

Отзыв

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата химических наук Туртыгина Александра Владимировича

на тему: «СКРИНИНГ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТАВА ТРИАЦИЛГЛИЦЕРИНОВ В РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЛАХ И ЖИВОТНЫХ ЖИРАХ В УСЛОВИЯХ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЭЖХ»

по специальности 02.00.02

Актуальность темы исследования. Растительные масла и животные жиры – важнейшие компоненты пищи, они представляют смесь триацилглицеринов высших жирных кислот (ТАГ) и других липоидных веществ, важных для жизнедеятельности человеческого организма. Набор высших жирных кислот, входящих в состав ТАГ масел и жиров определяет их биодоступность и биологическую ценность, а также их индивидуальные характеристики. Контроль качества и безопасности масложировой продукции включает в себя обязательное определение состава жирных кислот (ЖК) и применение полученных результатов в идентификации подлинности жировой продукции. Этот состав определяют методом капиллярной ГЖХ после гидролиза и переэтерификации исходных ТАГ (ГОСТ Р51483-99). При этом теряется важная информация о распределении радикалов ЖК в ТАГ. Фракционный состав ТАГ также нельзя установить методом ГЖХ. Анализ триглицеридного состава методом ВЭЖХ с применением «эквивалентных углеродных чисел» (ЭУЧ) позволяет существенно повысить надежность идентификации подлинности растительных масел и животных жиров. Подход с применением ЭУЧ можно дополнительно усовершенствовать, используя двухпараметрический метод индексации удерживания ТАГ в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ. Этот подход разработан при выполнении данной диссертационной работы. При его применении нивелированный результат определения фракционного состава ТАГ мало зависит от частных вариаций в условиях хроматографирования и позволяет использовать векторную модель для оценки качества масел и установления фальсификации. Разработка усовершенствованной методологии определения состава ТАГ с применением инкрементного подхода и индексов их относительного удерживания в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ для оценки качества и подлинности растительных масел и животных жиров, безусловно, является актуальным исследованием.

Научная новизна. Впервые разработан двухпараметрический способ индексации удерживания ТАГ в условиях ОФ ВЭЖХ, в котором комбинируется метод анализа относительных параметров удерживания и инкрементный подход. Показано, что параметры двухпараметрического способа индексации ТАГ могут быть перенесены с одной марки октадецильного сорбента на другую в условиях изократического элюирования. Получена база данных по параметрам уравнения относительного удерживания основных ТАГ типовых растительных масел и животных, позволяющая в оболочке MS Excel рассчитывать времена удерживания для 35 ТАГ с заданным жирнокислотным составом, моделировать хроматограммы при статистическом распределении радикалов жирных кислот в ТАГ в условиях ОФ ВЭЖХ. В качестве стандартной смеси предложено и обосновано использование подсолнечного масла, которое содержит трилинолеат. Этот ТАГ в предложенной модели использован в качестве реперного для определения основных, наиболее часто встречающихся в химии растительных масел инкрементов. Кроме того, предложена и экспериментально обоснована возможность переноса инкрементных соотношений с установленного «тренировочного ряда» на удерживание других ТАГ. Впервые предложена векторная модель, построенная по площадям характеристичных пиков для конкретных стандартных и анализируемых образцов масел, позволяющая количественно оценить подлинность анализируемого масла, ее применимость опробована на продукции, в изготовлении которой используется масло какао.

Практическая значимость. Предложен усовершенствованный способ оценки качества и установления подлинности растительных масел и жиров с использованием данных ОФ ВЭЖХ натуральных образцов. Проведен мониторинг растительного сырья Белгородской области, определен триглицеридный и жирнокислотный состав этого сырья, найдены растительные источники масел с биологически ценным химическим составом. Разработанный методологический подход использован в практикумах для обучающихся в Белгородском государственном национальном исследовательском университете (бакалавриат, специалитет, магистратура, аспирантура) по химическому, биологическому и медицинскому направлениям. Разработка может использоваться в экспертизах после верификации в лабораториях различных надзорных органов.

