

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Вершинина Юлия Сергеевна

Извлечение белка подсолнечника и контроль его качества на содержание

фенольных соединений методами колебательной спектроскопии

Специальность 1.4.2. Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2025

Диссертация подготовлена на кафедре аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель: **Веселова Ирина Анатольевна**
доктор химических наук, доцент

Официальные оппоненты: **Дзантиев Борис Борисович**
доктор химических наук, профессор
Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
руководитель отдела лиганд-рецепторных
взаимодействий и биосенсорики, заведующий
лабораторией иммунобиохимии

Горячева Ирина Юрьевна
доктор химических наук, профессор
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Саратовский национальный исследовательский
государственный университет имени Н.Г.
Чернышевского», Институт химии, директор

Паренаго Ольга Олеговна
кандидат химических наук
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт общей и неорганической
химии имени Н.С. Курнакова РАН,
и.о. заведующего лабораторией сверхкритических
флюидных технологий

Защита диссертации состоится «17» декабря 2025 г. в 15 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.014.5 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, аудитория 446.

E-mail: dissovet02.00.02@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3629>

Автореферат разослан « » ноября 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук

И.А. Ананьева

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Одним из приоритетных направлений развития научно-технологического комплекса России, определяющих здоровье населения и сохранение его генофонда, является переход к высокопродуктивному и экологически чистому агро- и аквахозяйству, создание безопасных и качественных, в том числе функциональных, продуктов питания. Проблема качества, пищевой ценности и безопасности пищевых продуктов включает не только разработку перспективных технологий, но и усовершенствование существующих методов химического анализа, а также создание новых аналитических подходов контроля качества растительного сырья и продуктов его переработки.

Подсолнечник является одной из наиболее ценных сельскохозяйственных культур, выращиваемых на территории Российской Федерации, и наиболее рентабельной масличной культурой. Подсолнечный шрот – важнейший вторичный продукт получения масла благодаря высокому содержанию сырого протеина (около 40%), отличающегося от других масличных культур в первую очередь сбалансированным аминокислотным составом и практически полным отсутствием антипитательных веществ.

Однако на сегодняшний день применение подсолнечного шрота в пищевой промышленности все еще ограничено. Одной из главных причин является наличие в нем фенольных соединений (1-4%), в основном хлорогеновой кислоты, которая в условиях высоких значений pH и температуры легко окисляется и необратимо связывается с молекулами белка, придавая темно-зеленое окрашивание и горьковатый вкус конечному продукту.

В связи с этим одной из ключевых целей Стратегии развития агропромышленного комплекса до 2030 года является создание новых технологий производства и переработки сельскохозяйственной продукции, а концепция «Цифрового сельского хозяйства» включает в себя разработку быстрых скрининговых методов контроля качества как исходного сырья, так и конечного целевого продукта. Методы колебательной спектроскопии, к которым относятся рамановская и ИК-спектроскопия, могут одновременно обеспечить недеструктивный, в ряде случаев дистанционный, мультиплексный скрининговый анализ при определении биологически активных веществ на разных стадиях биотехнологического процесса без пробоподготовки объектов и привлечения высококвалифицированного персонала.

Цель работы

Разработка эффективных подходов к выделению белка из подсолнечного шрота для получения белковых изолятов высокой степени чистоты и контролю качества сырья и конечного продукта на содержание фенольных соединений с помощью методов колебательной спектроскопии.

Для достижения поставленной цели были решены следующие **задачи**:

- предложить способ и выбрать оптимальные условия (рН водной фазы, гидромодуль, температура, время, состав органической фазы) извлечения белка из подсолнечного шрота;
- предложить подходы к предотвращению связывания молекул белка с продуктами окисления фенольных соединений, содержащихся в исходном сырье, в условиях высоких значений рН и температуры;
- предложить подходы к увеличению степени извлечения белка по сравнению с существующими способами и повысить степень чистоты конечного белкового продукта;
- сравнить возможности различных классических методов определения белка (азотометрических, спектрофотометрических) с учетом матрицы исследуемого растительного объекта;
- разработать подходы к недеструктивному анализу сырья и конечного белкового продукта на содержание фенольных соединений методами ИК, КР и ГКР спектроскопии.

Научная новизна

Разработан новый эффективный способ извлечения белка из шрота подсолнечника и последующего его отделения от маточного раствора в присутствии органических растворителей методом флотации, который позволил значительно повысить степень извлечения (в среднем в 1.5 раза больше по сравнению с литературными данными) целевого вещества до (94±1) %.

Сочетание предложенного способа выделения белка с очисткой продукта методом сверхкритической флюидной СО₂ экстракции позволило получить изолят из шрота подсолнечника с чистотой (96±1) % и значительно сократить количество солевых отходов (не менее, чем в 40 раз по сравнению с литературными сведениями).

Для получения препаратов белка, не связанных с продуктами трансформации фенольных соединений, предложено внесение в реакционную смесь антиоксидантов, которые предотвращают окисление указанных соединений кислородом воздуха в условиях щелочной экстракции.

Разработан подход для определения общего количества белка в шроте и белковых препаратах подсолнечника, основанный на сочетании автоматизированного и экспрессного азотометрического метода Дюма в tandemе со спектрофотометрической методом Лоури для подтверждения белковой природы азота в реальном образце.

Разработан и апробирован на реальном объекте подход к недеструктивному анализу сырья и конечного белкового продукта на содержание фенольных соединений методами КР и ИК-спектроскопии.

Предложена ГКР сенсорная система на основе медной фольги, модифицированной наночастицами серебра, для экспрессного определения хлорогеновой и кофейной кислот в объектах с белковой матрицей.

Практическая значимость

Разработан лабораторный способ выделения белка из подсолнечного шрота методом флотации, который был масштабирован в 25 раз и апробирован на pilotной установке в инновационном центре ООО «Бирюч-НТ».

Разработана методика определения протеина в подсолнечном шроте с использованием автоматизированного и экспрессного азотометрического метода Дюма в тандеме со спектрофотометрическим методом Лоури для подтверждения белковой природы азота.

Разработана методика определения основного фенольного соединения подсолнечного шрота (хлорогеновой кислоты) методом ВЭЖХ с УФ-детектированием, которую можно использовать в качестве «золотого стандарта» для контроля содержания этого соединения на всех стадиях технологического процесса.

Предложена и апробирована методика определения хлорогеновой кислоты в подсолнечном шроте методом ИК-спектроскопии.

Предложена и апробирована ГКР-сенсорная система для экспрессного определения хлорогеновой и кофейной кислот в объектах с белковой матрицей.

Положения, выносимые на защиту

1. Извлечение белка из подсолнечного шрота водным раствором аммиака позволяет увеличить степень извлечения и сократить в 40 раз количество солевых отходов, а внесение в экстракционную систему антиоксиданта (бисульфита натрия) обеспечивает получение чистых белковых препаратов, не связанных с продуктами трансформации фенольных соединений.

2. Способ выделения подсолнечного белка из маточного раствора с использованием органического растворителя нефраса, а также выбор оптимальных значений pH маточного раствора и соотношения фаз обеспечивает выход белкового препарата более 90 масс.%, а применение сверхкритической флюидной экстракции в качестве дополнительной стадии очистки белка дает возможность получать изоляты высокой степени чистоты – (96±1) масс.%.

3. Предложенный подход, основанный на автоматизированном и экспрессном азотометрическом методе Дюма в тандеме со спектрофотометрическим методом Лоури позволяет определять содержание протеина как в подсолнечном шроте, так и в извлекаемом из него белковом препарате.

4. Разработанная методика определения основного фенольного соединения подсолнечного шрота (хлорогеновой кислоты) методом ВЭЖХ с УФ-детектированием

применима в качестве «золотого стандарта» для контроля содержания данного фенольного соединения на всех стадиях технологического процесса выделения белка из подсолнечного шрота.

5. Разработанная методика на основе метода ИК-спектроскопии обеспечивает недеструктивный анализ подсолнечного шрота на содержание хлорогеновой кислоты в диапазоне концентраций 0.5–10 мг/г, а предложенная методика на основе спектроскопии ГКР позволяет проводить экспрессное определение хлорогеновой и кофейной кислот в объектах с белковой матрицей в диапазоне концентраций 70-350 мкг/г и 36-180 мкг/г, соответственно.

Степень достоверности

Полученные в ходе работы результаты подтверждались большим объемом экспериментальных данных, осуществлением обработки полученных результатов методами математической статистики, применением современного спектрофотометрического, спектроскопического и хроматографического оборудования.

Соответствие паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует паспорту научной специальности 1.4.2. Аналитическая химия по областям исследований: методы химического анализа (химические, физико-химические, атомная и молекулярная спектроскопия, хроматография, рентгеновская спектроскопия, масс-спектрометрия, ядерно-физические методы и др.); методы маскирования, разделения и концентрирования; анализ объектов окружающей среды; анализ пищевых продуктов.

