

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Олейниц Елены Юрьевны «Управление разделением некоторых фенольных соединений в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.2. Аналитическая химия

Актуальность темы диссертационной работы. Обращенно-фазовая (ОФ) ВЭЖХ в настоящее время является наиболее часто используемым вариантом высокоэффективной жидкостной хроматографии в аналитических лабораториях различной направленности (70-80% всех применений ВЭЖХ). Достоинство метода – доступность множества типов ОФ сорбентов различных производителей оборачивается проблемой - заметным различием сорбционных свойств этих сорбентов, которую следует решить при смене образцов даже однотипных стационарных фаз. Используемые к настоящему времени ряд точечных методов характеристики стационарных фаз, бесспорно, хороши, но их значимость ограничена конкретными условиями выполнения хроматографического исследования. Сопоставление удерживания аналитов в каких-то специально, или произвольно выбранных хроматографических условиях, является не совсем корректным подходом, поскольку при переходе к другому составу подвижной фазы или к другому типу обращенной стационарной фазы возможны даже инверсии времен удерживания веществ. Это резко ограничивает использование литературных данных, получаемых с применением труднодоступных методов или длительных технологий, в других лабораториях.

К числу часто определяемых биологически активных веществ природного происхождения особо следует выделить антиоксиданты, необходимые человеку в современном урбанизированном мире для подавления окислительного стресса – предшественника многих заболеваний. Антоцианы и фенольные кислоты,

содержащие *орто*-гидроксильные группы в ароматическом кольце, относятся к числу важнейших биологически активных веществ такого типа. Вследствие возможности соэлюирования некоторых веществ сложных многокомпонентных природных смесей при использовании определенного состава подвижной фазы при изократическом разделении, или при использовании некоторого варианта градиентного разделения, необходимы хроматографические методы гарантирующие разделение целевых компонентов.

Важно отметить, что в работе предприняты усилия по решению важной задачи мировой науки, названной как «зеленая химия», которая имеет и собственное название в ВЭЖХ - «зеленая хроматография». Её задача - отказ от наиболее часто используемого в качестве органического модификатора подвижной фазы ацетонитрила, растворителя с высокой стоимостью и токсичностью для человека и окружающей среды.

Цели, задачи и научная новизна диссертации. Цель работы - разработка нового подхода для оценки и управления удерживанием и разделением на примере антоцианов и хлорогеновых кислот в сложных смесях в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Решением первой задачи и первым новым научным решением, направленным на управление удерживания компонентов сложных смесей стало предложение совместного анализа двух типов карт разделения. Этот подход позволяет осуществлять анализ и выполнять прогноз по качеству разделения всех компонентов в широком диапазоне водно-органических подвижных фаз с различными органическими модификаторами, исключая составы с соэлюированием соединений. Впервые показана согласованность двух карт разделения, основанных на различных типах анализа – на известной гипотезе о квадратичной зависимости удерживания от состава подвижной фазы и на анализе относительного удерживания. Поскольку удерживание аналитов зависит

не только от объемной доли органического модификатора, но и от типа этого модификатора в качестве не зависящей от этих переменных характеристики стационарных фаз предложено использование асимптотического удерживания анализа при нулевом содержании органического модификатора. При этом наклон линий тренда на картах разделения второго типа является важной характеристикой специфики сольватации анализа используемым органическим модификатором.

При решении второй задачи - создание новых экологически более благоприятных и экономически более приемлемых подвижных фаз, решенных с использованием разработанных карт разделения, была показана возможность отказа от применения ацетонитрила без потери качества разделения. При этом проведен анализ зависимости удерживания антоцианов от факторов, на которые не обращали должного внимания в мировой практике разделения антоцианов и хлорогеновых кислот.

К научной новизне при решении третьей комплексной задачи - определение влияния на разделение антоцианов и хлорогеновых кислот: а) изменения состава подвижной фазы, б) изменения свойств стационарной фазы, в) изменения температуры разделения, г) изменения рН подвижной фазы, д) комплексообразования «гость-хозяин» с β -циклодекстрином в подвижной фазе можно отнести несколько решений. Первое из них – аддитивность свойств удерживания дикофеоил хинных кислот по удерживанию монокофеоилхинных кислот как при изменении рН, так и при введении в подвижную фазу β -циклодекстрина. Впервые найдены потенциальные органические модификаторы подвижных фаз с существенно различающейся селективностью разделения кофеина и хлорогеновых кислот, позволяющих определять эти компоненты при совместном присутствии.

