

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

о кандидатской диссертации Климовой Яны Анатольевны  
*"Закономерности энантиоселективного удерживания дипептидов на адсорбентах с привитыми амфолитными хиральными селекторами на основе гликопептидных антибиотиков и производных хининовых алкалоидов"*,  
представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук  
по специальности 1.4.4 – Физическая химия

Одним из самых сложных и активно развивающихся направлений современной хроматографии является хиральная ВЭЖХ. Молекулярный дизайн хиральных селекторов практически не имеет синтетических ограничений, что позволило в последние десятилетия получить новые поколения хиральных неподвижных фаз (ХНФ) для различных вариантов хроматографии. Вместе с тем, глубокое физико-химическое исследование процессов хирального распознавания с участием таких сорбентов практически не проводится, большинство примеров разделения базируется на произвольном выборе ХНФ без объяснения молекулярного механизма удерживания и разделения. Важным достоинством физико-химического подхода к оценке хиральной селективности является создание строгих теоретических моделей удерживания энантиомеров, позволяющих не только объяснить наблюдаемые закономерности и различия в их сорбции, но и направленно модифицировать хроматографические системы с целью увеличения эффективности и селективности разделения. Решению этих и связанных с ними **актуальных** вопросов на примере изучения методом ВЭЖХ адсорбции дипептидов на гликопептидных антибиотиках и производных хининовых алкалоидов и посвящено интересное диссертационное исследование Я.А. Климовой.

Диссертация Я.А. Климовой имеет традиционную структуру и включает введение, обзор литературы (глава 1), описание материалов и методики эксперимента (глава 2), обсуждение результатов (главы 3-5), выводы, а также список использованной литературы (305 источников). Диссертация изложена на 152 стр., содержит 36 рисунков и 23 таблицы. Рукопись диссертационной работы **аккуратно оформлена**, пронумерована, написана с современной применением номенклатуры в области физической химии межмолекулярных взаимодействий, адсорбции и хроматографии. Включает четкие и лаконичные формулировки основных полученных результатов и выводов; таблицы, графики и диаграммы содержат исчерпывающую информацию по полученным новым данным.

В обзоре литературы (*глава 1*) подробно обсуждаются роль и значение хиральных веществ в важнейших биохимических и физиологических процессах, различия в свойствах отдельных энантиомеров и огромной важности получения гоохиральных соединений и препаратов, применяемых в фармацевтической практике и различных областях протеомики. Отмечается, что непревзойдённым инструментом для аналитического и препаративного разделения энантиомеров в настоящее время являются различные варианты хиральной хроматографии. Подробно и обстоятельно обсуждаются механизмы хирального распознавания в условиях хроматографического разделения, при этом выполнен не только ретроспективный анализ состояния проблемы, но, что весьма ценно, обсуждаются теоретические исследования, выполненные за последнее десятилетие. Автор диссертации весьма подробно и критически останавливается на анализе известных моделей удерживания в жидкостной хроматографии, отмечая достоинства и ограничения каждой из моделей. При этом речь идёт не о банальной констатации известных фактов, а обсуждаются термодинамические аспекты межмолекулярных взаимодействий в рамках того или иного

