

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Рукусуева Елизавета Алексеевна

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

02.00.02 – Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва - 2021

Работа выполнена на кафедре аналитической химии Химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Научный руководитель:

Беклемишев Михаил Константинович, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник кафедры аналитической химии Химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Официальные оппоненты:

Дворкин Владимир Ильич, доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ордена Трудового Красного Знамени Института нефтехимического синтеза им. А.В.Топчиева Российской академии наук, г. Москва,

Бурмистрова Наталия Анатольевна, доктор химических наук, доцент, профессор Института химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», г. Саратов,

Богомолов Андрей Юрьевич, кандидат химических наук, старший научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения высшего профессионального образования "Самарский государственный технический университет", г. Самара

Защита диссертации состоится «03» марта 2021 года в 15 часов на заседании диссертационного совета МГУ.02.05 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские Горы, д.1, стр. 3, МГУ имени М.В.Ломоносова, Химический факультет, аудитория 466.

E-mail: dissovet02.00.02@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский просп., д.27). Со сведениями о регистрации участия в защите в удаленном интерактивном режиме и с диссертацией в электронном виде также можно ознакомиться на сайте АИС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/343181891/>.

Автореферат разослан «29» января 2021 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук



Ананьева И.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. 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

хеометрической 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 полиэтиленимином. 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 полиэтиленимина и о-фталевого диальдегида, родамин В и флуоресцеин, иммобилизованные на наночастицах кремнезема, нековалентно модифицированном полиэтиленимином) 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационной работы, сформулированы цель и поставленные задачи исследования, раскрыта

научная новизна работы и показана ее практическая значимость, публикации по теме исследования, степень ее апробации, структура и объем.

В первой главе обсуждены методы «отпечатков пальцев» в химическом анализе, основанные на получении аналитических сигналов с помощью электрохимических и хроматографических методов, УФ и ИК-спектроскопии, а также методов, основанных на флуоресценции, в том числе и с добавками флуорофоров. Описана их роль и развитие в классификации и идентификации различных объектов, в основном продуктов питания. Кроме того, внимание уделено математической обработке сигналов в методах «отпечатков пальцев», рассмотрены основные методы хемометрики: метод главных компонент, опорных векторов, дискриминантный анализ.

Во второй главе перечислены реагенты, аппаратура, использованные в работе, а также описаны методики экспериментов по получению новых флуорофоров, процедуры анализа таких объектов как плазма крови, виски, мед, сок и др. Описаны методы обработки данных. Использовано следующее аналитическое оборудование: спектрофлуориметры Cary Eclipse (Agilent, США) и «Флюорат-02 Панорама» (Люмэкс, Россия); спектрофотометр СФ-102 (Аквилон СЗ, Россия); визуализатор TLC Visualizer 2 (Camag, Швейцария).

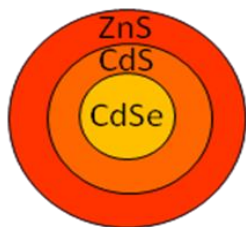
В третьей главе обобщены и оценены основные результаты проведенных исследований.

Методы «отпечатков пальцев» решают задачи дискриминации (различения) образцов. В качестве образцов использовали искусственные смеси модельных аналитов (на начальном этапе работы) или (на следующих этапах) напитки, продукты одного и того же типа, но различного происхождения, сорта и т. п. Для анализируемых образцов получали спектры флуоресценции или цифровые фотографии флуоресцирующих растворов, которые затем обрабатывали методом главных компонент. При такой обработке каждому спектру флуоресценции (или фотографии лунки планшета) соответствует точка на графике счетов; одному образцу отвечает группа точек, соответствующих параллельным измерениям этого образца. Основные усилия в работе были направлены на достижение наилучшей дискриминации образцов. Под качеством (или эффективностью) дискриминации мы понимаем степень разграничения на графиках счетов групп точек, отвечающих разным образцам. Такие группы точек считали дискриминированными, если их доверительные эллипсы, построенные при доверительной вероятности 82%, не пересекались (в таком случае группы точек были визуально разделены). Количественно степень дискриминации характеризовали расстоянием Махаланобиса D_M ; соприкосновению доверительных эллипсов соответствовало расстояние Махаланобиса между группами точек, равное 4. Соответственно, критерием дискриминации было

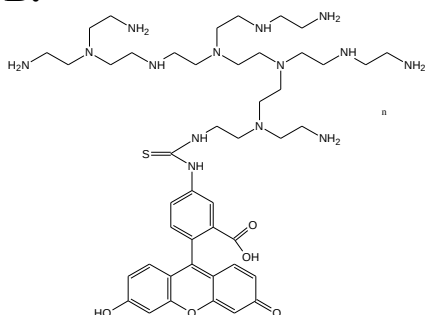
$D_M > 4$. Подсчет числа групп точек, визуально отделенных друг от друга на графике счетов, является простейшим способом оценки качества дискриминации (далее называется «число дискриминированных групп»).

Флуорофоры. В качестве флуорофоров применяли различные квантовые точки (КТ) (ZnS, PbS, Ag₂S, ZnSe, CdSe). Чаще всего использовали КТ CdSe/CdS/ZnS, полученные из двух источников: CdSe-1 (ООО «Нанотех-Дубна», стабилизированные меркапто-*n*-додекановой кислотой) и CdSe-2 (модифицированные Jeffamine M-1000 (блок-сополимер полиоксипропилена и полиоксипропилена с первичными аминогруппами), полученные от проф. И.Ю. Горячевой (Институт химии, Саратовский университет). Использовали также: основание Шиффа, полученное при смешивании *o*-фталевого диальдегида с полиэтиленимином; флуоресцентные красители – флуоресцеин и родамин В, иммобилизованные по собственной методике на кремнеземе, модифицированном полиэтиленимином (Флуор/SiO₂ и Род/SiO₂, соответственно); *трис*-бипиридилат рутения(2+) (Ru(bpy)₃²⁺); комплекс цинка(II) с 8-гидроксихинолин-5-сульфонатом (8-Ох-Zn); тиазоловый оранжевый (ТО), интеркалированный в ДНК (получена из двух источников: натриевая соль ДНК из сельди (“Sigma-Aldrich”, США) - ДНК-1, и препарат «Деринат» (ЗАО ФП «Техномедсервис») – ДНК-2) и некоторые другие флуорофоры (схема 1).

