

ОТЗЫВ

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

Актуальность темы. Широкое использование растительного сырья, полифенольных веществ, выделяемых из него в пищевой, фармацевтической, химической промышленности, медицине определяет высокую востребованность биологически активных веществ (БАВ) природного происхождения. Ценность этих БАВ обусловлена их высокой антиоксидантной активностью и необходимостью разработки универсальных, экспрессных методик их определения, выделения и очистки. Чаще всего используется стандартный подход, предполагающий использования традиционных сорбентов, в том числе, в варианте обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ). Он предполагает применение подвижных фаз (ПФ) на основе ацетонитрильных растворов. Ограниченность состава ПФ не всегда позволяет определять близки по физико-химическим свойствам вещества, особенно полифенольных компоненты, присутствующие в растительных объектах в виде многокомпонентных смесей. В связи с этим тема представленной диссертационной работы представляется актуальной. Поставленная цель исследования – разработка нового подхода для оценки и управления удерживанием и разделением антоцианов и хлорогеновых кислот в сложных смесях в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ являются обоснованной.

Сформулированы и решены соответствующие тематике работы следующие задачи:

1. Разработать универсальный подход к оценке влияния стационарной и подвижных фаз на удерживание аналитов сложных смесей на примере антоцианов и хлорогеновых кислот в условиях обращенно-фазовой хроматографии.
2. Создать новые экологически более благоприятные и экономически более приемлемые подвижные фазы для разделения антоцианов и хлорогеновых кислот с целью замены ацетонитрила.
3. Определить влияние 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.

Научная новизна диссертационной работы Олейниц Е.Ю.

- Разработан подход для управления разделением антоцианов и фенольных веществ, основанный на использовании карт разделения.
- Теоретически обосновано использование карт разделения для управления хроматографическим разделением антоцианов и хлорогеновых кислот при их определении в экстрактах природного сырья.
- Изучено влияние состава подвижных фаз, кислотности элюентов и добавок циклодекстринов (для варьирования механизма удерживания аналитов при образовании комплексов включения «хозяин-гость») при варьировании

удерживания близких по физико-химическим свойствам фенольных и полифенольных веществ.

Фундаментальная значимость работы состоит в расширении круга растворителей, в том числе менее токсичных, используемых в анализе многокомпонентных растворов полифенольных веществ природного происхождения. Адаптирован подход карт разделения для определения антоцианов и производных кофейной кислоты, что дает возможности проводить определения биологически активных веществ, в том числе в условиях отсутствия дорогостоящих стандартов.

Практическая значимость работы заключается в расширении круга реальных объектов, аналитов, которые могут быть определены с использованием как хроматографических, так и гибридных методов анализа в условиях повышения привлекательности БАВ природного происхождения. Рассмотрение в условиях ОФ ВЭЖХ объемного перечня растворителей, используемых в работе, позволяет расширить круг определяемых БАВ (полярных и неполярных) с различной растворимостью в органических средах. Это дает возможность разделять близкие по свойствам фенольные и полифенольные вещества, в том числе варьированием механизма удерживания при образовании комплексов включения «хозяин-гость».

Достоверность представленных в диссертационной работе данных обеспечивается применением современного оборудования и взаимодополняющих методов исследования, соответствием полученных результатов фундаментальным законам естествознания и данным, полученным в независимых исследованиях. Соискатель активно пользуется российскими и международными литературными источниками для интерпретации результатов и обоснования выводов. Полученные результаты прошли всестороннюю апробацию на многочисленных научных конференциях. Основные положения диссертационной работы опубликованы в авторитетных научных журналах.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, списка литературы из 288 источников. Материал работы изложен на 200 страницах, содержит 96 рисунков, 46 таблиц.

Основные результаты исследования.

Во введении четко обоснована актуальность и новизна работы, определены цели и задачи исследования. Из представленной информации следует, что работа имеет необходимое для диссертации на соискание ученой степени кандидата химических наук содержание.

Глава 1. Обзор литературы посвящена анализу современных представлений о хроматографическом определении антоцианов и фенольных кислот, факторах, влияющих на удерживание БАВ в варианте обращенно-фазовой ВЭЖХ. Автор приводит описание механизмов удерживания, ОФ сорбентов, а также зависимость удерживания полифенольных веществ от состава подвижной фазы. Приведена классификация и описание биологической роли антоцианов и фенольных соединений. Приведена характеристика хроматографических методов для анализа веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, представлен анализ полноты их рассмотрения в литературных источниках. Олейниц Е.Ю. проанализировано значительное количество литературных источников, в том числе тех, которые опубликованы в последние годы. Автор приводит характеристику метода QSRR, используемого для анализа веществ на основе взаимосвязи структуры аналитов и параметров удерживания. С учетом достоинств и недостатков такого подхода в

первой главе работы обосновывается необходимость изучения роли состава ПФ, варьирования природы растворителей, в том числе, с учетом достоинств и недостатков классификации растворителей по Снайдеру. Автором характеризуются методы пробоподготовки групп фенольных и полифенольных соединений для их определения в многокомпонентных растворах. Для обоснования постановки задач работы рассмотрены механизмы удерживания полифенольных веществ и пути их варьирования, в том числе с использованием комплексов включения по типу «гость-хозяин» между фенольными соединениями и циклодекстринами. Материал изложен логично и четко. На основании проведенного анализа литературных источников сформулированы цели и задачи диссертационной работы, определены методы исследования.

