

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Нгуен Ван Ань

«Определение полиненасыщенных жирных кислот в составе триацилглицеринов и в супрамолекулярных комплексах методом ВЭЖХ»

на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности

02.00.02 – аналитическая химия

Актуальность темы. Масла, содержащие высшие жирные кислоты (ЖК) с сопряженными двойными связями, представляют большой интерес в пищевой промышленности, фармакологии, а также при промышленном получении пленкообразующих веществ. Традиционно при рассмотрении качества масел применяют метод газовой хроматографии (ГХ). Термическое воздействие способно привести к потере некоторых химически активных органических веществ. Кроме этого метод ГХ не позволяет учитывать особенности строения триацилглицеринов (ТАГ). Использование обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) расширяет возможности анализа масел, оценки содержания в них различных по структуре и свойствам компонентов, проведение контроля видового состава ТАГ, в том числе без химического модифицирования масла.

Расширение направлений применения биологически активных веществ актуально для развития современных технологий переработки масел, в том числе для использования высоко гидрофобных соединений. Автором рассмотрено образование супрамолекулярных комплексов липидов с циклодекстринами, что весьма актуально для увеличения растворимости субстанций, улучшения физической и химической стабильности активных субстанций и повышения их биодоступности.

Цель диссертационной работы Нгуен Ван Ань – определение ТАГ, содержащих радикалы кислот с сопряженными двойными связями, в маслах семян растительных источников методом ОФ ВЭЖХ с использованием независимых способов идентификации. Разработка аналитических способов контроля образования супрамолекулярных комплексов жирных кислот с мочевиной, жирных кислот и ТАГ - с циклодекстринами.

Для достижения поставленной цели решались следующие основные задачи:

- разработка способа экстракции, концентрирования и очистки масел, исключаящих разрушение или изомеризацию лабильных полиеновых соединений;
- подбор хроматографических условий для разделения ТАГ и жирных кислот с сопряженными двойными связями;
- установление закономерностей разделения ТАГ и жирных кислот в условиях ОФ ВЭЖХ, определение параметров относительного удерживания, включая построение карты разделения, и объяснение полученных закономерностей;
- создание аналитического обеспечения для контроля процесса обогащения октадекатриеновыми кислотами гидролизата соответствующих масел за счет образования тубулатоклатратов с мочевиной;
- создание способов аналитического обеспечения для контроля комплексообразования сквалена, некоторых масел и жирных кислот с сопряженными двойными связями с циклодекстринами.

Научная новизна диссертационной работы Нгуен Ван Ань состоит в теоретическом расширении возможностей ОФ ВЭЖХ для проведения качественного и количественного анализа масел, содержащих высшие ЖК. Разработан способ количественного определения методом ОФ ВЭЖХ состава ТАГ растительных масел с радикалами кислот с сопряженными двойными связями. Расширение возможностей метода достигается разработкой способа пробоподготовки масла семян, предшествующего определению ЖК.

Разработан способ количественного определения жирных кислот методом внутренней нормировки ТАГ, без введения поправочных коэффициентов на чувствительность по

каждому из веществ, основанный на использовании в качестве аналитических длин волн аналогичных изобестических.

В работе впервые получены данные о видовом составе ТАГ, а также полиненасыщенных ЖК более 20 масел семян растений большого числа объектов Белгородской и Вьетнамской флоры. Нгуен Ван Ань представил теоретическое развитие инкрементного подхода с использованием данных спектрофотометрии и масс-спектрометрии для определения видового состава ТАГ.

Для объяснения селективности неподвижной фазы (НФ) к жирным кислотам с сопряженными двойными связями предложена модель строения поверхности обращенно-фазовых сорбентов, полученных химической модификацией силикагеля алкилдиметилхлорсиланами. Представленный результат исследования позволяет увеличивать эффективность хроматографического разделения близких по природе ЖК.

Разработанное в работе аналитическое сопровождение методов получения и изучения состава супрамолекулярных комплексов включения некоторых липидов (скалена, масел и жирных кислот) с мочевиной и циклодекстринами расширяет направления использования высоко гидрофобных соединений, для увеличения их растворимости, улучшения физической и химической стабильности и повышения их биодоступности.

Практическая значимость работы заключается в расширении возможностей извлечения и использования биологически активных веществ. Автором методом ОФ ВЭЖХ определены составы ТАГ 22 масел семян, содержащих радикалы с сопряженными двойными связями. Внедрение предлагаемой системы индексаций удерживания ТАГ, содержащих радикалы сопряженных ЖК, расширяет аналитические возможности лабораторий при определении биологически активных веществ в маслах. Представленные диссертантом подходы к определению жирных кислот методом ОФ ВЭЖХ позволяет расширить возможности определения веществ и проводить адаптацию результатов, лаборатории, оснащенных традиционными хроматографами, не обладающих дорогостоящим оборудованием выполненных с учетом данных, полученных в других лабораториях.