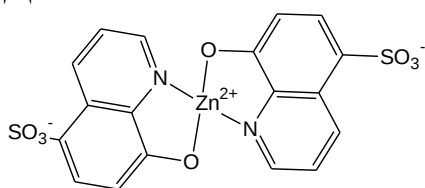
А.



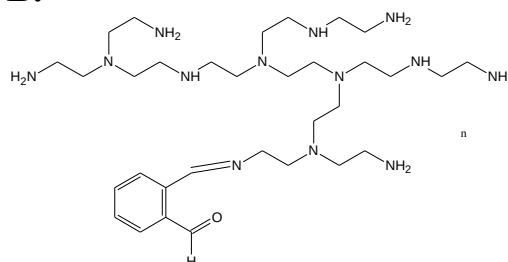
В.



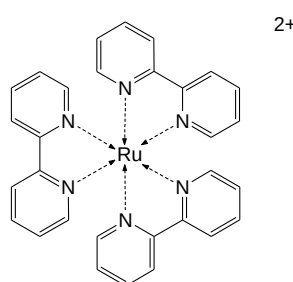
Д.



Б.



Г.



Е.

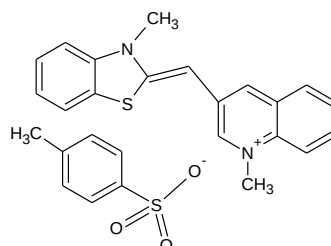


Схема 1.

Структуры флуорофоров.

А. CdSe.

Б. Оsn. Шиффа.

В. Флуоресцеин-ПЭИ, исполь-

зуемый при

закреплении на

SiO₂ (аналогично

– для

родамина В).

Г. трис-

бипиридилат

рутения(2+).

Д. Комплекс

цинка(II) с 8-

гидроксихино-

лин-5-суль-

фонатом.

Е. Тиазоловый

оранжевый.

Рис. 1. Степень



квантовые точки CdSe-1 и PbS. Спектры флуорофоров представлены на рисунке 2. Обнаружили, что флуорофоры при смешивании влияют на эмиссию друг друга, что чаще всего проявляется во взаимном тушении флуоресценции (рис. 2б (черный спектр)). Кроме того, спектр флуоресценции смеси флуорофоров значительно изменяется в присутствии разных модельных аналитов (рис. 2б), что создает возможность их дискриминации.

Были составлены все возможные двух- и трехкомпонентные смеси аналитов в равных молярных концентрациях и изучены в присутствии смеси 4-х вышеназванных флуорофоров (исключив КТ PbS). При применении однократного разложения по методу главных компонент (МГК) возможно дискриминировать все смеси, за исключением следующих четырех: А+С; А+П+С; А+Х+С; А+Х+П+С (рис. 3а).

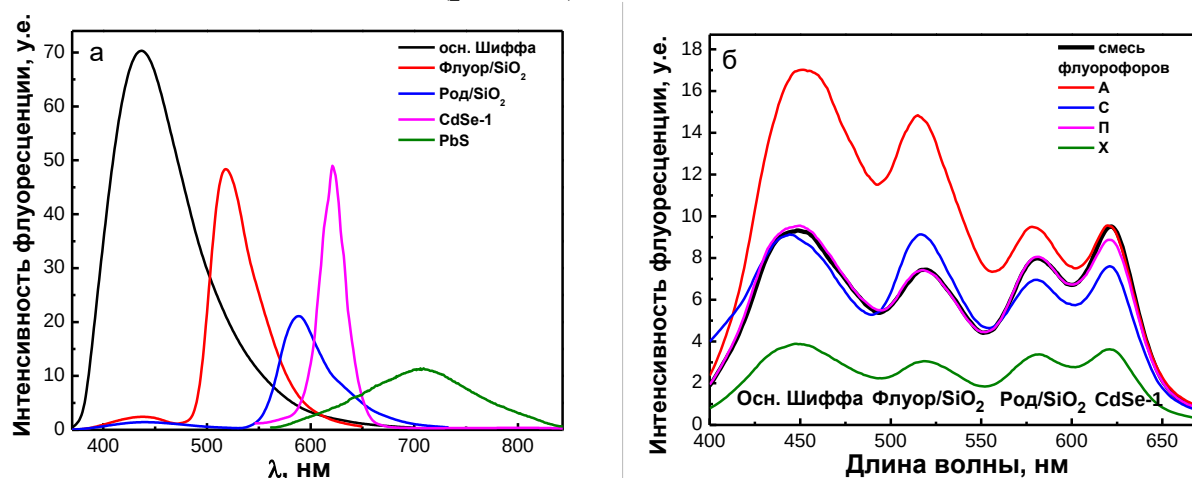


Рис. 2. Спектры эмиссии: а) индивидуальных флуорофоров (осн. Шиффа, Флуор/SiO₂, Род/SiO₂, CdSe-1, PbS); б) смеси 4-х названных флуорофоров без аналитов (черный спектр) и в присутствии $4,0 \times 10^{-4}$ М аналитов: А – амикацин (красный), С – сульфаметоксазол (синий), П – пирацетам (розовый), Х – хлорамфеникол (зеленый). Буфер МОПС (рН 7,6), $\lambda_{\text{возб}} = 300$ нм.

Перед вторым применением МГК с использованием тех же спектральных данных исключили спектры хорошо дискриминированных групп и применили МГК только к спектрам смесей, которые не были дискриминированы. Результаты такого расчета (рис. 3б) показывают, что все смеси модельных аналитов хорошо различимы. Число недискриминированных смесей минимально для четырехкомпонентной смеси флуорофоров и имеет тенденцию к увеличению с уменьшением числа флуорофоров в смеси (табл. 1).