Во второй главе представлена характеристика объектов исследования, аналитов, которые могут быть определены хроматографическим методом. Приведены характеристики растворителей, используемых в варианте ОФ ВЭЖХ, некоторые их физико-химические характеристики. Представлено описание инструментальных методов, используемых в работе. Приведены формулы расчетов параметров, используемых при обработке результатов разделения аналитов. Непривычным выглядит обозначение ширины хроматографического пика на полувысоте (стр. 50) и формула расчета числа теоретических тарелок, включающая коэффициент емкости (формула 2.2). В второй главе указана спецификация используемого в работе оборудования, применяемых методов и условий спектрофотометрического, масс-спектрометрического детектирования аналитов. Описаны способы пробоподготовки для определения антоцианов, производных кофейной кислоты в экстрактах растительного сырья. В методической части диссертации описаны способы определения антоцианов в экстрактах спектрофотометрическим методом. В разделе 2.5 приведены способы определения антоцианов и хлорогеновых кислот в изократическом и градиентном режимах при варьировании состава подвижных фаз. Описано построение карт разделения.

В разделе 2.9 автор приводит валидацию способов определения антоцианов при спектрофотометрическом детектировании. Представлена характеристика метрологических параметров определения антоцианов и кофеина методами спектрофотометрии и ВЭЖХ при спектрофотометрическом детектировании. Представлен анализ правильности и прецизионности двух перечисленных методов при определении антоцианов и производных кофейной кислоты в экстрактах различных реальных объектов (растительного сырья и продуктов переработки).

Для рассмотрения влияния образования комплексов включения на параметры удерживания описана методика определения термодинамических параметров (изменения энтальпии) процесса переноса сорбата из подвижной в стационарную фазу. Приводится методическая часть по изучению влияния кислотности среды на параметры удерживания хлорогеновой кислоты.

Третья глава содержит результаты изучения хроматографического поведения антоцианов и производных кофейной кислоты с использованием разделения двух типов. Первый тип карт разделения предусматривает зависимость логарифма фактора удерживания от объемной доли органического модификатора (ОМ) с применением уравнений Снайдера, модели Мураками. Отмечается согласованность двух типов карт и большее удобство карт второго типа, возможность проводить экстраполяцию параметров удерживания аналитов далеко за пределы составов, используемых в ПФ. Отдельно автор акцентирует внимание

на природе растворителей, возможности нежелательных реакций между компонентами элюирующей системы, приводящей к дрейфу удерживания при разделении антоцианов в ПФ, содержащей, например, одновременно муравьиную кислоту и метанол.

Анализ карт разделения второго типа позволил автору показать, что замена ацетонитрила на метанол приводит к небольшим изменениям в разделении антоцианов, но без существенных ухудшений. Рассмотрены также и другие растворители (этилацетат, ацето и др.) в качестве органических модификаторов ПФ. Полученные при этом результаты показали, что порядок элюирования 3-глюкозидов пяти часто встречающихся в растительных объектах агликонов (Dp, Cy, Pt, Pn и Mv) не изменяется во всех исследованных случаях, но существует возможность замены ацетонитрила на другой более дешевый и менее экологически опасный растворитель, включая этанол.

Диссертантом предложено использовать методику спектрофотометрического определения суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-глюкозида хлорид в исследуемых объектах. Указано, что методика характеризуется повторяемостью (сходимостью) с расхождением результатов не более 0.5 %. Однако линейность отклика сигнала от концентрации должна проверяться, поскольку при высоком содержании примесей возможно проявление эффектов межмолекулярной копигментации.

При рассмотрении хроматографического разделения производных кофейной кислоты было установлено, что наиболее эффективным способом изменения разделения кофеина и изомерных ХК является замена ацетонитрила на изопропанол или этилацетат. Такая замена существенно уменьшает относительное удерживание кофеина и позволяет целенаправленно изменять положение элюирования кофеина относительно хлорогеновых кислот. Автор демонстрирует, что это может быть использовано для исключения соэлюирования кофеина с другими экстрактивными веществами за счет изменения состава подвижной фазы.

Олейниц Е.Ю. была исследована возможность управления разделением за счет изменения температуры разделения. Анализ энтальпии переноса двух близким по свойствам веществ из подвижной фазы в стационарную позволяет указать на возможность и направление изменения разделения за счет изменения температуры. Данный способ был использован соискателем для решения экспериментальной задачи разделение пятнадцати антоцианов плодов черники (и голубики), которая не решалась в работах с использованием ацетонитрила, но была решена за счет снижения температуры разделения с 40 до 25 °С.

Еще одним хорошо известным фактором, влияющим на разделение, является рН ПФ.

