

Отзыв

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени

доктора химических наук

Темердашева Азамата Зауалевича

на тему

«ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В АНАЛИТИЧЕСКОЙ ТОКСИКОЛОГИИ И ДОПИНГ-КОНТРОЛЕ»

по специальности

02.00.02 – Аналитическая химия

Актуальность темы исследования. Существующие подходы к анализу смесей наиболее распространенных наркотических веществ и современных допинг-агентов базируются на методологии нецелевого и направленного скрининга. С 2000-х гг подавляющее большинство исследований в этом направлении решаются методами хромато-масс-спектрометрии и тандемной масс-спектрометрии. Новые наркотические средства (НС) получили широкое распространение в период 2003–2005 гг, а с 2008 по 2016 гг., вследствие доступности и легальности на момент их распространения стремительно выросла популярность т.н. *дизайнерских наркотиков* – синтетических наркотических средств, отличительная особенность которых – наличие структурного подобия с нейромедиаторами и природными психоактивными соединениями. Метаболиты НС, как правило, представляют собой неизвестные ранее соединения. При этом процесс обновлений коммерческих библиотек (NIST и MPW) слишком длителен, что не удовлетворяет требованиям оперативного реагирования на появление новых НС. Исходя из многообразия синтетических наркотиков и динамики появления новых дизайнерских образцов, **актуальными** задачами в области контроля НС является поиск путей выявления новых и скрининг уже известных соединений в нативном виде, растительном сырье и биологических жидкостях.

Научная новизна. Диссертантом разработан комплексный подход целевого и нецелевого скрининга различных ксенобиотиков методами газовой и жидкостной хроматомасс-спектрометрии. Предложена методология полного цикла анализа образцов от нативных веществ и их смесей, средств и препаратов на их основе до

обнаружения в биологических жидкостях в нативном виде и в форме метаболитов. Предложена аналитическая схема хроматографического определения, включающая скрининг, идентификацию и определение 52-х наиболее распространенных наркотических и психоактивных средств природного и синтетического происхождения (тропановые опийные алкалоиды, α -аминоарилкетоны, производные N-алкилиндолил- и N-алкилиндазолил-кетоны) в различных объектах. Выявлены и идентифицированы представители новых классов допинг-агентов: рилизинг-пептиды гормона роста, селективные модуляторы андрогенных рецепторов, некоторые стимуляторы и наркотические вещества. Методом УВЭЖХ-МС/МС для всех изученных наркотических соединений выявлено два MRM-перехода, что в совокупности с установленными индексами удерживания и основными характеристичными ионами их ГХ-МС определения обеспечило достоверное обнаружение следовых количеств аналитов. Изучены возможности различных вариантов нецелевого скрининга при исследовании метаболизма ксенобиотиков. Показано, что в отношении селективных модуляторов андрогенных рецепторов и их метаболитов, а также исследованных стимуляторов и наркотических веществ возможна унификация методик, направленных на скрининг широкого спектра допинг-агентов, таких как анаболические стероиды, глюкокортикостероиды, наркотики и стимуляторы.

Практическая значимость. Разработаны методики скрининга и определения некоторых наркотических средств природного и синтетического происхождения, включая новые «дизайнерские» катионы и синтетические каннабиноиды, нашедшие практическое применение в экспертно-криминалистическом центре Главного управления МВД России по Краснодарскому краю и бюро судебно-медицинской экспертизы г. Краснодара. Разработанная методика определения мельдония в моче методом УВЭЖХ-МС/МС с электрораспылительной ионизацией в режиме гидрофильной хроматографии валидирована, метрологически аттестована (МИ 02067847.02-2017 "Определение мельдония в моче человека. Методика измерений методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием") и внесена в Федеральный реестр аттестованных методик измерений ФР.1.31.2018.29251. Методика определения

мельдония в молоке востребована при выполнении исследования в рамках урегулирования спора с РУСАДА в целях демонстрации возможности контаминации продуктов питания запрещенными веществами. Показана возможность применения скрининга ряда наркотических и психоактивных веществ в биологических жидкостях для химико-токсикологических и антидопинговых лабораторий.

Степень достоверности и апробации результатов. Достоверность сформулированных научных положений, полученных результатов и выводов к работе обеспечена использованием современных инструментальных методов исследования и научного оборудования для хроматографических и масс-спектрометрических измерений, высокой степенью корреляции полученных экспериментальных результатов с теоретически ожидаемыми и независимыми методами исследования, согласованностью с литературными данными. Разработанные методики определения наркотических, психоактивных веществ и допинг-агентов в растительном сырье, лекарственных препаратах и биологических жидкостях отвечают требованиям всемирного антидопингового агентства (ВАДА).