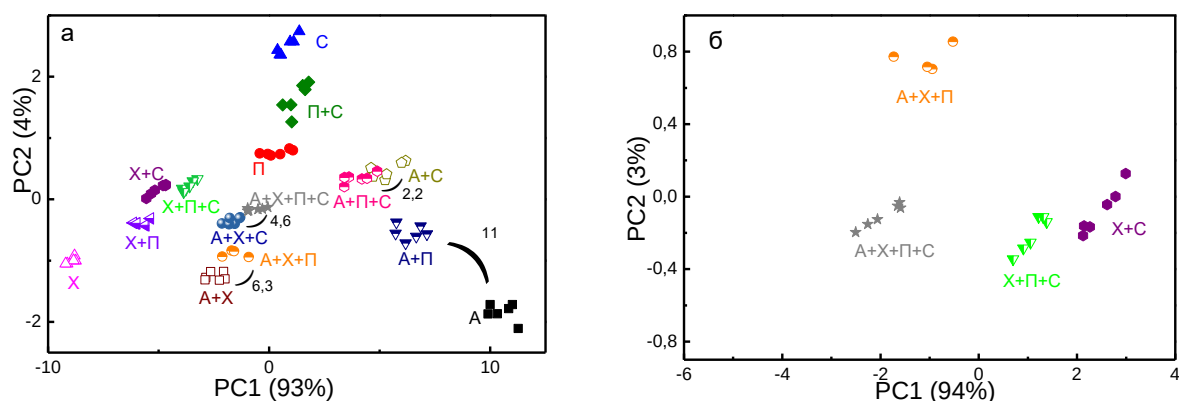


Рис. 3. Графики счетов, полученные с использованием смеси 4-х флуорофоров (осн. Шиффа, Флуор/SiO₂, Род/SiO₂, CdSe-1) с модельными аналитами (А – амикацин, Х – хлорамфеникол, С – сульфаметоксазол, П – пирацетам) и их смесей в воде: а) МГК, 1-й этап – в качестве данных используют весь набор спектров, т.е. 15 модельных аналитов. б) МГК, 2-й этап – использование спектров 4-х недискриминированных смесей. Подписаны значения расстояний Махаланобиса между некоторыми образцами. (РС – principal component, главная компонента).

Таблица 1.
Эффективность
дискриминации
смесей 4-х
модельных
аналитов (А, Х, С,
П) в присутствии
смесей
флуорофоров с
использованием
двухэтапного
метода главных
компонент.
ОШ – осн. Шиффа;
Флу – Флуор/SiO₂;
Род – Род/SiO₂;
CdSe – CdSe-1.

Число флуоро- форов в смеси	Состав смеси флуорофоров	Число не- дискримини- рованных групп
5	ОШ, Флу, Род, CdSe, PbS	10
4	ОШ, Флу, Род, CdSe	0
3	ОШ, Флу, Род	6
3	ОШ, Флу, CdSe	11
3	Флу, Род, CdSe	6
3	ОШ, Род, CdSe	4
2	ОШ, Род	10
2	Род, CdSe	14
2	Флу, CdSe	12
1	Род	14

Для сравнения эффективности развиваемого метода с альтернативными методами «отпечатков пальцев» получили *спектры поглощения в УФ-области* тех же модельных аналитов (амикацин, пирацетам, сульфаметоксазол, хлорамфеникол) в водном растворе. Воспроизводимость УФ-спектров была выше, чем спектров флуоресценции, что могло бы повлечь

лучшую дискриминацию. Тем не менее, сравнение графиков счетов, полученных при обработке УФ-спектров (рис. 4) и спектров флуоресценции в присутствии 4-х флуорофоров (рис. 3) показывает лучшую дискриминацию методом «флуоресцентный глаз». Результат объясним тем, что спектры поглощения не обладают достаточной индивидуальностью, а некоторые аналиты вообще не поглощают в УФ-видимой области (в данном случае амикацин).

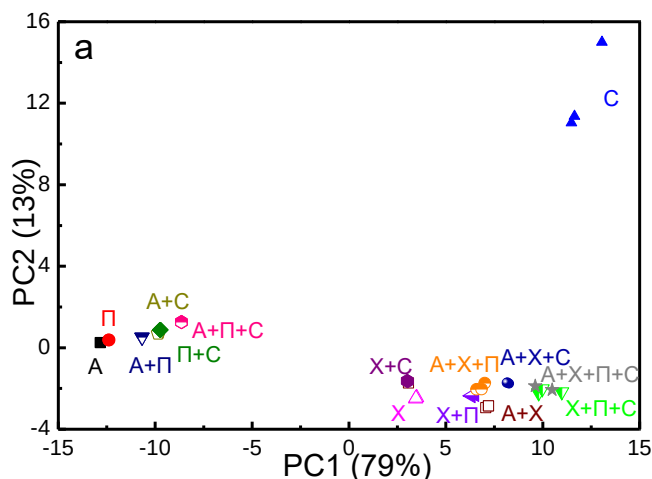


Рис. 4. Графики счетов для УФ-спектров поглощения (220-400 нм) модельных аналитов и их смесей в водном растворе (МОПС pH 7,6): а) А – амикацин, Х – хлорамфеникол, С – сульфаметоксазол, П – парацетам.

Пути повышения дискриминирующей способности метода

Качество дискриминации образцов зависит не только от используемого флуорофора, но и от условий эксперимента (тип оптического прибора, время экспозиции (для фотографии)) и условий предобработки данных (контрастирование, нормирование, «виртуальное» смешивание флуорофоров). Систематически влияние условий регистрации и способов предобработки данных изучали на примере дискриминации 16-ти сортов виски.

