентификации метаболитов флавоноидов горянки, воспринимается как фрагмент комплексной работы, все остальные части которой скрыты от читателя. При выборе оптимальных процедур подготовки проб к ВЭЖХ-МС/МС анализу и собственно анализа соискателем использованы стандартные образцы флавоноидов. Судя по объему выполненных исследований, стандартные образцы имелись в достаточном количестве. Если задача исследования метаболизма флавоноидов горянки в работе не ставилась, но было желание апробировать разработанные подходы в биоаналитических исследованиях, было бы логично начать с изучения биотрансформации одного из флавоноидов как индивидуального вещества. Вместо этого автор сразу берется за исследование биотрансформации сложной смеси флавоноидов (экстракт *Epidemium brevicornum*). На предыдущих этапах работы было определено количественное содержание в экстракте икариина, икаритина, икаризидов I и II, эпимединов A и B. Из таблицы 13 следует, что общее содержание этих 6-ти флавоноидов соответствует приблизительно 1/3 от общей массы экстракта (по-видимому, сухого). Остальные 2/3 по массе соответствуют неизвестным компонентам. Сопоставляя состав экстракта (таблица 13) и перечень обнаруженных в моче крыс метаболитов (таблица 20), можно заключить, что предполагаемые метаболиты являются продуктами гидроксилирования икариина, икаризидов I, II, эпимединов A, B и эпимедина C (не заявленного в составе экстракта, таблица 13). Продукт гидроксилирования икаритина не обнаружен в моче скорее всего ввиду низкого содержания исходного вещества в исследуемом экстракте (1 мг/г). Кроме того, известный путь биотрансформации икариина в икаритин, по-видимому, реализован не был. О путях биотрансформации,

которые привели к полученному результату, вынести суждение не представляется возможным. В режиме целевого поиска хотя бы по точным массам полезно было бы проверить отсутствие либо предположительное присутствие других известных из литературы многочисленных метаболитов семи рассмотренных флавоноидов. Иначе можно прийти к ошибочному выводу, что гидроксилирование – единственный путь их биотрансформации. Замечания оппонента по существу работы относятся к единственному разделу – биоаналитическому, который можно рассматривать в качестве стартового (пробного) момента для будущего комплексного исследования. Последующие замечания носят редакционный характер. В частности, согласно логике событий, эпимедин С сначала был обнаружен автором в экстракте горянки в безэталонном режиме. Гипотеза была аргументированно обоснована (стр.83-84) и подтверждена позднее с применением стандартного образца. Все необходимые характеристики эпимедина С были получены, после чего вполне обоснованно он был включен в перечень флавоноидов, определение которых охватывается аттестованной методикой. При этом состав исследованных образцов не дополнен результатами определения еще одного аналита, что, как уже было отмечено выше, привело к некоторым трудностям при интерпретации результатов исследований. Отметим также некоторые лексические неточности. Перерастворение сухого остатка в подвижной фазе не следует называть восстановлением. Базы данных не описывают их (данные), а содержат, поэтому здесь неуместен союз «о»; коэффициенты извлечения, а не коэффициенты «по извлечению». Лучше не «степень экстракции», а коэффициент извлечения и не «степень», а эффективность ионизации. Попутно отметим, что снижение эффективности ионизации не единственная причина, обусловливающая эффект подавления сигнала матрицей. В рамках специальности «аналитическая химия» утверждение, что все используемые реактивы имели «аналитическую степень чистоты» должно быть конкретизировано. Выражения «предиктивный метаболизм», «спектральные деревья», «матрица после ее пробоподготовки» также относятся к лексическим двусмысленностям. В целом работа изложена грамотно, читается с интересом, легко воспринимается. Все перечисленные замечания не являются существенными и не снижают положительного впечатления от работы. Объем и качество научных результатов заслуживают высокой оценки, подтверждены публикациями в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК и соответствующих научной специальности. По своему научному уровню, значимости полученных лично

автором результатов, их обоснованности, новизне и практической ценности, а также общему объему исследований диссертационная работа соответствует критериям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, а ее автор –Шевлякова Олеся Александровна, присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

доктор химических наук по специальности 20.02.23 «Поражающее действие специальных видов оружия, средства и способы защиты», кандидат химических наук по специальности 02.00.02 «Аналитическая химия»

_____ Савельева Елена Игоревна

ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства России
188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, ст. Капитолово, корп. № 93.
тел. 8(812) 449-61-77 доб. 240
e-mail: savelieva@rihophe.ru

Подпись заведующей лабораторией аналитической токсикологии ФГУП НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека («НИИ ГПЭЧ») удостоверяю:

Ученый секретарь ФГУП «НИИГПЭЧ», доктор медицинских наук, профессор _____ Козяков В.П.

09.09.2016