Апробация результатов исследования

Основные результаты работы докладывались на следующих конференциях:

2025 год: конференция «Оптические хемо- и биосенсоры», Саратов, Россия, 30 сентября – 2 октября 2025; XVIII Всероссийская конференция «Высокочистые вещества. Получение, анализ, применение», Нижний Новгород, Россия 8-10 сентября 2025;

2024 год: XXII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии, Федеральная территория «Сириус», Россия, 7-11 октября 2024; LUPANSHAN FORUM, advanced energy and nanomaterials, Гуюань, Китай, 10-14 августа 2024; XXXI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2024», Москва, Россия, 12-26 апреля 2024; XXVII Всероссийская конференция молодых ученых-химиков, Нижний Новгород, Россия 16-18 апреля 2024;

2023 год: II Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Ресурсосберегающие и экологобезопасные процессы в химии и химической технологии», Пермь, Россия, 21-24 ноября 2023; XXX Международная научная

конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2023», Москва, Россия, 10-21 апреля 2023;

2022 год: XXIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2022», Москва, Россия, 11-22 апреля 2022.

2021 год: XXVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2021», Москва, Россия, 12-23 апреля 2021.

Публикации

По материалам работы опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus, RSCI) и рекомендованных в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.2. Аналитическая химия.

Личный вклад автора

Результаты исследований получены лично автором, под его руководством или в сотрудничестве с коллегами. Личный вклад автора заключался в поиске, систематизации и анализе литературных данных по теме работы, а также подготовке, планирования и проведения экспериментов, обработке и анализе полученных результатов, подготовке материалов к публикации и представлении на конференциях. Образцы подсолнечного шрота предоставлены инновационным центром ООО «Бирюч-НТ». Сверхкритическая флюидная CO₂-экстракция осуществлена инженером ИНЭОС РАН Стамер Е.С., CHN-анализ образцов сырья и белковых продуктов выполнил к.х.н., м.н.с. МГУ им. М.В. Ломоносова Гармай А.В. Помощь с предоставлением оборудования и реагентов для проведения электрофореза оказал к.б.н., проектный менеджер ООО «Хайтест» Семенов А.Г. Моделирование колебательных спектров выполнила к.х.н., м.н.с. МГУ им. М.В. Ломоносова Еремина О.Е. В работах, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

Структура и объем работы

Работа имеет следующую структуру: список использованных сокращений, введение, обзор литературы, экспериментальная часть, результаты и их обсуждение (представлены в двух главах), заключение, список использованной литературы. Работа изложена на 141 странице, включая 55 рисунков и 34 таблицы. В списке литературы 198 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** описана актуальность выбранной темы, сформулирована цель и задачи исследования, раскрыта научная новизна и практическая значимость работы, степень ее апробации, структура и объем.

Обзор литературы

В обзоре литературы подробно рассмотрены и систематизированы данные об источниках растительного белка, в частности, подсолнечном шроте, его составе, способах извлечения белка и методах контроля его качества.

В **первой главе** представлена информация о росте интереса к развитию альтернативных источников белка, упомянуты и классифицированы наиболее важные его источники, приведен их состав и примеры использования в пищевой промышленности.

Вторая глава посвящена общим сведениям о подсолнечном шроте как потенциальному источнике пищевого белка, содержит информацию о аминокислотном составе белка подсолнечника, его технико-функциональных свойствах, а также способах получения белковых концентратов и изолятов.

В **третьей главе** приведена общая характеристика фенольных соединений растений, описаны фенол-белковых взаимодействия с их классификацией на ковалентные и нековалентные, перечислены известные способы очистки белков подсолнечника от присутствующих в шроте фенольных соединений.

Четвертая глава представлена в двух разделах. В разделе «Методы определения белка» описаны принципы основных методов анализа белка – азотометрических и биохимических, их недостатки и примеры использования. Раздел «Методы определения фенольных соединений» посвящен спектрофотометрическим, электрохимическим, хроматографическим методам анализа фенольных соединений, показана перспективность применения недеструктивных методов колебательной спектроскопии для оценки содержания данных соединений в растительном сырье.

Экспериментальная часть

Пятая глава содержит описание используемых в работе реагентов, материалов и оборудования, методик пробоподготовки и проведения экспериментов, расчетных формул.

Азотометрическое определение белка проводили с использованием CHNS/O-анализатора Perkin Elmer 2400 Series II CHNS/O Elemental Analyzer («Perkin Elmer Corporation», США). Образцы известной массы сжигали при температуре около 900°C в присутствии кислорода. Полученное содержание азота умножали на стандартный коэффициент пересчета – 6.25 для получения значения содержания белка в исследуемых образцах.

Для фракционирования белков использовали систему для вертикального электрофореза («Bio-Rad», США).

Поглощение растворов в УФ и видимой областях регистрировали с использованием спектрофотометра SPECTROstar Nano («BMG Labtech», Германия) с

точностью ± 0.002 опт. ед. Для измерения поглощения использовали кварцевые кюветы объемом 1 мл (с длиной оптического пути 0.2 см и 1 см) и 96-луночные полистирольные микропланшеты с объемом лунки 300 мкл («Corning», США).

Для проведения ВЭЖХ-анализа использовали систему Agilent 1200 («Agilent Technologies», Германия) со спектрофотометрическим детектором (длина волны 326 нм при ширине спектральной полосы 4 нм), оснащенную колонкой Synergi Hydro-RP («Phenomenex», США) размером 150×4.6 мм и диаметром частиц сорбента 4 мкм.

Инфракрасные спектры регистрировали на ИК-Фурье спектрометре Perkin Elmer SPECTRUM 3 («PerkinElmer», США) в режиме пропускания в диапазоне 2000-500 cm^{-1} .

Таблетки для КР-картирования формировали с помощью набора для прессования (9 мм) «PMY-B» (Китай). В качестве подложек использовали покровные стекла 24×24 mm^2 и 18×18 mm^2 , толщиной 0.15 мм («Deltalab», Испания).

Подготовку подложек осуществляли с использованием установки плазменной обработки УПО-12 (ООО «Микродатчик», Россия).

Исследования методом спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) и гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) проводили на конфокальном сканирующем рамановском спектрометре Horiba LabRam HR Evolution («HORIBA Ltd.», Япония), оснащенным линейно поляризованным лазером 514, 532, 632.8 и 785 нм, а также с помощью спектрометра Enspectr с использованием твердотельных лазеров с длинами волн 532 нм (50 мВт) и 785 нм (105 мВт) и рамановского комплекса на базе оптического микроскопа RM638 («Фотон-Био», Россия), использующего твердотельный лазер с длиной волны 638 нм (140 мВт).

Результаты и их обсуждение

Результаты и их обсуждение представлены в главах 6 и 7.

Шестая глава («Разработка подхода к выделению белка из подсолнечного шрота») посвящена выбору оптимальных условий экстракции, выделения белка из раствора и его дополнительной очистке.

При выборе оптимальных условий извлечения первой задачей было увеличение количества белка, переводимого в раствор из подсолнечного шрота. На основании литературных данных извлечение белка проводили в течение 30 мин при температуре 50-55°C во избежание его денатурации, варировании pH от 10 до 12 и гидромодуль от 15 до 25. В работе изучена возможность замены традиционно используемого в качестве растворителя гидроксида калия на аммиачный раствор, что способствовало уменьшению солевых стоков примерно в 40 раз. Эффективность извлечения оценивали по содержанию твердого остатка после фильтрации.

Для отделения нерастворимого остатка от маточного раствора белка сравнивали два способа: центрифугирование и фильтрацию через сито. Центрифугирование оказалось неэффективным, так как не удалось подобрать такие параметры (скорость,

время), чтобы белок оставался в растворе, а волокна и другие твердые частицы осаждались. Эффективного удаления твердого остатка удалось достичь при использовании сита с диаметром пор 40 мкм (40-50 мкм – средний размер растительных волокон).

Таблица 1. Содержание твердого остатка в образцах после извлечения белка ($n=3$, $P=0.95$)

рН	Гидромодуль	Содержание твердого остатка, %	
		Экстракция гидроксидом калия	Экстракция аммиачным раствором
12	15	43 ± 1	32 ± 1
	20	39 ± 1	35 ± 2
	25	34 ± 2	29 ± 1
11	15	60 ± 1	47 ± 1
	20	52 ± 3	39 ± 1
	25	50 ± 1	34 ± 1
10	15	62 ± 1	61 ± 2
	20	52 ± 2	54 ± 2
	25	52 ± 1	49 ± 1

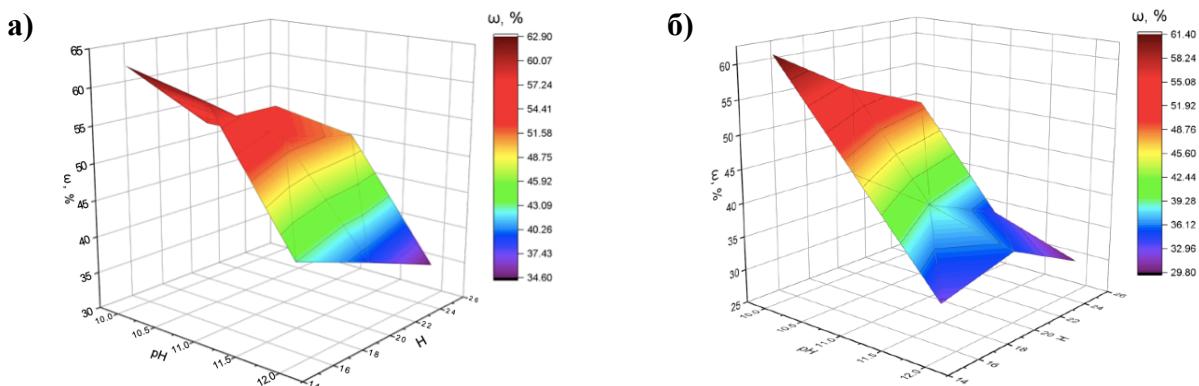


Рисунок 1. 3Д-диаграмма зависимости содержания твердого остатка от гидромодуля и рН при извлечении белка а) раствором гидроксида калия; б) аммиачным раствором.

