

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

**на диссертационную работу Туртыгина Александра Владимировича «Скрининг и определение состава триацилглицеринов в растительных маслах и животных жирах в условиях обращённо-фазовой ВЭЖХ», представленной на соискание учёной степени кандидата химических наук**

Стратегия гарантированного обеспечения населения качественными продуктами питания является обязательной частью общей стратегии национальной безопасности любого современного развитого государства. В России официальный взгляд на эту сферу изложен в так называемой Доктрине продовольственной безопасности Российской Федерации, утверждённой Указом Президента Российской Федерации № 20 от 21.01.2020. Согласно этому документу, продовольственная безопасность понимается как *«состояние социально-экономического развития страны, при котором обеспечивается продовольственная независимость Российской Федерации, гарантируется физическая и экономическая доступность для каждого гражданина страны пищевой продукции, соответствующей обязательным требованиям, в объёмах не меньше рациональных норм потребления пищевой продукции, необходимой для активного и здорового образа жизни»*. Среди прочего, Доктриной определяются необходимые уровни обеспечения продовольственной независимости РФ по различным группам пищевых продуктов. В отношении растительных масел этот уровень равен 90% от общего объёма потребления. Данным документом, а также другими нормативными актами предусматривается необходимость постоянного мониторинга качества пищевой продукции, в том числе и растительных масел, в рамках общего комплекса мер по обеспечению физической доступности для населения продукции, отвечающей требованиям здорового питания. Для осуществления такого мониторинга необходимо иметь развитые методы аналитического контроля качества масел и жиров, которые позволяют достоверно устанавливать качество продукции, соблюдение требований пищевой безопасности при её изготовлении и реализации, а также, при наличии, факты фальсификации продуктов. При этом для того, чтобы иметь возможность реализовать аналитический контроль повсеместно, а не только в точках развитой научной инфраструктуры, такие методы в идеале должны быть недорогими в реализации, простыми в использовании, однозначными в интерпретации и, по возможности, легко адаптируемыми к изменениям технических и экономических условий. Этот набор сложных и в чём-то противоречивых требований ставит перед разработчиками методов химического анализа пищевой продукции целый ряд непростых и амбициозных задач.

В масложировой индустрии чаще всего встречаются типовые задачи по установлению ненадлежащего качества либо грубой фальсификации продукции, такие, например, как использование низкокачественного сырья для производства масел высоких сортов либо добавление жиров растительного происхождения в сливочное масло. Такие задачи в целом успешно решаются с использованием устоявшихся подходов, основанных преимущественно либо на титриметрических измерениях характеристических показателей жиров (кислотное, йодное, перекисное, анизидиновое и другие числа), либо на газохроматографическом анализе жирнокислотного состава переэтерифицированных масел. Однако есть значительный спектр более тонких задач, с решением которых типовые приёмы могут не справляться. Например, задачи различения рафинированных растительных масел, не содержащих экзотических жирных кислот в своём составе, часто не могут быть достоверно решены с использованием газохроматографического подхода ввиду близости жирнокислотного состава разных масел и широких интервалов их допустимых содержаний. В таких ситуациях целесообразнее проводить анализ триглицеридного состава исходного масла с использованием жидкостной хроматографии. А это гораздо более сложная задача. С одной стороны, разнообразие класса триацилглицеридов (ТАГ) весьма велико. Существует несколько десятков распространённых жирных кислот, и, следовательно, много сотен различных природных ТАГ. С другой стороны, все ТАГ очень схожи между собой по химическим, в том числе и хроматографическим, свойствам. С этим связана сложность их хроматографического разделения и идентификации, без чего невозможно надёжное установление качества масел. Диссертационная работа А.В. Туртыгина направлена на разработку подходов, которые позволят решать такие задачи потоковым образом без использования сложного масс-спектрометрического оборудования, что обуславливает **актуальность данного исследования**.

**Структура диссертации** А.В. Туртыгина отвечает требованиям ВАК. Диссертация изложена на 208 страницах машинописного текста, состоит из введения, 3-х глав основной части (аналитический обзор, экспериментальная часть, результаты и обсуждение), выводов, списка цитируемой литературы (258 источников), и 5-ти приложений, содержит 77 рисунков и 35 таблиц. Автореферат диссертации достаточно полно отражает содержание работы.