Соответствие специальности 02.00.02 – аналитическая химия. Диссертационная работа Темердашева А.З. соответствует пункту 2 «Методы химического анализа», пункту 10 «Анализ органических веществ и материалов», пункту 13 «Анализ пищевых продуктов», пункту 15 «Анализ лекарственных препаратов» паспорта специальности 02.00.02 – аналитическая химия. Успешное решение таких важнейших задач как оценка аналитических возможностей методов ГХ–МС и УВЭЖХ-МС/МС для определения и скрининга наркотических средств природного и синтетического происхождения; оптимизация условий пробоподготовки объектов со сложной матрицей обеспечило диссертанту возможность достижения целей диссертационной работы. Перечисленные задачи соответствуют научной специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

Объем и структура работы. Оценка содержания диссертации. Диссертационная работа изложена на 375 страницах машинописного текста, содержит 80 таблиц и 78 рисунков, состоит из введения, литературного обзора, 14 глав экспериментальной части с обсуждением результатов, общих выводов, списка цитируемой литературы из 621 наименования и 4-х приложений.

В обзоре литературы обсуждаются вопросы классификации, определения и идентификации природных и синтетических наркотических и психоактивных веществ в растительных материалах, биологически активных добавках, продуктах питания, лекарственных формах. Особое внимание уделено методологии нецелевого скрининга. Тщательно проанализированы состояние и аспекты определения стероидов и катехоламинов в биологических жидкостях человека. Сделано заключение, что основными методами определения наркотических и психоактивных средств в различных объектах являются методы газовой, жидкостной хроматографии и хромато-масс-спектрометрии. Выявлена постоянно возрастающая роль масс-спектрометрии высокого разрешения для целевого и нецелевого скрининга.

Целью диссертационного исследования Темердашева Азамата Зауалевича явилась разработка методологии комплексного подхода к анализу наркотических средств природного и синтетического происхождения и их метаболитов в биологических жидкостях человека с использованием целевого и нецелевого скрининга для решения задач криминалистики, аналитической токсикологии и допинг-контроля, а также обоснование и реализация новых подходов к пробоподготовке и мониторингу при изучении стероидного и катехоламинового профиля, метаболизма новых ксенобиотиков в организме человека.

В экспериментальной части и обсуждении результатов описаны объекты исследования, реактивы и материалы, используемое оборудование, методы и методики анализа. Рассмотрены результаты целевого и нецелевого скрининга ксенобиотиков в биологических жидкостях человека, обоснована целесообразность применения твердофазной аналитической дериватизации катехоламинов и дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции при определении стероидных гормонов.

В главе *Определение наркотических и психоактивных веществ в растительном сырье* представлены результаты разработанной диссертантом оригинальной аналитической схемы определения низких содержаний опийных алкалоидов на семенах мака масличного пищевого методом ВЭЖХ-ДМД. До выполнения настоящего исследования подобная информация отсутствовала. Найден состав экстрагента, обеспечивший максимальное извлечение алкалоидов путем

перевода их из основной в солевую форму, растворимую в воде, что позволило определить и меконовую кислоту, являющуюся природным спутником опия. В исследуемых образцах методом ВЭЖХ-ДМД диссертантом обнаружены и определены морфин и кодеин. Показано, что при определении тропановых алкалоидов методом ГХ-МС, выбранным в качестве подтверждающего, предварительная дериватизация не требуется ввиду их термической устойчивости.

При ВЭЖХ-МС исследовании дурмана индийского автором работы предложено несколько вариантов пробоподготовки с акцентом на твердофазную экстракцию (ТФЭ). С учетом полярности аналитов предпочтение отдано варианту электрораспылительной ионизации. В режиме регистрации положительных ионов в экстракте дурмана индийского идентифицированы помимо скополамина и атропина, гоматропин, апоскополамин, апоатропин.

В главе *Определение некоторых наркотических и психоактивных средств синтетического происхождения* представлены результаты определения синтетических каннабиноидов, широко применяемых в курительных смесях типа «Спайс» и стимуляторов, являющихся производными α -аминоарилкетонов. Синтетические каннабиноиды, подобно природным, также являются агонистами каннабиноидных рецепторов, не уступая своим предшественникам по степени воздействия на них. Поскольку используемый способ экстракции аналитов не является селективным, диссертант провел оценку количества соэкстрактивных веществ с целью установления возможных матричных влияний. Для повышения надежности определения аналитов убедительно показана целесообразность сочетания методов УВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС. Общее время проведения аналитического цикла при совместном определении 52-х соединений не превысило 1 ч.