Указано, что возникают проблемы с количественным определением при спектрофотометрическом детектировании. Снижение рН приводит к заметному уширению пиков, различном для производных агликонов антоцианов. Учет протолитических свойств монокофеоилхинные кислоты позволил идентифицировать ДКХК только по специфике изменения удерживания с ростом рН.

В списке литературных источников соискатель приводит 288 работы, среди которых представлены новейшие российские и зарубежные публикации. Авторитет цитируемых изданий и их разнообразие указывают на серьёзный подход Олейниц

Е.Ю. к обеспечению достоверности и обоснованности результатов проведенного исследования.

Выводы охватывают все выносимые на защиту положения и объективно отражают полученные научные результаты.

Таким образом, поставленная соискателем цель является достигнутой; все задачи в полной мере решены; результаты исследования всесторонне обоснованы.

Отмечая в целом несомненные достоинства рецензируемой диссертационной работы, официальный оппонент считает **необходимым обратить внимание автора на следующие моменты:**

1. В выводе 2 указано, что «Разработаны новые условия для определения антоцианов и хлорогеновых кислот, в которых ацетонитрил заменен на метанол, этанол, пропанол-2, этилацетат и ацетон без потери эффективности разделения аналитов.». Вместе с тем, не понятно, использовался ли в этом случае в качестве критерия эффективности число теоретических тарелок или эффективность разделения аналитов трактуется только в рамках карт разделения. Насколько обоснованным в этом случае является использование понятия «эффективности»?
2. В задачах и научной новизне отмечено, что «Определены условия необходимые для эффективного использования подвижных фаз для разделения антоцианов и хлорогеновых кислот...», а в выводе «Разработаны новые условия для определения антоцианов и хлорогеновых кислот, в которых ацетонитрил заменен на метанол, этанол, пропанол-2, этилацетат и ацетон». Однако не указано, в чем же преимущества и недостатки замены ацетонитрила на другие растворители с точки зрения аналитической химии.
3. Автор в пределах диссертации и даже одного раздела (см. стр. 62) использует зарубежную (\log) и отечественную (\lg) форму записи десятичных логарифмов.
4. В автореферате на стр. 6 указано, что мертвое время определяли по урацилу или щавелевой кислоте. Требуется пояснений совпадают ли t_0 для этих реперных веществ, а если нет, то какое вещество использовалось в качестве несорбируемого и при изучении каких аналитов. В случае различий t_0 для урацила и щавелевой кислоты может возникнуть неопределенность в интерпретации данных, так как коэффициент емкости k' зависит от абсолютного значения t_0 . В работе не указано, зависит ли этот параметр от состава ПФ, pH, температуры и присутствия циклодекстринов.
5. В разделе 2.8 указано, что при исследовании взаимодействий циклодекстринов подвижными фазами использовали моделирование методом молекулярной механики. А далее рассматривается взаимодействие циклодекстринов с привитыми слоями стационарных фаз. Требуется пояснения проводились ли расчеты комплексов внедрения для ПФ или НФ? Какова информативность обсуждаемых расчетов и как этот используется при достижении цели и задач работы?
6. Отсутствие раздела «Сокращения и обозначения» затрудняет чтение и восприятие материала диссертации.

Следует подчеркнуть, что приведенные выше замечания в основном носят дискуссионный или рекомендательный характер и не снижают общей положительной оценки выполненной диссертационной работы.

В целом, диссертацию Олейниц Е.Ю. можно рассматривать как самостоятельный и законченный научный труд, в котором на основании выполненных соискателем исследований получены новые и перспективные результаты в области теории и практики хроматографического разделения антоцианов и других фенольных веществ, проведено обоснование применимости подхода карт разделения, в том числе условий хроматографического определения антоцианов и производных кофейной кислоты. Эти результаты расширяют фундаментальную базу для разработки методов разделения и определение биологически активных веществ, относящихся к группе полифенолов растительного происхождения.

Диссертация написана хорошим научным языком и аккуратно оформлена. Автореферат и публикации (11 статей в рекомендованных ВАК РФ журналах, 8 тезисов и материалов докладов на международных и всероссийских научных конференциях) полно и адекватно отражают основное содержание представленной диссертационной работы. Автореферат диссертации соответствует основным положениям работы.

Официальный оппонент считает, что диссертационная работа Олейниц Е.Ю. «Управление разделением некоторых фенольных соединений в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ» является научно-квалификационной работой и удовлетворяет всем требованиям п. 9-11,13,14 Положения о присуждении учёных степеней, утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 (в действующей редакции) и соответствует паспорту специальности 1.4.2. Аналитическая химия (в п.п. 2,8,14). Автор Олейниц Е.Ю. достойна присуждения искомой 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».

Карпов Сергей Иванович

доктор химических наук, доцент,
доцент кафедры аналитической химии
ФГБОУ ВО "ВГУ"
01.03.2023

С.И.Карпов

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Воронежский государственный университет»
Адрес: Россия, 394018, г. Воронеж, Университетская пл., д. 1
Тел./факс: +7(473)-2208-755/+7(473)-2208-932
e-mail: karsiv@mail.ru

