

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Тыняной Ирины Ивановны «Разделение, концентрирование и анализ антоцианов и бетацианинов в экстрактах растительного сырья с применением оптических и хроматографических методов», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия

Актуальность темы представленного исследования

Работа посвящена актуальной теме – качественному и количественному определению природных красителей (антоцианов и бетацианинов) спектрофотометрическим и хроматографическим методами. Эта проблема связана со стремлением заменить синтетические соединения натуральными биологически активными веществами (БАВ), к числу которых относятся изученные аналиты, имеющие высокую биологическую активность и не оказывающие пагубного влияния на организм человека. Но изменения такого плана, безусловно, должны сопровождаться развитием соответствующих методов контроля качества растительного сырья, содержащего эти БАВ, и получаемой на их основе продукции. Особенность растительного сырья - широкая изменчивость свойств, зависимость биосинтеза БАВ от условий произрастания, что затрудняет задачу по идентификации компонентов.

Наиболее часто используемым методом анализа антоцианов и бетацианинов является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с различными вариантами детектирования. Эффективное разделение таких компонентов в сложных смесях (экстрактах) сложная задача. Исследование особенностей хроматографического поведения этих соединений, в том числе механизмов удерживания, позволит оптимизировать условия их идентификации.

Для количественного определения антоцианов и бетацианинов широко используют спектрофотометрический метод анализа. В этом отношении в мировой практике остается неучтенной существенная нестабильность бетацианинов в кислых средах. При работе с растворами антоцианов необходимо уделять особое внимание медленным равновесным переходам между существующими окрашенными и неокрашенными формами. Без учета выше приведенных факторов возможно возникновение значительных систематических погрешностей при количественных определениях. Исследование спектральных характеристик антоцианов и бетацианинов позволит существенно снизить погрешности при их идентификации.

Пробоподготовка экстрактов антоцианов и бетацианинов для проведения исследований спектрофотометрическим и хроматографическим методами также является одним из недоработанных в науке вопросов, решаемых в предложенной диссертационной работе.

Общая характеристика диссертации

Диссертация состоит из введения, трех глав, выводов, списка цитируемой литературы и приложений. Работа изложена на 147 страницах машинописного текста и содержит 66 рисунков, 27 таблиц, библиографию из 214 наименований.

Глава 1. Обзор литературы. Автором проведен мониторинг пищевых красителей, используемых в мировом производстве продуктов питания. Особенно остро поднят вопрос о канцерогенном действии синтетических азокрасителей. Предложена альтернатива в виде природных бетацианинов и антоцианов, известных на рынке пищевых красителей под кодовыми названиями E162 и E163 соответственно, которые импортируются из зарубежных стран, несмотря на наличие достаточной сырьевой базы на территории РФ. Исследование антоцианов и бетацианинов в рамках сопоставления является интересным, поскольку эти два класса веществ дополняют друг друга. Если антоцианы проявляют красящие свойства лишь в кислой среде, то бетацианины сохраняют окраску в более широком диапазоне pH.

Соискателем раскрыто понятие антиоксидантной активности как основного свойства, благоприятствующего замене синтетических компонентов натуральными. Более подробно представлено описание таких природных красителей-антиоксидантов, как антоцианы и бетацианины, обеспечивающие продуктам питания окраску от красной до глубокой фиолетовой. Рассмотрено строение, физико-химические характеристики, природные источники, факторы, влияющие на стабильность, а также основные методы качественного и количественного определения антоцианов и бетацианинов, используемые сегодня в мировой практике. Пробоподготовка для определения БАВ на первой стадии наиболее часто предполагает использование экстракционных методов. В работе анализируются условия проведения экстракции красителей из растительных источников. Критически рассматривается значение pH среды, в которой производится экстракция и анализ. Ключевая роль отводится статической экстракции. Подчеркивается принципиальная важность учета приведенных в литературном обзоре факторов, влияющих на стабильность исследуемых соединений и, соответственно, их окраски. Рассматриваются достоинства и недостатки различных экстрагентов, отмечаются оптимальные.

Приведены данные по использованию оптических и хроматографических методов в исследовании антоцианов и бетацианинов. Отмечается, что в научной литературе остается без внимания роль кислот, добавляемых в элюент при разделении сложнокомпонентных систем антоцианов и бетацианинов методом ВЭЖХ. Более того, при работе с полярными соединениями для повышения эффективности их разделения обращено-фазовой (ОФ) ВЭЖХ применяют хроматографию на основе гидрофильных взаимодействий. Но для определения антоцианов и бетацианинов этот вариант хроматографии практически не используется.

