

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В.ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Шик Анна Викторовна

**Распознавание объектов близкого состава с помощью
кинетического метода отпечатков пальцев**

1.4.2. Аналитическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

доктор химических наук

Беклемишев Михаил Константинович

Москва – 2026

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	11
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. МАТЕМАТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА В МЕТОДАХ ОТПЕЧАТКОВ ПАЛЬЦЕВ	13
1.1.1. Методы «без учителя»	14
1.1.2. Методы классификации и дискриминации	15
1.2. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА «ОТПЕЧАТКОВ ПАЛЬЦЕВ»	20
1.2.1. Анализ и распознавание лекарственных средств	20
1.2.2. Распознавание напитков.....	24
1.2.3. Распознавание природных объектов.....	32
1.2.4. Оценка доз облученных продуктов.....	34
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	38
2.1. РЕАГЕНТЫ И ОБРАЗЦЫ.....	38
2.2. АППАРАТУРА	41
2.3. МЕТОДИКИ ПРОВЕДЕНИЯ ИНДИКАТОРНЫХ РЕАКЦИЙ	41
2.4. АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ МЕТОДЫ РАСПОЗНАВАНИЯ.....	42
2.5. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ	43
2.5.1. Обработка изображений	43
2.5.2. Оценка правильности распознавания	43
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	47
ГЛАВА 3. ХАРАКТЕРИСТИКИ ИНДИКАТОРНЫХ РЕАКЦИЙ	47
3.1. Реакции окисления пероксидом.....	47
3.2. Реакции окисления гипохлоритом	48
3.3. Другие окислители	49
ГЛАВА 4. РАЗЛИЧЕНИЕ МОДЕЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ.....	50
4.1. Распознавание сульфаниламидов.....	51
4.2. Распознавание 9 лекарственных веществ	53
4.3. Распознавание модельных белков	60
4.4. Распознавание аминокликозидов, цефалоспоринов и серосодержащих соединений	68
ГЛАВА 5. ПРИМЕНЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКОГО МЕТОДА ОТПЕЧАТКОВ ПАЛЬЦЕВ К РЕАЛЬНЫМ ОБЪЕКТАМ	71
5.1. Классификация яблочных соков	71
5.2. Распознавание сычужных ферментов.....	76
5.3. Классификация моторных масел.....	79
5.4. Распознавание вод из разных источников	86

5.5. Обнаружение загрязнителей в природных водах	89
5.6. Обнаружение соединений разных классов в природной воде	94
5.7. Обнаружение сброса сточных вод	101
5.8. Установление факта облучения продуктов	109
5.9. Определение порядка дозы облученных продуктов	119
ГЛАВА 6. СРАВНЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКОГО МЕТОДА ОТПЕЧАТКОВ ПАЛЬЦЕВ С АЛЬТЕРНАТИВНЫМИ МЕТОДАМИ	138
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	141
ВЫВОДЫ	142
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	143

Введение

Развитие простых, доступных и экспрессных методов сравнения объектов сходного состава является важной народнохозяйственной задачей. Проблемы классификации, аутентификации, идентификации образцов в пищевой промышленности, фармацевтике, экологическом мониторинге требуют решений, сочетающих экономичность, высокую производительность и экологичность. Применяемыми для этого методами не определяют отдельные компоненты образца, а исследуют его комплексное влияние на аналитический сигнал, позволяя получить так называемый «отпечаток пальцев», используя при этом методы хроматографии, электрохимии и спектроскопии. Широкое распространение получили методы «электронный нос» и «электронный язык» с применением газовых и электрохимических сенсоров, сигнал в которых формируется только за счет летучих или электрохимически активных маркеров. Известен вариант флуориметрического метода отпечатков пальцев, использующий добавку флуорофора к образцу, что расширяет круг анализируемых объектов и позволяет распознавать образцы, не обладающие собственной флуоресценцией. Однако однократное измерение сигнала не дает достаточной информации об образце, поэтому для эффективного различения образцов часто требуется целый массив сенсорных элементов. Измерение аналитического сигнала во времени позволило бы увеличить объем получаемых данных даже с использованием единственного сенсорного элемента (одной индикаторной реакции) для распознавания объектов, расширить их круг и повысить правильность распознавания.

Одним из вариантов решения указанной проблемы является развиваемый нами в этой работе кинетический метод «отпечатков пальцев», основанный на измерении влияния исследуемого образца на протекание индикаторной реакции (как правило, окислительно-восстановительной). Вместо традиционного измерения, проводимого после достижения постоянства сигнала, проводится серия измерений по ходу протекания индикаторной реакции, что увеличивает объем информации об образцах и повышает правильность их распознавания. Разные образцы по-разному влияют на скорость индикаторной реакции, создавая уникальные временные профили сигнала. Как и все методы «отпечатков пальцев», метод не требует информации о составе образца, поскольку дискриминация основана на суммарном влиянии компонентов образца на протекание реакции.

До начала нашей работы в 2017 и 2020–2021 гг. в литературе появились первые упоминания вышеописанного кинетического подхода к распознаванию групп аналитов и объектов – в основном, с использованием регистрации спектров поглощения наночастиц серебра и золота во времени и реакции окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина пероксидом водорода в присутствии катализаторов. Другие редокс-реакции для распознавания объектов не применяли. Реакции карбоцианиновых красителей в кинетическом методе отпечатков пальцев к началу наших работ не были описаны. Сигнал не измеряли в нескольких диапазонах, редко использовали флуоресценцию и никогда не измеряли ее в ближней ИК-области. Большинство упомянутых работ посвящено распознаванию отдельных соединений (чаще всего белков), а не объектов. Работы опубликованы разными научными группами и не носят систематического характера; степень универсальности кинетического подхода к распознаванию объектов не выяснена.

Целью настоящей работы являлось развитие кинетического метода «отпечатков пальцев», основанного на влиянии образца на скорость индикаторной реакции, для распознавания объектов близкого состава.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Изучить принципиальную возможность реализации указанного подхода для распознавания объектов. Выяснить возможность перехода от массива сенсорных элементов с однократным измерением сигнала к единственной индикаторной реакции с измерением сигнала в разные моменты времени.
2. Выявить наиболее эффективные индикаторные системы среди реакций окисления карбоцианиновых красителей различными окислителями.
3. Оценить степень универсальности подхода, изучая возможность распознавания модельных лекарственных веществ и объектов различной природы: природных и сточных вод, пищевых продуктов и напитков, в том числе облученных ионизирующим излучением (с целью оценки дозы), индивидуальных белков и белковых препаратов, а также жирорастворимых объектов.
4. Сопоставить различные методы хеометрической обработки данных для оценки правильности распознавания образцов.
5. Сравнить предложенный подход с существующими альтернативными подходами к различению объектов близкого состава, обеспечив выполнение экспериментов на одних и тех же образцах.

Научная новизна

1. Предложен вариант кинетического метода «отпечатков пальцев» для распознавания объектов близкого состава, основанный на проведении индикаторной реакции в присутствии раствора объекта, периодическом измерении интенсивности флуоресценции и/или светопоглощения в планшете при нескольких длинах волн с хемометрической обработкой результатов.
2. В качестве индикаторных в кинетическом методе «отпечатков пальцев» предложены реакции окисления карбоцианиновых красителей пероксидом водорода (в том числе в присутствии иона металла-катализатора), нитритом, броматом, гипохлоритом, кислородом воздуха, а также хлораминами, образующимися в результате взаимодействия гипохлорита с белками.
3. Предложен подход к различению индивидуальных соединений разных классов (сульфаниламидов, аминогликозидов, цефалоспоринов, фенотиазинов, пенициллинов, серосодержащих) с помощью реакций окисления карбоцианинов пероксидом водорода и гипохлоритом, а также белков и белоксодержащих объектов по реакциям окисления гептаметиновых карбоцианинов гипохлоритом.
4. Предложен способ распознавания жирорастворимых образцов на основе реакции окисления карбоцианина в среде с малым содержанием воды.
5. Предложен способ различения облученных и необлученных продуктов питания и оценки поглощенных доз по порядку величины, включая способ получения экстрактов образцов.
6. Предложен способ мониторинга качества источников водоснабжения: обнаружение сбросов сточных вод в водопроводную и речную воду, обнаружение органических соединений в природной воде, полуколичественное определение водорастворимой фракции моторного масла и ионов железа(II) в природной воде, а также распознавание природных вод из разных источников.
7. Показано, что развиваемый метод может быть использован для распознавания объектов различной природы. Обнаружено, что из ограниченного круга индикаторных систем (4 карбоцианина, 2 окислителя) можно выбрать реакции, позволяющие с высокой правильностью (>90%) решить разнообразные задачи распознавания (доз облученных печени индейки, картофеля, куриного мяса, говядины; сроков хранения сока; различения типов природных вод и индивидуальных соединений близкой природы). Показано, что для решения разных задач оптимально использование разных индикаторных реакций.

Практическая значимость

1. Сформулированы практические рекомендации по применению кинетического метода отпечатков пальцев для распознавания объектов, в том числе касающиеся выбора комбинации красителя и окислителя, позволяющей фиксировать изменение сигнала с удобной скоростью, по возможности в нескольких спектральных областях; совместного анализа известных и неизвестных образцов; объединения данных, полученных при протекании нескольких индикаторных реакций, для повышения правильности распознавания.

