

СТАНОВИЩЕ
от д-р Виолета Миленкова Стефанова,
доцент, аналитична химия,
Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“
по: област на висше образование **4. Природни науки, математика и информатика**
професионално направление **4.2. Химически науки**
докторска програма **Аналитична химия**

Автор: Ася Димитрова Христовова

Тема: Развиване възможностите на газовата хроматография с масспектрометрична детекция чрез комбиниране със „зелени“ подходи за екстракция и моделиране

Научен ръководител: доц. д-р Кирил Костов Симитчиев, Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“

1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Съгласно заповед № РД-22-486 от 21.02.2025 г. на Ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ (ПУ), съм определена за член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема *„Развиване възможностите на газовата хроматография с масспектрометрична детекция чрез комбиниране със „зелени“ подходи за екстракция и моделиране“* за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.2. Химически науки, докторска програма Аналитична химия. Авторът на дисертационния труд е докторант, редовна форма на обучение, към катедра Аналитична химия и компютърна химия на Химическия факултет при Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“.

Представеният от Ася Христовова пълен комплект материали на хартиен и електронен носител напълно съответства на всички изисквания, посочени в Чл.36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ.

Ася Христовова е възпитаник на Химическия факултет при Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“. През 2005 г. тя придобива ОКС Бакалавър по специалност „Биология и химия“ а през следващата (2006 г.) се дипломира с ОКС Магистър по специалност „Медицинска химия“. Задочната форма на обучение в магистърската програма позволява на докторанта веднага да започне работа в „Чайкафарма Висококачествените лекарства“ АД през периода 2006-2020 г. където започва като медицински представител, а в последствие се насочва към аналитична дейност като химик аналитик, аналитик-хроматографист и отговорник за LIMS системата в отдела по качествен контрол. Избраната от Ася Христовова област на професионална реализация, която е пряко свързана с инструменталните методи за анализ и системите за управление и контрол на качеството я мотивират да запише и успешно завърши през 2019 г. втора магистърска програма по „Спектрохимичен анализ“.

От март 2020 г. тя е назначена като асистент в катедра „Аналитична химия и компютърна химия“ на ПУ „Паисий Хилендарски“, където води практически занятия по дисциплините: „Аналитична химия и инструментални методи за анализ“, „Фармацевтичен анализ“ на студенти ОКС бакалавър от химическия и биологически факултети; както и практически занятия за студенти от ОКС магистър: дисциплина „Комбинирани хроматографски техники“ (в магистърска програма „Спектрохимичен анализ“ и дисциплините: „Аналитични възможности на съвременната газова хроматография“ и „Аналитични възможности на съвременната течна хроматография“ (в магистърска програма „Хроматографски и спектрален аналитичен контрол“).

2. Актуалност на тематиката

Съвременните газ-хроматографски техники за разделяне в комбинация масспектрометрични детектори (GC-MS и GC-MS/MS) се наложиха като мощни инструментални системи, способни да отговорят на непрекъснато нарастващите изисквания на обществото към качеството на аналитичните данни, както и необходимостта да се идентифицират и определят количествено голям брой органични съединения с относително ниски температури на кипене, във все по-ниски концентрации, присъстващи в разнообразни обекти (фармацевтични, клинични, екологични, хранителни и др.)

Изследването е фокусирано върху разширяване на възможностите на GC-MS за определяне на субследови нива на летливи и полуетливи съединения, съдържащи се в етерични масла, както и на пестициди във води и плодови сокове чрез екологично щадящи подходи.

През последните две десетилетия, „не-целеви анализ“ (non target analysis) набира популярност като обещаващ подход за идентифициране на огромен брой органични съединения в сложни матрици. Ключово предизвикателство е разработването на надеждни подходи за идентификация, базирани на математическо моделиране на хроматографски данни, без да е необходимо експериментално определяне на времената на задържане.