С целью получения изолятов белка кремового цвета, что свидетельствует об отсутствии или следовых количествах фенольных соединений, оптимальными условиями извлечения выбраны использование аммиачного раствора в качестве растворителя, рН 11 и гидромодуль 25. С целью «защиты» белка от связывания с продуктами окисления фенольных соединений в условиях высоких рН и температуры изучали добавление антиоксидантов, разрешенных в пищевой промышленности, и выбрали бисульфит натрия в связи с его минимальной молекулярной массой.

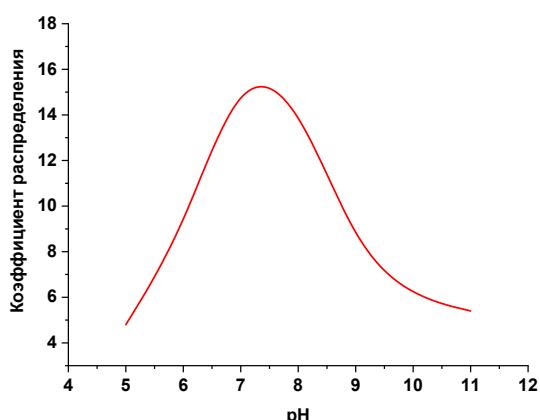
Выделяли белок из маточного раствора параллельно двумя способами: осаждением в изоэлектрической точке (ИЭТ) при pH около 4.5 и флотацией с помощью органического растворителя – толуола. Эффективность способа выделения оценивали по выходу конечного белкового продукта (таблица 2).

Таблица 2. Сравнение результатов выделения белка методами осаждения в ИЭТ и флотации ($n=3$, $P=0.95$)

Способ выделения белка	Исследуемая система	Содержание твердого остатка, %	Выход белкового продукта, %
Флотация	KOH	43 ± 1	10 ± 1
	KOH + NaHSO ₃	32 ± 1	24 ± 1
	NH ₃	27 ± 1	66 ± 1
	NH ₃ + NaHSO ₃	28 ± 2	68 ± 1
Осаждение в ИЭТ	KOH	46 ± 1	25 ± 1
	KOH + NaHSO ₃	34 ± 1	46 ± 1
	NH ₃	28 ± 1	37 ± 1
	NH ₃ + NaHSO ₃	27 ± 1	66 ± 1

Так, не только замена осаждения на флотацию, но и замена гидроксида калия на аммиак, а также внесение антиоксиданта после фильтрации позволяет значительно сократить потери белка (уменьшение содержания твердого остатка) и увеличить выход конечного белкового продукта.

Так как толуол является токсичным реагентом и частично ограничен в использовании в пищевой промышленности, в последующем было принято решение о его замене на нефрас, использующийся при экстракции масла из семян подсолнечника. Однако при флотации нефрасом образовывалась рыхлая пена, которую практически невозможно отобрать для последующей сушки. Для увеличения стабильности пены использовали природные сапонины, в частности – экстракт трибулуса.



Для повышения эффективности флотации изучали зависимость сорбции белка при варьировании pH маточного раствора от 5 до 11 (рисунок 2), а также выбирали оптимальное соотношения фаз маточный раствор : нефрас (таблица 3).

Рисунок 2. Зависимость коэффициента распределения от pH маточного раствора.

Таблица 3. Зависимость выхода белка от соотношения фаз ($n=3$, $P=0.95$)

Соотношение фаз маточный раствор : нефрас	Выход белкового продукта, %
1 : 0.75	52 ± 3
1 : 1	63 ± 2
1 : 1.25	58 ± 3
1 : 1.5	26 ± 2
1 : 2	11 ± 2

Из полученных данных можно сделать вывод, что оптимальным pH для выделения белка является 7, а максимальный выход белкового продукта достигался при соотношении фаз маточный раствор : нефрас – 1:1 и составлял (63 ± 2) %.

С целью получения изолятов с более высоким содержанием белка дополнительно очищали белковый продукт с помощью промывки растворителями (водой и 20% этианолом), барботированием углекислым газом и сверхкритической флюидной CO₂-экстракцией. Особо перспективным и экологически чистым методом является сверхкритическая флюидная CO₂-экстракция (СФЭ), с помощью которой удалось получить белковый изолят со степенью чистоты около (96 ± 1) %.

Таким образом, предложенный подход к получению белка из шрота подсолнечника имеет ряд преимуществ по сравнению с «классическим»:

1. Использование аммиачного раствора вместо гидроксида калия позволяет сократить количество солевых стоков примерно в 40 раз.

2. Предварительное внесение в щелочной раствор антиоксиданта (бисульфита натрия) на стадии извлечения белка предотвращает окисление фенольных соединений в условиях высоких значений pH и температуры.

3. Добавление антиоксиданта после отделения твердого остатка позволяет получить конечный продукт кремового цвета, что свидетельствует об отсутствии или следовых количествах фенольных соединений.

4. Замена стадии осаждения белка в ИЭТ на флотацию увеличивает достичь степени извлечения до 94 ± 1%.

5. С помощью дополнительной очистки белка сверхкритической флюидной CO₂-экстракцией возможно получить конечный белковый препарат высокой степени чистоты – около 96%.

Помимо выделения белка из подсолнечного шрота рассмотрели возможность введения в разработанную технологическую схему стадии извлечения фенольных соединений с целью их дальнейшего использования для создания новых продуктов с добавленной стоимостью. Для извлечения фенольных соединений использовали наночастицы магнетита (Fe₃O₄), модифицированные хитозаном, для эффективного

связывания с фенольными соединениями. Хитозан способен связывать как восстановленные, так и окисленные формы фенольных соединений, что могло способствовать большей степени очистки белкового препарата. Несмотря на то, что предложенный подход демонстрирует потенциал интегрирования стадии извлечения фенольных соединений при выделении белка из подсолнечного шрота, полученные результаты показывают, что эффективность извлечения не является полной – часть фенольных соединений остается в водной фазе. Кроме того, агрегация наночастиц при масштабировании всего процесса (в 10 раз) приводила к их быстрой седиментации и загрязнению белкового изолята.

В **седьмой главе** («Методы контроля качества белка подсолнечного шрота») рассмотрены классические методы определения белка и фенольных соединений, а также возможность недеструктивного анализа этих соединений.

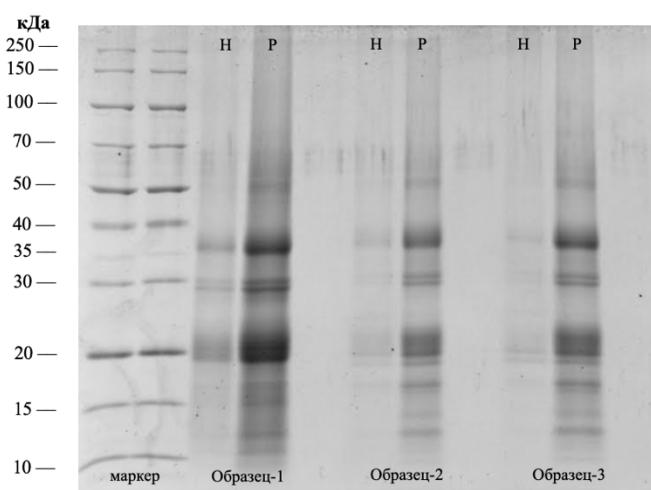
Первая часть главы посвящена определению белка в исходном сырье, образце, полученном по методике, разработанной в рамках докторской диссертационной работы, а также трех коммерческих образцах подсолнечного протеина. Для анализа использовали азотометрический метод Дюма и спектрофотометрические методы (прямой спектрофотометрический метод, метод Брэдфорда, метод Бенедикта, метод с бицинхониновой кислотой (БЦК) и метод Лоури).