Изучена возможность упрощения и ускорения эксперимента при использовании для получения аналитических сигналов фотографий вместо спектров флуоресценции (рис. 5). Число дискриминированных групп на графиках счетов, полученных при регистрации фотографий (число групп точек с непересекающимися доверительными эллипсами), в ряде случаев показывает лучший результат по сравнению с аналогичным параметром, полученным при регистрации спектров флуоресценции, хотя иногда и ухудшает дискриминацию (табл. 2).

Возможная причина эффективности использования фотографий состоит в том, что возбуждение УФ-лампой с максимумом излучения при 366 нм является довольно широкополосным, поэтому образцы облучаются в более широком диапазоне, чем при использовании монохромного света в

спектрофлуориметре. Фотографирование оказывается в чем-то подобным получению матриц возбуждения – эмиссии.

А.



Б.

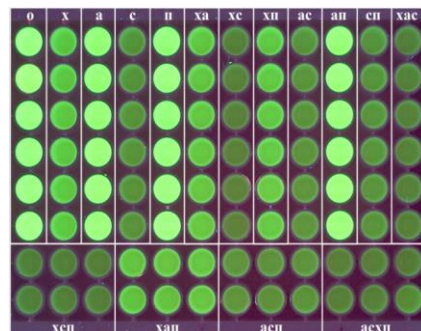


Рис. 5. А. Визуализатор для регистрации флуоресценции образцов в 96-луночных планшетах. **Б.** Пример получаемой фотографии планшета (группы по 6 лунок принадлежат разным образцам (выделены белыми линиями)).

При использовании в качестве аналитического сигнала RGB-интенсивностей фотографий использовали последовательно возбуждение образцов двумя длинами волн (254 и 366 нм). Для всех используемых флуорофоров объединенные данные по двум длинам волн с последующей обработкой МГК приводят к лучшей дискриминации, чем использование этих данных порознь.

Флуорофор	Спектры флуоресценции	Фотографии
8-Ох-Zn	6	3
Отсутствует	9	9
Осн. Шиффа	2	8
Род/SiO ₂	7	6

Таблица 2. Число дискриминированных групп на графиках счетов для 16-ти сортов виски по спектрам флуоресценции и по цифровым фотографиям (выдержка 5 сек)

В программном обеспечении визуализатора есть функция контрастирования (SpotAmp), которая анализирует цветовые гистограммы каждой части изображения и рассчитывает разности между интенсивностями для каждой точки и выбранной пользователем точки сравнения для каждого цветового канала (RGB). Применение этой функции улучшает дискриминацию для некоторых флуорофоров (Род/SiO₂), хотя для других флуорофоров изменений не наблюдается или результат ухудшается.

Полученный опыт обработки изображений позволил заключить, что для лучшей дискриминации образцов при использовании фотографий следует объединять каналы (R, G и B), объединять данные, 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 функции контрастирования изображения.

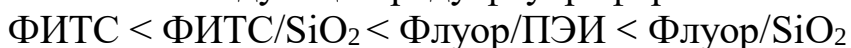
Для уменьшения взаимного влияния флуорофоров в смеси применен подход, названный «виртуальным» смешиванием: в единую матрицу объединяли значения цветовых интенсивностей «смешиваемых» флуорофоров для трёх каналов (R, G, B) при возбуждении длинами волн 254 и 366 нм, которую затем обрабатывали методом главных компонент. В таблице 3 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. Таким образом, применять «виртуальное» смешивание флуорофоров целесообразно, когда дискриминация с помощью одного флуорофора недостаточно эффективна, а реальное смешивание вызывает взаимное тушение эмиссии.

Таблица 3. Число дискриминированных групп, полученных при анализе фотографий 4-х 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 для флуорофоров:		
	Индивидуальных	«виртуальной» смеси	реальной смеси
Осн. Шиффа	8	11	5
Флуор/SiO ₂	9		
Род/SiO ₂	8		
CdSe-1	5		

Иммобилизация красителя на сорбенте (например, кремнеземе) приводит к усилению влияния аналитов на флуоресценцию. Причина этого явления может заключаться в том, что аналиты, сорбированные в непосредственной близости от прикрепленного красителя, имеют больше времени для обмена энергией с красителем и тем самым сильнее влияют на интенсивность его излучения, чем в растворе. В качестве иммобилизованных форм изучены: Флуор/SiO₂ (синтезированный путем присоединения изотиоцианата флуоресцеина к полиэтиленимину, предварительно сорбированном на SiO₂) и контрольный флуорофор ФИТС/SiO₂ (полученный путем механической сорбции изотиоцианата флуоресцеина на кремнезем). Растворенные формы флуоресцеина представлены самим флуоресцеином (ФИТС) и продуктом взаимодействия изотиоцианата флуоресцеина с полиэтиленимином (Флуор/ПЭИ). Результаты показывают (рис. 6), что

влияние модельных аналитов на интенсивность флуоресценции имеет тенденцию к увеличению в следующем ряду флуорофоров:



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.

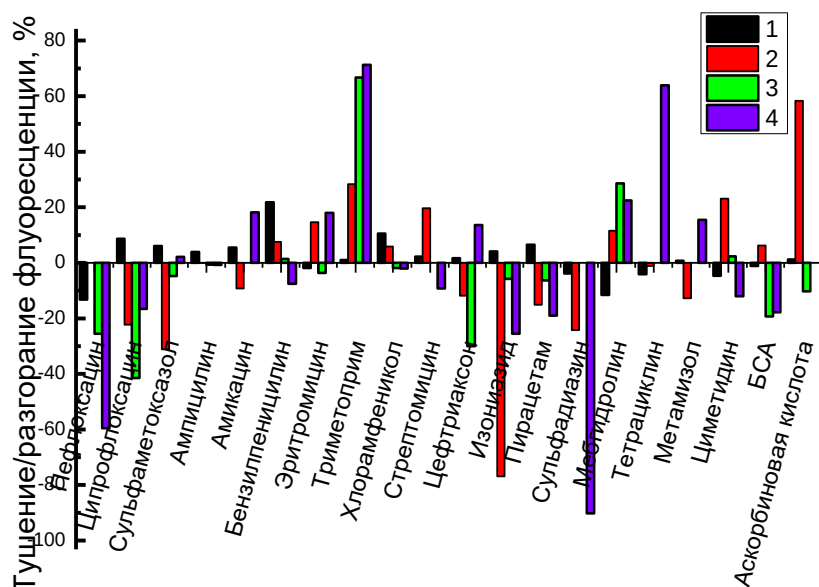


Рис. 6.