Установлено, что одной из важных и до конца не решенных задач при производстве натуральных красителей остается их очистка от сопутствующих экстрактивных веществ. Приводится информация о некоторых используемых способах очистки экстрактов, среди которых наиболее эффективными считаются хроматографические методы, но могут быть использованы и более доступные методы, например, сорбция природными глинами. Но описания способов очистки бетацианинов слоистыми минералами в литературе отсутствуют.

Глава 2. Экспериментальная часть. Посвящена описанию экспериментальных способов, использованных диссертантом. Представлены: объекты исследования; пробоподготовка экстрактов к спектрофотометрическому и хроматографическому анализу, включающая твердофазную экстракцию. Используются современные приборы - высокоэффективный жидкостной хроматограф с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детекторами (Agilent 1260 Infinity), спектрофотометры Shimadzu UV-2550 и СФ 56, препаративный хроматограф Shimadzu LC-20. Твердофазная очистка велась на концентрирующих патронах ДИАПАК (БиоХимМак СТ, Москва). Для получения сухих форм, содержащих натуральные красители, приготовленные образцы лиофилизированы на установке Free Zone 2.5L, Labconco.

Глава 3. Результаты и их обсуждение. В ней изложены и обсуждены полученные экспериментальные данные. Вначале на примере антоцианов бутонов *H. sabdariffa* (чай «Каркаде») и бетацианинов корнеплодов *B. vulgaris* (красная столовая свекла) была показана возможность дифференциации этих двух классов природных красителей при изменении рН растворов в диапазоне от 1 до 8 с использованием спектрофотометрического метода анализа. На примере вишневого сока, экстракта плодов винограда и индивидуально выделенного цианидин-3-глюкозида показано медленное достижение равновесия между окрашенной флавилиевой формой антоцианов и бесцветной формой псевдооснования. Оценена систематическая погрешность определения содержания антоцианов рН-дифференциальным методом в случае недостаточного для

достижения равновесия выдерживания растворов. Рассмотрено влияние органического растворителя на результаты количественного определения антоцианов спектрофотометрическим методом. Проанализированы электронные спектры экстрактов антоцианов, выделенных из различных растительных источников. Следует отметить, что полученные автором данные воспроизводимы, т.к. введенные поправки позволяют уменьшить систематическую погрешность определения антоцианов спектрофотометрическим методом.

В работе проведено исследование электронных спектров комплекса беталаиновых красителей, состоящего из бетацианинов и бетаксантинов и предложен способ их количественного определения с использованием метода Фирордта без предварительного разделения на фракции.

Важной составляющей диссертационной работы является исследование устойчивости бетацианинов. После анализа электронных спектров отдельных фракций беталаиновых красителей (бетацианинов и бетаксантинов) и суммарного экстракта, а также после исследования хроматограмм, полученных в условиях ВЭЖХ, определено, что основной причиной неустойчивости бетацианинов является обратимость реакции конденсации беталамовой кислоты и *цикло*-ДОФА. Проведенные исследования позволили определить оптимальные условия для сохранения максимально возможного уровня устойчивости бетацианинов (концентрированные растворы с $\text{pH } 4.5 \div 7$).

Соискателем разработан способ очистки бетацианинов на концентрирующих патронах ДИАПАК, заполненных обращено-фазовыми сорбентами (С8, С16 и С18). На основании расчета зарядовых состояний на сайте www.chemaxon.com и полученным экспериментальным данным методом горизонтального электрофореза, предложены условия для проведения сорбции-десорбции бетацианинов: 0.1М раствор хлороводородной кислоты в качестве экстрагента и 10% раствор этанола в 0.1М растворе хлороводородной кислоты для подавления сорбции. При использовании ОФ сорбентов комплекс беталаиновых красителей легко удается разделить на две фракции – бетацианиновую, окрашенную в красный цвет, и бетаксантиновую, окрашенную в желтый цвет.

Для очистки экстрактов бетацианинов аналогично с антоцианами от сопутствующих экстрактивных веществ возможно использование и более доступной, и дешевой по сравнению с ОФ сорбентами природной глины. При этом необходимо в экстрактах создавать кислую среду ($\text{pH} \leq 1.0$) для перевода молекул красителя в катионную форму, что способствует протеканию сорбции по ионообменному механизму. Реэкстракцию с поверхности сорбента проводят подкисленным раствором этанола.

Автором исследованы закономерности поведения антоцианов и бетацианинов в условиях ОФ ВЭЖХ. На примере 3-глюкозидов антоцианидинов рассмотрено два варианта подвижных фаз: 1 – смесь «ацетонитрил-вода», подкисленная 0.5 об. % раствором ортофосфорной кислоты; 2 – смесь «ацетонитрил-вода», подкисленная 10 об. % раствором муравьиной кислоты. Установлено, что оптимальна смесь с муравьиной кислотой, что делает элюенты, приготовленные на её основе, более эффективными при разделении компонентов, различающихся по гидрофильности. Параметры уравнения относительного удерживания позволяют в случае применения обеих подвижных фаз дифференцировать антоцианы относительно структуры углеводного фрагмента на моно-, ди- и тригликозиды.