Таблица 4. Содержание азота в образцах, определенное по методу Дюма, с пересчетом на содержание белка ($n=3$, $P=0.95$)

Образец	Содержание азота, %	Содержание белка, %
Подсолнечный шрот	8 ± 1	50 ± 1
Лабораторный образец	8 ± 1	50 ± 1
Коммерческий образец-1 (90%)	14 ± 1	88 ± 1
Коммерческий образец-2 (82.5%)	8 ± 1	50 ± 1
Коммерческий образец-3 (78%)	13 ± 1	81 ± 1

Общий недостаток азотометрических методов заключается в том, что они определяют азот независимо от того, является ли он органическим и входит в состав молекул белка или привнесен в продукт с посторонним азотсодержащим веществом. Как видно из полученных результатов (таблица 4), для коммерческого образца-2 с помощью метода Дюма получили заниженный результат содержания белка по сравнению с заявленным производителем.

Альтернативой являются биохимические методы, однако они широко применимы для определения индивидуальной формы белка. При переходе к растительным объектам, которые содержат разные белки как по природе, так и молекулярной массе, а также характеризуются сложным составом матрицы возникают сложности определения.



Методом гель-электрофореза определили фракционный состав трех коммерческих образцов подсолнечного протеина. Как видно на рисунке 3, все образцы содержат белки двух типов – солерасторимые глобулины и водорастворимые альбумины разной молекулярной массы.

Рисунок 3. Электрофорез растворимой (Р) и нерастворимой (Н) фракций подсолнечных белков.

По результатам проведенного электрофореза можно сделать вывод о том, что в исследуемых образцах присутствуют низкомолекулярные 2S альбумины (10-20 кДа) и диссоциированные 11S глобулины с молекулярной массой 30-50 кДа.

При анализе растительных объектов, которые содержат разные белки как по природе, так и молекулярной массе, а также характеризуются сложным составом матрицы, возникают сложности определения с помощью спектрофотометрических методов, так как они широко применимы только для определения индивидуальной формы белка.

Прямой спектрофотометрический метод имеет преимущество среди других подходов, так как не требует приготовления и использования дополнительных реагентов. Он основан на способности некоторых ароматических кислот белка (триптофана и тирозина) поглощать УФ свет при 280 нм. Однако известно, что белки отличаются по содержанию ароматических аминокислот, в связи с чем их поглощение в УФ-области спектра может сильно различаться.

Для установления возможности определения белка данным методом сравнили УФ-спектры поглощения растворов стандартного образца белка – бычьего сывороточного альбумина (БСА) – и трех коммерческих образцов белка подсолнечника (рисунок 4). У всех трех исследуемых образцов белка не наблюдается пика в области 280 нм, что может быть связано с различным аминокислотным составом БСА и белка подсолнечника, а также присутствием в исследуемых образцах мешающих матричных компонентов, например хлорогеновой кислоты с максимумом поглощения в области 330 нм. Таким образом, прямое спектрофотометрическое определение белка подсолнечника оказалось невозможным.

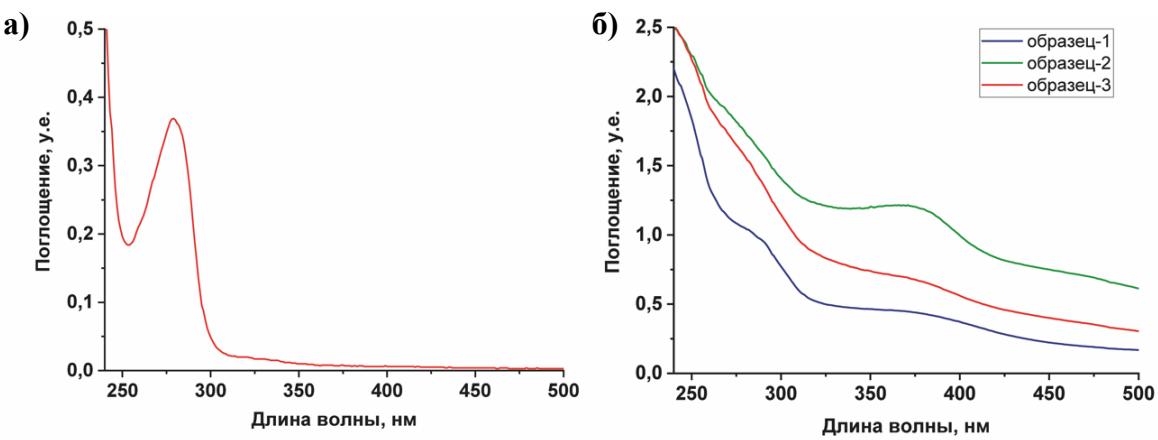


Рисунок 4. УФ-спектры поглощения а) БСА, б) трех коммерческих образцов подсолнечного белка.

При определении белка методом Брэдфорда критическое значение имеет природа белкового стандарта. Используемый в исследовании стандарт БСА обладает чрезмерным ответом на связывание с красителем кумасси и, таким образом, недооценивает содержание белка во всех трех исследуемых образцах.

При использовании методов Бенедикта и БЦК получены заниженные результаты содержания протеина для всех трех коммерческих образцов протеина по сравнению с заявленными производителями, что можно объяснить взаимодействием компонентов белковой матрицы с ионами меди или влиянием восстановливающих веществ.

При определении белка методом Лоури получены достоверные результаты, соответствующие заявленным (для образца-1 и образца-3). При этом достаточно высокая чувствительность метода (предел обнаружения 9.7 мкг/мл) позволяет исключить мешающее влияние компонентов матрицы (полисахаридов и фенольных соединений).

Таблица 5. Содержание белка в образцах подсолнечного протеина ($n=3$, $P=0.95$)

Исследуемый образец	Содержание белка, %			
	Метод Брэдфорда	Метод Бенедикта	Метод БЦК	Метод Лоури
Лабораторный образец	38 ± 1	55 ± 1	49 ± 1	55 ± 1
Коммерческий образец-1 (90%)	63 ± 1	91 ± 1	88 ± 1	89 ± 1
Коммерческий образец-2 (82,5%)	44 ± 1	54 ± 1	73 ± 1	54 ± 1
Коммерческий образец-3 (78%)	59 ± 1	62 ± 1	63 ± 1	77 ± 1

При определении белка методом Лоури в диапазоне 20-100 мкг/мл получены достоверные результаты, соответствующие заявленным (для образца-1 и образца-3). Достаточно высокая чувствительность данного метода позволяет исключить мешающие влияние компонентов матрицы (полисахаридов и фенольных соединений). Результаты содержания протеина для образца-1 и образца-3, определенные с помощью метода Лоури, соответствуют заявленным производителем и согласуются с результатами, полученными по методу Дюма (таблица 5).

Таким образом, установлено, что для определения общего количества белка наиболее подходящим является использование азотометрического метода Дюма в тандеме со спектрофотометрическим методом Лоури, в основе которого лежит реакция на пептидные связи.

Вторая часть данной главы посвящена разработке подходов к выделению и определению фенольных соединений подсолнечного шрота.

Для выделения фенольных соединений из первичного сырья навеску подсолнечного шрота растворяли в соответствующем растворителе (вода, 20% этанол, 50% этанол и 80% этанол). Процесс извлечения проводили в течение 5, 15 и 30 минут, после чего растворы центрифугировали, осадок отделяли, а надосадочную жидкость – фенольный экстракт – использовали для дальнейшего анализа. Для определения фенольных соединений в полученных экстрактах использовали спектрофотометрические методы Фолина-Чокальтеу и Берлинской лазури (таблица 6), а также метод ВЭЖХ (таблица 7).

Таблица 6. Результаты содержания фенольных соединений в экстрактах подсолнечного шрота, полученные с помощью методов Фолина-Чокальтеу (ФЧ) и Берлинской лазури (БЛ) ($n=3$, $P=0.95$)

Условия экстракции	Время экстракции, мин					
	5 мин		15 мин		30 мин	
	ФЧ	БЛ	ФЧ	БЛ	ФЧ	БЛ
	Содержание фенольных соединений, %					
H_2O	4.3 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.5 ± 0.1	4.7 ± 0.1	3.9 ± 0.1	5.3 ± 0.1
20% этанол	4.5 ± 0.1	4.8 ± 0.1	4.9 ± 0.1	5.2 ± 0.1	4.6 ± 0.1	5.1 ± 0.1
50% этанол	4.1 ± 0.1	5.3 ± 0.1	4.2 ± 0.1	5.2 ± 0.1	4.8 ± 0.1	5.5 ± 0.1
80% этанол	2.7 ± 0.1	3.5 ± 0.1	3.2 ± 0.1	3.7 ± 0.1	3.6 ± 0.1	4.4 ± 0.1

По полученным данным можно сделать вывод, что с увеличением времени извлечения растет содержание фенольных соединений в образцах, а также, что наиболее эффективным растворителем является 50% этанол.

Еще одним классическим методом определения фенольных соединений является метод ВЭЖХ. Подобраны хроматографические условия для определения трех основных фенольных кислот при их совместном присутствии в стандартном растворе (рисунок 5).