Тушение/разгорание флуоресценции (%) для различных форм флуоресцеина органическими соединениями в растворе (суспензии):
1 – Флуор/SiO₂,
2 – ФИТС/SiO₂,
3 – Флуор/ПЭИ,
4 – ФИТС.

На рисунке 7 показано, что дискриминация синтетических смесей в присутствии флуорофоров в нативной форме хуже, чем с помощью смеси, содержащей иммобилизованные красители.

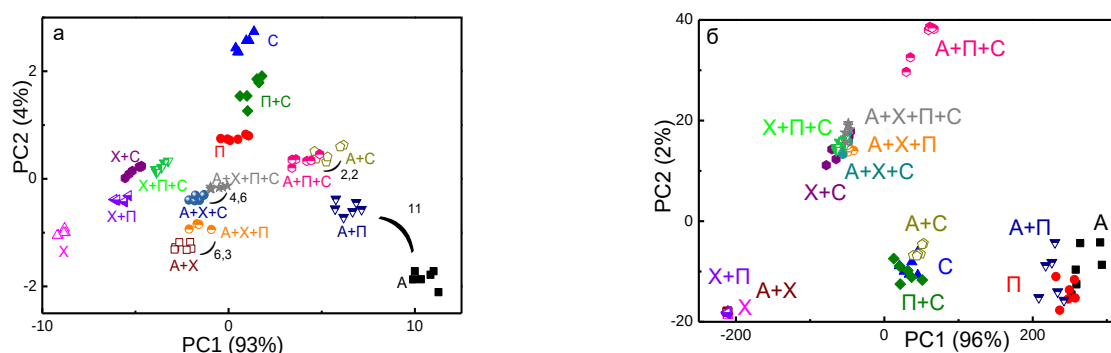


Рис. 7. Графики счетов, полученные для смеси 4-х флуорофоров а) осн. Шиффа, Флуор/SiO₂, Род/SiO₂, CdSe-1 б) осн. Шиффа, ФИТС, Родамин В изотиоционат, CdSe-1 в присутствии модельных аналитов и их смесей (А – амикацин, Х – хлорамфеникол, С – сульфаметоксазол, П – пирацетам).

Оценка качества дискриминации. Для выбора наиболее удобного способа оценки качества дискриминации применены имеющиеся в

литературе методы, а также предложен собственный параметр. Способы оценки качества дискриминации выбирали на примере образцов меда. В качестве флуорофоров для дискриминации сортов меда рассмотрены комплексы металлов: 8-гидроксихинолин-5-сульфоната с цинком(II) и рутения(II) с 2,2'-бипиридилем. Также использовали флуоресцентный краситель тиазоловый оранжевый (он наиболее интенсивно флуоресцирует при интеркалировании в ДНК).

При рассмотрении всего спектра флуоресценции наилучшая дискриминация с точки зрения количества дискриминируемых групп было достигнута при добавлении к образцам меда только ДНК без красителя (11 дискриминированных групп для 36-ти образцов). Однако добавление ТО к этой системе и рассмотрение только длинноволнового пика в спектре эмиссии позволило дискриминировать образцы меда на 12 групп (рис. 8).

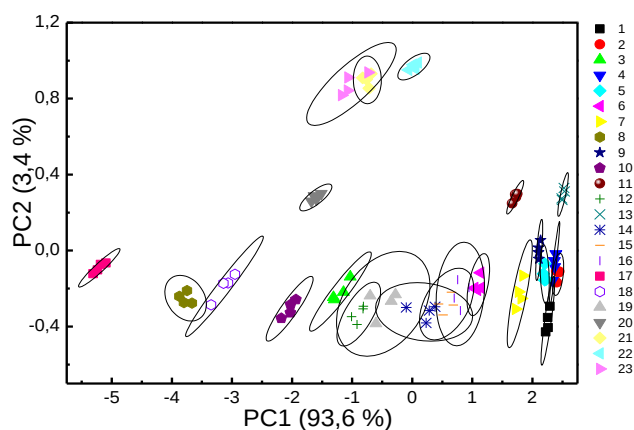


Рис. 8. График счетов, построенный по спектрам эмиссии образцов меда с добавлением смеси тиазолового оранжевого с ДНК (53:1 моль/моль).

Для дискриминации образцов меда в качестве флуорофоров также изучены комплексы металлов. Флуорофор $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, добавленный к каждому из 36-ти образцов меда, разделяет их на 14 классов. Расстояние между классами значительно выше, чем при использовании в качестве флуорофора комплекса цинка (8-Ох-Zn). Последний отличается меньшей повторяемостью параллельных измерений, что увеличивает размер доверительных эллипсов, приводя к их возможному перекрыванию (рис. 9). С этим флуорофором можно дискриминировать образцы меда лишь на 9 классов.

