

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

Химический факультет

На правах рукописи



Рукоосуева Елизавета Алексеевна

**Классификация объектов анализа по данным флуориметрии с
использованием добавок флуорофоров («флуоресцентный глаз»)**

02.00.02 – Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
д.х.н. Беклемишев М.К.

Москва - 2021

Оглавление

Введение	4
Глава 1. Обзор литературы	9
1.1. Методы «отпечатков пальцев» в химическом анализе	9
1.1.1. Флуориметрия	10
1.1.2. Хроматография	22
1.1.3. Электрохимические методы	26
1.1.4. ИК-спектроскопия	28
1.1.5. УФ-спектроскопия.....	30
1.2. Математическая обработка сигнала в методах «отпечатков пальцев».....	32
1.2.1. Обработка массивов данных	33
1.2.2. Метод главных компонент.....	35
1.2.3. Линейный дискриминантный анализ (<i>LDA</i>)	37
1.2.4. Метод опорных векторов (<i>SVM</i>).....	38
Глава 2. Экспериментальная часть	43
2.1. Исходные вещества, аппаратура, обработка результатов измерений, методики эксперимента.....	43
2.1.1. Исходные вещества.....	43
2.1.2. Аппаратура	43
2.1.3. Методики эксперимента.....	44
2.2. Обработка результатов измерений	49
2.2.1. Анализ спектров флуоресценции	49
2.2.2. Обработка фотографий.....	50
2.2.3. Оценка эффективности дискриминации.....	50
Глава 3. Результаты и их обсуждение	53

3.1. Оценка дискриминирующей способности флуорофоров с помощью искусственных смесей аналитов	53
3.1.1. Выбор флуорофоров	53
3.1.2. Предварительная оценка свойств смесей флуорофоров	56
3.1.3. Дискриминация смесей аналитов	59
3.1.4. Сравнение дискриминации модельных смесей по спектрам поглощения и флуоресценции	63
3.1.5. Полуколичественный анализ модельных смесей	66
3.2. Пути повышения дискриминирующей способности метода "флуоресцентный глаз"	69
3.2.1. Выбор условий регистрации и способов предобработки данных	69
3.2.2. «Виртуальное» смешивание флуорофоров	80
3.2.3. Закрепление флуорофора на наночастицах носителя как способ повышения вероятности его взаимодействия с аналитами	84
3.3. Способы оценки качества дискриминации образцов	86
3.3.1. Понятие «качества дискриминации»	86
3.3.2. Оценка качества дискриминации в случае не полностью разделенных образцов	87
3.4. Применение метода к реальным объектам	98
3.4.1. Смеси модельных аналитов в плазме крови	98
3.4.2. Дискриминация продуктов питания и напитков	103
3.5. Заключение	119
Выводы	121
Список цитируемой литературы	123

Введение

В настоящее время активно развиваются методы анализа, позволяющие сравнивать, различать и классифицировать объекты сходного состава. Состав таких объектов может различаться вследствие разнообразия в источниках происхождения, времени хранения, введения добавок и т. п. Как правило, методы классификации состоят из трех этапов. Первый этап включает получение многомерных сигналов (спектров различной природы, хроматограмм или данных с электрохимических сенсоров). На втором этапе полученные данные обрабатывают как целое методами математической статистики без идентификации отдельных компонентов. В связи с последним обстоятельством подобные подходы получили название методы «отпечатков пальцев». В таких методах образцы различают по их индивидуальным сигналам, не углубляясь в выяснение причин этих различий. На последнем этапе образцы сравнивают (классифицируют), используя математические критерии.

Методы «отпечатков пальцев» просты, экспрессны и не требуют сложной (или вообще никакой) пробоподготовки, поэтому их широко применяют при контроле качества, выявлении фальсификации пищевых продуктов, установлении производителя, определении сортов продукта, анализе алкогольных напитков, почв и т. д. Традиционно в этой области развивались методы, основанные на использовании электрохимических («электронный язык») и газовых сенсоров («электронный нос»). Однако в последнее время все больший оборот набирает развитие спектральных методов «отпечатков пальцев». Эти методы, основанные на УФ-видимой и ИК-спектроскопии и флуоресценции, отличаются еще большей простотой и возможностью получать другие виды данных.

В флуориметрических методах «отпечатков пальцев» используют, как правило, эмиссию, полученную по спектрам собственной флуоресценции объектов, однако она может быть малоинтенсивной, а получаемые спектры часто недостаточно уникальны для решения задач классификации. В связи с этим интересно адаптировать флуориметрические методы «отпечатков пальцев» для классификации слабо флуоресцирующих объектов (в том числе не поглощающих в

УФ-области), а также объектов, недостаточно эффективно дискриминируемых по спектрам собственной флуоресценции. Это позволило бы расширить круг анализируемых объектов. Кроме того, актуальным является сокращение времени, затрачиваемого на получение спектральной информации.

Одним из эффективных путей решения этих проблем является добавление к объекту флуорофоров, изменяющих интенсивность эмиссии в результате взаимодействия с компонентами образца, с последующей хемометрической обработкой спектров эмиссии. Первая работа в этом направлении была выполнена коллективом из США в 2007 г., и с тех пор несколькими группами исследователей опубликовано около 20 статей.

Цель работы. Развитие флуоресцентного метода «отпечатков пальцев», основанного на добавлении флуорофоров к анализируемому объекту.

Для достижения поставленной цели было необходимо решение следующих задач:

1) Выбрать или синтезировать флуорофоры, перекрывающие спектрами эмиссии значительную часть видимого спектра, изучить их стабильность в водных растворах и взаимное влияние на флуоресценцию друг друга.

2) Изучить возможность дискриминации модельных аналитов (лекарственных препаратов различного строения) и их 2-4-компонентных смесей с использованием различных флуорофоров и их 2-5-компонентных смесей в водном растворе и сложных матрицах (плазме крови).

3) Изучить возможность перехода от спектров флуоресценции к цифровым фотографиям при дискриминации образцов, а также возможность использования «виртуальных» смесей флуорофоров. Найти наилучшие способы обработки аналитического сигнала.

4) Предложить удобный способ оценки качества дискриминации образцов при их неполном разделении на графиках счетов.

5) Выбрать наиболее эффективные флуорофоры и предложить способы дискриминации реальных объектов (виски, мед и др.).

6) Сформулировать практические рекомендации по использованию флуориметрического метода «отпечатков пальцев».

Научная новизна. В флуоресцентном методе «отпечатков пальцев», основанном на добавках флуорофоров к образцам, предложено использовать более доступные флуорофоры, чем в работах предшественников: как коммерческие (квантовые точки), так и впервые полученные нами легко синтезируемые флуорофоры: основание Шиффа, полученное из полиэтиленimina и *o*-фталевого диальдегида; родамин В и флуоресцеин, иммобилизованные на наночастицах кремнезема, нековалентно модифицированных полиэтиленiminiном. Выявлено, что иммобилизация флуорофора на наночастицах усиливает влияние модельных аналитов на его эмиссию.

Показана возможность различения четырех модельных аналитов, их попарных и тройных искусственных смесей.

Показана возможность использования «виртуального» смешивания флуорофоров как способа преодоления взаимного тушения эмиссии флуорофоров в смесях.

Выработаны новые методические приемы, упрощающие дискриминацию образцов: переход от регистрации спектров флуоресценции к цифровой фотографии флуоресцирующих растворов образцов, использование контрастирования и нормировки изображений. Найдено, что качество дискриминации по фотографиям часто не уступает таковому по спектрам эмиссии.

Предложено использовать число взаимных пересечений доверительных эллипсов на графиках счетов метода главных компонент как меру качества дискриминации объектов и, соответственно, меру эффективности флуорофоров или их смесей. Число пересечений коррелирует с общей чувствительностью и числом дискриминированных групп.

Практическая значимость. Сформулированы практические рекомендации по дискриминации объектов различных типов флуориметрическим методом «отпечатков пальцев», включающие выбор между традиционным методом и методом с добавками флуорофоров, выбор флуорофора, описание способа получения цифровых фотографий и обработки данных.

Предложен способ дискриминации сортов виски с помощью только одного, причём коммерчески доступного флуорофора ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) на примере 16-ти образцов (полное разделение).

Предложен способ классификации сортов меда с помощью флуорофоров $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ и тиазолового оранжевого в присутствии дезоксирибонуклеиновой кислоты на примере 36-ти образцов (дискриминация на 14 групп).

Положения, выносимые на защиту:

1. Синтезированные новые флуорофоры (основание Шиффа, полученное из полиэтиленimina и о-фталевого диальдегида, родамин В и флуоресцеин, иммобилизованные на наночастицах кремнезема, нековалентно модифицированном полиэтилениминном) могут быть использованы для классификации искусственных смесей веществ и реальных образцов продуктов питания и пищевого сырья при помощи методологии "отпечатков пальцев".

2. Использование смеси четырех флуорофоров-реагентов позволяет разделить на классы двух-, трех- и четырех компонентные смеси лекарственных веществ в водных растворах и плазме крови за счет того, что аналиты различной природы в разной степени и направлении влияют на сигналы флуоресценции каждого из реагентов.

3. Переход от регистрации спектров флуоресценции растворов исследуемых образцов к получению цифровых изображений с последующим их контрастированием и нормировкой упрощает дискриминацию сложных смесей веществ по сравнению с полноспектральным анализом и ускоряет анализ.

4. Число взаимных пересечений доверительных эллипсов на графиках счетов метода главных компонент можно использовать как меру чувствительности и качества дискриминации объектов при использовании флуорофоров или их смесей при помощи методологии "отпечатков пальцев".

Степень достоверности. Полученные в ходе работы результаты подтверждались статистически значимой воспроизводимостью экспериментальных данных.

Публикации и апробация работы. По теме диссертационной работы опубликовано 10 печатных работ: из них 5 статей в российских и зарубежных

журналах, в том числе 5 статей в журналах, индексируемых Web of Science и Scopus, рекомендованных Диссертационным советом МГУ для публикации результатов диссертационных работ, представлено 5 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

Результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: XXIV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2017" (Москва, МГУ, 2017 г.), Третий съезд аналитиков России (Москва, 2017 г.), XXV Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, МГУ, 2018 г.), XXVI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, МГУ, 2019 г.), III Всероссийская конференция по аналитической спектроскопии (Туапсе, 29 сентября – 5 октября 2019 г.).

Структура и объем диссертационной работы. Представленная диссертационная работа изложена на 136 страницах текста, включает 40 рисунков и 24 таблицы. Работа состоит из введения, 2-х глав обзора литературы, главы, представляющей результаты исследований и их обсуждение и состоящей из 4-х частей, заключения, выводов и списка литературы, включающего 133 источника.

Личный вклад автора заключался в поиске, систематизации и анализе данных литературы по теме работы; планировании, постановке и проведении экспериментов; обработке и интерпретации полученных результатов; подготовке к публикации результатов проведенных исследований.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Методы «отпечатков пальцев» в химическом анализе

Ощущения вкуса и обоняния являются результатом ряда специфических и неспецифических событий, которые протекают параллельно. В некоторых случаях существуют рецепторы, селективные к отдельным анализам, но в большинстве случаев вкусовые вещества и компоненты запахов идентифицируются через совокупность неспецифических взаимодействий. Существуют шаблоны вкуса или запаха, на которые рецепторы дают определенный ответ. Например, язык млекопитающих имеет вкусовые рецепторы, которые отвечают четырем категориям вкуса: сладкий, кислый, соленый и горький. Сочетание этих четырех сигналов дополненное обонянием дает особый образец каждого вкуса. В последние десятилетия химики-аналитики пытаются найти всевозможные имитации подобных систем. Такие методы называют методы «отпечатков пальцев». Они нацелены на получение как можно большего количества особенностей об объекте изучение, чтобы получить всестороннее понимание о составе образца.

Методы распознавания образцов по «отпечаткам пальцев» используют в качестве аналитического сигнала спектры, хроматограммы или вольтамперограммы и т. д., которые обрабатывают как единое целое без идентификации сигналов хемометрическими методами. По своей сути, такие методы позволяют распознавать образцы (т.е. отличать один от другого) или одновременно определять несколько аналитов [1]. Дискриминация образцов методами «отпечатков пальцев» полезна в решении ряда задач: выявление фальсификации пищевых продуктов [2, 3], и пищевых добавок [4], определять производителя [5], различать виды масел [6], алкогольные напитки [7] и почвы [8], определять пол по дактилограмме [9] и идентифицировать пациентов со злокачественной опухолью полости рта [10]. «Электронные языки», которые обычно используют 15-20 электрохимических датчиков, близки к таким методам [11]. Методы «отпечатков пальцев», основанные на УФ-видимой [9] или флуоресцентной спектроскопии [2, 3, 12, 13, 14], получили широкое внимание для

распознавания сложных образцов из-за их относительной простоты и доступности приборов. Тем не менее, большинство исследований направлены на дискриминацию отдельных аналитов, таких как белки [15], ионы металлов [16] – такие сенсорные системы называют «химическими носами» и «электронными языками» [17]. Другие исследования направлены на дискриминацию образцов с целью аутентификации и оценки качества продуктов питания и напитков [18]. При решении таких проблем эффективна комбинация (слияние) аналитических сигналов с различных инструментальных методик [19].

1.1.1. Флуориметрия

Флуоресцентная спектроскопия – это быстрый, чувствительный и неразрушающий аналитический метод анализа «отпечатков пальцев» объектов различной природы. Спектры флуоресценции обычно состоят из широких перекрывающихся полос эмиссии, содержащие, как химическую, физическую, так и структурную информацию компонентов образца. Данная аналитическая информация многомерна по своей природе, а, следовательно, неселективна. Кроме того, различия между образцами могут вызывать трудноразличимые спектральные данные. В связи с этим, информацию из данных спектров возможно извлекать с помощью различных методов многомерного анализа.

Флуориметрические методы «отпечатков пальцев» можно разделить на два варианта. В первом варианте аналитическим сигналом является собственная флуоресценция компонентов образца. Этот подход широко изучается, и применим к большинству реальных объектов, включая продукты питания и напитки. Он основан на получении спектров флуоресценции образцов, обработки данных методами хемометрики, и проведение дальнейшей классификации образцов. Такие системы не требуют создания специального аналитического инструмента, но при этом позволяют анализировать многокомпонентные смеси и сложные объекты. Далее представлены некоторые из них.

Разделение растительных масел и приготовленного из них биодизельного топлива по их спектрам синхронной флуоресценции описано в работе [20]. Спектры получали с различными интервалами длин волн в диапазоне 280–600 нм в

общей сложности 50 образцов коммерчески доступных масел и полученного из них трансэтерификацией биодизельного топлива. При помощи методов обработки данных *Tucker3* и линейный дискриминантный анализ (в англоязычной литературе - *linear discriminant analysis*, или *LDA*) удалось классифицировать свежие и со сроком хранения в 18 месяцев растительные масла и полученное на их основе дизельное топливо с точностью до 94%.

В работе [21] изучали возможность неdestructивного распознавания яблок, обработанных 1-метилциклопропеном (1-МСП), с применением спектров флуоресценции яблочной кожуры. Распознавание проводили на основе классификационной модели, полученной математической обработкой профилей флуоресценции с использованием метода проекции на латентный структуры и дискриминантный анализ (в англоязычной литературе *partial least squares discriminant analysis*, или *PLS-DA*), комбинированном с методом рекурсивного выбора переменных, который был развит авторами в этой же работе. В результате исследования удалось классифицировать обработанные 1-МСП яблоки с точностью в 89,74%. Также, в работе исследован состав метаболитов, характеризующих обработанные 1-МСП и обычные яблоки с применением ЖХ-МС и ЯМР спектроскопии. Авторами сделано предположение, что полученные различия в профилях метаболитов являются причиной различия профилей флуоресценции обработанных 1-МСП и контрольных образцов яблок.

Предложен метод определения содержания афлатоксинов в мускатных орехах с применением матрицы спектров возбуждения и флуоресцентной эмиссии [22]. Для анализа использовали спектры флуоресценции порошков 91-го образца мускатного ореха, полученные в диапазоне эмиссии 200 – 900 нм с интервалом 10 нм. Из всего спектра выбирали диапазоны возбуждения 250 – 700 нм и эмиссии 260-720 нм, причём области спектра, не несущие полезную информацию, удаляли. Из 3-х параллельных значений интенсивности флуоресценции каждого образца рассчитывали среднее, которое использовали для составления матрицы данных. Распознавание образцов по общей концентрации афлатоксинов проводили с использованием *PLS-DA*, а для количественного определения концентрации применяли метод проекции на латентные структуры для количественного анализа

(в англоязычной литературе - *partial least squares regression*, или *PLS-R*). В результате удалось классифицировать образцы с минимальным содержанием токсина 2,2 *ppb* ложноположительным значением в 13,3%. Полученная методом *PLS-R* концентрация афлатоксина имела положительную корреляцию с фактической концентрацией со значением коэффициента детерминации 0,69.

Предложен вариант выявления фальсифицированных твердых сыров с добавлением растительных масел для имитации обезжиривания по синхронным спектрам флуоресценции [23]. Получали спектры с различными интервалами длин волн в диапазоне 240-700 нм. Полученные данные обрабатывали методом главных компонент (в англоязычной литературе – *principal component analysis*, или *PCA*), а затем для неизвестных образцов проводили классификацию, используя линейный дискриминантный анализ (*LDA*). В результате удалось добиться точности классификации до 97%.

Подобный тип фальсификации, но в молоке, предлагается выявлять с помощью флуоресцентной спектроскопии и газовой хроматографии [24]. Хроматографию использовали для выделения фракции, содержащей растительные масла, затем получали спектры флуоресценции и обрабатывали их с использованием регрессионного анализа. Предложенный подход позволяет выявлять менее 5% примесей растительных масел в исследуемом образце молока.

Еще одна методика [25] объединяет флуоресцентную спектроскопию, супрамолекулярную химию и методы регрессионного анализа. Методика предложена для определения энантиомерного состава растворов триптофана. Флуоресцентная спектроскопия использовалась для детектирования хирального взаимодействия между энантиомерами триптофана и бычьим сывороточным альбумином, который играл роль хирального селектора. Регрессионный анализ использовали для установления количественной взаимосвязи между полученными спектральными данными и энантиомерным составом триптофана. Результаты показывают, что метод пригоден для количественного определения энантиомерного состава. Более того, метод весьма чувствителен. Энантиомерный состав триптофана был точно определен в растворе с концентрацией 2,5 мкмоль/л.

Однако если образцы не обладают собственной флуоресценцией или не могут быть дискриминированы по ней, необходимо применять другой подход. В таких случаях добавление дополнительного флуорофора (или смесей из них) к образцу приводит к изменениям в спектрах излучения. Использование дополнительных флуорофоров направлено на получение новой информации от образца, так как некоторые нефлуоресцирующие молекулы могут взаимодействовать с добавленными флуорофорами. Одними из первых работ в этой области являются исследования группы под руководством *проф. Бунза* и *проф. Ротелло* (США), которые применяли в качестве флуорофоров поли-(*n*-фениленэтилены) [18, 19, 26]. Эти флуоресцирующие полимеры изменяют интенсивность эмиссии в присутствии объектов различного состава, таких как вина [18], соки [19] и нестероидные противовоспалительные препараты [26]. Авторы показали, что предложенный ими подход к дискриминации объектов различной природы, основанный на изменении интенсивности эмиссии флуорофоров при добавлении их к объектам, целесообразно развивать, поскольку он прост и экспрессен, не требует дорогостоящего оборудования и может быть использован в сочетании со стандартными методами обработки данных. Однако в работах [18, 19, 26] использовали флуорофоры, получаемые посредством довольно сложного синтеза.

Применяя флуориметрический метод “отпечатков пальцев”, можно использовать разный подход при добавлении флуорофоров к объекту. Наиболее простым и удобным способом является добавление одного флуорофора к образцам и последующая обработка массива данных. Однако далеко не всегда данный способ позволяет полностью дискриминировать образцы, вследствие чего возможно применять последовательное добавление флуорофоров, тем самым получать спектры 2D флуоресценции или для ускорения анализа применять добавление смеси флуорофоров, что позволяет добиться лучших результатов. Основные работы этого направления представлены в таблице 1.

Таблица 1. Флуориметрический метод “отпечатков пальцев” с добавками флуорофоров к объекту

Флуорофоры	Объект	Результат	Метод	Лит.*
Полифенилен-этиниленовые флуорофоры (ПФЭ)				
Комплексы ПФЭ/ полимер/ антимикробные пептиды (протамин, <i>PAF26, jelleine</i>)	Бактерии в составе человеческой мочи (14)	Полное разделение бактерий в урине и частичное в воде	Массив флуорофоров	[27]
Зеленый флуоресцентный белок (<i>K72</i>), ПФЭ с Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , акридиновым оранжевым, кукурбитурилом	Аминокислоты (20)	Полное разделение аминокислот 4-х различных видов (полярные и неполярные, ароматические и др.)	УФ-видимая область спектра, массив флуорофоров	[28]
ПФЭ полимеры	Соки (25)	Полное разделение образцов сока по сорт и индивидуально	Добавление одного флуорофора, массив флуорофоров	[19]
Катионный и анионный комплексы с ПФЭ полимерами	Белые вина (12)	Полное разделение сортов вин и выявление главных компонентов тушения флуоресценции	Массив флуорофоров	[18]
ПФЭ полимеры	Белки (17)	Полное разделение белков и определение их концентрации с отклонением в 5%	УФ-видимая область спектра, добавление одного флуорофора, массив флуорофоров	[29]
ПФЭ полимеры с SO_3^{2-} , CO_3^{2-} и NR_3^+ группами	Белки (7)	Разделение видов белка с точностью 98%	Массив флуорофоров	[30]
ПФЭ полимеры с карбоксыльными и др. группами	Ионы тяжелых металлов (8)	Полное разделение ионов металлов при разных концентрациях	УФ-видимая область спектра, массив флуорофоров	[31]

ПФЭ с перфторбензил-аммонийной, карбоксильной группами, сульфогруппой, зеленый флуоресцентный белок	Виски (33)	Полное разделение сортов виски по стране производителя, виду и частично по вкусу	УФ-видимая область спектра, массив флуорофоров	[32]
ПФЭ полимер с пиридоновой группой	Нестероидные противовоспалительные препараты (11)	Полное разделение препаратов при разных концентрациях	Массив флуорофоров	[26]
Наночастицы и квантовые точки				
Квантовые точки с ионами металлов (Ce^{3+} , Fe^{3+} , Cu^{2+})	Фосфат-анионы (5 видов)	Полное разделение фосфатов на фоне аминокислот и других анионов	Массив флуорофоров	[33]
Наночастицы золота модифицированные белками на серебряной подложке (НЧЗ)	Белки (10)	Полное разделение видов белка при разных концентрациях	Ближняя ИК-область спектра, массив флуорофоров	[34]
Прочие флуорофоры				
Биспирен с оксиэтиленом, биспирен с оксиэтиленом и холестерином	Металлопротеиды (гемоглобин и еще 4)	Разделение всех образцов	УФ-видимая область спектра, массив флуорофоров	[35]
Два флуорофора с SO_3H -группами	Аминокислоты (7)	Полное разделение аминокислот по отдельности и их смесей	УФ-видимая область спектра, добавление смеси флуорофоров (2)	[36]
Флуорофоры на основе бисперена ($Pu-TOA-Pu$, $Pu-EOA-Pu$, $Pu-DDA-Pu$)	Ионы металлов (10)	Идентификация 6-ти тяжелых металлов	УФ-видимая область спектра, добавление одного флуорофора	[37]
Акридиновый желтый, эозин, метиленовый синий	Соли тяжелых металлов (4)	Полное разделение солей металлов при разных концентрациях	Массив флуорофоров	[38]

*Литература, ¹ ПФЭ –поли(пара-фенилэтилен)

Группой профессора *Bunz* предложено использовать комплексы полифенилен-этиленового полимера (*ПФЭ*) с четырьмя антимикробными пептидами для классификации бактерий со схожими свойствами в составе мочи человека [27]. *ПФЭ* был смешан с каждым из пептидов для получения 4-х флуоресцирующих комплексов. Спектры флуоресценции снимали непосредственно в моче, а также в водном растворе. Составлен массив сигналов интенсивностей каждого комплекса с образцами бактерий, для получения достоверных результатов. Эксперимент с одним комплексом и определенной бактерией проводили 6 раз (4 комплекса × 14 бактерий × 6 повторов). После обработки методом *LDA* точность контрольного анализа составила 100% и 94%, для мочи и воды соответственно.

В работе [28] приведено исследование, расширяющее возможное число определяемых аминокислот при помощи использования 4-х различных матриц сигналов. Первая и вторая матрицы включали интенсивности комплексов металлов с зеленым флуоресцентным белком (*K72*) при рН 7 (3 фактора) и одного *ПФЭ* при рН 3, 7 и 13 (9 факторов). Две другие матрицы составлены из сигналов трех *ПФЭ* с кукурбитурилом при рН 3, 13 (6 факторов) и пяти *ПФЭ* с кукурбитурилом и акридиновым оранжевым (5 факторов). Данные, полученные при помощи комплексов металлов с *ПФЭ* и *K72*, обработанные по отдельности двумерным линейным дискриминантным анализом (*LDA*) обеспечивали неполное разделение, кроме комплекса *ПФЭ* с акридиновым оранжевым и кукурбитурилом. Метод, разработанный в данной работе, основан на формировании основной матрицы (8 факторов × 20 аминокислотных аналитов × 6 повторов) из матриц сигналов, описанных выше, которая при обработке методом *Jackknife*, гарантирует 100% точность разделения 20-ти аминокислот при концентрации 25 мМ, даже при их структурном сходстве.

Также группой профессора *Bunz* проведена дискриминация различных видов сока (яблочный, смородиновый, виноградный) с помощью двух *ПФЭ* флуорофоров при разном значении рН [19**Ошибка! Закладка не определена.**]. Для разделения были составлены три матрицы сигналов, две из которых содержали по одному флуорофору при трех различных значениях рН, которые достигались введением в образцы буферных растворов, а третья матрица представляла собой их

объединение. При использовании флуорофора *P1* наблюдалось неполное разделение виноградных соков, а *P2* для яблочных соков. Только используя «виртуальное» смешивание достигалось разделение соков индивидуально и по сортам. К тому же использование метода *LDA* показало, что данный метод не подходит для разделения смеси виноградного и смородинового соков.

Описан способ распознавания белых вин при помощи двух *ПФЭ* и их комплекса [18]. Группой исследователей получено искусственное вино, чтобы найти, какое влияние оказывают основные компоненты вина на сигнал. Выявлено, что наибольший вклад в изменение интенсивности флуорофора вносят танниновая кислота, глюкоза, фруктоза и яблочная кислота. Для дискриминации сортов вина составлена матрица (4 фактора \times 13 вин \times 6 повторов), содержащая сигналы двух *ПФЭ* при рН 13 и их комплекса при рН 3, 13. Обработка матрицы модельных аналитов методом *3D-LDA* показала 100% точность, а анализ контрольного опыта из пятидесяти двух образцов – точность 98%.

Предложен метод дискриминации белков, основанный на составлении матрицы сигналов шести *ПФЭ* [29]. Подобрано 17 образцов белка сильно различающихся по структуре, что должно способствовать их разделению, несмотря на большое число аналитов. Сначала для распознавания предполагали использовать каждый флуорофор по отдельности, но все шесть флуорофоров не позволяли достичь полного разделения, точность составляла 26-56%. Поэтому составили общую матрицу сигналов из всех флуорофоров (6 полимеров \times 17 белков \times 6 повторов), что позволило полностью дискриминировать модельные аналиты. В качестве эксперимента также составлен массив интенсивностей без одного флуорофора, разделявшего аналиты с 26% точностью. Но данный подход лишь понизил точность до 97%, что доказывает уникальный вклад в разделение каждого полимера. После проведения контрольного опыта из шестидесяти восьми образцов, выбранных случайно из 17-ти представленных белков, только два не удалось различить. Более того, концентрации белков определялись с отклонением не более 5%.

В работе [30] представлен метод классификации белков различной структуры, основанный на зависимости сигнала флуоресценции *ПФЭ* при

взаимодействии с белками в силу изменения конформационного состояния молекулы флуорофора. Для дискриминации белков составлена матрица интенсивностей, состоящая из сигналов шести ПФЭ, индивидуально смешанных с каждым белком (6 полимеров × 7 белков × 20 повторов). По результатам обработки методом *LDA* только два белка были распознаны со 100% точностью и один – с 95% точностью, точность распознавания остальных колебалась в пределах 65-80%. Но команде исследователей удалось решить данную проблему с помощью многократной *LDA* обработки. Всего проведено четыре этапа обработки, в ходе которой отдельно обрабатывались сигналы белков, точность распознавания которых была ниже 95%. В итоге удалось добиться точности дискриминации 98% при концентрации белков 2 мкг/мл. Как утверждают авторы, предел обнаружения метода составляет 1 и менее мкг/мл.

Предложен способ распознавания восьми катионов металлов (Pb^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+}), которые являются загрязнителями питьевой воды [31]. Для данной работы подобраны четыре ПФЭ, способные взаимодействовать с ионами металлов. Анализ матрицы сигналов (4 полимера × 8 ионов металлов × 6 повторов), составленной из интенсивностей ПФЭ, по отдельности добавленных к ионам металлов, с помощью метода *2D-LDA* удалось полное разделение катионов металлов при концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ М, при этом разделение Mn^{2+} и Co^{2+} далеко от идеала, вследствие чего при анализе реальных объектов могут возникнуть проблемы. Но данная ситуация легко разрешается при использовании в качестве метода обработки *3D-LDA*, которая позволяет добиться желаемого разделения всех ионов металлов. Кроме того, матрица флуорофоров успешно использована для дискриминации ионов металлов с концентрациями $1 \cdot 10^{-7}$, $5 \cdot 10^{-7}$, $1 \cdot 10^{-6}$ и $2 \cdot 10^{-6}$ М. Метод подходит для определения катионов Pb^{2+} и Hg^{2+} в водных растворах в пределах $1 \cdot 10^{-7}$ - $2 \cdot 10^{-5}$ М.

Немецкой группой исследовано разделение 33-х сортов виски с помощью ПФЭ и зеленых флуоресцентных белков (*GFP*) [32]. Для составления матрицы сигналов (3 полимера × 33 сорта виски × 4 повтора) выбраны три ПФЭ с лучшей разделяющей способностью из двадцати двух, предварительно протестированных для дискриминации. С помощью данной матрицы достигли разделения сортов

виски с точностью 99%, к тому же контрольный опыт на основе 120-ти проб из 33-х разделяемых виски показал точность 96,7%. Исследована также матрица флуорофоров на основе *GFP*, позволяющая добиться сравнимой точности дискриминации. Матрицы флуорофоров использовали для разделения сортов виски по происхождению (шотландский, ирландский, бурбон), вкусу (богатый и легкий), виду (односолодовый и купажируемый). Точность при применении обеих матриц для этих целей составила 93-100%, причем при совместной обработке сигналов матриц достигалось полное разделение сортов виски по всем параметрам.

Представлен способ разделения нестероидных противовоспалительных препаратов и выявления их контрафакта [26]. Для дискриминации модельных препаратов изучено взаимодействие восьми *ПФЭ* при pH 10 и 13. Впоследствии выбраны только два *ПФЭ*, демонстрирующие лучшее тушение флуоресценции. Сформирована матрица сигналов из данных флуорофоров (2 полимера \times 2 значения pH \times 11 препаратов \times 4 повтора) при концентрации препаратов $6 \cdot 10^{-3}$ М. Все аналиты были успешно разделены, что подтвердил контрольный опыт, показавший 100% точность. К тому же в работе проводилось исследование зависимости сигнала от концентрации в области $6 \cdot 10^{-3}$ - $3 \cdot 10^{-5}$ М, который показал возможность разделения трех исследуемых препаратов в смеси при различных концентрациях (кетопрофен, индометацин, мефенаминовая кислота): при значительном уменьшении концентрации результаты дискриминации ухудшаются. Также проведено разделение пяти коммерческих образцов ибупрофена и аспирина и двух фальсификатов этих препаратов. Разработанная методика позволила не только разделить все препараты, но и выделить образцы аспирина и ибупрофена в отдельные группы; фальсификаты были распознаны и не попали в данные группы.

Китайской группой проведено исследование по распознаванию фосфат-анионов в присутствии различных ионов металлов [33]. Выявлены оптимальные для данной задачи ионы металлов, способные агрегировать с квантовыми точками (КТ), и условия их применения. Так, для агрегата с Fe^{3+} выбрана концентрация $5 \cdot 10^{-5}$ М, значение pH 5,0, при этом для других ионов металлов условия отличаются. Составлена матрица сигналов (3 агрегата \times 5 фосфат анионов + 5 неорганических ионов + 4 аминокислоты \times 5 повторов) трех агрегатов металлов и

квантовых точек с различными фосфат-ионами и другими мешающими компонентами для проверки возможностей метода. Данный массив флуорофоров позволил выделить все фосфат-анионы в отдельные группы, так же как аминокислоты и неорганические ионы (K^+ , SO_4^{2-} , Na^+ , Cl^- , Ca^{2+}). Кроме того, проведена дискриминация фосфат-ионов в присутствии сыворотки крови, которая показала возможность полного разделения анионов вплоть до концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ М.

В работе [34] исследована дискриминация белков при малых концентрациях. Использовали наночастицы золота (НЧЗ), флуоресценция которых возростала в 20 раз на серебряной подложке. В качестве аналитов, сорбировавшихся на НЧЗ и изменяющих интенсивность их эмиссии, использовали пять различных белков (бычий и человеческий сывороточный альбумин, яичный белок, лизоцим, пероксидаза хрена). С помощью линейного дискриминантного анализа обработана матрица интенсивностей (5 НЧЗ \times 10 белков \times 5 повторов) и достигнуто полное разделение по группам всех белков при концентрации $5 \cdot 10^{-7}$ М. Также массив флуорофоров успешно протестирован для разделения белков при концентрациях $1 \cdot 10^{-6}$ и $1 \cdot 10^{-7}$ М. Контрольный тест 150 образцов (10 белков \times 3 концентрации \times 5 повторов) показал 100% точность, что доказывает возможность применения данного метода для дискриминации белков даже с различными, низкими концентрациями.

Предложен метод разделения металлопротеидов, играющих ключевую роль в биологических процессах животных и человека [35]. Синтезированы два флуорофора на основе биспирена, в один из которых была введена группа холестерина. Выявлено уникальное влияние флуорофоров на аналиты и составлен массив флуорофоров. Получена матрица сигналов (2 флуорофора \times 2 длины волны \times 5 металлопротеидов \times 5 повторов), которая позволила достичь разделения аналитов на группы при концентрациях 10, 50 и 100 нМ. Также проведен контрольный опыт для 30-ти образцов (5 различных белков с неизвестной концентрацией \times 6 повторов), который подтвердил возможность метода дискриминировать металлопротеиды со 100%-ной точностью. Такая точность

дискриминации при столь низких концентрациях показывает широкие возможности применения данного метода.

Описан способ разделения семи аминокислот, играющих важную биологическую роль [36]. После синтеза двух амфифильных флуорофоров выявлено образование флуорофорами мицелл и критические концентрации мицеллообразования. При концентрациях $4 \cdot 10^{-6}$ М первого флуорофора и $3 \cdot 10^{-5}$ М второго флуорофора, когда возможно образование мицелл только первым флуорофором, протестировано влияние аналитов на смесь флуорофоров. Зарегистрировано заметное тушение флуоресценции пика первого флуорофора и смещение в длинноволновую область пика второго флуорофора, что показывает влияние аминокислот на мицеллы. Проведен анализ данных с помощью метода *РСА*, который позволил полностью разделить аналиты. Также успешно дискриминированы три аминокислоты и их 2-3-х-компонентные смеси при концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ М.

В работе [37] исследована дискриминация ионов металлов, часть из которых являются загрязнителями окружающей среды. В этом исследовании также использовалось образование мицелл, но уже с применением поверхностно активных веществ (ПАВ). Проверена зависимость интенсивности флуоресценции в присутствии различных ионов металлов при разных концентрациях ПАВ и выявлена оптимальная – $7 \cdot 10^{-3}$ М, при которой флуорофор показывает наибольшую интенсивность сигнала. Проанализировано взаимодействие флуорофора с ионами металлов при их разной концентрации, что позволило разделить металлы на 4 группы по виду тушения флуоресценции. Измерение флуоресценции проводили при 4-х значениях длин волн, что позволило составить матрицу сигналов (4 длины волны \times 10 ионов металлов \times 7 повторов). Анализ с помощью *РСА* позволил разделить металлы на 6 индивидуальных групп и группу, состоящую из 4-х ионов, которая ранее была выделена по виду тушения флуоресценции из-за почти одинакового взаимодействия с флуорофором. Метод способен дискриминировать ионы Hg^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , являющиеся загрязнителями окружающей среды.

Представлен метод разделения солей тяжелых металлов в водном растворе [38]. Для этих целей предложено использовать массив из трех флуорофоров, концентрации которых подбирали так, чтобы максимум эмиссии был при 260 нм и влияние эффекта внутреннего фильтра было минимально. Концентрации солей металлов при анализе варьировали в диапазоне $(2-25) \cdot 10^{-4}$ М. Составлена матрица сигналов (3 флуорофора \times 4 иона металлов \times 5 концентраций), которая после обработки методом *РСА* позволила полностью разделить ионы металлов. Метод отлично подходит для разделения Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} в диапазоне, исследуемом в работе.

1.1.2. Хроматография

Метод «отпечатков пальцев» был успешно применен в тонкослойной хроматографии для анализа некоторых известных лекарственных трав, таких как китайская володушка [39], пуэрария дольчатая (дикая) и антельная [40], солодка [41], шалфей [42]. В большинстве случаев анализ основан на выявлении различия в содержании главных биоактивных компонентов, содержащихся в экстрактах исследуемых растений. В случае китайской володушки различие видов этого растения базировалось на определении сайкосапонинов, присутствующих в ее корнях. Флуоресцентные изображения образцов были обработаны методами хемометрики. Корни пуэрарий (дольчатой и антельной) удалось различить по содержанию пуэрарина, при этом хроматограммы проявляли посредством опыления 10%-ным раствором серной кислоты в этаноле при нагревании. Предшествующий хроматографическому разделению этап подготовки образца часто включает сложные и трудоемкие стадии приготовления экстрактов и пробоподготовки. Например, для хроматографирования экстракта солодки необходимо было приготовить его метанольную микроимпульсию, а также провести ее концентрирование.

Авторами [43] предложен метод высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) с масс-спектрометрией высокого разрешения для распознавания 50-ти сортов немецкого пива, а также содержащихся в пиве активных соединений, которые влияют на здоровье человека. Данным методом

возможно классифицировать безалкогольное и алкогольное пиво, а также дифференцировать темное пиво от других видов.