2. Предложены способы установления факта облучения и оценки порядка поглощенной дозы (100 Гр и выше) в мясе курицы, печени индейки, говядины и клубнях картофеля, облученных ускоренными электронами или рентгеновским излучением. Выбраны индикаторные реакции, показавшие высокую правильность при различении образцов, облученных различными дозами: куриного мяса (92%), печени индейки (100%), картофеля (94%) и говядины (97%) с использованием метода линейного дискриминантного анализа (ЛДА).

3. Разработан подход к различению яблочных соков, срок выпуска которых различается на год и более, с использованием реакций окисления красителя **дор-255** гипохлоритом либо пероксидом и последующей обработкой полученных данных методом дискриминантного анализа на основе проекций на латентные структуры (ПЛС-ДА), обеспечивающая правильность классификации 95%.

4. Показана возможность распознавания моторных масел различных производителей по реакции окисления карбоцианина **Су7**-гидразин азотной кислотой с правильностью 100%, достигнутой методом ЛДА.

5. Предложен способ различения сычужных ферментов различных производителей с использованием реакций окисления красителей **дор-128** и **Су5.5** гипохлоритом.

6. Предложены способы различения методом ЛДА образцов природных вод из разных источников по реакции **дор-145** – $NaOCl$ с правильностью 100%, обнаружения загрязнения природной воды водорастворимой фракцией моторного масла с использованием реакции **дор-145** – $NaOCl$ с правильностью 92%, обнаружения сбросов канализационных вод в источники водоснабжения с правильностью до 100% при объединении данных, полученных по реакциям **дор-145** – $NaNO_2$ и **дор-249** – $NaOCl$.

Положения, выносимые на защиту

1. Реакции окисления гептаметиновых хлорсодержащих карбоцианиновых красителей (**дор-128, дор-145, дор-249, дор-255, Су5.5, Су7, кат-24, кат-72, акри-278**) пероксидом водорода и гипохлоритом натрия в сочетании со стандартными хемометрическими методами (линейный дискриминантный анализ, дискриминантный анализ на основе проекций на латентные структуры, софтмакс регрессия, метод k ближайших соседей) применимы для распознавания модельных соединений разных классов (сульфаниламидов, цефалоспоринов, фенотиазинов, пенициллинов, аминогликозидов, серосодержащих соединений, модельных белков) и реальных объектов близкого состава с правильностью классификации до 100%.

2. Из круга изученных нами индикаторных систем на основе карбоцианинов и двух окислителей (H_2O_2 и $NaOCl$) можно выбрать хотя бы одну реакцию, обеспечивающую правильность классификации $>90\%$ для объектов различной природы, однако для каждого типа объектов (лекарственные вещества, белки, сычужные ферменты, яблочные соки, природные и сточные воды, облучённые продукты, моторные масла) индикаторную реакцию следует выбирать индивидуально на основе экспериментальных данных.

3. Для пяти исследованных типов объектов (яблочные соки, природные воды, облученные куриное мясо, печень индейки, картофель) показано, что альтернативные методы распознавания (собственная флуоресценция, антиоксидантный тест FRAP, добавка флуорофора, реакция окисления 3.3'.5.5'-тетраметилбензидина) менее эффективны, тогда как выбор оптимальной системы из восьми индикаторных реакций предложенного метода обеспечивает правильность распознавания $>90\%$ для всех исследованных типов объектов.

4. Объединение данных 2–3 индикаторных реакций окисления карбоцианиновых красителей с регистрацией флуоресценции и поглощения повышает правильность распознавания до 100% при оценке поглощенной дозы в курином мясе и говяжьем фарше и при обнаружении сбросов сточных вод при совместной обработке данных реакций *дор-145* – $NaNO_2$ и *дор-249* – $NaOCl$.

5. Реакции окисления гептаметиновых карбоцианиновых красителей (**дор-145, дор-249, дор-128**) гипохлоритом натрия, пероксидом водорода или нитритом натрия обеспечивают мониторинг загрязнения водопроводной и речной воды сточными водами до разбавления 1:1000 по объёму (правильность распознавания $>90\%$).

6. Реакции окисления карбоцианиновых красителей, проводимые в присутствии водных экстрактов образцов, позволяют различать облученные и необлученные образцы куриного мяса (правильность распознавания 100%), печени индейки (100%), картофеля (94%) методом ПЛС-ДА и оценивать порядок поглощённой дозы в диапазоне 100 – 10 000 Гр при облучении пищевого сырья ускоренными электронами или рентгеновским излучением.

7. Кинетический метод отпечатков пальцев при использовании индикаторных реакций *Cy7-гидразин* – HNO_3 и *доp-250* – *t-BuOOH* – Cu^{2+} обеспечивает распознавание моторных масел различных производителей (правильность распознавания 94%), а при использовании реакций этих же красителей с HNO_3 классификацию на два класса – «дорогой – дешёвый» – с правильностью классификации 100%.

Степень достоверности.

В каждом эксперименте проводили не менее 6 параллельных измерений для каждого образца, что обеспечивало надежность получаемых данных и минимизировало влияние случайных погрешностей. Достоверность результатов обработки (в основном, расчетов статистических метрик, таких как правильность распознавания) обеспечивали корректно проведенной кросс-валидацией.

Личный вклад автора.

В основу диссертационной работы положены исследования, выполненные автором в 2021–2025 гг. Основные результаты получены лично автором или в соавторстве. Вклад автора заключался в поиске и анализе литературы по теме работы, планировании и проведении экспериментов, обработке и интерпретации полученных данных, подготовке материалов по теме диссертации к публикации и представлении полученных результатов на конференциях. Карбоцианиновые красители предоставлены доц. Т.А.Подругиной и к.х.н. И.А.Солововой (Дорошенко). Облученные продукты предоставлены д.ф.-м.н. У.А.Близнюк. Образцы вод предоставлены Аналитическим центром МГУ.

Публикации и апробация работы

По материалам работы опубликовано 12 печатных работ, в том числе 12 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук.

Результаты работы были представлены на российских и международных конференциях:

2025: 11th International Conference on Food Chemistry & Technology (Рим, Италия, 15–17 октября, стендовый доклад), XXII European Conference on Analytical Chemistry - EuroAnalysis 2025 (Барселона, Испания, 31 августа–4 сентября, устный доклад), XIII Всероссийская конференция по анализу объектов окружающей среды «ЭКОАНАЛИТИКА-2025» (Санкт-Петербург, Россия, 19–23 мая, стендовый доклад), XXVIII Всероссийская конференция молодых ученых-химиков (с международным участием) (Нижний Новгород, Россия, 15–17 апреля, устный доклад).

2024: XXII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Федеральная территория «Сириус», Университет «Сириус», Россия, 7–11 октября, стендовый доклад), 10th International Conference on Sensors and Electronic Instrumentation Advances (Ибица, Испания, 24–27 сентября, устный доклад), IAEA International Symposium on Food Safety and Control (Вена, Австрия, 27–31 мая, стендовый доклад), Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2024" (Москва, Россия, 12–26 апреля, стендовый доклад).

2023: 9th International Conference on Food Chemistry & Technology (Париж, Франция, 27–29 ноября, стендовый доклад), IV Всероссийская конференция по аналитической спектроскопии с международным участием (Краснодар, Россия, 24–30 сентября, устный доклад), Московский семинар по аналитической химии (Москва, Россия, 25 апреля 2023 г., соавтор), The 13th Winter Symposium on Chemometrics, Москва, Россия, 28 февраля–4 марта 2022 г., (устный доклад).

Список сокращений

- ¹H ЯМР – протонная спектроскопия ядерного магнитного резонанса
- АДВ – активное действующее вещество
- БИК – ближняя инфракрасная область спектра
- БПК – биологическое потребление кислорода
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- ВОЗ – всемирная организация здравоохранения
- ВРФ – водорастворимая фракция
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием
- ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрией
- ДА – дискриминантный анализ
- ДДС – додецилсульфат натрия
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИК – инфракрасная область спектра
- ИНС – искусственные нейронные сети
- ИСП-МС – масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой
- КА – кластерный анализ
- ЛДА – линейный дискриминантный анализ
- ЛР – логистическая регрессия
- МГК – метод главных компонент
- МС – масс-спектрометрия
- НЕМ – нефелометрическая единица мутности
- ОПЛС-ДА – ортогональный дискриминантный анализ на основе проекций на латентные структуры
- ПДК – предельно допустимая концентрация
- ПЛС-ДА – дискриминантный анализ на основе проекций на латентные структуры
- ПЛСР – регрессия на основе проекций на латентные структуры
- ПФ – преобразование Фурье
- ПЭИ – полиэтиленмин
- РГК – регрессия на главные компоненты
- РФА ПВО – рентгенофлуоресцентный анализ с полным отражением

