

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Дербиной Анастасии Андреевны «Применение микроэмульсий типа “Вода в масле” в микроэмульсионной электрокинетической хроматографии», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

Оценка актуальности темы диссертационной работы

Микроэмульсионная электрокинетическая хроматография (МЭЭКХ) – новейшая, бурно развивающаяся разновидность капиллярного электрофореза с использованием необычных сред для разделения – микроэмульсий типа “масло в воде” и “вода в масле”. Основная часть проводимых во всем мире исследований выполняется с использованием эмульсий первого типа, а эмульсии “вода в масле” пока практически не используются ввиду неизученности механизмов разделения в таких средах.

Диссертационная работа А.А.Дербиной, в которой в качестве эффективного метода разделения и количественного определения предлагается использовать капиллярный электрофорез в варианте микроэмульсионной электрокинетической хроматографии типа “вода в масле”(В/М МЭЭКХ), несомненно, представляется актуальной.

Новизна исследования и полученных результатов

И в мире, и в России этот новый мощный оригинальный метод анализа пока практически не используется. Основные результаты диссертации, представляющие научную новизну, включают также продемонстрированную автором возможность применения электрокинетической хроматографии для экономичной, скоростной и надежной оценки количественного содержания биологически активных микрокомпонентов пробы в анализируемом объекте.

Значение результатов диссертации для науки и производства

Результаты проведенного А.А.Дербиной исследования имеют ценность и в теоретическом и в практическом отношении. В рамках аналитической химии это – получившее в диссертации развитие одного из самых эффективных современных методов разделения (МЭЭКХ) для анализа объектов сложного состава. В практическом отношении это исследование делает возможным применение современных методов микроанализа для оценки качества продуктов питания, фармацевтики, клинической биохимии, химических средств защиты.

Оптимизированные диссертантом условия разделения и детектирования могут быть рекомендованы для анализа практически любых объектов указанных областей (в том числе ранее недоступных для анализа в силу невозможности проведения пробоподготовки объектов анализа общепринятыми методами. Отдельно стоит отметить, что эти результаты, безусловно, сделают доступными экспресс-анализы жизненно важных лекарств и их метаболитов в клинической биохимии.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа общим объемом 155 страницы состоит из введения, обзора литературы, 4 глав с описанием проведенных экспериментов и полученных результатов, общих выводов и списка литературы. Содержит 17 таблиц и 62 рисунка, список цитируемой литературы включает 162 наименования.

Во **введении** автором обосновывается актуальность, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, формулируются цели и задачи исследования.

Первая глава диссертационной работы содержит достаточно полный обзор литературы по строению и свойствам микроэмульсий, их применению в различных сферах науки и техники.

Во **второй главе** описаны приборы, реактивы, методы пробоподготовки и способы получения микроэмульсий, использованные в работе.

Третья, четвертая, пятая, шестая главы построены в общем ключе и представляют собственно результаты экспериментов, проведенных диссертантом, и их обсуждение.

Так, в **третьей главе** проведена оценка применимости метода МЭЭКХ для определения веществ различной полярности, исследование влияния состава В/М микроэмульсий на скорость миграции, селективность и эффективность разделения модельной смеси неорганических ионов методом МЭЭКХ, проведено сравнение подвижностей этих ионов различными методами КЭФ, включая МЭЭКХ. Значительный объем проведенной автором экспериментальной работы позволил обоснованно выбрать опорные точки эксперимента по типу используемых водных буферов, ПАВ, типа масла, их концентрации и рекомендуемых условий проведения эксперимента для разделения. Показано, что из трех вариантов разделения (КЗЭ, М/В МЭЭКХ, В/М МЭЭКХ) метод М/В МЭЭКХ дает лучшее разделение, чем классический КЗЭ. При этом для КЗЭ И М/В МЭЭКХ подвижность анионов в 10 раз выше, чем для варианта В/М МЭЭКХ, а порядок миграции анионов в М/В МЭЭКХ значительно отличается от такового в варианте В/М МЭЭКХ, что говорит о принципиально разном механизме разделения неорганических анионов этими методами. Сделано предположение о том, что эта разница может быть обусловлена разной сольватацией растворителей, являющихся основой фоновых электролитов (водный раствор или н-бутанол).