Метод «отпечатков пальцев» в тонкослойной хроматографии может активно использоваться для контроля качества продукции и уже применялся для различных по качеству образцов экстракта шалфея, известного своими целебными свойствами. Для этого использовали два элюента: для разделения малополярных и средне- и высокополярных соединений. В основу дискриминации образцов положена разница в содержании растительных фенолов, а хроматограммы проявлены путем опрыскивания ванилин-сернокислотным реагентом. Состав образцов лекарственных растений также различается в зависимости от условий выращивания (почвы, климата): это было еще раз продемонстрировано в ходе опыта с экстрактами красного (китайского) шалфея [44], выращенного в различных местностях и на разных этапах развития. В качестве элюента использовали смесь этилацетата и легких фракций нефти. Однако обсуждаемый метод применяли не только для анализа экстрактов растений: были также исследованы отдельные вещества и соединения определенного химического класса (фосфопептиды [40], олигонуклеотиды [45], извлеченные из рибонуклеазы и из поджелудочной железы, аминокислоты [46], извлеченные из экстракта листьев яблони). В случае аминокислот проведена количественная оценка их содержания. Метод также использован для дискриминации двух высокоценных видов грибов Линджи [47], широко известных в восточной медицине. В качестве неподвижной фазы чаще всего использовали силикагель.

В работе [48] изучали эффективность различных методов обработки хроматограмм, полученных при анализе древесных смол методом ВЭТСХ для их дальнейшей классификации с применением метода главных компонент. Регистрировали этанольные экстракты смол, которые затем выпаривали и повторно растворяли в метаноле. Метанольный раствор наносили на подложку из силикагеля, которую затем погружали в элюент, состоящий из толуола, этилацетата и муравьиной кислоты. Фотографии подложки получали при длине волны возбуждения 366 нм и обрабатывали программами *MATLAB*, *ImageJ* и *Sorbfil TLC Videodensitometer*. Группы данных, составленные из числовых значений

интенсивности флуоресценции выбранных областей подложки, совокупности точек, расположенных вдоль хроматографического фронта, и областей, соответствующих характеристическим максимумам флуоресценции образцов, обрабатывали методом главных компонент. По результатам математической обработки авторы заключили, что два метода получения данных пригодны для качественного анализа экстрактов древесной смолы, а третий метод может быть использован только для количественного анализа состава экстрактов.

Описан способ классификации грецких орехов по месту их происхождения, основанный на математической обработке газовых хроматограмм метилированных жирных кислот, полученных из ядер орехов [49]. В качестве объектов анализа использовали грецкие орехи, собранные в 6-ти различных географических регионах Ирана. Образцы готовили экстракцией растительных масел петролейным эфиром из ядер орехов с их последующим омылением метанольным раствором гидроксида натрия и этерификацией смесью метанола и концентрированной серной кислоты. Хроматограммы получали на газовом хроматографе, снабжённым капиллярной колонкой и пламенно-ионизационным детектором. Для построения и проверки математической модели хроматограммы поделили на 2 группы, которые обрабатывали комбинированными методами *PCA-LDA* и *SIMCA*. В итоге с применением кросс-валидации удалось классифицировать образцы грецких орехов с точностью в 99,2% и достичь 98,3% верного распознавания места происхождения орехов по построенной модели, что отражает корректность исследованного метода классификации.

В работе [50] для распознавания двух видов лимонника (*Schisandra chinensis* и *Schisandra sphenanthera* E) методом *PCA* обрабатывали хроматограммы водных экстрактов образцов. Ультразвуковой экстракцией из собранных в разных провинциях Китая плодов обоих видов лимонника готовили образцы для анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) с применением в качестве детектора поглощения излучения с длиной волны 220 нм. Из каждой полученной хроматограммы выбирали максимумы 9-ти характеристических пиков, которые объединяли в единый массив данных и обрабатывали методом главных

компонент. В результате по полученным графикам счетов удалось полностью дискриминировать приготовленные из разных видов растения образцы.

Для определения и разделения некоторых антигипертензивных препаратов на основе гормона ангиотензина использовали жидкостную хроматографию с УФ-детектированием. Для повышения качества разделения успешно применяли метод главных компонент в различных вариациях [51]. Применение метода главных компонент для определения веществ в допинг-пробах рассмотрено в [52]. Этот метод обработки был применен к двум наборам данных, полученным с помощью ГХ–МС. Первый содержал результаты анализа образцов мочи с добавлением смеси четырех контрольных веществ (метилфенидат, петидин, кофеин и пибрадол). Второй – результаты анализа образца реальной мочи, содержащей производные этилфрена и антиоксидант ВНТ, которые оказались неразделенными на хроматограмме. С помощью метода главных компонент удалось идентифицировать смеси даже по неполностью разделенным пикам, что позволило значительно сократить время анализа.

Силикагель, оксид алюминия, кремнезем и полиамид использовали для отделения цветных пигментов из шести образцов порошков перца чили методом обращенно-фазовой тонкослойной хроматографии. Наилучшее разделение цветных пигментов было получено на кремнеземе со смесью ацетон–вода в качестве элюента. Установили, что пигментный состав в различных образцах различается. Для классификации порошков по их пигментному составу применили метод главных компонент, что позволило использовать выявленные различия для идентификации некоторых сортов чили [53].

В работе [54] разработали просто и надежный способ дискриминации образцов фруктов, основанный на ВЭЖХ с УФ-детектированием по пику полифенольных соединений. Всего проанализировали 17 полифенольных соединений, содержащих различные функциональные группы (флаваноиды, фенольные кислоты). Пробоподготовка заключалась в экстракции ультразвуком с добавлением ацетона:воды:соляной кислоты (70:29,9:0,1 об.) с последующим центрифугированием. Проанализированы такие образцы как клюква, виноград, черника, малина, а также фруктовые соки и сухофрукты. В качестве

аналитического сигнала использовали хроматограммы, соответствующие полифенольному составу. В качестве методов обработки данных применяли *РСА*. Таким образом, удалось дискриминировать образцы по составу полифенолов, а также выявить фальсифицированные образцы клюквы.

1.1.3. Электрохимические методы

Одним из перспективных направлений в многокомпонентном анализе на сегодняшний день является разработка мультисенсорных систем. Среди электрохимических систем наибольший интерес вызывает «электронный язык», который предназначен для распознавания и анализа продуктов и напитков. *F. Winqvist* и *I. Lundström* первыми предложили вольтамперметрический электронный язык в 1997 г. [55]. В последующем они разработали гибридный электронный язык, объединив измерения потенциометрии, вольтамперметрии и проводимости раствора [56, 57, 58, 59].

Наиболее часто в качестве сенсоров выступают ионселективные электроды и электрохимические сенсоры различных типов [60]. Полученный совокупный аналитический сигнал от системы сенсоров интерпретируют различными методами многомерной обработки данных, такими как нейронные сети или метод главных компонент [61].

В работе [62] авторы сообщают о возможности отличить с помощью «электронного языка» козье молоко от фальсификата на основе коровьего молока. Система состоит из 36-ти потенциометрических сенсоров и позволяет также определять основные стандарты вкуса – «солёный», «кислый», «сладкий», «горький».

Предложен относительно дешёвый метод классификации образцов вина и виски с использованием одноразового вольтамперметрического «электронного языка», изготовленного с использованием золотых и медных подложек, с последующей обработкой сигналов методом главных компонент и других методов распознавания образов [63]. Описанное устройство было успешно использовано для дискриминации дорогостоящих и дешёвых виски и для выявления фальсификации, при этом был задействован только медный электрод. Для анализа

сортов вина «электронный язык» был составлен из медных и золотых рабочих электродов. Возможно дискриминировать типы анализируемых сортов вина – сухое и сладкое, красное и белое.

Известны попытки создания «электронного языка» с неэлектрохимическим типом сенсоров. Так, в работе [64] задействованы оптические сенсоры. В данном случае сенсоры – это зерна полиэтиленгликоль-полистирольной смолы, дериватизированные индикаторами (*o*-крезолфталеинкомплексон, флуоресцеин, оксазиновый краситель). Измерения сигналов, получаемых от набора таких сенсоров, проводили относительно контрольного сенсора – зерна с ацетилированным амином. Сенсоры размещали в полостях специально подготовленных пластинок, имитирующих расположение рецепторов в биологическом языке. О результатах практического применения такой системы не сообщается.

В работе [65] описан детектор для капиллярной газовой хроматографии, в котором используется набор сенсорных пленок полупроводниковых оксидов (диоксида олова с добавками Cu, Zn и V). Такая система является мультисенсорной и основана на принципах «электронного языка». С помощью разработанного детектора возможно определение различных летучих органических соединений.

В качестве сенсоров также предлагали применять токопроводящие полимеры, например стеариновую кислоту, полипиррол или полианилин. Нанесенные на металлическую подложку, они выступали в качестве электрохимических сенсоров, для считывания сигналов которых использовали спектроскопию импеданса [66].

В работе [67] для определения фальсифицированных масел, полученных смешиванием масел различных сортов, применяли циклическую вольтамперометрию с последующей обработкой данных методами *PCA*, *PLS-DA* и *SIMCA*. Вольтамперограммы растворов масел оливы, подсолнуха, кукурузы и соевых бобов в системе дихлорметан-этанол с добавлением перхлората лития и их метанольных экстрактов получали с применением стеклоуглеродного индикаторного электрода в диапазоне - 200 – 1300 мВ со скоростью развёртки $20 \text{ мВ} \cdot \text{с}^{-1}$. В результате удалось дискриминировать осветлённые, неосветлённые

масла и масла экстра-класса. Для количественного анализа содержания неосветлённого масла в масле высшего сорта применяли метод *PLS*, который позволил достичь предела обнаружения первого в 2% (об./об.) и области линейности в 33% (об./об.).

Описан [68] подход анализа запаха образцов воздуха, основанный на системе «электронный нос». В работе анализировали образцы воздуха, взятые на различных этапах рабочего цикла водоочистительной станции. «Электронный нос» состоял из 5-ти газовых сенсоров, чувствительных к имеющим различную химическую природу газам и легколетучим веществам. Для классификации образцов данные сенсоров обрабатывали методом главных компонент, а при количественной оценке состава воздушной смеси на каждом этапе рабочего цикла станции анализировали совокупности сигналов сенсоров методом *PLS*. При таком подходе удалось дискриминировать все образцы по их происхождению и достичь коэффициента детерминации линейной модели в 0,9967 при доверительной вероятности в 95 %.

1.1.4. ИК-спектроскопия

В работе [69] исследована возможность контроля качества коммерчески доступного порошка куркумы с применением инфракрасной Фурье-спектроскопии. Анализировали 30 образцов приобретённого в Алжире и Египте порошка куркумы, для чего регистрировали 3 параллельных спектра поглощения ИК излучения каждого образца в диапазоне $4000 - 400 \text{ см}^{-1}$ с шагом в 4 см^{-1} . Проведена фоновая коррекция, центрирования и масштабирования спектров, после чего полученная матрица данных обработана методами иерархического кластерного анализа (в англоязычной литературе - *hierarchical cluster analysis*, или *HCA*) с применением метода полной связи для иерархической кластеризации *PCA*. По полученным результатам различить образцы куркумы данным способом не удалось. По мнению авторов, это связано с тем, что качественный химический состав внутри одного вида растения (*Curcuma longa*) постоянен, в то время как в зависимости от исследованного образца меняется лишь количественное содержание компонентов.

Успешное применение инфракрасной Фурье-спектроскопии в сочетании с математическими методами многомерной обработки данных представлено в работе

[70]. Авторы показали возможность распознавания морского салата (*Ulvalactuca*), полученного из чистых, а также из загрязнённых бензином и дизельным топливом водоёмов. Для этого образцы морского салата в течение определённого времени выдерживали в контейнерах, наполненных стерильной морской водой и 0,001%–1,0% от общего объёма сертифицированным бензином или дизельным топливом. После этого образцы лиофилизировали и регистрировали 5 параллельных спектров поглощения ИК излучения каждого образца в диапазоне 4000 – 400 см⁻¹ с шагом в 2,04 см⁻¹. Из полученных спектров составляли матрицу данных, которую нормировали и подвергали фоновой коррекции для дальнейшей обработки методами *PCA* и *HCA*. В результате удалось различить образцы, находившиеся в незагрязнённой и содержащей бензин и дизельное топливо морской воде, а также группы образцов с различной концентрацией примесей (от 0,001% до 1,0%) и временем выдержки (30 мин, 1, 12 или 24 ч) в загрязнённой воде.

В работе [71] предложены как количественный, так и качественный многомерный анализ на основе Фурье ИК-спектроскопии в сочетании с *PLS-R* методом для обработки данных. Метод может применяться для контроля качества лекарств, так как стабильный и экспрессный и содержит минимальное число этапов пробоподготовки. Метод опробован для определения двух действующих веществ в различных соотношениях вилдаглиптин и метаморфин в различном соотношении (50/500, 50/850, 50/1000 мг) на коммерческом препарате Галвусмет.

Исследована возможность использования ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье с нарушенным полным внутренним отражением (НПВО) в сочетании с многомерным анализом для обнаружения арганового масла в горчичном масле [72]. Изучали 20 чистых образцов горчичного масла и 140 образцов с добавлением арганового масла (1-30% об.). Успешное разделение достигалось с использованием в качестве методов классификации *PCA* и *LDA*, в том числе удалось дискриминировать образец с добавлением арганового масла в количестве 1% об.

Метод анализа «на месте», основанный на ИК с преобразованием Фурье и ближней ИК-спектроскопии в сочетании с хемометрикой, разработан для разделения источников омега-3 полиненасыщенных жирных кислот в форме

триацилглицерина и концентрированного этилового эфира [73]. В качестве метода дискриминантного анализа использовали *PLS-DA*. Удалось установить, что ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье более чувствительна к дискриминации морских нефтепродуктов.

В исследовании [74] выделили бактерии, акклиматизированные к тяжелым металлам, с помощью инфракрасного излучения с преобразованием Фурье-НПВО, используя методы многомерного анализа, а именно иерархический кластерный анализ (*HCA*), метод главных компонент и *SIMCA*. Микроорганизмы *Brevundimonas sp.*, *Gordonia sp.* и *Microbacterium oxydans* подвергали воздействию токсичных концентраций Cd^{2+} (30 мкг/мл) или Pb^{2+} (90 мкг/мл). Результаты показали, что методы *PCA* и *HCA* позволяют четко дискриминировать быстро акклиматизировавшиеся, постепенно акклиматизированные и контрольные бактерии друг от друга. Кроме того, более точно классифицированы акклиматизированные, отличающиеся резким и постепенным воздействием тяжелых металлов, и контрольные бактерии с помощью *SIMCA* с достоверностью 99,9%. Это исследование продемонстрировало, что акклиматизированные к тяжелым металлам бактерии и бактерии контрольной группы могут быть дискриминированы с помощью хемометрического анализа Фурье ИК-спектров мощным, экономичным и удобным способом.

1.1.5. УФ-спектроскопия

Содержание фенолокислот на различных стадиях приготовления блинов из двух сортов рафинированной и цельнозерновой муки были предметом исследования работы [75]. Экстракты образцов муки, теста определённого состава и приготовленных из него блинов, при помощи жидкостной хроматографии разделяли на группы по временам удерживания в хроматографической колонке. Получали 4 параллельных спектра поглощения образца из каждой группы в диапазоне 250 – 500 нм с шагом в 1 нм, которые затем обрабатывали методом *PCA*. По полученным результатам удалось дискриминировать взятые на каждом этапе приготовления блинов образцы из рафинированной и цельнозерновой муки, в то

время как мука, тесто и блины внутри каждой подгруппы (рафинированные и цельнозерновые) не были разделены.

Описан способ определения происхождения съедобного гриба из рода *Leccinum* (*Leccinum rugosiceps*) [76], основанный на построении классификационной модели обработкой УФ-спектров поглощения методами *PLS-DA* и метод опорных векторов (в англоязычной литературе - *support vector machine*, или *SVM*). В качестве объектов анализа использовали хлороформные экстракты высушенных и измельчённых плодовых тел, полученные ультразвуковой экстракцией из собранных в 6-ти различных регионах грибов. Спектры поглощения получали в диапазоне 190-500 нм с шагом в 1 нм, однако из-за значительного вклада растворителя в поглощение в области 190-240 нм при дальнейшем анализе данную область спектра не учитывали. Точность кросс-валидации построенной математической модели составила 75,00%, в то время как точность определения происхождения образцов проверочной группы достигала 47,37%.

Разработка простого метода оценки качества образцов зеленого чая, полученных с южных регионов Восточной Азии, представлена в работе [77]. Данные УФ-видимой, Фурье-спектроскопии и ВЭЖХ для 38-ми образцов зеленого чая подвергнуты многомерному анализу с помощью методов *HCA* и *PCA*. Данные, полученные с помощью Фурье-спектроскопии, не дали положительных результатов. Данные УФ-спектроскопии, полученные в диапазоне 200-400 нм, с последующей обработкой методом *PCA* разделили тестируемые образцы на два класса с дисперсиями главных компонент (PC – principal component) 75% и 19% (соответственно, PC1 и PC2). Кроме того, данным методом удалось дискриминировать коммерческие и купленные на рынке образцы чая.

Работа [78] направлена на обнаружение и количественное определение фальсификации свежего оливкового масла добавлением старого оливкового масла из предыдущего урожая с использованием различных спектроскопических подходов в сочетании с хемометрикой. Приготовили «фальсифицированные» образцы в различных объемных соотношениях и проанализировали методами флуоресценции, ИК и УФ спектроскопии. После предварительной обработки все классификационные модели *PLS-DA* для каждого спектрального метода успешно

дифференцируют фальсифицированные и нефальсифицированные масла с более чем 90%-ным уровнем значимости.

В работе [79] изучали принципиальную возможность улучшения предобработки данных, полученных методом УФ-спектроскопии, для лучшего разделения образцов. В качестве примера использованы образцы джина с различными условиями хранения. Применение второй, третьей и четвертой производных к спектрам поглощения позволило лучше идентифицировать длины волн, связанные с условиями хранения джина, и соответственно улучшить качество дискриминации образцов.

Изучение влияния проблем, связанных с получением спектров, например температуры, описаны в работе [80]. Оценивали эффект от увеличения температуры при получении УФ спектров, а также влияние на качество дискриминации образцов виски в зависимости от страны происхождения. Образцы виски разных торговых марок были проанализированы при различных температурах (25, 35, 45, 55 °C). В качестве методов разделения использовали *PCA* и *PLS-DA*. Результаты показали, что температура не влияла на классификацию образцов виски в зависимости от страны происхождения.

1.2 Математическая обработка сигнала в методах «отпечатков пальцев»

Применение методов «отпечатков пальцев» для исследования объектов связано с получением и анализом больших массивов экспериментальных данных. В этом случае главной проблемой, с которой сталкивается аналитик, является извлечение полезной информации, несущей необходимые для решения конкретной аналитической задачи сведения, из общего объёма данных, содержащего нежелательную составляющую, называемую шумом. Природа шума может быть разной, и в зависимости от анализируемого объекта и используемых методов пробоотбора и получения аналитического сигнала тот или иной вид шума может вносить наибольший вклад в общий массив данных.

Для извлечения полезной информации из объёма экспериментальных данных применяют методы хемометрики. Основой большинства хемометрических

методов является либо полученная эмпирически математическая зависимость данных (формальные модели), либо идеализированные описания физико-химических процессов (содержательные модели). В первом случае зависимость справедлива для ограниченного диапазона условий, что не позволяет решать задачи экстраполяцией. Во втором случае, можно экстраполировать поведение системы в новых условиях, однако такой метод применим, только если модель известна априори. Применение каждого из подходов при анализе конкретного объекта диктуется их преимуществами и недостатками.

Хемометрику применяют как в качественном, так и в количественном анализе при обработке сложных аналитических сигналов, полученных электрохимическими, оптическими, хроматографическими и другими методами. Основное преимущество использования хемометрики – это возможность получать аналитический сигнал, используя данные, имеющие низкое разрешение, сильное перекрывание сигналов или высокий уровень шума [81]. Более того, правильное применение хемометрических методов позволяет повысить чувствительность, селективность и снизить пределы обнаружения. Разнообразие инструментов, разработанных в данной области, обеспечивает визуализацию данных, обнаружение скрытых связей между аналитическим сигналом и параметрами выборки [82]. Одной из основных целей многомерных методов в аналитической химии является группировка и классификация объектов, а также моделирование взаимосвязей между различными аналитическими данными. Типичные примеры – группировка или кластеризация образцов по сходным характеристикам, классификация образцов с помощью аналитических данных и др.

1.2.1. Обработка массивов данных

Для проведения обработки аналитические данные представляют в виде матрицы X , состоящей из n объектов (строк) и p характеристик (столбцы). Объектами могут быть образцы различного происхождения, индивидуальные вещества или смеси. Характеристиками объектов служат спектры, хроматограммы,

данные с электрохимических датчиков и т.д. Таким образом, матрицу данных $n \times p$ можно записать следующим образом (1):

$$X = \begin{pmatrix} x_{11} & x_{12} & \dots & x_{1p} \\ x_{21} & x_{22} & \dots & x_{2p} \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ x_{n1} & x_{n2} & \dots & x_{np} \end{pmatrix} \quad (1)$$

Для многомерной обработки данных важной и неотъемлемой частью анализа является предварительная обработка данных. На первом этапе предподготовки проверяют матрицу данных на полноту (в ней не должно быть пустых мест, так как они могут исказить результаты анализа). Конечно, отсутствующие значения нельзя заполнять нулями, существует несколько приемов заполнения пустот в данных, например их можно заполнить по среднему значению столбца, строки, или ближайших соседей. В худшем случае можно воспользоваться генерацией случайного числа. В случаях, когда данные сильно коррелируют друг с другом или избыточны и постоянны, их стоит удалить их выборки.

Для получения правильных результатов химического анализа важным условием является предварительная подготовка данных, которая заключается в центрировании и нормировании данных. Центрирование – это вычитание из исходной матрицы X матрицы M . Обычно используют среднее центрирование, где каждая переменная x_{ik} центрируется вычитанием среднего значения столбца x_k в соответствии с уравнением (2):

$$x_{ik}^* = x_{ik} - \bar{x}_k \quad (2)$$

здесь i – индекс строки, k – индекс колонки, а \bar{x}_k среднее по колонке, рассчитанное по формуле (3):

$$\bar{x}_k = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_{ik} \quad (3)$$

Нормирование данных не изменяет их структуру, а изменяет вес различных частей данных при обработке, которое заключается в умножении исходной матрицы X слева на матрицу W . К использованию данного преобразования нужно подходить индивидуально для каждого набора данных, так как его применение может как улучшить, так и исказить результаты.

Часто данные могут представлять собой совершенно разные свойства образца, так что значения характеристик (т.е. столбцов матрицы данных)

отличаются в значительной степени. При обработке данных могут происходить сильные искажения. Для устранения этих различий проводят масштабирование данных. Существует два способа масштабирования: по диапазону данных (4) и по стандартному отклонению (автомасштабирование) (5):

$$x_{ik}^* = \frac{x_{ik} - x_k(\min)}{x_k(\max) - x_k(\min)} \in 0 \leq x_{ik}^* \leq 1 \quad (4)$$

$$x_{ik}^* = \frac{x_{ik} - \bar{x}_k}{S_k}$$

$$S_k = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_{ik} - \bar{x}_k)^2}{n-1}} \quad (5)$$

Здесь n – число образцов [83].

1.2.2. Метод главных компонент

Метод главных компонент – один из самых мощных и популярных хеометрических техник. Он позволяет уменьшить размерность данных без значительной потери информации из-за скрытой структуры данных и лежит в основе ряда других хеометрических методов [84]. В зарубежной литературе метод называется *PCA – principal component analysis*.

Принцип работы метода главных компонент заключается в разложении матрицы данных, в которой число строк соответствует количеству образцов, а число столбцов – числу независимых переменных (в частном случае – аналитических сигналов), на произведение двух матриц T и P с меньшими размерностями и матрицу остатков E , которая содержит фоновую информацию (шум) (рис. 1) [85].

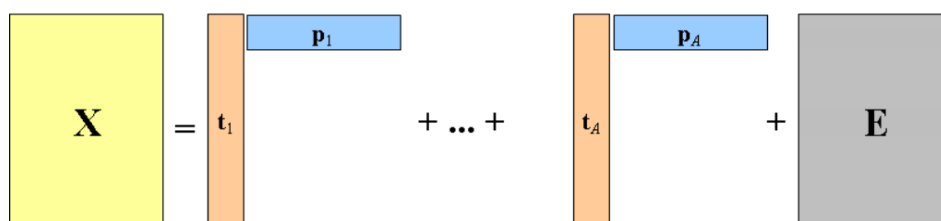


Рис. 1. Разложение матрицы данных X по методу главных компонент.

При обработке данных методом *PCA* особое внимание уделяется графикам счетов и нагрузок, они несут полезную информацию. В качестве примера на

рисунке 2 показаны результаты анализа образцов кофе (1-8) и смесей образцов кофе (9-11) [86]. Сигналы были получены от потенциометрического «электронного языка» и обработаны по методу главных компонент. Группы точек соответствуют параллельным измерениям одного образца. График представляет собой визуализацию матрицы счетов по первым двум главным компонентам (PC1 и PC2) [87].

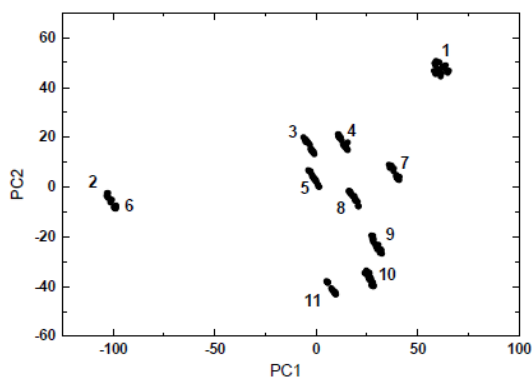


Рис 2. Результаты обработки сигналов «электронного языка» методом главных компонент для различных индивидуальных образцов кофе (1–8) и смесей (9–11).

Таким образом, успешным результатом применения *PCA* считается график счетов, в котором образцы четко кластеризованы, т.е. группы точек одного образца не пересекаются с группами точек другого. Такие результаты могут свидетельствовать о высокой дискриминирующей способности использованного аналитического метода. К сожалению, наличие нескольких статистически значимых главных компонент приводит к тому, что даже трехмерное представление данных является неточным их описанием. Поэтому часто *PCA* дополняют другими многомерными методами.

PCA – один из наиболее часто используемых методов в распознавании образов. Неудивительно, что он нашел применение в анализе различных аналитов различными методами, например, в оптической спектроскопии дискриминация: катионов [88, 89, 90], анионов [91], электронейтральных небольших молекул, таких как аминокислоты [92], сахараиды [93, 94], взрывчатые вещества [95] и т.д., кроме того, различные потребительские продукты: подсластители [96], напитки [97, 88, 98], зубные пасты [91] и т.д.

1.2.3. Линейный дискриминантный анализ (LDA)

Линейный дискриминантный анализ – это классический статистический метод, как для уменьшения значимых данных, так и для классификации образцов (чаще всего данный подход называют распознавание образов с учителем). LDA - алгоритм классификации, основывающийся на характеристиках распределения групп объектов, таких, как математическое ожидание и дисперсия (матрица ковариации). Основная идея заключается в построении линейной функции (полинома первой степени), зависящей от параметров для каждого класса. Преимуществом метода является то, что функции можно построить, не имея эталонных объектов, а зная только статистические характеристики каждого класса. Для классификации объекта необходимо рассчитать значение каждой разделяющей функции, при этом функция, дающая максимальное значение, определяет класс объекта. Известно, что наилучший результат классификации достигается, если параметры классов распределены по нормальному закону и имеют одинаковые матрицы ковариации

По сути, LDA ищет векторы в пространстве, которые наиболее эффективно различают классы, а не те, которые лучше всего описывают данные. Учитывая независимые признаки, относительно которых описаны данные, LDA создает линейную комбинацию признаков, что позволяет получить наибольшее среднее различие между классами. С математической точки зрения для всех классов определяется две меры:

1) матрица разброса *внутри* класса (6):

$$S_w = \sum_{j=1}^c \sum_{i=1}^{N_j} (x_i^j - \mu_j)(x_i^j - \mu_j)^T \quad (6)$$

здесь x_i^j , i -й образец класса, μ_j – среднее значение класса j , c – количество классов, N_j , количество выборок в классе j .

2) матрица разброса между классами (7):

$$S_b = \sum_{j=1}^c (\mu_j - \mu)(\mu_j - \mu)^T \quad (7)$$

здесь μ - среднее всех классов.

В линейном дискриминантном анализе задачей является максимизировать межклассовую матрицу и минимизировать внутриклассовую матрицу. Одним из способов решения данной задачи является использование метода *PCA* перед построением модели. *LDA* широко применяют в статистическом анализе для классификации образцов, например, малых ионов и молекул [99], взрывчатых веществ [100, 101].

1.2.4. Метод опорных векторов (*SVM*)

Наряду с методами *PCA* и *LDA* существует еще несколько векторных методов для многомерного анализа данных, такие как факторный анализ - метод наименьших квадратов (*PLS*) [102], метод опорных векторов (*SVM*) [103]. В последние годы *SVM* зарекомендовал себя как очень надежный метод работы с набором данных с небольшим количеством классов, которые сложно дискриминировать линейными методами хемометрического анализа.

SVM – это контролируемый метод классификации, который стремится дискриминировать классы, отображая вход в *n*-мерное пространство с использованием функций ядра. Эти функции могут быть линейной, полиномиальной, радиальной базисной функцией и т. д. Функция ядра обеспечивает гибкость с точки зрения характера данных, подлежащих классификации. Попав в пространство функций, точки данных разделены гиперплоскостями с максимальным запасом по отношению к обучающим данным. Расстояние между двумя гиперплоскостями, разделяющими два разных класса, называется гиперплоскость максимального поля и соответствует границе, которая максимизирует разделение между двумя разными классами. Таким образом, *SVM* ищет данные точки (опорные вектора), удовлетворяющие условию, где две гиперплоскости имеют максимальное расстояние между двумя классами.

SVM обычно обеспечивает лучшую классификацию по сравнению с *PCA* и *LDA*, но данный метод сложнее реализовать из-за параметризации данных, которая в большинстве случаев выполняется вместе с перекрестной проверкой. *SVM* успешно применен в спектральных методах для классификации алкалоидов с

использованием соединений ДНК [104], ионов металлов [105], паров органических веществ [106] и других аналитов.

В сводной таблице 2 приведены некоторые из методов «отпечатков пальцев» с различными подходами к обработке данных и их применение к дискриминации объектов анализа.

Таким образом, для решения задач классификации, дискриминации и идентификации объектов методами «отпечатков пальцев» используют самые разнообразные методы химического анализа и способы хемометрической обработки данных. Из числа описанных методов привлекает внимание флуориметрическая спектроскопия с добавлением флуорофоров к объектам (раздел 1.1.1). Этот метод относится к наиболее простым в аппаратном оформлении, однако весьма эффективен как метод разделения, с одной стороны, и относительно мало исследован (не более 20 публикаций) – с другой.

Таблица 2. Сводные данные по описанным в обзоре методам химического анализа и хемометрической обработки данных с указанием объектов и задач дискриминации

Объект	Метод	Метод обработки	Задача	Литература
Молоко	ВЭЖХ	-	Различение фальсификатов животного и соевого молока; выявление добавок сои, риса, белка	[107, 108, 109, 110, 111]
Молоко	ГХ	<i>ANOVA</i> ¹	Различение органического молока по наличию жирных кислот	[112, 113, 114]
Сыр	ВЭЖХ	<i>PCA</i> ² , <i>PLS</i> ³	Различение сыра, произведенного из коровьего, овечьего и козьего молока	[115, 116, 117]
Молоко	Флуоресценция	<i>PCA</i>	Определение состава и географического региона	[118, 24]
Сыр	Флуоресценция	<i>PLS, PCA + FDA</i> ⁴	Дискриминация по процессу производства, зонам образца и стадиям созревания	[119, 120]
Свиной жир	ИК	<i>PLS, PCA</i>	Выявление подделок с пальмовым маслом, дискриминирование куриного и свиного жира	[121, 122]
Молочный жир (в т.ч. подделки)	Флуоресценция	<i>PCA</i>	Обнаружение растительного масла в молочном жире ($\geq 5\%$)	[24]
Мед (акация, гречиха, вереск, липа и рапс)	Флуоресценция	-	Установление источника меда	[12]
Растительное масло (17 видов)	Флуоресценция	-	Дискриминация оливкового масла, обнаружение фальсификатов	[3]
Растительное масло (подсолнечное, кукурузное и оливковое)	Потенциометрия	<i>PLS-DA, PCA,</i>	Установление типа масла	[123]
Вина и виски	Вольтамерометрия	<i>PCA</i>	Распознавание и дифференциация сортов вин и виски, обнаружение фальсификатов	[124]
Биодизельное топливо	Флуоресценция	<i>Tucker</i> ⁵ и <i>LDA</i> ⁶	Классификация масла по сроку хранения	[20]
Яблоки	Флуоресценция, ЯМР, ЖХ-МС	<i>PLS-DA</i>	Распознавание сорта	[21]
Орехи	Флуоресценция	<i>PLS-DA</i>	Выявление афлатоксинов	[22]

Объект	Метод	Метод обработки	Задача	Литература
Сыр	Флуоресценция	<i>LDA</i>	Выявление фальсификата	[23]
Молоко	Флуоресценция + ГХ	<i>LDA</i>	Выявление фальсификата	[24]
Пиво	ТСХ	-	Классификация б/а и алкогольного пива, а также темного и других сортов	[43]
Древесные смолы	ТСХ	<i>PCA</i>	Качественный анализ древесных смол	[48]
Орехи	ГХ	<i>PCA-LDA</i>	Классификация по географическому происхождению	[49]
Лимонник	ВЭЖХ	<i>PCA</i>	Классификация двух видов лимонника	[50]
Козье молоко	Потенциометрия	-	Поиск фальсификатов, добавление коровьего молока	[62]
Вино	Потенциометрия	<i>PCA</i>	Дискриминация по типу (сухое/сладкое, красное/белое)	[63]
Масло	Вольтамперометрия	<i>PCA, PLS-DA, SIMCA</i> ⁷	Дискриминация по типу масла	[67]
Воздух	Газовые сенсоры	<i>PLS</i>	Дискриминация по происхождению (места водоочистительной станции)	[68]
Куркума	ИК	<i>PCA+HCA</i> ⁸	Дискриминация по происхождению	[69]
Морской салат	ИК	<i>PCA+HCA</i>	Выявление загрязненных образцов	[70]
Мука	УФ	-	Дискриминация на рафинированную и цельнозерновую	[75]
Гриб <i>Leccinum rugosiceps</i>	УФ	<i>PLS-DA и SVM</i> ⁹	Дискриминация по происхождению	[76]
Лекарство (вилдаглиатин и метаморфин)	ИК	<i>PLS</i>	Обнаружение при совместном присутствии	[71]
Аргемоновое масло в горчичном	ИК	<i>PCA и LDA</i>	Дискриминация образцов с добавлением разных объемов арганового масла	[72]
Морские нефтепродукты	ИК	<i>PLS-DA</i>	Дискриминация омега-3 ПНЖК в морских нефтепродуктах	[73]
Бактерии (<i>Brevundimonas</i>)	ИК	<i>HCA, PCA, SIMCA</i>	Дискриминация бактерий, акклиматизированных к	[74]

Объект	Метод	Метод обработки	Задача	Литература
<i>sp., Gordonia sp. и Microbacterium. Oxydans)</i>			тяжелым металлам	
Зеленый чай	УФ	<i>HCA, PCA</i>	Дискриминация чая по происхождению	[77]
Оливковое масло	УФ	<i>PLS-DA</i>	Дискриминация фальсифицированного свежего оливкового масла добавление старого	[78]
Джин	УФ	<i>PCA</i>	Дискриминация джина по способу хранения	[79]

1 *ANOVA* – дисперсионный анализ; **2** *PCA* – метод главных компонент; **3** *PLS* – метод проекции на латентные структуры; **4** *FDA* – факторный дискриминантный анализ; **5** *Tucker3* – аналог *PCA* для трехмерных данных; **6** *LDA* – линейный дискриминантный анализ; **7** *SIMCA* - формальное независимое моделирование аналогий классов; **8** *HCA* – иерархическая кластеризация; **9** *SVM* – метод опорных векторов.

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1. Исходные вещества, аппаратура, обработка результатов измерений, методики эксперимента

2.1.1. Исходные вещества

В работе использовали нанопорошок кремнезёма с размером частиц 11 ± 3 нм; полиэтиленимин (ПЭИ) в виде 50%-го (мас./об.) водного раствора, родамин В изотиоцианат, флуоресцеин изотиоцианат, *o*-фталевый диальдегид, 3-(*N*-морфолино)пропансульфоновую кислоту (МОПС), меркапто-*n*-додекановую кислоту, 8-гидроксихинолин-5-сульфоновую кислоту, хлорид цинка(II), трис(2,2'-бипиридилат)дихлор рутения (II), ацетат цинка двухводный, триэтаноламин, сульфид натрия девятиводный, этиленгликоль, гидроксид калия, липоевая кислота, боргидрид натрия, уксусная кислота, ацетат свинца, мезо-2,3-димеркаптоянтарная кислота, глутатионат натрия, сополимер метилметакрилата, метилакрилата и акриловой кислоты (МАКАК), $AgNO_3$, *n*-гексан, метанол, хлороформ, ацетат натрия, этанол, диметилсульфоксид (ДМСО), тиазоловый оранжевый (все производства "Sigma-Aldrich", США). Глутатион использовали в виде натриевой соли (препарат TAD 600, Biomedica, Италия).

Для приготовления растворов использовали дистиллированную воду, полученную однократной перегонкой в дистилляторе ДЭ-4-2М и дополнительно очищенную в установке Millipore (18 МОм·см).

В качестве модельных аналитов использовали следующие лекарственные препараты: амикацин, бензилпенициллин натрия, хлорамфеникол, цефтриаксон, циметидин, изониазид, парацетам, сульфадиазин, сульфаметоксазол, анальгин, пefлоксацин, ципрофлоксацин, ампицилин, бензилпенициллин, эритромицин, триметоприм, стрептомицин, изониазид, тетрациклин ("Sigma-Aldrich", США), а также бычий сывороточный альбумин (БСА) и аскорбиновую кислоту.