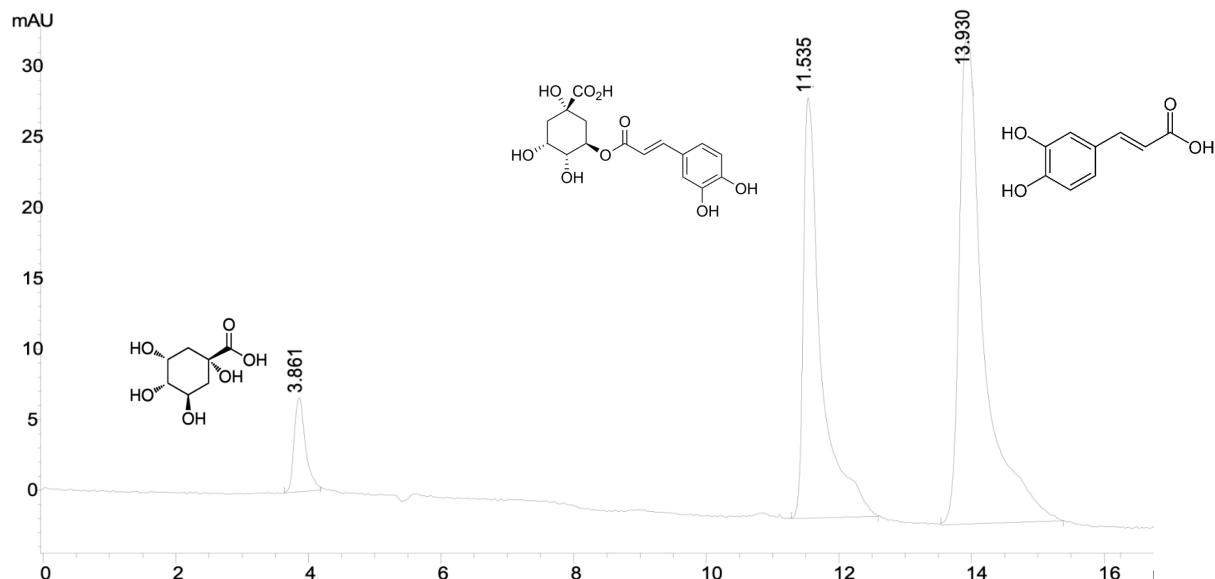


Рисунок 5. Хроматограмма модельного раствора трех фенольных кислот: хлорогеновой, кофейной и хинной (концентрация 0.4 мкг/мл).

Однако при переходе к реальному объекту выяснилось, что единственным присутствующим в нем фенольным соединением является хлорогеновая кислота. На хроматограммах (рисунок 6) расположение пика раствора стандартного образца соответствуют расположению пика исследуемого раствора, время удерживания хлорогеновой кислоты составляет около 2.5 минут.

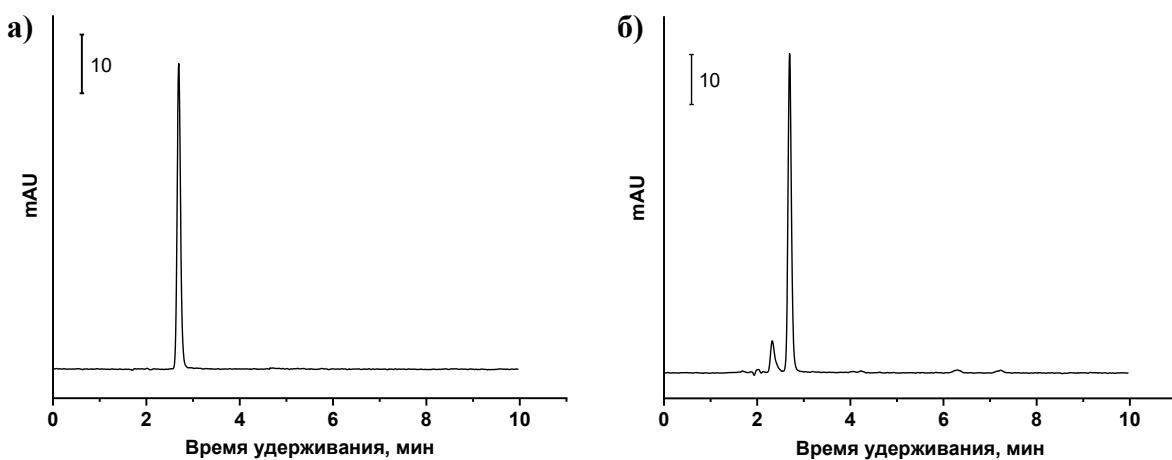


Рисунок 6. Хроматограммы а) стандартного образца хлорогеновой кислоты (концентрация 2 мкг/мл), б) экстракта подсолнечного шрота (50% этанол, 30 мин).

Таблица 7. Результаты определения хлорогеновой кислоты в подсолнечном шроте методом ВЭЖХ с УФ-детектированием ($n=3$, $P=0.95$)

Условия извлечения	Время удерживания хлорогеновой кислоты, мин	Содержание хлорогеновой кислоты в образце, %
H_2O , 30 мин	2.7	2.4 ± 0.1
20% этанол, 30 мин	2.7	3.3 ± 0.2
50% этанол, 30 мин	2.7	3.6 ± 0.2
80% этанол, 30 мин	2.7	3.1 ± 0.3

При определении хлорогеновой кислоты в образце лабораторного белка в тех же условиях ее содержание составило $(0.03 \pm 0.02) \%$, что почти в 100 раз меньше по сравнению с исходным растительным сырьем.

Далее в работе рассмотрели возможность недеструктивного анализа фенольных соединений методами колебательной спектроскопии. Критерием возможности проведения мультиплексного анализа методом ИК-спектроскопии является наличие индивидуальных характеристических полос для каждого соединения.

Как видно на рисунке 7, ИК-спектры исследуемых фенольных кислот накладываются друг на друга. Так как именно продукты окисления хлорогеновой кислоты необратимо связываются с молекулами белков, придавая продуктам на их основе нежелательное зеленое окрашивание, далее сосредоточились на разработке подходов к определению только этого соединения на фоне белковой матрицы и в растительном сырье. Характеристические полосы БСА не расположены в области «отпечатков пальцев», поэтому модельный белок не мешает определению хлорогеновой кислоты.

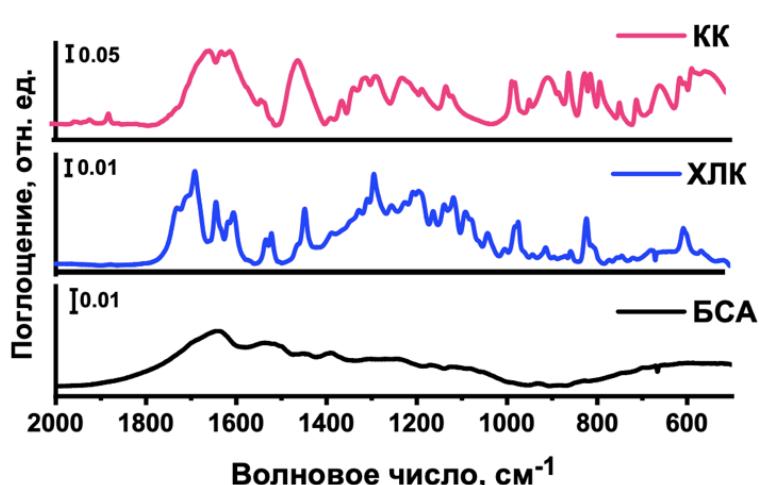


Рисунок 7. Сравнение ИК-спектров БСА, хлорогеновой и кофейной кислот.

На рисунке 8 представлены ИК-спектры хлорогеновой кислоты в матрице БСА и соответствующая градуировочная зависимость рассчитанных интегральных значений поглощения (для характеристической полосы в

области 1560 см^{-1}) от логарифма концентрации аналита в матрице БСА с коэффициентом корреляции 0.9995 (таблица 8).

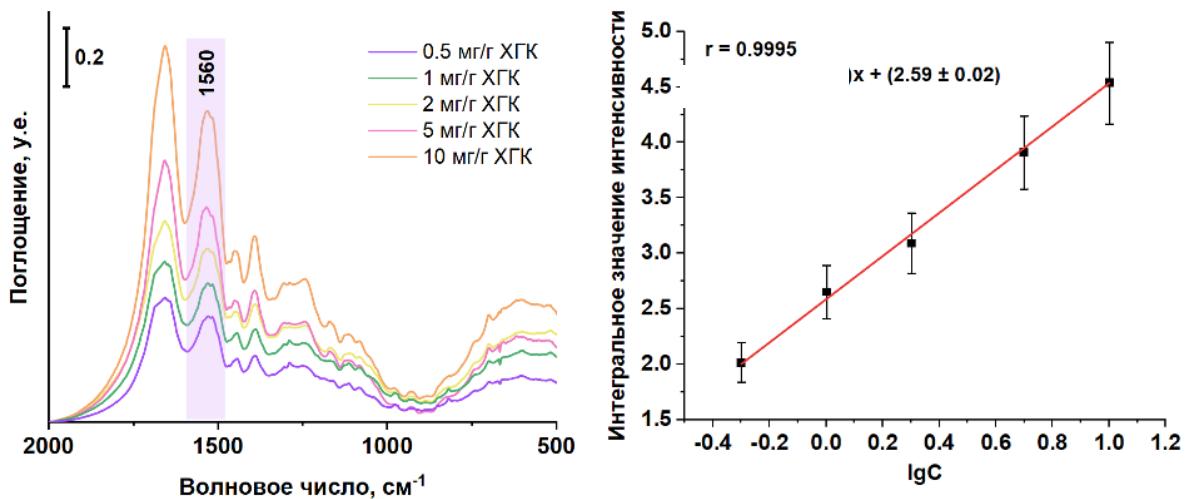


Рисунок 8. ИК-спектры модельных смесей хлорогеновой кислоты в матрице БСА и соответствующая градуировочная зависимость.