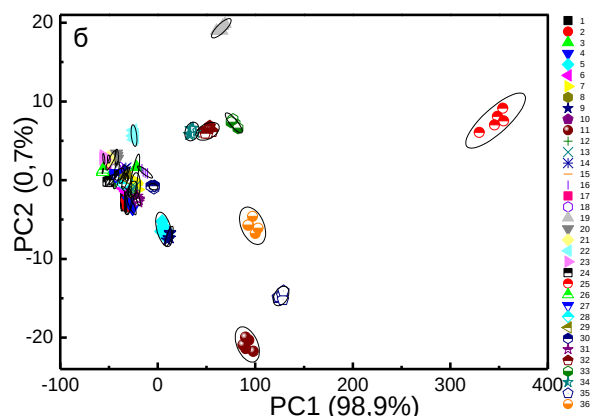
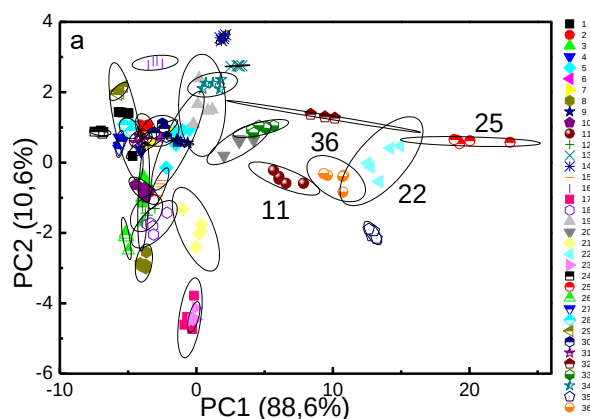


Рис. 9. Графики счетов, построенные по спектрам флуоресценции 36-ти видов меда с добавлением а) 8-Ох-Zn, б) $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$.

Как видно из представленных данных, ни один из флуорофоров не позволяет дискриминировать 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 4 представлена эффективность дискриминации 28-ми образцов меда. При использовании в качестве сигнала всего спектра флуоресценции наилучшую дискриминацию наблюдали в присутствии ДНК-2 и ДНК-1–ТО. При добавлении к образцам меда ДНК-1 достигнут наилучший результат дискриминации (11 групп образцов). Таким образом, при анализе большого числа групп образцов целесообразно последовательное построение графиков счетов для наилучшей дискриминации образцов.

Таблица 4. Эффективность дискриминации 28-ми образцов меда при добавлении флуорофоров (после исключения образцов №№ 11, 19, 22, 25, 32, 33, 35, 36)

Флуорофор	Число дискриминированных групп		
	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 + $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$	7	-	4
Мед + 8-Ох-Zn	5	-	8

Подсчет числа дискриминированных групп наиболее прост технически, однако он не всегда позволяет адекватно охарактеризовать качество дискриминации. Так, в случае графиков счетов, представленных на рисунке 9, 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). Таким образом, эффективность распознавания сложно оценить, когда образцы не полностью разделены или только часть их образует отдельные классы. Мы предложили и использовали простой способ оценки эффективности дискриминации путем

подсчета числа пересечений для всех эллипсов на графике счетов (**ЧисП**). В соответствии с этим критерием, наиболее эффективным флуорофором является $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (**ЧисП** = 112), а наименее эффективным – тиазоловый оранжевый в присутствии ДНК-2 (239 пересечений). Этот результат согласуется и с числом дискриминированных групп точек на графике счетов: 14 и 11, соответственно.

Для сравнения предложенного подхода со стандартными методами рассчитан показатель так называемой «общей чувствительности» (total sensitivity, TS), которая представляет собой отношение числа правильно идентифицированных образцов к количеству всех образцов. Корреляция **ЧисП** с TS не превысила 0,7 (табл. 5), что подтверждает уникальность параметра **ЧисП** (наибольшее значение коэффициента корреляции, равное 0,69, получено при применении метода опорных векторов (*SVM – support vector machine*) с функцией преобразования полиномом третьей степени: *SVM – полином-3*). Предлагаемый параметр **ЧисП** не требует выделения проверочного набора данных и может быть рассчитан без использования программного обеспечения, если на графиках счетов построены доверительные эллипсы.

Таблица 5. 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	SVM полином -3		
$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$	86,1	83	14	112
ТО–ДНК-1	80,6	81	11	112
ДНК-1	80,6	83	12	183
Без фл-фора	80,6	81	11	178
ДНК-2	73,3	67	12	208
8-Ох-Zn	63,3	81	12	192
ТО–ДНК-2	59,4	69	11	239
<i>r</i> с ЧисП	0,79	0,69	0,42	1,00

Применение метода к реальным объектам. Для дискриминации смесей модельных аналитов выбрали *плазму крови* человека как пример реального объекта сложного состава. В качестве аналитов использовали смеси амикацина, хлорамфеникола, сульфаметоксазола и пирацетама. Смесь 4-х флуорофоров (осн. Шиффа, Флуор/ SiO_2 , Род/ SiO_2 , CdSe-1), хорошо зарекомендовавшая себя при изучении дискриминации модельных аналитов, позволила дискриминировать модельные смеси на 7 классов, что обеспечило

наилучшую дискриминирующую способность. В альтернативном варианте распознавания смесей, основанном на использовании УФ-видимых спектров, 15 исследуемых модельных смесей удалось разделить на 5 классов. Результаты показали, что флуориметрический метод «отпечатков пальцев» позволяет дискриминировать 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».

Для дискриминации сортов меда использовали 36 образцов. Наилучшим флуорофором оказался $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, так как дискриминирует образцы меда на 14 групп. В отсутствие флуорофора, а также в присутствии ТО–ДНК образцы меда удалось разделить лишь на 11 групп. Так, в присутствии практически любого из флуорофоров возможно отделить мед с живицей (кроме длинноволнового пика флуорофора ТО–ДНК), в некоторых случаях ярко выражен мед белой акации или липовый с малиной. При оценке дискриминирующей способности флуорофоров по видам меда наилучшая дискриминация наблюдается при использовании $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ и ТО–ДНК (1,2). Данные результаты свидетельствуют, что с изученными флуорофорами дискриминировать сразу все виды меда невозможно, но для решения задачи разделить определенные сорта можно подобрать эффективные флуорофоры.