2.1.2. Аппаратура

Спектры флуоресценции записывали на спектрофлуориметрах Cary Eclipse (Agilent, США) и «Флюорат-02 Панорама» (Люмэкс, Россия). УФ-видимые

спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре СФ-102 (Аквилон СЗ, Россия). Для диспергирования суспензий применяли ультразвуковой гомогенизатор Sonopuls HD 2070 (Bandelin, ФРГ) с погружным зондом. Использовали рН-метр-иономер "Эксперт-001" (Эконикс-эксперт, Россия) с комбинированным рН-полумикроэлектродом ЭСК 10614 (ООО "Измерительная техника"). Для центрифугирования суспензий в пробирках типа «Эппендорф» использовали центрифугу-вортекс «Elmi CM-50M/2010». Растворы перемешивали на орбитальном шейкере. Для отбора растворов применяли дозаторы на $10 \pm 0,5$, 200 ± 1 и 1000 ± 10 мкл. Взаимодействие флуорофоров с образцами проводили в 96-луночных флуориметрических планшетах (Thermo Scientific Nunc F96 MicroWell, white, cat. No 136101). Цифровые фотографии планшетов получали на визуализаторе TLC Visualizer 2 (Camag, Швейцария).

2.1.3. Методики эксперимента

2.1.3.1. Приготовление флуорофоров

Получение нанопорошка кремнезёма, модифицированного полиэтилен-имином (SiO_2 -ПЭИ). Навеску 240 мг нанопорошка кремнезёма добавили в 6 мл 0,1 М (по мономеру) раствора неразветвлённого ПЭИ и встряхивали на шейкере (130 об/мин) в течение 20-ти мин. Суспензию диспергировали на ультразвуковом гомогенизаторе (около 2-х мин при 40-60% мощности) и разлили по 2 мл в 6 пластиковых пробирок типа «Eppendorf». Провели 8-кратную отмывку водой, включавшую центрифугирование при 10 тыс. об/мин в течение 3-х мин с последующим декантированием центрифугата, при этом за одну отмывку удалялось около 1,8 мл и оставалось около 0,3 мл суспензии (вместе с сорбентом). Отмытый осадок доводили водой до 1 мл в каждой пробирке, диспергировали на УЗ-гомогенизаторе при 15% мощности в течение 1 мин, смешивали содержимое всех пробирок и вводили ещё 9 мл воды.

Иммобилизация флуоресцентных красителей на SiO_2 -ПЭИ. Центрифугировали 2 мл полученной, как описано выше, суспензии SiO_2 -ПЭИ (10 тыс. об/мин, 3 мин), раствор слили, а осадок промыли 2 мл диметилсульфоксида (ДМСО) для удаления воды. Добавили 1 мл раствора

родамина В изотиоцианата или флуоресцеина изотиоцианата (ФИТЦ) (5 мг/мл в ДМСО) и перемешивали на шейкере в течение 9 ч. Продукт центрифугировали (10 тыс. об/мин, 3 мин) и затем многократно отмывали осадок водой до удаления избытка красителя.

Полиэтиленимин с привитыми группами флуоресцеина (Флуор/ПЭИ).
 Приготовили 0,028 М раствор ПЭИ в фосфатном буфере, для чего к 100 мкл 0,28 М водного раствора разветвленного ПЭИ добавили 900 мкл фосфатного буфера (рН 7,4, 0,067М). Навеску ФИТЦ (4,0 мг) растворили в 4,0 мл смеси ДМСО:Н₂О (1:1). К полученному раствору добавили 400 мкл 0,028 М раствора ПЭИ в фосфатном буфере и поместили на орбитальный шейкер (150 об/мин). Через 5 ч добавили 500 мкл 0,1 М карбонатного буфера (рН 9,0) и продолжали перемешивание еще 19 ч. Продукт диализовали в диализных пробирках Pur-A-Lyzer против 600 мл дистиллированной воды. Воду меняли через 1 сутки после начала диализа и еще через 19 ч. Еще через сутки диализ остановили.

Кремнезем, нековалентно модифицированный флуоресцеином (ФИТЦ/SiO₂).
 Смешали 4,7 мг ФИТЦ, растворенного в 1 мл ДМСО, и 80 мг нанопорошка кремнезема и встряхивали суспензию в течение 24 ч при 150 об/мин на орбитальном шейкере.

Получение флуоресцирующего основания Шиффа (рис. 3). К 800 мкл ацетатного буфера (1 М по ацетат-иону, рН 4,2) добавили 200 мкл суспензии 140 мг (0,2 ммоль по мономерному звену) ПЭИ в этаноле, затем 14 мг (0,1 ммоль) *о*-фталевого диальдегида (*о*-ФДА), растворённого в 250 мкл этанола, и перемешали. Нагрели на водяной бане при температуре 55±1°С в течение 30 мин. Получили красноватый раствор продукта, который при стоянии в течение 1-2 суток частично обесцвечивался.

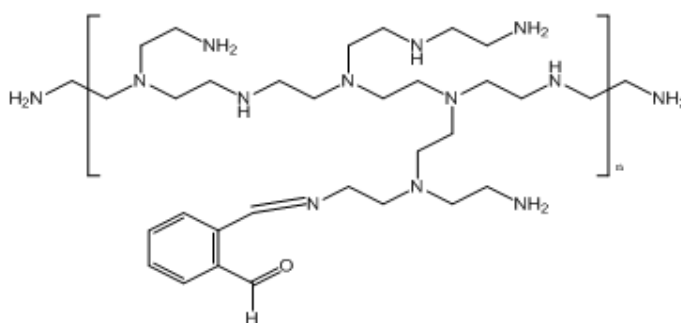


Рис. 3. Структурная формула основания Шиффа.

Получение водорастворимых квантовых точек CdSe-1. Использовали квантовые точки (КТ) *CdSe/CdS/ZnS* производства ООО «Нанотех-Дубна», стабилизированные олеиновой кислотой, в виде раствора в гексане (предоставлены д.х.н. С.А. Павловым). Для удаления стабилизатора (олеиновой кислоты) и перевода в водный раствор к 0,5 мл КТ *CdSe-1* (150 мг/мл) добавили 4,5 мл гексана и 5 мл метанола, встряхнули вручную 3-5 мин и оставили на 10 мин. Метанол удалили с помощью глазной пипетки. Такую процедуру повторили 3 раза. Концентрация точек в конечном растворе – 15 мг/мл.

Аликвоту 0,5 мл очищенных от стабилизатора КТ поместили в полипропиленовую пробирку вместимостью 15 мл. Добавили 4,5 мл хлороформа, 400 мкл жидкой меркапто-*n*-додекановой кислоты, подогретой до комнатной температуры, и перемешивали на шейкере при 180 об/мин в течение 24 ч. После этого центрифугировали при 3000 об/мин, хлороформ декантировали, прилили 3 мл хлороформа и встряхнули 5 мин вручную, чтобы удалить остатки олеиновой кислоты, освободившейся при замене лигандов. Повторно центрифугировали. Повторили эту процедуру три раза. Отдельно приготовили 1,1 мМ раствор меркапто-*n*-додекановой кислоты с рН 10 (рН довели раствором *NaOH*). После последней промывки декантировали хлороформ, оставили на 10 мин и смешали в необходимом объеме с 1,1 мМ раствором меркапто-*n*-додекановой кислоты.

Квантовые точки CdSe/CdS/ZnS, модифицированные Jeffamine M-1000 (блок-сополимер полиоксиэтилена и полиоксипропилена с первичными аминогруппами) (CdSe-2), полученные от проф. И.Ю. Горячевой (Институт химии, Саратовский университет), использовали без модифицирования.

Получение квантовых точек PbS. В стеклянный стакан на 50 мл при перемешивании на магнитной мешалке внесли 2 мл 0,03 М раствора липоевой кислоты или 50 мг (0,3 М) мезо-2,3-димеркаптоянтарной кислоты и 20 мг боргидрида натрия. Добавили 300 мкл 1 М уксусной кислоты для разложения избытка боргидрида и довели рН раствора до 9,0 с помощью 1 М *NaOH*. При интенсивном перемешивании ввели 1 мл 0,1 М раствора ацетата свинца, при этом раствор становился желтоватым и мутным. Далее по каплям при перемешивании

добавили 2 мл раствора сульфида натрия (0,025 М), при этом раствор приобретал темно-коричневую окраску. Перемешивание продолжали еще 5 мин.

Получение квантовых точек Ag_2S , стабилизированных глутатионом и сополимером метилметакрилата, метакриловой и акриловой кислот (МАКАК). К смеси 0,5 мл раствора глутатионата натрия (100 мг/мл) и 0,5 мл 10%-го (мас./об.) водного раствора МАКАК, добавили 1 мл 0,02 М раствора $AgNO_3$ при перемешивании, затем быстро вводили 400 мкл 0,02 М раствора Na_2S и нагревали на электроплитке при $85\pm 5^\circ C$ в течение 20 мин.

Получение квантовых точек ZnS . В трехгорлую колбу с магнитной мешалкой поместили 50 мл 0,01 М раствора двухводного ацетата цинка в этиленгликоле. В атмосфере азота по каплям добавляли триэтаноламин в мольном соотношении к цинку 8:1. Довели рН до 10,75 раствором KOH 1 М (1 мл). Далее внесли по каплям 60 мл 0,01 М Na_2S . Кипятили с обратным холодильником при $120^\circ C$ 2,5 ч.

Получение квантовых точек $ZnSe$ [125]. Сначала получали гидроселенид натрия, для чего селен в гранулах растирали в ступке в порошок, навеску 80 мг Se пересыпали в термостойкую колбу и приливали 5 мл деионизированной воды. Колбу снабжали мешалкой, помещали в вытяжной шкаф и подавали в колбу азот. Через 5 мин добавляли 0,114 г боргидрида натрия $NaBH_4$ и нагревали 10 мин при $70^\circ C$, в результате чего получали раствор цвета от светло-желтого до бесцветного. На воздухе гидроселенид натрия окисляется, окраска становится красной (стремились не допускать красного окрашивания). Получили раствор 1 ммоль $NaHSe$ на 5 мл воды.

Для получения собственно квантовых точек 0,5 ммоль ацетата цинка взвешивали, пересыпали в коническую колбу, вводили 0,2 г глутатиона, 1,25 мл приготовленного ранее раствора гидроселенида натрия, 1 мл гидразин-гидрата и 5 мл воды. Доводили рН раствора до 11, приливая по каплям 1 М $NaOH$. (Молярное соотношение $Zn:thiol:Se=0,5:0,65:0,25$.) Нагревали на электроплитке при температуре $100^\circ C$, при этом раствор обесцвечивался.

Смесь тиазолового оранжевого и ДНК (ТО–ДНК). В качестве флуорофора использовали краситель тиазоловый оранжевый; чтобы усилить флуоресценцию,

его интеркалировали в дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК). ДНК была получена из двух источников: натриевая соль ДНК из сельди (“Sigma-Aldrich”, США), обозначаемая ДНК-1, и лекарственный препарат «Деринат» (ЗАО ФП «Техномедсервис»), который содержал 2,5 г ДНК и 1 г $NaCl$ в 1 л воды (ДНК-2). ДНК-1 растворяли в воде с получением $7,2 \times 10^{-3}$ М (считая средний молярный вес нуклеотидной пары равным 670 г/моль). Растворы ДНК-1 и ДНК-2 разбавляли дистиллированной водой до $7,2 \times 10^{-5}$ М перед использованием. Тиазоловый оранжевый использовали в виде раствора $2,1 \times 10^{-4}$ М в воде.

Коммерческий органический флуорофор (КОФ). Растворяем в необходимом количестве дистиллированной воды.

2.1.3.2. Приготовление комплексов металлов

Комплекс цинка(II) с 8-гидроксихинолин-5-сульфоновой кислотой (8-Охи-Zn) получали смешиванием равных объемов водных растворов хлорида цинка(II) и кислоты, 0,001 М каждый.

Трис(2,2'-бипиридилат) дихлоррутения(II) ($Ru(bpy)_3^{2+}$) растворяли в воде с получением 0,001 М раствора и разбавляли водой до 1×10^{-5} М.

Комплекс тербия(III) с карбоксиметилированным полиэтиленимином (Tb^{3+} -ПЭИ). Для приготовления исходного 0,1 М раствора комплекса тербия(3+) с карбоксиметилированным полиэтиленимином (Tb^{3+} -ПЭИ) в 7 мл деионизованной воды растворили 0,307 г $Tb(NO_3)_3$. Исходный раствор готовили смешиванием 360 мкл 0,1 М раствора $Tb(NO_3)_3$, эквивалентного количества 360 мкл 0,1 М раствора карбоксиметилированного полиэтиленимина и 2,28 мл деионизованной воды.

2.1.3.3. Приготовление смесей флуорофоров

Смесь пяти флуорофоров: осн. Шиффа, Флуор/ SiO_2 , Pod/SiO_2 , КТ CdSe-1 и КТ PbS. Примерно за сутки до смешивания приготовили раствор КТ CdSe-1, стабилизированных *n*-меркаптододеканатом, разбавляя водой в 10 раз исходный раствор КТ (0,4 г/л). В день приготовления смеси к 1 мл буфера (0,1 М МОПС, рН 7,6) добавили 200 мкл суспензии 5×10^{-4} М Pod/SiO_2 и 100 мкл 5×10^{-4} М суспензии Флуор/ SiO_2 , встряхнули и оставили на 5 мин, при этом появлялся

красный осадок (видимо, продукт взаимной коагуляции разноименно заряженных частиц кремнезема с привитыми родамином и флуоресцеином). Центрифугировали суспензию на 3 тыс. об/мин в течение 2–3 мин и отделили почти прозрачный центрифугат, к которому добавили 80 мкл осн. Шиффа (0,0025 М) и 14 мл воды. Внесли 70 мкл раствора КТ *CdSe-1*, приготовленного, как описано выше, и 300 мкл исходного 0,02 М раствора КТ *PbS*. Для получения смесей меньшего числа флуорофоров (2–4) указанные объемы исключаемых флуорофоров заменяли водой.

Смесь трех флуорофоров: Tb³⁺-ПЭИ, ZnSe, CdSe-2. В кювету на 300 мкл добавляли растворы: 60 мкл *ZnSe*, 20 мкл *CdSe-2*, 50 мкл *Tb³⁺-ПЭИ*.

Отделение белка плазмы крови сульфатом аммония. Использовали гепаринизированную плазму крови человека (автор благодарит к.х.н. Д.А. Севко за предоставление образцов плазмы). В 2 мл плазмы внесли 140 мг сульфата аммония, перемешивали стеклянной палочкой и оставили на 10 мин. Затем суспензию центрифугировали (8 тыс. об/мин, 7 мин) и декантировали центрифугат. С центрифугатом описанную процедуру повторяли (обычно еще два раза) до получения почти бесцветного прозрачного супернатанта.

2.2. Обработка результатов измерений

2.2.1. Анализ спектров флуоресценции

Матрица данных содержала все спектры, полученные в ходе эксперимента. Перед выполнением анализа по методу главных компонент вычисляли формальную степень тушения Q для каждого значения интенсивности (8):

$$Q = (I - I_0) / I_0 \quad (8)$$

где I_0 – средняя интенсивность излучения контрольного образца (без аналитов) на соответствующей длине волны, I – средняя интенсивность излучения образца. Значения Q положительны, если интенсивность излучения увеличилась, и отрицательны, когда уменьшилась. Полученную матрицу счетов центрировали, а затем проводили анализ по методу *PCA* с использованием программного обеспечения *Unscrambler X* (Camo Software).

2.2.2. Обработка фотографий

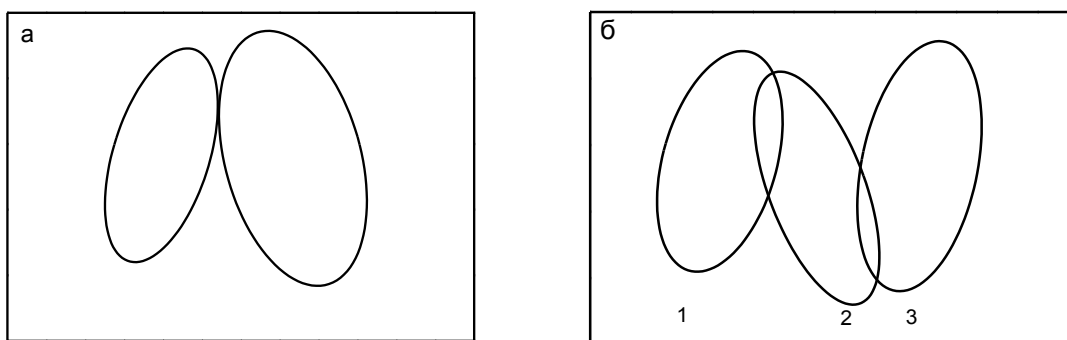
Контрастирование. Фотографии 96-луночных планшетов обрабатывали с помощью встроенного в программное обеспечение *Vision Cats* инструмента *SpotAmp*, который регулирует контрастность изображения относительно эталонной лунки, выбранной пользователем. Последовательное применение инструмента *SpotAmp* увеличивает цветовые различия между эталонной лункой и остальной фотографией.

Разложение цветового сигнала на RGB. Для разделения изображения на три канала: красный (red - *R*), зеленый (green - *G*) и синий (blue - *B*) использовали программное обеспечение *ImageJ*. В качестве исходных данных использовали выбранные круглые участки на изображении, соответствующие лункам планшета. В качестве выходных данные получали 6 значений интенсивностей цвета (*RGB* для двух длин волн – 254 и 366 нм). Если интенсивность одного из каналов стремилась к 0, то эти данные не использовали для обработки.

Нормировка. В некоторых экспериментах данные (интенсивности эмиссии спектров и цветовые интенсивности *RGB* на фотографиях) были нормированы перед проведением хемометрической обработки по формуле (8).

2.2.3. Оценка эффективности дискриминации

Доверительные эллипсы. Доверительные эллипсы строили в соответствии с распределением Стьюдента с уровнем достоверности 82% и наносили на графики счетов. В качестве простейшего способа охарактеризовать эффективность дискриминации подсчитывали число групп точек, визуально разделенных на графике счетов («число групп»). Образцы с соприкасающимися или перекрывающимися доверительными эллипсами считали неразделенными (рис. 4а). Если эллипсы пересекались, то использовали следующие правила: если эллипсы 1 и 2 и эллипсы 2 и 3 перекрываются попарно (рис. 4б), но эллипсы 1 и 3 не перекрываются, то, тем не менее, рассматривали все точки, находящиеся в эллипсах 1, 2 и 3 как одну группу. Если из визуального рассмотрения графика счетов было трудно сделать вывод, перекрываются ли два доверительных эллипса, рассчитывали расстояние Махаланобиса и сравнивали полученное значение с 4,0.



$$D_M = 4,0$$

Рис. 4. а) Группы точек с соприкасающимися доверительными эллипсами (при уровне доверительной вероятности 82% считали неразделенными. Расстояние Махаланобиса между ними $D_M = 4,0$. Если же эллипсы не соприкасаются, то группы разделены; б) эллипсы 1 и 2 и эллипсы 2 и 3 перекрываются попарно, но эллипсы 1 и 3 не перекрываются, в таком случае рассматривали все точки в эллипсах 1, 2 и 3 как одну группу.

Другой (предложенный нами) метод оценки качества дискриминации включал число пересечений доверительных эллипсов, подсчитываемое вручную. Эллипсы могут пересекаться несколькими способами: перекрываться в двух, трех или четырех точках (что и использовали как число пересечений), или же один эллипс будет лежать внутри другого, что принимали за 4 пересечения.

Расстояние Махаланобиса. На примере виски рассмотрим анализ фотографий образцов. Матрица данных включала 16 исследуемых образцов виски и 6 контрольных образцов; таким образом, каждая строка содержала 2×301 интенсивностей для спектров флуоресценции или 2×3 (*RGB*) цветовых интенсивностей, полученных из фотографий при двух длинах волн (254 и 366 нм). Матрицу данных центрировали и подвергали анализу с помощью *PCA*. Критерием дискриминации являлось безразмерное расстояние Махаланобиса (D_M) [126], используемое для описания разделения между несферическими группами точек. В качестве критерия дискриминации выбрали значение $D_M > 4,0$, при котором группы точек визуально разделялись на графиках счетов. D_M между классами рассчитывали с использованием программного обеспечения на языке *R*.

Расчет общей чувствительности с использованием расстояний Махаланобиса между образцами. Общую чувствительность (в англоязычной

литературе – *total sensitivity*, или *TS*) рассчитывали как число правильно идентифицированных образцов к количеству всех образцов.

Методы дискриминантного анализа (DA) и метод опорных векторов (SVM). Линейный дискриминантный анализ (*LDA*) создает линейную границу между двумя классами. В этой работе расстояние от центра групп рассчитывали с использованием расстояния Махаланобиса. Квадратичный дискриминантный анализ (в англоязычной литературе - *quadratic discriminant analysis*, или *QDA*) – это метрика расстояния, аналогичная *LDA*, в которой расстояние до каждого класса рассчитывается с использованием матрицы ковариаций каждого класса. Граница между классами, создаваемая *QDA*, представляет собой квадратичную кривую [127]. Метод опорных векторов (*SVM*) – это метод классификации, основанный на статистическом обучении, в котором определяется функция, которая описывает гиперплоскость для оптимального разделения классов. В методе *SVM* правило классификации определяется небольшим количеством выборок обучающего набора, называемых опорными векторами (в англоязычной литературе – *support vector*, или *SV*) [128]. В данной работе входные данные преобразовывали тремя функциями: линейной, полиномом третьей степени и радиальной базисной функцией.

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1. Оценка дискриминирующей способности флуорофоров с помощью искусственных смесей аналитов

3.1.1. Выбор флуорофоров*

В последнее время метод «отпечатков пальцев» находит всё большее применение при решении задач классификации и распознавания объектов по их уникальным спектральным данным различной природы. Классификацией называется процедура, в которой объекты распределяются по группам (классам) в соответствии с численными значениями переменных, характеризующих свойства этих объектов [129]. При этом классификацией называют не только саму процедуру, но и ее результат. Задачи классификации можно разделить на две группы. Классификация без обучения (распознавание образов), в которой не используется обучающий набор данных, и классификация с обучением, которую также называют дискриминацией, где применяют обучающий набор данных, а неизвестные образцы классифицируют по известным группам. В данной работе в основном использовали классификацию без обучения. Термины «распознавание или разделение образов» и «дискриминация» мы будем считать синонимами.

В работе проводили классификацию большого числа (более 2-х) классов. Если достигнуто разделение, каждый класс должен быть изолированным, то есть не пересекаться с другими, а неизвестный объект должен четко относиться к тому или иному классу. Но на практике при наличии большого числа классов это не всегда осуществимо, поэтому одной из важных и интересных задач является оценка способности к дискриминации образцов предлагаемым методом с использованием различных способов получения и обработки сигналов.

* Divyanin N.N., Razina A.V., Rukosueva E.A., Garmash A.V., Beklemishev M.K. Discrimination of 2-3-component mixtures of organic analytes by a “fluorescent tongue”: A pilot study // *Microchemical Journal*, 2017, 135, 48-54. DOI: 10.1016/j.microc.2017.08.002. (IF= 2,75, Q2) – руководство экспериментальной работой и обработка результатов

В развиваемом нами варианте метода «отпечатков пальцев» в качестве способа получения сигналов использовали флуоресцентную спектроскопию. К объектам, не обладающим (или обладающим малоинтенсивной) флуоресценцией мы предлагаем добавлять флуорофоры извне. Для этого необходимо иметь водорастворимые флуорофоры (если рассматривать возможность классификации объектов на водной основе). Для классификации нерастворимых в воде объектов нужно выбрать набор флуорофоров, растворимых в органических растворителях. Основными характеристиками, которыми должен обладать флуорофор, – это эмиссия в широком спектральном диапазоне и стабильный сигнал, что позволит получить максимум аналитической информации об образце. Проанализировав литературу, подобрали доступные флуорофоры с такими спектральными характеристиками.

В качестве флуорофоров использовали квантовые точки (*ZnS*, *PbS*, *Ag₂S*, *ZnSe*, *CdSe*), которые получали по известным методикам (разд. 2.1.3.1.), при этом варьировали стабилизаторы, чтобы получить флуорофор с наиболее благоприятными характеристиками. Квантовая точка – частица материала с размером, близким к длине волны электрона в этом материале (обычно размером 1–10 нм), внутри которой потенциальная энергия электрона ниже, чем за его пределами, таким образом, движение электрона ограничено во всех трех измерениях. Кроме квантовых точек, наш интерес вызывали органические флуоресцирующие агенты, в частности, основания Шиффа. Нами получено основание Шиффа, которое представляет собой продукт взаимодействия о-фталевого диальдегида и полиэтиленimina (осн. Шиффа). Это соединение имеет широкую область возбуждения (250–350 нм) и максимум эмиссии при 450 нм (разд. 2.1.3.1.).

В работе использовали полученные нами по оригинальной методике иммобилизованные на кремнеземе, модифицированным полиэтиленимином, флуоресцентные красители: флуоресцеин или родамин В изотиоционат (разд. 2.1.3.1.) (*Флуор/SiO₂* и *Род/SiO₂* соответственно). Флуоресцентные характеристики полученных красителей не отличались от таковых для тех же красителей в нативной форме.

Все полученные флуорофоры изучали с точки зрения изменения интенсивности их эмиссии в присутствии модельных аналитов. В качестве модельных аналитов выбраны растворимые в воде лекарственные вещества средней молекулярной массы различной природы. Наличие различных функциональных групп позволило аналитам с большей вероятностью влиять на эмиссию флуорофоров. В качестве примера для пяти вышеназванных флуорофоров представлена гистограмма тушения-разгорания флуоресценции в присутствии аналитов (рис. 5). Из этой гистограммы видно, что разные аналиты по-разному влияют на флуоресцентные характеристики флуорофоров, что и требуется в развиваемом методе. Некоторые аналиты можно классифицировать, используя лишь один из выбранных флуорофоров, однако для более четкой классификации мы составляли смеси флуорофоров.

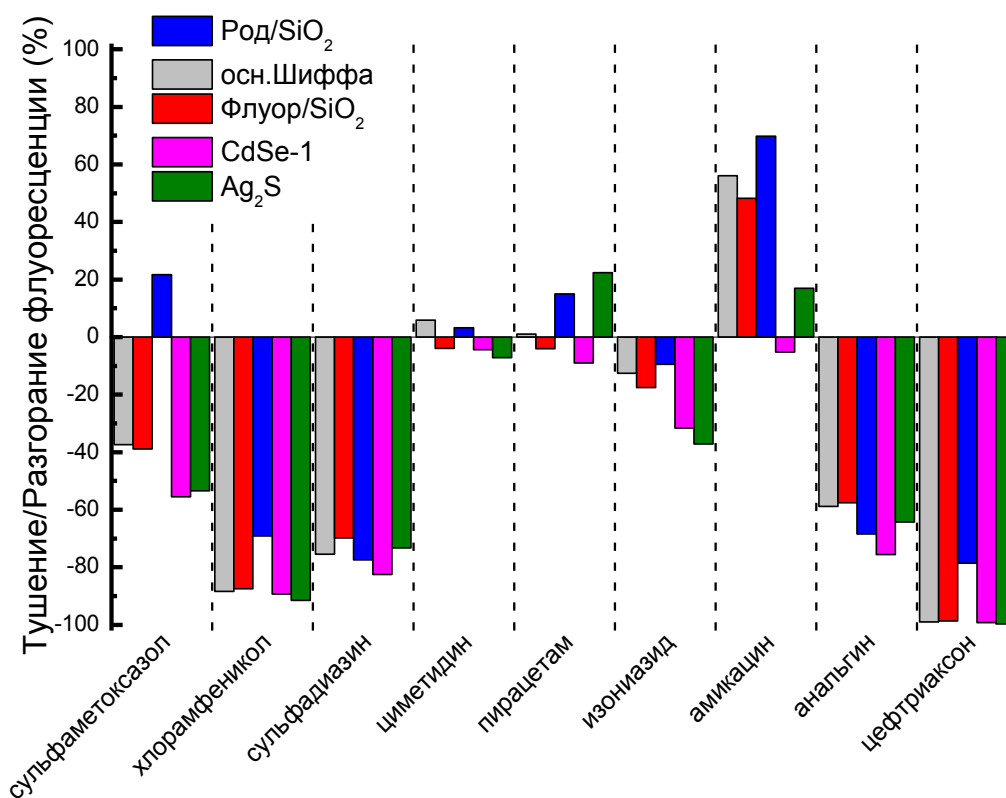


Рис. 5. Степень тушения/разгорания (%) флуоресценции флуорофоров: *Rod/SiO₂*, осн. Шиффа, *Флуор/SiO₂*, *CdSe-1*, *Ag₂S* в присутствии аналитов одинаковой концентрации $4,1 \cdot 10^{-4}$ М.

3.1.2. Предварительная оценка свойств смесей флуорофоров

При выборе флуорофоров для включения в смесь стремились к разнообразию эффектов в присутствии модельных аналитов, т.е. различным степеням тушения или разгорания разных флуорофоров разными аналитами. Кроме этого, учитывали спектральные характеристики: требовалось, чтобы смесь флуорофоров можно было возбудить при одной длине волны, а полосы эмиссии флуорофоров перекрывали бы максимально возможную область спектра. Такие условия при выборе флуорофоров можно обосновать следующим образом. Возбуждение всех флуорофоров одной длиной волны позволяет сократить время анализа в число раз, равное числу флуорофоров в смеси. Мы предположили, что выбрав флуорофоры, эмиссия которых перекрывает максимально возможную часть спектра, позволит получить максимальное количество информации для классификации образцов. В то же время, использовать флуорофоры, полосы эмиссии которых сильно перекрываются, нецелесообразно. С учетом перечисленных требований мы составили смесь пяти флуорофоров: флуоресцирующее основание Шиффа ($\lambda_{em} = 450$ нм), модифицированные красители на кремнеземе (флуоресцеин ($\lambda_{em} = 520$ нм) и родамин ($\lambda_{em} = 580$ нм)), КТ *CdSe-1* ($\lambda_{em} = 620$ нм), стабилизированные меркаптододекановой кислотой, а также КТ *PbS* ($\lambda_{em} = 710$ нм) или *Ag₂S* ($\lambda_{em} = 720$ нм).

При смешивании флуорофоров оказалось, что они влияют на эмиссию друг друга, что чаще всего проявлялось в тушении флуоресценции (рис. 6а и рис. 6б). Таким образом, в дальнейшем пришлось отказаться от флуорофора *Ag₂S*, в присутствии которого эмиссия остальных флуорофоров оказалась крайне низкой.

Спектры одной из наиболее удачных смесей флуорофоров представлены на рисунке 6а (смесь состояла максимально из пяти флуорофоров). Концентрации флуорофоров подбирали таким образом, чтобы обеспечить достаточную эмиссию при возбуждении светом с длиной волны 300 нм. Например, осн. Шиффа (рис. 6а) обладает интенсивностью эмиссии порядка 70 у.е., в то время как в смеси флуорофоров (рис. 6б) интенсивность снижается до 9 у.е. Для получения сигнала достаточной интенсивности концентрации флуорофоров в смеси были увеличены по сравнению с концентрацией в индивидуальном растворе.

Природа буфера также влияет на интенсивность эмиссии. Мы рассмотрели как неорганические (фосфатный, боратный, цитратный), так и органические (*МОПС*, *ТРИС* - трис(гидроксиметил)аминометан) буферы с различными значениями рН. Наиболее подходящим с точки зрения стабильности флуоресценции оказался буфер *МОПС* (рН 7,6, конечная концентрация 4 мМ).

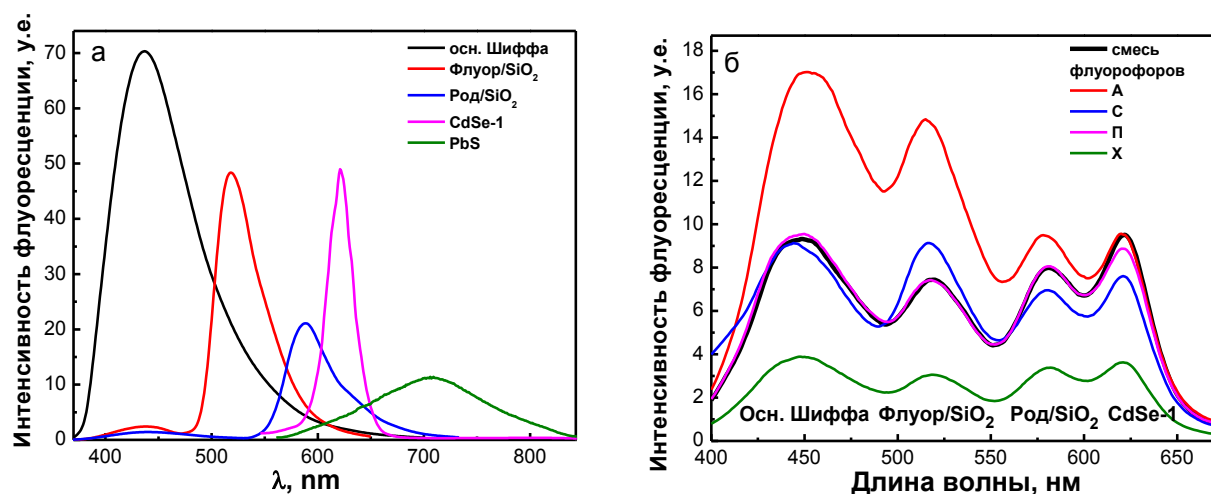


Рис. 6. а) Спектры эмиссии индивидуальных флуорофоров (осн. Шиффа, *Флуор/SiO₂*, *Род/SiO₂*, *CdSe-1*). б) Спектры эмиссии смеси 4-х названных флуорофоров без аналитов (черный спектр) и в присутствии 4×10^{-4} М аналитов: А – амикацина (красный), С – сульфаметоксазола (синий), П – пирацетама (розовый), Х – хлорамфеникола (зеленый). Буфер *МОПС* (рН 7,6), $\lambda_{\text{возб.}} = 300$ нм.

Предварительно изучили влияние нескольких лекарственных соединений на интенсивность эмиссии флуорофоров. Выбрали соединения (разд. 2.1.1.), имеющие различное строение. Оказалось, что разные соединения оказывали различное влияние на сигнал (тушение или разгорание флуоресценции), что необходимо для последующего успешного анализа смесей аналитов, хотя явной зависимости изменения сигнала в зависимости от присутствия тех или иных функциональных групп не наблюдали. Из всех соединений мы выбрали четыре модельных аналита, различным образом влияющих на сигнал: соединение, которое, как правило, увеличивало интенсивность флуоресценции – амикацин, уменьшало – хлорамфеникол, проявляло противоположные эффекты при разных длинах волн – сульфаметоксазол и соединение, которое проявляло слабые эффекты – пирацетам.

Данные аналиты выбраны как модельные для изучения дискриминирующей способности флуорофоров.

В присутствии этих четырех соединений интенсивность эмиссии флуорофоров изменяется сложным образом. На рисунке 7 показано, что эффекты аналитов могут быть неаддитивными, то есть в присутствии аналита суммарный сигнал отдельных флуорофоров может отличаться от сигнала смеси. Это может быть практически полезно в тех случаях, когда смешивание флуорофоров усиливает действие аналитов. В то же время, это не позволило выбирать флуорофоры, испускающие в одном и том же спектральном диапазоне, так как невозможно различить суммарный эффект двух флуорофоров в смеси и сигнал индивидуальных флуорофоров.

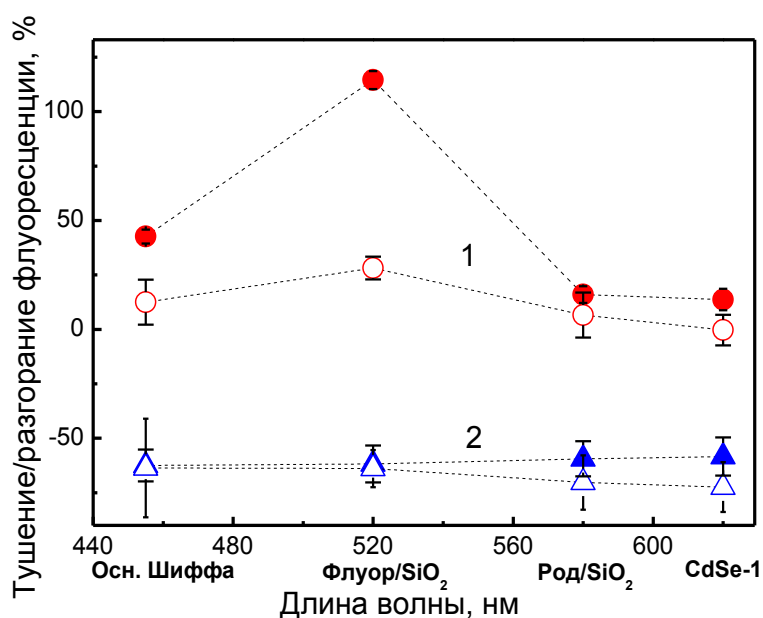


Рис. 7. Степень тушения/разгорания флуоресценции (%) для 4-х флуорофоров (отмеченных под осью абсцисс), взятых в виде смеси (закрашенные символы) и суммарного сигнала 4-х индивидуальных флуорофоров (пустые символы) в присутствии модельных аналитов: амикацин (кружки) и хлорамфеникол (треугольники). Значения степеней тушения/разгорания рассчитывали по интегральной интенсивности спектра в диапазоне ± 10 нм от максимума излучения для каждого из флуорофоров (интенсивности корректировали с учетом излучения других флуорофоров на этой длине волны).

3.1.3. Дискриминация смесей аналитов

При разработке метода «флуоресцентный глаз» необходимо оценить способность флуорофоров распознавать аналиты. Полагаться на литературные данные было невозможно, так как свойства смесей флуорофоров ранее практически не изучались. По этой причине мы попытались исследовать распознающую способность смесей флуорофоров на примере дискриминации синтетических смесей модельных аналитов (амикацин, далее кратко обозначаемый «А»), хлорамфеникол «Х», сульфаметоксазол «С» и пирарцетам «П»), все возможные двух- и трехкомпонентные смеси которых были составлены в равных молярных концентрациях. Задача состояла в том, чтобы изучить влияние таких смесей на спектры эмиссии различных смесей флуорофоров и разделить их с использованием хемометрического метода обработки данных. При этом требовалось выявить наиболее подходящее число флуорофоров для классификации модельных смесей. В качестве хемометрического метода обработки данных использовали метод главных компонент. Использование метода *РСА* позволяет уменьшить размерность данных от нескольких сотен (число регистрируемых длин волн в спектре) до двух-трех, несущих основную информацию. Результаты применения метода *РСА* представляли в виде графиков счетов (обычно двумерных, т.е. в пространстве первых двух главных компонент). Каждому образцу при этом отвечает группа точек, каждая из которых, в свою очередь, соответствует одному параллельному опыту - спектру флуоресценции (или средней интенсивности одной лунки 96-луночного планшета). В данной работе под качеством дискриминации мы понимаем степень разграничения на графиках счетов этих групп точек, каждая из которых отвечает одному образцу.