Степень достоверности результатов исследования и апробация работы. Достоверность результатов обеспечена использованием

современного хроматографического оборудования, применением статистико-математической обработки данных с применением типового аттестованного программного обеспечения MS Excel. Результаты работы опубликованы в рецензируемых научных изданиях и апробированы на профильных международных и всероссийских научных конференциях.

Соответствие специальности 02.00.02 – аналитическая химия. Диссертационная работа Туртыгина А.В. соответствует пунктам паспорта специальности 02.00.02: 2) методы химического анализа (... , хроматография, ...); 5) математическое обеспечение химического анализа; 13) анализ пищевых продуктов; 14) анализ природных веществ и 19) сертификация веществ и материалов по химическому составу.

Объем и структура работы. Оценка содержания диссертации. Диссертация состоит из введения, 3 глав, списка литературы из 258 источников, 5 приложений. Материал работы изложен на 208 страницах, содержит 77 рисунков, 35 таблиц.

Литературный обзор. В главе 1 (аналитический обзор), рассмотрена информация по липидам, в том числе ТАГ, их строению, биологической ценности, а также по источникам масел, обсуждены основные методы определения состава масел и жиров: ИК-спектроскопия, УФ-спектрофотометрия, ГЖХ, ВЭЖХ, ТСХ, масс-спектрометрия, их преимущества и недостатки. Важной составляющей обзора литературы является рассмотрение методологии инкрементной индексации для ОФ ВЭЖХ, эмпирических и полуэмпирических моделей, которые применялись или используются в настоящее время. Охват цитируемых первоисточников (258) достаточно широк, 72% ссылок на англоязычные научные издания, охват по времени опубликования – от 1952 до 2020 года. Вместе с тем сравнительно слабо отражена литература за последние 5 лет.

Экспериментальная часть (2-я глава). В этой части диссертации дано описание методов, использованных в работе, условия ОФ ВЭЖХ для хроматографирования ТАГ, составы подвижной фазы, тип детектирования, методы экстракции, очистки, условия полного и частичного гидролиза ТАГ. Следует отметить широкий спектр образцов растительных масел и масложировой продукции, которые были исследованы в работе соискателя.

В третьей главе представлены и обсуждены результаты выполненных исследований по определению жирнокислотного и триглицеридного состава растительных масел, животных жиров, масложировых и кондитерских продуктов, определены уравнения относительного удерживания, параметры

инкрементных соотношений; предложены и обоснованы методы определения идентификации масел, включая векторную модель. В ходе выполнения исследований создана база хроматографических данных ТАГ целой серии растительных масел. Проведена идентификация ТАГ с использованием разработок научной хроматографической школы Дейнеки В.И., показана эффективность применения метода анализа относительного удерживания, в котором чаще всего за реперное вещество принят трилинолеат глицерина. Рассмотрены карты разделения ТАГ, показано, что они остаются неизменными даже для стационарных фаз различных марок с одинаковыми привитыми октадецильными группами и одинаковым составом элюента. Особое внимание диссертант уделяет так называемым точкам конвергенции, на положение которых влияет количество двойных связей в ТАГ, т.е. по их координатам можно выявлять степень ненасыщенности ТАГ. Надо отметить, что эти точки всегда находятся по результатам экстраполяции экспериментальных зависимостей. Методологию идентификации ТАГ, апробированную на типовых растительных маслах соискатель распространил на расшифровку хроматограмм нетрадиционных источников масел, в том числе при интерпретации хроматографических данных по составу ТАГ семян 3 видов древогубцев и 10 видов бересклетов, у которых имеются в структуре ТАГ остатки уксусной кислоты. Эти масла перспективны в качестве биотоплива без дополнительной стадии переэтерификации. Также инкрементный подход был использован при установлении фракционного состава ТАГ животных жиров (гусиный, свиной, говяжий) и жира коровьего молока. Были рассмотрены приемы выявления фальсификатов по составу ТАГ сливочного масла, дорогих и лечебных сортов растительных масел (оливкового, облепихового, какао), как с использованием качественного метода «отпечатков пальцев», так и с применением векторной модели, количественно характеризующей отклонения от состава образца сравнения. Векторная модель отработана на примере масла какао и шоколадных изделий (80 образцов различной шоколадной продукции), содержащей то или иное количество натурального масла какао. В качестве образца сравнения было использовано чистое масло какао географического происхождения Кот-д'Ивуара. Созданная Туртыгиным А.В. собственная индексация параметров удерживания ТАГ в ОФ ВЭЖХ была реализована в виде программы в оболочке MS Excel.