В **четвертой главе** проведено сравнение различных 'он-лайн' методов концентрирования с методом В/М МЭЭКХ при практическом использовании указанных подходов для разделения сложных смесей (стекинг с усилением поля, электростекинг, свипинг) как для неорганических ионов, так и органических ионогенов. Простой в исполнении стекинг с усилением поля дал хорошее разделение смеси стандартных неорганических анионов при 10-

кратном концентрировании пробы, что позволило далее определить содержание бромид-иона в морской воде на уровне 81 ± 5 мг/л. Единственным недостатком метода является ограничение по объему вводимой пробы (до 50% объема капилляра). Этому недостатку лишен ввод при помощи электростекинга, позволяющий заполнять капилляр практически на 100% . При этом за счет 1000-кратного концентрирования пробы удалось снизить предел обнаружения тех же компонентов той же пробы до 2 -5 мкг/л при полном разделении компонентов. Метрологически определение анионов методом ВМ МЭЭКХ в сочетании с электростекингом линейно в диапазоне 5 – 500 мкг/л при коэффициенте R^0 0,999, при относительном стандартном отклонении $S_r = 1,2 - 5,8$ % по времени миграции (внутрилабораторно) и $S_r = 3,2 - 9,0$ % по площади пиков.

Аналогично методом В/М МЭЭКХ в сочетании с электростекингом разделены принципиальные подсластители – продукты многотоннажной пищевой химии (сахарин, аспартам, ацесульфам с коэффициентами концентрирования 160, 320, 710, соответственно).

Диссертантом впервые предложен вариант свипинга (концентрирование аналитов псевдостационарной фазой) с использованием В/М обратных микроэмульсий для концентрирования нейтральных веществ гидрофильной природы на основе взаимодействия аналитов с полярными каплями микроэмульсий. Следует отметить, что в данном варианте свипинга использование н-бутанола и ВМ микроэмульсий и в качестве экстрагента для извлечения антибиотика ацикловира из лекарственной формы мази и в качестве среды разделения позволило во-первых, провести извлечение антибиотика из мази с выходом 98%, и 99 % соответственно, во-вторых, сконцентрировать его в 30 раз, в-третьих, определить вещество в концентрации 0,05 – 2 мг/л.

При оценке методик определения содержания иода в продуктах питания методом ВМ МЭЭКХ в сочетании с предварительным электростекингом следует отметить, что по метрологии (предел обнаружения – 7.0 мкг/кг, сходимость -6.5%, внутрилабораторная прецизионность – 8,2%) данный метод

близок к другим физическим и химическим методам анализа, но значительно проще в пробоподготовке и скорости проведения анализа.

В пятой главе показаны результаты применения микроэмульсий в качестве экстрагентов при пробоподготовке лекарственных образцов и продуктов питания. Основной особенностью и преимуществом применения ВМ микроэмульсий для анализа сложных по составу образцов, какими являются продукты питания и лекарственные композиции, является простота подготовки образцов. Это наглядно показано на примерах определения консервантов (сорбиновой и бензойной кислот) в майонезе на предмет соответствия нормам Сан – Пин. Поскольку обратные эмульсии содержат в своем составе как полярную, так и неполярную составляющую, то они идеально подходят для анализа таких сложных по составу матриц, как майонез, содержащий до 67% жира. Особенно наглядно это показано на примере определения Д-пантенола из образца мази (содержание целевого гидрофильного Д-пантенола - 5%, остальное – наполнители (гидрофобные панолин и парафин). степень извлечения Д-пантенола составила 100% +2%.

В шестой главе рассмотрены результаты использования М/В и В/М микроэмульсий в качестве реакционных сред при химической модификации антибиотиков исследования в сочетании с разработанным автором методом on-line концентрирования. На примере модификации антибиотика ампициллина (АМП) 2,3-нафталиндиальдегидом (НДА) в пробирке в результате оптимизации процесса химической модификации показана возможность проведения реакции при комнатной температуре в 3800 раз быстрее по сравнению с проведением той же реакции в классических условиях (в пробирке, в среде ацетонитрил-вода, 25⁰С). Этот эффект автор объясняет, во-первых, уникальным строением микроэмульсий, капли органической фазы которой выступают в роли микрореакторов, во-вторых, близкими значениями коэффициентов гидрофобности $\log P$, что позволяет АМП и НДА концентрироваться в каплях микроэмульсии и быстро и эффективно реагировать между собой даже при комнатной температуре.

Последующая многопараметрическая оптимизация процесса дериватизации обоих антибиотиков (АМП и АМО) в капилляре с использованием микроэмульсии М/В (порядок ввода реактантов, время смешения реагирующих зон, время протекания реакции, концентрации и длины зоны раствора антибиотиков, проходящих через зону модифицирующего реагента и

обгоняющих его) позволило добиться 100% модификации обоих антибиотиков за 10 минут при 40⁰ С.

