

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Жеребкера Александра Яковлевича "Изучение строения гуминовых веществ методами изотопного обмена и масс-спектрометрии", представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.03 – органическая химия

Необходимо сразу отметить: Жеребкер Александр Яковлевич выполнил оригинальную научную работу в сложнейшей области органической химии – химии природных соединений гуминового ряда, где белых пятен существенно больше, чем успехов, если смотреть на проблему с классической точки зрения, **когда одна структура - одно вещество**. В данном случае такой базовый подход неприменим, и возникающая проблема общепринятой методологией исследований структуры описана быть не может. Следовательно, разработка новых подходов и методологии к решению структурных задач является актуальной. Обобщение выполненных в этом направлении работ в виде диссертации – это не просто квалификационное сочинение, а попытка прорыва в другое измерение. Можно констатировать, включая в базовый материал и выполненную диссертацию, – успехи в теоретическом и фундаментальном почвоведении в последние полвека были обеспечены химиками. Отрадно осознавать, что основополагающий вклад в это внес выдающийся учёный, профессор Московского университета Д.Орлов.

**Актуальность темы исследования** не вызывает сомнений. Как принято в настоящее время считать, гуминовые вещества (ГВ) образуются в результате стохастического (не матричного) синтеза из продуктов трансформации биомакромолекул, входящих в состав отмирающей биомассы. «Как следствие, они представляют собой супрамолекулярные системы природных органических соединений с высокой степенью структурной гетерогенности, определяющей их устойчивость к биоразложению» - так считает автор, и с чем можно не согласиться. Структурная гетерогенность не может определять устойчивость к биоразложению. Устойчивость ГВ к биоразложению есть результат предельной биотрансформации исходных веществ или субстратов.

«Гумификация является вторым по масштабности процессом после фотосинтеза». Позволю не согласиться с этим тезисом. Гумификация является чрезвычайно важным для биосферы процессом, но не вторым. Вторым по масштабу процессом после фотосинтеза является противоположный ему процесс деструкции или окисления органического вещества до воды и диоксида углерода. Гумификация занимает незначительную часть этих процессов. ГВ составляют от 30 до 80% органического вещества вод, почв и горючих ископаемых. Одной из важных функций ГВ в биосфере является защитная, обусловленная их мощными стресс-протекторными и антивирусными свойствами. В то же время применение данных свойств ГВ в фармацевтике весьма ограничено, так как отсутствуют подходы к установлению структуры наиболее активных компонентов ГВ, хотя ГВ широко применяются в растениеводстве и животноводстве. Новым направлением использования ГВ стала нефтедобывающая промышленность, где ГВ используются при проходке стволов скважин и увеличении нефтеотдачи обводненных пластов. Масштабы применения ГВ в этой отрасли исчисляются сотнями тысяч тонн. В лидеры по производству гуминовых препаратов для нефтедобычи в последние годы выходит Китай. Как отмечалось выше, использование гуминовых препаратов в медицине очень и очень маленькое, несмотря на демонстрируемые ими большие потенциальные возможности и проведенные клинические исследования. Такое положение обусловлено тем, что гуминовая система состоит из широкого набора молекулярных компонентов различного строения и молекулярных масс, которые в водных растворах образуют устойчивые амфифильные агрегаты, удерживаемые гидрофобными и другими слабыми взаимодействиями. Данные агрегаты могут



рассматриваться как псевдомолекулы, для которых можно определить средние физико-химические свойства: структурный и функциональный состав, молекулярную массу и реакционную способность. Для идентификации отдельных молекул в системах такой сложности необходимо применение метода, обладающего сверхвысоким разрешением. Автор достаточно подробно обосновал актуальность исследования путем анализа используемых современных методов. Существенным недостатком подходов является косвенный характер получаемой информации о структуре молекулярных компонентов, входящих в состав ГВ. Для надежной идентификации индивидуальных молекул широко применяется метод тандемной массспектрометрии (МС/МС). Однако из-за экстремальной структурной гетерогенности гуминовых веществ задача выделения целевого пика для последующей фрагментации и регистрации осколков требует колоссальных затрат приборного времени и была реализована только в единичном исследовании низкомолекулярного образца растворенного органического вещества.

