

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу **Смірної Оксани Ярославівни** «Розділення та визначення похідних 1,4-нафтохінону методами рідинної хроматографії», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.02 – аналітична хімія.

Дисертаційна робота **присвячена:**

- дослідженню хроматографічних характеристик (параметрів) в умовах обернено-фазової вискоєфективної рідинної хроматографії (ОФ ВЕРХ) і нормально-фазової тонкошарової хроматографії (НФ ТШХ) ряду біологічно активних 2,3-заміщених сполук 1,4-нафтохінону та встановленню взаємозв'язку між параметрами їх хроматографічного утримування та будовою цих речовин з їх використанням для розробки методик виділення, розділення, оцінювання чистоти, оптимізації та прогнозування умов хроматографічного визначення.

Дисертаційна робота є **актуальною** у зв'язку з важливістю вирішення наукових задач по вивченню і порівнянню хроматографічних характеристик утримування значного числа представників 1,4-нафтохінонів (29 сполук) та встановлення закономірностей, залежно від наявності замісників, для оптимізації, прогнозування умов аналізу та обробки результатів визначення для вирішення аналітичних завдань ідентифікації і кількісного визначення аналітів, а також для виявлення взаємозв'язків між хроматографічними характеристиками та біологічною активністю наведених сполук.

Мета і задачі дослідження полягають у дослідженні хроматографічної поведінки біологічно активних речовин 2,3-заміщених сполук 1,4-нафтохінону в умовах ОФ ВЕРХ і НФ ТШХ та встановлення взаємозв'язку між параметрами їх хроматографічного утримування та будовою цих речовин, що необхідно для розробки методик виділення, розділення, оцінювання чистоти, оптимізації та прогнозування умов хроматографічного визначення.

Для досягнення поставленої мети були **успішно вирішені** наступні наукові та практичні завдання, які чітко впливають з огляду сучасної літератури:

- вивчено вплив складу рухомої фази (РФ) на утримування похідних 1,4-нафтохінону (заміщені фрагменти – аніліни, амінокислоти, морфолін, піперидин, піперазин та інші структури) в умовах ОФ ВЕРХ;
- випробувано та оцінено можливості комп'ютерного моделювання для утримування похідних 1,4-нафтохінону в умовах ОФ ВЕРХ;
- досліджено вплив рН для РФ на утримування похідних 1,4-нафтохінону в умовах ОФ ВЕРХ;
- вивчено вплив складу РФ на утримування та розділення похідних 1,4-нафтохінону в умовах НФ ТШХ;
- розроблено методики кількісного визначення похідних 1,4-нафтохінону методами ОФ ВЕРХ та НФ ТШХ на основі оптимізованого складу РФ.

Наукова новизна отриманих результатів роботи полягає у розвитку наукового напрямку, який пов'язаний з використанням методів ОФ ВЕРХ та НФ ТШХ для систематичного дослідження параметрів утримування значного числа аналітів – 2,3-заміщених сполук 1,4-нафтохінону з РФ різного складу та у якому було вирішено наступні наукові задачі, а саме:

- оптимізовано склад РФ для розділення нових синтетичних похідних 1,4-нафтохінону та проведено оцінювання їх ступеня чистоти методом ОФ ВЕРХ в аналітичному варіанті;
- показано вплив кислотності РФ на утримування амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону методом ОФ ВЕРХ;

- проаналізовано можливості комп'ютерного моделювання утримування амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону в умовах ОФ ВЕРХ при застосуванні програми ChromDream;
- розроблено прості та доступні методики кількісного визначення похідних 1,4-нафтохінону методом ОФ ВЕРХ з використанням оптимізованих ізократичних бінарних РФ на основі метанол–вода та ацетонітрил–вода;
- запропоновано суміші бензену з полярними розчинниками – метанол, пропан-2-ол, ацетонітрил, ацетон та хлороформ для розділення вказаних аналітів методом НФ ТШХ.

