

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

о диссертации Азарян Алисы Андреевны "*Хромато-масс-спектрометрическое определение некоторых ксенобиотиков и катехоламинов в биологической жидкости человека*", представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия

В настоящее время наблюдается рост создания новых фармацевтических препаратов, которые находят применение как для лечения различных заболеваний, так и в качестве допинг-агентов, т.к. они становятся доступными на черном рынке биологически активных добавок и вспомогательных препаратов для спортсменов, хотя далеко не все препараты проходят полный цикл клинических испытаний. Ряд препаратов, примененных в качестве стимуляторов в профессиональном спорте, позже получили распространение среди лиц с наркотической зависимостью, т.к. с увеличением концентрации, они начинали проявлять типичные свойства наркотических средств. Наблюдается также рост популярности «аптечных наркотиков» – веществ, находящихся в открытой продаже и являющихся лекарственными препаратами без ярко выраженных психоактивных свойств.

Все это требует разработки современных методов контроля, отличающихся экспрессностью, высокой точностью и надежностью, разработки методик контроля подобных веществ в биологических жидкостях. В связи с этим поставленная диссертантом задача – разработка аналитических схем хромато-масс-спектрометрического определения некоторых психоактивных веществ, допинг-агентов и катехоламинов в биологической жидкости человека, является весьма актуальной.

Для решения подобных задач наиболее эффективными представляются методы хромато-масс-спектрометрии в различных вариантах их исполнения, которые позволят проводить идентификацию различных ксенобиотиков в криминалистических и токсикологических лабораториях с последующим подтверждением полученных результатов с помощью методов газовой хромато-масс-спектрометрии, а также позволяет установить факт фальсификации продукции и обнаружить не декларированные компоненты, что особенно важно в случаях контроля спортивного питания и биологически активных добавок.

Диссертация Азарян А.А. имеет **традиционную структуру** и включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть и обсуждение результатов, выводы и список цитируемой литературы. Работа содержит большое количество иллюстративного материала, что облегчает понимание и анализ полученных результатов.

Обстоятельный, аналитический **обзор литературы** в полной мере отражает современное состояние применения наркотических соединений и психоактивных веществ в

спорте в качестве стимуляторов, а также среди лиц с наркотической зависимостью. Автором обсуждены и систематизированы методы определения некоторых наркотических средств и психоактивных соединений в различных биологических жидкостях, рассмотрены основные проблемы аналитического контроля ряда различных ксенобиотиков, включенных в запрещенный список ВАДА, и катехоламинов в биологической жидкости человека. Показаны основные подходы и проблемы, связанные с подготовкой проб к анализу и задачи инструментального и методического обеспечения для определения некоторых ксенобиотиков в биологических жидкостях человека. Анализ литературных данных показывает, что основным методом исследования анализируемых объектов является высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием.

**Научная новизна проведенных исследований и полученных результатов** определяется совокупностью новых полученных данных о способе количественного определения мельдония в моче методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме гидрофильной хроматографии, отвечающем требованиям точности, экспрессности, надежности и чувствительности. Разработана аналитическая схема хромато-масс-спектрометрического определения некоторых ксенобиотиков в биологической жидкости человека и продуктах спортивного питания, позволяющая проводить экспрессное и высокочувствительное определение аналитов для целей клинической диагностики и допинг-контроля.

**Практически значимым результатом работы** является разработанная автором методика количественного определения производных катехоламинов в моче человека путем их дериватизации на патроне для твердофазной экстракции. С учетом простоты и воспроизводимости предлагаемая методика может быть использована в клинической лабораторной практике для диагностики различных заболеваний, а также для мониторинга биологического паспорта спортсмена. Разработанная оригинальная методика определения мельдония в моче человека метрологически аттестована и внесена в Федеральный реестр методик измерений. Методика введена в практику и используется в ЦКП «Эколого-аналитический центр» Кубанского госуниверситета.

Первая глава диссертационного исследования посвящена синтетическим наркотическим средствам и психоактивным веществам, их распространению в качестве стимуляторов в профессиональном спорте, а также среди лиц с наркотической зависимостью. Приведен достаточно систематизированный обзор по методам определения наркотических средств и психоактивных соединений в различных биологических жидкостях. Рассмотрены основные проблемы аналитического контроля ряда различных ксенобиотиков, включенных в запрещенный список ВАДА, и катехоламинов в биологической жидкости человека. Результатом тако-

го анализа является вывод о приоритетности применения высокоэффективной жидкостной хроматографии с масспектрометрическим детектированием для исследования такого рода объектов. Показаны основные подходы и проблемы, связанные с подготовкой проб к анализу и задачи инструментального и методического обеспечения для определения некоторых ксенобиотиков в биологических жидкостях человека.

**Вторая глава** диссертации посвящена описанию эксперимента и обсуждению полученных результатов. Автором проведено обоснование выбора метода исследования для определения некоторых ксенобиотиков и катехоламинов в биологических жидкостях человека. Рассмотрены основные классы, проблемы идентификации и определения некоторых ксенобиотиков в биологических жидкостях человека, проведены скрининговые исследования различных видов продуктов спортивного питания и вспомогательных препаратов для обнаружения в них психоактивных соединений, допинг-агентов методами ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС. В ходе хромато-масс-спектрометрического исследования ряда продуктов, реализованных в период с 2014 по 2016 гг., в составе предтренировочных комплексов, жиросжигателей и прогормонов обнаружены запрещенные ВАДА вещества.