Число флуорофоров в смеси варьировали от 1 до 5. Соответствующий график счетов для смеси пяти флуорофоров приведен на рисунке 8. Большинство модельных смесей можно различить, обработав весь набор данных и используя две главные компоненты (*РС*) (рис. 8а). Несмотря на то, что пирарцетам слабо влияет на интенсивность флуоресценции, отличия пирарцетама от нулевого образца существенны, поэтому многие из смесей, содержащие пирарцетам, оказались разделены (А и А+П; Х и Х+П; С+Х и С+Х+П; А+С и А+С+П, рис. 8а). Включение

третьей главной компоненты и использование пространства $PC1-PC2-PC3$ (или, альтернативно, пары плоских участков $PC1-PC2$ и $PC1-PC3$) позволяет различить больше пар смесей (в случае пяти флуорофоров возможно различить комбинации С и С+П; Х+С и Х+П, рис. 8б). Похожую ситуацию наблюдали и для других смесей флуорофоров.

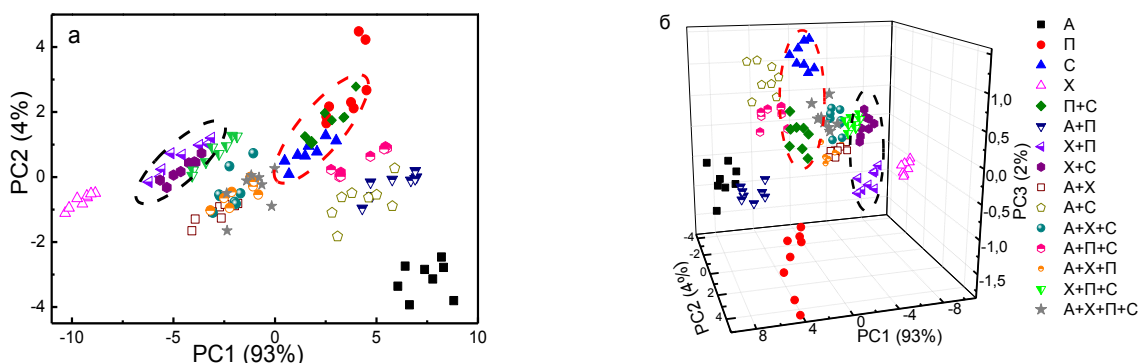


Рис. 8. Графики счетов метода главных компонент, полученные с использованием спектров флуоресценции смеси пяти флуорофоров (осн. Шиффа, $Fluor/SiO_2$, Pod/SiO_2 , $CdSe-1$, PbS) с модельными аналитами (А – амикацин, Х – хлорамфеникол, С – сульфаметоксазол, П – пираретам) и их смеси в воде; а) график счетов, построенный по двум главным компонентам ($PC1-PC2$), б) 3D-график счетов ($PC1-PC2-PC3$). Эллипсами выделены две группы точек, разделение которых можно увидеть только на трехмерном графике (Х и П+Х, Х+С и Х+П).

Смесь четырех флуорофоров (осн. Шиффа, Pod/SiO_2 , $Fluor/SiO_2$, $CdSe-1$) оказалась более эффективной, чем смесь пяти флуорофоров. При применении однократного разложения по методу главных компонент возможно дискриминировать все смеси, за исключением следующих четырех: А+С; А+П+С; А+Х+С; А+Х+П+С (рис. 9а). Перед вторым применением метода PCA с использованием тех же спектральных данных мы исключили спектры хорошо разделенных групп и применили метод PCA только к спектрам смесей, которые не были дискриминированы. Результаты такого расчета (рис. 9б) показывают, что все смеси модельных аналитов четко различимы.

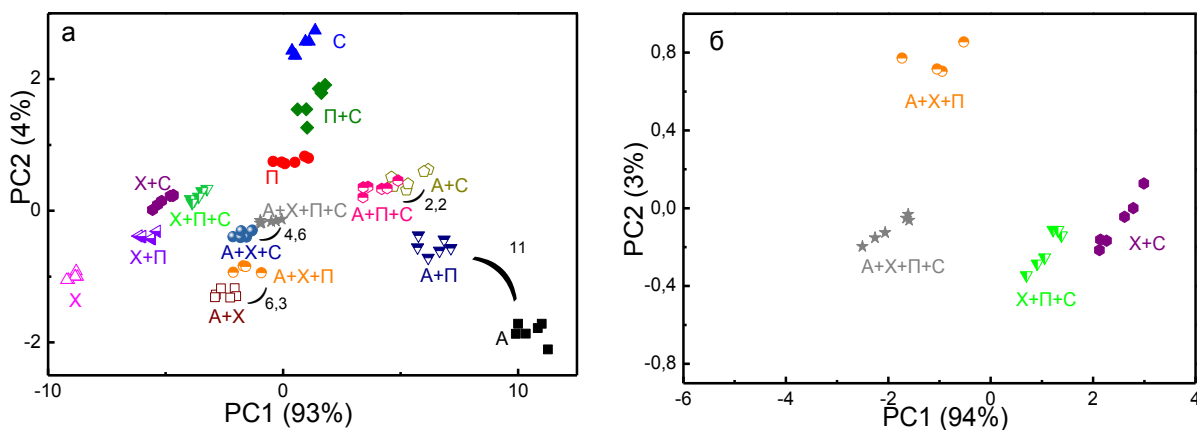


Рис. 9. Графики счетов, полученные с использованием смеси 4-х флуорофоров (осн. Шиффа, $Fluor/SiO_2$, Pod/SiO_2 , $CdSe-1$) с модельными аналитами (А – амикацин, Х – хлорамфеникол, С – сульфаметоксазол, П – пирацетам) и их смесей в воде. а) *PCA*, 1-й этап – в качестве данных используют весь набор спектров, т.е. 15 смесей и отдельные аналиты. б) *PCA*, 2-й этап – использование спектров 4-х недискриминированных смесей. Подписаны значения расстояний Махаланобиса между некоторыми образцами.

Чтобы сравнить эффективность различных смесей флуорофоров, использовали результаты двухступенчатого метода *PCA*. Число недискриминированных смесей приняли за меру эффективности дискриминации, в то время как расстояние Махаланобиса $D_M \geq 4$ приняли в качестве критерия дискриминации. Число недискриминированных смесей минимально для четырехкомпонентной смеси флуорофоров и имеет тенденцию к увеличению с уменьшением числа флуорофоров (табл. 3). Лучшая трехкомпонентная смесь (осн. Шиффа - Pod/SiO_2 - $CdSe-1$) оставляет неразделенными 5 групп при одностадийной обработке *PCA*, тогда как двухступенчатый *PCA* за исключением хорошо разделенных групп уменьшает число недискриминируемых смесей на одну пару (А+Х+П и А+Х+П+С). Индивидуальный флуорофор (Pod/SiO_2) не позволяет разделить большую часть модельных смесей. Таким образом, для достижения наиболее полного разделения модельных смесей необходимо использование смеси по меньшей мере четырех флуорофоров.

Можно заключить, что для дискриминации двойных, тройных и четверных модельных смесей аналитов можно использовать смеси флуорофоров. Однако

число флуорофоров, обеспечивающее наилучшую дискриминацию, необходимо подбирать для каждой конкретной задачи.

Таблица 3. Эффективность дискриминации смесей модельных аналитов с различными смесями флуорофоров с использованием двухэтапного метода главных компонент (А – амикацин, П – пирацетам, Х – хлорамфеникол, С – сульфаметоксазол)

Число флуорофоров в смеси	Состав смеси флуорофоров	Недискриминированные группы точек на графиках счетов <i>PC1-PC2</i>	Число недискриминированных групп
5	Осн. Шиффа, <i>Флуор/SiO₂</i> , <i>Род/SiO₂</i> , <i>CdSe-1</i> , <i>PbS</i>	П+С, П+Х, Х+С, А+Х, А+С, А+Х+С, С+Х+П, Х+П+С, А+Х+П+С ³	10
4	Осн. Шиффа, <i>Флуор/SiO₂</i>, <i>Род/SiO₂</i>, <i>CdSe-1</i>	–	0
3	Осн. Шиффа, <i>Флуор/SiO₂</i> , <i>Род/SiO₂</i>	А+Х, А+С, А+Х+С, А+С+П, А+Х+П, А+Х+П+С	6
3	Осн. Шиффа, <i>Флуор/SiO₂</i> , <i>CdSe-1</i>	С, П, Х+П, Х+С, А+Х, А+С, А+Х+С, А+П+С, А+Х+П, Х+П+С, А+Х+П+С	11
3	<i>Флуор/SiO₂</i> , <i>Род/SiO₂</i> , <i>CdSe-1</i>	С, П+С, А+Х+С, А+Х+П, Х+П+С, А+Х+П+С	6
3	Осн. Шиффа, <i>Род/SiO₂</i> , <i>CdSe-1</i>	А+С, А+П+С, А+Х+П, А+Х+П+С	4
2	Осн. Шиффа, <i>Род/SiO₂</i>	А, Х, А+П, А+Х, Х+П, Х+С, Х+П+С, А+Х+С, А+Х+П, А+Х+П+С	10
2	<i>Род/SiO₂</i> , <i>CdSe-1</i>	А, Х, С, А+П, А+С, А+Х, Х+П, Х+С, П+С, А+П+С, А+Х+П, А+Х+С, Х+П+С, А+Х+П+С	14
2	<i>Флуор/SiO₂</i> , <i>CdSe-1</i>	П, С, А+С, А+П, Х+П, Х+С, П+С, А+П+С, А+Х+П, А+Х+С, Х+П+С, А+Х+П+С	12
1	<i>Род/SiO₂</i>	А, П, С, А+П, Х+П, П+С, А+Х, А+С, Х+С, А+Х+С, А+П+С, А+Х+П, Х+П+С, А+Х+П+С	14

Для оценки перспектив дальнейшего использования изученной смеси четырех флуорофоров, показавшей разделение смесей амикацина, пираретама, хлорамфеникола и сульфаметоксазола, изучили возможность дискриминации другой группы аналитов, состоящей из анальгина, бензилпенициллина, сульфадиазина и хлорамфеникола. На рисунке 10 представлен график счетов, из которого видно, что разделение смесей этих аналитов менее эффективно, чем предыдущей четверки аналитов. Можно заключить, что для каждого набора образцов флуорофоры следует подбирать индивидуально.

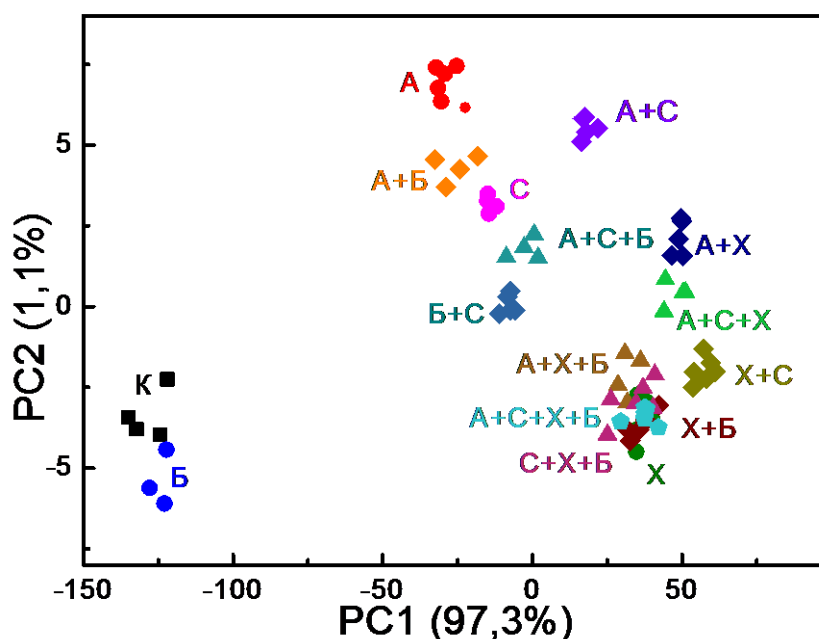


Рис. 10. Визуализация матрицы счетов сигналов смеси 4-х флуорофоров: осн. Шиффа, $Fluor/SiO_2$, Pod/SiO_2 , $CdSe-1$ в присутствии аналитов: А - анальгин, Б - бензилпенициллин, С - сульфадиазин, Х - хлорамфеникол, К - контроль; $\lambda_{ex} = 300$ нм, МОПС рН 7,6.

3.1.4. Сравнение дискриминации модельных смесей по спектрам поглощения и флуоресценции

Альтернативными «флуоресцентному глазу» являются методы «отпечатков пальцев», основанные на УФ- или видимой спектроскопии. Для оценки эффективности развиваемого нами метода мы оценили дискриминирующую способность метода «отпечатков пальцев» по спектрам поглощения в УФ-области на примере следующих двух систем, состоящих из модельных аналитов (1-я

система - амикацин, пирацетам, сульфаметоксазол, хлорамфеникол, 2-я система - аналгин, бензилпенициллин, сульфадиазин, хлорамфеникол) в водном растворе (МОПС, pH 7,6). Чтобы сопоставить эффективность двух методов для дискриминации модельных аналитов, выбрали смесь четырех флуорофоров как наиболее эффективную. Обработку полученных спектров, как и спектров флуоресценции, осуществляли методом главных компонент. Воспроизводимость УФ-спектров была выше, чем спектров флуоресценции, что могло бы повлечь лучшую дискриминацию.

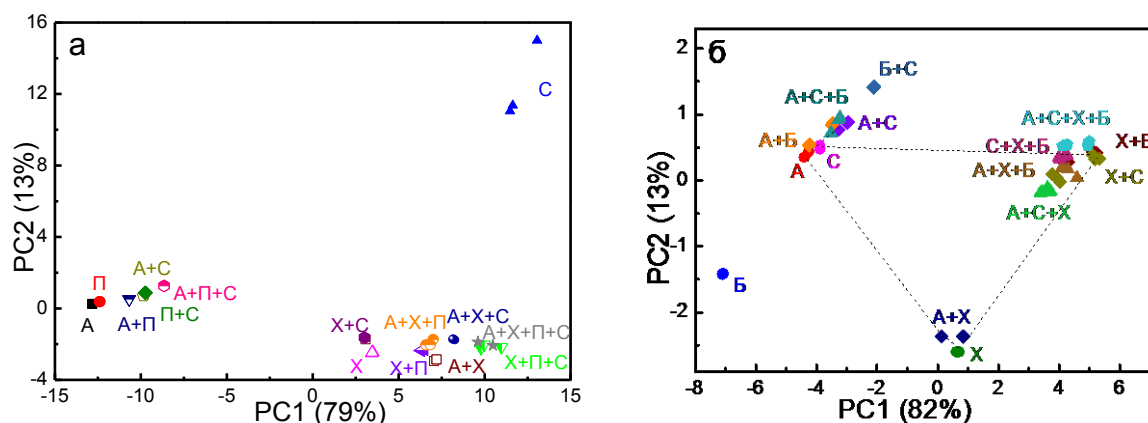


Рис. 11. Графики счетов для УФ-спектров поглощения (220-400 нм) модельных аналитов и их смесей а) А – амикацин, Х – хлорамфеникол, С – сульфаметоксазол, П – пирацетам б) А - аналгин, Б - бензилпенициллин, С - сульфадиазин, Х – хлорамфеникол) МОПС pH 7,6.

Тем не менее, даже визуальное сравнение графиков счетов, полученных при обработке УФ-спектров (рис. 11) и спектров флуоресценции в присутствии 4-х флуорофоров (рис. 9 и рис. 10) показывает превосходство метода «флуоресцентный глаз» при разделении групп точек, соответствующих модельным смесям аналитов. В таблице 4 перечислены неразделившиеся группы точек на графиках счетов для названных методов, а также приведено число недискриминированных групп. При сравнении этих значений видно, что для обеих систем модельных аналитов разделение по спектрам эмиссии более эффективно.

Таблица 4. Сравнение эффективности дискриминации смесей модельных аналитов методом «отпечатков пальцев» с помощью спектров флуоресценции и УФ-спектроскопии

Метод распознавания	Неразделившиеся группы точек на графике счетов по $PC1-PC2^1$	Число недискриминированных групп
<i>Первая система модельных аналитов</i>		
По УФ-спектрам аналитов	А, П, А+С, А+П, П+С, А+П+С, Х+С, Х, Х+П, А+Х+П, А+Х, А+Х+С, Х+П+С, А+Х+П+С	14
По спектрам эмиссии смеси четырех флуорофоров (осн. Шиффа, <i>Флуор/SiO₂, Род/SiO₂, CdSe-1</i>)	Х+С; А+Х+П; С+Х+П; А+Х+П+С	4
<i>Вторая система модельных аналитов</i>		
По УФ-спектрам аналитов	А, С, А+Б, Х+Б, Х+С, А+С+Б, А+Х+Б, А+С, С+Х+Б	9
По спектрам эмиссии смеси четырех флуорофоров	Х, А+С+Х+Б, А+Х+Б, Х+Б, С+Х+Б	5

¹ Группы точек соответствуют сигналам модельных аналитов и их смесей (по 6 параллельных опытов). 1-я система модельных аналитов: А – амикацин, Х – хлорамфеникол, С – сульфаметоксазол, П – пирацетам; 2-я система модельных аналитов: А – аналгин, Б – бензилпенициллин, С – сульфадiazин, Х – хлорамфеникол.

Полученный результат объясним тем, что спектры поглощения аналитов не всегда обладают достаточной индивидуальностью для возможности дискриминации. Кроме того, метод «флуоресцентный глаз» выигрывает в случае разделения аналитов, не обладающих заметным поглощением в УФ-видимой области (из изученных нами модельных аналитов к ним относятся аминогликозиды, в том числе амикацин).

3.1.5. Полуколичественный анализ модельных смесей

Используя выбранную систему 4-х флуорофоров (осн. Шиффа, *Флуор/SiO₂*, *Род/SiO₂*, *CdSe-1*), мы попытались одновременно определить концентрации трех выбранных аналитов (амикацин, хлорамфеникол, сульфаметоксазол) при совместном присутствии. Первоначально для данных аналитов получены спектры тушения флуоресценции смеси флуорофоров (рис. 12).

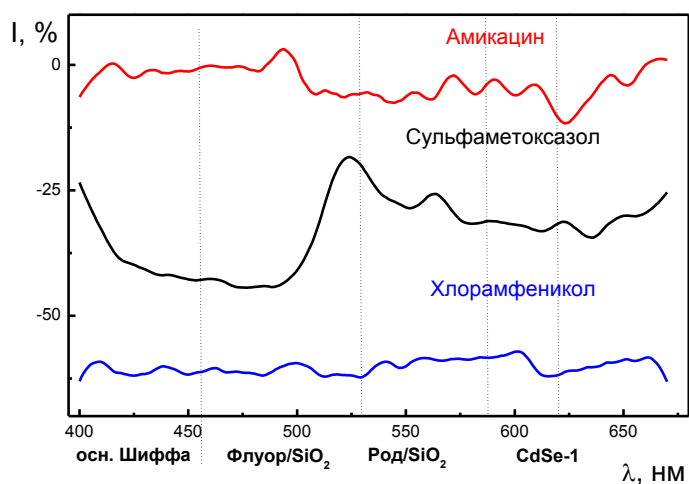


Рис. 12. Степень тушения флуоресценции (%) смеси 4-х флуорофоров (осн. Шиффа, *Флуор/SiO₂*, *Род/SiO₂*, *CdSe-1*) для аналитов: сульфаметоксазол, амикацин, хлорамфеникол (5×10^{-4} М каждый).

Анализируя полученные зависимости, можно сделать вывод, что хлорамфеникол примерно в равной степени тушит эмиссию всех флуорофоров, амикацин тушит все флуорофоры слабо и в близкой степени, так как степень тушения флуоресценции близка к 0, а сульфаметоксазол значительно тушит осн. Шиффа (40-50%), чуть слабее – *Флуор/SiO₂* и *CdSe-1* (30-40%) и слабо – *Род/SiO₂* (20%). Для каждого отдельного аналита построили градуировочные зависимости, выбрав в качестве аналитического сигнала интеграл всего спектра эмиссии. Из рисунка 13 видно, что ни для одного из аналитов нет линейной зависимости сигнала при низких концентрациях, а также высоки ошибки.

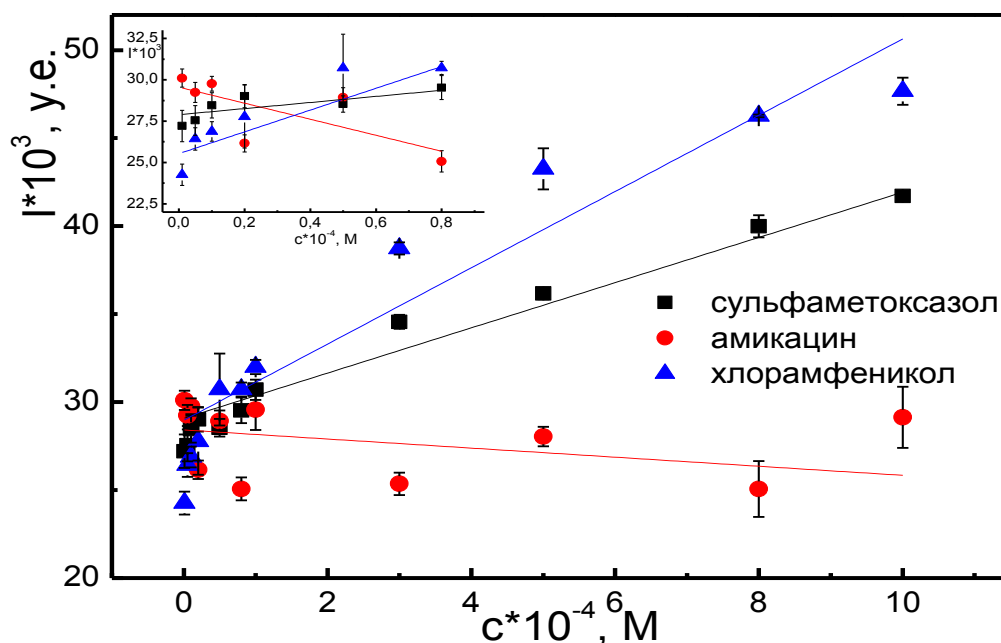


Рис. 13. Концентрационные зависимости тушения флуоресценции смеси 4-х флуорофоров (осн. Шиффа, *Флуор/SiO₂*, *Род/SiO₂*, *CdSe-1*) тремя отдельными аналитами: сульфаметоксазолом, амикацином и хлорамфениколом (I – площадь под спектром). Верхний график – область малых концентраций, $(0,01 - 0,8) \times 10^{-4} M$.

Так как градуировочные зависимости нелинейны, невозможно анализировать смесь этих аналитов методами линейного преобразования. Поэтому провели расчет концентраций с использованием нейронных сетей, для чего использовали программу *Statistica 10*. Программное обеспечение автоматически определяет наиболее эффективный алгоритм, анализируя предоставленную обучающую выборку. Затем оно проводит тренировку одной или нескольких самых эффективных нейронных сетей.

Таблица 5. Результаты полуколичественного определения модельных аналитов с помощью автоматизированной нейронной сети (число нейронов – 17, выходная функция – экспоненциальная от аргумента с обратным знаком, входные данные передаются без изменений)

Амикацин		Сульфаметоксазол		Хлорамфеникол	
Введено, мг/л	Предсказано, мг/л	Введено, мг/л	Предсказано, мг/л	Введено, мг/л	Предсказано, мг/л
0,6	2,0	0,6	-0,4	0,3	-0,1
5,0	3,2	1,4	2,8	1,1	1,1
7,2	3,9	2,2	1,4	5,6	5,6
11,1	5,8	2,8	2,7	6,1	5,6
Ошибка предсказания	55%	–	54%	–	9,9%

Проанализировав результаты, полученные с помощью ПО, выбрали автоматизированную нейронную сеть с наименьшей ошибкой предсказания (число нейронов – 17, выходная функция – экспоненциальная от аргумента с обратным знаком, входные данные передаются без изменений). Мы рассматривали возможность определения концентрации аналита в присутствии других аналитов, для этого выбрали следующую схему: два аналита брали с постоянной концентрацией – 5 мг/л, а концентрацию третьего аналита варьировали. Результаты метода «введено-найденно» с использованием нейронных сетей представлены в таблице 5. Судя по этим данным, предлагаемый метод может одновременно полуколичественно определять три выбранных аналита в воде в диапазоне 1-10 мг/л.

3.2. Пути повышения дискриминирующей способности метода "флуоресцентный глаз"

3.2.1. Выбор условий регистрации и способов предобработки данных*

Качество дискриминации образцов зависит не только от используемого флуорофора, но и от условий эксперимента (тип оптического инструмента, время экспозиции (для фотографии), количество образца) и условий предобработки данных (контрастирование, нормирование, «виртуальное» смешивание флуорофоров). Влияние этих факторов мы и рассмотрим в этом разделе. Систематически влияние условий регистрации и способов предобработки данных изучали на примере дискриминации 16 сортов виски.

Кроме того, мы считали важным изучить возможность упрощения и ускорения эксперимента, используя для получения аналитических сигналов не спектры флуоресценции, а фотографии. Ниже приведен результат сравнения этих двух методов регистрации.

Использование цифровых фотографий вместо спектров флуоресценции

Сравнили результаты дискриминации образцов виски на основе спектров флуоресценции (рис. 14а) и цифровых фотографий (рис. 14б) одних и тех же образцов в 96-луночных планшетах.

Спектры эмиссии флуорофоров с добавлением различных сортов виски регистрировали при длине волны возбуждения 350 нм, фотографии с образцами регистрировали широкополосной лампой с максимумом эмиссии при 366 нм. Данные для сравнения представлены в таблице 6. Число дискриминированных групп на графиках счетов, полученных при регистрации фотографий для представленных флуорофоров, показывает явно лучший результат по сравнению с

* Rukosueva E.A., Dobrolyubov E.O., Goryacheva I.Y., Beklemishev M.K. Discrimination of whiskies using an "add-a-fluorophore" fluorescent fingerprinting strategy // Microchemical Journal, 2019, 145, 397-405. DOI: 10.1016/j.microc.2018.11.002. (IF= 3,594, Q2) – проведение эксперимента, обработка и интерпретация результатов.

числом дискриминированных групп, полученных при регистрации спектров флуоресценции.

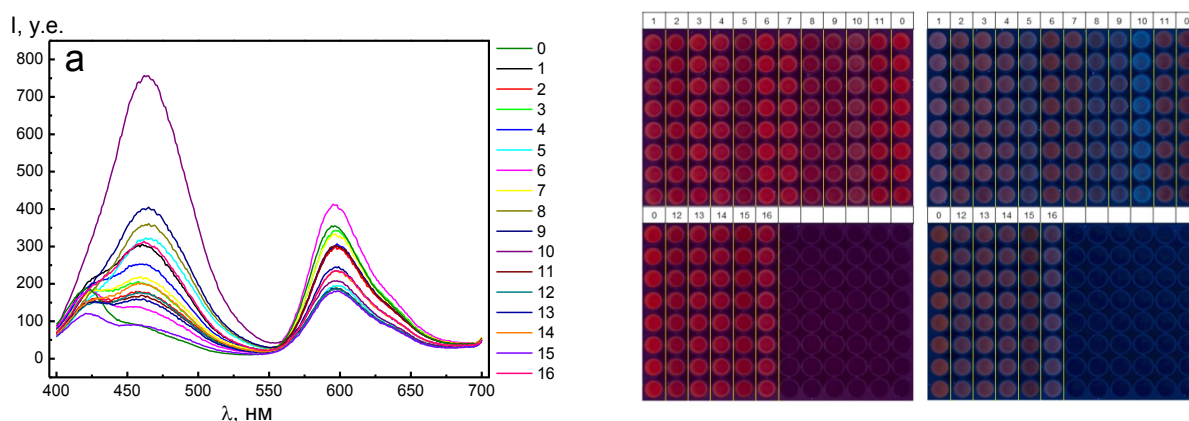


Рис. 14. а) Спектры эмиссии для 16-ти видов виски с добавлением в качестве флуорофора Pod/SiO_2 , возбуждение при 350 нм. Излучение в диапазоне 400-540 нм относится к собственной флуоресценции образцов, а около 600 нм – к Pod/SiO_2 . б) Фотографии 96-луночных планшетов, содержащих образцы виски и Pod/SiO_2 при возбуждении 254 нм (слева) и 366 нм (справа). Восемь параллельных экспериментов для каждого сорта виски (колонки пронумерованы по номеру образца) и два контрольных образца (обозначены "0").

Таблица 6. Число дискриминированных групп на графиках счетов для 16-ти сортов виски по спектрам флуоресценции и по цифровым фотографиям (данные нормированы, выдержка 5 сек)

Флуорофор	Спектры флуоресценции	Фотографии
δ -Ox-Zn	8	13
Отсутствует	9	10
Осн. Шиффа	2	10
Pod/SiO_2	7	7

Примечание. Группы считали разделившимися по критерию неперекрывания доверительных эллипсов.

Возможная причина эффективности использования фотографий состоит в том, что оно частично выполняет роль получения трехмерных спектров флуоресценции (так как возбуждение лампой с максимумом излучения при 366 нм является довольно широкополосным), то есть образцы возбуждаются в более широком диапазоне, чем при использовании монохромного света в спектрофлуориметре. В дальнейшем мы во многих случаях пользовались фотографированием образцов вместо получения полных спектров эмиссии.

Получив фотографии образцов с добавками флуорофоров, необходимо выбрать, какую величину использовать в качестве аналитического сигнала. Мы выделяли область лунки, принадлежащую одному образцу, и получали усредненную интенсивность для каждого цветового канала по всей выделенной области. Такой подход позволяет исключить возможные неточности в интенсивностях, которые могут возникнуть при учете только одного пикселя из всей лунки. Чтобы оценить дискриминацию образцов по спектрам флуоресценции и по фотографиям с помощью графиков счетов, мы также использовали метод главных компонент, но для его использования необходимы хотя бы два аналитических сигнала для одного образца, поэтому использовали три составляющие сигнала – красную, зеленую и синюю (R, G, B).

Объединение данных, получаемых с разных (R, G, B) каналов и при разных длинах волн возбуждения

Используемый нами визуализатор давал возможность получать фотографии при двух длинах волн возбуждения, 254 и 366 нм. Для выбора длины волны, возбуждение при которой даст наилучшие результаты дискриминации, мы получили изображения для двух длин волн, а также для объединенных длин волн и построили графики счетов для 16-ти сортов виски. Пример приведен для флуорофора $CdSe-2$ на рисунке 15, а результаты дискриминации в таблице 7. Видно, что объединенные данные с последующей обработкой методом PCA приводят к лучшей дискриминации (13 групп), чем при использовании этих же данных порознь. Такая же тенденция наблюдается и для других флуорофоров. В дальнейшем мы всегда использовали объединенные данные (254 и 366 нм) при использовании PCA .

Таблица 7. Число дискриминированных групп для разных длин волн возбуждения. Условия: время экспозиции 5 с, ненормированные данные

Флуорофор	254 нм	366 нм	Объединенные 254 и 366 нм
Осн. Шиффа	6	6	9
$CdSe-2$	5	8	13

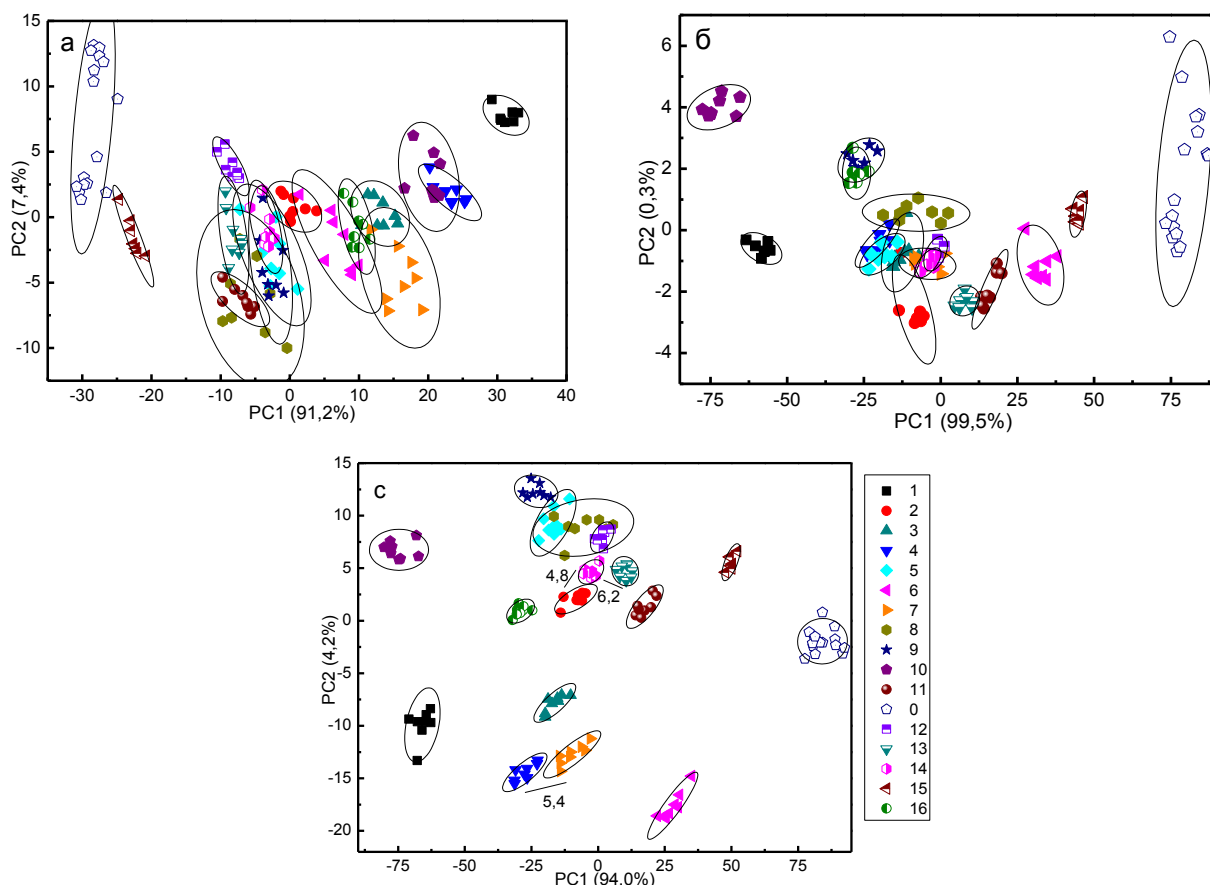


Рис. 15. Графики счетов цифровых фотографий 16-ти сортов виски с добавлением в качестве флуорофора *CdSe-2* с длиной волны возбуждения (а) 254 нм, (б) 366 нм и (с) объединенные данные 254 и 366 нм. Условия эксперимента: время экспозиции 5 с, ненормированные данные, без использования контрастирования.

Время экспозиции

При фотографировании образцов качество дискриминации может зависеть от продолжительности выдержки. В таблице 8 приведено число дискриминированных групп образцов (всего 16 образцов), полученных при использовании фотографий, сделанных при разной выдержке (экспозиции) (5 и 10 с), а также при составлении массива данных из значений интенсивностей при возбуждении двумя длинами волн. Фотографии, сделанные при возбуждении длиной волны 366 нм, не позволили разделить образцы на группы, но при возбуждении длиной волны 254 нм деление при экспозиции в 10 с эффективнее, чем при 5 с. В то же время, 5-секундная выдержка позволяет добиться для объединённых длин волн лучшего разделения, чем 10-секундная.

Таблица 8. Число дискриминированных групп при экспозиции в 5 и 10 с и при разных (или объединённых) длинах волн возбуждения, нормированные данные

Флуорофор	Время выдержки, с (длина волны возбуждения, нм)					
	5			10		
	254	366	254 + 366	254	366	254 + 366
Осн. Шиффа	4	1	10	5	1	8
<i>Pod/SiO₂</i>	4	1	7	5	1	6
<i>Флуор/SiO₂</i>	5	1	8	6	1	10
<i>CdSe-2</i>	5	1	13	5	1	12

Таким образом, априори выбрать выдержку нельзя; в дальнейшем мы получали данные, как правило, при двух разных выдержках (5 и 10 с).

Нормировка данных

Нормировку данных проводили перед использованием метода главных компонент. При обработке фотографий рассчитывали формальную степень тушения для каждого канала (*R*, *G* и *B*) в долях единицы. Такая операция позволяет поместить все данные в один и тот же диапазон (от 0 до 1), делая их сопоставимыми. Но с другой стороны, при нормировке используется оператор деления, который обычно увеличивает ошибку, и, таким образом, может негативно влиять на разделение образцов на группы. Результаты обработки полученных данных показали, что нормировка по-разному влияет на результат при использовании разных флуорофоров. Так, использование нормировки улучшило дискриминацию образцов виски при использовании в качестве флуорофоров *Ru(bpy)₃²⁺*, *8-Ox-Zn* и *Pod/SiO₂*, тогда как в случае *Флуор/ПЭИ* число дискриминируемых групп, наоборот, уменьшилось (табл. 9). Таким образом, стоит рассматривать целесообразность нормировки для каждого конкретного флуорофора.

Таблица 9. Число дискриминированных групп на графиках счетов, полученных при обработки методом *PCA RGB*-фотографий 16-ти образцов виски, смешанных в 96-луночном планшете с флуорофорами (или без) и возбужденных 254 и 366 нм (обработаны совместно)

Флуорофор	Нормировка**	Контраст ^{3*}	Время выдержки, с			
			5		10	
			82% ^{4*}	95% ^{4*}	82%	95%
<i>Poδ/SiO₂</i>	Нет	0	10	7	8	5
		1	11	5	10	7
		2	12	5	9	6
		3	13	5	12	5
		4	13	5	10	5
	Есть	0	7	3	6	4
		1	9	5	9	5
		2	9	5	10	5
		3	12	4	10	5
		4	14	7	10	6
Осн. Шиффа	Нет	0	9	5	8	5
		1	10	5	9	6
		2	12	7	12	5
		3	-	-	12	5
	Есть [#]	0	10	4	8	4
		1	11	4	9	4
		2	11	5	11	4
		3	-	-	12	4
<i>Ru(bpy)₃²⁺</i>	Нет	0	14	7	12	8
		1	11	5	10	6
		2	9	4	8	4
		3	9	4	8	6
		4	11	4	9	4
	Есть	0	15	14	14	13
		1	15	13	15	15
		2	15	15	15	15
		3	15	14	16	14

		4	14	12	16	14
<i>8-Ox-Zn</i>	Нет	0	10	5	9	5
		1	10	4	9	5
		2	11	4	7	3
		3	6	4	7	4
		4	8	4	7	3
	Есть	0	13	9	13	8
		1	14	10	13	7
		2	13	10	9	7
		3	10	9	8	4
		4	11	8	7	5
<i>CdSe-2</i>	Нет	0	13	10	13	9
		1	10	5	13	9
		2	13	10	13	9
		3	13	11	13	10
		4	12	11	8	5
	Есть [#]	0	13	9	12	9
		1	3	1	12	9
		2	3	1	10	9
		3	12	9	11	8
		4	12	10	10	8
<i>Флуор/ПЭИ</i>	Нет	0	11	4	–	–
	Есть	0	8	4	10	–
без флуорофоров	Нет	0	10	8	7	6

Красный канал, полученный при длине волны возбуждения 366 нм, был исключен из расчетов, так как имел нулевую интенсивность.