СИП – спектрометрия ионной подвижности
СР – софтмакс регрессия
ТМБ – 3.3'.5.5'-тетраметилбензидин
УФ – ультрафиолетовая область спектра
ФЭУ – фотоэлектронный умножитель
ХПК – химическое потребление кислорода
ЦТАБ – цетилтриметиламмония бромид
ЧСА – человеческий сывороточный альбумин
ЭПР – электронный парамагнитный резонанс
ЯМР – ядерный магнитный резонанс
ATR-FTIR – инфракрасная спектроскопия с ослабленным полным отражением и преобразованием Фурье
CART – деревья классификации и регрессии
FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power; анализ антиоксидантной активности по восстановлению железа
kNN – метод k ближайших соседей
LOGO – Leave-One-Group-Out; валидация «с исключением по одной группе»
RGB – Red, Green, Blue; красный, зеленый и синий цветовые каналы
RMSEV – среднеквадратичная ошибка валидации
RR – ридж-регрессия
SAE – Society of Automotive Engineers; система маркировки вязкости моторных масел
SIMCA – soft independent modeling of class analogy; мягкое независимое моделирование аналогий классов
SVM – support vector machine; метод опорных векторов

Глава 1. Обзор литературы

В последние годы образцы все чаще характеризуют по их «химическим отпечаткам». Этот подход обычно называют нецелевым анализом. Концепция «отпечатков пальцев» означает получение уникального аналитического сигнала, характеризующего комплексный состав образца. Метод «отпечатков пальцев» предлагает принципиально новый подход к анализу: вместо определения одного или нескольких маркерных компонентов, он основывается на комплексной оценке всего состава образца. «Химический отпечаток» можно определить как характерный профиль,

визуализирующий химический состав образца. Нецелевой анализ предполагает, что уникальная информация об образцах собирается и затем используется для сравнительного анализа. Такой подход имеет ряд преимуществ по сравнению с целевым анализом. Он создает всестороннее представление о составе образца, в отличие от целевого анализа, который характеризует образец ограниченным числом параметров, что предполагает наличие предварительных знаний об исследуемом образце и использование химических стандартов.

Для получения «отпечатков» используют широкий набор методов. Среди них наиболее распространены различные виды хроматографии, а также хроматография в сочетании с масс-спектрометрией. Однако изменения подвижной фазы, старение аналитических колонок и нестабильность прибора усложняют хемометрический анализ полученных отпечатков. Также благодаря их несложной пробоподготовке применяют спектроскопические методы, такие как УФ-видимая спектроскопия, спектроскопия комбинационного рассеяния, ядерный магнитный резонанс. Перечисленные методы генерируют многомерные данные (спектры, хроматограммы), которые обрабатывают методами хемометрики. Перед рассмотрением примеров применения методов «отпечатков пальцев» целесообразно рассмотреть основные методы обработки многомерных данных, применяемых для классификации и оценки качества построенных моделей.

1.1. Математическая обработка в методах отпечатков пальцев

Спектры или хроматограммы представляют собой многомерные данные, которые невозможно использовать напрямую. Важной задачей является не только получение многомерных данных, но и их грамотная интерпретация, для чего необходимы хемометрические методы. Хемометрический анализ отпечатков пальцев обычно состоит из трех частей: (1) предварительная обработка данных, (2) анализ без учителя и (3) анализ с учителем [1].

Правильная предварительная обработка данных и выбор подходящих методов имеют большое значение и требуют предварительного анализа данных. Выбор подходящих аналитических моделей и правильная интерпретация данных являются основной проблемой в многомерном анализе, поскольку неправильная (пред)обработка данных может привести к искаженным результатам.

1.1.1. Методы «без учителя»

Методы «без учителя» используют только информацию, содержащуюся в матрице данных, то есть полученные «отпечатки пальцев» в качестве единственного источника информации. Часто методы «без учителя» используют в качестве разведочного анализа, чтобы выявить различия между образцами, найти выбросы или идентифицировать сигналы, которые вносят наибольший вклад в распознавание образцов. К таким методам относятся, например, метод главных компонент (МГК) и метод кластерного анализа [2,3].

Метод главных компонент (МГК) – это инструмент сокращения числа исходных переменных, который позволяет визуализировать информацию, заключенную в матрице данных (размером $m \times n$), путем преобразования многомерного пространства исходных переменных в низкоразмерное. Это низкоразмерное пространство определяется новыми ортогональными скрытыми переменными, которые называют главными компонентами (ГК) (рис.1). Каждая ГК является линейной комбинацией исходных переменных и подбирается так, чтобы максимально отражать дисперсию, присутствующую в исходных данных [3]. Первая ГК объясняет наибольшую долю дисперсии, вторая – максимально возможную из оставшейся, и так далее. В результате МГК получаются две матрицы: матрица счетов и матрица нагрузок. Все m образцов проецируются на вновь полученные ГК, эти проекции называются их оценками или счетами. Счета можно представить в виде графика счетов, который позволяет получить информацию о сходстве или различии образцов. Нагрузки характеризуют вклад каждой исходной переменной в формирование каждой ГК: чем выше значение нагрузки, тем больше вклад. График нагрузок позволяет выяснить, какие именно переменные отвечают за наблюдаемые различия между образцами.

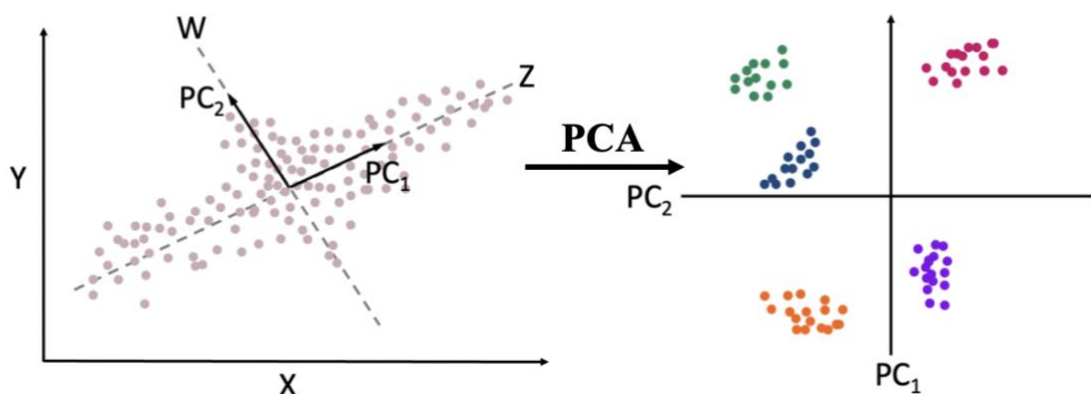


Рис. 1. Принцип метода главных компонент.

Метод кластерного анализа является еще одним важным инструментом для разведочного анализа данных. Различные методы кластеризации обычно делятся на две подгруппы: иерархическая и неиерархическая кластеризация [4,5]. Иерархический анализ выявляет структуру данных, что приводит к построению дерева или дендрограммы, представляющих классификацию образцов. В этом методе большие группы делятся на меньшие (дивизивный подход) или наоборот (агломеративный подход). [6]. Чаще применяется агломеративный подход, который заключается в объединении двух похожих образцов или кластеров до тех пор, пока все объекты не войдут в один класс. Существует несколько подходов к построению кластеров в зависимости от применяемой меры сходства, например, евклидово расстояние, расстояние Махаланобиса, коэффициент корреляции [7].

Неиерархические методы (методы разбиения) делят образцы на несколько непересекающихся кластеров. В результате образцы внутри одного кластера оказываются более схожими между собой, чем с теми, которые попали в другие кластеры. Такое разбиение на взаимоисключающие группы является результатом оптимизации по выбранной мере сходства внутри каждой группы. Неиерархический анализ обычно применяется на больших выборках и с заранее заданным числом групп.

1.1.2. Методы классификации и дискриминации

Методы «с учителем» отличаются тем, что используют дополнительно заданную информацию об образцах. Помимо информации, присутствующей в матрице данных (в полученных «отпечатках пальцев»), используется вектор отклика, содержащий дополнительную информацию. Ниже перечислены несколько основных методов, которые чаще всего используются для классификации и различения образцов.

По возможности предпочтение отдается линейным дискриминантным моделям, поскольку они имеют меньше параметров для настройки, требуют меньшего количества обучающих выборок и, как правило, более устойчивы к переобучению. Исторически первым [8] и одним из наиболее часто используемых методов дискриминантного анализа является **линейный дискриминантный анализ (ЛДА)**. Основная задача ЛДА – спроецировать исходные данные на новую ось или плоскость, на которой образцы из разных классов будут максимально отдалены друг от друга. На первом шаге вычисляют межклассовую дисперсию, которая определяет расстояние между средними значениями классов. Далее рассчитывают внутриклассовую дисперсию, которая показывает расстояние между средним значением и выборками каждого класса. На последнем шаге

строят пространство меньшей размерности, которое максимизирует межклассовую дисперсию и минимизирует внутриклассовую дисперсию. Для уменьшения числа переменных метод ЛДА определяет несколько дискриминантных функций, которые представляют собой комбинации исходных переменных; они определены таким образом, чтобы максимально разделить классы образцов [9]. Метод ЛДА основан на допущении, что образцы каждого класса имеют нормальное распределение внутри класса при условии равенства ковариационных матриц, однако на практике метод хорошо работает и без строгой нормальности данных [10]. Поскольку классический ЛДА не может быть использован, если число переменных больше, чем число образцов, на первом этапе часто применяют метод МГК для уменьшения размеров матрицы [11]. Современное программное обеспечение чаще всего использует различные механизмы для устранения ограничений ЛДА, например регуляризованный, разреженный или пошаговый варианты ЛДА.

