

УТВЕРЖДАЮ

И.о. ректора ФГБОУ ВПО

«Кубанский государственный университет»

М.Б. Астапов

29 апреля 2014 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу Ставрианиди А.Н. на тему «Новые подходы к обнаружению физиологически активных компонентов женьшеня методом высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия

Оценка актуальности темы диссертационной работы

Обнаружение и идентификация физиологически активных компонентов в растительных материалах, широко используемых в традиционной медицине, весьма затруднительны и трудноразрешимы без развития методов современной аналитической химии. На сегодняшний день наиболее широко применяемым способом исследования структуры неизвестных веществ является высокоэффективная жидкостная хромато-масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС), сочетающая возможности высокоселективного разделения смесей и идентификацию компонентов по сигналам молекулярных и фрагментных ионов в масс-спектрах. В современных приборах имеются новые возможности ВЭЖХ-МС/МС, сочетающие в себе различные варианты комбинирования источников с «мягкой» ионизацией и нескольких масс-анализаторов для получения более информативных спектров. С другой стороны, при отсутствии качественных электронных библиотек и баз данных по физиологически активным компонентам растительного сырья, весьма сложными и трудоемкими, а зачастую невозможными становятся задачи обнаружения и идентификации соединений, входящих в состав анализируемых материалов. С этой точки

зрения, диссертационная работа Ставрианиди А.Н., посвященная обнаружению физиологически активных компонентов женьшеня представляется, несомненно, актуальной, научно и практически значимой.

Новизна исследований и полученных результатов

Соискателем проведен достаточно критический анализ известных подходов, физико-химических методов обнаружения и идентификации физиологически активных компонентов растительного сырья на примере женьшеневых сапонинов. Делается вывод о предпочтении метода ВЭЖХ-МС/МС, как наиболее перспективного метода одновременного селективного определения соединений выбранных групп. Изучены процессы формирования масс-спектров компонентов, регистрируемых с использованием линейной ионной ловушки, установлены закономерности между структурой вещества, значениями m/z и относительной интенсивностью сигнала в условиях ионизации электрораспылением. На основе полученных данных Автором предложен оригинальный способ детектирования и алгоритм, позволяющие идентифицировать структурные фрагменты сапонинов, а также классифицировать их, основываясь на паттернах фрагментации в режиме on-line.

Важным достоинством диссертационного исследования является разработка научно-методического подхода по обнаружению веществ в сложных реальных объектах. Общее число известных женьшеневых сапонинов, на сегодняшний день, превышает 600, стандартные образцы большинства из них труднодоступны или отсутствуют, а посему, развитие методов групповой ВЭЖХ-МС/МС идентификации веществ для целей получения информации о составе женьшеневого сырья и продуктов на его основе представляется весьма перспективным. Автором приводятся оптимизированные условия разделения семнадцати стандартных гинсенозидов, ставшие основой разработанного способа обнаружения этих веществ в реальных объектах, обеспечивающего высокую селективность, чувствительность и информативность регистрируемых масс-спектров. В

работе проведена проверка разработанного способа обнаружения веществ на образцах свежего и сухого корня, а также продуктах на его основе.

Несомненный интерес вызывает также разработанный соискателем селективный способ определения псевдогинсенозидов F11 и RT5 как основных биомаркеров *P. quinquefolius* в присутствии других женьшеневых сапонинов, показана возможность применения этого способа для целей контроля качества продукции на основе американского женьшеня.

Значение результатов диссертации для науки и производства

Полученные в диссертационной работе Ставрианиди А.Н. результаты имеют теоретическое и практическое значение для развития научных исследований в области анализа материалов растительного происхождения применительно к фитотерапии, фармакологии. Автором предложен эффективный способ неразрушающего извлечения гинсенозидов из различных образцов растительных материалов и коммерческих продуктов, содержащих женьшень. Соискателем показана возможность применения метода ВЭЖХ-МС/МС для надежного обнаружения гинсенозидов Rf, F11 и R1 - основных биомаркеров разных видов женьшеней, с помощью которых возможно выявление фактов фальсификации лекарственных средств и контроля качества растительного сырья на основе женьшеня.

Ставрианиди А.Н. разработаны способы определения и групповой ВЭЖХ-МС/МС идентификации физиологически активных компонентов женьшеня, входящих в состав большого количества лекарственных средств и пищевых добавок. В практическом отношении представляет несомненный интерес разработанный автором способ препаративного ВЭЖХ выделения компонентов женьшеневого чая с масс-спектрометрическим контролем чистоты выделяемых фракций, что обеспечивает возможность получения и исследования отдельных сапонинов, физиологическая активность которых еще не изучена.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа Ставрианиди А.Н., выполненная на кафедре аналитической химии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, состоит из введения, обзора литературы, 5 глав экспериментальных исследований, общих выводов и списка цитируемой литературы. Материал изложен на 179 страницах, содержит 82 рисунка и 23 таблицы, список цитируемой литературы из 230 наименований и приложение, включающее 32 рисунка и 1 таблицу на 23 страницах.