Таблица 8. Метрологические характеристики методики определения хлорогеновой кислоты в матрице БСА с помощью ИК спектроскопии ($n=3$, $P=0.95$)

Определяемое вещество	Диапазон определяемых содержаний, мг/г	C_{\min} , мг/г	Коэф. корреляции, r	s_r (при C_{\min} , $n=5$, $P=0.95$)
Хлорогеновая кислота	0.5 – 10	0.2	0.9995	0.18

Предел обнаружения хлорогеновой кислоты составляет 0.2 мг/г. При этом, в таблетке KBr он достигает довольно низких для ИК-спектроскопии значений – 2.7×10^{-3} мг/г (в матрице БСА).

На рисунке 9 представлены ИК-спектры подсолнечного шрота с добавленным содержанием хлорогеновой кислоты от 0.5 до 10 мг/г и соответствующая градуировочная зависимость рассчитанных интегральных значений поглощения (для характеристической полосы в области 1560 cm^{-1}) от логарифма концентрации аналита в матрице реального объекта с коэффициентом корреляции 0.9775 (таблица 9).

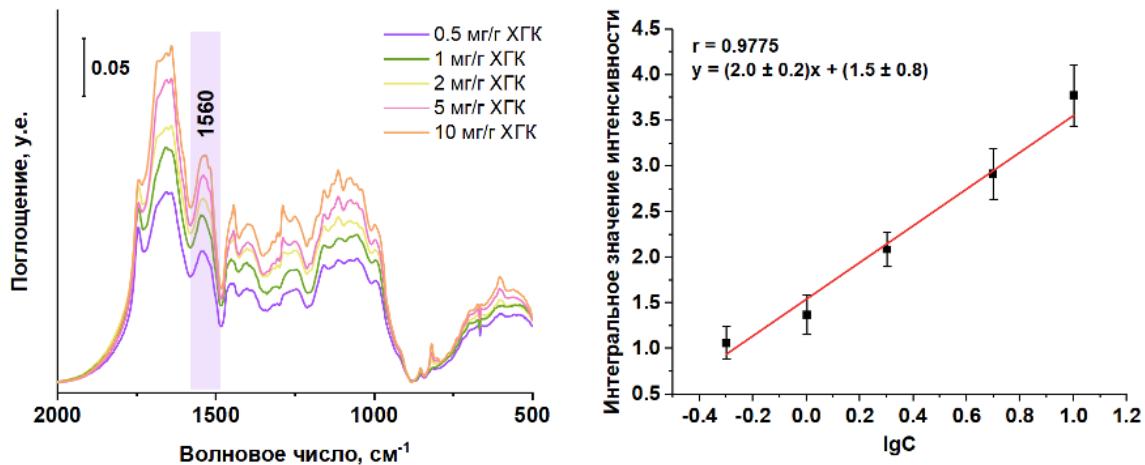


Рисунок 9. ИК-спектры подсолнечного шрота с добавлением хлорогеновой кислоты и соответствующая градуировочная зависимость.

Таким образом, метод ИК-спектроскопии позволяет определять содержание хлорогеновой кислоты в исследуемом растительном объекте с пределом обнаружения 2.7×10^{-3} мг/г (в пересчете на таблетку KBr).

Таблица 9. Метрологические характеристики методики определения хлорогеновой кислоты в подсолнечном шроте методом ИК-спектроскопии.

Определяемое вещество	Диапазон определяемых содержаний, мг/г	C_{\min} , мг/г	Коэф. корреляции, r	s_r (при $C_{\text{ниж}}$, $n=5$, $P=0.95$)
Хлорогеновая кислота	0.5 – 10	0.2	0.9775	0.12

Содержание хлорогеновой кислоты в исследуемом образце подсолнечного шрота, определенное с помощью метода добавок, составило (5.6 ± 0.8) мг/г.

На основании проведенного исследования и полученных результатов можно сделать вывод о том, что ИК-спектроскопия является подходящим методом для проведения простого недеструктивного экспресс-анализа первичного растительного сырья на содержание хлорогеновой кислоты.

Несмотря на то, что методика для определения вышеуказанного фенольного соединения методом ИК-спектроскопии имеет более широкий доверительный интервал, чем спектрофотометрические методы и ВЭЖХ, разработанный подход не требует предварительной пробоподготовки – экстракции фенольных соединений из матрицы белка и подсолнечного шрота. Это является значительным преимуществом, так как изменение условий (растворитель, время, температура) при пробоподготовке может увеличить или сократить содержание фенольных соединений в экстракте с величиной отклонения друг от друга на порядок больше доверительного интервала для каждого образца. Это делает аналитические характеристики сигнала, определяемого методом

ИК-спектроскопии, близкими к характеристикам, получаемым «классическими» методами.

Для установления потенциальной возможности определения фенольных кислот в реальном объекте и оценки мешающего влияния матрицы при идентификации этих соединений сравнили КР-спектры стандартного образца белка – БСА и трех фенольных кислот (рисунок 10а). Характеристические полосы фенольных кислот не перекрываются между собой, а также с БСА. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о том, что БСА обладает низким фоновым сигналом и не мешает определению фенольных кислот.

После этого, приготовили модельные смеси хлорогеновой и кофейной кислот в матрице БСА с массовым содержанием 10%, а также выбрали оптимальные условия для их регистрации (рисунок 10б). В выбранных условиях матрица белка не влияет на вид КР-спектров исследуемых соединений.

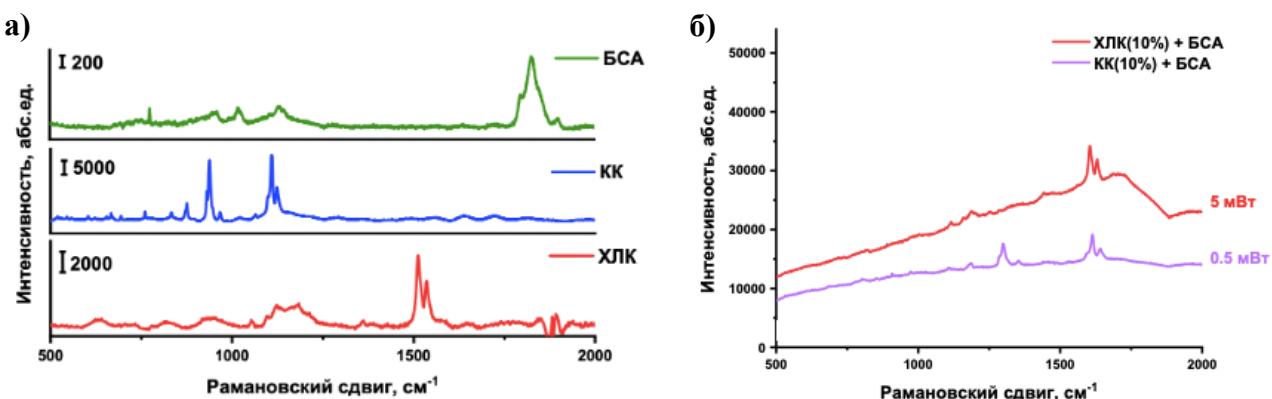


Рисунок 10. а) Сравнение КР-спектров БСА и фенольных кислот; б) КР-спектры фенольных кислот в матрице БСА (10 масс.-%).

Для построения градуировочных зависимостей (рисунок 11) с целью определения хлорогеновой кислоты и кофейной кислоты в белковой матрице проводили КР-картирование таблеток с шагом 555 мкм с помощью лазера $\lambda=532$ нм.