**Во введении** автор обосновывает актуальность и значимость выбранного направления исследований, ставит цель работы, заключающуюся в *«разработке методологии определения состава триацилглицеридов с применением инкрементного подхода и индексов их относительного удерживания в условиях обращённо-фазовой ВЭЖХ*

для оценки качества и обнаружения фальсификаций растительных масел и животных жиров», а также обозначает нижеследующий перечень задач, которые необходимо решить для достижения этой цели:

1. Установление закономерностей хроматографического поведения ТАГ в условиях ОФ ВЭЖХ при изменении состава подвижной фазы, температуры разделения и марки стационарной фазы.

2. Определение ТАГ и жирнокислотного состава масел семян растений в условиях ОФ ВЭЖХ и сопоставление с результатами определения жирнокислотного состава масел методом ГЖХ метиловых эфиров. Оценка надежности инкрементного подхода.

3. Разработка двухпараметрической системы индексации удерживания ТАГ в условиях ОФ ВЭЖХ по методу анализа относительного удерживания и сопоставление полученных данных с индексацией по эквивалентным углеродным числам.

4. Оценка прогностической функции инкрементного подхода в качественном анализе сложных смесей ТАГ и оценка роли координат точек конвергенции в неразрушающем способе определения жирнокислотного состава ТАГ.

5. Разработка качественных и количественных методов установления качества растительных масел по видовому составу ТАГ и разработка количественного критерия (векторной модели) для установления фальсификации.

**В аналитическом обзоре** автором кратко рассмотрено химическое разнообразие природных липидов с упором на триацилглицериды как целевые объекты настоящего исследования. Приведены сведения о физиологических свойствах наиболее интересных с практической точки зрения жирных кислот и их содержании в различных природных источниках, прежде всего растительных. В частности, даны сведения о таких сравнительно редко встречающихся видах жирных кислот, как конъюгированные полиненасыщенные и гидрокси-кислоты. Проведён обзор физико-химических методов анализа триацилглицеридов. Преимущественное внимание при этом уделено различным видам хроматографических методов и их сочетаний с разными вариантами детектирования; но также приведены сведения об использовании некоторых спектроскопических методов для подобных исследований (ИК, ЯМР, УФ). Рассмотрены имеющиеся подходы к индексации удерживания в хроматографии, в том числе применительно к анализу смесей ТАГ. Даны необходимые сведения о так называемых методе относительного анализа удерживания и инкрементном методе, разработанных ранее руководителем группы, в которой выполнялась работа.

**В главе 2, экспериментальная часть**, приведено описание использованного в работе хроматографического и иного оборудования, даны методики проведения пробоподготовки разных типов сырья для анализа, самих процедур хроматографического анализа и компьютерной обработки данных, а также перечислены все виды сырья, с использованием которых проводилось исследование, и указаны источники их происхождения.

**Глава 3, результаты и их обсуждение**, состоит из трёх разделов, посвящённых, соответственно, 3.1) подходам к использованию инкрементного метода для установления триглицеридного состава масел, 3.2) подходам к использованию метода относительного анализа удерживания для исследования состава смесей ТАГ и 3.3) применению разработанных приёмов для обнаружения фальсификации в нескольких видах пищевых продуктов.

**В разделе 3.1** демонстрируется применимость инкрементного подхода к идентификации отдельных ТАГ в составе масла без необходимости использования стандартов или масс-спектрометрии при наличии предварительно вычисленных значений инкрементов для жирных кислот, входящих в состав данного масла. Суть инкрементного подхода заключается в том, что замене одной жирной кислоты на другую в составе ТАГ в выбранных условиях соответствует одинаковое изменение  $\lg k$  ТАГ вне зависимости от остальных кислот в составе ТАГ. Эта величина  $\Delta(\lg k)$  и называется инкрементом. Соответственно, если по какому-либо растительному объекту с хорошо изученным триглицеридным составом вычислить значения инкрементов для основных пар жирных кислот для выбранных хроматографических условий, то далее по ним становится возможным вычислять параметры удерживания любых других ТАГ, состоящих из данных кислот. При этом величина инкремента не уникальная для каждой пары кислот, а определяется изменением отдельных структурных элементов в составе кислоты, например, добавлению этиленовой группы либо двойной связи. Это даёт возможность вычислять инкременты для многих пар кислот по набору базовых значений, вычисляемых на относительно небольшом наборе данных. Продемонстрирована применимость такого подхода к установлению состава смесей ТАГ на примере подсолнечного, соевого, льняного, рапсового и других масел. Показана зависимость значений инкрементов от параметров хроматографического разделения: тип сорбента, состав подвижной фазы. На примере масла грецкого ореха продемонстрировано сохранение величин инкрементов при использовании стеклинга нескольких одинаковых колонок для достижения лучшего разделения близко элюирующихся ТАГ при сохранении остальных рабочих параметров неизменными. Реализован алгоритм расчёта жирнокислотного состава масла по триглицеридному составу,

установленному с использованием инкрементного подхода. На примере некоторых масел косточек растений семейства *Розоцветные* продемонстрировано хорошее соответствие между результатами анализа жирнокислотного состава масла, полученными указанным способом и классическим способом с использованием газовой хроматографии продукта переэтерификации масла.