Практическая значимость работы. Предложенный новый подход для

оценки и управления удерживанием и разделением аналитовсложных смесей в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ может быть использован при разделении смесей биологически активных соединений. Наиболее важное значение имеет факт возможности замены ацетонитрила на экологически и экономически более благоприятные растворители в практике работ аналитических лабораторий.

Достоверность полученных данных подтверждается применением современных аналитических методов (спектрофотометрии в УФ-видимом диапазоне и высокоэффективной жидкостной хроматографии). В работе при построении карт разделения обязательно используется контроль выхода хроматографа в рабочий режим, а высокие значения R^2 свидетельствуют о надежности полученных результатов. Полученные данные характеризуются воспроизводимостью, или не противоречат, или уточняют современные научные представления.

Оценка содержания диссертации

Диссертационная работа Олейниц Е.Ю. изложена на 188 страницах машинописного текста с приложениями (12 стр.) и включает Введение, Обзор литературы, Экспериментальную часть, Результаты и их обсуждение, Заключение, список использованной литературы и приложение В работе представлены 96 рисунков, 46 таблиц, а в списке цитируемой литературы 288 источников.

Во **Введении** изложена актуальность проведенного исследования, сформулированы цели и задачи диссертационной работы, ее научная новизна, практическая значимость и положения, выносимые на защиту. Отмечается, что понимание закономерностей удерживания аналитов сложных смесей в широком диапазоне составов подвижных фаз для возможности использования литературных данных о порядке удерживания соединений, определенных в работах, выполненных в других лабораторий мира. Особо отмечается задача в

плане «зеленой» хроматографии, направленная на замену экологически неблагоприятного и дорогостоящего ацетонитрила на другие более приемлемые органические растворители.

В **первой главе** приведен обзор научной литературы по тематике диссертации. Подробно рассматривается специфика строения традиционных «мономерных» и «полимерных» обращенно-фазовых сорбентов, причин проявления статочных силанольных групп и способов уменьшения их влияния на суммарное удерживание аналитов, включая эндкеппинг и эмбединг. Показано, что для характеристики обращенно-фазовых колонок разработаны точеные, т.е. выполняемые при одних определенных хроматографических условиях тесты, основной недостаток которых состоит в зависимости получаемых параметров от состава подвижных фаз. Обращено внимание на возможность осуществления различных механизмов сорбции в условиях обращенно-фазовой хроматографии - по адсорбционному (в рамках «сольвофобной» теории) и по абсорбционному (распределительному) механизмам. Кратко рассмотрены варианты QSRR (quantitative structure-retention relationships), предназначенные для установления взаимосвязи между строением и удерживанием сорбатов. Внимание также акцентировано на известных зависимостях удерживания аналитов от состава подвижной фазы и на классификации органических модификаторов подвижных фаз. Затем приводится необходимая информация об объектах исследования - фенольных соединениях, включающих антоцианы и производные коричной кислоты и известные варианты их разделения в условиях ОФ ВЭЖХ. Глава заканчивается выводами о том, что не все закономерности при хроматографическом определении фенольных соединений установлены к моменту начала работы над темой диссертации и практически отсутствовали работы по внедрению идей «зеленой» хроматографии по отношению к разделению этих аналитов.

К сожалению, не приведены или слабо освещены последние достижения ОФ ВЭЖХ: увеличение гидрофобности сорбентов за счет перфторированных алкильных цепей, расширение возможностей работы во всем диапазоне pH (1-14) за счет применения устойчивых основ: оксидов титана и циркония и устойчивых неполярных углеродных и полимерных сорбентов. Для возможности работы при больших количествах воды в элюенте вплоть до 100% созданы embedded колонки.

Слабо освещено влияние на удерживание длины привитых алкильных цепей в сорбентах для ОФ ВЭЖХ (C8, C12, C18, C22, C30, C34.), а также плотности прививки-доли углерода на привитом сорбенте

Применение бидентатных стационарных фаз для уменьшения вклада в удерживание гидроксильных групп. Не описаны монолитные колонки для ОФХ.