механизма удерживания. Примечательно, что изложение теоретических положений сопряжено с яркими примерами из практики разделения хиральных веществ, относящихся к разным классам органических соединений. Нужно отметить, что в последнее время несколько снижен интерес специалистов в области хроматографии к изучению динамики сорбции, что во многом объясняется достижениями в техническом оформлении разных вариантов хроматографии (капиллярные и поликапиллярные колонки в ГХ, насосы высокого давления для колонок с ультрадисперсными сорбентами в ВЭЖХ и др.). Однако большинство вопросов динамики сорбции, в значительной степени определяющих эффективность хроматографического разделения остаются открытыми и малоизученными. Приятно отметить, что этой важной проблеме в диссертационной работе Я.А. Климовой уделено особое место. Наряду с обсуждением общих закономерностей динамики адсорбции, обсуждаются различные модели элюирования (смешанно-диффузионные, транспортно-дисперсионные, равновесно-дисперсионные и особенности динамики адсорбции в хиральной хроматографии). Особый интерес вызывает попытка объяснения выпуклых вверх кривых ван Деемтера, надежного объяснения которым пока не найдено. Обзор литературы завершает анализ наиболее часто применяемых ХНФ на основе полисахаридов, белков, циклодекстринов, краун-эфиров, *фаз Пиркла*, лигандообменных адсорбентов и, безусловно, активно изучаемых пермскими коллегами, макроциклических антибиотиков. Не будет преувеличением сказать, что отечественной хроматографической школе по целому ряду позиций принадлежит приоритет в изучении адсорбционно-хроматографических свойств антибиотиковых ХНФ, что хорошо продемонстрировала автор диссертации на многочисленных примерах в своём обзоре. Сделан вывод о том, что в литературе представлен обширный материал о хроматографическом поведении и механизмах удерживания выбранных в качестве объектов исследования дипептидов на антибиотиковых ХНФ, однако сведений о динамике адсорбции дипептидов на указанной группе сорбентов не обнаружено, данные по селективности разделения немногочисленны, а влияние природы элюента на удерживание на таких фазах практически не изучено. Таким образом, анализ литературных данных однозначно демонстрирует **актуальность и перспективность** сформулированной темы исследования, свидетельствует о её **научной важности и новизне**. Представленный литературный обзор можно рекомендовать для опубликования в виде отдельного сообщения как в виде обзора в профильном научном издании, так и в виде учебно-справочного пособия для специалистов в области хирального хроматографического разделения.

В диссертационной работе подробно изложены материалы и методики выполненного исследования (*глава 2*). Подробно перечислены примененные автором исходные реактивы, материалы и их квалификация по степени чистоты, структура исследованных хиральных сорбатов. Замечу, что большинство изученных дипептидов представляли собой не рацемические смеси, а гомохиральные образцы, что не позволяет усомниться в правильности идентификации энантиомеров на хроматограммах. Детально и грамотно описаны оборудование и методики ВЭЖХ-эксперимента, а также способы обработки первичного хроматографического сигнала. Подробно и методически верно выполнено описание алгоритмов расчёта избыточной гиббсовской адсорбции, толщины адсорбционного слоя, коэффициентов активности сорбатов в адсорбционной и жидких фазах. В экспериментальной части работы дана исчерпывающая информация по измерению коэффициентов диффузии, измерению кривых ван Деемтера и параметров массопереноса. Особо отмечу тот факт, что подавляющая часть экспериментальных данных в диссертации **получена впервые**.

*Глава 3* диссертации посвящена анализу данных по адсорбции компонентов бинарных водно-органических растворителей на ХНФ с привитыми макроциклическими антибиотиками. Сразу оговорюсь, что в работах большинства исследователей в области ВЭЖХ этот важнейший для понимания механизмов удерживания и разделения аспект практически не рассматривается и зачастую сводится к

констатации общеизвестных закономерностей. В этой связи работа Я.А. Климовой выгодно отличается от других аналогичных работ. В подтверждение своих слов приведу ряд интересных эффектов и закономерностей, обнаруженных диссертантом на данном этапе своей работы. Так, чрезвычайно интересными являются данные по точкам адсорбционного азеотропа для изученных систем ХНФ – водно/органический элюент. Анализ величин коэффициентов активности вблизи составов, соответствующих этим точкам для сильно ассоциированных элюентов, показывает резкое изменение характера межмолекулярных взаимодействий вода/модификатор, что может служить дополнительным фактором, влияющим на селективность хроматографического разделения. Описанный эффект, без сомнения, следует считать одним из **фундаментальных результатов** работы Я.А. Климовой. Совокупность данных полученных в главе 3 позволила автору диссертации сделать вывод о том, что исследованные ХНФ с привитыми антибиотическими и хининалкалоидными селекторами следует отнести к гидрофильным материалам. Данные, полученные в главе 3, однозначно указывают на то, что для всех рассмотренных ХНФ на их поверхности формируется мономолекулярный слой при контакте с  $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{OH}$  и полимолекулярный слой в случае  $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN}$ , что особенно важно для понимания механизма удерживания и разделения.