* При расчетах использовали объединённые данные для возбуждения при 254 и 366 нм.

** «Нет» в данной колонке означает, что интенсивность *RGB* никак не обрабатывали, «Есть» означает наличие нормировки, т.е. расчет формальной степени тушения флуоресценции.

³* Число пошаговых применений контрастного инструмента *SpotAmp* к необработанным изображениям.

⁴* Доверительная вероятность, используемая при определении числа разделенных групп.

Применение функции контрастирования при обработке RGB-фотографий

В программном обеспечении использованного нами визуализатора (Camag Visualizer 2) есть функция контрастирования (*SpotAmp*), которая анализирует цветовые гистограммы каждой части изображения и рассчитывает разности между интенсивностями для каждой точки и выбранной пользователем «эталонной» точки для каждого цветового канала (*RGB*) (все интенсивности лежат в диапазоне от 0 до 255). «Эталонная» точка задается кликом мыши. Работа алгоритма *SpotAmp* заключается в том, что программа пересчитывает интенсивности цвета по всему изображению таким образом, чтобы существующие отличия каждой точки от «эталонной» точки стали больше, причем так, что, чем больше начальная разница данной точки с эталонной, тем большее изменение приписывается данной точке. Во время этой операции интенсивности цвета эталонной точки остаются неизменными (рис. 16, рис. 17 и табл. 10). Для разных флуорофоров наибольшие отличия наблюдаются в разных цветовых сигналах. Последовательное применение данной функции при неизменной «эталонной» точке повторяет преобразование, увеличивая цветовые различия между ней и остальными точками. Такую операцию можно повторять до 4-х раз, после чего никаких изменений уже не происходит.

Чтобы проиллюстрировать работу функции *SpotAmp*, мы построили полученные с помощью визуализатора гистограммы интенсивности цвета для одной из лунок 96-луночного планшета (рис. 16) и нанесли на этот график интенсивность цвета для различного числа применений функции *SpotAmp*.

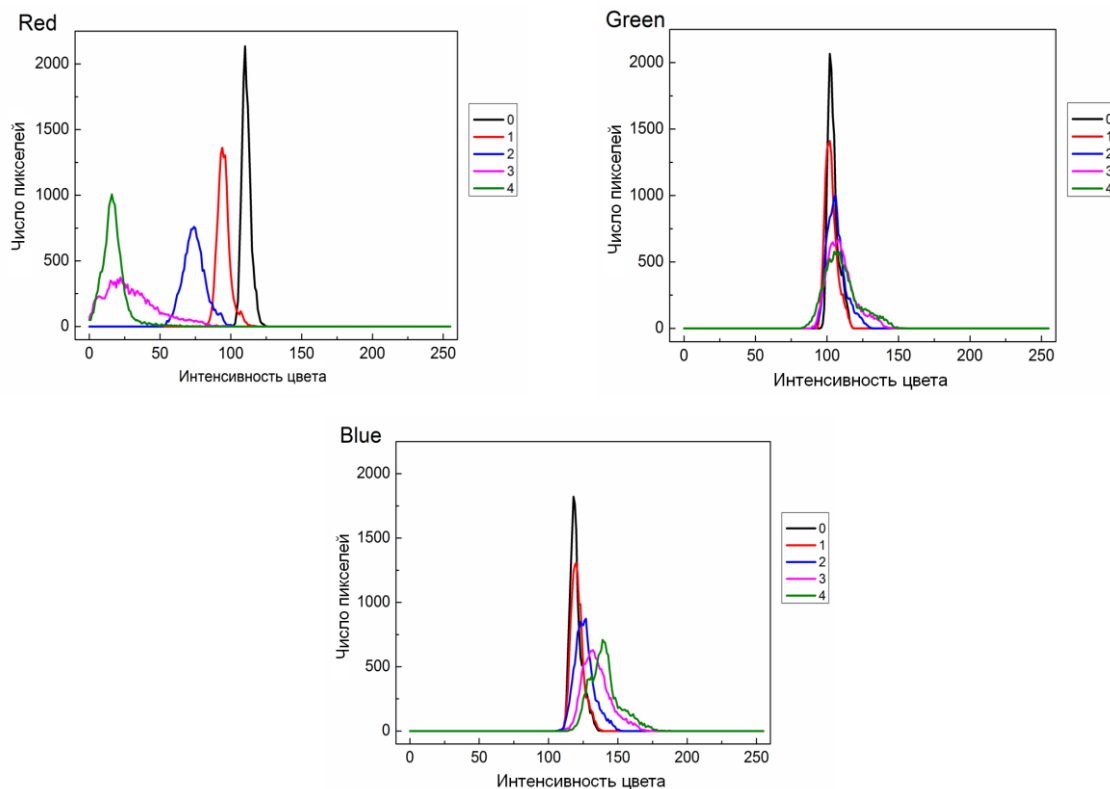


Рис. 16. Гистограммы интенсивности цвета для одной из лунок 96-луночного планшета до (0) и после четырех последовательных применений функции *SpotAmp* (1-4). Графики представляют количество пикселей, обладающих интенсивностью цвета, обозначенной как абсцисса.

На рисунке 17 можно видеть, что для большей начальной разности между интенсивностями «эталонной» и изучаемой лунок (красный цвет) конечная разность (после 4-х последовательных применений функции *SpotAmp*) больше. И наоборот, наименьшая разница в цвете (зеленый) остается небольшой.

В таблице 10 представлено изменение интенсивности цветовых сигналов при применении функции *SpotAmp* на примере одной лунки. С увеличением числа применений данной функции увеличивается разность в цветовом сигнале между контрольной лункой и изучаемой. Разница в интенсивностях изменятся от 2-х до 6-ти раз. Для разных флуорофоров наибольшие отличия наблюдаются в разных цветовых сигналах.

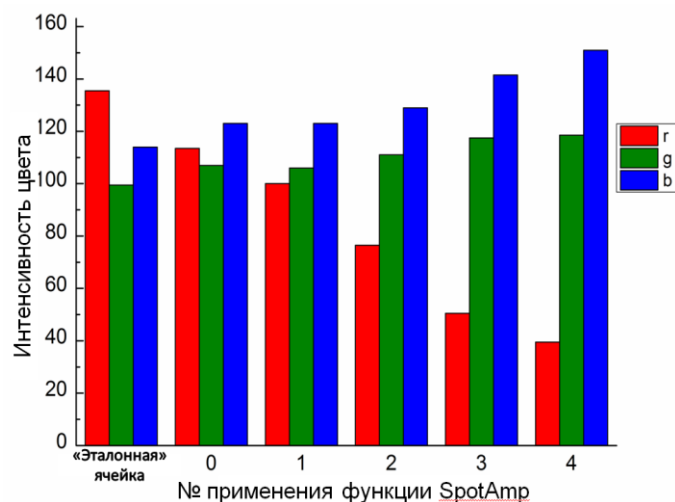






Рис. 17. Сравнение интенсивности цвета (полученные из гистограмм, показанных на рисунке 16) приведены в зависимости от количества применений функции *SpotAmp*.

Таблица 10. Средняя интенсивность цвета для контрольной и изучаемой лунок до и после применения функции *SpotAmp*

Цветовой канал	Контрольная лунка 	Изучаемая лунка					Начальная разность*	Конечная разность**
		Число применений функции <i>SpotAmp</i>						
		0 	1 	2 	3 	4 		
<i>R</i>	132	110	95	73	27	16	22	116
<i>G</i>	98	103	103	105	107	110	-5	-12
<i>B</i>	110	118	119	125	132	138	-8	-28

* Между цветом «эталонной» лунки и изучаемой до применения функции *SpotAmp*

** Между цветом «эталонной» лунки и изучаемой после 4-кратного применения функции *SpotAmp*

Узнать, какой именно заложен алгоритм в функцию *SpotAmp*, не удалось, так как это коммерческая тайна производителей программного обеспечения. Мы попытались симитировать подобную функцию, задав ее следующей формулой, которая зависит от интенсивности нулевого образца (выбирали усредненное значение интенсивности одной из лунок, содержащей только флуорофор), также квадратично зависящей от исходной интенсивности (9):

$$i_{R,G,B} = (i_0 - i_n) * i_n * k + i_n, \quad (9)$$

здесь $i_{R,G,B}$ - интенсивность, полученная после применения искусственного контрастирования, i_0 - интенсивность цвета лунки, на которую нормируют

(эталонной), i_n - интенсивность цвета текущей лунки (которую нормируют), и k – коэффициент, искусственно подобранный так, чтобы значение $i_{R,G,B}$ не выходило за пределы от 0 до 255.

Некоторые подобранные коэффициенты для разделения 16-ти образцов в присутствии флуорофора $Ru(bpy)_3^{2+}$ представлены в таблице 11. Значения коэффициента k , равные 0,005 и -0,0038, оказались крайними, то есть последующее отдаление от значения $k = 0$ приводило к выходу за границы 0–255 интенсивностей образцов по одному или нескольким каналам.

Таблица 11. Число дискриминированных групп для разных значений коэффициента k

Значение k	Число дискриминированных групп	
	Ненормированные данные (17 образцов*)	Нормированные данные (16 образцов)
0,005	9	11
0,001	11	14
0	12	14
-0,001	12	14
-0,0038	15	14

*Учен контрольный образец

Искусственное применение предложенной нами формулы как инструмента контрастирования фотографии позволяет как улучшить дискриминацию групп в случае ненормированных данных, так и ухудшить; для нормированных данных разделение не улучшается. Чтобы сопоставить предложенный нами алгоритм и функцию программного обеспечения, мы выбрали два значения k и применили контрастирование до 4-х раз на анализируемых данных (табл. 12). Последовательное применение данного алгоритма также может, как улучшать, так и ухудшать дискриминацию образцов, что согласуется и с результатами работы встроенной функции программного обеспечения, которая также не приводит к однозначным результатам.

Применение описанной функции оказалось очень эффективным для дискриминации образцов в случае некоторых флуорофоров. Так, количество дискриминируемых групп увеличилось с 7 до 14 для флуорофора Pod/SiO_2 и от 14

до 16 для флуорофора $Ru(bpy)_3^{2+}$ (табл. 9). В случае основания Шиффа эффект был минимальным (улучшение от 10 до 11 разделенных групп), а в случае $CdSe-2$ применение этой функции не улучшило дискриминацию.

Таблица 12. Число дискриминированных групп образцов виски в присутствии флуорофора $Ru(bpy)_3^{2+}$ с применением алгоритма контрастирования по формуле (9) с разным коэффициентом k

Число применений	Число дискриминированных групп	
	Ненормированные данные (17 образцов*)	Нормированные данные (16 образцов)
$k = 0,001$		
0	9	11
1	11	14
2	10	14
3	9	13
4	9	14
$k = -0,0005$		
0	9	11
1	12	14
2	12	14
3	13	14

*Учтен контрольный образец

Таким образом, перед обработкой данных, полученных по фотографиям, следует объединять каналы (RGB), объединять фотографии, полученные при возбуждении разными длинами волн, а также оптимизировать выдержку при фотографировании. Для каждого конкретного флуорофора или смеси флуорофоров желательно отслеживать возможность улучшения дискриминации при применении нормировки и алгоритма контрастирования изображения.

3.2.2. «Виртуальное» смешивание флуорофоров

Использование фотографий в качестве источника аналитического сигнала не всегда дает положительный результат. На примере уже изученных в разделе 3.1.2. пятнадцати 2-3-компонентных смесей четырех аналитов (амикацин,

хлорамфеникол, сульфаметоксазол, парацетам), полученных для хорошо себя зарекомендовавшей смеси 4-х флуорофоров (осн. Шиффа, *Флуор/SiO₂*, *Род/SiO₂*, *CdSe-1*), сравнили результаты дискриминации, полученные при регистрации спектров флуоресценции и фотографий.

На рисунке 18а представлены графики счетов, полученные при регистрации спектров флуоресценции. На основании расстояний Махаланобиса можно выделить 13 классов из 15. В то же время, на рисунке 18б представлен график счетов, полученный при регистрации сигнала с фотографий, где выделяются только 5 групп. В данном случае это может быть связано с сильным взаимным тушением флуорофоров при совместном присутствии, на что указано ранее.

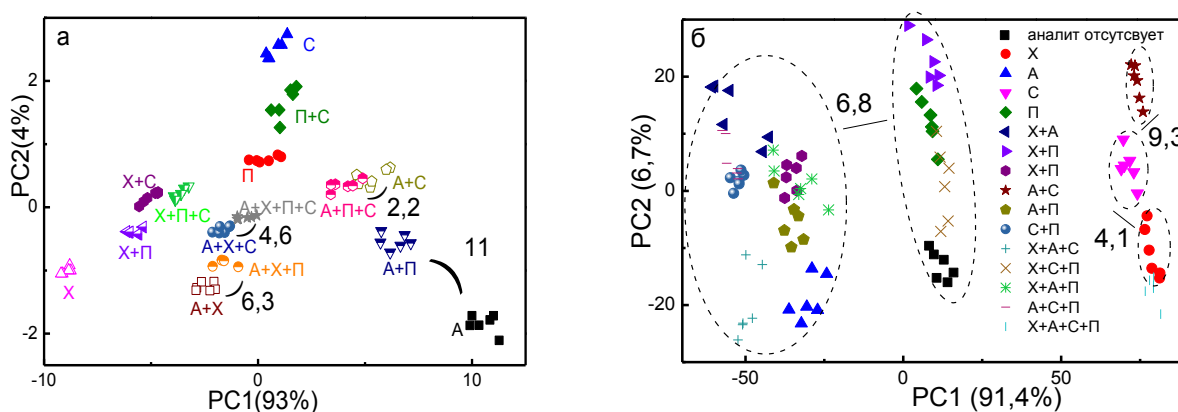


Рис. 18. Графики счетов, полученные по (а) спектрам флуоресценции и (б) фотографиям планшетов с объединенными *RGB* каналами при возбуждении длинами волн 254 и 366 нм с 4-мя виртуально смешанными флуорофорами (осн. Шиффа, *Флуор/SiO₂*, *Род/SiO₂*, *CdSe-1*). Цифры – значения расстояний Махаланобиса между соседними образцами.

Для подтверждения гипотезы о взаимном тушении флуорофоров и влиянии длины волны возбуждения при регистрации аналитического сигнала с фотографии рассмотрели разделение 15-ти модельных смесей в присутствии единственного флуорофора - *Флуор/SiO₂*. Для этого провели обработку фотографии при возбуждении отдельно излучением с длинами волн 254 нм, 366 нм (широкий спектр возбуждения) и совместно две фотографии при возбуждении 254 и 366 нм. При сравнении числа дискриминированных групп на графиках счетов выяснилось, что при возбуждении 254 нм удалось разделить 15 смесей аналитов (рис. 19а) на 4 четко различимых группы, а при возбуждении 366 нм имеется одна неподделенная

группа (рис. 19б), состоящая из всех образцов. Однако при использовании сигналов с двух фотографий, т.е. при возбуждении и 254, и 366 нм образцы удалось дискриминировать на 9 групп (рис. 19в).

Итак, оказалось, что дискриминация с помощью одного флуорофора (*Флуор/SiO₂*) может быть лучше, чем при использовании смеси флуорофоров. В связи с этим предложили проводить так называемое «виртуальное» смешивание, что могло бы помочь избежать взаимного тушения флуорофоров.

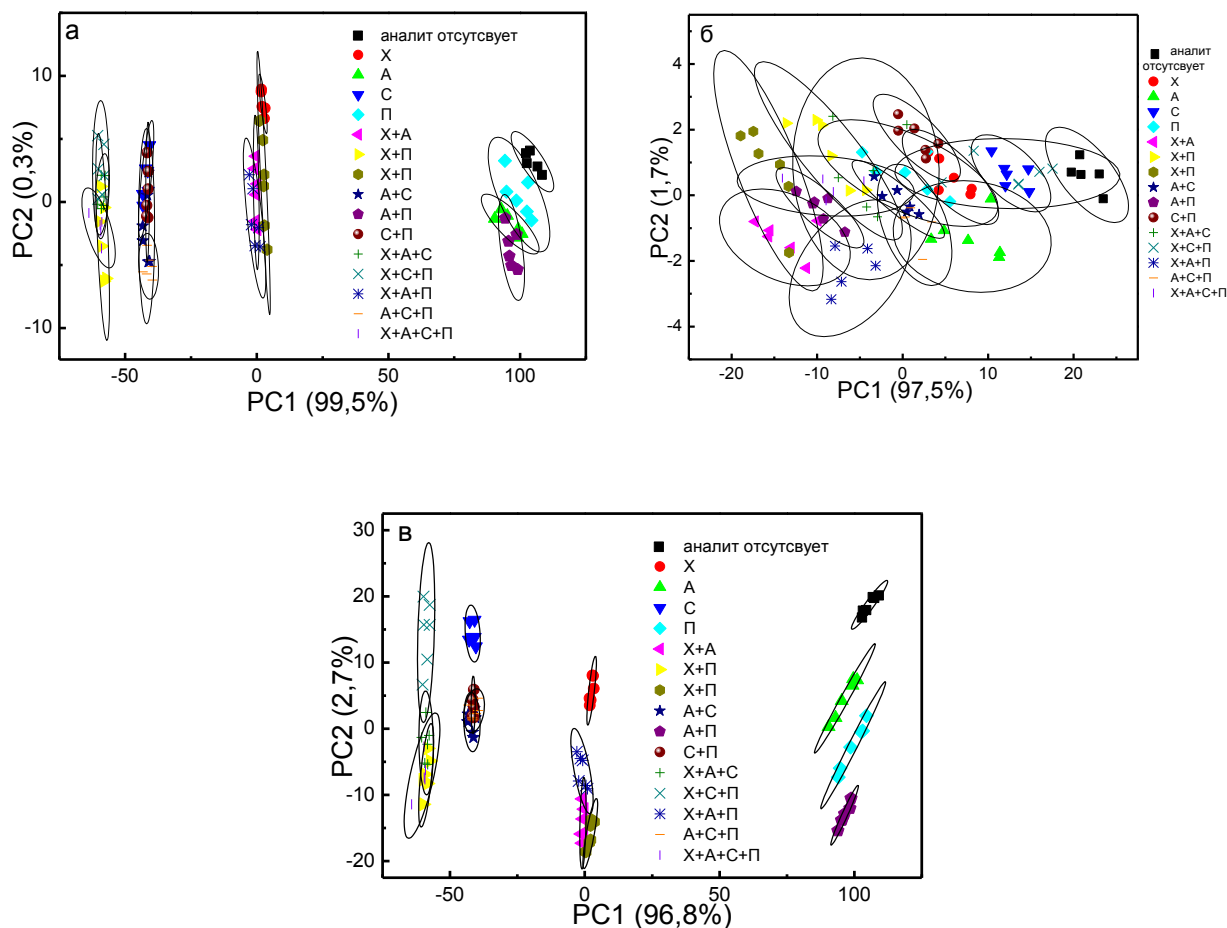


Рис. 19. Графики счетов модельных смесей аналитов, полученные при возбуждении 254 (а) и 366 (б) 254+366 (в) нм фотографий 96-луночного планшета в присутствии флуорофора *Флуор/SiO₂*.

«Виртуальное» смешивание флуорофоров проводили объединением в единую матрицу данных значений цветовых интенсивностей «смешиваемых» флуорофоров для трёх каналов (*R, G, B*), полученных при возбуждении длинами волн 254 и 366 нм, которую затем обрабатывали методом главных компонент. В таблице 13 представлено число дискриминированных групп смесей аналитов в

присутствии индивидуальных флуорофоров, при использовании «виртуальной» смеси, а также реально смешанных флуорофоров. Объединение данных в единый массив позволяет улучшить качество дискриминации в связи с увеличением объема полезной информации.

Таблица 13. Число дискриминированных групп, полученных при анализе фотографий модельных аналитов в присутствии индивидуальных флуорофоров (объединенные данные 254+366 нм, выдержка 5 с), «виртуальной» смеси, а также реально смешанных флуорофоров

Флуорофор	Число дискриминированных групп		
	Индивидуальный	«Виртуальная» смесь	Реальная смесь
Осн. Шиффа	8	11	5
<i>Флуор/SiO₂</i>	9		
<i>Род/SiO₂</i>	8		
<i>CdSe-1</i>	5		

На рисунке 20 представлены графики счетов, полученные при реальном (а) и виртуальном (б) смешивание 4-х флуорофоров. Снимки планшетов делали при экспозиции 5 с и использовали интенсивности, полученные при 254 и 366 нм. Реальное смешивание позволяет разделить образцы на 5 групп, тогда как виртуальное – на 11.

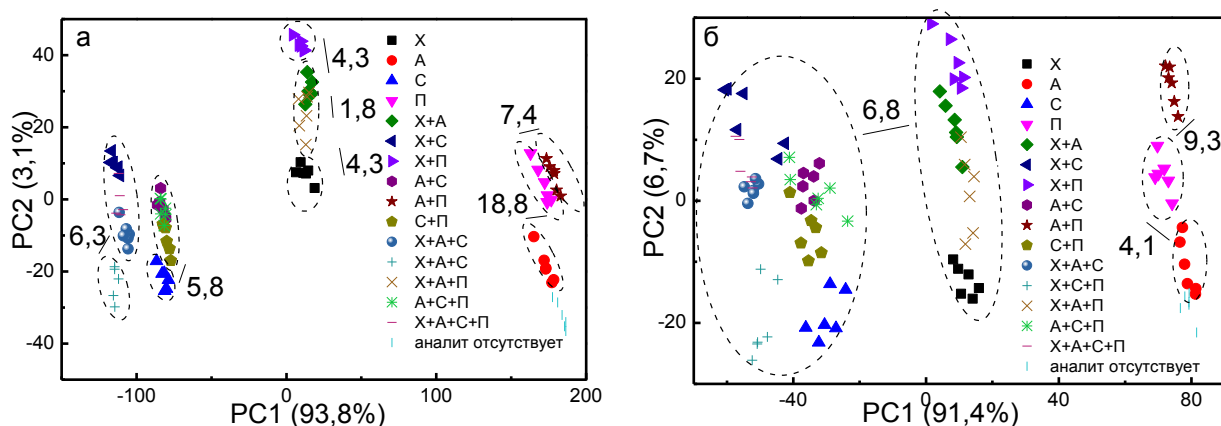


Рис. 20. Графики счетов, полученные по фотографиям планшетов с объединенными RGB каналами при возбуждении длинами волн 254 и 366 нм с 4-мя виртуально (а) и реально (б) смешанными флуорофорами. Цифры – значения расстояний Махаланобиса между соседними образцами.

Таким образом, применять «виртуальное» смешивание флуорофоров целесообразно, когда дискриминация с помощью одного флуорофора недостаточно эффективна, а реальное смешивание вызывает взаимное тушение эмиссии.

3.2.3. Закрепление флуорофора на наночастицах носителя как способ повышения вероятности его взаимодействия с аналитами*

Развиваемый нами метод эффективен, если интенсивность излучения сильно изменяется в присутствии аналитов - тушителей и разжигателей флуоресценции. Это достигается, когда аналит и флуорофор сближаются на расстояние, обеспечивающее передачу энергии, и находятся на таком расстоянии определенное время. Многие красители (например, родамин и флуоресцеин) имеют высокий квантовый выход флуоресценции и, следовательно, могли бы быть полезны в методе «флуоресцентный язык», но в растворе они слабо взаимодействуют с большинством модельных аналитов, поэтому добавление аналитов приводит лишь к небольшому изменению интенсивности их эмиссии.

Мы предположили, что иммобилизация красителя на активном сорбенте (таким как кремнезем) изменит эту ситуацию, поскольку аналиты, сорбированные в непосредственной близости от прикрепленного красителя, будут иметь достаточно времени для обмена энергией с красителем и тем самым влиять на интенсивность его излучения. Кроме того, если сорбент используется в форме наночастиц, измерения можно проводить в коллоидном растворе в смеси с другими флуорофорами.

Для проверки этого предположения мы изучили влияние 20-ти модельных аналитов на спектры эмиссии растворенного и иммобилизованных форм флуоресцеина. В качестве иммобилизованных форм изучали: *Флуор/SiO₂* (синтезированный путем присоединения изотиоцианата флуоресцеина к

* * Divyanin N.N., Razina A.V., Rukosueva E.A., Garmash A.V., Beklemishev M.K. Discrimination of 2-3-component mixtures of organic analytes by a “fluorescent tongue”: A pilot study // *Microchemical Journal*, 2017, 135, 48-54. DOI: 10.1016/j.microc.2017.08.002. (IF= 2,75, Q2) – руководство экспериментальной работой и обработка результатов

полиэтиленмину, предварительно сорбированном на SiO_2) и контрольный флуорофор $ФИТС/SiO_2$ (полученный путем механической сорбции изотиоцианата флуоресцеина на кремнезем). Растворенные формы флуоресцеина представлены самим флуоресцеином ($ФИТС$) и продуктом взаимодействия $Флуор/ПЭИ$.

Результаты показывают (рис. 21), что влияние модельных аналитов на интенсивность флуоресценции имеет тенденцию к увеличению в следующем ряду флуорофоров:

$$ФИТС < ФИТС/SiO_2 < Флуор/ПЭИ < Флуор/SiO_2$$

По сути, иммобилизованный флуоресцеин более чувствителен к модельным аналитам, чем растворенный краситель. Что касается $Флуор/ПЭИ$, это растворимое вещество, которое может образовывать молекулярные комплексы с низкомолекулярными соединениями, что характерно для полиэлектролитов, и по этой причине оно также может быть весьма активным.

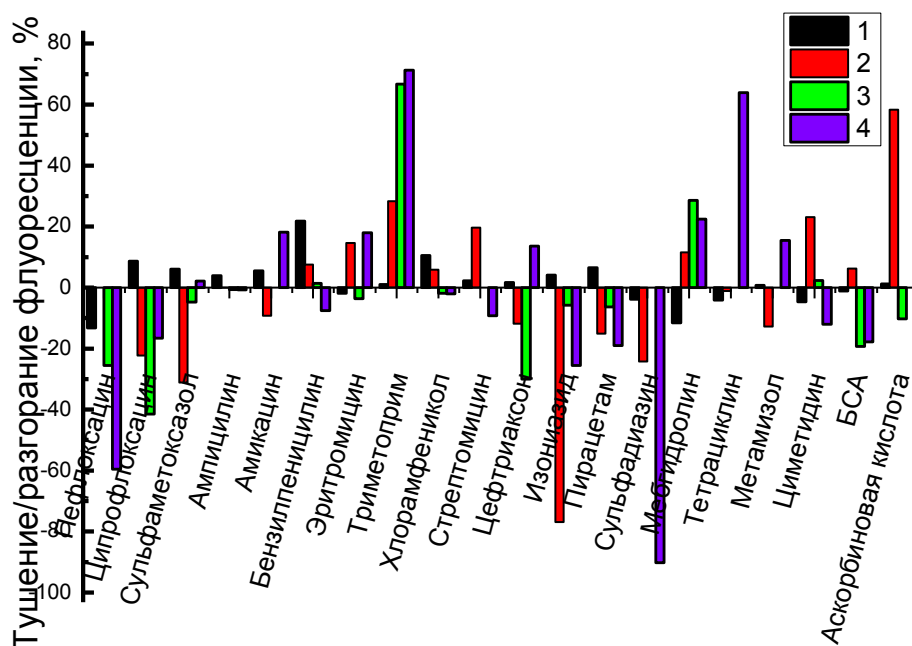


Рис. 21. Тушение/разгорание флуоресценции (%) различных форм флуоресцеина органическими соединениями в растворе (суспензии): 1 – $Флуор/SiO_2$, 2 – $ФИТС/SiO_2$, 3 – $Флуор/ПЭИ$, 4 – $ФИТС$.

Чтобы подтвердить пользу иммобилизации красителей, мы изучили смесь флуорофоров, содержащую непривитые родамин и флуоресцеин. На рисунке 22

показано, что разделение синтетических смесей в этом случае хуже, чем с помощью смеси, содержащей иммобилизованные красители. Закрепление флуоресцентных красителей на наночастицах помогает сделать эти флуорофоры более чувствительными к изменению интенсивности флуоресценции при добавлении органических аналитов.

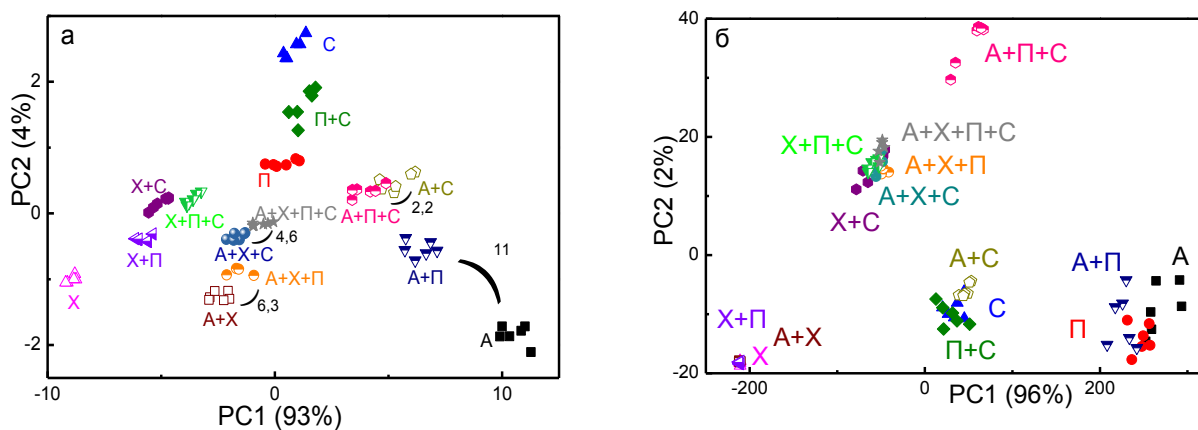


Рис. 22. График счетов, полученный для смеси 4-х флуорофоров а) осн. Шиффа, Флуор/ SiO_2 , Род/ SiO_2 , CdSe-1 б) осн. Шиффа, ФИТС, Родамин В изотиоционат, CdSe-1 в присутствии модельных аналитов и их смесей (А – амикацин, Х – хлорамфеникол, С – сульфаметоксазол, П – пирацетам).

При переходе к реальным объектам важным этапом является выбор флуорофоров, чувствительных к данному образцу, что, в свою очередь, требует оценивать качество дискриминации с использованием разных флуорофоров.

3.3. Способы оценки качества дискриминации образцов

3.3.1. Понятие «качества дискриминации»

Задачи дискриминации образцов сходного состава встречаются в различных сферах жизни, таких как установление производителя, выявление фальсификатов и другие задачи классификации. Такого рода проблемы могут быть решены с использованием методов «отпечатков пальцев». Среди флуориметрических методов отпечатков пальцев в качестве исходных данных чаще всего используют собственную флуоресценцию объектов. В частности, это всегда применимо для продуктов питания и напитков. Однако если объекты слабо флуоресцируют или не различимы по собственным спектрам, то целесообразно использовать

дополнительные флуорофоры, смешивая их с образцом [27-35]. Суммарный спектр флуоресценции объекта и флуорофора позволяет получить дополнительную информацию об образце, поскольку (нефлуоресцирующие) маркерные компоненты образца взаимодействуют с флуорофорами, изменяя интенсивность их излучения.

В результате обработки спектральных данных методами хемометрики получается «свертка» спектров – «картинка», на которой необходимо выделить классы образцов. К сожалению, в литературе нет устоявшихся критериев дискриминации, и исследователи сами выбирают их, руководствуясь понятиями математической статистики.

3.3.2. Оценка качества дискриминации в случае не полностью разделенных образцов*

Для выбора наиболее удобного способа оценки качества дискриминации мы применили имеющиеся в литературе методы, а также предложили собственный параметр. Способы оценки качества дискриминации выбирали на примере анализа образцов меда. Изучили 36 образцов меда, приобретенных в супермаркетах или у пчеловодов (табл. 14). Мед растворяли в воде, получая растворы концентрацией 0,1 г/мл, и хранили при температуре 4°C.

Образцы имели разную консистенцию и цвет, что предполагало наличие разных спектральных характеристик. Действительно, спектры собственной флуоресценции всех образцов различались (рис. 23а). При длине волны возбуждения 320 нм собственная эмиссия меда наблюдалась в диапазоне 400-600 нм. Пик при 420 нм, который присутствует во всех спектрах, связан с наличием флуоресцирующих веществ в планшете, поэтому в расчетах его не учитывали (использовали диапазон длин волн 430-600 нм). Чтобы оценить возможность дискриминации меда по собственной флуоресценции, построили график счетов по

* Rukosueva E. A., Belikova V. A., Krylov I. N., Orekhov V. S., Skorobogatov E. V., Garmash A. V., Beklemishev M. K. Evaluation of Discrimination Performance in Case for Multiple Non-Discriminated Samples: Classification of Honeys by Fluorescent Fingerprinting // Sensors, 2020, 20, 5351. DOI: 10.3390/s20185351. (IF= 3,275, Q2) – проведение эксперимента, обработка и интерпретация результатов, Крылов И.Н. – консультация по обработке результатов, Беликова В.А. – обработка результатов и дискриминирование альтернативным методом.

спектрам собственной эмиссии (рис. 23б). На этом графике счетов можно видеть, что несколько видов меда хорошо различаются, в то время как остальные виды представляют одну большую группу. При использовании собственной флуоресценции меда его можно разделить на 11 групп.

Таблица 14. Виды меда, участвующие в исследовании (приведены номера образцов)

<i>Вид меда</i>	Фермерский	Магазинный
Цветочный	1, 2, 3, 4, 27, 32, 33, 34, 35, 36	5, 6, 7, 8, 9, 12, 13
Донниковый	14, 15, 16	-
Кипрейный	17, 18, 19, 28, 31	-
Липовый	20, 21, 22, 23	10
Липовый с добавлением малинового	24	-
Облепиховый	25	-
Мед белой акации	26	-
Лавандовый	29	-
Мед с добавлением живицы	30	-
Гречишный	-	11

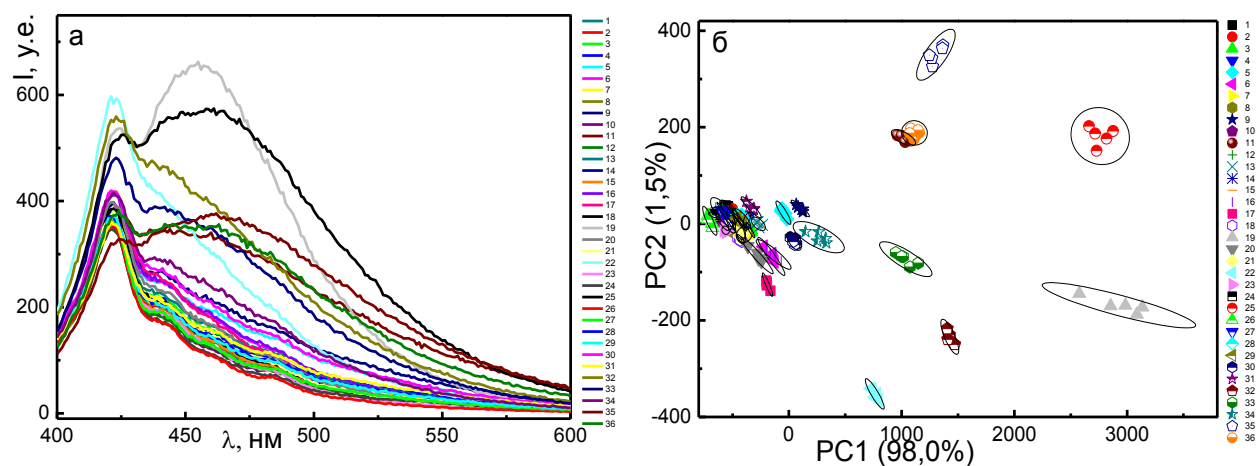


Рис. 23. а) Спектры флуоресценции образцов меда без добавления флуорофоров, $\lambda_{\text{возб}} = 320$ нм. б) график счетов, построенный по спектрам собственной флуоресценции образцов меда.

Метод «флуоресцентного глаза» основан на добавках флуорофоров, поэтому для данного объекта важно выбрать наиболее подходящие флуорофоры. В качестве флуорофоров для дискриминации образцов меда мы рассмотрели комплексы металлов: 8-гидроксихинолина с цинком(II) и коммерчески доступный комплекс рутения(II) с 2,2'-бипиридиллом. Также использовали флуоресцентный краситель

тиазоловый оранжевый, который наиболее интенсивно флуоресцирует при интеркалировании в ДНК. Кроме того, ДНК как полимер может образовывать молекулярные комплексы с маркерными соединениями образцов, приближая их к флуоресцентному красителю и тем самым также изменяя эмиссию.

Поскольку тиазоловый оранжевый эффективен в присутствии ДНК, для различения образцов меда необходимо было выбрать соотношения ТО:ДНК. Без использования ТО и при добавлении ДНК ко всем образцам меда в области выше 500 нм эмиссии не наблюдалось (рис. 24). Также из рисунка 24 видно, что при повышении концентрации красителя максимум эмиссии комплекса ТО-ДНК-2 смещается в длинноволновую область спектра.

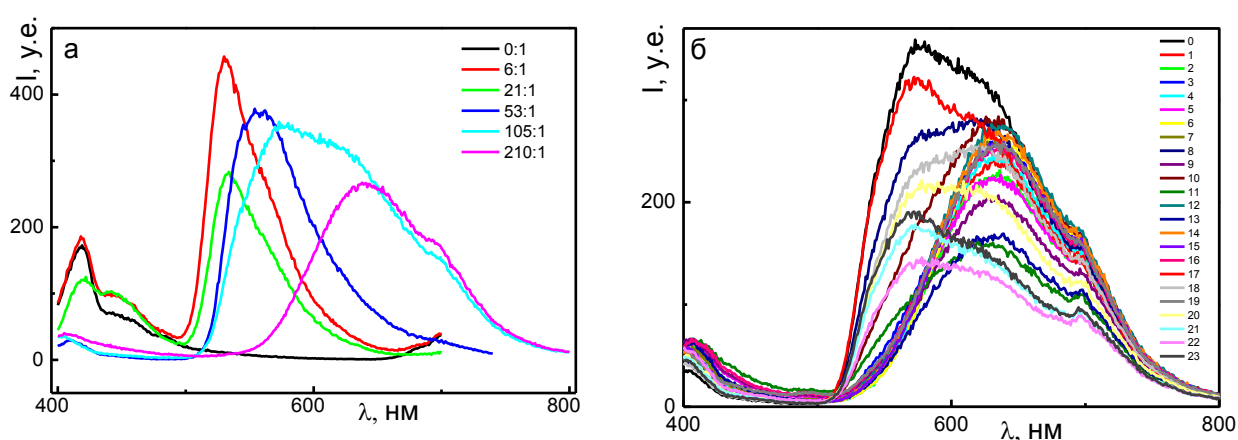


Рис. 24. а) Спектры флуоресценции тиазолового оранжевого (ТО), интеркалированного в ДНК-2, $\lambda_{\text{возб}} = 320$ нм, молярное соотношение ТО к ДНК показано в легенде; б) спектры флуоресценции 23-х образцов меда с добавленным ТО (при соотношении ТО:ДНК-2 = 105:1, $\lambda_{\text{возб}} = 320$ нм).