Затем диссертант разработал вариант улучшения чувствительности определения антибиотиков сочетанием внутрикапиллярного концентрирования исходных антибиотиков с их последующей внутрикапиллярной дериватизацией. Концентрирование зон проводилось по схеме стекинга с большим объемом пробы и обращением полярности. Последующая переполюсовка напряжения позволила добиться полного разделения всех компонентов смеси (исходный реагент, и два модифицированных антибиотика). Такое сочетание методов он-лайн концентрирования с он-лайн дериватизацией дало возможность повысить чувствительность определения обоих антибиотиков более чем в 300 раз по сравнению со стандартным КЗЭ. При этом диапазон линейности градуировочной кривой составил 50 – 1000 мкг/л, при относительном стандартном отклонении 6,7% – 8,4 % .

Следующим (и закономерным) шагом в изучении возможностей использования микроэмульсий явилась демонстрация концентрирования растворов веществ в капилляре с последующей дериватизацией в том же капилляре методом В/М МЭЭКХ. Поскольку обратные эмульсии (ВМ) обладают более низкой электропроводностью, чем прямые (М/В), то это позволяет применить один из наиболее эффективных способов “он лайн” концентрирования – электростекинг (с последующей внутрикапиллярной дериватизацией). Совместное использование этих методик дало возможность повысить чувствительность определения антибиотиков в 1500 раз (до 4 мкг/л) по сравнению со стандартным КЗЭ.

Мне представляется, что удачная разработка совместного использования низкопроводящих электролитов для “он лайн” концентрирования минорных аналитов методом электростекинга с последующим использованием капель микроэмульсий в качестве микрореакторов является настоящей изюминкой данной работы и имеет хорошие перспективы развития. Омысленный учет факторов гидрофобности изучаемых веществ и совместимость их

гидрофобности со свойствами капель микроэмульсий (как МВ, так и ВМ) привел автора к идее чрезвычайно эффективных “скорострельных” микрореакторов. С чем автора можно и поздравить. Тем более, что идея реализована на принципиально важных объектах – антибиотиках.

Выводы диссертационного исследования в полной мере обоснованы, работа выполнена на хорошем научном уровне, написана последовательно и логично.

Однако в работе есть положения, требующие дополнительного разъяснения.

1. Автором убедительно продемонстрированы аналитические достоинства КЭ в варианте МЭЭКХ.. Однако эти возможности были реализовано только в варианте зарубежных приборов американской фирмы «Agilent». Каковы при этом возможности приборов для КЭ отечественного производства, например, производства фирмы «Люмекс» или Института аналитического приборостроения РАН?

2. Иод в различных продуктах питания определен только в виде свободного иодид – иона, хотя иод присутствует в органических соединениях и в виде химически связанного иода (например, в виде иодированных остатков аминокислот белков). Насколько правомерен был выбор только иодид иона для оценки его содержания в продуктах питания?

3. В описании параметров эксперимента указано значение рН растворов буферов. Насколько это понятие применимо к микроэмульсиям типа В/М, и, тем более, М/В?

4. На стр 116 текста диссертации степень протекания реакции (рН 9.3, 60*С , 1 час определяли косвенно (по убыли концентрации дериватизирующего агента).а не напрямую (по росту пика продукта). Почему был выбран такой способ оценки полноты протекания реакции?

5. Хорошо, что автором разработан высокочувствительный метод определения искусственных подсластителей в пищевых продуктах, однако стоит отметить, что принятые в Европе и США нормы потребления аспартама (аспартил-фенилаланил-о-метиловый эфир) , при метаболизме которого образуется токсичный метанол, составляют 40 и 50 мг/кг массы тела, что для человека массой 70 кг означает 2800 –3500 мг аспартама /день (MeOH/аспартам =32/294) , т.е. около 300 мг метанола/день. Из пектина 1 кг

съеденных яблок в организме человека образуется 1400 мг метанола. Так что страхи преувеличены, но это не умаляет достоинств ни методики определения подсластителей, ни диссертанта.

Заключение о соответствии работы требованиям ВАК и ее общая оценка

Поставленные в диссертации задачи решены автором в достаточном объеме и на современном экспериментальном и теоретическом уровне, диссертационная работа выполнена на высоком научном уровне. Основные положения, вынесенные автором на защиту, представляются надежно и убедительно доказанными. Основные материалы диссертационной работы опубликованы в 10 публикациях (4 статьи и 6 тезисов докладов). Структура и объем диссертационной работы, выводы и рекомендации, научные статьи, а также автореферат полностью отражают и подтверждают научные положения, рассматриваемые в диссертации. Следует подчеркнуть, что указанные выше замечания не затрагивают основных результатов и выводов автора и нисколько не влияют на общую высокую оценку диссертационной работы А.А.Дербиной . На основании всего вышеизложенного считаю, что диссертационная работа «Применение микроэмульсий типа “Вода в масле” в микроэмульсионной электрокинетической хроматографии»,» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком научном уровне и в полной мере соответствует критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, По актуальности решаемой задачи, научной новизне полученных результатов, практической значимости и объему выполненных исследований диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 года № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук и заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 “Аналитическая химия”.