Результаты работы по содержанию добавок неживотных жиров позволяют выявлять фальсификацию различных объектов, содержащих ЖК, в том числе сыры и молоко. Автором характеризуются способы подтверждения подлинности методом отпечатков пальцев, оценки идентичности хроматографических профилей. Предложенное использование в работе векторной модели позволило автору характеризовать предполагаемый тип фальсификации с учетом выбора базиса и реперного вектора.

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 всероссийских и международных научных конференциях. Основные положения диссертационной работы опубликованы в авторитетных научных журналах. Основные результаты диссертации опубликованы в 28 работах, в том числе в 12 статьях, опубликованных в журналах, рекомендованных ВАК РФ, из которых 7 в международных журналах, индексируемых в SCOPUS и WoS, 16 материалов в сборниках трудов конференций и всероссийских журналах.

Объем и структура диссертации. Диссертация Нгуен Ван Ань по содержанию и структуре полностью отвечает научно-квалификационной работе на соискание ученой степени кандидата химических наук. Она состоит из введения, главы 1 "Обзор литературы", главы 2 "Объекты исследования и методики эксперимента", Главы 3 "Результаты и их обсуждение", выводов и списка использованной литературы (233 наименования), 8 приложений. Работа изложена на 138 страницах машинописного текста, содержит 86 рисунков и 66 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.

Обзор литературы посвящен анализу современных представлений о жирных кислотах (ЖК), их классификация, физические свойства, строение, влияние насыщенности, получение, особенности свойств масел, содержащих радикалы с сопряженными двойными связями, биологическая, химическая активность сопряженных жирных кислот. Приведены данные о содержании ненасыщенных ЖК и их производных в различных объектах, методах их определения.

Автором указаны основные направления использования хроматографических, спектроскопических, а также гибридных методов анализа. Диссертант обосновывает выбор метода анализа, выявляя достоинства и ограничения методов. Отмечена сложность трактовки данных анализа различными методами (спектрофотометрии, спектроскопии ИК-, МС- (MALDI-TOF), газовой хроматографии с МС, и др.). Приведена характеристика методов качественного и количественного определения сопряженных жирных кислот в растительных маслах. Представлена схема методов определения конъюгированных кислот, а также характеристика вариантов аналитических методов, получивших наиболее широкое распространение в качественном и количественном анализе масел, при определении ЖК.

Указаны достоинства методов и их преимущества, позволяющие определять целевой компонент. Отдельное внимание уделено спектрофотометрии, смещению максимумов поглощения, что в дальнейшем диссертанту позволило обосновать четвертое положение, применение метода внутренней нормировки, проводить количественный анализ соотношения различных ТАГ. Нгуен Ван Ань представил характеристику ИК-спектроскопии в анализе структуры ЖК и отнесение полос, с указанием относительных интенсивностей полос, что в дальнейшем позволяет интерпретировать полученные экспериментальные данные о составе экстрактов.

Особое внимание автор уделяет описанию различных вариантов хроматографических методов, включая особенности их пробоподготовки, типы колонок, детекторов, условий детектирования, последовательности элюирования жирных кислот. Диссертант в зависимости от свойств аналита указывает на применимость наиболее подходящих вариантов хроматографии. Газовая хроматография рассматривается при *идентификации изомеров ЖК*, разделении эфиров жирных кислот; "Ион-серебряная" в комбинации с ОФ ВЭЖХ – для обоснования возможности сочетания различных хроматографических методов при идентификации наибольшего числа ТАГ в сложных смесях, также для препаративного разделения ТАГ.

Диссертантом представлена характеристика прогнозирования времени удерживания триацилглицеринов и учет вклада функциональных групп. Большое внимание уделено инкрементному подходу, разработанному Дейнека В.И., для удерживания ТАГ, использование которого позволило диссертанту сформулировать и обосновать возможность идентификации ТАГ и закономерности их разделения.

В диссертационной работе представлена характеристика методов исследования комплексов включения с циклодекстринами (термический анализ, рентгеновская дифрактометрия, ИК-, ЯМР-спектроскопия). Обширный и глубокий анализ литературных данных по характеристике объектов исследования и современным методам их анализа позволил диссертанту сформулировать условия определения сопряженных жирных кислот; показана эффективность методов ВЭЖХ при разделении ТАГ, что в дальнейшем легло в основу экспериментального подтверждения и обоснования положений диссертационной работы, выносимых на защиту.