Раздел 3.2 посвящён применению метода относительного анализа удерживания для исследования состава смесей ТАГ. Суть этого метода заключается в использовании для описания закономерностей удерживания представителей гомологических рядов не одного параметра, коэффициента удерживания, а двух – коэффициентов удерживания исследуемого вещества и реперного для данной группы соединения. Зависимости логарифмов коэффициентов удерживания целевого вещества и реперного от параметров состава фазы (объёмной доли сильного растворителя) имеют линейный вид:

$$\lg k_i = a \cdot \lg k_{\text{репер}} + b \quad (1)$$

Отличие данного метода от других известных способов линеаризации зависимостей  $\lg k$  от состава подвижной фазы заключается в том, что параметры  $a$  и  $b$  не зависят от состава подвижной фазы, температуры и даже марки сорбента. Если общий механизм удерживания при производстве таких вариаций условий остаётся неизменным, то количественные сдвиги в удерживании не отражаются на типе зависимости, поскольку они одинаково действуют и на исследуемое вещество, и на реперное. Это позволяет по единожды найденным зависимостям идентифицировать известные ТАГ в составах любых масел, при этом их хроматографический анализ может быть проведён при иных температурах, с иным составом подвижной фазы и даже на иных неподвижных фазах того же типа, нежели тот, при котором строились исходные зависимости. Это открывает путь к анализу смесей ТАГ без привязки к точным условиям разделения, а также к анализу данных, полученных ранее на другом оборудовании и т.д. Кроме того, для данного метода характерно общее свойство всех методов линеаризации зависимостей коэффициентов удерживания гомологических рядов: пересечение всех прямых в одной точке, называемой точкой конвергенции. При этом координата точки конвергенции по оси абсцисс определяется набором функциональных групп, входящих в состав жирных кислот, образующих ТАГ данной группы (двойные связи, эпокси- и гидроксигруппы), что открывает возможность определять тип ТАГ по значению его точки конвергенции.

В работе продемонстрирована предсказательная сила метода, позволяющая вычислять значения коэффициентов удерживания искомым ТАГ по коэффициенту удерживания реперного соединения. Проведено сравнение метода относительного анализа удерживания и распространённого метода эквивалентных углеродных чисел (ЭУЧ) для

исследования смесей ТАГ. Убедительно продемонстрировано преимущество первого метода ввиду того, что значения ЭУЧ зависят от состава подвижной фазы, температуры, марки сорбента и пр. и могут использоваться только для той конкретной реализации конкретной хроматографической методики, в рамках которой они были получены. Создана база параметров относительного удерживания для 35 наиболее распространённых природных ТАГ. Разработан и реализован алгоритм моделирования хроматографического профиля масла по заданному  $\lg k$  реперного вещества, мёртвому времени и перечню жирных кислот, входящих в состав данного масла. Работоспособность метода продемонстрирована в решении задач анализа триглицеридного состава животных жиров: гусиного, свиного, говяжьего, бараньего – а также специфических растительных масел, содержащих ТАГ с радикалами уксусной кислоты (масла семян бересклета, древогубцев). В последнем случае совместное использование метода относительного анализа удерживания и инкрементного метода позволило предложить расшифровку структуры ТАГ, содержащих жирные кислоты, данные для которых отсутствовали в исходных наборах данных. Независимый анализ масел семян бересклета и древогубцев, выполненный методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием, подтвердил правоту сделанных выводов. Применение метода относительного анализа удерживания к ряду растительных масел, содержащих конъюгированные жирные кислоты (семена бораго, семена аквилегии, орехи сосны кедровой), позволило установить точный жирнокислотный состав данных объектов и, в частности, произвести однозначное отнесение ТАГ, содержащих позиционные и цис-транс-изомеры линоленовой (октадекатриеновой) кислоты. Для сравнения показано, что газовая хроматография с использованием колонки длиной 30 м не обеспечивает разделения некоторых изомеров метиловых эфиров этой кислоты. Продемонстрирована применимость метода относительного анализа удерживания и инкрементного метода к исследованию растительных масел, содержащих гидроксикислоты (масла косточек граната и диморфотеки). В частности, показано, что ТАГ с такими кислотами имеют свою точку конвергенции на карте разделения, отдельную от точек конвергенции ТАГ различной степени неопределённости.