Практичні результати роботи пов'язані з розширенням області застосування ОФ ВЕРХ та НФ ТШХ в практиці хімічного аналізу та безпосередньо пов'язані з науковою новизною роботи:

запропоновано експериментальні та розрахункові методики рідинно-хроматографічного визначення ряду похідних 1,4-нафтохінону;

результати проведених досліджень використані для контролю синтезу цих сполук та ступеня їх чистоти;

результати проведених досліджень можуть бути використані для розробки методик інших синтетичних біологічно активних нафтохіноїдних похідних;

результати розділення досліджених ряду похідних 1,4-нафтохінону впроваджені у навчальний процес на кафедрах фізичної, аналітичної та загальної хімії та технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Національного університету «Львівська політехніка», а також у лабораторний практикум навчальної дисципліни «Хроматографія» кафедри аналітичної хімії Львівського національного університету імені Івана Франка.

Розроблені методики визначення ряду похідних 1,4-нафтохінону детально наведено в пунктах наукової новизни роботи та розділах 3 і 4 дисертації.

Основний зміст роботи. Робота складається з анотації, вступу, 4 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел з 183 найменувань та 4 додатків.

У **вступі** обґрунтовано актуальність роботи, сформульовано мету і задачі дослідження, зазначено наукову новизну і практичне значення роботи.

У **першому розділі** проведено огляд літературних даних щодо аналізу похідних 1,4-нафтохінонів методами рідинної хроматографії. Розглянуті різні варіанти ВЕРХ та склад РФ для розділення 1,4-нафтохінонів. Обговорені загальні положення проблеми оптимізації складу РФ при ізократичному режимі хроматографічного розділення та можливості використання комп'ютерних програм для передбачення утримування в умовах ОФ ВЕРХ, включаючи принципи функціонування обчислювальних програм ChromDream і ChromSword. Узагальнено та сформульовано основні проблеми та напрямки практичного застосування рідинної хроматографії похідних 1,4-нафтохінонів та прогнозування їх утримування у методах ОФ ВЕРХ та НФ ТШХ.

У **другому розділі** охарактеризовано використані у роботі похідні 1,4-нафтохінону, які чітко зображені у вигляді 2,3-похідних 1,4-нафтохінону. Також наведено основні етапи експериментальних досліджень і їх умови проведення, обладнання та апаратуру, використані у роботі, аналіти, компоненти РФ, методики приготування розчинів, охарактеризовано основні стадії стандартизації вимірювань при дослідженні хроматографічної поведінки методом ОФ ВЕРХ на прикладі деяких комерційних препаратів (сполуки **I** – 1,4-нафтохінон, **II** – 2,3-дихлоро-1,4-нафтохінон та **XXX** – натрієва сіль 4-сульфокислоти 1,2-нафтохінону як неутримувана речовина, табл. 1, автореферат). Наведено методики проведення експериментальних досліджень методом ОФ ВЕРХ та ТШХ, також наведено основні співвідношення між параметрами утримування в ТШХ.

Описано методику визначення параметрів хроматографічних піків в програмі MathCAD та використання програми Densitan для отримання величин R_f в ТШХ.

Описано методику визначення параметрів рівнянь згідно моделі утримування з використанням MS EXCEL за розв'язуванням в матричній формі переозначеної системи лінійних рівнянь з трьома невідомими.

Дано основні залежності та умови для розрахунку об'ємів Мак-Говена та Ван дер Ваальса та опис цього розрахунку в MS EXCEL.

Третій розділ присвячено дослідженню впливу вмісту органічного розчинника (метанол, ацетонітрил) у бінарних водно-органічних РФ на утримування похідних 1,4-нафтохінону в умовах ОФ ВЕРХ. Показано, що для цих бінарних РФ при складі метанолу (75–90 % об.) та ацетонітрилу (40–60 % об.) залежності утримування від вмісту органічного компонента добре описуються загальноприйнятим напівлогарифмічним рівнянням, а саме: $\ln(k') = \ln(k_0) - S \cdot \varphi$, де $\ln(k')$ – логарифм коефіцієнту ємності, k_0 – екстрапольований коефіцієнт ємності аналіту у воді, S – коефіцієнт впливу вмісту органічного компонента в РФ, що залежить від РФ та нерухомої фази (НРФ), φ – об'ємна частка органічного компонента.