В **главе 4** диссертации подробно описаны и проанализированы результаты хирального разделения дипептидов на ХНФ на основе производных хининовых алкалоидов. Выполнен детальный анализ зависимости величин факторов (в диссертации *коэффициентов*) разделения пар энантиомеров от количественного и качественного состава элюента. Приведены результаты применения расширенной *модели удерживания Тсуи* для удовлетворительного описания экспериментальных данных с подробным анализом сольватационных и других межмолекулярных взаимодействий дипептидов с компонентами ВЭЖХ-системы. Продемонстрировано влияние структуры хирального селектора и разделяемых стереоизомеров дипептидов. Показана связь между гидрофобно/гидрофильным балансом аналитов с характеристиками их удерживания из среды различных по составу элюентов. Установлено, что наличие солевых добавок в состав ПФ приводит к значительному снижению удерживания дипептидов и уменьшению показателей селективности вследствие экранирования заряженных групп селектора ионами соли. Важно подчеркнуть, что **успешно решена основная задача** хиральной хроматографии – определены оптимальные условия и достигнуто полное разделение изученных энантиомеров дипептидов.

Интересные данные для развития теории динамики сорбционных процессов получены в **главе 5**. По мнению рецензента результаты этой главы диссертации могут быть предметом отдельного глубокого исследования. Вопросы кинетики массопереноса, нелинейной кинетики адсорбции, вихревой диффузии и т.д. рассмотрены подробно и тщательно, что позволило сделать важный вывод о том, что дипептидные адсорбаты, характеризующиеся медленной кинетикой адсорбции на ХНФ, демонстрируют более выраженное искажение классических зависимостей ван Деемтера и более высокие коэффициенты аксиальной дисперсии, вызывающей размывание зоны вещества в хроматографической колонке.

При ознакомлении с материалами диссертации и авторефератом можно сделать однозначный вывод о том, что Я.А. Климова является **сложившимся специалистом** в области хроматографических методов исследования, адсорбции, химии оптически активных соединений и теории межмолекулярных взаимодействий. Автор диссертации профессионально владеет техникой хроматографических измерений, глубоко понимает методологию физико-химических исследований, верно интерпретирует получаемые физико-химические величины, выдвигает новые идеи и гипотезы. Особо отмечу, что большая часть результатов, полученных в работе Я.А. Климовой, имеет важное значение для развития физико-химических аспектов хроматографии, а её работа служит ещё одним ярким подтверждением

существования самостоятельной сильной пермской хроматографической школы в области хиральной ВЭЖХ, возглавляемой Л.Д. Асниным.

**Достоверность** полученных в диссертации Я.А. Климовой результатов и выводов не вызывает сомнений, поскольку они согласуются с данными литературы, получены на современном оборудовании, характеризуются внутренней непротиворечивостью результатов эксперимента с известными теоретическими положениями, выраженным физическим смыслом использованных теоретических моделей и полученных закономерностей. Гипотеза об основном вкладе алкалоидного фрагмента в хиральное распознавание нашла экспериментальное подтверждение, при этом установлено, что роль неалкалоидного фрагмента ХНФ вторична и сведена к влиянию на количественные характеристики удерживания и .

Работа прошла очень хорошую **апробацию**. Основные материалы диссертации изложены в 15 публикациях: из них 10 статей в профильных изданиях, включая 3 статьи в ведущем международном журнале по хроматографии *Journal of Chromatography*, статья в одном из самых престижных журналов Chirality и статья в популярном у хроматографистов журнале Journal of Chromatography Open. Также имеется статья и в ведущем отечественном физико-химическом журнале – *Журнале физической химии*. В большинстве публикаций фамилия диссертанта в списке соавторов стоит на первом месте, что дополнительно указывает на большой **личный вклад** соискателя. Физико-химическая направленность изданий позволяет сделать вывод о том, что широкий круг специалистов в области физико-химических основ хиральной хроматографии имели возможность ознакомиться с новыми и очень интересными результатами исследований Я.А. Климовой. Автор диссертации неоднократно докладывала о результатах диссертационной работы на конференциях различного уровня. Кроме того, диссертационное исследование выполнялось при финансовой поддержке грантов РФФИ и РНФ, что также свидетельствует об актуальности работы, дополнительной экспертизе и апробации результатов диссертации на стадии написания отчётов по гранту. Автореферат и публикации **полностью отражают** содержание диссертационной работы, соответствующей паспорту научной специальности 1.4.4. – физическая химия (п. 2-4, 5, 8, 12).

