

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»


А.А. Федянин
май 2020г.



ОТЗЫВ

ведущей организации ФГБОУ ВО «Московский Государственный университет имени М.В. Ломоносова» на диссертационную работу Фалёва Данила Ивановича на тему *Скрининг и определение пентациклических тритерпеноидов в растительном сырье хроматографическими и масс-спектрометрическими методами* предоставленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности: 02.00.02 – Аналитическая химия

Актуальность темы диссертационной работы

Пентациклические тритерпеноиды представляют собой многочисленную группу распространенных в природе вторичных метаболитов растений и обладают исключительно высокой биологической активностью. Широко известны противовоспалительные, противоопухолевые, гепатопротекторные, ранозаживляющие свойства тритерпеноидов, что делает их перспективным сырьем для производства различных фармацевтических препаратов и косметических средств. Расширяющееся применение таких соединений диктует необходимость разработки эффективных методов контроля используемого растительного сырья, включая решение вопросов обнаружения, скрининга и определения пентациклических тритерпеноидов различных классов в биомассе растений.

Диссертационная работа **Фалёва Д.И.** направлена на решение указанных проблем и посвящена совершенствованию и расширению возможностей методов и подходов к обнаружению и определению пентациклических тритерпеноидов различных классов в растительном сырье хроматографическими и масс-спектрометрическими методами. Для достижения поставленной цели соискателем решались задачи по созданию методического подхода для экспрессного и эффективного извлечения пентациклических тритерпеноидов из растительного сырья; изучению хроматографического поведения различных классов

пентациклических тритерпеноидов в условиях ВЭЖХ-анализа и разработка условий их экспрессного хроматографического разделения; разработке подходов по быстрому обнаружению и определению пентациклических тритерпеноидов в растительном сырье.

По сути, автор провел оригинальное научное исследование, обеспечивающее комплексное решение поставленной задачи, в том числе на уровне создания готовой системы быстрого скрининга и селективного чувствительного определения пентациклических тритерпеноидов, которая может быть использована для оценки содержания этих соединений в коре деревьев, корнях лекарственных растений, а также в кожуре плодов.

Из вышеизложенного следует, что актуальность диссертационной работы Фалёва Д.И. не вызывает сомнений. Отдельно следует отметить, что в связи с высокой физиологической активностью пентациклических тритерпеноидов и их важной ролью в фармацевтике, косметической и пищевой промышленности данная работа представляет несомненный практический интерес.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 123 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, пяти глав экспериментальной части, общих выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 123 источника.

Во введении дано обоснование актуальности темы исследования, сформулированы цель и задачи работы, ее научная новизна и практическая значимость. Сформулированы положения, выносимые на защиту, дана информация об апробации работы и сделанных публикациях по ее результатам. Дана характеристика личного вклада соискателя в выполнение исследования.

В обзоре литературы рассмотрены свойства пентациклических тритерпеноидов, дан подробный анализ современного состояния методов их обнаружения и определения в растительном сырье. Особое внимание уделено применению для этой цели хроматографических и масс-спектрометрических методов, отмечены существующие проблемы при хроматографическом разделении и детектировании тритерпеноидов. Из представленного критического анализа литературы органично вытекают сформулированные соискателем задачи диссертационного исследования.

В экспериментальной части дано исчерпывающее описание использованного оборудования, реагентов и материалов, условий и методик выполнения экспериментов.

В первой и второй главах раздела «Результаты и их обсуждение» автором приводятся результаты разработки подхода к аналитической экстракции пентациклических тритерпеноидов из растительного сырья, основанного на применении жидкостной экстракции под давлением. Показано, что применение в качестве экстрагента метанола позволяет достичь максимально полного извлечения аналитов и существенно повысить эффективность экстракции по сравнению с экстракцией по Сокслету при сокращении затрат времени на порядки. Получаемые с использованием различных растворителей экстракты охарактеризованы методами ГХ-МС и масс-спектрометрии высокого разрешения на основе орбитальной ионной ловушки.

Третья глава посвящена разработке методики определения четырех важнейших представителей пентациклических тритерпеноидов в коре березы методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. Достигнутые пределы обнаружения аналитов существенно снизились по сравнению с методиками, предложенными в литературе и основанными на применении ВЭЖХ-МС.

В четвертой главе для разделения более широкого круга пентациклических тритерпеноидов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ предложено использование неподвижной фазы с поперечно сшитыми октадецильными группами, демонстрирующей более высокую селективность разделения некоторых аналитов. Это позволило сократить время ВЭЖХ-МС/МС анализа до 20 мин и достичь удовлетворительного разделения большинства аналитов. Разработанный подход валидирован и прошел апробацию при анализе реальных объектов – экстрактов растений.