Для співвідношення між нахилами S і відтинками $\ln(k_0)$, яке описується лінійними двопараметровими кореляціями $S = p + q \cdot \ln(k_0)$, для РФ метанол–вода, згідно із даних літератури, $p \in 2,27\text{--}3,50$, $q \in 0,69\text{--}0,79$; у випадку 26 похідних 1,4-нафтохінону дисертантом отримано задовільні кореляції для РФ: метанол–вода $p=1,4708$, $q=0,9164$, $R^2=0,9532$ та ацетонітрил–вода $p=1,4090$, $q=1,2140$, $R^2=0,9028$. Дану залежність можна використати для зменшення кількості параметрів оптимізації розділення методом ОФ ВЕРХ.

За кореляцією між нахилами S для метанолу та ацетонітрилу згідно однопараметрового лінійного рівняння експериментально отримано коефіцієнт пропорційності (0,78) для бінарних ізоелюотропних РФ (метанол – вода, ацетонітрил – вода) за параметрами розчинності Гільдебранта – $\varphi_{\text{(ацетонітрил)}} = 0,78 \cdot \varphi_{\text{(метанол)}}$, який задовільно узгоджується з теоретичною величиною, що отримана за полярностями компонентів РФ в умовах ОФ ВЕРХ.

Випробувано можливості комп'ютерного моделювання з допомогою програми ChromDreem для прогнозування утримування похідних 1,4-нафтохінону в умовах ОФ ВЕРХ. Встановлено, що кількість задовільних результатів з усіх даних прогнозування у випадку РФ з ацетонітрилом є меншою, ніж для РФ з метанолом. При порівнянні для 24 аналітів РФ складу 75 % об. метанолу та 60 % об. ацетонітрилу оцінки є суттєво ближчими.

Досліджено вплив рН для РФ на утримування амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону в умовах ОФ ВЕРХ. Показано, що залежності коефіцієнта ємності k' від рН мають класичний характерний вигляд в умовах ОФ ВЕРХ для аналітів, що є слабкими кислотами. В межах рН=3,5–7,0 для обернено-фазових силікагелевих НРФ з прищепленими вуглеводневими ланцюгами C_{18} , встановлено, що за рН ≤ 5 роздвоєння піків аналітів з карбоксильною групою, яке отримано для РФ з високим вмістом води, зникає, оскільки ці сполуки внаслідок зміщення рівноваги під дією протонів переходять у молекулярну форму.

Наведено хроматограми найбільш повного розділення суміші 10 похідних 1,4-нафтохінону для РФ з складу $\varphi=60$ % об. ацетонітрилу та $\varphi=75$ % об. метанолу.

Розроблено методику кількісного визначення в умовах ОФ ВЕРХ для реакційної суміші синтезу 2-(4-гідрокси-3,5-ди-*трет*-бутилфеніл)-3-(бензотриазол-2-ил)-1,4-нафтохінону, яка крім продукту реакції містить реагенти бензотриазол, 2,3-дихлоронафтохінон-1,4- та 2,6-ди-*трет*-бутилфенол, а також продукт першої стадії синтезу 2-(4-гідрокси-3,5-ди-*трет*-бутилфеніл)-3-хлоро-1,4-нафтохінон.

В **четвертому** розділі наведено результати систематичного дослідження хроматографічних властивостей НФ ТШХ.

Узагальнено вплив складу РФ на утримування та розділення похідних 1,4-нафтохінону в умовах НФ ТШХ. Показано, що для бінарних РФ на основі бензену та полярного компонента (метанолу, пропан-2-олу, хлороформу, ацетонітрилу, ацетону) з вмістом 2,5–10 % об. залежності між параметром утримування R_m та десятковим логарифмом молярної частки N_b полярного компонента добре описуються рівнянням Сочевінського.