Во второй главе приведено описание объектов исследования. Изучены характеристики растительных масел, приобретенных в розничной торговле, масел растений ботанического сада НИУ «БелГУ» и растений, культивируемых во Вьетнаме. Автором представлены методики экстракции ТАГ и обоснованы условия извлечения БАВ с учетом их

природы, лабильности. Указаны особенности отчистки масел для определения веществ методом ВЭЖХ.

Представлены подробные методики количественного определения жирных кислот в вариантах ВЭЖХ при использовании рефрактометрического и спектрофотометрического детекторов методом внутренней нормировки. При выборе способов детектирования отмечен характер изменения коэффициента асимметрии при варьировании концентрации аналита. Указана низкая эффективность квадрупольного масс-детектора и рекомендации по повышению эффективности ионизации за счет добавок химических веществ в растворитель.

Третья глава содержит результаты изучения применения вариантов жидкостной хроматографии, а именно нормально-фазовой и обращено-фазовой хроматографии для разделения липидов. Указаны особенности анализа ЖК по сравнению с расчетным значением логарифма коэффициента распределения веществ в системе «октанол-1 – вода» (CLOGP), «эквивалентных углеродных чисел». Отмечена корреляция между $\lg k(\text{ТАГ})$ и параметром липофильности (CLOGP) и эквивалентными углеродными числами (ECN). Приведено обоснование природы стационарной фазы (C18, C8 фазы) и состава ПФ. Отмечены закономерности изменения параметров удерживания и обосновано использование C18. На основе анализа чисел теоретических тарелок, при учете вязкости растворителей, подтверждена применимость ацетонитрила как растворителя наиболее пригодного для разделения ЖК в вариантах ОФ ВЭЖХ. Обоснован выбор компонентов ПФ с учетом способа детектирования (рефрактометрического, спектрофотометрического), природы растворителей (собственной абсорбции электромагнитного излучения), элюирующей силы, эффективности хроматографической системы, химической лабильности сопряженных триеновых соединений.

Указана более высокая чувствительность рефрактометрического детектирования по сравнению со спектрофотометрическим детектированием. Подробно изучены эффекты, вызванные добавлением к подвижной фазе модификаторов (н-гексан). Автор приводит обоснование скорости ПФ на основе построения экспериментальной зависимости и описания уравнением Ван-Деемтера.

При установлении качественного и количественного состава ТАГ растительных масел автор широко использует инкрементный подход. Нгуен Ван Ань комбинирует его с анализом электронных спектров и масс-спектров для определения видовой состава ТАГ. Особого внимания заслуживает количественное определение содержания ТАГ в образцах по площадям пиков, записанных с использованием спектрофотометрического детектора при определении эквивалентных изобестических точек.

Автором предложена идеализированная модель химически модифицированного силикагеля. Представленный механизм позволил объяснить ряд закономерностей (последовательность элюирования соединений), обнаруженных при исследовании удерживания триацилглицеринов, как функции строения радикалов высших жирных кислот.

Автор существенная часть работы посвящена особенностям исследования многокомпонентных систем. Отмечено, что в реальной хроматографической практике иногда приходится сталкиваться с инверсией удерживания некоторых пар веществ. Это создает определенные трудности для установления присутствия определяемого вещества в пробе даже при использовании стандартных образцов. Указано, что совпадение времен удерживания двух веществ не является доказательством их идентичности и необходим ортогональный контроль других свойств веществ. Для решения этих проблем предложено использовать двухпараметрическую индексацию удерживания по методу анализа относительного удерживания. Для большого количества масел проведено построение карт разделения и определение параметров уравнений относительного удерживания. Автором показано, что индексационные уравнения не привязаны к составу ПФ, и в ряде случаев могут быть общими для различных марок стационарных фаз, что подтверждено в работе экспериментально.

В *списке литературных источников* соискатель приводит 233 работы, среди которых представлены российские и зарубежные публикации, в том числе за последние 5-10 лет.

Авторитет цитируемых изданий и их разнообразие указывают на серьёзный подход Нгуен Ван Ань к обеспечению достоверности и обоснованности результатов проведенного исследования.

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

В приложении приведена векторная модель для оценки фальсификации сыра пальмовым и подсолнечным маслами.