В качестве реперного соединения в обоих методах предложено использовать трилинолеат. В качестве источника этого реперного соединения, а также ряда других распространённых ТАГ для вычисления инкрементов предложено использовать подсолнечное масло как дешёвый и повсеместно доступный продукт постоянного состава, в котором трилинолеат всегда является мажорным компонентом.

Раздел 3.3 посвящён примерам применения разработанной методологии исследования состава масел и жиров для установления факта фальсификации некоторых пищевых

продуктов. Предложен способ подтверждения наличия добавки оливкового масла в подсолнечном по анализу соотношений площадей пиков ТАГ состава  $L_3$ ,  $L_2O$  и  $O_3$ , где  $L$  – линолевая кислота, а  $O$  – олеиновая. Обнаружен ряд характеристических пиков в хроматограммах масел плодов облепихи, позволяющих подтверждать наличие в исследуемых образцах облепихового масла и определять степень его разбавления подсолнечным маслом. С использованием инкрементного подхода показано, что эти пики соответствуют ТАГ, содержащим пальмитолеиновую кислоту, и произведено их отнесение. Проведён сравнительный анализ большого набора образцов сливочного масла, в рамках которого предложен подход к быстрой идентификации фальсификата по характерному хроматографическому профилю. Отмечены характерные особенности хроматографических профилей сливочного масла и маргаринов, полученных методом гидрирования. Разработана экспрессная методика анализа масла какао, входящего в состав шоколада и кондитерских изделий на его основе. Предложена векторная математическая модель описания ВЭЖХ-профиля масла какао по трём характеристическим пикам:  $P_2O$ ,  $OPC$  и  $OC_2$ , где  $O$  – олеиновая кислота,  $P$  – пальмитиновая,  $C$  – стеариновая. На массиве масел какао разных марок и стран происхождения экспериментально определён возможный разброс значений результирующего углового параметра модели. На большом наборе шоколадных изделий продемонстрирована применимость разработанной векторной модели для быстрого вычленения образцов продукции, для которых существуют основания сомневаться в достоверности утверждения об использовании истинного масла какао в производстве. Показано, что решение данной задачи методом газовой хроматографии затруднительно.

В завершении главы 3 описаны некоторые приёмы компьютерной обработки хроматограмм смесей ТАГ, которые позволили автору устанавливать параметры хроматографических пиков даже в случае неполного разделения близко элюирующихся веществ.

**Выводы** логично обобщают результаты исследования.

**Научная новизна** работы заключается прежде всего в демонстрации применимости инкрементного метода и метода относительного анализа удерживания к расшифровке состава сложных смесей ТАГ. Сочетание этих двух методов позволяет по относительно небольшому количеству заранее измеряемых параметров идентифицировать многие ТАГ, входящие в состав масел, с большой степенью вероятности. При этом не требуется использовать ни сложное масс-спектрометрическое оборудование, ни индивидуальные стандарты редких ТАГ. Нароботан массив данных по инкрементам многих типовых

структурных элементов, а также по параметрам линейных зависимостей в методе относительного анализа удерживания для 35 распространённых ТАГ. Кроме того, решён целый ряд частных задач по установлению триглицеридного состава растительных масел и животных жиров. Некоторые из этих результатов вошли в базу данных SOFA.

**Практическая значимость** работы заключается в том, что предложенный способ анализа смесей ТАГ может быть сравнительно легко внедрён в практику определения фальсификатов пищевых продуктов, в состав которых входят растительные масла и животные жиры. Разработанный подход более информативен, чем традиционные титриметрические и газохроматографические методы, и может быть использован для решения ряда тонких аналитических задач, таких, например, как фальсификация более дорогих растительных масел более дешёвыми со схожим жирнокислотным составом. Используемый метод не требует относительно труднодоступного и сложного в эксплуатации масс-спектрометрического оборудования. При этом в силу вышеописанных особенностей метода относительного анализа удерживания предложенный в данной работе подход гораздо более удобен для потоковой работы в области контроля качества пищевых продуктов, чем простой анализ триглицеридного состава масел методом ОФ-ВЭЖХ. В его рамках возможно проводить вариации состава подвижной фазы для достижения лучшего разделения критических пар, его результаты не зависят от перепадов температур в случае отсутствия термостатирования колонки, он допускает смену хроматографической колонки без перекалибровки и даже до определённой степени устойчив к смене марки сорбента при сохранении его типа. Помимо вышеперечисленного предложенный подход выгодно отличается тем, что не требует приобретения дорогостоящих и иногда труднодоступных стандартов.