Дискриминантный анализ на основе проекций на латентные структуры (ПЛС-ДА) – это универсальный алгоритм, который может быть использован как для описания данных, так и для прогнозирования, а также для выявления переменных, наиболее важных для решения задачи распознавания. Однако универсальность метода является его недостатком, поскольку необходимо оптимизировать большое число параметров для получения надежных результатов [12]. Теоретически ПЛС-ДА объединяет процесс снижения размерности данных и дискриминантный анализ в один алгоритм, что особенно эффективно для моделирования многомерных данных. Кроме того, ПЛС-ДА не предполагает, что данные соответствуют определенному распределению, не накладывает ограничений на число переменных и поэтому является более гибким, чем другие дискриминантные алгоритмы. Чтобы алгоритм ПЛС мог решать задачи классификации, информация о принадлежности к классу должна быть закодирована в переменной отклика Y . Сначала строят модель ПЛС на основе полученных данных (матрица X) и зависимой переменной, описывающей образцы (матрица Y), так что $Y = XB + E$, где B – матрица коэффициентов регрессии, а E – матрица остатков. Матрица X состоит из n строк, каждая из которых соответствует образцу, и m столбцов, каждый из которых соответствует измеренному сигналу, тогда как матрица Y состоит из n строк, каждая из которых представляет собой категориальную переменную, определяющую класс образца (например, 0 и 1). Модель ПЛС-ДА преобразует исходные переменные в набор нескольких скрытых переменных

(LV), называемых ПЛС факторами, которые представляют собой линейные комбинации исходных переменных. Эти переменные строятся таким образом, чтобы максимизировать ковариацию между исходными переменными и переменной отклика Y . График счетов ПЛС-ДА получают путем проекции образцов на латентные переменные; он позволяет оценить степень сходства или различия образцов. Нагрузки ПЛС определяют, какой вклад каждая переменная X вносит в конкретный компонент модели, аналогично нагрузкам МГК [13].

Метод мягкой независимой классификации по аналогии классов (SIMCA) – метод классификации «с учителем», который моделирует каждый класс объектов отдельно, определяя оптимальное число главных компонент (полученных из МГК) с помощью процедуры кросс-валидации. Принадлежность нового образца к классу оценивается по двум показателям: евклидово расстояние до построенной модели и расстояние Махаланобиса, вычисленное в пространстве ГК. Образец принадлежит к классу, если оба расстояния не превышают пороговых значений, рассчитанных для этого класса. SIMCA – метод «мягкой» классификации, то есть образец может принадлежать как к одному, так и к нескольким классам [14].

Метод k ближайших соседей (kNN) строит классификационную модель, вычисляя евклидово расстояние между неизвестным объектом и каждым из объектов обучающего набора. Вычисляют расстояние для каждого образца из обучающего набора, затем из всей выборки выбирают k образцов, наиболее близких к неизвестному. Неизвестный образец принадлежит к тому классу, к которому принадлежит большинство из k соседних объектов обучающего набора. Количество ближайших соседей (k), которые необходимо включить в построение классификационной модели, должно быть определено путем оптимизации. Среди недостатков метода – чувствительность к выбору числа соседей k , к наличию шумов и выбросов, вычислительная сложность при большом числе переменных. Эффективность метода при большом числе переменных падает, поэтому необходимо предварительное уменьшение размерности [15].

Метод опорных векторов (Support Vector Machine – SVM) – метод машинного обучения, который пытается различать классы образцов путем построения разделительной гиперплоскости и находит границу с максимально возможным расстоянием между точками. Алгоритм метода отображает каждый из объектов как

точки в пространстве и находит линейное уравнение, которое разделяет данные с наибольшим отступом. Новые данные классифицируются в соответствии с областью, в которую они попадают. Метод опорных векторов можно адаптировать для классификации нелинейных данных с помощью математической функции, называемой ядром, которая отображает исходные данные в пространство более высокой размерности. В этом новом пространстве гиперплоскость можно легко найти, даже если точки данных не являются линейно разделимыми в исходном пространстве. Хотя метод является бинарным классификатором, было разработано множество вариаций для построения более сложных моделей. Важным преимуществом SVM является использование принципа минимизации структурного риска. Этот принцип направлен на оптимизацию сложности модели и точности аппроксимации обучающей выборки. Модель избыточной сложности способна точно воспроизводить обучающие данные, однако демонстрирует низкую эффективность на новых. Это означает, что SVM лучше подходит для анализа систем, где распределение обучающих данных может отличаться от распределения тестовых данных. Основные недостатки метода SVM – это высокая чувствительность к выбору функции ядра и гиперпараметров, а также трудная интерпретируемость модели при использовании нелинейных функций [16].

Искусственные нейронные сети (ИНС) – структуры обучения, основанные на сети соединенных узлов, называемых искусственными нейронами. Основная цель искусственной нейронной сети состоит в том, чтобы найти корреляцию между входными данными любого процесса или метода и выходными данными. Каждый нейрон может получать и обрабатывать сигнал и передавать его другому нейрону. Простейший искусственный нейрон – это перцептрон, который используют для бинарной классификации линейно разделимых данных. Входные данные перцептрона – это значения, которые суммируются и проходят через функцию активации, что дает выходные данные. Веса в ИНС – это числовые коэффициенты, которые определяют вклад каждого нейрона. Один перцептрон может выполнять классификацию только с использованием линейных моделей, однако объединение нескольких перцептронов позволяет классифицировать нелинейные данные с использованием скрытых нейронов, получающих в качестве информации взвешенные комбинации линейных моделей. Существуют нейронные сети прямого распространения и с алгоритмом обратного распространения ошибки. В первом случае сигнал распространяется от входного слоя через скрытые слои к выходному без образования циклов и обратных связей. Во втором

случае выходной сигнал сравнивается с целевым значением (поскольку это метод обучения «с учителем») путем вычисления производной функции ошибки. Затем ошибка распространяется от выходного слоя к входному, а веса корректируются для минимизации ошибки. Существует множество вариантов ИНС, которые включают в себя различные структуры и функции активации, что делает их универсальными для анализа многих различных типов данных [17]. ИНС хорошо подходят для анализа очень сложных нелинейных данных, однако они могут быть вычислительно затратными. Кроме того, ИНС требуют больших объемов обучающих данных по сравнению со многими другими методами [18]. В отличие от SVM, искусственные нейронные сети обычно используют принцип минимизации эмпирического риска, стараются снизить ошибку именно на обучающей выборке, даже если это приводит к переобучению [16].

Анализ с использованием деревьев классификации и регрессии (CART) – непараметрический метод, который может использоваться для решения как задач классификации, так и задач регрессии, в зависимости от определения вектора отклика y . Деревья решений состоят из последовательности логических условий «если–то», которые многократно разделяют образцы на более однородные группы на основе их реакции на каждое условие. Изначально все образцы находятся в одной группе. Алгоритм ищет переменную и порог разделения, при которых достигается наибольшее снижение неоднородности при делении. Процесс бинарного разделения повторяют, пока не будет достигнут критерий остановки. В алгоритме CART выделяют три этапа: построение максимального дерева – разделение до тех пор, пока в группах не останется по одному объекту, что приводит к переобучению; удаление конечных групп, в результате чего из максимального дерева получается набор меньших, менее сложных деревьев; на заключительном этапе выбирают оптимальное дерево на основе ошибки прогнозирования с помощью кросс-валидации [19]. Преимуществами метода являются возможность обработки разного типа сигналов, в том числе пропущенных переменных, простота интерпретации результатов и наглядная визуализация. Среди недостатков метода можно выделить склонность к переобучению, чувствительность к изменению входных данных и плохую способность обработки несбалансированных данных [20].

Хеометрика в основном работает с эмпирическими моделями, которые должны хорошо описывать полученные данные и позволять предсказывать нужные свойства. Для одних и тех же данных можно построить несколько хеометрических моделей, на

качество которых влияет несколько факторов: число образцов, их структура, используемый метод и т. д. Для выбора и проверки надежности модели используют процедуру валидации [21]. Валидация позволяет не только выбрать наиболее подходящую модель, но и оценить ее способность к предсказанию свойств новых данных. Без процедуры валидации возникает риск переобучения, поскольку модель отражает случайные выбросы и шумы. Правильная стратегия валидации должна включать оценку ошибки модели на наборе данных, отличном от того, который был использован для расчета параметров модели. Обычно это достигается с помощью внешнего тестового набора данных или перекрестной (кросс-) валидации. Тестовый набор должен быть получен в тех же условиях, что и обучающие данные и не участвовать в подборе модели. Кросс-валидация – это метод проверки, при котором данные многократно делятся на обучающую и тестовую части. Модель обучается на одной части (например, 83%) и проверяется на оставшейся (17%), затем процедура повторяется несколько раз в разных вариантах разбиений. Примерами методов кросс-валидации являются *k*-fold валидация или «с исключением по одной группе». Для несбалансированных данных используют стратифицированную *k*-fold валидацию, которая сохраняет долю классов в каждой группе тестового набора. Критериями качества для задач классификации служат правильность, чувствительность и специфичность [22].