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 работе встречаются стилистические ошибки и неточности, некоторые предложения содержат повторы.
2. Автор указывает, что "Разработан подход количественного анализа жирных кислот методом внутренней нормировки ТАГ..." В данном случае имеет смысл говорить о способе количественного определения ЖК. По рекомендациям научного совета по аналитической химии РАН термин "анализ" можно использовать применительно к объектам, а для веществ (компонентов) имеет смысл говорить об определении (качественном или количественном).
3. Автором на стр. 77 диссертации отмечено, что "При этом идентификация пиков по инкрементному подходу хорошо выполняется как при рефрактометрическом, так и при спектрофотометрическом детектировании. Результаты представлены в таблицах 3.6 и 3.7, а результаты количественного определения, представленные в таблице 3.8, свидетельствуют о том, что оба метода дают сходимые результаты". Требуются пояснения, как проводилась оценка погрешности, какова в этом случае выборка (n). Было бы полезно характеризовать отдельно случайную и систематическую погрешности при определении ЖК в вариантах ВЭЖХ (в том числе для рефрактометрического детектирования, результаты которого (чувствительность детектора, воспроизводимость сигнала) зависят от условий термостатирования).
4. При рассмотрении хроматограмм масла семян, записанные в двух различных подвижных фазах при спектрофотометрическом и рефрактометрическом детектировании, существенно варьируются параметры удерживания триглицеридов (рис. 3.14, 3.16). Требуются пояснения, какой из факторов автор прослеживает: состав ПФ или тип детектора. Возможно, в этом случае более существенную роль играет варьирование состава ПФ, а для сравнения аналитических характеристик детекторов имело бы смысл использовать идентичные хроматографические условия.
5. Достаточно дискуссионно выглядит вопрос о закономерностях удерживания триацилглицеринов с учетом структуры аморфного силикагеля. Автором предложено построение и обоснование модели удерживание триацилглицеринов аморфным силикагелем, указано влияние природы силанольной группы, а также их появления на одной или нескольких вершинах кремнекислородного тетраэдра. Автор характеризует появление сорбционных центров на поверхности идеально формирующихся тетраэдрических структур, однако не рассматривается кривизна поверхности (пористость силикагеля) и возможность энергетической неоднородности таких групп в реальных силикагелях (в микро, мезо, макропорах).

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 Нгуен Ван Ань можно рассматривать как самостоятельный и законченный научный труд, в котором на основании выполненных соискателем исследований получены новые и перспективные результаты в области определения триацилглицеринов, содержащих радикалы кислот с сопряженными

двойными связями, в маслах семян растительных источников методом ОФ ВЭЖХ с использованием независимых способов идентификации. В диссертационной работе разработаны аналитические способы контроля образования супрамолекулярных комплексов ЖК с мочевиной, жирных кислот и ТАГ - с циклодекстринами. Эти результаты расширяют фундаментальную базу для разработки методов экстракции, концентрирования и очистки масел, исключая разрушение или изомеризацию лабильных полиеновых соединений. Создание аналитического обеспечения для контроля процесса выделения биологически активных веществ, установление закономерностей разделения ТАГ и жирных кислот в условиях ОФ ВЭЖХ, определение параметров относительного удерживания, построение карт разделения представляет собой один из эффективных направлений исследования таких веществ. Представленная работа открывает новые возможности для более широкого внедрения сорбционных технологий, хроматографических методов в промышленное производство, в том числе при контроле качества объектов, содержащих жирные кислоты.

Диссертация написана хорошим научным языком и аккуратно оформлена. Автореферат и публикации (12 статей в рекомендованных ВАК РФ журналах, 16 тезисов докладов на международных и всероссийских научных конференциях) полно и адекватно отражают основное содержание представленной диссертационной работы. Автореферат диссертации соответствует основным положениям работы.

Диссертация работа Нгуен Ван Ань «Определение полиненасыщенных жирных кислот в составе триацилглицеринов и в супрамолекулярных комплексах методом ВЭЖХ» по актуальности решаемых задач, новизне, объему проведенных исследований, уровню их обсуждения, научной и практической значимости соответствует паспорту специальности 02.00.02 – аналитическая химия (в п.п. 1,2,7,13,14), отвечает требованиям п. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением № 842 Правительства российской Федерации от 24 сентября 2013 года, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия.

Карпов Сергей Иванович

Кандидат химических наук
(02.00.04 – физическая химия), доцент,
доцент кафедры аналитической химии
ФГБОУ ВО "ВГУ",
доцент
15.04.2020

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



федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ВГУ»)	
Подпись	<i>Карпова С.И.</i>
Заведую	<i>С.И. Карпов</i>
	должность
<i>15.04.2020</i>	
подпись, расшифровка подписи	