Во второй главе (в **Экспериментальной части**) приводится краткое описание объектов исследования, включающих растительные источники некоторых антоцианов и хлорогеновых кислот и приводится характеристика использованных в работе органических модификаторов подвижных фаз, использованных в исследовании. Затем описаны экспериментальные методы и способы обработки полученных данных, включающие постановку хроматографических, спектрофотометрических и масс-спектрометрических экспериментов. Большой раздел посвящен описанию разработанных методов пробоподготовки растворов для хроматографического разделения, включающих частичную очистку экстрактов методом твердофазной экстракции. Предложены многочисленные варианты хроматографических условий с использованием различных органических модификаторов водно-органических подвижных фаз для разделения антоцианов и хлорогеновых кислот. Описаны способы построения карт разделения первого и второго типов. Представлены уравнения, использованные для расчетов зависимостей удерживания аналитов от pH, от

концентрации циклодекстринов в подвижной фазе при оценке констант устойчивости комплексов «гость-хозяин». Приведены специфические для хроматографии метрологические характеристики разработанных в работе способов определения фенольных соединений, что особенно относится к правильности полученных результатов, определяемой предложенной в настоящей работе двух-колоночной техникой измерения.

Третья глава (**Результаты и их обсуждение**) начинается с разработки подхода одновременного контроля разделения сложных смесей двумя типами карт разделения. Предложено оценивать стационарные фазы по удерживанию аналитов при нулевом содержании органического модификатора, как единственной характеристики, не зависящей от типа используемого органического модификатора. Для этого используется известная квадратичная зависимость логарифма фактора удерживания от объемной доли органического модификатора в подвижной фазе. Второй тип карт разделения построен по также известному методу относительного анализа удерживания, в котором используется удерживание вещества, принятого в качестве вещества сравнения. Но, во-первых, добавлен физический смысл наклона линий тренда как характеристики особенностей сольватации аналитов используемым органическим модификатором, что объясняет проблемы сравнения различных стационарных фаз при ненулевых концентрациях органического модификатора в подвижной фазе. Также впервые показана согласованность обеих карт разделения. Но карты разделения второго типа эффективнее для анализа порядка удерживания и управления им за счет изменения концентрации или типа органического модификатора. Вертикальные срезы на картах разделения второго типа указывают на порядок элюирования, выявляют составы элюентов, при которых удерживания некоторых пар аналитов совпадают. Это позволяет выбрать состав для условий обеспечения правильности анализа сложных смесей,

что обеспечено добавлением еще одной зависимости – состава элюента от логарифма фактора удерживания реперного соединения. Для сопоставления разделения веществ при смене органического компонента предложено использование сравнение двух карт разделения второго типа, в котором используется система сравнения, названная референтной. Построенная для системы «ацетонитрил – 10 об. % HCOOH– вода». Это позволило ценить возможность применения различных органических модификаторов и управлять селективностью разделения такой заменой.

В работе впервые показана роль pH подвижной и последствия использования подвижных фаз с пониженной кислотностью. Впервые показана необходимость учета возможности реакции этерификации спиртов муравьиной кислотой и исключение дрейфа удерживания при замене муравьиной кислоты на ортофосфорную. Примененный подход позволил предложить составы элюентов при замене ацетонитрила не только на метанол, но и на ацетон, ацетонитрил и этанол. Это позволяет существенно сократить расход органического модификатора и заменить ацетонитрил на более экологически или экономически приемлемые органические модификаторы.

Аналогичный подход был применен для разделения некоторых хлорогеновых кислот, включая варианты их разделения при совместном присутствии с кофеином. При этом было установлено, что замена ацетонитрила на изопропанол или этилацетат, не изменявшая порядок элюирования трех обычных (3CQA, 5CQA и 4CQA) монокофеоилхинных кислот, существенно изменяла порядок элюирования кофеина среди них. Порядок же элюирования монокофеоилхинных кислот, как показали выполненные исследования, зависел только от активности остаточных силанольных групп, т.е. контролировался маркой обращенной стационарной фазы. Порядок элюирования дикофеоилхинных кислот определялся порядком удерживания

монокофеоилхинных кислот почти по аддитивной схеме, включая особое поведение 1,3-дикофеоилхинной кислоты вследствие внутримолекулярного стекинга ароматических колец радикалов кофейной кислоты в молекуле. Основная проблема при этом состояла в отделении 1,5-дикофеоилхинной кислоты от 3,4- и 3,5-дикофеоилхинных кислот. Замена органического модификатора была малоэффективной в этом отношении. Поэтому для управления разделением этих кислот было предложено изменение рН подвижной фазы или введение в подвижную фазу β -циклодекстрина. Установлено, что и в этих случаях изменение порядка элюирования может быть предсказано по изменению поведения монокофеоилхинных кислот в аналогичных условиях.