1.2. Применение метода «отпечатков пальцев»

1.2.1. Анализ и распознавание лекарственных средств

Методы отпечатков пальцев могут быть полезным инструментом при анализе поддельных лекарств, поскольку они дают целостное представление об образце, а не фокусируются на конкретных заранее определенных соединениях. Как Европейская, так и Американская фармакопеи используют инфракрасные (ИК) спектры для сравнения областей спектральных отпечатков, полученных из образцов, с эталонными спектрами [23],[24]. На такие спектральные отпечатки влияют все соединения, присутствующие в образцах, поскольку образцы анализируются целиком, без учета распространения информации во времени. Для различения поддельных лекарств по их «отпечаткам пальцев» необходима эталонная база данных подлинных лекарств, однако таких баз данных мало. В идеале должны быть разработаны глобальные базы данных, доступные и совместимые с различными устройствами.

Многие исследования, посвященные анализу поддельных лекарств, основаны на идентификации и определении активного действующего вещества (АДВ). Основным недостатком данного подхода заключается в том, что препараты, содержащие действующее вещество в правильной дозировке, могут считаться безопасными, в то время как в них могут присутствовать потенциально токсичные компоненты, такие как примеси и остатки растворителей. Методы отпечатков пальцев также могут быть полезными для обнаружения поддельных лекарств, поскольку они анализируют не только содержащееся действующее вещество. В литературе описаны как хроматографические, так и спектроскопические методы получения «отпечатков пальцев», кроме того, есть примеры использования «электронного языка». Далее рассмотрим более подробное применение некоторых методов.

Высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) в комбинации с различными способами детектирования часто используют для обнаружения поддельных лекарственных средств. Например, авторы [25] исследовали возможность различения чистого и фальсифицированного препарата морфина с помощью ВЭЖХ-МС. Многомерный анализ полученных отпечатков позволил различать различные классы морфина в зависимости от происхождения. Обнаружению поддельного морфина мешают входящие в его состав алкалоиды. База данных с хроматографическими отпечатками морфина может быть использована для идентификации происхождения образца и, таким образом, для выявления фальсификаций. Показано применение ВЭЖХ [26] для различения подлинных и фальсифицированных образцов препарата на основе цитрата силденафила, а также его дженериков с помощью метода ВЭЖХ с двумя детекторами: диодно-матричным и масс-спектрометром. Для каждого вида детектирования получили несколько видов отпечатков образцов и протестировали, какой из наборов данных даст лучшее качество классификации. Выяснили, что хорошее различение возможно при использовании отпечатков масс-спектров в комбинации с ПЛС-ДА, а также отпечатков, полученных с помощью диодно-матричного детектора при 254 нм в комбинации с методами k ближайших соседей (kNN) и формального независимого моделирования аналогий классов (SIMCA). Однако безошибочная классификация была достигнута при комбинации данных, полученных с помощью этих двух детекторов и обработкой данных методом kNN. В другой работе [27] авторы проанализировали набор из 209 образцов того же препарата, а также дженерики, поддельные образцы и образцы плацебо, методом инфракрасной спектроскопии с ослабленным полным отражением и преобразованием Фурье (ATR-FTIR), используя

полученные спектры в качестве отпечатков пальцев. Хемометрический анализ включал метод главных компонент (МГК), метод kNN, деревья классификации и регрессии и метод SIMCA. В данном случае метод kNN показал наихудшие результаты, а метод SIMCA наилучшие.

Метод «отпечатков пальцев», используемый в спектроскопии, также применяется для анализа лекарственных веществ. Показана возможность использования УФ-видимой спектроскопии для различения трех химиотерапевтических препаратов – доксорубина, даунорубина и эпирубина с использованием клинически значимых диапазонов концентраций, приготовленных в 0.9% растворах NaCl [28]. Применение метода ПЛС-ДА к данным УФ-видимой спектроскопии показало идеальную дискриминацию трех препаратов с чувствительностью и специфичностью 100%.

УФ-видимую спектроскопию использовали для различения лекарственных препаратов, включая дженерики с одинаковым действующим веществом, но разными вспомогательными веществами, а также подделки [29]. Исследовали препараты флуоксетина и ципрофлоксацина из разных партий. Показали, что предложенный метод в сочетании с методами МГК и SIMCA эффективен для распознавания различных составов дженериков и импортных препаратов с незначительно различающимися составами.

Существуют методы анализа лекарств, основанные на различных видах спектроскопии (БИК, рамановская, флуоресцентная, спектроскопия ЯМР). Например, «отпечатки пальцев», полученные с помощью БИК- и рамановской спектроскопии использовали для различения подлинных и поддельных препаратов для снижения уровня холестерина [30]. Классификация, основанная на моделях ПЛС-ДА, оказалась успешной для обеих спектроскопических методик, независимо от того, использовались ли в качестве действующего вещества аторвастатин или ловастатин. Кроме того, метод может быть также применен для различения аторвастатина и ловастатина, используемых в подделках, протестированных в данном исследовании. Дискриминационная способность модели, основанной на БИК-спектроскопии, в значительной степени зависит от спектральных различий матрицы таблетки, что связано с высокой поглощающей способностью вспомогательных веществ. Недостатком рамановской спектроскопии является то, что это, в основном, поверхностный метод. В результате спектры поверхности и ядра таблетки могут различаться. Однако устойчивость моделей ПЛС-ДА оказалась достаточно высокой, чтобы обеспечить надежную дискриминацию. В работе [31] создали базу данных БИК- и рамановских спектров как фальсификатов,

так и подлинного продукта. Применили метод МГК и иерархический кластерный анализ для выявления спектральных классов. Далее сравнили несколько методов «с учителем» (kNN, ПЛС-ДА, искусственные нейронные сети) для предсказания принадлежности образца к известному классу. Еще один пример использования рамановской спектроскопии в комбинации с МГК для обнаружения поддельных лекарственных препаратов представлен в [32]. Предложенная система идентификации была протестирована на 7 видах (40 партиях) гипогликемических таблеток и 12 распространенных фармацевтических вспомогательных веществах. Общая чувствительность, специфичность и правильность распознавания составили 97%, 97% и 96% соответственно. Авторы [33] предложили использовать портативную БИК-спектроскопию в сочетании с методами МГК и SIMCA для аутентификации подлинных антибиотиков и их дженериков. Всего зарегистрировали спектры 23 препаратов, которые можно разделить на 6 классов в соответствии с действующим веществом: амоксициллин, клавулановая кислота, азитромицин, ципрофлоксацин, доксициклин и офлоксацин. Удалось различить подлинные препараты и дженерики, а также классифицировать их на основе источника их производства.

Многомерную флуоресцентную спектроскопию в сочетании с хемометрикой использовали для быстрого обнаружения, различения и определения пенициллина, сульфадиазина и тетрациклина в молоке [34]. Применили метод МГК для визуализации различий между образцами по типу и концентрации антибиотика, правильность была близка к 100%. Установили, что предел обнаружения при использовании предложенного метода ниже, чем максимально допустимый уровень концентрации антибиотика в молоке.

Спектроскопию ATR-FTIR применили для обнаружения просроченных таблеток антибиотиков [35]. Хемометрический анализ был основан на последовательной предварительной обработке данных путем ортогонализации с последующим ЛДА. При анализе таблеток Аугментина, состоящих из амоксициклина и клавулановой кислоты, была достигнута 93% правильность классификации, что соответствовало одному неправильно классифицированному образцу из 15.

В работе [36] использовали спектроскопию ЯМР ^1H для различения чистого свиного гепарина и свиного гепарина, смешанного с бычьим гепарином, а также для количественной оценки степени такой фальсификации. С применением методов ПЛС-ДА и ридж-регрессии (RR) было возможно оценить степень добавки бычьего гепарина

к образцам свиного гепарина с пределом обнаружения 2% и среднеквадратичной ошибкой валидации (RMSEV) 1%.

Для обнаружения остатков антибиотиков в коровьем молоке был разработан вольтамперометрический электронный язык [37]. Шесть антибиотиков (хлорамфеникол, эритромицин, канамицин, неомицин, стрептомицин и тетрациклин), добавленные в четырех различных концентрациях (0.5, 1, 1.5 и 2 максимальных предела остаточного содержания), были классифицированы на основе данных электронного языка с помощью двух методов: анализа главных компонент (МГК) и дискриминантного анализа (ДА). Для оценки концентраций антибиотиков использовались три регрессионные модели: регрессия на основе проекций на латентные структуры (ПЛСР), метод наименьших квадратов с опорными векторами и регрессионный анализ на главные компоненты (РГК), который показал лучшие результаты.

1.2.2. Распознавание напитков

Контроль качества, аутентификация и выявление фальсификатов пищевых продуктов и напитков являются приоритетными задачами в пищевой индустрии. Потребители напитков сталкиваются с такими проблемами, как некачественное сырье, контрафактная продукция, разбавление, нарушение технологий производства, подделка географического происхождения. Традиционные аналитические методы, помимо их сложности и дороговизны, часто оказываются недостаточно эффективными для решения подобных проблем, особенно в случае сложных матриц, где подделку сложно обнаружить по ограниченному набору показателей. Одним из подходов к решению этих задач могут стать методы отпечатков пальцев, поскольку они не требуют предварительного знания о том, какие именно параметры важны для решения конкретной задачи. Метод применим в нескольких областях: выявление фальсификатов, аутентификация географического происхождения, идентификация производителя, контроль технологии производства. Наиболее распространенные методы получения «отпечатков пальцев» включают методы на основе жидкостной или газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией, спектроскопические методы, электронный язык и электронный нос. Ниже рассмотрены некоторые примеры использования этих методов для анализа напитков.