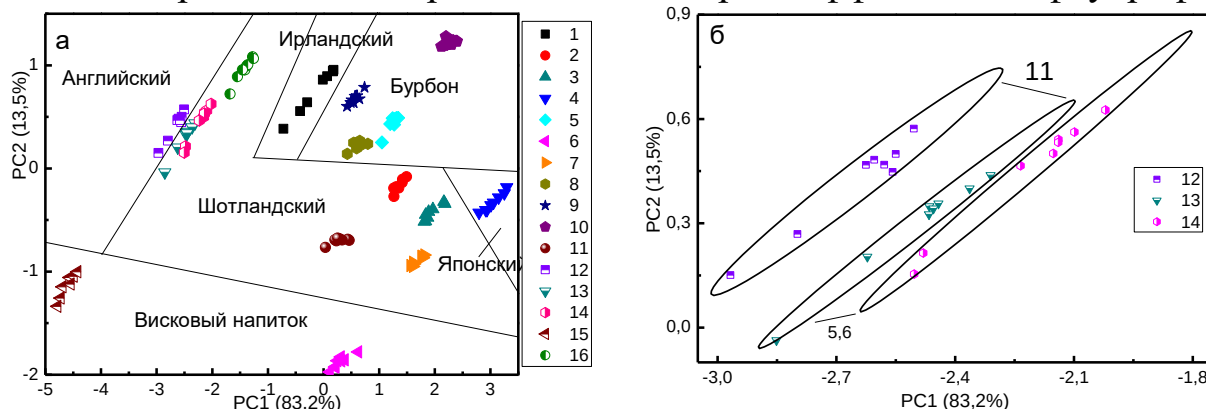


Рис. 10. а) График счетов для 16-ти сортов виски в присутствии флуорофора $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Линии разделяют области, соответствующие определённым типам виски. Условия: выдержка 10 с, 3 применения функции SpotAmp; б) увеличенный участок графика (а) для образцов 12, 13 и 14 с расстояниями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

При анализе виски наилучшая дискриминация также получена при использовании в качестве флуорофора $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (рис. 10). На графике счетов расстояние Махаланобиса превышает значение 4,0 даже между наименее дискриминированными группами (образцы 13 и 14). Высокую эффективность этого флуорофора можно объяснить его высокой реакционной способностью.

Различные виды виски, произведенные в разных странах, попадают в отдельные области на графике счетов (рис. 10). Это показывает, что есть

возможность определения типа виски неизвестного образца. (Чтобы дискриминировать виски с еще большей достоверностью, должно быть изучено большее число образцов.) Кроме того, виски в возрасте больше 3-х лет (образцы 10 и 16) на рисунке 10 расположены в верхней части графика, то есть существует принципиальная возможность дискриминации образцов виски по возрасту. Четко дискриминированы висковые напитки (образцы 6 и 15), что позволяет выявлять фальсифицированную продукцию предлагаемым методом.

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°C в течение 40 мин (процедура, стандартно используемая при инаktivации вирусов), другие 14 – не прогреты. При исключении сильно окрашенных гемоглобином образцов оставили 11 образцов, из которых три образца – прогретая плазма, остальные – непрогретая. Удалось почти полностью дискриминировать прогретые и не прогретые образцы при использовании смеси 4-х флуорофоров (осн. Шиффа, Флуор/SiO₂, Род/SiO₂, CdSe-1) и фотографической регистрации.

Предпринята попытка дискриминации образцов *мяса птицы, облученных низкоэнергетическими электронами* (антимикробная обработка), с помощью добавок Ru(bpy)₃²⁺, однако положительного результата получить не удалось.

При дискриминации образцов *яблочного сока* по спектрам флуоресценции наилучшее разделение наблюдали в присутствии CdSe-2 и Ru(bpy)₃²⁺ (рис. 11). В обоих случаях дискриминированы нектары (образцы 7 и 8), а также сок фирмы «Мой» и «J7» (образцы 3 и 13, соответственно). Дискриминация на наибольшее число групп имеет место в присутствии флуорофора CdSe-2, так как дополнительно отделяется сок фирмы «Малышам» (образец 2), а группы остальных соков имеют меньшее перекрывание друг с другом.

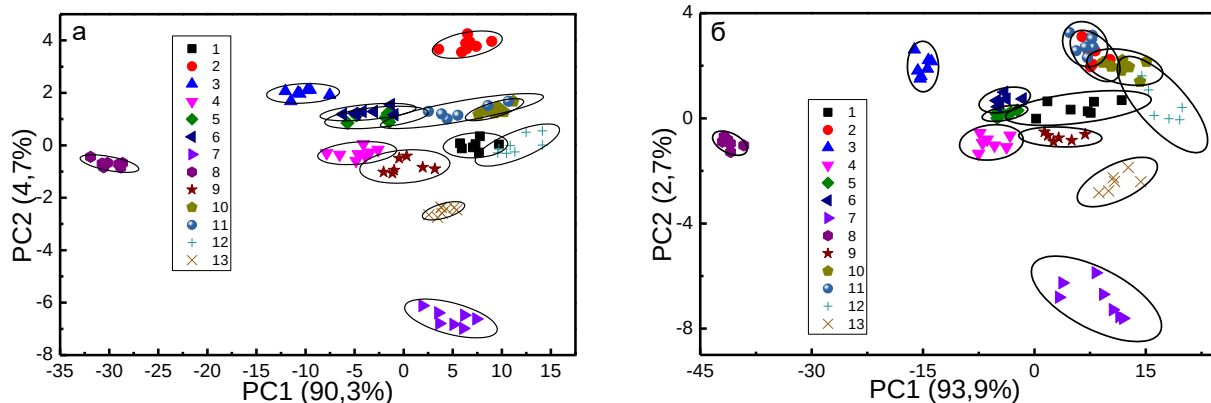


Рис. 11. Графики счетов для 13-ти сортов яблочного сока в присутствии флуорофоров а) CdSe-2 и б) $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Спектры флуоресценции получали в диапазоне 400-680 нм, применяли нормировку.

Для разделения сортов *кваса* использовали две смеси флуорофоров: первая смесь, хорошо себя зарекомендовавшая для других объектов, состояла из осн. Шиффа, Флуор/ SiO_2 и Род/ SiO_2 и CdSe-1; вторая смесь состояла из Tb^{3+} –ПЭИ (комплекс тербия(3+) с карбоксиметилированным полиэтиленимином), КТ ZnSe и CdSe-2. При дискриминации в присутствии флуорофоров (рис. 12) картина резко отличается для разных смесей: в присутствии смеси 4-х флуорофоров дискриминированы группы сортов кваса №№ 6+8, 5+7, 3 и остальные, а в присутствии второй смеси флуорофоров четко отделены образцы №№ 2 и 6.