**Достоверность** представленных в работе данных не вызывает сомнений, поскольку подкреплена большим количеством прямых иллюстративных материалов (хроматограмм масел), соответствующих современным знаниям о хроматографических профилях этих объектов, а также результатов сопоставления данных, полученных авторским методом, с данными, полученными другими хроматографическими методами (ВЭЖХ-МС, ГХ-МС).

Диссертационная работа прошла необходимую **апробацию**. Результаты опубликованы в 8 статьях в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ для опубликования научных трудов, а также в 9 тезисах конференций. Основные результаты работы докладывались на представительных российских конференциях.

При прочтении диссертации возникает ряд **дискуссионных вопросов и замечаний**:

1. Для разработанного автором метода вопрос точного измерения мёртвого времени является краеугольным, поскольку все вычисляемые в обоих используемых методах параметры критическим образом зависят от этой величины. Автор в разделе 2.6. обозначает, что для определения мёртвого времени использовался «*современный подход, основанный на рекуррентных соотношениях*» и далее очень кратко описывает этот подход как основанный на предположении о постоянстве разницы в логарифмах коэффициентов удерживания для любых двух соседних пиков в гомологическом ряду. Из текста непонятно, во-первых, что именно понимается под «соседними веществами в гомологическом ряду» в случае триглицеридов, и во-вторых, как производится собственно вычисление мёртвого времени. Приводимая автором формула 2.2 (стр. 66) не позволяет напрямую рассчитывать значение  $t_0$ , поскольку в ней присутствуют коэффициенты удерживания, для вычисления которых надо уже знать величину  $t_0$ . Вероятно, эта информация есть в цитируемых автором публикациях, но в тексте диссертации этот вопрос раскрыт недостаточно.

2. Целью работы являлось создание методологии анализа смесей ТАГ, которая может быть использована для установления фактов фальсификации масел. При этом в разделе 3.3, в котором описаны работы по выявлению фальсификатов, инкрементный подход напрямую используется лишь однажды: при отнесении компонентов масла облепихи, содержащих радикал пальмитолеиновой кислоты, что, вообще говоря, не было обязательным для установления самого факта разбавления облепихового масла подсолнечным. Метод же относительного анализа удерживания не используется в данном разделе вовсе. Понятно, что в работе и с олеиновым, и со сливочным маслом, и с шоколадом косвенно были задействованы наработки, возникшие ранее при составлении базы инкрементов. Но всё же для более убедительной демонстрации возможностей разработанного автором подхода хотелось бы видеть непосредственные примеры применения инкрементного метода и метода относительного анализа удерживания для установления, например, факта фальсификации подсолнечного масла соевым, или нечто аналогичное.

3. Автор неоднократно подчёркивает, что устойчивость параметров относительного удерживания к смене марки сорбента является одним из замечательных достоинств метода. Это было продемонстрировано на 5 неподвижных фазах с октадецильными функциональными группами. Насколько вероятно сохранение этого свойства при использовании других типов сорбентов для обращённо-фазовой ВЭЖХ? Например, с другими функциональными группами (фенильными, пентафторфенильными, нитрильными, октильными и пр.) или с теми же октадецильными, но привитыми к силикагелю через полярные линкеры (т.н. колонки mixed mode)?

4. Есть ряд небрежностей в оформлении диссертации. В тексте присутствуют орфографические и пунктуационные ошибки. В некоторых разделах (например, в главе 1.1.3 посвящённой конъюгированным жирным кислотам) недостаёт ссылок на использованные источники. На 3.43 (стр. 138) перепутаны подписи хроматограмм.

Указанные вопросы и замечания не снижают научной ценности представленной работы, а являются скорее дискуссионными.

Диссертация Туртыгина А.В. соответствует паспорту специальности 02.00.02 – аналитическая химия – в части пунктов 4, «методическое обеспечение химического анализа», 13, «анализ пищевых продуктов», и 14, «анализ природных веществ».

Представленная работа отвечает всем требованиям, предъявляемым к диссертации на соискание учёной степени кандидата наук, сформулированным в п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, а её автор, Туртыгин Александр Владимирович, заслуживает присуждения ему учёной степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия.

Официальный оппонент:

Кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории ультразвуковой техники и технологии ФБГУН Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова Российской академии наук

  
\_\_\_\_\_/Покровский Олег Игоревич/

Дата 01.03.2021.

Почтовый адрес: 119991, г. Москва, Ленинский пр-т, 31, ИОНХ РАН.

Тел. +7(926) 173-19-35

E-mail: oleg.pokrovskiy@igic.ras.ru