Масс-спектрометрию высокого разрешения использовали для получения химических отпечатков образцов вина для их различения по сорту винограда (каберне совиньон, мерло, пино-нуар) [38]. Для изучения структуры данных и построения

классификационных моделей использовали методы МГК и ПЛС-ДА. Всего проанализировали 51 образец; модель, основанная на методе ПЛС-ДА, позволила классифицировать образцы с 96%-ной правильностью.

Проверка сорта винограда с помощью химико-аналитических методов является одной из главных задач аутентификации вина. ГХ-МС с использованием микроэкстракции применили для различения сортов винограда на основе анализа летучих соединений [39]. Для демонстрации осуществимости выбранной стратегии выбрали вина из четырех красных сортов винограда, всего было исследовано 118 вин из разных стран. На первом этапе с помощью метода МГК проверили, различаются ли сорта визуально на графиках счетов. В качестве метода многоклассовой классификации применили нестандартный подход – попарное моделирование (one-vs-one), объединенное с деревом решений. Такая стратегия позволила классифицировать образцы с 98%-ной правильностью, при этом для валидации использовали внешний набор данных. Кроме того, применили метод SIMCA, который обеспечил 80-87% правильных соотношений для трех сортов винограда.

Исследовали возможность применения отпечатков, полученных с помощью масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС), для классификации вин в зависимости от типа почвы виноградника [40]. Авторы выясняли возможность различения вин, произведенных на относительно небольшой географической территории с разным типом почв. Результаты показывают, что классификация вин из разных хозяйств (120 вин, из них 93 красных и 27 белых, из 23 виноделен) возможна с использованием данных элементного и многомерного статистического анализа, основанного на сочетании метода МГК, кластерного анализа и дискриминантного анализа. Кроме того, вина классифицировали по месту производства, поскольку тип почв влияет на микроэлементный состав вина.

Еще один пример распознавания образцов вина представлен в работе [41]. Авторы предложили использовать спектроскопию ЯМР ^1H в качестве молекулярных отпечатков образцов нескольких вин Ламбруско с защищенным наименованием места происхождения для оценки подлинности и контроля качества. Метод МГК был применен к полному спектру ЯМР, однако с помощью этого метода обработки данных не удалось различить вина по их сортовому происхождению. Поэтому авторы применили метод «с учителем», а именно ПЛС-ДА, для построения модели, которая позволила им классифицировать образцы вина по трем сортам винограда с правильностью 95%, чувствительностью и специфичностью 72%.

В работе [42] сравнили четыре варианта метода «отпечатков пальцев» для различения двух сортов итальянского красного вина из одного региона и одного года урожая. Исследование проводили на 59 образцах, применяя БИК-спектроскопию, УФ-видимую спектроскопию, электронный нос (масс-спектрометрия) и электронный язык (циклическая вольтамперометрия). Целью было определить, какой из методов позволяет проще, быстрее и дешевле различать образцы по сорту винограда. После предварительной обработки данных применили метод МГК для визуальной оценки и метод ЛДА с кросс-валидацией для оценки правильности распознавания. Наилучшие результаты показала УФ-видимая спектроскопия: правильность распознавания составила 96.6%; БИК-спектроскопия дала 93.2% правильных соотнесений. Правильность распознавания с использованием электронного языка составила 85%, а электронный нос показал худшие результаты (80%). Объединение данных БИК- и УФ-видимой спектроскопии позволило незначительно улучшить правильность до 98.3%. Авторы пришли к выводу, что спектроскопические методы наиболее эффективны для данной задачи.

Кофе относится к напиткам, качество которых часто не соответствует заявленным характеристикам. Для того, чтобы гарантировать потребителям географическое происхождение кофе, его состав и высокие вкусовые качества необходимы быстрые и эффективные аналитические методы. Хроматография является широко применяемым методом для получения «отпечатков пальцев» образцов кофе. Например, метод ВЭЖХ в комбинации с МГК использовали для выявления фальсификатов кофе [43]. Метод позволил определять 5% добавки к натуральному кофе (соя, маш или кофейная гуща), однако не удалось достоверно определить тип добавки. ВЭЖХ с ультрафиолетовым и флуоресцентным детекторами использовали для одновременного получения отпечатков флуоресценции и поглощения [44]. Данные обрабатывали методом ПЛС-ДА для классификации растворимого кофе, растворимого кофе без кофеина и порошка цикория. Результаты продемонстрировали высокую эффективность классификации с значением R^2 более 0.999 и ошибкой калибровки в пределах 0.8%. Авторы применили тот же подход для обнаружения цикория и ячменя в кофе и для различения смесей кофе [45,46]. Правильность классификации методом ПЛС-ДА в обоих случаях составила 100%. Метод ГХ-МС с твердофазной экстракцией использовали для обнаружения добавки ячменя к кофе [47]. С помощью анализа МГК обнаружили 1% ячменя в кофе темной обжарки. ГХ-МС в комбинации с ПЛС-ДА использовали для классификации образцов кофе разного географического

происхождения [48]. В [49] использовали ГХ-МС, электронный нос и электронный язык для различения кофейных зерен, подвергнутых сушке при различных условиях. МГК и кластерный анализ позволил четко различить 5 типов образцов.

Существуют работы по использованию спектроскопических «отпечатков пальцев» для анализа кофе. УФ-видимую спектроскопию применили для оценки уровня фальсификации жареного кофе кукурузой [50]. Спектральные данные для образцов, содержащих 10-50% кукурузы, были получены в диапазоне 250-400 нм. Для прогнозирования уровня фальсификации использовали три метода многомерной регрессии: регрессия на основе проекций на латентные структуры (ПЛСР), множественная линейная регрессия (МЛР) и регрессия на главные компоненты (РГК). БИК-спектроскопию в комбинации с МГК использовали для обнаружения нескольких распространенных примесей кофе сорта арабика (кукуруза, ячмень, соя, рис, кофейная шелуха и кофе сорта робуста) [51]. Авторы показали, что спектральные отпечатки позволяют распознать чистые образцы от фальсифицированных при наличии примесей в концентрации $\geq 10\%$. Использование БИК-спектроскопии позволило авторам [52] установить географическое и генотипическое происхождения зерен кофе. Полученные спектры обработали методом ПЛС-ДА и получили модель, способную идентифицировать 94% образцов.

Фруктовые соки относятся к наиболее часто фальсифицируемым продуктам. Наиболее распространенные виды подделок – это разбавление водой, добавление сахаров или менее ценных соков. Контроль качества соков важен не только для предотвращения мошенничества, но и для обеспечения безопасности, поскольку некачественные продукты могут содержать вредные добавки или аллергены. Традиционные методы анализа не всегда позволяют выявить сложные виды фальсификации, особенно если подделка имитирует натуральный состав. Методы «отпечатков пальцев» за счет получения комплексного состава образца позволяют различать сорта, происхождение, способы обработки сока и выявлять отклонения от заявленной нормы.

Разработаны методы распознавания соков на основе содержащихся в них летучих соединений. Например, использовали газовую хроматографию с паровым анализом в сочетании с масс-спектрометрией или спектрометрией ионной подвижности (СИП) для оценки качества лимонного сока [53]. Провели идентификацию образцов сока на основе общего содержания летучих соединений. Полученные данные использовали для построения хемометрических моделей с использованием ортогонального

дискриминантного анализа на основе проекций на латентные структуры (ОПЛС-ДА) для различения лимонных соков в зависимости от сорта лимонов, использованного при их производстве. Газовую хроматографию с парофазным анализом в сочетании с масс-спектрометрией и СИП также использовали для анализа летучих соединений цитрусовых соков, включая грейпфрутовый, красный апельсиновый и обычный апельсиновый [54]. С помощью МГК выявили различие между апельсиновыми и грейпфрутовыми соками. Кроме того, на основании данных СИП выявили различие между грейпфрутовыми соками, изготовленными из концентрата, и свежавыжатыми; данные МС позволили отличить соки из красного апельсина от обычных апельсиновых. Кроме того, для точной идентификации типа сока к полученным данным МГК применяли алгоритмы ЛДА, метода опорных векторов и метода k ближайших соседей. Лучшие результаты были получены с помощью метода ЛДА с кросс-валидацией с правильностью классификации 96.9% и 94.5% для данных СИП и МС, соответственно. «Отпечатки пальцев», полученные с помощью ГХ-МС, использовали для сравнения трех методов пастеризации апельсинового сока (традиционной термической, обработки высоким давлением и импульсным электрическим полем) [55]. Для обработки данных использовали методы МГК и ПЛС-ДА. Сразу после пастеризации значительных различий между технологиями выявлено не было, однако в процессе хранения можно было выявить различия между соками, обработанными термически или высоким давлением, и соками, обработанными электрическим полем. Авторы объясняют такое различие разной степенью инактивации ферментов.