В пятой главе представлены наиболее интересные результаты совершенствования методологии хроматографического разделения пентациклических тритерпеноидов. Соискателем предложен оригинальный подход к одновременному высокоэффективному разделению аналитов различных классов, сильно отличающихся по полярности, при высокой селективности разделения структурно близких аналитов внутри каждого класса. Он основан на применении неподвижной фазы со смешанным механизмом удерживания, сочетающим гидрофобные, гидрофильные и ионообменные взаимодействия с аналитами. Многообразие параметров, влияющих на хроматографическое удерживание аналитов открывает большие возможности для настройки селективности разделения сложных смесей пентациклических тритерпеноидов, однако, с другой стороны, требует достаточно сложной процедуры оптимизации условий разделения. Такая оптимизация выполнена в диссертационной работе на основе изучения влияния различных факторов на удерживание аналитов различных классов и позволила достичь практически полного разделения десяти

аналитов за 7,5 мин. На этой основе разработана и валидирована методика определения пентациклических тритерпеноидов в экстрактах растений методом ВЭЖХ на неподвижной фазе со смешанным механизмом удерживания – тандемной масс-спектрометрии.

Шестая и седьмая главы посвящены разработке подходов к нецелевому скринингу пентациклических тритерпеноидов в растительном сырье с использованием методов масс-спектрометрии МАЛДИ и жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии в режиме сканирования ионов-предшественников. Первый метод позволяет проводить быстрое исследование большого количества проб на наличие тех или иных классов тритерпеноидов при минимальной пробоподготовке. Второй метод позволяет предположительно идентифицировать конкретных представителей различных классов и их производные за счет получения структурной информации из тандемных масс-спектров. Предложенные подходы успешно апробированы при исследовании нескольких типов растительных объектов.

В разделе «Выводы» подведен итог выполненных исследований, сформулированы основные выводы, полностью соответствующие поставленным целям и задачам.

Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научная новизна диссертации заключается в получении большого массива новых данных по свойствам пентациклических тритерпеноидов. Установление закономерностей удерживания аналитов позволило в широких пределах регулировать селективность хроматографического анализа. Показано, что экстракция под давлением с применением метанола в качестве экстрагента при температуре 100 °С обеспечивает существенное увеличение эффективности экстракции по сравнению с традиционной экстракцией по Сокслету. Предложен способ одновременного определения десяти пентациклических тритерпеноидов различных классов в экстрактах растений, основанный на сочетании градиентной обращенно-фазовой хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием в режиме химической ионизации при атмосферном давлении. Предложен оригинальный подход к быстрому обнаружению и полуколичественному определению пентациклических тритерпеноидов методом МАЛДИ-МС, основанный на использовании углеродных матриц и добавления ионов лития для образования катионированных молекул.

Значимость для науки и производства (практики) полученных автором диссертации результатов не вызывает сомнений. Полученные результаты имеют большое

значение для совершенствования методологии хроматографического и масс-спектрометрического анализа биомассы растений и продуктов на ее основе, развития методов хроматографического анализа с использованием неподвижных фаз со смешанным механизмом удерживания, создания новых подходов к аналитической экстракции природных соединений из растительного сырья. Практическое значение работы заключается в разработке комплекса методик и подходов к скринингу и определению пентациклических тритерпеноидов в различных объектах для создания системы контроля сырья, полуфабрикатов и конечной продукции в таких отраслях как фармацевтика, фармакогнозия, косметология и пищевая промышленность.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Полученные Фалёвым Д.И. результаты представляют теоретический и практический интерес и могут быть использованы в работе сотрудниками Московского, Санкт-Петербургского, Казанского, Воронежского, Саратовского, Кубанского государственных университетов, Самарского национального исследовательского университета имени академика С.П. Королева, Института физической химии и электрохимии имени А.Н. Фрумкина РАН, Института геохимии и аналитической химии имени В.И. Вернадского РАН, Института физиологии растений РАН и др.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений

Достоверность полученных в диссертации результатов подтверждается их удовлетворительным согласием с данными литературы и не вызывает сомнений. Сделанные выводы и заключения полностью соответствуют приведенным экспериментальным данным и хорошо обоснованы автором диссертационной работы. Работа прошла хорошую апробацию. Опубликованы четыре статьи в журналах, рекомендованных ВАК, а также 13 тезисов докладов. Результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на представительных профильных конференциях различного уровня.

