

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата химических наук Хрисанфовой Анны Олеговны
на тему: «Разработка способов изучения свойств неподвижных фаз в
условиях гидрофильной хроматографии»
по специальности 1.4.2. Аналитическая химия**

Гидрофильная хроматография (ГИХ) является, пожалуй, наиболее молодым методом ВЭЖХ, но он быстро нашел применение в таких современных областях науки и практики, как протеомика, метаболомика, медицина и т.п. Он может использоваться для разделения белков и пептидов, нуклеозидов, аминокислот, сахаров, углеводов и других малых, полярных и ионизируемых соединений. ГИХ особенно распространён в метаболомных исследованиях, благодаря своей способности удерживать полярные аналиты, которые плохо разделяются традиционной ВЭЖХ. Высокая селективность разделения подобных аналитов в методе гидрофильной хроматографии связана как с комплексным механизмом удерживания аналитов, так и большим выбором неподвижных и подвижных фаз, разработанных для этого метода.

Актуальность диссертационной работы Хрисанфовой А.О. связана с тем, что в силу важности метода гидрофильной хроматографии для решения большого спектра аналитических задач необходимо углубленное понимание процессов в хроматографической системе с целью формирования обоснованных стратегий выбора условий анализа.

Научная новизна работы представлена как разработанными новыми способами и условиями характеристики неподвижных фаз, так и новыми данными о влиянии высокого содержания органического растворителя в элюенте на хроматографические свойства анионообменников на основе силикагеля и полистирол-дивинилбензола и сорбента с привитыми макромолекулами эремомицина. Впервые установлены константы диссоциации соединений с различными кислотно-основными группами в водно-органической среде, необходимые для прогнозирования их поведения в условиях гидрофильной хроматографии.

Практическая значимость работы заключается в том, что благодаря новым методикам удаётся не только существенно сократить время, необходимое как для изучения и сравнения свойств новых неподвижных фаз, так и для определения оптимальных условий разделения реальных многокомпонентных смесей. Успешный выбор условий разделения компонентов напитка наглядно демонстрирует перспективы применения результатов работы Хрисанфовой А.О. на практике.

Достоверность полученных результатов и обоснованность сделанных научных выводов подтверждаются применением автором при исследовании процессов гидрофильной хроматографии современного хроматографического оборудования, использованием реагентов и сорбентов, всесторонне охарактеризованных различными физико-химическими методами, интенсивным применением статистических методов для обобщения полученных результатов. Применение нескольких хемометрических методов позволило Хрисанфовой А.О. провести надёжное сравнение селективности неподвижных фаз.

Диссертационная работа Анны Олеговны состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов (четыре главы), заключения, выводов и списка литературы. Материал работы изложен на 193 страницах машинописного текста, содержит 69 рисунков, 34 таблицы, 8 приложений и список литературы из 157 наименований. По теме диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых научных изданиях. Результаты работы были представлены на всероссийских и международных конференциях.

Следуя традиционной для этого типа научных публикаций схеме, изложение полученных результатов, начинается с обзора литературы, который включает пять разделов. Первый и второй разделы обзора литературы посвящены обсуждению состава и свойств подвижных и неподвижных фаз применяемых в ГИХ. Как справедливо отмечено автором, количество как стационарных, и тем более подвижных фаз, используемых в ГИХ, весьма

велико, и корреляция строения(состава) фазы с результатами разделения обычно проводится на эмпирическом уровне. Этот вопрос более подробно рассмотрен в третьем разделе обзора, посвященном механизмам удерживания и разделения аналитов в ГИХ. В сравнении с традиционными хроматографическими методами, такими как нормально-фазная или обращенно-фазная хроматографии, метод ГИХ характеризуется вовлечением в процесс разделения одновременно нескольких механизмов. Это позволяет проводить тонкую оптимизацию условий разделения, но ставит сложную задачу при описании и сравнении различных ГИХ систем. Разработанные для этого методы описания свойств стационарных фаз для ГИХ, приведены в четвертом разделе обзора литературы. Значительное количество экспериментальных данных, находимых при исследовании стационарных фаз, требует применения хемометрических методов для сравнения селективности стационарных ГИХ фаз и выявления фундаментальных закономерностей в их работе. В то же время, в следующем разделе обзора литературы автор приходит к выводу, что на данный момент в литературе отсутствуют достаточно надёжные модели предсказания удерживания соединений в режиме ГИХ, а широко используемое систематическое варьирование многочисленных параметров аналитического разделения является трудо- и время затратным процессом. В обзоре литературы также отмечено, что варьирование целевого параметра оптимизации, может одновременно вызывать неконтролируемое изменение других, связанных с ним параметров, что может приводить к неполноценным или искажённым трендам удерживания.

Особенности варьирования компонентов подвижной фазы с целью получения информации о поведении аналитов и неподвижных фаз в гидрофильной хроматографии рассмотрены в главе 3. В этой главе представлены рекомендации для сокращения негативного влияния одновременно изменяющихся параметров при варьировании концентрации элюирующего иона, рН и природы буферного раствора. Концентрацию соли в

элюенте предложено сохранять в узком диапазоне 1-7,5 мМ и катион аммония заменить на катион щелочного металла. Это приводит к стабилизации количества воды, удерживаемой стационарной фазой. Рекомендован способ приготовления буферных растворов, заключающийся в добавлении основания к определенному количеству слабой кислоты до заданного рН. Показано влияние природы катиона и аниона буферного раствора на удерживание и селективность разделения аналитов.