По результатам работы опубликовано большое число для кандидатских диссертаций статей 19 печатных работ, в том числе 11 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ (9 из которых индексируется в базах данных SCOPUS и Web of Science), 8 тезисов и материалов конференций. Представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук диссертационная работа является завершенным научным исследованием, отвечающим заявленной специальности 1.4.2 – Аналитическая химия. Сделанные по работе выводы соответствуют поставленным задачам и полученным результатам. Автореферат и публикации в полной мере отражают содержание диссертации. Некоторые полученные результаты имеют приоритетный характер.

Автореферат и публикации отражают содержание диссертации. Но при общем положительном впечатлении представленной диссертации возникают следующие **вопросы и замечания**:

По оформлению:

1. Почему в абзаце **Методы исследования** (стр. 7) не указаны действительно использованные спектрофотометрия, масс-спектрометрия и расчеты по методу молекулярной механики, указанные в Главе 2?

2. На стр. 15 в последнем абзаце неудачна фраза «...от взаимодействия гидрофобного связывания между молекулой растворенного вещества...», т.к. она похожа на автоматический перевод одного из переводчиков интернета, особенно это касается «растворенного вещества», как переводится слово «solute», обозначающее в данном случае сорбат.
3. Последний абзац на стр. 19 и первый (после таблицы 1.1) почти идентичные.
4. Потеряна ссылка на источник, в котором приведены уравнения определения константы гость-хозяин в спектрофотометрическом методе (стр. 46 – стр. 47).
5. На стр. 92 (в предпоследнем абзаце) указывается, что допустимое изменение концентрации метанола в пробе не должно превышать $\pm 50\%$, но это очень широкий диапазон – возможно, необходимо указать, не должно превышать ± 50 относительных%?
6. Неудачно название рисунка 3.50 («... Карта разделения 5CQA ...»), поскольку на рисунке приведено удерживание (а не разделение) только одного сорбата на трех различных стационарных фазах.
7. Не приведены последние достижения в разработке сорбентов для ОФ ВЭЖХ: применение устойчивых основ во всем диапазоне pH (оксид титана и циркония), неполярные углеродные и полимерные сорбенты, бидентатные сорбенты для уменьшения вклада в удерживание гидроксильных групп, перфторированные сорбенты с повышенной гидрофобностью.

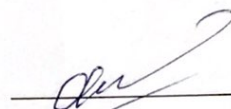
Указанные замечания не снижают значимости представленного диссертационного исследования. Поэтому работа Е.Ю. Олейниц «Управление разделением некоторых фенольных соединений в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ» выполнена на высоком профессиональном уровне, обладает научной новизной и практической значимостью, соответствует специальности 1.4.2. Аналитическая химия и отвечает требованиям п. 9–11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства

РФ от 24.09.2013г. №842, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Таким образом, соискатель Елена Юрьевна Олейниц заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.2. Аналитическая химия.

Согласен на включение моих персональных данных в аттестационное дело, их дальнейшую обработку и размещение в информационно-телекоммуникационной сети «Интернет».

Яшин Яков Иванович


«10» марта 2023 г.

доктор химических наук (02.00.04 – Физическая химия), профессор (02.00.04 – Физическая химия), научный консультант отдела исследований и разработок, общество с ограниченной ответственностью «Интерлаб» (ООО «Интерлаб»)
E-mail: yashin@scietegra.com, тел.: +74957880983.

Общество с ограниченной ответственностью «Интерлаб»
143441, Московская обл, г. Красногорск, д. Гаврилково, ЭЖК Эдем, квартал 5,
д.12
E-mail: interlab@interlab.ru; тел.: +7 4957880983, Сайт организации:
<https://www.interlab.ru>

Подпись Яшина Якова Ивановича
заверяю,
руководитель отдела персонала





/ О.С. Радковец

«10» марта 2023