Оценка содержания диссертации, её завершенность в целом, замечания по оформлению

Диссертационная работа **Фалёва Д.И.** содержит все обязательные составляющие для такого уровня исследований и включает введение, обзор литературы, характеристику объектов и методов исследования, обсуждение полученных результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Содержание автореферата отражает основное содержание

диссертационной работы. Полученные соискателем результаты в полном объеме отражены в сделанных в соавторстве публикациях по теме исследования.

Диссертационная работа Фалёва Д.И. не лишена отдельных недостатков:

1. В выводе 5 работы указано, что пределы обнаружения для исследованных соединений, полученные при применении разработанного МАЛДИ-МС подхода, оказались на уровне 0.5-100 мг/л. Такие высокие пределы обнаружения для лупеола и α/β -амиринов ставят под сомнение применение данного подхода к определению этих компонентов, поскольку их измеряемые содержания (стр. 106) в исследуемых объектах можно будет оценить только в случае приготовления сильно концентрированного экстракта. Как влияла такая проба на ионизацию и вид масс-спектров?
2. При обсуждении рисунка 33 авторы указывают значения R_s на уровне 1.25 и 1.70 для критических пар олеанололовая/урсоловая кислоты и α/β -амирины соответственно, подчеркивая, что значение 1.70 близко к оптимальному. Общепринято, считать $R_s = 1.5$ достаточным для проведения точных измерений концентрации, так как перекрытие хроматографических пиков будет на уровне 0.15% по площади. На рисунке отчетливо видно, что указанные авторами значения R_s несколько завышены, что и заставляет их говорить о не вполне достигнутом разделении даже на уровне $R_s = 1.7$. И использованные формулы для расчета R_s в тексте диссертации не приведены.
3. В таблице 7 диссертации приведены факторы удерживания k , полученные при разделении пентациклических тритерпеноидов на колонке Shim-pack XR-ODS II в градиентном режиме элюирования. Расчет этих параметров представляется некорректным в условиях изменяющейся концентрации сильного элюента в подвижной фазе.
4. В таблице 8 диссертации и соответствующей ей таблице 4 автореферата по-разному названы параметры детектирования – Потенциал на предквадруполе Q1, В и Энергия на Q1, В. Неясно, что именно авторы варьировали и каким образом выбирали оптимальное значение.
5. На рисунке 10 автореферата пик бетулиновой кислоты не значительно отличается по высоте от уровня шума. Не указано разбавление экстракта. Значит ли наличие значения в таблице 6 для содержания бетулиновой, что был проанализирован этот экстракт с меньшим разбавлением, чтобы зарегистрировать её хроматографический пик?

Сделанные замечания не снижают общей положительной оценки диссертационного исследования **Фалёва Д.И.** и местами носят характер научной дискуссии. Из

представленной работы видно, что Фалёв Д.И. в ходе выполнения диссертационной работы продемонстрировал профессионализм в таких областях, как жидкостная хроматография и масс-спектрометрия, пробоподготовка сложных объектов что свидетельствует о его высокой квалификации и широком научном кругозоре.

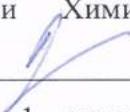
Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней

В научной квалификационной работе Фалёва Д.И. решены задачи, имеющие существенное значение для развития теоретических представлений и расширения сферы практического применения жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии с ионизацией при атмосферном давлении, развития методологии использования хроматографических и масс-спектрометрических методов в изучении состава растительных материалов.

Диссертационная работа Фалёва Д.И. соответствует требованиям п. 9 Постановления Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. N 842 "О порядке присуждения ученых степеней" (с изменениями, внесенными Постановлением Правительства РФ от 21 апреля 2016г. № 335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 - аналитическая химия.

Отзыв подготовили  Чл.-корр. РАН, д.х.н. проф. О.А. Шпигун
 к.х.н., доцент А.Н. Ставрианиди

Отзыв заслушан и утвержден на заседании кафедры аналитической химии Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, протокол заседания № 2 от 02 марта 2020 года.

И.О. Заведующего кафедрой аналитической химии Химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова  М.А. Проскурнин

Почтовый адрес: 119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 3, ГСП-1, МГУ, химический факультет, кафедра аналитической химии.

Телефон: +7 (495) 939-55-64

Электронная почта: kafedra@analyt.chem.msu.ru

Секретарь заседания

 В.В. Апяри

Зам. декана Химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова по научной работе,
д.х.н

 М.Э.Зверева