Резюмируя выполненный анализ основной части диссертации Азарян А.А., можно заключить, что все представленные на защиту **положения и результаты являются новыми** и представляют большой **теоретический и практический интерес**.

Большинство данных систематизировано в виде рисунков и таблиц, что значительно облегчает поиск необходимой информации. Качество выполненного аналитического обзора литературных данных подтверждается большим числом цитированных в нём работ (146 ссылок).

**Достоверность** результатов настоящей работы подтверждается хорошей воспроизводимостью и правильностью аналитических результатов. Представленные в работе результаты исследований, их обсуждение и аргументированность выводов свидетельствуют о высоком научно-методическом уровне работы. Поставленная в диссертационной работе цель достигнута и задачи решены. Обсуждение полученных результатов выполнено с использованием классических подходов, что свидетельствует о высоком уровне проведенного научного исследования. Азарян А.А. является сложившимся специалистом в области аналитической химии.

Работа прошла **хорошую апробацию**. Результаты и выводы диссертации доложены и обсуждены на представительных международных, российских и региональных конференциях. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи, 6 тезисов докладов и получен 1 патент РФ на изобретение.

Работа Азарян А.А. хорошо структурирована, подробно изложена и аккуратно оформлена. **Автореферат и публикации полностью отражают** содержание диссертации, соответствующей паспорту научной специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

Несмотря на безусловно положительное впечатление, диссертационная работа не лишена отдельных **недостатков**:

1. Применение метода «разбавил-и-вколол» и различных видов гидролиза - достаточно известная процедура, повсеместно применяемая в хромато-масс-спектрометрии. Согласно литературным данным, применение ферментативного гидролиза позволяет избежать деградации целого ряда метаболитов и нативных веществ, в отличие от минерального гидролиза. Чем был обусловлен выбор минерального гидролиза при проведении исследований, связанных с некоторыми «аптечными наркотиками» и стимуляторами? Существует ли допустимый порог остаточных содержаний этих веществ в моче?
2. Насколько достаточным доказательством факта употребления экзогенных анаболических стероидов является соотношение тестостерон/эпитестостерон (Т/Е)?
3. В разделе, посвященном изучению продуктов спортивного питания, приводится идентификация компонента, реализуемого под видом лаксогенина. Из работы следует, что фактически под этим видом реализовывался 20-гидроксиэкдизон (20E), а в качестве доказательства, приводится описание и характеристика фрагментации. Насколько такой подход достоверен?
4. В этом же разделе приведены сведения о результатах исследования некоторых пептидов, используемых в качестве релизинг-пептидов гормона роста. Проводилось ли изучение стабильности пептидов во времени и при разных температурах? Рассматривался ли вариант деградации соединений при нарушениях условий их транспортировки и хранения? Являются ли указанные детектируемые ионы единственными образующимися в ходе ионизации?
5. При определении мельдония в моче использован только 1 MRM-переход. Но из рекомендаций ВАДА следует, что для этого стоит использовать минимум 2, а, желательно, 3 перехода. Насколько можно говорить о достаточной надежности и селективности метода с использованием всего 1 перехода? Проводилось ли изучение кинетики выведения мельдония из организма?
6. Чем обусловлено применение твердофазной аналитической дериватизации при определении катехоламинов? Насколько необходимо было проводить дериватизацию аналитов, не лучше ли было использовать прямое их определение в режиме гидрофиль-

ной хроматографии, в условиях которой чувствительность метода ВЭЖХ-МС/МС был бы выше благодаря большому содержанию ацетонитрила в составе подвижной фазы?

Сделанные замечания не снижают общей, безусловно, положительной оценки диссертационного исследования Азарян А.А. и могут по ряду позиций рассматриваться как элемент научной дискуссии.

**Результаты работы могут быть использованы** при проведении научных исследований в Кубанском государственном университете (г. Краснодар), Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова (г. Москва), Санкт-Петербургском государственном университете (г. Санкт-Петербург), в антидопинговых лабораториях, а также в учебных курсах по аналитической хроматографии. Спектр потенциальных областей применения результатов работы весьма широк. Разработанные методы и подходы могут применяться в медицинской практике для терапевтического лекарственного мониторинга, для мониторинга наркотических и психоактивных соединений в биологической жидкости человека, и т.д.

Диссертационная работа Азарян Алисы Андреевны "Хромато-масс-спектрометрическое определение некоторых ксенобиотиков и катехоламинов в биологической жидкости человека" по объему и качеству выполненных исследований, актуальности, новизне, достоверности и научной обоснованности полученных результатов и выводов полностью соответствует требованиям пункта 9 "Положения о присуждении ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842, а сам диссертант, Азарян Алиса Андреевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

Официальный оппонент: Член-корреспондент РАН, д.х.н., профессор кафедры аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, заведующий лабораторией хроматографии (119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, МГУ, д.1, стр.3, химический факультет, кафедра аналитической химии;  
e-mail: [shpigun@analyt.chem.msu.ru](mailto:shpigun@analyt.chem.msu.ru),  
тел.: (495)939-13-82



Олег Алексеевич Шпигун

Подпись О.А. Шпигуна заверяю  
И.о. декана химического факультета  
Член-корр. РАН, профессор



С.Н.Калмыков