При оптимизация условий скрининга наркотических средств природного и синтетического происхождения диссертант использовал методы быстрой газовой хроматографии и ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией, соблюдая критерии ВАДА: разница между временем удерживания стандарта и определяемого аналита не должна превышать 0.1 мин; для идентификации необходимо использовать как минимум 3 характеристичных иона. Для всех соединений установлены минимум 2 MRM перехода, что в совокупности

со временем удерживания, а также результатами ГХ-МС обеспечило надежную идентификацию.

Интересно и важно следующее заключение. Показано, что для скрининга наркотических средств природного и синтетического происхождения применение ВЭЖХ-МС/МС в режимах сканирования продуктов и селективного мониторинга реакций (SRM) обеспечивает получение необходимой информации без предварительной дериватизации, а использование фиксированного значения энергии соударений в режиме полного сканирования спектра продукт-ионов позволило использовать полученный спектр как один из параметров для идентификации. Надежно идентифицированы соединения различных классов: алкалоиды (тропановые, опиоидные), α -аминоарилкетоны, а также производные N-алкилиндолилкетонов и N-алкилиндазолилкетонов. Для оценки адекватности предложенной схемы выполнен анализ 23 реальных образцов курительных смесей, «солей для ванн» и «удобрений». В большинстве курительных смесей обнаружен JWH-018, запрещенный к обороту на территории многих стран. При анализе образца, оказавшегося героином, среди сопутствующих соединений обнаружены кофеин и димедрол.

При определении запрещенных соединений в продуктах питания, БАД и спортивном питании диссертантом решена задача корректного определения эфедрина, обнаруженного в некоторых образцах жиросжигателей, параметры удерживания которого и масс-спектр совпадали с псевдоэфедрином. Для идентификации в качестве подтверждающего использован метод СВЭЖХ-МС/МС, обеспечивший эффективное разделение эфедрина и псевдоэфедрина.

Специальные главы диссертационной работы посвящены стратегии обнаружения мельдония в пищевых объектах и в биологических жидкостях. Мельдоний имеет только один характеристичный переход из-за малой молекулярной массы. Высокая полярность в сочетании с небольшой молекулярной массой могли бы вызвать дополнительные проблемы с определением мельдония из-за сильно выраженных матричных эффектов и слабого удерживания в режиме ОФ-ВЭЖХ. Эта нетривиальная задача также была успешно решена диссертантом. Данное соединение достаточно эффективно ионизируется, что, в сочетании с режимом гидрофильной хроматографии позволило достичь достаточно низких пределов обнаружения. Ввиду

отсутствия изотопно-меченых стандартов в качестве внутреннего стандарта диссертант использует габапентин, который не является эндогенным соединением и близок по структуре мельдонию. Ввиду склонности к образованию интенсивных протонированных молекулярных ионов ($[M+H]^+$) ионизация мельдония и габапентина осуществлялась с использованием источника электрораспылительной ионизации с последующей регистрацией положительных ионов.

При определении т.н. «аптечных наркотиков» (атропин, скополамин; 4-метилэтилкатион; прегабалин, фенибут и др.) в биологических жидкостях было установлено, что чувствительность определений для большинства аналитов с использованием источника химической ионизации при атмосферном давлении недостаточна, что послужило в ходе разработки методики причиной выбора нагреваемого источника электрораспылительной ионизации. Для каждого вещества устанавливали, как минимум, 2 MRM-перехода. Установлено, что матричные эффекты оказывают достаточно серьезное влияние на величину аналитического сигнала.

Определение рилизинг-пептидов гормона роста в моче потребовало оптимизации режима ТФЭ и условий масс-спектрометрического детектирования. Наибольшая степень извлечения аналитов достигнута при использовании патронов со слабым катионообменным сорбентом (WCX). Выявлены возможности проведения анализа, при котором масс-спектрометр постоянно осуществляет переключение между режимом сканирования полного ионного тока ионов-прекурсоров и широкополосным сканированием ионов-продуктов, при котором аналитический квадруполь пропускает весь заданный диапазон масс в ячейку соударений. При наличии коэлюирующихся матричных соединений регистрируются спектры ионов-продуктов как аналитов, так и матричных компонентов.