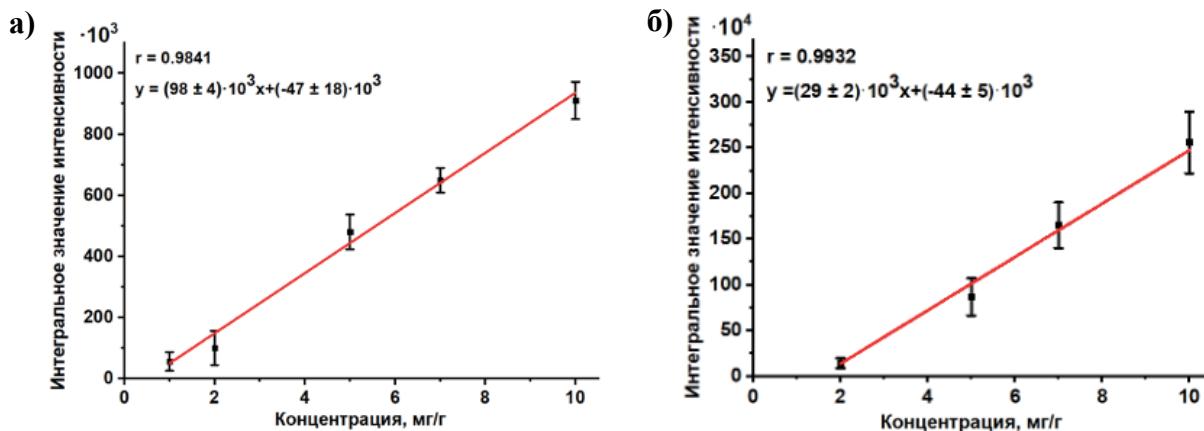


Рисунок 11. Градуировочные зависимости для определения а) хлорогеновой кислоты, б) кофейной кислоты в матрице белка.

Оценку влияния подсолнечного шрота на вид КР-спектров фенольных кислот проводили с использованием хлорогеновой кислоты, а также лазеров с длинами волн 532 и 785 нм. Готовили таблетки, содержащие 90 масс.% шрота и 10 масс.% хлорогеновой кислоты, после чего регистрировали их КР-спектры.

Под воздействием излучения с $\lambda=532$ нм сам шрот подсолнечника дает высокий фоновый сигнал. При добавлении хлорогеновой кислоты фон заметно снижается, однако добиться появления в спектре характеристических полос аналита не удается (рисунок 12а). В случае же лазера с $\lambda=785$ нм ситуация противоположная: шрот обладает низким фоновым сигналом, а при внесении хлорогеновой кислоты он резко возрастает (рисунок 12б), но, как и в предыдущих условиях, невозможно идентифицировать хлорогеновую кислоту в матрице шрота.

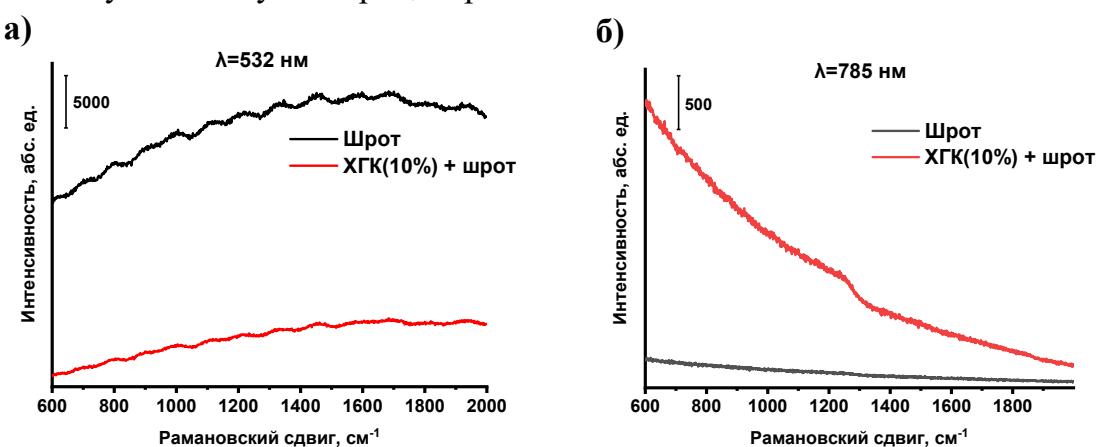


Рисунок 12. КР-спектры смеси 10 масс.% хлорогеновой кислоты и 90 масс.% подсолнечного шрота, а) $\lambda=532$ нм; б) $\lambda=785$ нм.

В целях повышения чувствительности определения фенольных соединений и улучшения соотношения сигнал/шум было предложено перейти от метода КР к методу гигантского комбинационного рассеяния (ГКР). Возможность применения метода спектроскопии ГКР изучали на сенсорной поверхности, состоящей из медной фольги, модифицированной наночастицами серебра (Cu-AgNP). На первом этапе зарегистрировали ГКР-спектры полученных сенсорных подложек и убедились в отсутствие сигналов, что исключает возможность спектральных наложений. Усиливающую способность сенсорного элемента проверили на раман-активном соединении родамине 6G.

При использовании подложки Cu-AgNP для хлорогеновой кислоты наблюдали характеристический пик в области 1251 cm^{-1} , а также линейную зависимость интегрального значения интенсивности сигнала от концентрации в диапазоне 70-350 мкг/г (рисунок 13).

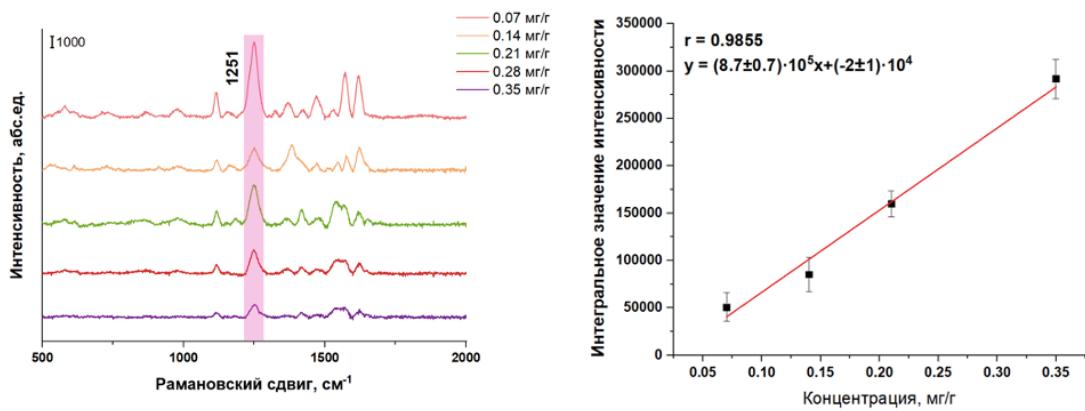


Рисунок 13. ГКР-спектры хлорогеновой кислоты и соответствующая градуировочная зависимость.

Для кофейной кислоты характеристические полосы наблюдали в области 1116 см^{-1} и, аналогично, линейную зависимость интегрального значения интенсивности сигнала от концентрации в диапазоне 36–180 мкг/г (рисунок 14).

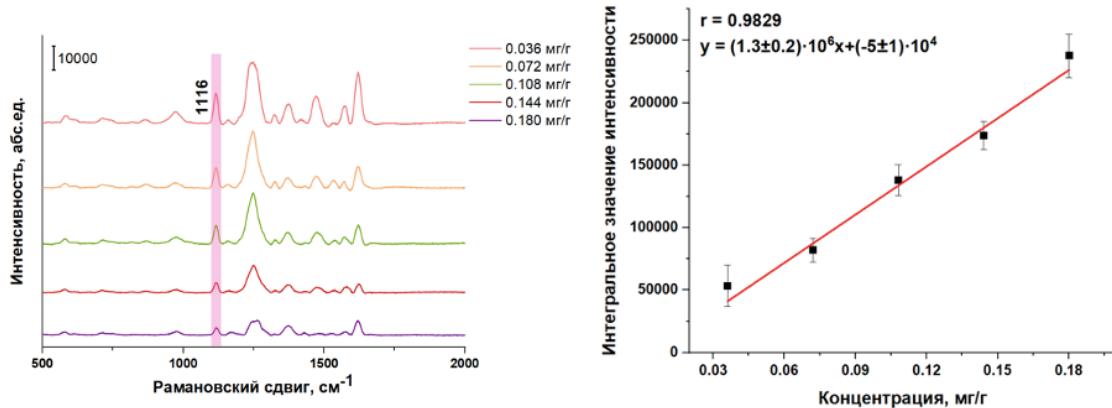


Рисунок 14. ГКР-спектры кофейной кислоты и соответствующая градуировочная зависимость.

Сравнение метрологических характеристик определения фенольных кислот методом ГКР-спектроскопии на двух типах сенсорных подложек представлено в таблице 10.

Таблица 10. Метрологические характеристики методики определения хлорогеновой и кофейной кислот методом ГКР-спектроскопии

Определяемое соединение	Диапазон определяемых содержаний, мкг/г	$C_{\min}, \text{мкг/г}$	Коэффиц. корреляции, r	s_r (при $C_{\min}, n=5, P=0,95$)
Хлорогеновая кислота	70 – 350	0.2	0.9855	0.12
Кофейная кислота	36 – 180	1.1	0.9892	0.09

Полученные результаты (таблица 9 и 10) демонстрируют, что при определении фенольных соединений методом спектроскопии ГКР возможно добиться предела обнаружения на три порядка ниже по сравнению ИК-спектроскопией. Такая высокая чувствительность делает ГКР спектроскопию предпочтительным методом для контроля следовых количеств фенольных соединений в высокоочищенных белковых препаратах. В то же время, ИК-спектроскопия является подходящим методом для экспресс-анализа исходного растительного сырья (подсолнечного шрот), где содержание фенольных соединений не требует столь низких пределов обнаружения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований поставленные задачи решены, а цель работы достигнута. Основные результаты, полученные в ходе выполнения работы, представлены ниже.