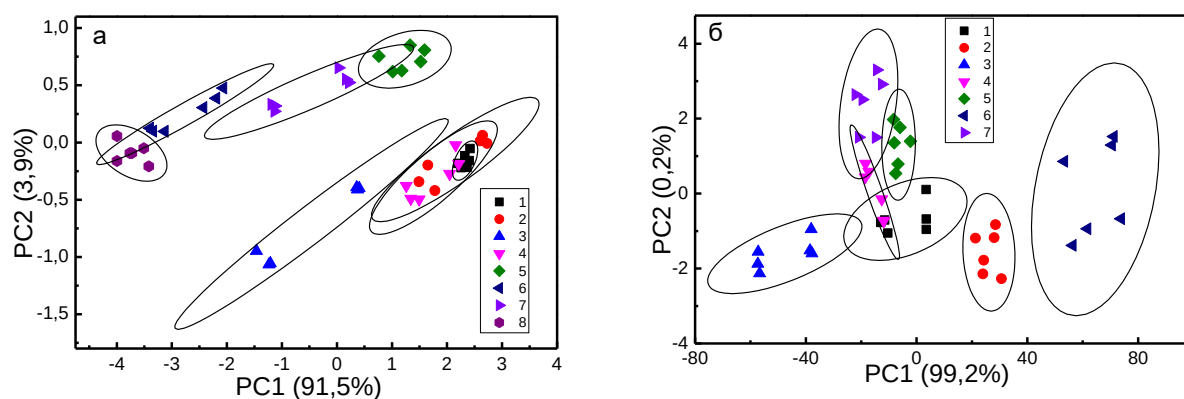


Рис. 12. Дискриминация сортов кваса с помощью спектров флуоресценции смеси 4-х флуорофоров (осн. Шиффа, Флуор/ SiO_2 и Род/ SiO_2 , CdSe-1) (а) и смеси 3-х флуорофоров (Tb^{3+} –ПЭИ, ZnSe, CdSe-2) (б).

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 показывают, что для решения каждой конкретной задачи целесообразно заново подбирать состав флуорофоров или их смесей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение сформулируем общие рекомендации по применению флуориметрического метода «отпечатков пальцев» при появлении задачи классификации какого-либо объекта.

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.

6. 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 полиэтиленимина и *o*-фталевого диальдегида, а также родамин В и флуоресцеин, иммобилизованные на кремнеземе, нековалентно модифицированном полиэтиленимином. 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, пирарцетам); для этих целей наиболее эффективна система из 4-х флуорофоров (основание Шиффа, родамин и флуоресцеин, иммобилизованные на кремнеземе, модифицированном полиэтиленгликолем, 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.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень Минобрнауки РФ, а также индексируемых в базах данных Web of ScienceTM и/или Scopus[®]:

1. 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. V. 135. P. 48-54. (Импакт-фактор: 2,74);
2. 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. V. 73. P. 1165-1171 (Импакт-фактор: 0,89)
3. 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. V. 145. P. 397-405. (Импакт-фактор: 3,59)
4. Черняев А.П., Розанов В.В., Беклемишев М.К., Близнюк У.А., Ипатова В.С., Авдюхина В.М., Борщеговская П.Ю., Гордонова И.К., Рукосуева Е.А., Ханкин В.В., Юров Д.С. Применение низкоэнергетических электронов для антимикробной обработки мяса птицы// Известия Российской академии наук. Серия физическая. 2020. Т. 84. P. 1617-1622. (Импакт-фактор (РИНЦ): 0,61)
5. 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. V. 20. № 5351 (Импакт-фактор: 3,27)

Иные публикации:

1. Дивянин Н.Н., Рукосуева Е.А. Одновременное обнаружение нескольких антибиотиков с помощью смеси флуорофоров при использовании метода главных компонент. XXIV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов – 2017" секция «Инновации в химии: достижения и перспективы». Москва, 2017.
2. Дивянин Н.Н., Беклемишев М.К., Разина А.В., Рукосуева Е.А. «Флуоресцентный язык»: первый опыт распознавания смесей. Третий съезд аналитиков России. Туапсе, 2017.
3. Рукосуева Е.А., Добролюбов Е.О. Обнаружение модельных аналитов методом «флуоресцентный язык» с пространственно-разделенными

флуорофорами. XXV Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» секция «Инновации в химии: достижения и перспективы». Москва, 2018.

4. Рукосуева Е.А., Дивянин Н.Н., Беклемишев М.К. «Флуоресцентный язык» - метод различения объектов сложного состава. III всероссийская конференция по аналитической спектроскопии с международным участием. Кубанский Государственный Университет. Краснодар, 2019. С.163.

5. Рукосуева Е.А. Классификация объектов методом флуоресцентной спектроскопии с добавками флуорофоров. XXVI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», секция «Инновации в химии: достижения и перспективы». Москва, 2019.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю д.х.н., в.н.с. Беклемишеву М.К., кафедре аналитической химии и лаборатории кинетических методов анализа и лично д.х.н., профессору Шеховцовой Т.Н. за возможность написания диссертации и ценные советы. Особую благодарность автор выражает Крылову И.Н. за консультации в области хеометрики, к.х.н., с.н.с. Зайцеву С.М. за оптимизацию вычислений, Дивянину Н.Н. за помощь в эксперименте, к.ф.-м.н., с.н.с. Рукосуеву А.Л. за безграничную поддержку и замечания, способствующие улучшению изложения. Также автор благодарит за помощь и поддержку д.х.н., профессора Гладилина А.К., к.х.н., доцента Карпову Е.В., к.х.н., доцента Керимова Э.Ю., к.х.н., м.н.с. Карпову Е.В., Суминова К.А. и Рукосуеву Ю.В.