Друго актуално научно направление, застъпено в настоящия дисертационен труд е стремежът да се разработват екологично целесъобразни методи, които са в съгласие с принципите на „зелената аналитична химия“ т.е. използват минимални количества, относително слабо-опасни реагенти и изискват минимален ресурс от енергия, инструментариум, време и др.

3. Познаване на проблема

Обстойният и задълбочен литературен обзор - 306 източника (над 56% от които са публикувани след 2015 г.) показва, че докторантът е запознат в детайли със съвременното състояние на научните постижения в тематичната област на дисертационния труд. Обзорът критично оценява перспективите в развитието на съвременните газ-хроматографски системи в контекста на концепцията за „зелена химия“, както и основните предимства, ограничения и предизвикателства пред GC-MS метода при идентификация и количествено определяне на пестициди и компоненти в етерични масла.

Сериозно внимание е отделено на хеометрични подходи за качествен и количествен хроматографски анализ и моделиране на химичния експеримент.

Пробоподготовката е критичен етап от аналитичната процедура, затова перманентно е във фокуса на научните изследвания, но настоящата работа се фокусира върху едни от най-перспективните екологично целесъобразни методи за подготовка на проби за газ-хроматографски анализ: екстракция при температура на коагулация (CPE); дисперсивна течно-течна микроекстракция (DLLME); твърдофазна микроекстракция (SPME); микроекстракция с дълбоко-евтектични разтворители (DES и натурални - NADES).

4. Методика на изследването

Цялостната изследователска работа по дисертационния труд за разширяване на възможностите на газ-хроматографията в комбинация с тандемна масспектрометрия (GC-MS/MS) следва парадигмата на екологично целесъобразните „зелени“ подходи в аналитичната химия. Систематично планираната изследователска стратегия обхваща както качествените (идентификация), така и количествените (измерване) аспекти на анализа. Цялостната структура на изследването убедително демонстрира ключовата роля на експерт-аналитика в интелигентния подбор и систематичното проследяване на причинно-следствените връзки, с което се създават предпоставки както за разработване на екологично чисти процедури, осигуряващи получаване на добре валидирани крайни аналитични резултати, така и за ефективно планиране на целия изследователски процес.

За целите на качествения анализ експериментално са изследвани три вида етерични масла. Оптимизирано е хроматографското разделяне с използване на неполярна стационарна фаза. Многокомпонентният нецелеви анализ идентифицира присъствието на 51 съединения в две търговски марки розово масло, 49 съединения в масло от лавандула и 32 в мента. Получените експериментални резултати са обединени в собствена база данни, въз основа на която е разработен и валидиран алгоритъм за множествена линейна регресия, който позволява да се предскажат линейните индекси на задържане (LRI) на летливи и полулетливи съединения при газ-хроматографско разделяне. Алгоритъмът е лесно приложим и се основава само на 14 молекулни дескриптора.

Предложена е и процедура за предварително концентриране и отделяне на компонентите от матрицата чрез твърдофазна микроекстракция в газовата фаза над пробния разтвор (HS-SPME).

Количественият анализ е ориентиран към определяне на органофосфорни и органохлорни пестициди, които се определят като едни от най-опасните устойчиви органични замърсители с изключително ниски регулирани концентрации в редица обекти.

Разработени са две нови екологично ориентирани екстракционни процедури за групово разделяне и концентриране на общо 19 съединения чрез: микровълново-подпомогната екстракция при температура на коагулация (MW-CPE) и дисперсивна течно-течна микроекстракция, базирана на природен хидрофобен дълбоко-евтектичен разтворител (NADES-DLLME). За оптимизиране на процедурите са използвани методи за експериментален дизайн (Plackett-Burman и Central Composite Design), намалявайки

експерименталното натоварване, като същевременно се отчитат взаимодействията между факторите.