Автор предположил, что альтернативным способом извлечения структурной информации из данных МС ИЦР ПФ может служить введение изотопных меток в состав индивидуальных компонентов ГВ. Однако такой подход не несет информации об углеродном скелете молекул. Для получения такой информации необходимо применение методов селективного Н/Д обмена скелетных протонов и направленной модификации функциональных групп. Поэтому определение структурных фрагментов индивидуальных компонентов в составе гуминовых веществ методами селективного изотопного обмена и массспектрометрии ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье является актуальной задачей. Для достижения цели автор исследовал широкую выборку ГВ, выделенных из различных источников, методом МС ИЦР ПФ для установления закономерностей изменения молекулярного состава. Кроме этого синтезировал структурные аналоги ароматического каркаса ГВ путем окислительной поликонденсации лигнинных и фенольных прекурсоров и разработал методическое обеспечение для селективного введения дейтериевых меток в углеродный скелет ГВ и способы интерпретации данных МС ИЦР ПФ изотопного обмена, а так же выполнил полную идентификацию структуры индивидуальных компонентов синтезированных аналогов ГВ.

**Научная новизна** достаточно хорошо обоснована и замечаний нет. Так впервые автором показана возможность извлечения информации о структурной изомерии отдельных ароматических компонентов ГВ методами селективного изотопного обмена в сочетании с масс-спектрометрией сверхвысокого разрешения. Впервые найдено сходство молекулярного состава структурных аналогов ГВ, полученных методом окислительного сочетания фенолов, и ароматических компонентов природных ГВ. На примере структурных аналогов ГВ впервые показано, что в источнике ионизации электрораспылением в реакции Н/Д обмена вступают скелетные протоны, участвующие в кето-енольной таутомерии, а молекулярные компоненты ГВ с одинаковым количеством кислотных групп характеризуются близким элементным составом независимо от типа ГВ.

Относительно **теоретической и практической значимости работы**. Хотя автор, как и большинство диссертантов, выполняющих не прикладные исследования, в своих сочинениях объединяют эти два раздела из-за трудности формулировок практической значимости, сделаю попытку проанализировать их по отдельности.

**Теоретическая значимость работы.** Полученные данные по строению и молекулярному составу широкой выборки ГВ будут использованы для разработки теоретических основ молекулярной систематики природного органического вещества, основанной на идентификации общих и уникальных индивидуальных компонентов в составе образцов различного генезиса. Создание такой систематики будет способствовать пониманию эволюции органического углерода на Земле. Найденные взаимосвязи между молекулярным составом продуктов окислительной поликонденсации и структурой исходных фенольных мономеров могут лечь в основу направленного синтеза гуминоподобных систем, наиболее близких по структуре к природным ГВ. Информация о



структурных фрагментах индивидуальных компонентов ГВ является необходимой для получения прогностических моделей «структура — биологическая активность ГВ» и понимания механизма их биологической активности. Указанные модели могут стать теоретической основой для разработки лекарств на основе ГВ.

**Практическая значимость работы.** Практическая значимость работы определяется в первую очередь тем, что проверенные модели могут стать основой для разработки лекарств на основе ГВ в части аналитического обеспечения как ТУ на субстанции, так и разделов фармстатей на ГЛС. Выпускавшиеся в СССР несколько перспективных препаратов в дальнейшем были сняты с производства именно из-за отсутствия такой информации. Кроме этого, полученные данные могут войти в открытую базу данных IUPAC по компонентному составу гуминовых веществ и природного органического вещества ([http://iupac.org/projects/project-details/?project\\_nr=2016-015-2-600](http://iupac.org/projects/project-details/?project_nr=2016-015-2-600)). Создание «химической библиотеки» компонентов природного органического вещества станет важным инструментом для верификации данных о молекулярном составе сложных матриц, например, по частоте встречаемости молекулярных составов. Разработанный в данной работе комплекс методик введения изотопных меток и определения карбоксильных групп в индивидуальных компонентах методом МС ИЦР ПФ может быть использован для углубленного анализа биотоплив, моторных топлив и нефтей.