Руководитель группы аналитической химии белка ФГБУН ИБХ РАН

кандидат химических наук, ст.н. сотр.,

Назимов Игорь Владимирович

19.01.2016

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки институт
биоорганической химии им.М.М.Шемякина и..Ю.А.Овчинникова Российской
академии наук (ИБХ РАН)

Москва, 117997, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Тел.: +7 (495) 330-75-92

Эл. почта: nazimov@ibch.ru

ПОДПИСЬ ЗАВЕРЯЮ
УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ИБХ РАН
д.ф.н. В.А.Олейников



В диссертационный совет Д 501.001.88

при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении
высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»

от Назимова Игоря Владимировича

Настоящим даю согласие выступить официальным оппонентом на защите диссертационной работы Дербиной Анастасии Андреевны на тему «Применение микроэмульсий типа “вода в масле в микроэмульсионной электрокинетической хроматографии», представленной на соискание учёной степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 - Аналитическая химия

О себе сообщаю следующие сведения.

Назимов Игорь Владимирович

1. Кандидат химических наук (02.00.10)-биоорганическая химия), старший научный сотрудник
2. Место работы: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки институт биоорганической химии им.М.М.Шемякина и.Ю.А.Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)
3. Адрес места работы:ИБХ РАН, 117997, ГСП-7, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10. . Телефон: 7(495) 330 75 92; эл. почта: nazimov@ibch.ru
4. Основные работы по профилю оппонируемой диссертации:

КАПИЛЛЯРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НЕМОДИФИЦИРОВАННЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ АМИНОКИСЛОТ

Мосина А.Г.,Мельников И.О., Назимов И.В., Глубоков Ю.М.
Журнал аналитической химии. 2009. Т. 64. № 6. С. 655-659

Определение содержания гомоцистеина и других низкомолекулярных аминотиолов в плазме крови :Мельников, И.О. ; Назимов, И.В.; Стукачева, Е.А. ; Глубоков, Ю.М.
Журнал аналитической химии.,61, Выпуск:11,1185-1191, (2006)

AN EFFECTIVE ANALYTICAL PROCEDURE FOR GRADUAL CONTROL OF RECOMBINANT HUMAN INSULIN PRODUCTION

SERGEEV N.V., NAZIMOV I.V., MIROSHNIKOV A.I.
AMERICAN BIOTECHNOLOGY LABORATORY 19, 52-56, (2001)

DETERMINATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE LOW-MOLECULAR-MASS THIOLS IN HUMAN BLOOD - II. HIGH-PERFORMANCE CAPILLARY ELECTROPHORESIS WITH PHOTOMETRIC DETECTION

Ivanov A.R., Nazimov I.V., Baratova L.A.
Journal of Chromatography A. 2000. Т. 895. № 1-2. С. 167-171.

DIRECT DETERMINATION OF AMINO ACIDS AND CARBOHYDRATES BY HIGH-PERFORMANCE CAPILLARY ELECTROPHORESIS WITH REFRACTOMETRIC DETECTION

Ivanov A.R., Nazimov I.V., Lobazov A.P., Popkovich G.B.
Journal of Chromatography A. 2000. Т. 894. № 1-2. С. 253-257.

IDENTIFICATION OF UNUSUAL (MODIFIED AND NON-ENCODED) AMINO ACID RESIDUES
IN PEPTIDES BY COMBINATIONS OF HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY
AND HIGH-PERFORMANCE CAPILLARY ELECTROPHORESIS WITH MATRIX-ASSISTED
LASER DESORPTION IONIZATION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY

Ivanov A.R., Nazimov I.V.

Journal of Chromatography A. 2000. Т. 870. № 1-2. С. 255-269.

СПОСОБ РАЗДЕЛЕНИЯ СВОБОДНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ АМИНОКИСЛОТ

Мельников И.О., Глубоков Ю.М., Мосина А.Г., Назимов И.В.

патент на изобретение RUS 2346931 29.06.2007

Кандидат химических наук (02.00.10)

И.В.Назимов