Проведено сравнение методологии «Wrong-way round ionization» с известными методами определения рилизинг-пептидов гормона роста в режиме гидрофильной хроматографии и классическим определением с использованием обращено-фазовой УВЭЖХ-МС/МС. Убедительно показано, что несмотря на возможность переноса протона в газовой среде от аммиака к молекуле аналита и формировании преимущественно монозарядных ионов, добиться большей чувствительности по сравнению с использованием подкисленной подвижной фазы не удается.

Грамотная и тщательно продуманная пробоподготовка с использованием дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции обеспечила диссертанту успешный результат при определении стероидных гормонов в моче. Анаболические стероиды до сих пор относятся к наиболее распространенному виду допинга в мире.

Необходимо было подобрать диспергент, способный растворяться не только в экстрагенте, но и в среде, из которой экстрагируются аналиты. Для учета влияния варьируемых параметров внутренние стандарты (метилтестостерон, d3-тестостерон и d3-эпитестостероны) вводили в исследуемые пробы перед началом пробоподготовки. Поскольку стероидные гормоны выводятся из организма преимущественно в конъюгированной форме, при их определении часто используют стадию деконъюгации. Диссертант учитывал, что в отличие от ряда ксенобиотиков, стероиды разрушаются при длительной экспозиции в среде минеральных кислот и нагревании. Это, в свою очередь, может привести к искажениям результатов и деградации пробы.

Предлагаемый вариант извлечения стероидных гормонов методом дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции с последующим УВЭЖХ-МС/ВР определением позволил достичь предела детектирования на уровне от 0.25–10 нг/мл, что полностью перекрывает значимые диапазоны концентраций и сохраняет возможность проведения нецелевого скрининга.

Интересное решение найдено и в случае катехоламинов, где автором диссертационного исследования предложена схема экспрессной пробоподготовки на принципах твердофазной аналитической дериватизации. При этом сам сорбент не подвергается модификации, а избыток дериватирующего агента ускоряет протекание реакции.

Особое внимание в диссертационной работе уделено определению наркотических и психоактивных веществ в биологических жидкостях с использованием методов целевого и нецелевого скрининга. Биожидкости обладают сложной матрицей, которая способна как гасить ионизацию аналитов, так и способствовать её усилению. Диссертантом выбран метод УВЭЖХ-МС/МС, позволяющий проводить экспрессное определение с минимальной пробоподготовкой таких образцов, как моча и кровь. Поскольку синтетические каннабиноиды практически полностью метаболизируются в организме, в моче определяют исключительно их метаболиты. Последние, в

зависимости от пробоподготовки, будут в форме конъюгатов или в свободной форме. Показано, что предпочтительным является применение минерального гидролиза, как более доступного и простого способа подготовки проб, обеспечивающего определение не только нативных стимуляторов, но и их метаболитов.

Сильной стороной диссертационного исследования является предлагаемая стратегия анализа в зависимости от природы аналита и цели исследования. Отмечено, что при использовании ВЭЖХ-МС/МС систем низкого разрешения целесообразно проведение только целевого скрининга, чтобы свести к минимуму возможность ложноположительной идентификации. Использование масс-спектрометрии высокого разрешения позволяет проводить нецелевой скрининг синтетических каннабиноидов, т.к. большинство известных синтетических каннабиноидов «конструируются» вокруг известной базовой структуры – индольной или индазольной, что позволяет предположить набор молекулярных и псевдомолекулярных ионов метаболитов. Для уменьшения количества вероятных кандидатов предлагается использовать также и точность определяемых масс: для молекулярных и псевдо-молекулярных ионов удовлетворительным является расхождение в массах не более 10, а продукт-ионов – не более 20 ppm.

К весьма значимым результатам диссертационной работы относится и поиск метаболитов ноотропного препарата унифирама в режиме нецелевого скрининга с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения. Для снижения риска возникновения ложноположительного результата диссертанту необходимо было предусмотреть ряд дополнительных предосторожностей. Среди них – требования к отсутствию пиков эндогенных соединений, имеющих параметры удерживания, сопоставимые с предполагаемыми метаболитами и минимизация ошибки определения масс (менее 5 ppm для режима сканирования ионов-прекурсоров и не более 10 ppm в режиме сканирования ионов-продуктов). Немаловажным способом проверки корректности первичных заключений явилась и оценка изотопного распределения. В случае унифирама, в структуре которого несколько разных гетероатомов, это – принципиально. Диссертанту удалось выделить два потенциально возможных метаболита унифирама. Методология нецелевого поиска метаболитов для такого случая строилась на постепенном увеличении элюирующей силы подвижной фазы с

быстрой регистрацией спектра ионов-прекурсоров и ионов-продуктов. Применение режима сканирования *full MS*, в свою очередь, позволило достичь максимальной чувствительности для QTOF-систем из-за отсутствия потерь в процессе соударительной ионизации.