В **главе 4** суммированы основные принципы варьирования рН в элюенте в ГИХ, позволяющие получать более корректные закономерности удерживания катионов, анионов, слабых кислот, оснований, цвиттер-ионных и нейтральных соединений на немодифицированном силикагеле. Показано, как состав элюента меняет соотношение ионного обмена, распределения и адсорбции в удерживании тест аналитов. Установлено, что удерживание слабых электролитов на силикагеле определяется степенью диссоциации силанольных групп сорбента, константами диссоциации соединений, их гидрофильностью и способностью образовывать водородные связи. Обнаруженные закономерности позволяют предложить методы оптимизации разделения аналитов на не модифицированном силикагеле. Ключевым параметром является рН подвижной фазы, значительно изменяющий селективность разделения смесей, содержащих диссоциирующие соединения.

В совокупности автором проведено сравнение 33 тестовых веществ на 28 неподвижных стационарных фазах (**глава 5**), для которых рассчитаны логарифмы попарных селективностей (всего 119 значений). Стационарные фазы факторным анализом сгруппированы в 4 кластера, из которых автор особенно выделяет стационарные фазы с полимерным слоем в функциональном слое сорбента. Наличие полимера приводит к появлению дополнительных, вероятно, гидрофобных взаимодействий, между стационарной фазой и аналитом. Тестирование большого количества аналитов и сорбентов, привело к получению большого объема экспериментальных данных, для обработки которых автор предложил использовать

хеометрические методы, представленные в главе 5. Параллельное использование нескольких хеометрических методов для большого числа аналитов, стационарных и подвижных фаз повышает надежность группировки неподвижных фаз по кластерам, но является трудо- и время затратным процессом. Среди исследованных аналитов автор выделил группу азотистых оснований и нуклеозидов, которые по своим характеристикам удерживания формируют разбиение фаз на кластеры близкое к тому, которое наблюдается при использовании полного набора тест-аналитов. В дальнейшем, из этой группы соединений были выбраны три соединения (гуанин, цитидин и дезоксиуридин), которые, при соблюдении предложенных условий анализа, позволяют получить характеристику сорбентов сравнимую с характеристикой сорбентов, получаемой при использовании полного набора аналитов. В то же время, продолжительность анализа при использовании трех выбранных аналитов сокращается до трех часов, в сравнении днями и часами необходимыми для характеристики сорбентов при использовании стандартной процедуры и полного набора аналитов.

Полученные результаты подводит нас к классическому методу оценки свойств сорбентов – применению маркеров (глава 6). Метод маркеров является чисто эмпирическим и при его применении часто наблюдаются расхождения и несоответствия результатов получаемых с различным набором маркеров. Примеры подобных несоответствий автор видит в недостаточной изученности и сложности механизма удерживания аналитов в ГИХ. Основываясь на результатах исследования механизма взаимодействия аналит-сорбент в ГИХ, диссертант предлагает новый набор веществ-маркеров. Так, для оценки анионообменных свойств ГИХ сорбентов, вместо используемого в тесте Танака коэффициента селективности п-толуол-сульфонат/уридин, предложено использовать метансульфонат, для оценки гидрофильности матриц вместо уридина использовать тиомочевину, а метиленовую селективность рассчитывать из факторов удерживания гомологов бутан- и пропансульфонатов. Использование правильных тест-аналитов позволило

автору доказать сорбцию неорганических катионов на положительно заряженных неподвижных фазах и продемонстрировать одновременное разделение 7 неорганических ионов методом ГИХ на приготовленных колонках.

В целом, автором проведен большой объем научных исследований, изучено более 100 ГИХ-систем, сформированных на основе 60 аналитов и 46 стационарных фаз, получены интересные результаты по механизму сорбции аналитов в ГИХ и, предложен подход к оптимизации условий анализа с возможностью одновременного разделения катионов, анионов и нейтральных соединений на стационарных фазах с основными, нейтральными и многофункциональными слоями. К замечаниям по работе можно отнести следующее:

1. В табл. 9 диссертации немодифицированный силикагель обозначен как С1, что может приводить к путанице, поскольку это обозначение обычно используется для силикагельных матриц модифицированных метильными группами.

2. В табл. 4 автореферата в разделе ионный механизм угловой коэффициент линейной зависимости $\lg k'$ от $\lg[M]$ обозначен как s , тогда как строчкой ниже приведен параметр S , который никак не расшифровывается. Это два одинаковых или два разных параметра?

3. В работе исследовано и проведено сравнение многочисленных сорбентов, приготовленных на базе различных силикагельных матриц (Kromasil, YMC-Pack, Диасфер и др.). Эти матрицы имеют различную пористую структуру (поверхность, объем пор и т.д.), которая несомненно будет влиять на свойства получаемых сорбентов. Учитывал ли диссертант эти факторы в своей работе и если да, то почему он не отметил их при описании свойств сорбентов (раздел 4)?

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает всем требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М. В.

Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.4.2. Аналитическая химия (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Хрисанфова Анна Олеговна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.2. Аналитическая химия.

Официальный оппонент:

Глав. науч. сотрудник, доктор хим. наук
лаборатории спектральных исследований
Федерального государственного учреждения науки института
нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук

Курганов Александр Александрович

05.03.2026

Контактные данные:

тел.: ,

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

1.4.3 – Органическая химия

Адрес места работы:

119991, (Россия), г. Москва, Ленинский проспект, д. 28,
Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН
лаборатория спектральных исследований

Подпись сотрудника ИНХС РАН Курганова А.А. удостоверяю.

Ученый секретарь ИНХС РАН

Доцент, докт. хим. наук

Костина Ю.В.

дата