Предложен метод получения отпечатков нескольких типов фруктовых соков, приготовленных из дорогих (апельсиновый) или относительно недорогих (яблочный, грейпфрутовый) фруктов, с применением ВЭЖХ-МС [56]. После автоматизированного анализа и предварительной обработки данных оценили пригодность многомерных данных ВЭЖХ-МС для классификации фруктовых соков и обнаружения фальсификатов с использованием хемометрических методов (МГК и ЛДА). Помимо трех исходных групп фруктовых соков (классов), в модели ЛДА использовали два дополнительных класса образцов, представляющих собой приготовленные в лаборатории смеси соков из апельсина и яблока, а также из апельсина и грейпфрута. Чтобы избежать переобучения модели ЛДА, в качестве входных данных использовали 19 главных компонент метода МГК. Правильность распознавания с использованием кросс-валидации составила 100%, в то время как правильность прогнозирования принадлежности образцов составила 94%. Конечная модель ЛДА позволила надежно обнаружить добавление 15% яблочного и

грейпфрутового сока в апельсиновый сок, а также присутствие 10% апельсинового сока в грейпфрутовом и яблочном соке.

Спектроскопические методы также применяют для анализа соков. Например, УФ-видимую спектроскопию применили для [57] быстрого и эффективного обнаружения фальсификации гранатового сока путем добавления яблочного или виноградного соков или воды. Спектральные характеристики использовали в качестве «отпечатков пальцев», которые обрабатывали методом МГК. Аналогичное исследование представлено в работе [58], в которой авторы изучили эффективность УФ-видимой спектроскопии и ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье для обнаружения фальсификации гранатового сока соками вишни и черной моркови в концентрации от 5% до 25%. Для построения хемометрических моделей применили методы ПЛС-ДА и ОПЛС-ДА, используя 2/3 данных для обучения моделей и 1/3 для валидации. Для обоих методов правильность классификации образцов фальсифицированного и настоящего сока составила 97%.

В работе [59] для решения проблемы фальсификации сока лайма предложили использовать два портативных спектрометра: в видимой и БИК-области (400-1000 нм) и в ИК-области (900-1700 нм). Для обучения моделей готовили образцы сока с содержанием лимонной кислоты от 1% до 40%, чтобы имитировать фальсификацию. Для обработки данных использовали метод SIMCA. Использование химических отпечатков, полученных в видимой и БИК-областях, позволило достичь 91% правильности, 100% чувствительности и 82% специфичности. Отпечатки, полученные в БИК-области, показали лучшие результаты: правильность 95%, чувствительность 100% и специфичность 90%. Модели на основе метода ПЛС-ДА и метода опорных векторов не дали существенного улучшения.

Целью исследования [60] была оценка применимости отпечатков, полученных в видимой, ближней ИК и в средней ИК-областях спектра, для распознавания образцов сока из двух сортов винограда (Шардоне и Рислинг). Для классификации применили методы МГК и ЛДА с кросс-валидацией с исключением по одному образцу. С использованием всех данных удалось классифицировать от 80% до 86% образцов сока по сортам.

Предложен подход к аутентификации фруктовых соков с помощью дифференциальной импульсной вольтамперометрии в комбинации с хемометрикой [61]. Исследовали 70 фруктовых соков. Пробоподготовка заключалась в центрифугировании образцов и добавлении к ним соляной кислоты для получения кислой среды.

Электрохимические отпечатки обработали методом МГК, что позволило различить группы различных соков на графиках счетов. В качестве методов «с учителем» использовали методы ПЛС-ДА и МГК-ЛДА, чтобы оценить качество дискриминации. Модель ПЛС-ДА позволила лучше распознать образцы апельсинового сока, чем модель ЛДА, с правильностью 94% и чувствительностью 100%. Кроме того, с помощью метода ПЛС-ДА возможно было отличать поддельные образцы апельсинового сока от настоящих с правильностью 100%.

Авторы работы [62] применили электронный язык на основе массива датчиков, включающих ионоселективные транзисторы, датчик проводимости и температуры для классификации 13 марок минеральной воды. Полученные данные обрабатывали с помощью иерархического кластерного анализа и МГК. Для построения модели классификации также применили метод SIMCA, который обеспечил 100% правильность соотнесения неизвестного образца.

В табл. 1 приведены описанные в данном разделе методы «отпечатков пальцев» с различными подходами к обработке данных и их применение к распознаванию напитков.

Таблица 1. Сводные данные по описанным в разделе методам «отпечатков пальцев» для распознавания напитков

№	Объект	Метод получения отпечатков	Метод обработки данных	Ссылка
1	Вино	МС высокого разрешения	МГК, ПЛС-ДА	[38]
2		ГХ-МС	МГК, SIMSA, дерево решений	[39]
3		ИСП-МС	МГК, КА*, ЛДА	[40]
4		ЯМР ¹ H	МГК, ПЛС-ДА	[41]
5		УФ-видимая, БИК спектроскопия, электронный нос, электронный язык	МГК, ЛДА	[42]
6	Кофе	ВЭЖХ	МГК	[43]
7		ВЭЖХ	ПЛС-ДА	[44–46]
8		ГХ-МС	МГК	[47]
9		ГХ-МС	ПЛС-ДА	[48]
10		ГХ-МС, электронный нос, электронный язык	МГК, КА*	[49]
11		УФ-вид спектроскопия	Многомерная регрессия	[50]
12		БИК-спектроскопия	МГК	[51]
13		БИК-спектроскопия	ПЛС-ДА	[52]
14	Лимонный сок	ГХ-МС	ОПЛС-ДА	[53]
15	Грейпфрутовый сок	ГХ-МС, СИП	МГК, ЛДА	[54]
16	Апельсиновый сок	ГХ-МС	МГК, ПЛС-ДА	[55]
17	Фруктовые соки	ВЭЖХ-МС	МГК, ЛДА	[56]
18	Гранатовый сок	УФ-вид спектроскопия	МГК	[57]
19		УФ-вид спектроскопия, ИК-спектроскопия с ПФ**	ПЛС-ДА, ОПЛС-ДА	[58]
20	Сок лайма	Вид, БИК-спектроскопия	SIMSA, ПЛС-ДА	[59]
21	Виноградный сок	Вид, ИК спектроскопия	МГК, ЛДА	[60]
22	Фруктовые соки	Вольтамперометрия	МГК, ПЛС-ДА, ЛДА	[61]
23	Минеральные воды	Электронный язык	МГК, SIMSA	[62]

*КА – кластерный анализ

**ПФ – преобразование Фурье.

1.2.3. Распознавание природных объектов

Контроль качества воды, идентификация источников загрязнения, оценка их происхождения и степени загрязнения являются важными задачами в экологическом мониторинге. Традиционные подходы (измерение pH, электропроводности, концентрации отдельных ионов, тяжелых металлов или органических веществ) часто не позволяют в полной мере охарактеризовать состояние воды. Анализ, ориентированный на обнаружение только известных загрязнителей, не гарантирует обнаружение неожиданных или неизвестных соединений. Изменение концентрации нескольких показателей не всегда отражает качество воды или позволяет идентифицировать конкретный источник загрязнения. Альтернативой или дополнением к традиционным подходам являются методы «отпечатков пальцев», которые отражают суммарное содержание всех компонентов без их предварительной идентификации или разделения. Наиболее часто применяют спектроскопические методы, хроматографию и масс-спектрометрию. Ниже рассмотрены некоторые примеры применения метода «отпечатков пальцев» для анализа образцов воды.

Авторы [63] применили нецелевой анализ на основе масс-спектрометрии высокого разрешения для анализа источников загрязнения воды. Всего проанализировали 51 образец воды, загрязненной из пяти типов источников: сельскохозяйственные воды, верховья рек, навоз, муниципальные сточные воды и городские ливневые стоки. Для анализа данных использовали алгоритм опорных векторов, с помощью которого удалось не только классифицировать источники загрязнения, но и обнаруживать их даже при 10000 кратном разбавлении.

Предложен подход к определению источника воды (реки, опресненная морская вода или подземные воды) в системе водоснабжения с помощью УФ-видимого спектроскопического зонда [64]. Собрали 37 физико-химических параметров воды стандартными лабораторными методами и применили метод МГК для классификации источников. Далее проверили, можно ли заменить сложный анализ УФ-видимым зондом, который дает спектральные «отпечатки». Распознавание улучшалось, если к спектральным данным добавить всего три дополнительных параметра: электропроводность, концентрации фторидов и бромидов.

Флуоресцентную спектроскопию использовали для выявления источников загрязнения подземных вод в районах животноводства [65]. Получили флуоресцентные отпечатки растворенного органического вещества и применили иерархический

кластерный анализ для различения образцов по степени загрязнения. Метод МГК, объясняющий 92% дисперсии данных, выявил, что именно степень загрязнения в большей степени влияет на интенсивность флуоресценции. Показано применение УФ-видимой спектроскопии для распознавания образцов воды, загрязненных бактериями и чистых образцов [66]. Для характеристики спектральных данных в диапазоне 200-900 нм использовали анализ главных компонент методом Монте-Карло, который позволил различить разные виды бактерий. Кроме того, с помощью нейронных сетей удалось установить концентрацию загрязняющих бактерий. УФ-видимую спектроскопию использовали для различения канализационных вод из разных источников [67]. Образцы отбирали и тестировали в реальном времени; было выделено четыре типа в соответствии с местами отбора проб и условиями окружающей среды. Для усиления отклика использовали производный спектр, а для нелинейной классификации разработали алгоритм сверточной нейронной сети. Протестировали три типа данных: исходный спектр, его первую производную и их комбинацию. Результаты показали, что нейронная сеть, использующая в качестве входных данных первую производную и исходные данные, обеспечивает наилучшую правильность классификации бытовых сточных вод, смешанных дождевых и бытовых вод, дождевой воды и промышленных сточных вод. Правильность распознавания источника промышленных сточных вод составила 100%, а бытовых сточных вод и дождевых вод – превысила 90%.