По тексту диссертационной работы возник ряд вопросов и замечаний.

1. При анализе реальных образцов биологических жидкостей всегда ли удастся однозначно установить принадлежность иона-продукта к конкретному иону-прекурору?
2. Известно, что ферментативный гидролиз является более мягким и экспрессным способом подготовки проб для определения нативных стимуляторов и их метаболитов, но в диссертационной работе предпочтение отдано минеральному гидролизу, который может оказывать негативное влияние, например, в случае тропановых алкалоидов. Чем обусловлен такой выбор?
3. На стр. 159. обсуждается масс-спектр (ЭИ) синтетического каннабиноида, обнаруженного в курительных смесях «АКВ48» и «LTI-258», который идентифицируется как N-адамантиламид-1-пентил-1-N-индазолтрикарбоновой кислоты. Не было ли попыток выделения этого анализита с целью большей надежности доказательства его структуры?
4. Известно, что стероидные гормоны в организме человека находятся в свободном виде и в форме сульфатных и глюкуронидных конъюгатов. Крайне важен мониторинг сульфатных форм метаболитов, поскольку в ряде случаев долгоживущие метаболиты, свидетельствующие об употреблении запрещенных веществ, образуются именно в сульфатной форме. Изучался ли мониторинг сульфатных форм?
5. При обнаружении в биологических материалах морфина и/или его метаболитов, можно сделать вывод как об употреблении самого морфина, так и его производных - кодеина или героина. Последний является диацетил-производным морфина, а одним из характерных метаболитов является общий для этих трех соединений морфин-3-глюкуронид. Обнаруживался ли этот метаболит автором работы?

6. Возможно ли сформулировать критерии, поясняющие для каких задач в качестве подтверждающего метода предпочтительно использовать ГХ-МС, а для каких - ВЭЖХ-МС-МС?
7. Имеются замечания оформительского плана. Отсутствует запись условий анализа под хроматограммами; встречаются опечатки: стр. 67; 78.; 114; 126; стр. 182; стр. 199; 206; 247; 266; есть неудачные выражения, например, *после 20 вколов...*

Возникшие вопросы и замечания не повлияли на самую высокую оценку диссертационной работы. Работа прошла широкую апробацию. По материалам диссертации опубликованы 25 статей, получены 4 патента РФ на изобретение, опубликована глава в учебнике.

Заключение. Диссертация Темердашева Азамата Зауалевича является цельной и завершенной научно-квалификационной работой, выполненной на актуальную тему, связанную с приоритетными направлениями и программами развития отечественной фундаментальной и прикладной науки с использованием современных концепций и экспериментальных методологий и содержит решение важной задачи, состоящей в разработке комплексного подхода целевого и нецелевого скрининга различных ксенобиотиков методами газовой и жидкостной хроматомасс-спектрометрии и методологии полного цикла анализа образцов от нативных веществ, их смесей, средств и препаратов на их основе до обнаружения в биологических жидкостях в нативном виде и в форме метаболитов. По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, степени обоснованности положений и выводов диссертационная работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям.

Положения, выносимые на защиту, выводы, сформулированные в диссертации, строго аргументированы и соответствуют экспериментальным данным. Диссертация и автореферат оформлены согласно требованиям действующих нормативных документов. Результаты работы доложены на представительных научных конференциях. Содержание автореферата и опубликованных трудов диссертанта полностью отвечает содержанию диссертации.

На основании вышесказанного считаю, что диссертационная работа Темердашева Азамата Зауалевича «Хроматомасс-спектрометрические методы в аналитической токсикологии и допинг-контроле» является завершённым квалификационным научным исследованием, выполненным на актуальную тему на достаточно высоком научном уровне, обладает научной новизной и практической значимостью и соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 26.05.2020 г. № 751), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор, Темердашев Азамат Зауалевич заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия.

Официальный оппонент:

Доктор химических наук,

Профессор кафедры органической химии

Института химии

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский Государственный Университет»

Карцова Людмила Алексеевна

Контактные данные: e-mail: kartsova@gmail.com

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 02.00.02 – Аналитическая химия

Адрес места работы: 198504, Россия, Санкт-Петербург, г. Петергоф,
Университетский просп., д. 26,

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский Государственный Университет»

Тел.: +7(812)428-40-44; e-mail: l.kartsova@spbu.ru

Подпись сотрудника

Карцова Л.А.

удостоверяю