Соискателем предложены «поплавочный» механизм удерживания антоцианов в условиях ОФ ВЭЖХ и поверхностный механизм сорбции бетацианинов на основании представленных особенностей геометрического строения их изомерных форм.

В качестве альтернативы ОФ ВЭЖХ автором разработаны условия для разделения антоцианов и бетацианинов в варианте хроматографии гидрофильных взаимодействий.

Приведены результаты спектрофотометрического анализа готовых форм, приготовленных на основе натуральных бетацианинов, предлагаемых в качестве красителей для пищевой промышленности. Автором продемонстрирован достигнутый высокий уровень сохранности крайне неустойчивых в растворах бетацианинов после лиофилизации приготовленных на их основе композиций.

Приведенные многочисленные экспериментальные данные в таблицах и в рисунках свидетельствуют об обстоятельности проведенного исследования.

Замечания по диссертационной работе:

1. Зависимость $A = f(\lambda)$ нужно было обозначить одинаково: или спектр поглощения или электронный спектр.
2. Интенсивности абсорбции растворов бетацианов от pH среды меняется непоследовательно: $pH4 > pH6 > pH8 > pH2 > pH1 > pH0$ (рис. 3.9). Чем это обусловлено?
3. Рисунок по тексту должен идти после ссылки на него, а не до (рис. 3.15, 3.18, 3.20, 3.23, 3.40). Такое повторяется и для таблиц (3.12).
4. По рисункам 3.6 и 3.17 тяжело судить о медленном возврате халконных форм антоцианов в флавилиевую, так как приведенные спектры поглощения (45 мин и 90 мин) отличаются незначительно.
5. Не совсем понятен смысл последнего предложения на стр. 65.

6. Неудачное обозначение («спектрофотометрическое определение») таблиц 3.2 и 3.3, так как в этом случае нужно было привести значения массы или концентрации аналита в образце.

7. Из таблицы 3.4 непонятно, какие параметры приведены в столбцах 2-10.

8. Если в таблицах с результатами представлены значения параметров с доверительными интервалами, то необходимо было рассчитать величину среднеквадратичного отклонения – Sr.

9. В таблице 3.12 приведены значения погрешности определения ($98,9 \pm 0,8\%$ и т.д.). Логично было дать величины либо относительной, либо абсолютной погрешностей.

10. Опечатка в таблице 3.13 – «чисто» вместо «число». Не маленькие ли значения ЧТТ?

11. Непонятно, в чем новизна разработанного способа спектрофотометрического определения антоцианов?

12. Проводились ли сравнения полученных результатов на реальных объектах с каким-либо арбитражным методом?

13. Вторая часть пункта 1 выводов, на мой взгляд, не конкретная (о каких органических растворителях идет речь, для чего они нужны?).

Заключение

Сделанные замечания не снижают, в целом, высокую оценку содержательной части работы, насыщенной экспериментальными данными и представляющей собой актуальное исследование. Работа написана на хорошем научном языке, легко читается.

Соответствие содержания диссертации указанной специальности

Диссертация И.И. Тыняной «Разделение, концентрирование и анализ антоцианов и бетацианинов в экстрактах растительного сырья с применением оптических и хроматографических методов», соответствует заявленной специальности 02.00.02 – аналитическая химия.

Соответствие содержания автореферата содержанию диссертации

Автореферат И.И. Тыняной соответствует тексту диссертационной работы на тему «Разделение, концентрирование и анализ антоцианов и бетацианинов в экстрактах растительного сырья с применением оптических и хроматографических методов».

Заключение о соответствии работы требованиям ВАК

Диссертационная работа И.И. Гыняной «Разделение, концентрирование и анализ антоцианов и бетацианинов в экстрактах растительного сырья с применением оптических и хроматографических методов», полностью отвечает п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (утв. Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г.), предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата химических наук, а ее автор, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени по специальности 02.00.02 – аналитическая химия.

Официальный оппонент

доктор химических наук, профессор,

заведующий кафедрой неорганической химии и химической технологии

ФГБОУ ВО «Воронежского государственного

университета инженерных технологий»

Нифталиев С.И.

Почтовый адрес:

394036, г. Воронеж, пр. Революции, 19,

Федеральное государственное бюджетное

образовательное учреждение высшего образования

«Воронежский государственный

университет инженерных технологий»

Нифталиев Сабухи Илич-Оглы

E-mail: niftaliyev@gmail.ru

Тел.: 89204004004

8 (4732) 55-38-87