При больших количествах красителя (соотношение ТО:ДНК-2 более чем 53:1) собственная эмиссия меда тушится, и в спектре наблюдается только пик эмиссии ТО (рис. 24). Наибольшее число дискриминированных образцов меда было достигнуто при соотношении ТО:ДНК=53:1. В таблице 15 обобщены характеристики разделения 23-х видов меда. Дискриминацию групп проводили по построению доверительных эллипсов на графике счетов: считали группы точек разделенными, если такие эллипсы не пересекались. Также мы сравнили количество дискриминированных групп в пространстве главных компонент, построенном при использовании в качестве исходных данных всего спектра эмиссии (430-800 нм) и с использованием только коротковолновых и

длинноволновых пиков (где коротковолновый пик относится к собственной флуоресценции меда, а длинноволновый пик соответствует эмиссии ТО, интеркалированного в ДНК-2).

Таблица 15. Эффективность разделения 23-х образцов меда при добавлении тиазолового оранжевого, интеркалированного в ДНК-2

Состав смеси (отношение ТО:ДНК-2)	Число дискриминированных групп на графиках счетов		
	Весь спектр (400-800 нм)	Один пик	
		коротковолновый	длинноволновый
Мед	7	8	-
Мед + ДНК-2	11	10	-
Мед + ТО + ДНК-2 (6:1)	10	8	5
Мед + ТО + ДНК-2 (21:1)	8	5	5
Мед + ТО + ДНК-2 (53:1)	9	-	12
Мед + ТО + ДНК-2 (105:1)	4	-	6
Мед + ТО + ДНК-2 (210:1)	4	-	5

При рассмотрении всего спектра флуоресценции наилучшая дискриминация с точки зрения количества разделенных групп была достигнута при добавлении в мед только ДНК-2 без красителя (11 групп). Однако добавление тиазолового оранжевого к этой системе и рассмотрение результатов, полученных только по длинноволновому пику в спектре эмиссии, позволило дискриминировать образцы меда на 12 групп (для соотношения ТО:ДНК=53:1, рис. 25). Для дальнейшего рассмотрения выбрали систему мед+ДНК-2 и расчет по всему спектру, а также мед+ТО+ДНК-2 и расчет по длинноволновому пику.

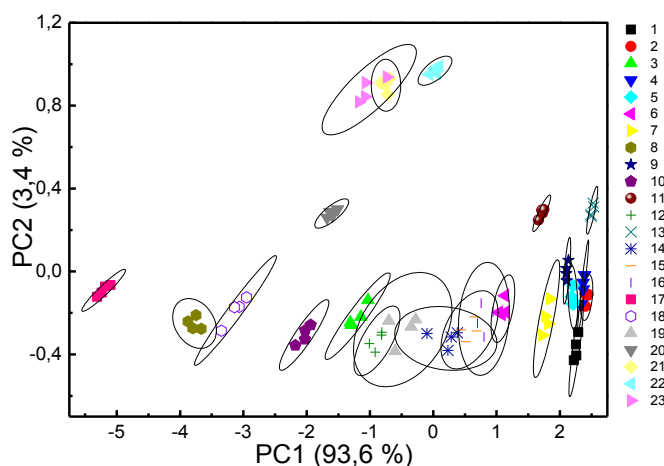


Рис. 25. График счетов спектра эмиссии меда с добавлением ТО:ДНК-2 в соотношении 53:1.

Для оценки дискриминации в качестве флуорофоров также изучены комплексы металлов. Флуорофор $Ru(bpy)_3^{2+}$, добавленный к каждому из 36-ти образцов меда, разделяет их на 14 классов, а классификация практически описывается первой главной компонентой (98,9% от общей дисперсии). Расстояние между классами значительно выше в сравнении с использованием в качестве флуорофора комплекса цинка с 8-гидроксихинолин-5-сульфонатом. Последний отличается меньшей повторяемостью параллельных измерений, что увеличивает размер доверительных эллипсов и, следовательно, приводит к их возможному перекрытию (рис. 26). Формально с этим флуорофором можно разделить образцы меда на 9 классов.

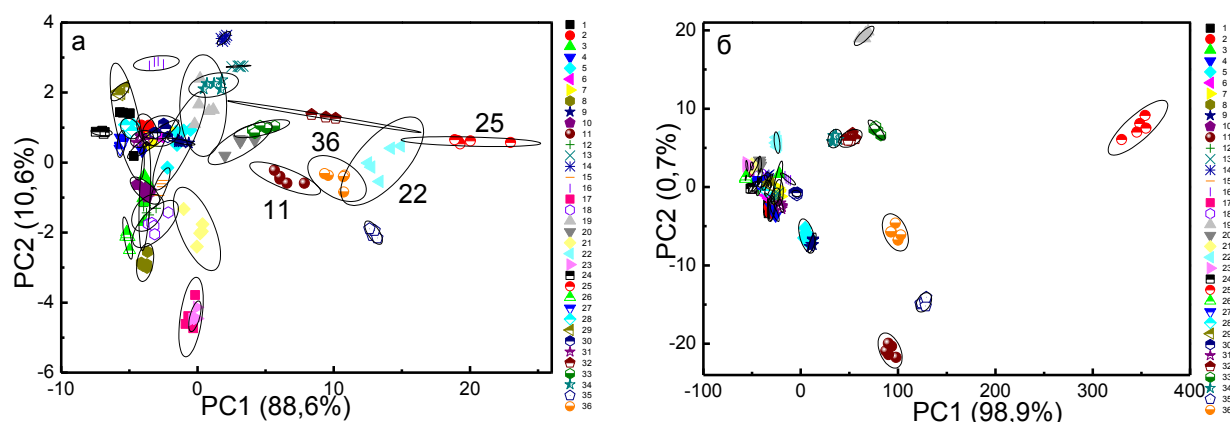


Рис. 26. Графики счетов спектров флуоресценции 36-ти видов меда с добавлением а) 8-Ox-Zn, б) $Ru(bpy)_3^{2+}$.

Как видно из представленных данных, ни один из флуорофоров не позволяет разделить все 36 образцов меда – всегда есть большой кластер из 22-25 образцов.

Чтобы разделить эти сорта меда, исключили данные с четко дискриминированными образцами, а остальные подвергли разложению на главные компоненты. В таблице 16 представлена эффективность дискриминации 28-ми образцов меда. При использовании в качестве сигнала для разделения весь спектр флуоресценции наилучшее разделение наблюдается в присутствии ДНК-2 и ДНК-1-ТО. Самым эффективным флуорофором оказался ДНК-1 при анализе только пика флуоресценции с результатом 11 дискриминированных групп образцов меда. Таким образом, при анализе большого числа групп образцов целесообразно последовательное построение графиков счетов для наилучшей дискриминации образцов.

Таблица 16. Эффективность дискриминации 28-ми образцов меда при добавлении флуорофоров (исключены образцы 11, 19, 22, 25, 32, 33, 35, 36)

Флуорофор	Число дискриминированных образцов меда на графиках счетов		
	весь спектр (430-800 нм)	один пик	
		коротковолновый	длинноволновый
Нет (мед)	6	8	-
Мед + ДНК-1	7	11	-
Мед + ДНК-2	8	8	-
Мед + ДНК-1 + ТО	8	4	9
Мед + ДНК-2 + ТО	5	3	8
Мед + $Ru(bpy)_3^{2+}$	7	-	4
Мед + $\delta\text{-Ox-Zn}$	5	-	8

При разработке метода флуоресцентных «отпечатков пальцев», основанного на добавлении флуорофоров к образцам, желательно найти критерий выбора наиболее эффективных флуорофоров. Это сложная задача в том случае, когда не все образцы разделены на графиках счетов. Самый простой способ – сосчитать группы точек, визуально отделенных друг от друга («число групп», правый столбец в таблице 16). Однако в случае графиков счетов, представленных на рисунке 26 такой подход не дает верной информации: многие доверительные эллипсы пересекаются, и эти образцы могут быть отнесены к одной группе, тогда как на самом деле многие группы точек разделены попарно (например, образцы 11 и 22,

36 и 25 явно разделены, хотя и принадлежат к одному большому кластеру образцов).

Таким образом, эффективность распознавания сложно оценить, когда образцы плохо разделены или только часть их образует отдельные классы. В попытке преодолеть эти трудности мы использовали простой способ оценки эффективности дискриминации путем подсчета числа пересечений для всех эллипсов на графике счетов (**ЧисП**, табл. 17). Возможно, более точные результаты были бы получены, если бы мы оценили *площади* пересечения доверительных эллипсов, но такие вычисления сложны. Из таблицы 17 следует, что наиболее эффективным флуорофором является $Ru(bpy)_3^{2+}$ (112 пересечений), а наименее эффективным – тиазоловый оранжевый в присутствии ДНК-2 (239 пересечений). Этот результат согласуется с числом дискриминированных групп точек на графиках счетов: 14 и 11, соответственно.

Для сравнения предложенного подхода со стандартными методами мы рассчитывали общую чувствительность (в англоязычной литературе – *total sensitivity, TS*). Этот параметр показывает, принадлежит ли данная точка к данному классу, и служит мерой эффективности классификации. Рассчитав расстояния между каждым образцом и каждым классом, мы получили матрицу, где первый столбец – название образца, а второй – логическое значение, отвечающее одной из трех ситуаций: точка не принадлежит ни одному классу ("неизвестная"), точка принадлежит определенному классу (номер класса), точка принадлежит сразу нескольким классам ("неопределенная"). Точка считалась принадлежащей классу, если расстояние Махаланобиса от нее до класса было меньше или равно 4. Общую чувствительность рассчитывали как отношение правильно отнесенных образцов к общему количеству образцов. Полученные значения параметра приведены в таблице 17. Результаты отсортированы в соответствии с увеличением числа пересечений доверительных эллипсов. Коэффициенты корреляции рассчитанных параметров с числом пересечений составляет около 0,8, что означает, что параметр **ЧисП** сходен с показателем общей чувствительности.

Таблица 17. Характеристики, используемые при дискриминации 36-ти образцов меда и их корреляция со значением числа пересечений эллипсов (ЧисП)

Флуорофор	Общая чувствительность						Число дискриминированных групп [#]	ЧисП
	По расстоянию Махаланобиса	<i>QDA</i>	<i>LDA-Mah</i>	<i>SVM</i> линейный	<i>SVM</i> полином-3	<i>SVM</i> рад. базисн. функц.		
<i>Ru(bpy)₃²⁺</i>	86,1	69	72	94	83	86	14	112
ТО–ДНК-1	80,6	67	75	86	81	83	11	112
ДНК-1	80,6	69	75	83	83	39	12	183
Отсутствие флуорофора*	80,6	72	69	83	81	42	11	178
ДНК-2	73,3	69	69	67	67	33	12	208
<i>8-Ox-Zn</i>	63,3	50	47	78	81	75	12	192
ТО–ДНК-2	59,4	53	58	81	69	72	11	239
<i>r</i> с ЧисП**	0,79	0,49	0,54	0,70	0,69	0,49	0,42	1,00

* Мед в отсутствие флуорофора

** Коэффициент корреляции ЧисП с другими характеристиками

[#] Число дискриминированных групп на графиках счетов, используя в качестве критерия расстояние Махаланобиса (Mah) $D_M = 4$

Эффективность дискриминации можно оценивать, рассчитав общую чувствительность, как меру правильно идентифицированных образцов, используя различные методы обработки данных. TS может быть получена с использованием дискриминантного анализа. Линейный дискриминантный анализ (LDA) применим только к двум классам, в то время как у нас присутствует 36, поэтому мы использовали методы дискриминантного анализа, применимые для классификации нескольких классов, такие как квадратичный дискриминантный анализ (QDA) и, LDA , основанный на вычислении расстояния Махаланобиса между классами ($LDA-Mah$). Другим методом вычисления TS является метод, основанный на вычислении опорных векторов (SVM) с применением различных алгоритмов классификации. Мы использовали полином 3-й степени или радиальную базисную функцию. Прежде чем применять алгоритмы QDA или SVM , данные раскладывали на главные компоненты. В таблице 17 представлены результаты расчета чувствительности для набора тестовых данных. Аналогично параметру общей чувствительности, корреляция числа пересечений эллипсов с TS не превышала 0,7, что подтверждает уникальность параметра ЧисП (наибольшее значение r , равное 0,69, получено при применении метода SVM с алгоритмом расчета полином-3).

В целом, дискриминирующую способность флуорофора можно охарактеризовать различными способами. Если построены доверительные эллипсы на графиках счетов, то самый простой способ оценить качество дискриминации – сосчитать число дискриминированных групп. Однако при таком подходе мы сталкиваемся с трудностями в случае большого количества недискриминируемых групп. То же касается и других стандартных способов оценки качества дискриминации. Этим недостатков лишен предлагаемый параметр ЧисП (число пересечений доверительных эллипсов), который к тому же не требует выделения проверочного набора данных и может быть рассчитан без использования программного обеспечения, если построены доверительные эллипсы. Параметр ЧисП слабо коррелирует с числом дискриминированных групп и стандартными характеристиками, что согласуется с тем, что этот параметр является независимым.

Обращаясь к проблеме выбора наиболее эффективного флуорофора, мы видим, что $Ru(bpy)_3^{2+}$ занимает лидирующие позиции среди других флуорофоров,

судя по параметру ЧисП (ЧисП = 112), числу разделенных групп, и значениям общей чувствительности, рассчитанным различными методами (табл. 17). Следующие по эффективности флуорофоры - это ТО–ДНК-1 и ДНК-1 без красителя. Другие флуорофоры в большинстве случаев имеют менее благоприятные показатели, чем данные, полученные обработкой собственной флуоресценции образцов меда, т.е. добавление флуорофоров ухудшает распознавание образцов.

Чтобы учесть все хемометрические показатели и количественно сравнить флуорофоры, мы рассчитали общий рейтинг флуорофоров. Для получения значения рейтинга индивидуальные места флуорофоров по всем показателям суммировали (табл. 18). Лучший рейтинг (минимальная сумма мест) также у $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$.

Имеет также смысл рассмотреть, как рассчитанные параметры соотносятся друг с другом. Как видно из таблицы 17, самая сильная корреляция (с коэффициентом 0,79) наблюдается между параметром ЧисП и общей чувствительностью по расстоянию Махаланобиса. Эти два показателя можно считать аналогичными. Общий рейтинг (табл. 18) также показывает значительную корреляцию с ЧисП ($r = 0,87$). Другие параметры показывают более низкую корреляцию с ЧисП ($r = 0,5-0,7$). В целом, все рассматриваемые метрики демонстрируют умеренную корреляцию между собой, что означает, что лучший способ выбора наиболее эффективной дискриминации должен включать использование максимально возможного количества метрик или их комбинаций, таких как общий рейтинг. Предложенный параметр ЧисП показал свою эффективность при оценке качества дискриминации на примере образцов меда.

Таблица 18. Места флуорофоров по значениям показателей общей чувствительности и ЧисП

Флуорофор	Общая чувствительность						Число дискриминированных групп [#]	ЧисП	Рейтинг**
	По расстоянию Махаланобиса	<i>QDA</i>	<i>LDA-Mah</i>	<i>SVM</i> линейный	<i>SVM</i> полином 3	<i>SVM</i> рад. базисн. Функ.			
<i>Ru(bpy)₃²⁺</i>	1	3	3	1	1,5	1	1	1,5	14
ТО–ДНК-1	3	5	1,5	2	4	2	6	1,5	28,5
ДНК-1	3	3	1,5	3,5	1,5	6	3	4	29
Отсутствие флуорофора*	3	1	4,5	3,5	4	5	6	3	32
ДНК-2	5	3	4,5	7	7	7	3	6	47,5
<i>8-Ox-Zn</i>	6	7	7	6	4	3	3	5	48
ТО–ДНК-2	7	6	6	5	6	4	6	7	53

* Мед в отсутствии флуорофора

** Сумма мест, показанных в этой таблице для каждого флуорофора, включая ЧисП. Если два флуорофора показали одинаковый результат, например, находясь на 1-м и 2-м месте, для них было показано место 1,5, а если три флуорофора были на 5, 6 и 7-м месте, все они были показаны на 6-м месте, и т. д. Зеленый фон обозначает 1–2 места, синий - 2–3–4 места, серый - последнее место (7)

[#] Число дискриминированных групп на графиках счетов, используя в качестве критерия расстояние Махаланобиса $D_M = 4$

3.4. Применение метода к реальным объектам

3.4.1. Смеси модельных аналитов в плазме крови*

Дискриминация низкомолекулярных органических соединений в биологических объектах представляет большой интерес. Для разделения смесей модельных аналитов выбрали плазму крови человека, как пример реального объекта сложного состава.

В качестве аналитов использовали смеси амикацина, хлорамфеникола, сульфаметоксазола и пираретама. Флуоресцентные реагенты добавляли к аналитам, взятым в виде индивидуальных соединений, всех попарных и тройных смесей, а также смеси всех 4-х веществ (всего 15 смесей). В качестве флуоресцентных реагентов использовали как индивидуальные флуорофоров, так и их смеси (предполагалось, что смеси флуорофоров позволят разделить модельные аналиты на большее число классов).

В случае смеси 4-х флуорофоров (*CdSe-1*, осн. Шиффа, *Флуор/SiO₂* и *Pod/SiO₂*) обнаружили, что влияние аналитов на форму спектра наиболее заметно (и в наибольшей степени различается для разных аналитов) при использовании родамина, модифицированного ПЭИ и иммобилизованного на диоксиде кремния (*Pod/SiO₂*, рис. 27).

* Divyanin N.N., Rukosueva E.A., Garmash A.V., Beklemishev M.K. Recognition of model analyte mixtures in the presence of blood plasma using a mixture of fluorophores («Fluorescent Tongue») // Journal of Analytical Chemistry, 2018, 73, 1165-1171. DOI: 10.1134/S1061934818120043. (IF= 0,894, Q3) – руководство экспериментом и обработка результатов

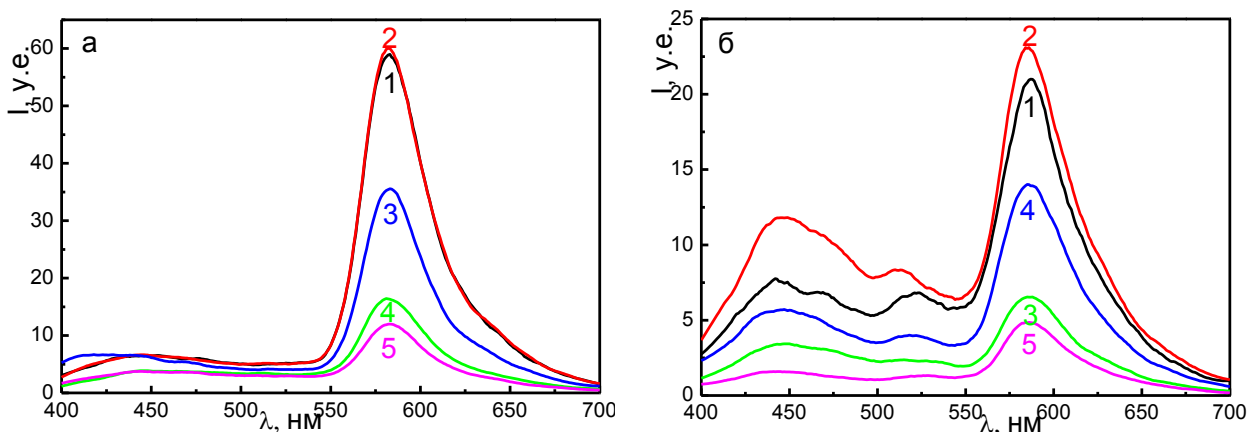


Рис. 27. Спектры флуоресценции Pod/SiO_2 (а) и смеси 4-х флуорофоров ($CdSe-1$, осн. Шиффа, $Флуор/SiO_2$ и Pod/SiO_2) (б) в присутствии плазмы крови без аналитов (1) и с модельными аналитами: 2 – парацетам, 3 – хлорамфеникол, 4 – сульфаметоксазол, 5 – смесь парацетам + сульфаметоксазол + хлорамфеникол. Буфер $МОПС$ (рН 7,6), $\lambda_{ex} = 300$ нм.

При рассмотрении смесей флуорофоров оказалось, что смеси, не содержащие Pod/SiO_2 (например, смесь $CdSe-1$, $Флуор/SiO_2$ и осн. Шиффа), вообще не позволяют выделить отдельные классы среди групп модельных аналитов. Смеси трех флуорофоров, содержащие Pod/SiO_2 , уступали индивидуальному Pod/SiO_2 по числу выделенных классов (рис. 28). Например, смеси (осн. Шиффа - Pod/SiO_2 - $Флуор/SiO_2$ и $CdSe-1$ - Pod/SiO_2 - $Флуор/SiO_2$) позволяют разделить массив данных на 2 класса, а смесь (осн. Шиффа - Pod/SiO_2 - $CdSe-1$) – на три. Таким образом, все смеси трех флуорофоров оказались менее эффективными, чем отдельный флуорофор – Pod/SiO_2 .

Смесь 4-х флуорофоров, хорошо зарекомендовавших себя при изучении разделения модельных аналитов (осн. Шиффа, $Флуор/SiO_2$, Pod/SiO_2 , $CdSe-1$) (рис. 29) позволила разделить модельные смеси на 7 классов, что обеспечило наилучшую дискриминирующую способность. Наивысшая эффективность смеси наибольшего изученного числа флуорофоров согласуется с тем фактом, что разные аналиты по-разному влияют на сигналы разных флуорофоров, поэтому с увеличением числа флуорофоров изменения спектра флуоресценции под влиянием аналитов становятся более разнообразными. Это в конечном итоге определяет форму спектра и его положение на графике счетов. Таким образом, наличие как минимум 4-х разных флуорофоров положительно влияет на способность

дискриминировать смеси. Введение 5-го флуорофора в аналогичную систему (в отсутствие плазмы крови) не улучшало дискриминирующую способность, поэтому большее число флуорофоров не изучали.

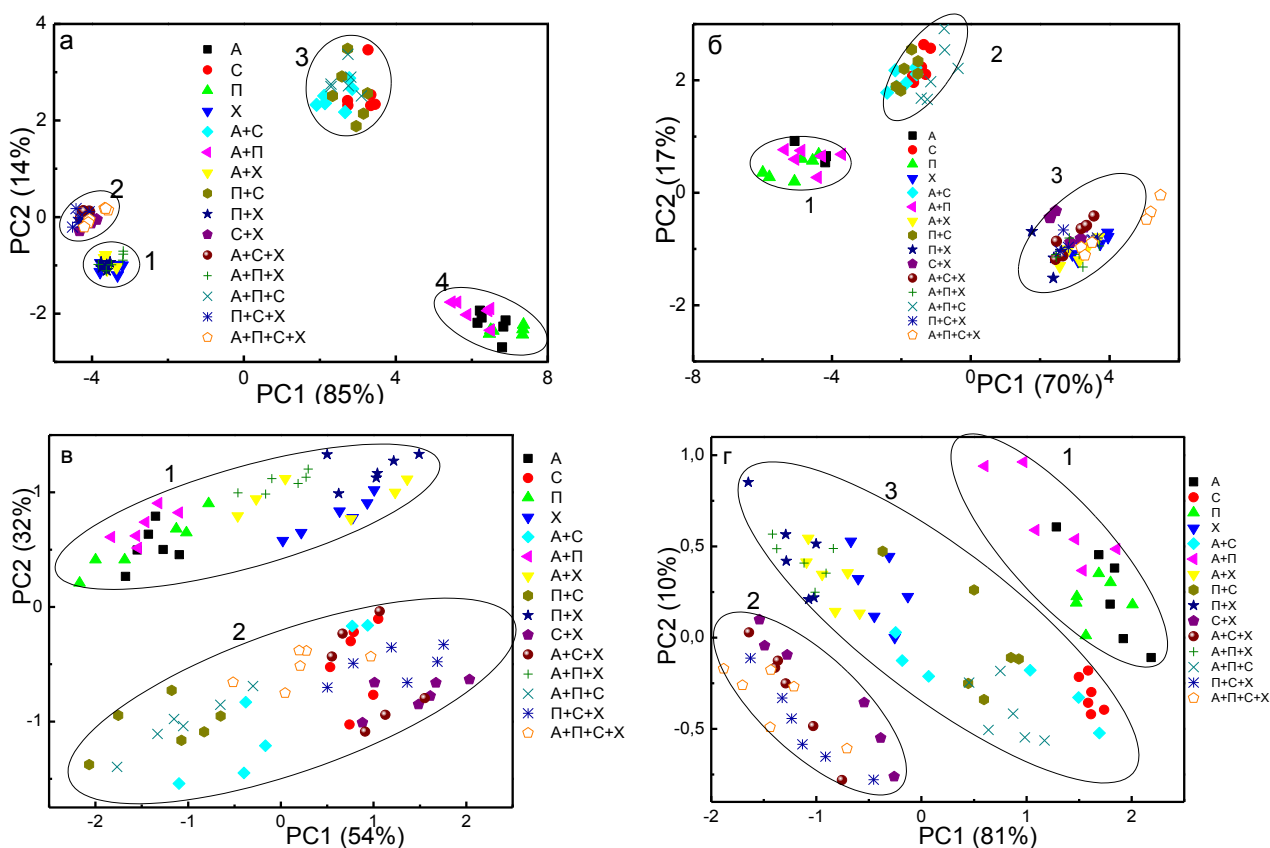


Рис. 28. Графики счетов метода главных компонент для спектров эмиссии флуорофоров: (а) Pod/SiO_2 , (б) $CdSe-1$, (в) смесь осн. Шиффа, $Fluor/SiO_2$ и Pod/SiO_2 , (г) смесь осн. Шиффа, Pod/SiO_2 , $CdSe-1$ в присутствии плазмы крови, аналитов и их смесей (А – амикацин, С – сульфаметоксазол, П – пирацетам, Х – хлорамфеникол). Эллипсами отмечены классы смесей аналитов, расстояния Махаланобиса между которыми превышают 4. (см. также табл. 19).

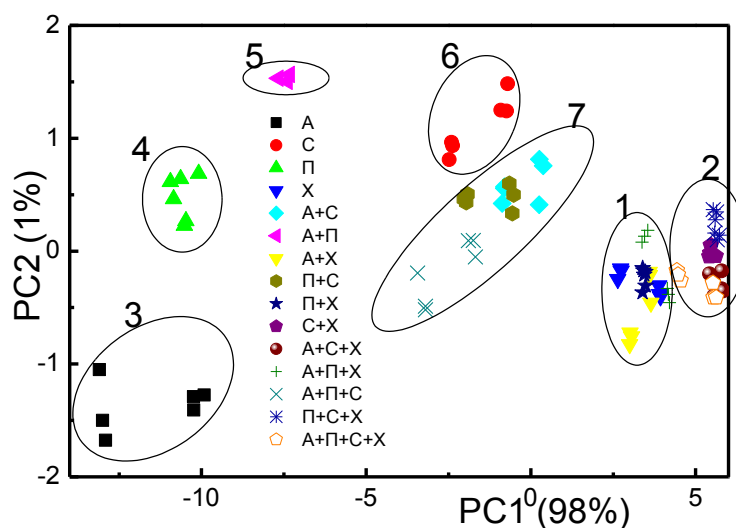


Рис. 29. График счетов для спектров флуоресценции смеси четырех флуорофоров (осн. Шиффа, *Флуор/SiO₂* и *Под/SiO₂*, *CdSe-1*) в присутствии плазмы крови, аналитов и их смесей (А – амикацин, С – сульфаметоксазол, П – парацетам, Х – хлорамфеникол). Эллипсами отмечены классы смесей аналитов, расстояния Махаланобиса между которыми превышают 4 (см. также табл. 19).

Таблица 19. Разделение 15-ти модельных смесей аналитов на классы с помощью флуорофоров

Состав флуоресцентного реагента	Число фл.*	№ класса, состав класса**	Номера классов [#]	$M_D^{##}$	Число классов
<i>Под/SiO₂</i>	1	1. А+Х, А+П+Х, П+Х, Х*** 2. П+С+Х, С+Х, А+П+С+Х, А+С+Х 3. А+С, П+С, А+П+С, С 4. А, П, А+П	1-2	9,9	4
			1-3	22,2	
			1-4	27,1	
			2-4	27,3	
			2-3	21,2	
			3-4	14,5	
<i>CdSe-1</i>	1	1. А, П, А+П 2. А+С, П+С, А+П+С, С 3. А+Х, А+П+Х, П+Х, Х, П+С+Х, С+Х, А+П+С+Х, А+С+Х	1-2	6,9	3
			1-3	15,2	
			2-3	15,9	
Состав флуоресцентного реагента	Число фл.*	№ класса, состав класса**	Номера классов [#]	$M_D^{##}$	Число классов
<i>Флуор/SiO₂</i> , <i>Под/SiO₂</i> , <i>CdSe-1</i>	3	1. А+Х, Х, П+Х, А+П+Х, П+С+Х, С+Х, А+П+С+Х, А+С+Х 2. А+С, П+С, А+П+С, С, А, А+П, П	1-2	5,5	2

Осн.Шиффа, Род/SiO ₂ , CdSe-1	3	1. А, П, А+П 2. С+Х, А+С+Х, П+С+Х, А+П+С+Х 3. П+Х, А+П+Х, А+Х, Х, А+С, С, П+С, А+П+С	1-2	14,2	3
			1-3	4,8	
			2-3	4,8	
Осн.Шиффа, Флуор/SiO ₂ , Род/SiO ₂	3	1. А, П, А+П, П+Х, А+П+Х, А+Х, Х 2. А+С, С, П+С, А+П+С, С+Х, А+С+Х, П+С+Х, А+П+С+Х	1-2	6,8	2
Осн.Шиффа, Флуор/SiO ₂ , CdSe-1	3	1	-	-	1
Осн.Шиффа, Флуор/SiO ₂ , Род/SiO ₂ , CdSe-1	4	1. Х, П+Х, А+Х, А+П+Х 2. С+Х, П+С+Х, А+С+Х, А+П+С+Х 3. А 4. П 5. А+П 6. С 7. А+С, П+С, А+С+П	1-2	4,8	7
			6-7	4,6	
			3-4	9,2	
			3-5	17,3	
			4-5	16,2	
			2-7	12,2	
			5-6	25,4	
4-7	15,3				

* Число флуорофоров в составе "флуоресцентного реагента"

** Результат разбиения 15-ти смесей модельных аналитов на классы

*** А – амикацин, П – пирацетам, Х – хлорамфеникол, С – сульфаметоксазол

Номера классов, между которыми рассчитывали расстояния Махаланобиса (M_D), приведенные в следующем столбце

Расстояние Махаланобиса

В альтернативном варианте распознавания смесей, основанном на использовании УФ-видимых спектров (рис. 30), 15 исследуемых модельных смесей удалось разбить на 5 классов. Это больше, чем при использовании одного флуорофора (Pod/SiO_2 , 4 класса), но меньше, чем при использовании смеси 4-х флуорофоров (7 классов, табл. 19).

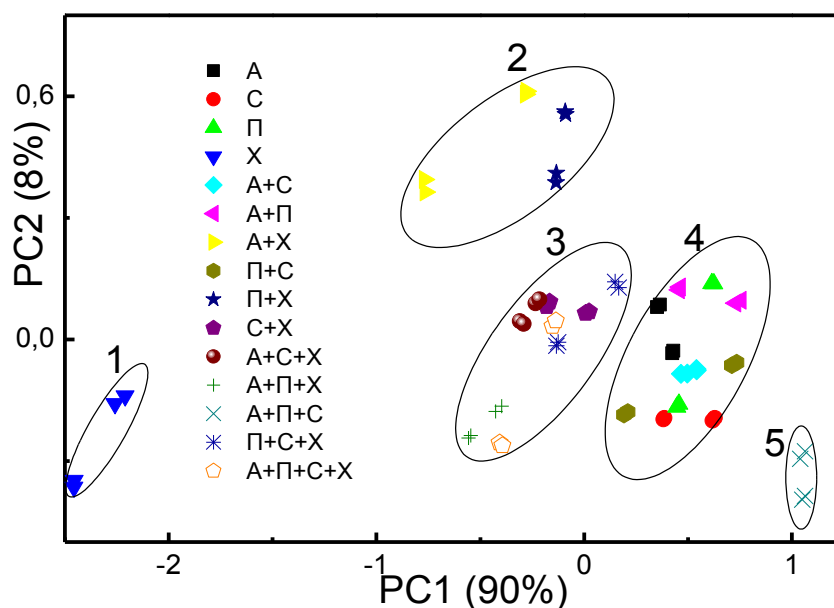


Рис. 30. График счетов метода главных компонент для УФ-видимых спектров поглощения (220–400 нм) аналитов и их смесей (А – амикацин, С – сульфаметоксазол, П – пирацетам, Х – хлорамфеникол) в присутствии плазмы крови.

Результаты показали, что флуориметрический метод «отпечатков пальцев» позволяет различать смеси 2-3-х модельных аналитов не только в водных растворах, но и в такой сложной биологической матрице, как плазма крови, что свидетельствует о высокой дискриминирующей способности «флуоресцентного глаза».

3.4.2. Дискриминация продуктов питания и напитков

Мед

Для дискриминации образцов меда, как упоминалась выше, использовали 36 образцов (табл. 14). Аликвоты растворов меда, обычно 50 мкл (растворили 1 г меда в 10 мл дистиллированной воды), помещали в лунки планшета и добавляли один из растворов флуорофоров, указанных выше: $Ru(bpy)_3^{2+}$ - 50 мкл, $\delta\text{-Ox-Zn}$ – 100 мкл, или тиазоловый оранжевый с ДНК в разных соотношениях. Полученные смеси разбавляли дистиллированной водой до получения общего объема 330 мкл. Как правило, образцы возбуждали длиной волны 320 и 360 нм, а диапазон излучения составлял от 400 до 800 нм при ширине щелей возбуждения и эмиссии 10 нм.

В таблице 20 представлено число дискриминированных групп образцов меда по спектрам флуоресценции в присутствии флуорофоров и без. Наилучшим флуорофором оказался $Ru(bpy)_3^{2+}$, так как с его помощью удалось разделить образцы меда на 14 групп. В отсутствие флуорофора, а также в присутствии флуорофора ТО-ДНК образцы меда удалось различить лишь на 11 групп.

Таблица 20. Разделение 36-ти видов меда на классы в присутствии флуорофоров и без них

Флуорофор	Число дискриминированных групп
$Ru(bpy)_3^{2+}$	14
ДНК-1	12
ДНК-2	12
<i>8-Ox-Zn</i>	12
ТО-ДНК-1	11
Отсутствие флуорофора	11
ТО-ДНК-2	11

Некоторые образцы меда на графиках счетов явно четко разделялись. На рисунке 23а представлен график счетов, построенный по собственной флуоресценции образцов меда. Выделено 9 образцов меда, среди которых удалось дискриминировать облепиховый мед (№ 25), который возможно дискриминировать также при добавлении флуорофоров. Образец № 11 (гречишный мед) также удалось дискриминировать при использовании флуорофоров, однако мы обратили внимание, что на рисунке 23б он находится в одной группе с образцом №36, который имеет такой же характерный темный цвет. Для дальнейшего исследования мы решили исключить явно дискриминированные образцы: 19 – кипрейный; 22 – липовый (фермерский); 32, 33, 35, 36 – цветочный мед (частная пасека), и более подробно изучить группу недискриминированных медов.

Таким образом, исключили 8 образцов, а оставшиеся образцы меда обрабатывали методом *РСА* и проводили разделение не по номерам образцов, а по типу меда. Дискриминация образцов на магазинные и фермерские не удалось (рис. 31а). Скорее всего, это связано с тем, что, как в магазине, так и у фермеров могли быть поддельные образцы, а также различные добавки.

Далее мы рассмотрели следующие типы меда: цветочный (фермерский) – 1, 2, 3, 4, 27, 34; цветочный (магазинный) – 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13; донниковый – 14, 15, 16; кипрейный – 17, 18, 28, 31; липовый (фермерский) – 20, 21, 23; липовый (магазинный) – 10; липовый с малиной – 24; белая акация – 26, лавандовый – 29, мед с живицей – 30. Так получили 10 групп образцов.

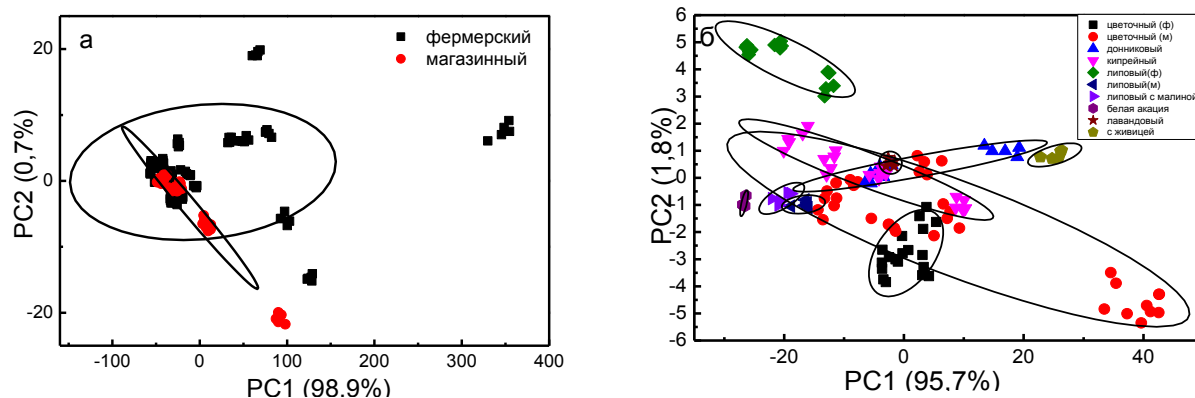


Рис. 31. а.) График счетов 36-ти образцов меда в присутствии флуорофора $Ru(bpy)_3^{2+}$ б.) график счетов 28-ми образцов меда в присутствии флуорофора $Ru(bpy)_3^{2+}$.