Для досліджених похідних 1,4-нафтохінону розраховано за структурними інкрементами площу A_s , яку займає молекула визначуваної речовини при сорбції на НРФ в умовах НФ ТШХ. Показано, що нахил B у рівнянні Сочевінського добре корелює з площею A_s . У всіх випадках зі зростанням площі A_s спостерігається збільшення нахилу B , що добре узгоджується з теорією утримування в НФ ТШХ.

Представлено коефіцієнт ємності k' , який розраховується за величиною R_f , селективність α , середнє значення коефіцієнта ємності $k'_{\text{середнє}}$, критерій розділення (роздільна здатність) сусідніх піків R_s , проведено оцінку ефективності системи НФ ТШХ за кількістю теоретичних тарілок N . На прикладі для сполуки **XI** показано, що зростання ефективності ТШХ від $N=700$ – 1000 до $N=1400$ – 1500 , тобто в 1,5–2 рази, спостерігається заміною полярного компонента РФ в ряду: ацетонітрил < ацетон < метанол < пропан-2-ол < хлороформ. В цьому ряду для ацетону спостерігається певний максимум між ацетонітрилом та метанолом.

Розроблено методику розділення та кількісного визначення на прикладі суміші чотирьох похідних 1,4-нафтохінону, а саме: 2-феніламіно-3-хлоро-1,4-нафтохінон, 2-(4-метоксифеніламіно)-3-хлоро-1,4-нафтохінон, 2-(4-гідроксифеніламіно)-3-хлоро-1,4-нафтохінон, 2-(4-метил-3-нітрофеніламіно)-3-хлоро-1,4-нафтохінон в умовах методу НФ ТШХ при знайдених оптимальних складах бінарних РФ.

Для однозначного трактування отриманих результатів дослідження по дисертаційній роботі слід зробити деякі зауваження та уточнити деякі питання:

1. В роботі використовували наступні терміни: мобільна фаза (МФ), стаціонарна фаза (СФ). Краще використовувати більш поширені терміни: рухома фаза (РФ) та нерухома фаза (НФ).
2. В роботі чітко узагальнено та сформульовано основні проблеми та напрямки практичного застосування рідинної хроматографії похідних 1,4-нафтохінонів та прогнозування їх утримування у методах ОФ ВЕРХ та НФ ТШХ. На основі кореляцій і виявлених закономірностей бажано було б сформулювати основні принципи вибору рухомої на нерухомій фаз (РФ та НРФ) для розробки методик кількісного визначення 3,4-похідних 1,4-нафтохінону. При прочитанні дисертації і автореферату принципи вибору РФ та НРФ стають зрозумілими. Оскільки формулювання принципів відсутнє і у висновках про це нічого не сказано, бажано було б дуже коротко навести формулювання принципів вибору фаз в доповіді.
3. В роботі наведено, що «Експерименти в умовах ВЕРХ проводили на хроматографі марки KNAUER-COMPACT (фірма KNAUER), обладнаного УФ-детектором ($b=3$ мм) за 250 нм, петльовим інжектором моделі 7725 фірми Reodyne із змінними дозами 5 та 200 мкл та аналітичною колонкою довжиною 250 мм і внутрішнім діаметром 4,6 мм, яка була заповнена сорбентом Spherisorb ODS-2 з розміром частинок 5 мкм. Об'єм проби розчину досліджуваної речовини був в межах 0,2–50 мкл, а дозування проби в петльовий інжектор хроматографа здійснювали за допомогою мікрошприца для ВЕРХ фірми Hamilton місткістю 10 мкл.». Оскільки робота виконувалася протягом певного часу, бажано було б знати, які колонки ще були використані для експерименту, крім Spherisorb ODS-2 з розміром частинок 5 мкм. Також виникає питання: для експерименту вибрані зовсім нові