**Рецензент согласен с формулировкой положений, выносимых на защиту**

**Личный вклад автора** состоит в написании критического обзора литературных данных, постановке экспериментов по введению дейтериевых меток в состав ГВ, подборе оптимальной процедуры пробоподготовки образцов для анализа методом МС ИЦР ПФ, интерпретации результатов масс-спектрометрии изотопного обмена.

Относительно литературного обзора необходимо сказать следующее. Написан достаточно профессионально. Восхищает проработанностью англоязычной литературы. Обзор содержит более 250 ссылок на оригинальные работы на английском языке.

**Апробация результатов** достаточно полная и репрезентативная. Результаты работы были представлены в виде стендовых и устных докладов на многочисленных конференциях различного уровня, начиная от международных конференций по ГВ в России, Греции, Японии, и заканчивая 64-ой Международной конференцией Американского масс-спектрометрического сообщества АСМС-2016, Сан-Антонио США.

**По материалам диссертации опубликовано** 18 работ, из них 11 статей в изданиях, рекомендованных ВАК.

Исследования выполнялись при поддержке проектов РФФИ (13-04-01853, 16-04-01753, 16-0301057, 16-33-00914), РНФ (16-14-00167, 14-24-00114) и ИЮПАК (2016-015-2-600), что так же подтверждает актуальность работы.

Автореферат подробно передаёт содержание диссертации.

В работе использованы современные методы органического синтеза, все впервые синтезированные соединения выделены и охарактеризованы. Эксперименты по оценке содержания подчеркивают междисциплинарный уровень исследования. Достоверность установления строения полученных соединений не вызывает сомнений, надежно доказана физико-химическими и спектральными методами: элементным анализом, данными спектров ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ , масс-спектрометрии; параметры спектров достаточно корректно описаны в экспериментальной части и не вызывают сомнений. На основании анализа работы и публикаций автора можно заключить, что цель работы, сформулированная в ее постановочной части, автором достигнута, а сопутствующие ей задачи, в целом, выполнены. Представленные научные положения, выводы и рекомендации являются обоснованными. Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертации. По существу, работа практически лишена методических и синтетических



недостатков, оформлена должным образом. Тем не менее, по диссертации можно сделать некоторые замечания.

Можно начать с выводов. Так вывод 1: «На основании исследования молекулярного состава ГВ методом МС ИЦР ПФ показано, что в составе угольных ГВ доминируют конденсированные таннины (> 45% от общего количества идентификаций), в торфяных и почвенных ГВ - лигнины (> 44%), в водных ГВ - гидролизуемые таннины (> 55%)» является перечислением сделанного. Рецензент эту информацию трансформировал бы следующим образом (как один из вариантов): «Полученные на основании исследования молекулярного состава ГВ методом МС ИЦР ПФ данные: в составе угольных ГВ доминируют конденсированные таннины (> 45% от общего количества идентификаций), в торфяных и почвенных ГВ - лигнины (> 44%), в водных ГВ - гидролизуемые таннины (> 55%), могут быть использованы для идентификации источника гуминовых кислот»

Вывод 2: «Установлено, что окислительная поликонденсация лигнинного мономера и гидрохинона позволяет воссоздать более 50% лигнинно-полифенольных компонентов природных ГВ. Предложен подход к определению типа структурной изомерии аналогов ГВ с помощью изотопного обмена и МС ИЦР ПФ». Можно превратить действительно в вывод, например, переписав следующим образом: «Окислительная поликонденсация лигнинного мономера и гидрохинона позволяет воссоздать более 50% лигнинно-полифенольных компонентов природных ГВ. Предложенный подход к определению типа структурной изомерии аналогов ГВ с помощью изотопного обмена и МС ИЦР ПФ позволяет ....»