Во **введении** соискателем сформулированы актуальность, цели и задачи исследования.

В **обзоре литературы** обобщены сведения о тритерпеновых сапонидах, входящих в состав растений из рода *Panax*, описано большое разнообразие гинсенозидов, присутствующих в растительном сырье и продуктах на его основе, приведена информация по существующим подходам извлечения, применяемым в целях приготовления лекарственных средств, а также для проведения анализа этих объектов. Систематизированы данные о современных способах определения гинсенозидов в растительных материалах и продуктах на основе женьшеня.

В **экспериментальных главах** работы последовательно изложены результаты исследований в соответствии с поставленными задачами. Автором изучено масс-спектрометрическое и хроматографическое поведение гинсенозидов, а также способы их извлечения из различных объектов со сложной матрицей в свете аналитического применения масс-спектрометрии для группового и целевого анализа женьшеневого растительного сырья. В работе отражены основные принципы интерпретации масс-спектров гинсенозидов и создание алгоритма получения структурной информации о сапонидах, входящих в состав растительного сырья и коммерческих продуктов на основе женьшеня.

Большое внимание в диссертационном исследовании уделено проверке разработанных способов обнаружения и оценки содержаний гинсенозидов, извлеченных из растительного сырья и продуктов на его основе в выбранных условиях проведения экстрагирования.

Вместе с тем, по диссертационной работе имеется ряд вопросов:

1. Не совсем понятно из текста диссертации, проводилась ли оценка матричных эффектов при определении гинсенозидов, если да, то каким образом? Изучалось ли гашение ионизации от состава ПФ?

2. В диссертационной работе указаны основные параметры работы масс-спектрометра при использовании ИЭР (с. 78), приведены параметры оптимизации энергии коллизии для установления оптимальной энергии переходов, однако отсутствует график зависимости аналитического сигнала от давления газа-мишени в ячейке соударений. Данный параметр, как правило, вносит существенный вклад в величину формируемого аналитического сигнала при использовании режима селективного мониторинга реакций.

3. Хотелось бы, чтобы соискатель прояснил некоторые данные, приведенные в работе. Согласно хроматограмме раствора гинсенозида, полученной в режиме регистрации выбранных ионов в режиме ЛИЛ при концентрации 2 мкг/мл, приведенной на рис. 13 (с. 79), видно, что предпочтительно использование данного режима, поскольку он будет обеспечивать существенный выигрыш по чувствительности (судя по интенсивности сигнала). Однако данные по линейности диапазонов и пределам детектирования, приведенные в табл. 8 (с. 93), указывают, что режим SRM не только не проигрывает в чувствительности ЛИЛ, но, местами превосходит его, что, исходя из рис. 13, вряд ли может быть достигнуто в режиме SRM.

4. Из содержания диссертационной работы не совсем понятна трактовка понятия «новые подходы». Выделение областей с характеристичными массами и выделение ряда масс, характерных для

определенных классов соединений – довольно известный прием, активно применяющийся в ГХ-МС, при проведении исследований использовались штатные режимы работы масс-спектрометра от AB Sciex (ЛИЛ и SRM). Возможно, соискатель подразумевает применение комплексного подхода с использованием метода высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии к изучению весьма сложного объекта для повышения информативности результатов скрининга и определения компонентов физиологически активных компонентов женьшеня.

5. Не совсем понятен из диссертационной работы принцип выбора переходов для проведения количественного анализа. Использовались ли для этих целей несколько переходов для подтверждения?

Сделанные замечания носят частный характер и не отражаются на общей высокой оценке исследования. Диссертационная работа выполнена на высоком научном уровне, написана логично. Основные результаты диссертации опубликованы в 11 публикациях (5 статей и 6 тезисов докладов), материалы исследований широко обсуждены на профильных научно-технических конференциях. Структура и объем диссертационной работы, выводы и рекомендации, опубликованные соискателем, научные статьи, а также автореферат полностью отражают и подтверждают научные положения, рассматриваемые в данной диссертации.


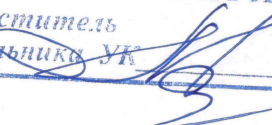
Исходя из вышеизложенного можно заключить, что работа «Новые подходы к обнаружению физиологически активных компонентов женьшеня методом высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком научном уровне, соответствует критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, установленным п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а ее автор, Ставрианиди Андрей Николаевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия.

Отзыв заслушан и обсужден на совместном заседании кафедры аналитической химии и УНПК «Аналит» ФГБОУ ВПО «Кубанский государственный университет» (протокол № 7 от 29.04.2014 г.).

Заведующий кафедрой аналитической химии
ФГБОУ ВПО «КубГУ», д.х.н., профессор
350040 Краснодар, ул. Ставропольская, д.149,
E-mail: analyt@chem.kubsu.ru

З.А. Темердашев



Подпись  ЗАВЕЯ
Заместитель
начальника УЖ  И.И. Миронова