Комбинираните методи за предварително разделяне и концентриране, в съчетание с последващ GC-MS/MS анализ са систематично проучени, както по отношение на стабилността на хроматографската колона в присъствие на повърхностно активно вещество и NADES, така и от гледна точка на матрични ефекти и калибрационни стратегии.

„Зеленият“ характер на двата разработени метода за определяне на органохлорни и органофосфорни пестициди е оценен посредством популярен в научните среди консенсусен подход: *Analytical greenness metric for sample preparation* (AGREEprep). Вземайки предвид факта, че хроматографското разделяне, само по себе си, е бавен процес, ефективизирането на процедурата на оптимизация също може да се разглежда като „зелен“ принос при разработването на конкретен аналитичен метод.

И двата метода са приложени за определяне на пестициди в реални проби: MW-CPE-GC-MS/MS за плодови сокове (лимон, червена ябълка) и NADES-DLLME-GC-MS/MS за три марки бутилирана изворна вода.

5. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

Дисертационният труд е структуриран в пет основни раздела: литературен обзор (38 стр.); цели и задачи на изследването (1 стр.); експериментална част, която обхваща използваната апаратура, реактиви, стандартни разтвори, сертифицирани референтни материали, оптимизирани процедури за микроекстракция на органохлорни и органофосфорни пестициди в различни обекти (11 стр.); резултати и дискусии върху проведените изследвания (62 стр.), изводите, заключенията и приносите са обобщени в 2 стр. и списък на цитираната литература (306 източника). Цялостното изследване е визуализирано чрез 38 таблици и 25 фигури. Допълнително са представени 4 приложения, които съдържат химични структури на целевите аналити, фигури илюстриращи влиянието на някои параметри върху ефективността на екстракция и хроматограми.

Целта и съответните изследователски задачи на дисертационния труд са ясно формулирани.

Най-важните приноси могат да бъдат обобщени както следва:

- Разработен и валидиран е подход за идентифициране на летливи компоненти в етерични масла чрез GC-MS и GC-MS/MS. Предложен е нов регресионен модел за прогнозиране на линейни индекси на задържане (LRI), основан на множествена линейна регресия. Създадена е база данни от експериментално определени линейни индекси на задържане за над 120 съединения, съдържащи се в етерични масла (от роза, мента и лавандула), при използване на неполярна стационарна фаза.
- Разработени са два оптимизирани подхода за групово разделяне и концентриране на следови съдържания от органохлорни и органофосфорни пестициди чрез микро-екстракционни техники в съчетание с последващ GC-MS/MS анализ.
 - ✓ за първи път е приложена микровълново подпомогната CPE с Тритон X100, последвана от ре-екстракция в хексан (или изооктан) за предварително концентриране и последващ газ-хроматографски анализ на пестициди.
 - ✓ за първи път е предложен оригинален подход за групово разделяне и концентриране на пестициди чрез подпомогната от вортекс DLLME, при която екстрагент е

хидрофобен дълбоко-евтектичен разтворител, приготвен от компоненти с природен произход (ментол: деканова киселина) (NADES).

- ✓ За двете процедури за пробоподготовка са предложени адекватни калибрационни стратегии, отчитащи матричното влияние при последващ GC-MS/MS анализ.
- ✓ Предложените комбинирани аналитични методи за концентриране и количествено определяне на пестициди MW-CPE-GC-MS/MS и NADES-DLLME-GC-MS/MS са приложени за анализ на реални проби води и плодови сокове. Постигнатите методични граници на количествено определяне (MLOQ) са значително по-ниски от съответните регламентирани нормативни стойности.
- Доказано е, че двата разработени и валидирани метода притежават значително по-изразен „зелен“ характер, в сравнение с рутинно използваните методи за анализ на пестициди в питейни води и храни от растителен произход.

Някои от приносите на дисертационния труд надхвърлят конкретното изследване и имат по-общ научно-приложен и фундаментален характер.