Соответственно, вывод 3 не будет вызывать нареканий при следующем изложении: «В условиях ионизации электрораспылением активные центры молекул, участвующие в кето-енольной таутомерии, подвергаются Н/Д обмену с D<sub>2</sub>O в заряженных микрокаплях аналогично реакциям в растворах».

Четвертый и пятый выводы можно оставить без изменений.

Замечания по выводам относятся не только к соискателю, но в первую очередь к Специализированным ученым советам по защите диссертаций и сложившейся в России практике писать псевдовыводы и принимать за выводы основные результаты или перечень сделанного.

Не могу согласиться с точкой зрения автора в следующих вопросах: «Как следствие, они (ГВ, рец.) представляют собой супрамолекулярные системы природных органических соединений с высокой степенью структурной гетерогенности, определяющей их устойчивость к биоразложению». Так считает автор, и с чем можно не согласиться. Структурная гетерогенность не может определять устойчивость к биоразложению. Устойчивость ГВ к биоразложению есть результат предельной биотрансформации исходных веществ или субстратов в окислительных условиях, с одной стороны, а с другой – всё доступное микроорганизмы в наших природно-климатических условиях метаболизировали. Другим доказательством служит отсутствие накопления ГВ в условиях тропиков и субтропиков.

«Гумификация является вторым по масштабности процессом после фотосинтеза». Позволю не согласиться с этим тезисом. Вторым по масштабу процессом после фотосинтеза является противоположный ему процесс деструкции или окисления органического вещества до воды и диоксида углерода.

Гумификация занимает незначительную часть этих процессов.

Не могу согласиться и с утверждением, что «ГВ составляют от 30 до 80% органического вещества вод, почв и горючих ископаемых» в части органического вещества вод. Рек и озер – да, но не океанов и морей.

Как уже отмечалось выше, одной из задач диссертации практической направленности является обеспечение количественного и качественного анализа ГВ, необходимого при разработке и производства ГЛС на основе ГВ. Диссертант несколько



раз говорит о перспективах ГВ в медицине. Представлялось целесообразным сослаться на многочисленные работы и обзоры по этой теме, написанные хотя бы проф. А.В.Бузлыма с сотр.

Последние замечания появились как результат анализа рецензентом утверждения диссертанта о критическом обзоре литературных данных: «Личный вклад автора состоит в написании критического обзора литературных данных».

Диссертант впервые нашёл сходство молекулярного состава структурных аналогов ГВ, полученных методом окислительного сочетания фенолов, и ароматических компонентов природных ГВ, однако описывая синтезы структурных аналогов ГВ методом окислительного сочетания фенолов необходимо было сослаться на многочисленные имеющиеся аналогичные работы, например, по синтезу Эпофена.

**Заключение.** Сделанные замечания не могут существенно повлиять на то положительное мнение рецензента, которое сформировалось при чтении диссертации, и на уважительное отношение к личности диссертанта, продемонстрировавшего высокий профессиональный уровень. Для России это прорывная работа и не только в области органической химии и почвоведения. Автор отзыва на протяжении многих лет следит за развитием работ, проводимых в группе профессора Перминовой И.В., и может отметить, что диссертационная работа Жеребкера Александра Яковлевича представляет собой не просто законченное научно-квалификационное исследование, отличающееся проработанностью, строгостью и логичностью постановки задач, научной новизной, но и следующим шагом в части развития и совершенствования методологии исследования гуминовых кислот на фоне их не подлежащей сомнению практической значимости в жизни общества и функционирования биосферы. Диссертационная работа "Изучение строения гуминовых веществ методами изотопного обмена и масс-спектрометрии" соответствует паспорту специальности 02.00.03 – органическая химия в части «исследования строения» и полностью отвечает всем критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, в соответствии с пунктами 9–14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. в редакции от 21.04.2016 г., так как разработка методологии и новых подходов к исследованию структуры соединений сложнейшего по структуре класса органических веществ и их производных, в том числе модельных, позволили получить оригинальные результаты, отличающиеся новизной, сформировать новый подход к классификации гуминовых веществ, который, несомненно, войдет в арсенал химиков и почвоведов, что является вкладом не только в органическую химию природных веществ, но и теоретическое почвоведение, а **Жеребкер Александр Яковлевич**, создавший методологию исследований веществ гуминовой природы и получивший оригинальные результаты, вполне заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.03 – органическая химия.