Изучено влияние основных параметров извлечения белка из подсолнечного шрота (рН и гидромодуль) из первичного растительного сырья. Предложена замена классического способа извлечения белка с использованием гидроксида калия в качестве растворителя на применение аммиачного раствора с целью сокращения нежелательных солевых стоков.

Установлены условия извлечения белка, при которых происходит его необратимое связывание с продуктами окисления фенольных соединений. Для решения этой проблемы впервые предложено добавление антиоксиданта в реакционную систему при сохранении оптимального рН раствора, а также внесение антиоксиданта в маточный раствор после отделения твердого осадка для получения конечного белкового препарата от белого до кремового цвета.

Впервые предложено выделение белка из маточного раствора с помощью флотации с использованием органического растворителя вместо его осаждения в изоэлектрической точке, что способствует увеличению степени извлечения белка. Выбраны оптимальные условия флотации: рН маточного раствора и соотношение фаз. В качестве растворителя предложено использовать нефрас, разрешенный для применения в пищевой промышленности, а для повышения устойчивости белковой пены – природные сапонины.

В качестве дополнительной стадии очистки с целью получения белковых изолятов высокой степени чистоты предложено использование сверхкритической флюидной СО₂-экстракции.

Разработанный в ходе исследования подход к выделению белка из подсолнечного шрота успешно масштабирован в 25 раз и апробирован на pilotной установке.

Установлено, что для определения общего количества белка в растительных объектах наиболее подходящим является использование азотометрического метода

Дюма в тандеме со спектрофотометрическим методом Лоури, в основе которого лежит реакция на пептидные связи. При этом, достаточно высокая чувствительность метода (предел обнаружения 9.7 мкг/мл) позволяет исключить мешающее влияние компонентов матрицы (полисахаридов и фенольных соединений).

Выбраны оптимальные условия выделения фенольных соединений из исходного сырья. С помощью ВЭЖХ определено, что основным фенольным соединением подсолнечного шрота является хлорогеновая кислота. Выбраны хроматографические условия для ее определения (предел обнаружения 0.01 мкг/мл), что можно использовать в качестве «золотого стандарта» для контроля ее содержания на всех стадиях технологического процесса.

С использованием метода ВЭЖХ подтверждено, что с помощью разработанного подхода удается сократить содержание хлорогеновой кислоты в получаемом белковом препарате примерно в 100 раз по сравнению с исходным сырьем.

Разработан подход к недеструктивному анализу хлорогеновой кислоты в первичном растительном сырье с помощью ИК-спектроскопии с пределом обнаружения 0.2 мг/г. Результаты определения хлорогеновой кислоты в образце подсолнечного шрота данным методом подтверждены ВЭЖХ, а также двумя спектрофотометрическими методами. Продемонстрирована принципиальная возможность оценки качества белковых препаратов (по содержанию хлорогеновой и кофейной кислот) методом спектроскопии ГКР в диапазоне концентраций 70 – 350 мкг/г для хлорогеновой и 36 – 180 мкг/г для кофейной кислоты.

Таким образом, можно сделать следующие **выводы**:

1. Предложен способ выделения белка из маточного раствора методом флотации с использованием органических растворителей. Выбраны оптимальные значения pH маточного раствора и соотношение фаз, которые позволяют достичь повышения выхода белкового препарата до 90–96 масс. % и сокращения количества солевых отходов по сравнению с литературными аналогами в 40 раз.

2. Разработан способ предотвращения окисления фенольных соединений кислородом воздуха в условиях выделения белка подсолнечника для получения чистых протеиновых препаратов.

3. Предложена методика определения основного фенольного соединения подсолнечного шрота – хлорогеновой кислоты – методом ВЭЖХ с УФ-детектированием с пределом обнаружения 0.01 мкг/мл.

4. Разработан способ контроля качества подсолнечного белка по его содержанию в исходном сырье и продуктах переработки с использованием автоматизированного и экспрессного азотометрического метода Дюма в тандеме со спектрофотометрическим методом Лоури (предел обнаружения 9.7 мкг/мл) для подтверждения белковой природы азота в растительном сырье.

5. На примере определения хлорогеновой кислоты в подсолнечном шроте разработан подход к недеструктивному анализу растительного сырья и продуктов его переработки на содержание фенольных соединений методами ИК-спектроскопии с пределом обнаружения 0.2 мг/г и КР спектроскопии с пределом обнаружения 0.5 мг/г.

6. Для контроля содержания хлорогеновой и кофейной кислот в белковых изолятах разработана методика их определения методом ГКР с использованием сенсорного элемента на основе меди и наночастиц серебра (Cu-AgNP) с пределами обнаружения 0.2 и 1.1 мкг/г, соответственно.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

Научные статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI и рекомендованных для защиты в докторской диссертации МГУ по специальности 1.4.2.

Аналитическая химия:

1. *Yulia S. Vershinina, Ilya V. Mitin, Andrey V. Garmay, Gleb K. Sugakov, Irina A. Veselova*. Simple and Robust Approach for Determination of Total Protein Content in Plant Samples // Foods. 2025. V. 14(3). P. 358. EDN: WOFYHX. – 1.27 п.л. Вклад автора 70%. Импакт-фактор 4,2 (JIF).

2. *Yulia S. Vershinina, Elizaveta V. Reshetnikova, Lv Sh., Irina V. Kolesnik, Olesya O. Kapitanova, Irina A. Veselova*. Raman and IR spectroscopy as a promising approach to rapid and non-destructive monitoring of chlorogenic acid in protein matrices // Frontiers in Chemistry. 2025. V. 13 No. 1543663. EDN: IUDVDP. doi: 10.3389/fchem.2025.1543663 – 1.27 п.л. Вклад автора 70%. Импакт-фактор 5,1 (JIF).

3. *Vladislav R. Khabibullin, Daria-Maria V. Ratova, Ksenia O. Andreeva, Yulia S. Vershinina, Ivan V. Mikheev, Sergei N. Shtykov, Mikhail A. Proskurnin*. Photothermal evaluation of aqueous magnetitnanodispersions: accuracy, precision and limitations // Molecules. 2025. V. 30(20). P. 4084. doi: 10.3390/molecules30204084. – 2.77 п.л. Вклад автора 30%. Импакт-фактор 4,6 (JIF).

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность и признательность своему научному руководителю, д.х.н., профессору Веселовой Ирине Анатольевне, за поддержку, терпение и помошь на всех этапах выполнения докторской диссертации; к.х.н. Капитановой Олесе Олеговне за постоянное внимание к исследованиям автора и ценные советы.

Автор благодарит к.х.н. Гармая Андрея Владимировича за проведение СН-анализа; к.х.н. Колесник Ирину Валерьевну за помошь в регистрации ИК-спектров и интерпретации результатов; Ларионова Дмитрия Сергеевича за помошь в осуществлении лиофильной сушки образцов; Стамер Екатерину Станиславовну за

проведение сверхкритической флюидной экстракции; к.х.н. Болотника Тимофея Александровича и к.х.н. Тимченко Юрия Валерьевича за помощь с определением фенольных соединений методом ВЭЖХ; к.б.н. Семенова Александра Геннадьевича за помощь с проведением электрофореза; к.х.н. Еремину Ольгу Евгеньевну за проведение квантово-химических расчетов; Решетникову Елизавету и Митина Илью, студентов, кто помогал с экспериментами в рамках дипломных работ.

Автор благодарит Химический факультет МГУ и научно-преподавательский состав кафедры аналитической химии за возможность заниматься современными научными исследованиями.

Особую благодарность автор выражает родителям, друзьям и всему коллективу лаборатории биоаналитических методов и оптических сенсорных систем за бесценную помощь и моральную поддержку.

Автор выражает благодарность ООО «Бирюч-НТ» за финансовую поддержку ряда выполненных исследований.

Диссертация подготовлена в рамках проекта «Проект «Чистая вода» как важнейшая составляющая сотрудничества Российской Федерации со странами глобального Юга: социально-экономические и технологические аспекты», поддержанного грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по программе научных исследований по приоритетным направлениям развития научно-технического прогресса (Соглашение № 075-15-2024-546), и госзадания «Создание функциональных материалов, высокоэффективных способов и средств химического анализа для мониторинга и прогнозирования состояния окружающей среды, перехода к высокопродуктивному и экологически чистому агро- и аквахозяйству, персонализированной медицине, технологиям здоровьесбережения, создания безопасных и качественных продуктов питания, лекарственных препаратов» (Номер ЦИТИС АААА-А21-121011990021-7).

Исследования проводились с использованием оборудования Центра коллективного пользования научным оборудованием МГУ по программе «Технологии получения новых наноструктурных материалов и их комплексное исследование», созданной в рамках Программы обновления оборудования (Национальный проект «Наука») и Программы развития МГУ.