- Показано е, че подходящото използване на математическо моделиране за предсказване на линейни индекси на задържане притежава значителен потенциал за разкриване на многокомпонентния състав при нецелев панорамен анализ на реални проби. Тази възможност не само освобождава аналитика от необходимостта от стандарти за идентификация на съединенията, но предлага възможност за откриване на подходящи маркери, позволяващи определянето на произхода на различни етерични масла или други природни обекти.
- Обогадени са знанията относно възможностите за комбиниране на CPE с хроматографски анализ. Показано е, че въвеждането на повърхностно активни вещества в хроматографската система може да доведе до повишаване на чувствителността, респективно намаляване на MLOQ.
- Разширени са възможностите на газ хроматографския анализ с маспектрометрична детекция при определяне на пестициди чрез комбиниране с предварително концентриране посредством DLLME, използваща като екстрагенти природни дълбоко-евтектични разтворители. Показано е, че NADES действа като „протектор“ за анализите, което води до повишаване на чувствителността.

6. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта

По темата на дисертацията са публикувани две статии в реферирани научни списания с висок импакт фактор, в които Ася Христозова е първи автор:

1) Hristozova, A., Simitchiev, K., Kmetov, V., Rosenberg, E., „*Compatibility of cloud point extraction with gas chromatography: Matrix effects of Triton X-100 on GC-MS and GC-MS/MS analysis of organochlorine and organophosphorus pesticides*“, Talanta, 2024, 269, 125445. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.125445>, (Scopus, SJR 2023=0.956, Q1). (5 забелязани цитата)

2) Hristozova, A., Batmazyan, M., Simitchiev, K., Tsoneva, S., Kmetov, V., Rosenberg, E., „*Headspace – Solid phase microextraction vs liquid injection GC-MS analysis of essential oils: Prediction of linear retention indices by multiple linear regression*“, Acta Chromatographica, 2024, 2025, 37 (1), 76–86., <https://doi.org/10.1556/1326.2024.01207> (Scopus, SJR 2023=0.344, Q2). (1 забелязан цитат)

Резултати от изследванията са представени в 8 постерни и 2 устни доклада на научни конференции и семинари в България и чужбина.

Ася Христозова е участник в изследователските екипи на четири научни проекта, два от които са с международно участие.

Общият наукометричен резултат от публикуваните статии е 45 (Q1 – 25 точки и Q2 – 20 точки), което надвишава *националните минимални изисквания за придобиване на ОНС „Доктор“* и изискванията на *Правилника за развитие на академичния състав на Пловдивски университет „Паусий Хилендарски“* (изискуеми 30 точки). Убедително доказателство за това

че докторантът активно е участвал както в експерименталното, така и в научното оформяне на публикациите и постерите е, че Ася Христовова е първи автор в публикуваните статии, както и във всички постерни доклади.

7. Автореферат

Авторефератът представя систематизирано, коректно и ясно основните постижения и приноси на дисертационния труд на Ася Христовова и отговаря на изискванията на Правилника на ПУ „Паисий Хилендарски“.

8. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Нямам забележки и препоръки към докторската дисертация, автореферата и представените материали.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд съдържа научни, научно-приложни и приложни резултати, които представляват **оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на ПУ „Паисий Хилендарски“**. Представените материали и дисертационни резултати напълно съответстват на специфичните изисквания на Факултета по Химия.

Ася Христовова демонстрира солидни теоретични знания и практически умения в аналитичната химия, което показва, че е придобила способност самостоятелно да планира, провежда и докладва научни изследвания..

Поради гореизложеното, **убедено давам своята положителна оценка за изследването, постигнатите резултати и декларираните приноси, представени в дисертационния труд и автореферата** и предлагам на уважаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „**доктор**“ на Ася Димитрова Христовова в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.2. Химически науки, докторска програма Аналитична химия.

8.05.2025 г.

Изготвил становището:

Доц. Д-р Виолета Стефанова