По диссертационной работе Я.А. Климовой имеется ряд **отдельных замечаний** и связанных с ними **вопросов и уточнений**.

1. Сделанные по результатам исследования адсорбции дипептидов на рассмотренных в диссертации ХНФ выводы о механизме удерживания не совсем полные, потому что не содержат количественные данные по энтальпиям и энтропиям адсорбции. Кроме того, некоторые утверждения вызывают вопросы и являются спорными: например, фраза о том, что "накопление воды в приповерхностном слое приводит к увеличению упорядоченности, так как это *выгодно за счёт уменьшения энтропии*" (стр.8 автореф.). Общеизвестно, что уменьшение энтропии, напротив, энергетически не выгодно.

2. Безусловный интерес представляют полученные данные по **точкам адсорбционного азеотропа** (рис.3.1, 79 стр. диссер.). Видно, что для исследованных сорбентов концентрационная координата этих точек независимо от природы органического модификатора находится в диапазоне 0.6-0.8 мольных долей воды. Как это можно объяснить? Как будет изменяться положение этих точек ( $\Gamma^n=0$ ) с ростом температуры? Может ли координата **точки адсорбционного азеотропа** служить дополнительным критерием полярности поверхности неподвижной фазы в ВЭЖХ в системе с заданным водно-органическим элюентом? Имеются ли в литературе данные по точкам адсорбционного азеотропа для традиционных и широко распространённых в практике ВЭЖХ неподвижных фаз (C18, C8, *Hypercarb* и др.)?

3. Использованный в работе метод определения толщины адсорбционного слоя ( $\tau$ ) в случае водно-метанольного элюента оказался неприменим, поскольку его значения меньше реальных

размеров молекул  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{CH}_3\text{OH}$ . Из данных табл.3.2 (стр.80 диссер.) следует, что величина  $\tau$  не зависит от соотношения органический модификатор/вода, т.е. при любом соотношении  $\text{H}_2\text{O}$ - $\text{CH}_3\text{OH}$ , например, для ХНФ *Chirobiotic R* значение  $\tau=0.12$ ? Насколько это достоверно и как будет зависеть величина  $\tau$  от температуры?

4. Объём диссертации позволяет изобразить зависимости  $\gamma^a=f(x^a_1)$  для систем с разными ХНФ не на одном, а на отдельных графиках. Из рис.3.4 (82 стр. диссер.) не совсем понятно, какая кривая соответствует воде, а какая органическому модификатору? О чём свидетельствуют величины  $\gamma^a \gg 1$  для системы  $\text{H}_2\text{O}$ - $\text{CH}_3\text{CN}$ ? Из графиков 3.4(а,б) видно, что предельные значения  $\gamma^a$  для воды и метанола близки (интервал 0.2-0.5), а для воды и ацетонитрила они сильно отличаются. О чём это может свидетельствовать? На рис. 3.4 (а,б) также наблюдается резкое изменение свойств поверхностного раствора вблизи точки адсорбционного азеотропа. Оказывает ли это обстоятельство влияние на вид зависимостей фактора удерживания ( $k$ ) от состава  $\text{H}_2\text{O}$ - $\text{CH}_3\text{OH}$  ПФ? Какова в целом погрешность определения величин  $\gamma^a$ ?

5. Для аппроксимации данных по зависимости величин  $k$  от состава ПФ соискатель использовал уравнение расширенной модели Тсуи (уравнение 1.16) (стр.18 диссер.). Это уравнение имеет шесть подгоночных параметров. При таком числе подгоночных параметров значительным может быть эффект их взаимной корреляции. Поскольку в табл. 4.4 и 4.5 (стр.90-91) не приведены доверительные интервалы коэффициентов модели, не ясно насколько надёжны их числовые оценки.