На рисунке 31б представлен график счетов 28-ми образцов меда, разделенных на вышеуказанные 10 групп. Из рисунка 31 видно, что цветочный мед, как фермерский, так и магазинный, занимает достаточно большое пространство на графике счетов. Это может быть вызвано тем, что цветочный мед очень разный, так как для производства используется разнотравье. Такую же картину можно видеть и в присутствии других флуорофоров, а также без них. Для выбора наилучшего флуорофора для разделения образцов меда по данным группам изучили возможность разделения, исключив весь цветочный мед. В таблице 21 приведено число и вид групп дискриминированных образцов меда. Так, в присутствии практически любого из флуорофоров возможно дискриминировать мед с живицей (кроме длинноволного пика флуорофора ТО-ДНК), в некоторых случаях ярко выражен мед белой акации или липовый с малиной. При оценке дискриминирующей способности флуорофоров по группам меда наилучшая дискриминация наблюдается при использовании в качестве флуорофоров $Ru(bpy)_3^{2+}$ и ТО-ДНК(1, 2).

Таблица 21. Число дискриминированных групп образцов меда (вид меда) на графиках счетов в присутствии флуорофоров и без них

Флуорофор	Число дискриминированных групп образцов меда (в скобках – вид меда) на графиках счетов		
	весь спектр (400-800 нм)	один пик	
		коротковолновый	длинноволновый
Нет (мед)	2 (живица, белая акация)	1 (живица)	-
Мед + ДНК-1	2 (живица, липовый с малиной)	2 (живица, липовый с малиной)	-
Мед + ДНК-2	2 (белая акация, живица)	1 (живица)	-
Мед + ДНК-1 + ТО	3 (белая акация, лаванда, живица)	1 (живица)	4 (липовый с малиной, белая акация, лавандовый, живица)
Мед + ДНК-2 + ТО	1 (смесь донника и лип. С малиной)	2 (смесь донника и лип. с малиной, живица)	4 (донниковый, лип. с малиной, белая акация, м.б. липовый)
Мед + $Ru(bpy)_3^{2+}$	4 (липовый(ф), живица, белая акация, липовый(м)+лип. С малин)	-	3 (липовый, белая акация, живица)
Мед + $\delta\text{-Ox-Zn}$	1 (липовый с малиной)	-	1 (белая акация)

На рисунке 32 представлены графики счетов дискриминации образцов меда в присутствии флуорофоров $Ru(bpy)_3^{2+}$ и ТО-ДНК. На всех графиках четко отличим только мед белой акации. В присутствии флуорофора ТО-ДНК (обоих видов) разделяются образцы меда донниковый и липовый с малиной. Кроме того, в случае использования флуорофоров $Ru(bpy)_3^{2+}$ и ТО-ДНК-2 можно заметить, что отличается липовый мед фермерский и магазинный.

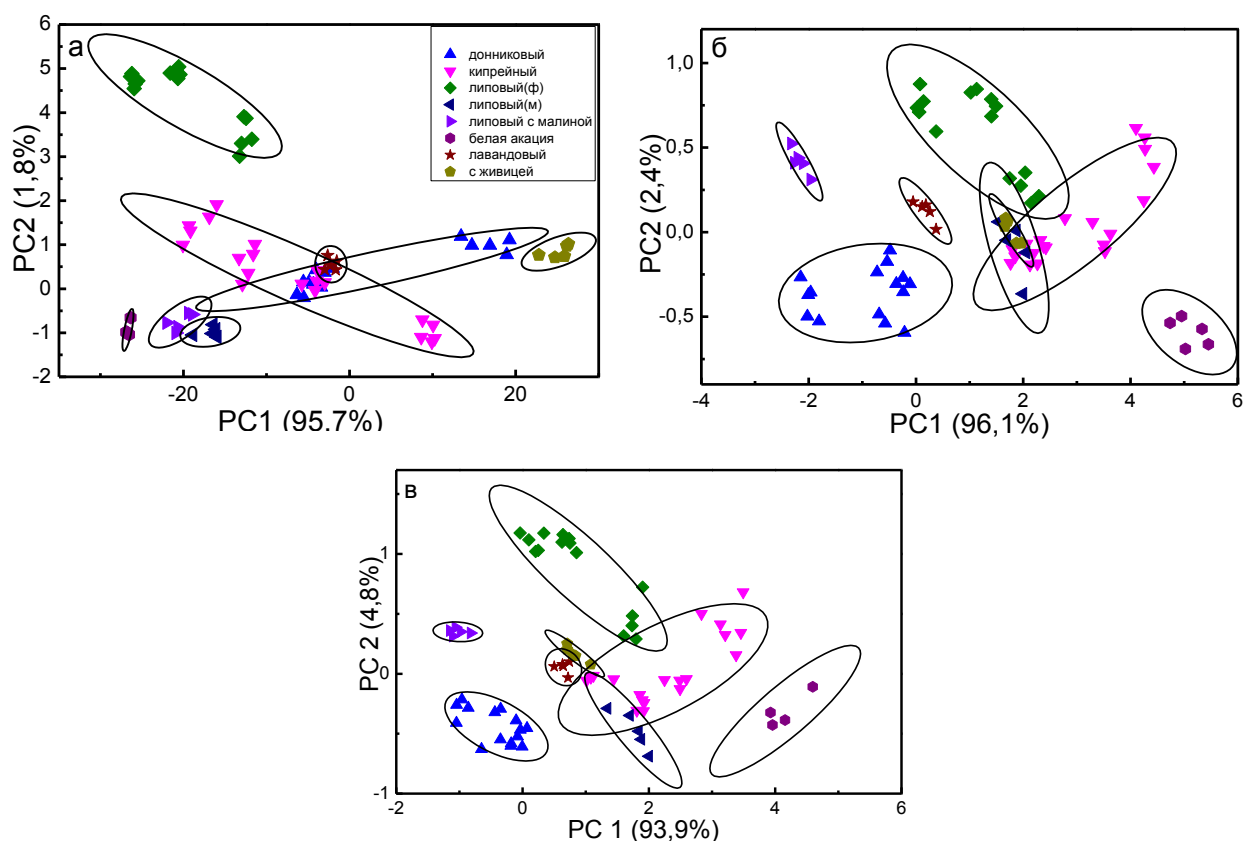


Рис. 32. Графики счетов образцов меда в присутствии флуорофоров а.) $Ru(bpy)_3^{2+}$, б.) ТО-ДНК-1, в.) ТО-ДНК-2.

Данные результаты свидетельствуют, что с использованными флуорофорами дискриминировать сразу все виды меда невозможно, но для решения задачи разделить определенные сорта меда можно подобрать эффективные флуорофоры.

Виски

Задача различать виски по сорту/происхождению/марке, добавкам компонентов или других способов подделки успешно реализуется различными методами «отпечатков пальцев» [130, 131, 132, 133], в том числе и методом, основанным на добавлении флуоресцентных полимеров [32].

Процедура анализа виски заключалась в следующем: алиquotы виски (35 мкл) помещали в лунки 96-луночного полистирольного планшета и добавляли один из флуорофоров (количество флуорофора определялось интенсивностью его излучения, при регистрации собственной эмиссии образцов флуорофоры не добавляли). Полученные смеси разбавляли дистиллированной водой, чтобы получить общий объем 330 мкл. Для каждого образца проводили по 6-8

параллельных измерений. При получении фотографий варьировали время экспозиции (5 или 10 с). Спектры флуоресценции получали при длине волны возбуждения 360 нм в диапазоне эмиссии от 400 до 700 нм. Виды виски, участвующие в исследовании и поделенные по типу, стране производства и времени выдержки (табл. 22).

Таблица 22. Виды виски, участвующие в исследовании

№	Название	Тип	Страна производства	Содержание спирта, % об.	Время выдержки, лет
1	Jameson	Ирландский	Ирландия	40	3
2	Clan, Hamilton	Шотландский	Дистиллят из Шотландии, разлит в Минске	40	3
3	Grant's	Шотландский	Великобритания	43	–
4	Suntory Old Whisky	Японский	Япония	43	–
5	Early Times	Бурбон	США	40	3
6	Rowson's Reserve	Ирландский (висковый напиток)	Дистиллят из Шотландии, разлит в Санкт-Петербурге	40	3
7	Teacher's	Шотландский	Великобритания	40	–
8	Jack Daniels*	Бурбон (Tennessee)	США	40	3
9	Jack Daniels*	Бурбон (Tennessee)	США	40	3
10	Jim Beam	Бурбон	Испания	40	4
11	White Horse	Шотландский	Великобритания	40	3
12	English Park	Английский	Словакия	40	3
13	William Lawson's	Шотландский	Великобритания	40	3
14	Bell's	Шотландский	Великобритания	40	3
15	Golden Joker	Висковый напиток	Россия, Пензенская обл.	40	–
16	Chivas Regal	Шотландский	Великобритания	40	12

Мы получили наилучшее разделение образцов виски при использовании в качестве флуорофора $Ru(bpy)_3^{2+}$ (рис. 33). На графике счетов расстояние Махаланобиса превышает значение 4,0 даже между наименее разделенными группами (образцы 13 и 14), что соответствует критерию дискриминации, рассмотренному ранее. Такой результат может объяснить высокая реакционная способность данного флуорофора.

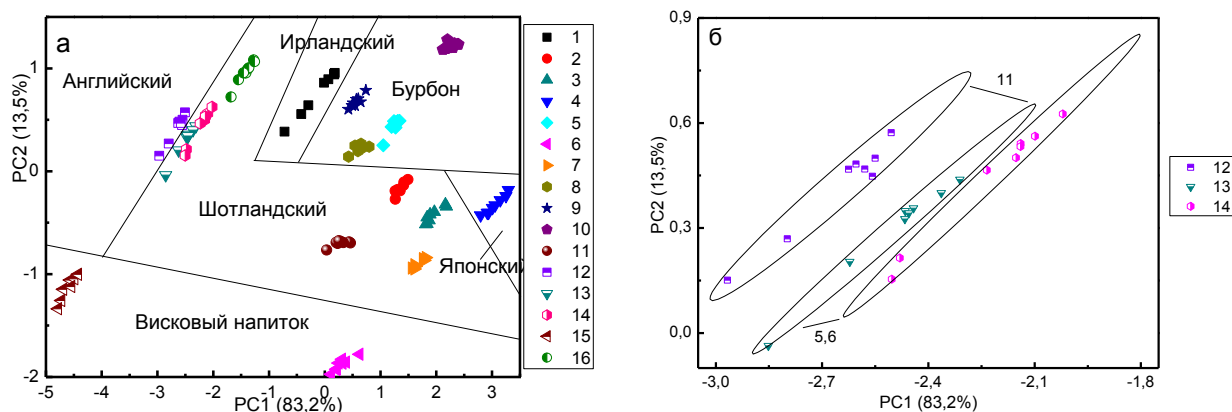


Рис. 33. а) График счетов для 16-ти сортов виски в присутствии флуорофора $Ru(bpy)_3^{2+}$. Линии разделяют области, соответствующие определённым типам виски. Условия: выдержка 10 с, применена нормировка, 3 применения функции *SpotAmp*; б) увеличенный участок графика а) для образцов 12, 13 и 14 с расстояниями Махаланобиса между ними.

Различные виды виски попадают в отдельные области на графике счетов (рис. 33). Это показывает, что есть возможность определения типа виски неизвестного образца. Чтобы дискриминировать виски с большей достоверностью, должно быть изучено большее количество образцов. Кроме того, виски в возрасте больше 3-х лет (образцы 10 и 16) на рисунке 33 расположены в верхней части графика, то есть существует принципиальная возможность разделения образцов виски по возрасту.

Следующими по эффективности дискриминации сортов виски флуорофорами являются Pod/SiO_2 и $\delta-Ox-Zn$, при использовании которых неразделенными остаются лишь две пары образцов. Эффективность Pod/SiO_2 может быть связана с его иммобилизацией на поверхности кремнезема (разд. 2.1.3.).

Кровь свиней

Разрабатываемый метод применили для дискриминации 28-ми образцов плазмы крови свиней (ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии»), 14 из которых прогреты при температуре 40 градусов в течение 40 мин, другие 14 – нет. Подобное прогревание используют для инактивирования вируса при работе с образцами, которые могут быть

зараженными. Использовали следующие группы флуорофоров: смесь 4-х флуорофоров (осн. Шиффа, Pod/SiO_2 , $Флуор/SiO_2$, $CdSe-1$), смеси двух флуорофоров ($CdSe-2 + Ru(dpy)_3^{2+}$, $КОФ + \delta-Oxi-Zn$). Разделение проводили как по спектрам флуоресценции, так и по фото.

На рисунке 34 представлены графики счетов для каждой смеси флуорофоров. В этом случае полного разделения не наблюдается. Однако при использовании в качестве аналитического сигнала фотографии непрогретые образцы со всеми тремя смесями флуорофоров образуют более упорядоченную группу, чем при регистрации спектров флуоресценции. Прогретые образцы на графиках счетов находятся в разных местах, есть и явно выделяющиеся образцы – это связано с тем, что не все образцы имели один цвет. Поэтому мы решили исключить образцы с яркой окраской, где присутствовало большое количество эритроцитов.

При исключении окрашенных образцов осталось только 11 образцов, из которых три образца – прогретая плазма, остальные – непрогретая. Полученные графики счетов представлены на рисунке 35. Как и в случае всех образцов, большая часть графиков счетов не дала возможности дискриминировать образцы, однако при использовании смеси 4-х флуорофоров и фотографической регистрации удалось почти полностью разделить образцы.

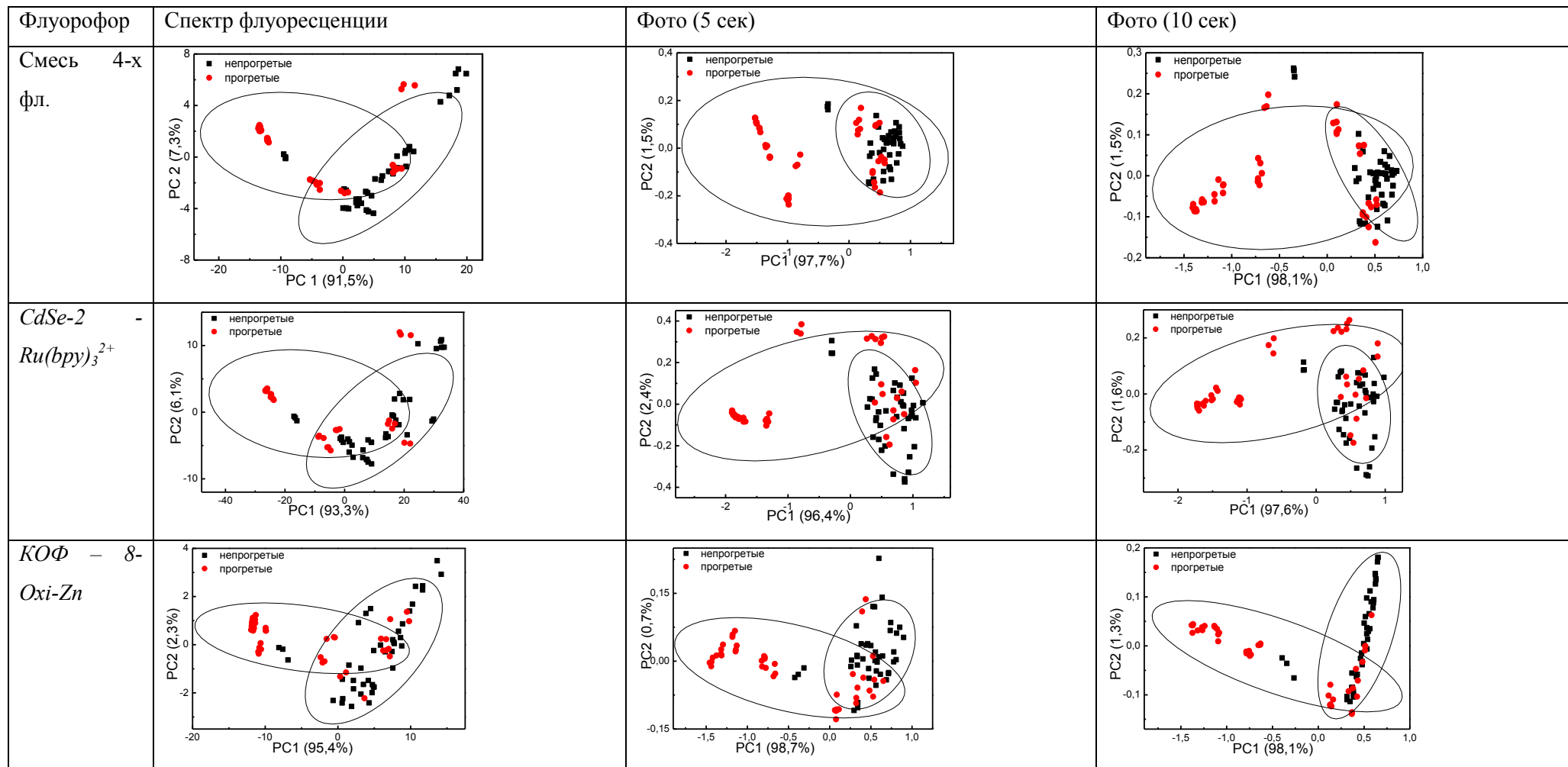


Рис. 34. Графики счетов для 28-ми образцов крови свиней, из которых 14 прогретых (красные кружки) в присутствии трех смесей флуорофоров (смесь 4-х флуорофоров, $CdSe-2$ - $Ru(bpy)_3^{2+}$, $KO\Phi$ - δ - $Oxi-Zn$), построенные по спектрам флуоресценции и при обработке фотографий с выдержкой 5 и 10 сек.

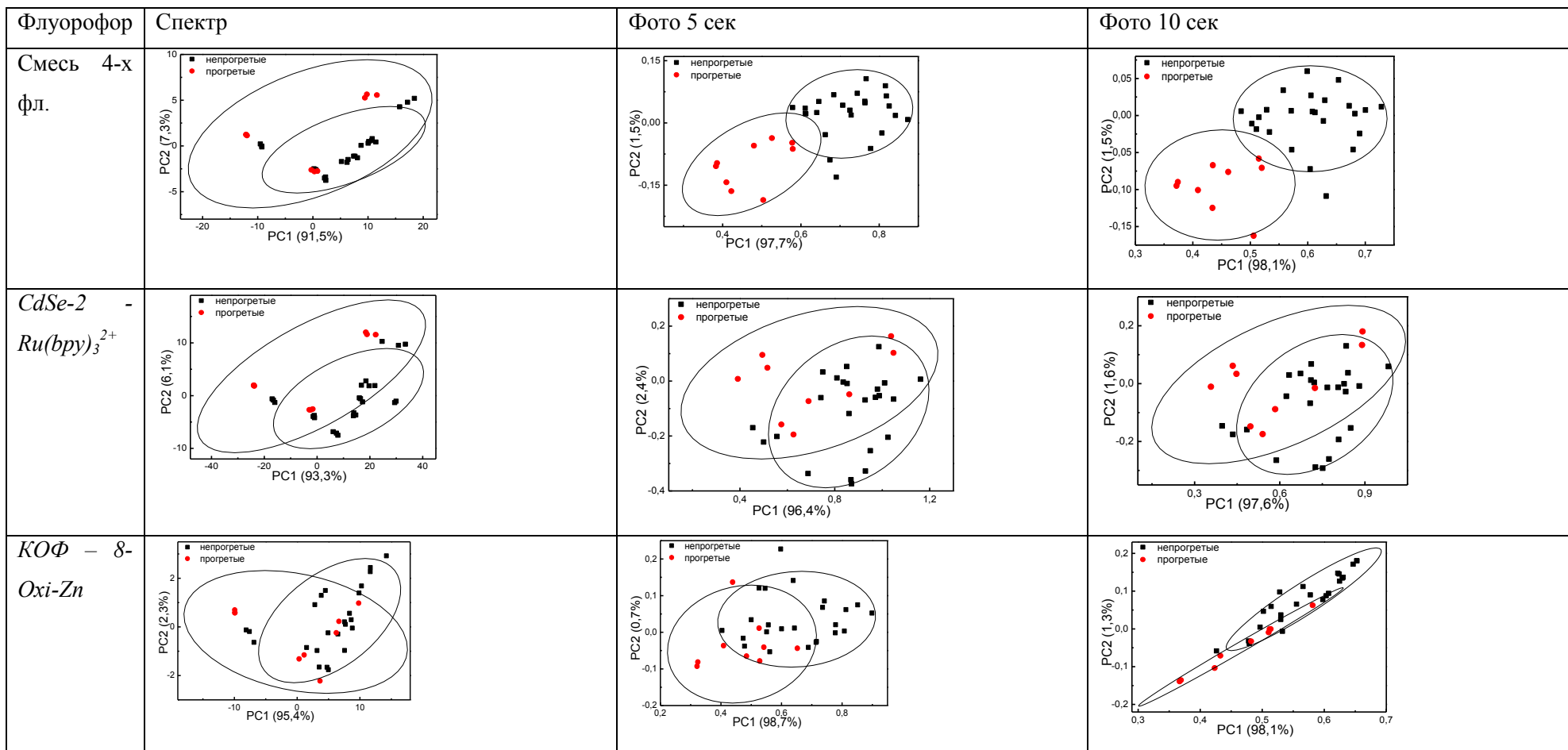


Рис. 35. Графики счетов для 11-ти образцов крови свиней, из которых 3 прогретых (красные кружки) в присутствии трех смесей флуорофоров (смесь 4-х флуорофоров, *CdSe-2- Ru(bpy)₃²⁺*, *КОФ-8-Oxi-Zn*), построенные по спектрам флуоресценции, и при обработке фотографий с выдержкой 5 и 10 сек.

Мясо птицы*

В задачу входило научиться различать облученные и необлученные образцы продуктов питания (на примере мяса индейки). Облучение продуктов электронами или рентгеновским излучением проводят с целями стерилизации для продления сроков хранения. Перед облучением к измельченной мышечной ткани индейки добавляли физиологический раствор в соотношении 1:3 (об.), полученную смесь гомогенизировали до однородной суспензии и 0,5 мл гомогената помещали в пластиковые стерильные пробирки объемом 2 мл. Образцы облучали на промышленном ускорителе электронов УЭЛР-1-25-Т-001 с энергией 1 МэВ при дозе 10 Гр/с. Перечисленные операции проведены сотрудниками Физического факультета МГУ; образцы гомогената мяса индейки в виде водной суспензии предоставлены ст. преп. У.А. Близнюк (каф. физики ускорителей и радиационной медицины Физического факультета МГУ). Измерение флуоресценции 6-ти облученных и 6-ти необлученных образцов проводилось в отсутствие флуорофора и при введении $Ru(bpy)_3^{2+}$. Обработанные на ультразвуковом гомогенизаторе образцы разбавляли водой в 40 раз и 60 мкл полученных растворов помещали в ячейки 96-луночного полистирольного планшета. Для исследования в присутствии флуорофора в ячейки поместили также 30 мкл $1,4 \cdot 10^{-5}$ М раствора флуорофора. Спектры флуоресценции снимали при возбуждении длиной волны 450 нм.

Результаты метода «отпечатков пальцев» по спектрам флуоресценции представлены на рисунке 36. По собственным спектрам флуоресценции образцов невозможно дискриминировать облученные и необлученные образцы (рис. 36а). При добавлении в качестве флуорофора $Ru(bpy)_3^{2+}$ результаты дискриминации также недостаточны для полного разделения образцов.

* Черняев А.П., Розанов В.В., Беклемишев М.К., Близнюк У.А., Ипатова В.С., Авдюхина В.М., Борщеговская П.Ю., Гордонова И.К., Рукоусева Е.А., Ханкин В.В., Юров Д.С. Применение низкоэнергетических электронов для антимикробной обработки мяса птицы // Известия Российской академии наук. Серия физическая, 2020, 84, 1617-1622. DOI: 10.31857/S0367676520110071. (IF (РИНЦ)= 0.61) – проведение эксперимента и обработка данных методом «флуоресцентный глаз».

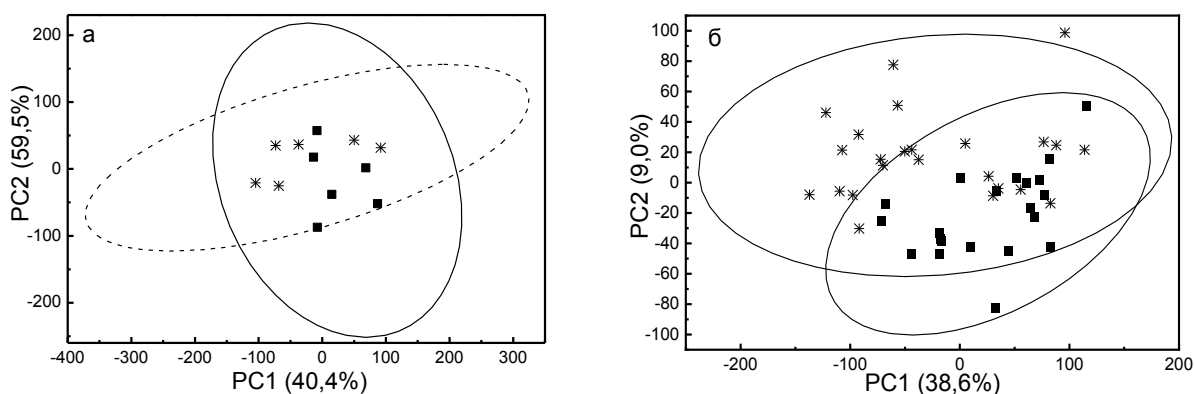


Рис. 36. Графики счетов метода главных компонент для спектров флуоресценции образцов мяса индейки: а – собственной (по 1 измерению каждого образца), б – в присутствии флуорофора $Ru(bpy)_3^{2+}$ (по 4 параллельных измерения каждого образца). Звездочки – образцы, облученные с мощностью дозы 10 Гр/с, квадраты – необлученные. Доверительные эллипсы проведены для 95%-ной доверительной вероятности.

Яблочный сок

В качестве объекта использовали 13 образцов яблочного сока различных марок (табл. 23). Образцы 7 и 8 – нектары, остальные образцы – 100% яблочный сок (осветленный).

Сок обладает собственной флуоресценцией, поэтому провели дискриминацию без добавления флуорофоров. Как показано в таблице 24, по собственной флуоресценции наилучшее разделение соков достигнуто с помощью нормированных спектров флуоресценции. Провели также разделение в присутствии флуорофоров $CdSe-2$, $8-Oxi-Zn$, Pod/SiO_2 и $Ru(bpy)_3^{2+}$.

Таблица 23. Виды яблочного сока, участвующие в исследовании

№	Название	Состав	Углеводы 100 г	Изготовитель	Примечания
1	Агуша	Сок яблочный восстановленный осветленный	11 г	Омск	С 4-х месяцев
2	Малышам	Сок из яблок восстановленный, осветленный	11,2 г	Липецк	С 4-х месяцев Калий 100- 130 мг
3	Мой (для детского питания)	Сок из яблок восстановленный, осветленный	11,5 г	Сады придонья Волгоградская обл.	С 4-х месяцев Калий 70-300 мг
4	Фруто Няня	Сок из яблок восстановленный, осветленный	11,2 г	Липецк	С 4-х месяцев Калий 90-150 мг

5	Добрый (для детей)	Сок яблочный восстановленный, осветленный	11,7	Москва	С 4-х месяцев
6	Добрый	Сок яблочный восстановленный, осветленный	11,5 г	Москва	С 3-х лет
7	Каждый день	Сок яблочный восстановленный, осветленный	11,0 г	Майкоп	С 4-х месяцев Калий 70-300 мг
8	Каждый день	Нектар яблочный. Сок яблочный, сахар, лимонная кислота Сока не мене 50%	11,0 г	Самара	С 3-х лет
9	Сады придонья	Сок яблочный восстановленный, осветленный	11,5 г	Волгоградская обл.	С 4-х месяцев Калий 70-300 мг
10	Сады придонья	Сок яблочный прямого отжима. Осветленный	11,0 г	Волгоградская обл.	С 4-х месяцев Калий 70-300 мг
11	Сады придонья	Сок яблочный восстановленный, осветленный	11,5 г	Волгоградская обл.	С 3-х лет
12	О!	Сок яблочный восстановленный, осветленный	11,0 г	Краснодарский край	С 3-х лет
13	J7	Сок яблочный восстановленный, осветленный	12,0 г	Липецкая обл.	С 3-х лет Натрия 0,01г

По фотографиям для выдержек 5 и 10 с наилучшее разделение образцов сока наблюдается в присутствии флуорофора *8-Oxi-Zn* без нормировки.

Таблица 24. Число дискриминированных групп при дискриминации 13-ти сортов яблочного сока при добавлении флуорофоров с помощью регистрации фотографий с выдержкой 5 и 10 сек и спектров флуоресценции с нормировкой (норм) и без нее (без норм)

Флуорофор	5 сек		10 сек		Спектр	
	Без норм	Норм	Без норм	Норм	Без норм	Норм
Отсутствует	2	2	2	2	3	5
<i>CdSe-2</i>	2	2	2	2	5	8
<i>8-Oxi-Zn</i>	6	3	6	3	5	5
<i>Pod/SiO₂</i>	3	3	2	2	4	3
<i>Ru(bpy)₃²⁺</i>	2	2	3	3	4	6

В то же время, по спектрам флуоресценции наилучшее разделение наблюдается в присутствии флуорофоров $CdSe-2$ и $Ru(bpy)_3^{2+}$ (табл. 24 и рис. 37). В обоих случаях дискриминированы нектары (образцы 7 и 8), а также сок фирмы «Мой» и «J7» (образцы 3 и 13, соответственно). При этом дискриминация на большее число групп наблюдается в присутствии флуорофора $CdSe-2$, так как дополнительно отделяется сок фирмы «Малышам» (образец 2), а группы остальных соков имеют меньшее перекрытие друг с другом.

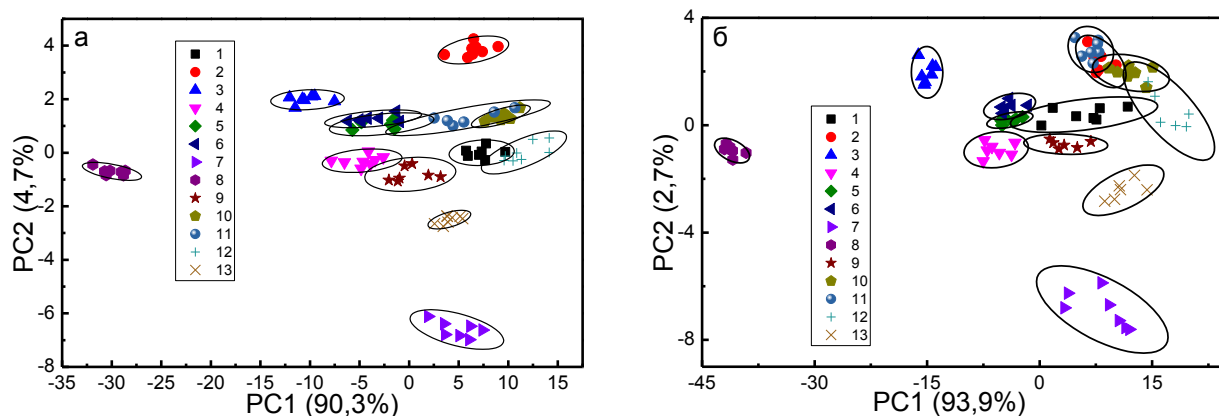


Рис. 37. Графики счетов для 13-ти сортов яблочного сока в присутствии флуорофоров а) $CdSe-2$ и б) $Ru(bpy)_3^{2+}$. Спектры флуоресценции получали в диапазоне 400-680 нм, применяли нормировку, доверительные эллипсы строили для 82% доверительной вероятности.

Образцы 7 и 8 – нектары – были исключены и изучена возможность дискриминации образцов сока по возрасту ребенка, с которого рекомендуется их употреблять (4 месяца и 3 года). На рисунке 38 представлены графики счетов 11-ти образцов сока в присутствии флуорофоров $CdSe-2$ и $Ru(bpy)_3^{2+}$. В этом случае разделения не удалось провести, что, возможно, говорит о произвольном характере назначения предельного возраста детей производителями соков.

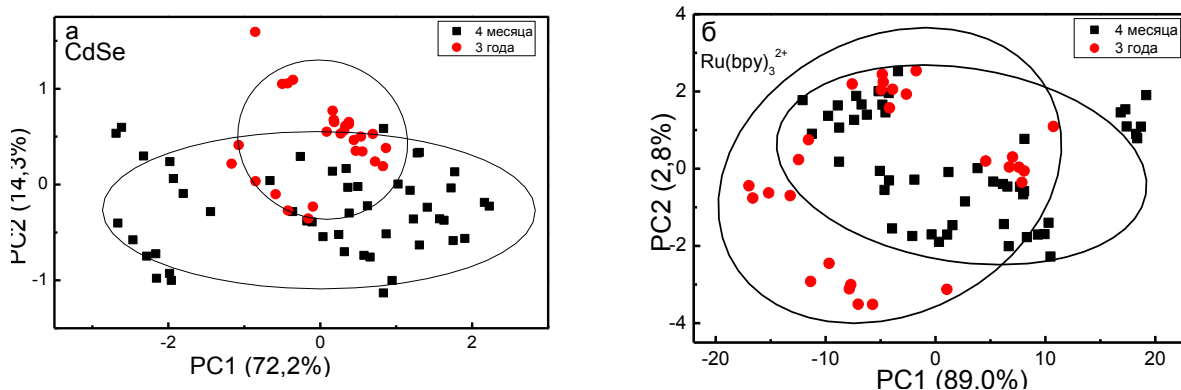


Рис. 38. Графики счетов 11-ти сортов яблочного сока в присутствии флуорофоров а) *CdSe-2* б) *Ru(bpy)₃²⁺*. Спектры флуоресценции получали в диапазоне 400-680 нм, применяли нормировку, доверительные эллипсы строили для 82% доверительной вероятности.

Соки различались содержанием сахара (от 11 до 12 г на 100 мл). Как видно из рисунка 39, в присутствии флуорофора *Ru(bpy)₃²⁺* удается дискриминировать сок, содержащий максимальное количество сахара на 100 г образца.

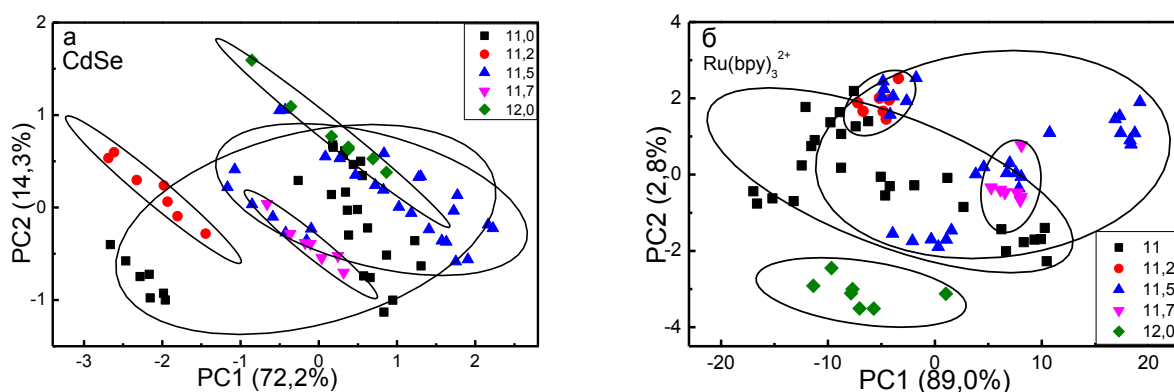


Рис. 39. Графики счетов 11-ти сортов яблочного сока в присутствии флуорофоров *CdSe-2* (а) и *Ru(bpy)₃²⁺* (б). Спектры флуоресценции получали в диапазоне 400-680 нм, применяли нормировку, доверительные эллипсы (82%) строили для различных содержаний сахара в 100 г образца (11–12%, как указано в легенде).

Квас

Для дискриминации сортов кваса использовали две смеси флуорофоров: первая смесь, хорошо себя зарекомендовавшая, состояла из осн. Шиффа, *Флуор/SiO₂* и *Под/SiO₂*, *CdSe-1*; вторая смесь состояла из *Tb³⁺-ПЭИ*, *ZnSe*, *CdSe-2*. Как указывалось ранее, используемые в работе флуорофоры индивидуально устойчивы, но при совместном присутствии изменение их спектров флуоресценции трудно предсказуемо. Поэтому найти устойчивую во времени смесь, а также с

минимальным взаимным тушением флуорофоров в растворе, достаточно непросто. Поэтому нами рассмотрены различные виды флуорофоров, наиболее устойчивой оказалась смесь комплекса тербия(3+) с карбоксиметилированным полиэтиленимином, квантовые точки ZnSe и CdSe-2. Данная смесь флуорофоров также изучена на возможность дискриминации модельных аналитов, что позволило получить сравнимые результаты и последующее применение данной смеси для дискриминации различных образцов кваса. В состав изученных смесей входят разные флуорофоры, что может привести к различным результатам дискриминации.

Нами выбраны случайным образом 8 видов магазинного кваса, купленные в супермаркете. По собственной флуоресценции образцы кваса неразличимы. При дискриминации в присутствии флуорофоров (рис. 39) видно, картина резко отличается для разных смесей флуорофоров. В присутствии смеси 4-х флуорофоров отделены группы сортов кваса №№ 6+8, 5+7, 3 и остальные, а в присутствии второй смеси флуорофоров четко выделены образцы №№ 2 и 6 (рис. 40).

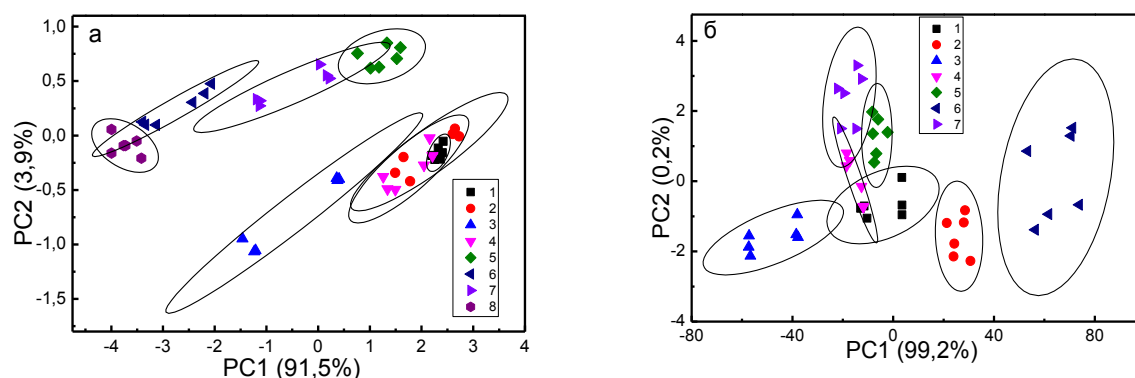


Рис. 40. Графики счетов сортов кваса для спектров флуоресценции смеси 4-х флуорофоров (осн. Шиффа, $Fluor/SiO_2$, Pod/SiO_2 , $CdSe-1$) (а) и смеси 3-х флуорофоров (Tb^{3+} -ПЭИ, $ZnSe$, $CdSe-2$) (б). Доверительные эллипсы построены для каждого сорта кваса.