Ф.И.О. составителя: ОФИЦЕРОВ Евгений Николаевич

Почтовый адрес: 125047 Москва, Миусская площадь, д. 9

Телефон: +74999786132

Адрес электронной почты: ofitser@mail.ru

Наименование организации: ФГБОУ ВО Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева

Должность: декан факультета химико-фармацевтических технологий и биомедицинских препаратов, доктор химических наук, профессор

Подпись Е.Н.Офицеров "Я доверяю"

Ученый секретарь университета

25 мая 2016 г.



(Вертальцев М.А.)



В диссертационный совет Д 501.001.97  
при Федеральном государственном бюджетном  
образовательном учреждении высшего  
образования «Московский государственный  
университет имени М.В. Ломоносова»  
от декана факультета химико-фармацевтических  
технологий и биомедицинских препаратов РХТУ  
им. Д.И.Менделеева,  
проф., д.х.н. Офицера Евгения Николаевича

Настоящим даю согласие выступить официальным оппонентом на защите диссертации Жеребкера Александра Яковлевича на тему: «Изучение строения гуминовых веществ методами изотопного обмена и масс-спектрометрии», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.03 – органическая химия.

О себе сообщаю следующие сведения:

1. Офицеров Евгений Николаевич, гражданин РФ.
2. Ученая степень: доктор химических наук (02.00.08 – элементоорганическая химия).
3. Ученое звание: профессор
4. Место работы: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева».
5. Должность: декан факультета химико-фармацевтических технологий и биомедицинских препаратов
6. Адрес места работы: 125047, г. Москва, Миусская пл, д.9. Тел: +7 (499) 978-61-32  
e-mail: [ofitser@mail.ru](mailto:ofitser@mail.ru)
7. Основные работы по профилю оппонируемой диссертации:
8. Офицеров Е. Н. Попытка количественного описания взаимосвязи свойств соединения с его химическим строением по А.М. Бутлерову. *Бутлеровские сообщения*. 2011. Т.27. №16. С.1-14.
9. Рябов Г.К., Убаськина Ю.А., Климовский А.Б., Фетюхина Е.Г. Офицеров Е..Н. Кремний и гуминовые кислоты: моделирование взаимодействий в почве. Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2011. Т. 13. № 4-2. С. 550-557.
10. E.N.Ofitserov, E.G.Fetjulina, J.A.Ubaskina, F.S.Bilalov. "The potencial role of amorphous silica in a soil". Сб. научн. Трудов Межд. Конф. «Вермикомпостирование и вермикультивиоание как основа экологического земледелия в XXI веке: Проблемы, перспективы, достижения». Минск, Ин-т зоологии НАН Беларуси. 2007. с. 61-64.
11. Muraleva N.A., Kolosova N.G., Tikhonov V.P. Efficacy of glucosamine alendronate alone & in combination with dihydroquercetin for treatment of osteoporosis in animal model. *Indian Journal of Medical Research*. 2012. Т. 135. № 2. С. 221-227.
12. E.N.Ofitserov, V.M.D'yakov, E.G.Fedyukhina, Yu.A.Ubas'kina. "Properties and Functions Comparison of Humic Substances and Biogenous Silica". In Abstracts "4<sup>th</sup> European Silicon days", Bath, UK. p. 170

Доктор химических наук  
02.00.08 – элементоорганическая химия

Подпись Е.Н. Офицера заверяю.



Е.Н. Офицеров

(Вартанянц М.А.)