6. Измерение кривых ван Деемтера выполнялось в широком диапазоне расходов ПФ, от 0.1 до 2 мл/мин. Таким образом, в широких пределах изменялось давление в колонке. Известно, что константа адсорбционного равновесия может зависеть от давления. Зависит от давления и коэффициент нормальной диффузии в жидкой фазе. Исследовалось ли влияние этого фактора на динамику адсорбции и на численные значения динамических характеристик (главе 5, диссер.)?

7. Поясните размерность константы адсорбционного равновесия ( $\text{см}^3/\text{см}^3$ )? Является ли эта константа термодинамической и если да, то каково выбранное для неё стандартное состояние?

8. Можно ли описать удерживание рассмотренных полярных соединений (дипептиды реализуют множество разных ионных форм) на изученных гидрофильных ХНФ в рамках модели гидрофильной (НПИС) хроматографии, при которой анализируемые вещества элюируются в порядке возрастания их полярности? Наблюдаются ли подобные зависимости в исследованных хроматографических системах?

Важно подчеркнуть, что сделанные замечания и возникшие вопросы не снижают общей, безусловно, **положительной оценки** диссертационного исследования Я.А. Климовой, а по ряду позиций могут рассматриваться как элементы научной дискуссии и большого интереса к работе.

Результаты работы **могут быть использованы** в проведении научных исследований в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова (г. Москва), Санкт-Петербургском государственном университете (г. Санкт-Петербург), Воронежском государственном университете (г. Воронеж), Самарском государственном техническом университете (г. Самара), Самарском национальном исследовательском университете им. С.П. Королёва, Институте физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН (г. Москва), Институте геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН (г. Москва) и в других научно-образовательных центрах страны, а также в учебных курсах по физико-химическим основам хроматографии, теории межмолекулярных взаимодействий, адсорбции и физической химии поверхностных явлений, стереохимии, супрамолекулярной химии. Замечу, что предложенные новые эффективные методики разделения энантиомеров исследованных дипептидов, без сомнения, будут полезны и востребованы специалистами в области хирального разделения, очистки фармацевтических препаратов и получения гомохиральных образцов различных лекарственных препаратов.

Диссертационная работа Я.А. Климовой "Закономерности энантиоселективного удерживания дипептидов на адсорбентах с привитыми амфолитными хиральными селекторами на основе гликопептидных антибиотиков и производных хинолиновых алкалоидов" полностью соответствует требованиям пунктов 9-11, 13, 14 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года (в действующей редакции), как научная квалификационная работа, в которой содержится решение важных задач, имеющих существенное значение для развития теории сорбционно-хроматографических процессов с участием новых хиральных неподвижных фаз, дальнейшего развития термодинамического подхода к описанию межмолекулярных взаимодействий энантиомеров с хиральными селекторами в условиях ВЭЖХ, применения методов хроматографии в решении задач протеомики, понимания влияния природы и состава элюента на общую селективность разделения хиральных аналитов в ВЭЖХ, а также совершенствования методов численного моделирования сложных физико-химических процессов на границе раздела фаз с участием дипептидов и других биологически важных соединений.

Резюмируя всё вышеизложенное, можно заключить, что соискатель учёной степени Яна Анатольевна Климова, безусловно, **заслуживает присуждения** ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.4 – Физическая химия.

Официальный оппонент:  
доктор химических наук  
(специальности 02.00.04 – физическая химия и  
02.00.02 – аналитическая химия), член НСАХ РАН,  
профессор кафедры аналитической и физической химии  
химико-технологического факультета Самарского  
государственного технического университета  
(443100, г. Самара, ул. Молодогвардейская, 244  
Самарский государственный технический университет,  
химико-технологический факультет, кафедра аналитической  
и физической химии  
e-mail: snyashkin@mail.ru,  
тел.: (846) 3222251

Яшкин Сергей Николаевич  
15 апреля 2025 года

Подпись д.х.н., профессора Яшкина С.Н. заверяю:  
Ученый секретарь СамГТУ, д.т.н.



Ю.А. Малиновская