Результаты работы с соками и квасами показывают, что меняя состав смеси флуорофоров можно изменять набор образцов, которые будут полностью дискриминированы. С другой стороны, эти результаты еще раз подтверждают, что для решения каждой конкретной задачи целесообразно заново подбирать состав флуорофоров или их смесей.

3.5. Заключение

В заключение сформулируем общие рекомендации по применению флуориметрического метода «отпечатков пальцев», подытожим его достоинства и недостатки.

Метод «флуоресцентный глаз», основанный на изменении интенсивности эмиссии флуорофоров в присутствии анализируемых объектов, прост и экспрессен в использовании. Особенностью метода является малый расход образца, а для растворимых в воде объектов – отсутствие пробоподготовки (объект анализируют целиком). Так как флуорофор добавляют извне, метод пригоден для анализа слабо флуоресцирующих, а также не поглощающих свет и электрохимически неактивных объектов. Переход от регистрации спектров флуоресценции к регистрации фотографий позволяет проводить анализ за несколько секунд. Преимуществом метода является простота хемометрической обработки данных, которая проводится с использованием стандартного программного обеспечения.

Основной проблемой метода является необходимость экспериментального подбора флуорофоров для решения конкретной задачи, что может занять существенное время.

Если появилась задача классификации образцов какого-либо объекта, то можно предложить следующие методические рекомендации по использованию предлагаемого метода.

1. Если объект обладает собственной флуоресценцией, то следует непосредственно использовать спектры его эмиссии в качестве аналитического сигнала. Если эмиссия достаточно интенсивна, то целесообразно использовать фотографический способ регистрации: качество дискриминации, скорее всего, будет не хуже, чем при использовании полных спектров эмиссии.

2. Если объект не флуоресцирует, обладает слабой флуоресценцией или дискриминацию по собственной флуоресценции не удастся провести, необходимы добавки флуорофоров. Предварительно стоит провести выбор наиболее подходящих флуорофоров для данного объекта из числа имеющихся в распоряжении аналитика. Целесообразно испытать флуорофоры разной природы, а также флуорофоры, активно связывающиеся с аналитами, например, за счет

комплексообразования или сорбции. Внимание целесообразно уделить комплексам переходных металлов, если они имеются, или получить таковые смешением растворов солей металла и лиганда. Второй механизм (сорбция) может быть реализован на наночастицах активного сорбента (например, на аэросиле), на котором предварительно сорбирован флуорофор. Если есть возможность, флуорофор закрепляют ковалентно (или ковалентно присоединяют к полимеру, который сорбируют на наночастицах).

3. При использовании добавок флуорофоров можно (за счет увеличения интенсивности сигнала) перейти от регистрации спектров эмиссии или трехмерных спектров к фотографической регистрации. Это сэкономит много времени и не потребует сложного оборудования (визуализатор можно собрать из коммерчески доступных компонентов: УФ- или светодиодных источников света и фотокамеры).

4. Следует уделить внимание выбору условий регистрации, таких как время выдержки, чтобы получать оптимальные цветовые интенсивности, и т. п.

5. Важным этапом является обработка фотографий: нормировка на контрольный образец или применение различных способов преобразования изображения, таких как контрастирование. Также иногда полезно использовать «виртуальное» смешивание флуорофоров или объединять данные, полученные разными методами «отпечатков пальцев», так как они могут нести различную информацию об анализируемых объектах.

Последним этапом является математическая обработка полученных данных. Здесь следует полагаться на стандартные методы хемометрики (*PCA*, *PLS*, *LDA*, нейронные сети и т. д.), встроенные во многие математические и статистические программные пакеты.

Выводы

1. Получены новые флуорофоры для использования в флуориметрическом методе отпечатков пальцев: основание Шиффа из полиэтиленimina и о-фталевого диальдегида, а также родамин В и флуоресцеин, иммобилизованные на кремнеземе, нековалентно модифицированном полиэтиленiminiном. Установлено, что флуорофоры, привитые на поверхность наночастиц, существенно изменяют интенсивность эмиссии в присутствии аналитов, чем нативные красители, что объяснено сорбцией аналитов на поверхности наночастиц. Обнаружено, что смешение флуорофоров приводит к взаимному тушению их эмиссии; предложен способ преодоления этого явления («виртуальное» смешивание флуорофоров).

2. Обнаружено, что органические соединения различной природы (модельные аналиты) в разной степени влияют на сигнал флуоресценции (в том числе с разным знаком), что и предопределяет возможность использования развиваемого метода. Изменения эмиссии смеси флуорофоров в присутствии аналитов могут быть неаддитивны в сравнении с изменением сигнала в присутствии отдельных флуорофоров. Показана возможность дискриминации 2- 3- и 4-компонентных смесей равных концентраций четырех модельных аналитов (амикацин, хлорамфеникол, сульфаметоксазол, пирацетам); для этих целей наиболее эффективна система из 4-х флуорофоров (основание Шиффа, родамин и флуоресцеин, иммобилизованные на кремнеземе, модифицированном полиэтиленiminiном, квантовые точки CdSe-1). Дискриминация этих аналитов с помощью УФ-спектров менее эффективна. Разделить искусственные смеси аналитов возможно не только в водных растворах, но и в плазме крови, хотя и менее эффективно.

3. Предложен способ регистрации аналитического сигнала путем получения цифровых фотографий (в частности, 96-луночных планшетов с образцами и флуорофорами). Установлено, что качество дискриминации образцов с помощью цифровых изображений в RGB-координатах не уступает таковому по спектрам эмиссии. Показано, что качество дискриминации образцов, как правило, можно повысить за счет контрастирования изображений, варьирование выдержки и

нормировки сигнала, однако для каждого сочетания флуорофор-объект ситуация индивидуальна.

4. Предложен способ оценки качества дискриминации образцов, полная дискриминация которых невозможна, путем подсчета числа пересечений доверительных эллипсов на графиках счетов метода главных компонент. Число пересечений коррелирует с параметром «общей чувствительности». Способ проиллюстрирован на примере образцов меда.

5. Выявлены флуорофоры для наилучшей классификации и предложены способы дискриминации реальных образцов. Сделано заключение о том, что комплексы переходных металлов относятся к наиболее эффективным флуорофорам. Показано, что для дискриминации образцов виски (16 образцов), в том числе по сортам, и образцов меда (36 образцов) достаточно использовать не смесь, а единственный флуорофор – трис-бипиридилат рутения(2+) (коммерчески доступен).

6. Сформулированы практические рекомендации по выполнению анализа объектов различных типов флуориметрическим методом «отпечатков пальцев», включающие выбор между традиционным методом и методом с добавками флуорофоров, выбор флуорофора, описание способа получения цифровых фотографий и обработки данных.

Список цитируемой литературы

1. Abdel-Ghany M.F., Hussein L.A., Ayad M.F., Youssef M.M. Investigation of different spectrophotometric and chemometric methods for determination of entacapone, levodopa and carbidopa in ternary mixture // *Spectrochim. Acta A*. 2017. V.171. P. 236–245.
2. Ntakatsane M.P., Liu X.M., Zhou P. Rapid detection of milk fat adulteration with vegetable oil by fluorescence spectroscopy // *J. Dairy Sci*. 2013. V.96. P.2130–2136.
3. Fang X., Zhang X., Feng C., Tang Y., Din Z. Synchronous fluorescence detection of oil and olive oil adulteration identification // *J. Chin. Cereals Oils Assoc*. 2015. V.9. http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-ZLYX201509024.htm.
4. Xie P., Chen S., Liang Y.-Z., Wang X., Tian R., Upton R. Chromatographic fingerprint analysis—a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine // *J. Chromatogr. A*. 2006. V.1112. P.171–180.
5. Zilberg R.A., Yarkaeva Yu.A., Maksyutova E.I., Sidel'nikov A.V., Maistrenko V.N. Voltammetric identification of insulin and its analogues using glassy carbon electrodes modified with polyarylenephthalides // *J. Analyt. Chem*. 2017. V.72. P.402–409.
6. Bajoub A., Medina-Rodríguez S., Gómez-Romero M., Ajal E.A., Bagur-González M.G., Fernández-Gutiérrez A., Carrasco-Pancorbo A. Assessing the varietal origin of extra-virgin olive oil using liquid chromatography fingerprints of phenolic compound, data fusion and chemometrics // *Food Chem*. 2017. V.215. P.245–255.
7. Novakowski W., Bertotti M., Paixão T.R.L.C. Use of copper and gold electrodes as sensitive elements for fabrication of an electronic tongue: Discrimination of wines and whiskies // *Microchem. J*. 2011. V.99. P.145–151.
8. Andrade J.M., Kubista M., Carlosena A., Prada D. 3-Way characterization of soils by Procrustes rotation, matrix-augmented principal components analysis and parallel factor analysis // *Anal. Chim. Acta*. 2007. V.603. P.20–29.
9. Brunelle E., Huynh C., Le A.M., Halámková L., Agudelo J., Halánek J. New horizons for ninhydrin: colorimetric determination of gender from fingerprints // *Anal. Chem*. 2016. V.88. P.2413–2420.

-
10. Madhuri S., Vengadesan N., Aruna P., Koteeswaran D., Venkatesan P., Ganesan S. Native fluorescence spectroscopy of blood plasma in the characterization of oral malignancy // *Photochem. Photobiol.* 2003. V.78. P.197–204.
 11. Tahara Y., Toko K. Electronic Tongues – A Review // *IEEE Sens. J.* 2013. V.13. P.3001–3011.
 12. Sergiel I., Pohl P., Biesaga M., Mironczyk A. Suitability of three-dimensional synchronous fluorescence spectroscopy for fingerprint analysis of honey samples with reference to their phenolic profiles // *Food Chem.* 2014. V.145. P.319–326.
 13. Sádecká J., Tóthová J. Fluorescence spectroscopy and chemometrics in the food classification – a review // *Czech J. Food Sci.* 2007. V.25. P.159–173.
 14. Karoui R., Blecker C. Fluorescence Spectroscopy Measurement for Quality Assessment of Food Systems—a Review. *Food Bioprocess // Technol.* 2011. V.4. P.364–386.
 15. You C.-C., Miranda O.R., Gider B., Ghosh P.S., Kim I.-B., Erdogan B. et al. Detection and identification of proteins using nanoparticle–fluorescent polymer ‘chemical nose’ sensors // *Nature Nanotechnol.* 2007. V.2. P.318–323.
 16. Xue S.F., Chen Z.H., Han X.Y., Lin Z.Y., Wang Q.X., Zhang M. et al. DNA Encountering Terbium (III): A Smart “Chemical Nose/Tongue” for Large-Scale Time-Gated Luminescent and Lifetime-Based Sensing // *Anal. Chem.* 2018. V.90. P.3443–3451.
 17. Askim J.R., Mahmoudi M., Suslick K.S. Optical sensor arrays for chemical sensing: the optoelectronic nose // *Chem. Soc. Rev.* 2018. V.42. P.8649–8682.
 18. Han J., Bender M., Seehafer K., Bunz U.H.F. Identification of white wines by using two oppositely charged poly(p-phenyleneethynylene)s individually and in complex. *Angew // Chem. Int.* 2016. V.55. P.7689–7692.
 19. Han J., Wang B., Bender M., Seehafer K., Bunz U.H.F. Poly(p-phenyleneethynylene)-based tongues discriminate fruit juices // *Analyst.* 2017. V.142. P.537–543.
 20. Insausti M., Gomes A.A., Camina J.M., Araujo M.C., Band B.S. Fluorescent fingerprints of edible oils and biodiesel by means total synchronous fluorescence and Tucker3 modelling // *Spectrochim. Acta A.* 2017. V.175. P.185–190.

-
21. Trivittayasil V., Tsuta M., Kasai S., Matsuo Y., Sekiyama Ya., Shoji T., Aiyama R., Kokawa M., Sugiyama J. Classification of 1-methylcyclopropene treated apples by fluorescence fingerprint using partial least squares discriminant analysis with stepwise selectivity ratio variable selection method // *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2018. V.175. P.30–36.
22. Aiyama R., Trivittayasil V., Tsuta M. Discrimination of aflatoxin contamination level in nutmeg by fluorescence fingerprint measurement. // *Food Control.* 2018. V.85. P.113–118.
23. Dankowska A., Małacka M., Kowalewski W. Detection of plant oil addition to cheese by synchronous fluorescence spectroscopy // *Dairy Sci Technol.* 2015. V.95. P.413–424.
24. Ntakatsane M., Liu X., Zhou P. Short communication: Rapid detection of milk fat adulteration with vegetable oil by fluorescence spectroscopy // *J. Dairy Sci.* 2013. V.96. P.2130–2136.
25. Jiao L., Deng Q., Wang Y., Li H. Determination of enantiomeric composition of tryptophan by fluorescence spectroscopy combined with principal component regression // *Anal. Lett.* 2013. V.46. P.831–843.
26. Han J., Wang B., Bender M., Kushida S., Seehafer K., Bunz U.H.F. Poly(aryleneethynylene) tongue identifies nonsteroidal anti-inflammatory drugs in water: a test case for combating counterfeit drugs // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2017. V.9. P.790–797.
27. Han J., Cheng H., Wang B., Braun M. S., Fan X., Bender M., Huang W., Domhan C., Mier W., Lindner T., Seehafer K., Wink M., Bunz Uwe H. F. A Polymer/peptide complex-based sensor array that discriminates bacteria in urine // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2017. V.56. P.15246–15251.
28. Wang B., Han J., Bojanowski N. M., Bender M., Ma C., Seehafer K., Herrmann A., Bunz Uwe H. F. An optimized sensor array identifies all natural amino acids // *ACS Sensors.* 2018. V.3. N.8. P.1562–1568.
29. Miranda O. R., You C.-C., Phillips R., Kim Ik-Bum, Ghosh P. S., Bunz Uwe H. F., Rotello V. M. Array-based sensing of proteins using conjugated polymers // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V.129. P.9856–9857.

-
30. Wu D., Schanze K. S. Protein induced aggregation of conjugated polyelectrolytes probed with fluorescence correlation spectroscopy: application to protein identification // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2014. V.6. P.7643–7651.
31. Wu Y., Tan Y., Wu J., Chen S., Chen Y. Z., Zhou X., Jiang Y., Tan C. Fluorescence array-based sensing of metal ions using conjugated polyelectrolytes // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2015. V.7. N.12. P.6882-6888.
32. Han J., Ma C., Wang B., Bender M., Bojanowski M., Hergert M., Seehafer K., Herrmann A., Bunz U.H.F. A hypothesis-free sensor array discriminates whiskies for brand, age, and taste // *Chem*. 2017. V.2. P.2817–2824.
33. Sun S., Jiang K., Qian S., Wang Y., Lin H. Applying carbon dots-metal ions ensembles as a multichannel fluorescent sensor array: detection and discrimination of phosphate anions // *Anal. Chem*. 2017. V.89. P.5542–5548.
34. Kong H., Lu Y., Wang H., Wen F., Zhang S., Zhang X. Protein discrimination using fluorescent gold nanoparticles on plasmonic substrates // *Anal. Chem*. 2012. V.84. P.4258–4261.
35. Cao Y., Zhang L., Huang X., Xin Y., Ding L. Discrimination of Metalloproteins by a Mini Sensor Array Based on Bispyrene Fluorophore/Surfactant Aggregate Ensembles // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2016. V.8. N.51. P.35650-35659.
36. Kostereli Z., Scopelliti R., Severin K. Pattern-based sensing of aminoglycosides with fluorescent amphiphiles // *Chem. Sci*. 2014. V.5. P.2456–2460.
37. Cao Y., Ding L., Hu W., Peng J., Fang Y. A surfactant-modulated fluorescent sensor with pattern recognition capability: sensing and discriminating multiple heavy metal ions in aqueous solution // *J. Mater. Chem. A*. 2014. V.00. P.1-8.
38. Melnikov A.G., Melnikov G.V., Varezchnikov A.S., Efremova V.V., Kuenbaeva V.R., Dykin V.S., Sysoev V.V. The fluorescent multi-sensor array to selectively detect a presence of various heavy metals in aqua solutions. International Conference on Actual Problems of Electron Devices Engineering (APEDE), Saratov, 2016, pp. 1-3, doi: 10.1109/APEDE.2016.7879034.
39. Tian R.T., Xie P.S., Liu H.P. Evaluation of traditional Chinese herbal medicine: Chaihu (*Bupleuri Radix*) by both high-performance liquid chromatographic

and high-performance thin-layer chromatographic fingerprint and chemometric analysis // *J. Chromatogr.* 2009. V.1216. P.2150–2155.

40. Chen S.B., Liu H.P., Tian R.T., Yang D.J., Chen S.L., Xu H.X., Chan A.S.C., Xie P.S. High-performance thin-layer chromatographic fingerprints of flavonoids for distinguishing between *Radix Puerariae Lobate* and *Radix Puerariae Thomsonii* // *J. Chromatogr. A.* 2006. V.1121. P.114–119.

41. Cui S., Fu B., Lee F.S.C., Wang X. Application of microemulsion thin layer chromatography for the fingerprinting of licorice (*Glycyrrhiza* spp.) // *J. Chromatogr. B.* 2005. V.828. P.33–40.

42. Cieřła L., Staszek D., Hajnos M., Kowalska T., Waksmundzka-Hajnos M. Development of Chromatographic and Free Radical Scavenging Activity Fingerprints by Thin-layer Chromatography for Selected *Salvia* Species // *Phytochem. Anal.* 2011. V.22. P.59–65.

43. Ristivojević P.M., Morlock G.E. Effect-directed classification of biological, biochemical and chemical profiles of 50 German beers // *Food Chem.* 2018. V.260. P.344-353.

44. Gu M., Su Z., Ouyang F. Fingerprinting of *Salvia miltiorrhiza* Bunge by Thin-Layer Chromatography Scan Compared with High Speed Countercurrent Chromatography. // *J. Liq. Chromat. Rel. Technol.* 2006. V.29. P.1503–1514.

45. Volckaert G., Fiers W. Micro Thin-Layer Techniques for Rapid Sequence Analysis of ³²P-Labeled RNA: Double Digestion and Pancreatic Ribonuclease Analyses. // *Analyt. Biochem.* 1977. V.83. P.228-239.

46. Bielecki R. L., Turner N. A. Separation and Estimation of Amino Acids in Crude Plant Extracts by Thin-Layer Electrophoresis and Chromatography // *Anal. Biochem.* 1966. V.17. P.278-293.

47. Di X., Chan K.K.C., Leung H.W., Huie C.W. Fingerprint profiling of acid hydrolyzates of polysaccharides extracted from the fruiting bodies and spores of *Lingzhi* by high-performance thin-layer chromatography // *J. Chromatogr.* 2003. V.1018. P.85–95.

48. Ristivojevic P., Trifkovic J., Vovk I., Milojkovic-Opsenica D. Comparative study of different approaches for multivariate image analysis in HPTLC fingerprinting of natural products such as plant resin // *Talanta*. 2017. V.162. P.72–79.

49. Esteki M., Farajmand B., Amanifar S., Barkhordari R., Ahadiyan Z., Dashtaki E., Mohammadlou M., Heyden Y.V. Classification and authentication of Iranian walnuts according to their geographical origin based on gas chromatographic fatty acid fingerprint analysis using pattern recognition methods // *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2017. V.171. P.251–258.

50. Oshima R., Kotani A., Kuroda M., Yamamoto K., MimakiYo., Hakamata H. Discrimination of schisandrae chinensis fructus and schisandrae sphenantherae fructus based on fingerprint profiles of hydrophilic components by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection // *J. Nat. Med.* 2017. V.72. P.399–408.

51. Inglot T, Gumieniczek A., Komsta K., Kasin A. LC and Principal Component Analysis in the lipophilicity study of seven angiotensin II-AT1 Receptor antagonists (sartans) // *Chromatographia*. 2008. V. 68. N.11/12. P.35-48.

52. Statheropoulos M., Smaragdis S., Tzamtzisa N., Georgakopoulosb C. Principal component analysis for resolving coeluting substances in gas chromatography-mass spectrometry doping control analysis // *Anal. Chim. Acta*. 1996. V. 331. P.53-61.

53. Cserhati T, Forgacs E., Morais H., Mota T. Classification of chili powders by thin-layer chromatography and principal component analysis // *J. Biochem. Biophys. Meth.* 2000. V.50. P.221–229.

54. Pardo-Mates N., Vera A., Barbosa S., Hidalgo-Serrano M., Núñez O., Saurina J., Hernández-Cassou S., Puignoua L. Characterization, classification and authentication of fruit-based extracts by means of HPLC-UV chromatographic fingerprints, polyphenolic profiles and chemometric methods // *Food Chem.* 2017. V.221. P.29-38.

55. Winquist F., Wide P., Lundström I. An electronic tongue based on voltammetry, // *Anal. Chim. Acta*. 1997. V.357. N.1–2. P.21–31.

56. Winquist F. Voltammetric electronic tongues — Basic principles and applications // *Microchim. Acta*. 2008. V.163. N.1–2. P.3–10.

57. Winquist F., Lundström I., Wide P. The combination of an electronic tongue and an electronic nose // *Sens. Actuators B*. 1999. V.58. №.1–3, P.512–517.

-
58. Winqvist F., Krantz-Rülcker C., Lundström I. Electronic tongues and combinations of artificial senses // *Sensors Update*. 2002. V.11. №.1. P.279–306.
59. Winqvist F., Holmin S., Krantz-Rülcker C., Wide P., Lundström I. A hybrid electronic tongue // *Anal. Chim. Acta*. 2000. V.406. №.2. P.147–157.
60. Legin A., Rudnitskaya A., Vlasov Y. Integrated analytical systems. In book: *Comprehensive analytical chemistry*. Elsevier. 2003. V.5. P.437-445.
61. Forster R., Diamond D. Nonlinear calibration of ion-selective electrode arrays for flow injection analysis // *Anal. Chem*. 1992. V.64. P.1721—1728.
62. Dias L., Peres M., Veloso A., Reis A., Vilas-Boas M. An electronic tongue taste evaluation: Identification of goat milk adulteration with bovine milk // *Sens. Actuators*. 2009. V.136. P.209–217.
63. Novakowskia W., Bertottib M., Thiago R. Use of copper and gold electrodes as sensitive elements for fabrication of an electronic tongue: discrimination of wines and whiskies // *Microchem. J*. 2011. V.99. P.145–151.
64. Lavigne J., Savoy S., Clevenger M., Ritchie J., McDonielB., Yoo S., Anslyn E., McDevitt J., Shear J., Neikirk D. Solution-based analysis of multiple analytes by a sensor array: toward the development of an 'electronic tongue' // *J. Amer. Chem. Soc*. 1998. V.120. №25. P.6429—6430.
65. Поваров Г., Лопатников А. Простой мультисенсорный детектор на основе диоксида олова в капиллярной газовой хроматографии // *Журн. аналит. химии*. 2016. Т.71. №9. С.1–6.
66. Riul A., Malmegrim R., Fonseca F., Mattoso L. An artificial taste sensor based on conducting polymers // *Biosens. Bioelectron*. 2003. V.18. P.1365—1370.
67. Tsopelas F., Konstantopoulos D., Kakoulidou A.T. Voltammetric fingerprinting of oils and its combination with chemometrics for the detection of extra virgin olive oil adulteration. // *Anal. Chim. Acta*. 2018. V.1015. P.1 – 12.
68. Blanco-Rodriguez A., Camara V.F., Campo F., Becheran L., Duran A., Vieira V.D., Melo H., Garcia-Ramirez A.F. Development of an electronic nose to characterize odours emitted from different stages in a wastewater treatment plant // *Water Res*. 2018. V.134. P.92–100.

-
69. Gad H.A., Bouzabata A. Application of chemometrics in quality control of Turmeric (*Curcuma longa*) based on Ultra-violet, Fourier transform-infrared and ¹H NMR spectroscopy // Food Chem. 2017. V.237. P.857–864.
70. Pilatti F.K., Ramlov F., Schmidt E.C., Costa C., Oliveira E.R., Bauer C.M., Rocha M., Bouzon Z.L., Maraschin M. Metabolomics of *Ulva lactuca* Linnaeus (Chlorophyta) exposed to oil fuels: Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis as tools for metabolic fingerprint // Marine Pollut. Bull. 2017. V.114. P.831–836.
71. Eid S.M., Soliman S.S., Elghobashy M.R., Abdalla O.M. ATR-FTIR coupled with chemometrics for quantification of vildagliptin and metformin in pharmaceutical combinations having diverged concentration ranges // Vib. Spectrosc. 2020. V.106. P.102995.
72. Jamwal R., Amit, Kumari S., Balan B., Dhaulaniya A.S., Kelly S., Cannavan A., Singh D.K. Attenuated total Reflectance–Fourier transform infrared (ATR–FTIR) spectroscopy coupled with chemometrics for rapid detection of argemone oil adulteration in mustard oil // LWT. 2020. V.120. 108945.
73. Karunathilaka S.R., Choi S.H., Mossoba M.M., Yakes B.J., Brückner L., Ellsworth Z., Srigley C.T. Rapid classification and quantification of marine oil omega-3 supplements using ATR-FTIR, FT-NIR and chemometrics // J. Food. Compost. Anal. 2019. V.77. P.9-19.
74. Kepenek E.S., Severcan M., Gozen A.G., Severcan F. Discrimination of heavy metal acclimated environmental strains by chemometric analysis of FTIR spectra // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2020. V.202. 110953.
75. Lu Yi., Memon A., Fuerst P., Kizonas A., Morris C., Luthria D. Changes in the phenolic acids composition during pancake preparation: Whole and refined grain flour and processed food classification by UV and NIR spectral fingerprinting method – Proof of concept // J. Food Comp. Anal. 2017. V.60. P.10–16.
76. Sen Ya., Tao L., Hong-Gao L., Jie-Qing L., Yuan-Zhong W. Geographic characterization of *leccinumrugosiceps* by ultraviolet and infrared spectral fusion // Anal. Lett. 2017. V.50. №14. P.2257–2269.

-
77. Aboulwafa M.M., Youssefa F.S., Gad H.A., Sarker S.D., Nahar L., Al-Azizia M.M., Ashourac M.L. Authentication and discrimination of green tea samples using UV–vis, FTIR and HPLC techniques coupled with chemometrics analysis // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2019. V.164. P.653-658.
78. Uncu O., Ozen B. A comparative study of mid-infrared, UV–Visible and fluorescence spectroscopy in combination with chemometrics for the detection of adulteration of fresh olive oils with old olive oils // *Food Control.* 2019. V.105. P.209-218.
79. Govindaraj N., Gangadoo S., Truong V.T., Chapman J., Gill H., Cozzolino D. The use of derivatives and chemometrics to interrogate the UV–Visible spectra of gin samples to monitor changes related to storage // *Spectrochim. Acta A.* 2020. V.227. 117548.
80. Joshi I., Truong V.K., Elbourne A., Chapman J., Cozzolino D. Influence of the Scanning Temperature on the Classification of Whisky Samples Analysed by UV-VIS Spectroscopy // *Appl. Sci.* 2019. V.9. 3254.
81. Esbensen K.H., *multivariate analysis - in practice*, 5th ed., CAMO Process AS, Norway – Alborg University, Esbjerg, 2001.
82. Otto M., *Chemometrics: Statistics and Computer Application in analytical chemistry*, 3d ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2016.
83. Granato D., Santos Ja.S., Escher G.B., Ferreira B.L., Maggio R.M. Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective // *Tr. Food Sci. Tech.* 2018. V.72. P.83–90.
84. Abdi H., Williams L.J. *Principal component analysis.* Wiley Interdiscip. Rev // *Comput. Stat.* 2010. V.2. P.433–459.
85. Родионова О.Е. *Хемометрика в аналитической химии* //Институт химической физики РАН. 2006. 61с.
86. Легин А., Рудницкая А., Селезнев Б., Власов Ю. Неспецифичные датчики («электронные языки») для химического анализа жидкостей // *Сенсор.* 2002. Т.1. С. 8—15.

-
87. Geladi P. Chemometrics in spectroscopy. Part 1. Classical chemometrics // *Spectrochim. Acta B*. 2003. V.58. P.767-782.
88. Palacios M.A., Wang Z., Montes V.A., Zyryanov G.V., Anzenbacher P.J. Rational design of a minimal size sensor array for metal ion detection // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V.130. P.10307–10314.
89. Lee J-S., Lee J.W., Chang Y-T. Counterion free colorimetric metal cation sensor array // *J. Comb. Chem.* 2007. V.9. P.926–928.
90. Lee J.W., Lee J-S., Kang M., Su A.I., Chang Y-T. Visual artificial tongue for quantitative metal cation analysis by an off-the-shelf dye array // *Chem. Eur. J.* 2006. V.12. P.5691–5696.
91. Palacios M.A., Nishiyabu R., Marquez M., Anzenbacher P.Jr. Supramolecular chemistry approach to the design of a high-resolution sensor array for multianion detection in water // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V.129. P.7538–7544.
92. Folmer-Andersen J.F., Kitamura M., Anslyn E.V. Pattern-based discrimination of enantiomeric and structurally similar amino acids: an optical mimic of the mammalian taste response // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. V.128. P.5652–5653.
93. Tan J., Wang H., Yan X. Discrimination of saccharides with a fluorescent molecular imprinting sensor array based on phenylboronic acid functionalized mesoporous silica // *Anal. Chem.* 2009. V.81. P.5273–5280.
94. Schiller A., Vilozny B., Wessling R.A., Singaram B. Recognition of phospho sugars and nucleotides with an array of boronic acid appended bipyridinium salts // *Anal. Chim. Acta*. 2008. V.627. P.203–211.
95. Ponnu A., Edwards N.Y., Anslyn E.V. Pattern recognition based identification of nitrated explosives // *New J. Chem.* 2008. V.32. P.848–855.
96. Musto C.J., Lim S.H., Suslick K.S. Colorimetric detection and identification of natural and artificial sweeteners // *Anal. Chem.* 2009. V.81. P.6526–6533.
97. Zhang C., Bailey D.P., Suslick K.S. Colorimetric sensor arrays for the analysis of beers: a feasibility study // *J. Agric. Food. Chem.* 2006. V.54 P.4925–4931.
98. Zhang C., Suslick K.S. Colorimetric sensor array for soft drink analysis // *J. Agric. Food. Chem.* 2007. V.55. P.237–242.

-
99. Schiller A., Wessling R.A., Singarum B. A fluorescent sensor array for saccharides based on boronic acid appended bipyridinium salts // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007. V.46. P.6457–6459.
100. Hughes A.D., Glenn I.C., Patrick A.D., Ellington A., et al. A pattern recognition based fluorescence quenching assay for the detection and identification of nitrated explosive analytes // *Chem. Eur. J.* 2008. V.14. P.1822–1827.
101. Germain M.E., Knapp M. Discrimination of nitroaromatics and explosives mimics by a fluorescent Zn (salicylaldimine) sensor array // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V.130. P.5422–5423.
102. Jurs P.C., Bakken G.A., McClelland H.E. Computational Methods for the Analysis of Chemical Sensor Array Data from Volatile Analytes // *Chem. Rev.* 2000. V.100. P.2649-2678.
103. Winters-Hilt S., Yelundur A., McChesney C., Landry M. Cheminformatics methods for novel nanopore analysis of HIV DNA termini // *BMC Bioinformatics.* 2006. V.7.S.22.
104. Pei R., Shen A., Olah M.J., Stefanovic D., Worgall T., Stojanovic M.N. High-resolution cross-reactive array for alkaloids // *Chem. Commun.* 2009. V.22. P.3193–3195.
105. Mayr T., Igel C., Liebsch G., Klimant I., Wolfbeis O.S. Cross-Reactive Metal Ion Sensor Array in a Micro Titer Plate Format // *Anal. Chem.* 2003. V.75. P.4389–4396.
106. Aernecke M.J., Guo J., Sonkusale S., Walt D.R. Design, Implementation, and Field Testing of a Portable Fluorescence-Based Vapor Sensor // *Anal. Chem.* 2009. V.81. P.5281–5290.
107. Sharma R., Rajput Y. S., Poonam, Dogra G., Tomar S. K. Estimation of sugars in milk by HPLC and its application in detection of adulteration of milk with soymilk // *Int. J. Dairy Technology.* 2009. V.62. P.514-519.
108. Russo R., Severino V., Mendez A., Lliberia J., Parente A., Chambery A. Detection of buffalo mozzarella adulteration by an ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry methodology // *J. Mass Spectrom.* 2012. V.47. P.1407-1414.

-
109. Cordewener J. H., Luykx D. M., Frankhuizen R., Bremer M. G., Hooijerink H., America, A. H. Untargeted LC-Q-TOF mass spectrometry method for the detection of adulterations in skimmed-milk powder // *J. Sep. Sci.* 2009. V.32. P.1216-1223.
110. Jablonski J. E., Moore J. C., Harnly J. M. Nontargeted detection of adulteration of skim milk powder with foreign proteins using UHPLC-UV // *J. Agric. Food. Chem.* 2014. V.62. P.5198-5206.
111. Motta T. M. C., Hoff R. B., Barreto F., Andrade R. B. S., Lorenzini D. M., Meneghini L. Z., et al. Detection and confirmation of milk adulteration with cheese whey using proteomic-like sample preparation and liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry analysis // *Talanta.* 2014. V.120. P.498-505.
112. Collomb M., Bisig W., Bütikofer U., Sieber R., Bregy M., Etter L. Fatty acid composition of mountain milk from Switzerland: comparison of organic and integrated farming systems // *Int. Dairy. J.* 2008. V.18. P.976-982.
113. Schröder M., Lutz N. L., Tangwan E. C., Hajazimi E. H., Vetter W. Phytanic acid concentrations and diastereomer ratios in milk fat during changes in the cow's feed from concentrate to hay and back // *Eur. Food. Res. Technol.* 2014. V.234. P.955-962.
114. Capuano M., Boerrigter-Eenling R., Elgersma A., van Ruth S. M. Effect of fresh grass feeding, pasture grazing and organic/biodynamic farming on bovine milk triglyceride profile and implications for authentication // *Eur. Food. Res. Technol.* 2014. V.238. P.573-580.
115. Sforza S., Cavatorta V., Galaverna G., Dossena A., Marchelli R. Accumulation of non-proteolytic aminoacyl derivatives in Parmigiano-Reggiano cheese during ripening // *Int. Dairy J.* 2014. V.19. P.582-587.
116. Masotti F., Hogenboom J. A., Rosi V., De Noni I., Pellegrino L. Proteolysis indices related to cheese ripening and typicalness in PDO Grana Padano cheese // *Int. Dairy. J.* 2014. V.20. P.352-359.
117. Rodrigues N. P. A., Givisiez P. E. N., Queiroga R. C. R. E., Azevedo P. S., Gebreyes W. A., Oliveira C. J. B. Milk adulteration: detection of bovine milk in bulk goat milk produced by smallholders in northeastern Brazil by a duplex PCR assay // *J. Dairy Sci.* 2012. V.95. P.2749-2752.

118. Liu Z., Metzger L. E. Application of fluorescence spectroscopy for monitoring changes in nonfat dry milk during storage // *J. Dairy. Sci.* 2007. V.90. P.24-37.

119. Karoui R., De Baerdemaeker J., Dufour E. A comparison and joint use of mid infrared and fluorescence spectroscopic methods for differentiating between manufacturing processes and sampling zones of ripened soft cheeses // *Eur. Food. Res. Technol.* 2008. V.226. P.861-870.

120. Othman S. H., Abbas K. A., Lebecque A., Bayoumi R., Ibrahim G. A., Degheidi M. A. Evaluation of the structural changes of cantal cheese throughout ripening by synchronous fluorescence spectroscopy and rheology methods // *Res. J. Appl. Sci.* 2011. V.7. P.1992-2000.

121. Basri K.N., Hussain M.N., Bakar J., Sharif Z., Khir M.F.A., Zoolfakar A.S. Classification and quantification of palm oil adulteration via portable NIR spectroscopy // *Spectrochim. Acta. A.* 2017. V.173. P.335–342.

122. Saputra I., Jaswir I., Akmeliawati R. Identification of pig adulterant in mixture of fat samples and selected foods based on FTIR-PCA wavelength biomarker profile // *Int. J. Adv. Sci. Eng. Inf. Technol.* 2018. V.8. P.2341–2348.

123. Tortora L., Stefanelli M., Mastroianni M., Lvova L., Di Natale C., D'Amico A., Filippini D., Lundstorm I., Paolesse R. The hyphenated CSPT-potentiometric analytical system: An application for vegetable oil quality control // *Sens. Actuators B.* 2009. V.142. P.457-463.

124. Novakowski W., Bertotti M., Paixao T.R.L.C. Use of copper and gold electrodes as sensitive elements for fabrication of an electronic tongue: Discrimination of wines and whiskies // *Microchem. J.* 2011. V.99. P.145-151.

125. Shu C., Huang B., Chen X., Wang Y., Li X., Ding L., Zhong W. Facile synthesis and characterization of water soluble ZnSe/ZnS quantum dots for cellular imaging // *Spectrochim. Acta. A.* 2013. V.104. P.143-149.

126. Jolliffe I. *Principal Component Analysis*. 2nd ed. Springer. 2002.

127. Dixon S.J., Brereton R.G. Comparison of performance of five common classifiers represented as boundary methods: euclidean distance to centroids, linear discriminant analysis, quadratic discriminant analysis, learning vector quantization and

support vector machines, as dependent on data structure // *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2009. V.95. P.1-17.

128. Amari S., Wu S. Improving support vector machine classifiers by modifying kernel functions. // *Neural Networks.* 1999. V.12. P.783-789.

129. Померанцев А.Л. Хемометрика в Excel: учебное пособие / Томск: ТПУ. 2014. 435 с.

130. Møller J.K.S., Catharino R.R., Eberlin M.N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of whisky: immediate proof of origin and authenticity // *Analyst.* 2005. V.130. P.890–897.

131. Teodoro J.A.R., Pereira H.V., Sena M.M., Piccin E., Zacca J.J., Augusti R. Paper spray mass spectrometry and chemometric tools for a fast and reliable identification of counterfeit blended Scottish whiskies // *Food Chem.* 2017. V.237. P.1058–1064.

132. Tosato F., Correia R.M., Oliveira B.G., Fontes A.M., França H.S., Coltro W.K.T., et al. Paper spray ionization mass spectrometry allied to chemometric tools for quantification of whisky adulteration with additions of sugarcane spirit // *Anal. Methods.* 2018. V.10. P.1952–1960.

133. Wiśniewska P., Boqué R., Borràs E., Busto O., Wardencki W., Namieśnik J., et al. Authentication of whisky due to its botanical origin and way of production by instrumental analysis and multivariate classification methods // *Spectrochim. Acta. A.* 2017. V.173. P.849–853.