Вопросы и замечания. Работа выполнена на высоком экспериментальном и теоретическом уровне. Вместе с тем к ней имеется ряд вопросов и замечаний.

1. Замечания по литературному обзору. Рукописи, к которым относятся диссертации, часто не проходят корректуры у профессионального редактора научного издания, в связи с этим имеют погрешности в оформлении. Не избежал их и соискатель. В обзоре автор бессистемно расставил разделы по методам анализа жиров и масел: ГЖХ, ТСХ, ЖХ, ИКС, МС, ГХ-МС, ВЭЖХ-МС, ЯМР, УФС. Логично было разместить их, начиная от более простых оптических и спектральных, затем перейти к гибридным хроматографическим методам. Список литературы составлен с применением «разношерстных» правил, желательно придерживаться принятого в РФ ГОСТ Р 7.0.100–2018 «Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления». В ссылках 17, 82, 146 нет года издания, в ряде источников нет либо тома, либо номера, либо страниц. В ссылках на книги количество страниц указано как номер страницы. В списке литературы 72% источников – статьи или книги в англоязычных изданиях, охватывающие период с 1952 по 2020 г.г. Это хорошо, но ссылок за последние 5-10 лет маловато. Грамматических, орфографических, стилистических ошибок немного, но бросается в глаза, например, слитное написание MS Excel; обозначение десятичного логарифма то как Log, то log, то lg, то курсивом, то прямо. Слова *химически привитые* автор пишет через дефис. Приставки *цис-* даже в начале предложения принято писать строчными буквами, прописными буквами в этом случае пишется следующее за приставкой название соединения. В целом обзор выглядит несколько эклектичным, общеизвестные сведения из учебных пособий, без которых можно обойтись, сочетаются с описанием оригинальных статей. В итоге обзора нет обоснования выбора ОФ ВЭЖХ в скрининге состава ТАГ в растительных маслах с применением октадецильных сорбентов, ацетон-ацетонитрильных элюентов и рефрактометрического детектирования.

2. Есть замечание по экспериментальной части. Пробоподготовка животных жиров (п.2.1.4) описана недостаточно подробно, чтобы ее можно было воспроизвести. А вот методика омыления жиров (п.2.2) излишне подробна, достаточно было привести номер ГОСТ. В пункте 2.4 ничего не сказано о том, что использовали в кювете сравнения, и вообще использовали ли кювету сравнения. В пункте 2.5 указано, что применяли 30-метровые капиллярные колонки для определения жирнокислотного состава. Они не селективны при разделении изомеров, не позволяют удовлетворительно разделить *цис-* и *транс-*изомерные жирные кислоты близкие по параметрам удерживания. В работе «*транс-жиры*» вообще не осуждаются, как будто их нет в природе, и они не образуются в результате переработки масложировой

продукции. В п.п. 2.8 и 2.9. формулы 2.3 и 2.4 желательно было набрать в редакторе формул, чтобы их можно было трактовать математически однозначно. Пункт 2.10 не достаточно информативен и не передает необходимых сведений о том, как была проведена автором статистико-математическая обработка результатов.