- колонки з паспортом розділення тестової суміші фірми-виробника чи старі, які пройшли стадію кондиціювання, чи це в даному випадку не має значення?
4. Чи проводили оцінку колонок різних виробників відносно batch-to-batch reproducibility (одного і того ж виробника з різних партій, різних років, оскільки комерційні фірми наводять в каталогах найкращі характеристики)? Це впливає на робастність при валідації методик?
 5. В роботі також наведено, що «ТШХ проводили з використанням пластинок Silufol (виробник Kavalier) з широкопористим силікагелем Silpearl (товщина шару 0,2 мм), розміром 1x15 см на алюмінієвій фользі, як основі.»
Чи використовували в роботі пластинки для ТШХ інших фірм? Чи оцінювали вплив НФ на результати аналізу?
 6. Не зрозуміло, як вимірювали рН у водно-органічних розчинах РФ з високим вмістом органічного розчинника? На мій погляд, бажано було б навести більш детальну інформацію відносно отримання адекватних результатів аналізу.
 7. Не зрозуміло, як були приготовані модельні суміші компонентів (табл. 5 і 7, автореферат, дисертація). Яким методом були отримані значення, що наведено у колонці (склад модельної суміші, w (%))?. Наведена величина правильності отриманих результатів δ , % не може достатньо характеризувати результати аналізу згідно методики, оскільки отримана відносно модельної суміші. Для оцінки точності та правильності розробленої методики необхідно було б використовувати Reference Material або реальну суміш, які мали б приписані значення, які були отримані за допомогою іншого (незалежного) методу. В реальних сумішах можуть бути присутні баластні компоненти. В цьому випадку будуть отримані інші результати аналізу та інші значення точності (precision) та правильності (accuracy) методики аналізу.
 8. Редакційні зауваження.

Вказані зауваження не принципові.

Висновки науково обґрунтовані. В дисертації, авторефераті та опублікованих роботах відображені основні результати дослідження, що складають наукову новизну та практичну цінність роботи, яка підтверджена публікаціями у фахових українських та закордонних журналах.

Робота широко апробована на міжнародних, всеукраїнських та регіональних наукових конференціях.

Робота виконана на високому науковому та експериментальному рівні.

Наукові результати, отримані здобувачем, опубліковано в 7 статтях в українських фахових журналах (1 стаття у журналі, який індексується міжнародною базою Scopus), 14 тезах доповідей.

Дисертаційну роботу викладено на 163 сторінках машинописного тексту, що включає 44 таблиці, 58 рисунків та складається із анотації, вступу, 4 розділів, загальних висновків і списку використаних джерел з 183 найменувань та 4 додатків. Загальний обсяг дисертації становить 302 сторінки.

Слід зазначити, що матеріал викладено доступно, дисертація та автореферат написані добре.

Дисертаційна робота є завершеним дослідженням, в якому отримано та застосовано нові науково обґрунтовані результати для вирішення актуальних задач хімічного та фармацевтичного аналізу. Враховуючи актуальність, об'єм виконаних досліджень, рівень наукової новизни та практичної значимості, обґрунтованість та достовірність отриманих результатів, вважаю, що дана дисертаційна робота за об'ємом експериментальних досліджень, виконаних на сучасному рівні, відповідає поставленій меті та вирішеним задачам і, в цілому, за своєю результативністю відповідає вимогам, які пред'являються до кандидатських дисертацій, а також п.п. 9, 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого

Постановою Кабінету Міністрів України за № 567 від 24 липня 2013 р. (зі змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України за № 656 від 19 серпня 2015 р., № 1159 від 30 грудня 2015 р., № 567 від 27 липня 2016 р., № 943 від 20 листопада 2019 р., № 607 від 15 липня 2020 р.) щодо кандидатських дисертацій, а її автор **Смірнова Оксана Ярославівна** заслуговує присудження наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.02 – аналітична хімія.

Заступник директора з наукової роботи,
провідний науковий співробітник
Інституту колоїдної хімії та хімії води
ім. А.В. Думанського НАН України,
доктор хімічних наук,
старший науковий співробітник



М.В. Мілюкін

25 серпня 2021 р.

Підпис заступника директора з наукової роботи,
провідн. наук. співроб.,
д.х.н., ст.н.с. Мілюкіна М.В.
засвідчую:

Начальник відділу кадрів Інституту колоїдної хімії
та хімії води ім. А.В. Думанського НАН України



О.О. Мусаєва