3. Замечания по 3 главе. Автор получил и использовал в своей работе более узкие выборки образцов подсолнечного масла по составу жирных кислот и данные о масле какао только одного сорта какао-бобов. Например, он привел результаты определения диапазона содержания линолевой кислоты в подсолнечном масле 63-65%, а по ГОСТ-1129-2013 этот диапазон равен 48-77%, аналогичные разночтения и по остальным жирным кислотам. На относительные параметры удерживания ТАГ это не влияет, а вот на интерпретацию результатов методом «отпечатков пальцев» или при сопоставлении по векторной модели можно сделать ложноположительные выводы о фальсификации, если опираться на узкие диапазоны варьирования состава или на единичные определения состава образца сравнения. Что касается данных по составу масла какао из разных регионов. Сегодня известно четыре сорта какао-бобов: Форастеро (Forastero), Криолло (Criollo), Тринитарио (Trinitario) и Националь (Nacional), отличающихся по количественному составу ТАГ. В табл. 3.25 приведены не собственные, а литературные данные и ссылка в описании таблицы на первоисточник была бы уместна. Для изготовления шоколадных плиток, конфет применяют шоколадную глазурь, в которой, согласно ГОСТ Р 53897-2010 «Глазурь. Общие технические условия», содержание масла какао предусмотрено *не ниже* 12 %. Не удивительно, что многие образцы шоколадных изделий по составу ТАГ были очень далеки от натурального масла какао, но их нельзя назвать фальшивыми, надо проверять ТУ, по которым они приготовлены. Таким образом, векторная модель является полезным инструментом, но не достаточным для уверенной идентификации качества масложировой продукции, требуется дополнительная верификация этого приема.

4. Предлагаемые соискателем алгоритмы компьютерного моделирования хроматограмм и созданную базу хроматографических данных по составу ТАГ было бы полезным зарегистрировать в свидетельствах о госрегистрации. Не помешало бы по ряду растительных масел сопоставить итоги собственной идентификации триглицеридного состава с данными из литературных источников.

5. При рассмотрении эквивалентных углеродных чисел (ЭУЧ) автор (см. п.3.2.1), опираясь на экспериментальные значения логарифмов фактора

удерживания, полученные в отличающихся хроматографических условиях, делает заключение, что ЭУЧ зависят от состава подвижной фазы, температуры... Но ЭУЧ в фундаментальном плане не являются функцией состава подвижной фазы или марки стационарной фазы. Это свойство самого аналита, связанное с его химическим строением (содержанием атомов углерода в молекуле, числом двойных связей и некоторыми другими особенностями химического строения). Его хроматографическое поведение немного отличается при изменении условий ВЭЖХ. Можно сказать, что *расчетные значения ЭУЧ*, найденные по параметрам удерживания разнятся, и для разных условий требуется вводить некие поправочные коэффициенты. Значения ЭУЧ при этом варьирует с точностью $\pm 1.5\%$.

Высказанные замечания не сказались на высокой оценке диссертационной работы. Выполнено добротное исследование, получены значимые результаты, Диссертация адекватно отражена в автореферате и в публикациях по теме исследования. В целом, рукопись оформлена в соответствии с нормативными требованиями, результаты изложены логично, итоги сформулированы четко.

Заключение. Диссертация Туртыгина А.В. является цельной и завершенной научно-квалификационной работой, выполненной на актуальную тему, связанную с приоритетными направлениями и программами развития отечественной фундаментальной и прикладной науки. По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, степени обоснованности положений и выводов диссертационная работа соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 (в редакции Постановлений правительства РФ 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 кандидатским диссертациям, а ее автор Туртыгин Александр Владимирович заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия.

Официальный оппонент:

доктор химических наук

(02.00.02 – Аналитическая химия)

доцент, заведующий кафедрой фармацевтической

химии и фармацевтической технологии

фармацевтического факультета