В работе [68] использовали нейронную сеть с радиально-базисной функцией для обработки УФ-видимых спектров поверхностных вод. Нейронная сеть была необходима, поскольку в поверхностных водах из-за рассеяния света поглощение имеет нелинейную зависимость от концентрации аналита. Идентифицировали смешанные химические загрязнители в источниках загрязнения поверхностных вод и определили их пропорции. Правильность обнаружения промышленных стоков в смеси из трех загрязнителей достигала 95%.

Еще один пример применения УФ-видимой спектроскопии представлен в [69]. Авторы показали возможность различения образцов, отобранных на очистных сооружениях топливной фабрики, путем предварительной идентификации загрязняющих веществ с помощью метода МГК и кластерного анализа. На графиках счетов МГК выделили две группы: образцы, поступающие в биологический реактор, и очищенные сточные воды. Кроме того, можно различить образцы, собранные в будни и в выходные дни. Метод МГК и кластерный анализ также позволили предварительно идентифицировать используемые технологические химикаты (смазочные материалы и

моющие средства) в качестве остаточных загрязняющих веществ в очищенных сточных водах.

Электронный нос и электронный язык применили для оценки загрязнения сточных вод, собранных на разных этапах очистки на очистных сооружениях, обрабатывающих бытовые и промышленные сточные воды [70]. Для обработки данных использовали МГК, ЛДА, метод опорных векторов и иерархический кластерный анализ. Удалось различить чистую и загрязненную воду, а также образцы сточных вод, собранные на разных стадиях очистки на очистных сооружениях. Результаты иерархического кластерного анализа показали, что электронный язык более эффективен, чем электронный нос, для прогнозирования физико-химических параметров образцов.

Электронный нос использовали для анализа параметров качества воды и концентрации запаха сточных вод [71]. Для распознавания образцов сточных вод, отобранных в разных местах, применили метод опорных векторов и метод ЛДА, что позволило достичь правильности 99%. Концентрация запаха и параметры качества воды были спрогнозированы с помощью ридж-регрессии.

1.2.4. Оценка доз облученных продуктов

Обработка пищевых продуктов различными видами излучения (гамма-лучи, высокоэнергетические электронные пучки и рентгеновские лучи) позволяет повысить их безопасность за счет подавления способности патогенных микроорганизмов к размножению при сохранении полезных свойств и органолептических характеристики продуктов. Это продлевает срок хранения продуктов в результате подавления микрофлоры, вызывающей порчу, и предотвращает заболевания, передающиеся через пищу. Облучение пищевых продуктов может быть также полезным для предотвращения прорастания корнеплодов и семян, для стимулирования их прорастания, а также для задержки созревания овощей и фруктов. В зависимости от типа продукта и желаемого эффекта используют различные дозы: 5–50 Гр применяют для стимуляции прорастания растений и семян; дозы до 1 кГр используют для замедления созревания или прорастания свежих фруктов и овощей; дозы 1–10 кГр используют для подавления патогенных микроорганизмов и улучшения технологических свойств свежей и замороженной рыбы и морепродуктов, грибов, сырой или замороженной птицы и мяса. Высокие дозы (более 10 кГр) используют для стерилизации мяса, птицы, морепродуктов путем инактивации ферментов и для микробной дезинфекции специй и приправ [72].

Законодательство большинства стран обязывает производителей маркировать облученные продукты, поэтому для предотвращения мошенничества важно проверять дозу, полученную продуктом, после обработки. Превышение установленной дозы может привести к негативным последствиям, таким как образование токсичных веществ и ухудшение органолептических свойств. Недостаточная доза облучения может привести к сохранению патогенных микроорганизмов и риску заболеваний, а также быстрой порче продукта и, как следствие, к экономическим потерям. Обычно поглощенную дозу контролируют в процессе облучения, однако для подтверждения факта облучения и соблюдения нормативов необходимы надежные аналитические методы, позволяющие идентифицировать факт облучения продуктов и дозу после окончания радиационной обработки.

Метод отпечатков пальцев редко применяли для определения порядка поглощённой дозы в продуктах. Ниже описаны существующие методы обнаружения факта облучения продуктов и определению порядка поглощенной дозы в них.

Традиционно для анализа облученных продуктов в качестве маркеров облучения используют 2-алкилциклобутаноны [73–76]. Европейские стандарты EN 1784:2003 и 1785:2003 позволяют выявлять химические изменения в липидном составе пищевого продукта во время облучения. Регламентируемый стандартами метод основан на сочетании газохроматографического разделения и масс-спектрометрического или пламенно-ионизационного обнаружения радиационно-индуцированных 2-алкилциклобутанонов. В работе [77] предложили использовать в качестве альтернативного маркера 2-додецилциклобутанон, который образуется в жирах при облучении. Применили метод твердофазной микроэкстракции из газовой фазы в сочетании с ГХ-МС. Оценили применимость метода на мясе курицы, индейки, утки, говядины и свинины, облученных рентгеновским излучением дозами 0.05, 0.12, 0.5, 1.0 и 3.0 кГр. Минимально определяемая доза составила 0.5 кГр. ГХ-МС применили для изучения влияния дозы облучения на образование углеводов в семенах арахиса, кунжута и льна, облученных дозами 2, 4, 6 и 8 кГр [78]. Во всех образцах, даже облученных минимальной дозой, было обнаружено 9 углеводов, однако их количество отличалось в зависимости от вида семян и возрастало с увеличением дозы. Авторами [79] разработан метод обнаружения факта облучения курицы и продуктов из куриного мяса, основанный на экстракции жира и последующем анализе углеводов, образующихся из жирных кислот при облучении, методом ГХ-МС. Эти углеводы были обнаружены только в облученных образцах с поглощенными дозами 5 и 10 кГр.

Предложен метод обнаружения облученных замороженных креветок, ломтиков трески и очищенных от раковин устриц, основанный на газохроматографическом анализе водорода и монооксида углерода, выделяющихся в облученных продуктах [80]. Удалось отличить облученные замороженные креветки от необлученных, хранившихся в течение 3 месяцев после облучения, в диапазоне доз 1.1 – 8.8 кГр, а облученные замороженные ломтики трески и устрицы можно различить в течение как минимум 2 месяцев при дозах 1.4 – 5.5 и 1.2 – 6.0 кГр, соответственно.

Недостатки методов, основанных на выявлении маркеров облучения с помощью газовой хроматографии, – длительный срок выполнения и использование больших объемов органических растворителей (гексана), дорогостоящего оборудования и необходимость квалифицированного персонала. Также фоновые углеводороды влияют на обнаружение облученных продуктов, что требует проверки конкретных продуктов на наличие углеводородов, поскольку маркеры различаются от продукта к продукту. Этим методом невозможно выявить облученный продукт при содержании в нем жира менее 1% по массе или при облучении дозой менее 100 Гр.

Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) – неразрушающий метод анализа широкого спектра продуктов, позволяющий относительно быстро и просто обнаруживать облученные образцы. Метод основан на регистрации сигнала свободных радикалов, образующихся при облучении в костях, целлюлозе и сахарах. Однако стабильность свободных парамагнитных радикалов, а следовательно, и интенсивность сигнала ЭПР, может уменьшаться со временем. Кроме того, на результат влияют содержание воды и наличие костей или твердых фрагментов в продукте [72]

Метод ЭПР использовали для измерения количества свободных радикалов, образующихся в костной ткани курицы под воздействием гамма-излучения [81]. Установили, что выход радикалов пропорционален поглощенной дозе. Проверили способность метода обеспечивать точную оценку дозы в диапазоне 0.5 – 7.4 кГр. Линейная аппроксимация данных позволяет оценить дозы для костей, облученных дозой <2 кГр, но оказывается неэффективной при более высоких дозах. Также авторы [82] исследовали зависимость интенсивности сигнала ЭПР на трех различных уровнях дозы (0.5, 3.0, 7.0 кГр) в течение 20 дней, а доза оценивалась для каждого уровня через 1, 8 и 20 дней после облучения. Было установлено, что время хранения образцов (до 20 дней после облучения) не оказывало негативного влияния на оценку дозы для костей при 0.5 и 3.0 кГр и лишь умеренно влияло на оценку дозы при 7.0 кГр. ЭПР также применили

для обнаружения облученной курицы с поглощенной дозой в диапазонах 0 – 10 кГр и 0 – 22 кГр [83]. Было установлено, что интенсивность сигнала линейно зависит от поглощенной дозы в диапазоне 0 – 10 кГр, а исследования стабильности образца, хранившегося при 4°C, показали снижение интенсивности сигнала ЭПР примерно на 10%.

ИК-спектроскопию с преобразованием Фурье и дифракцию рентгеновских лучей использовали для анализа гидроксиапатита из куриных костей, облученных электронами [84]. Все образцы показали линейную зависимость сигнала от приложенной дозы.

Выполнены работы по нетаргетному анализу облученных продуктов. Так, авторы провели нецелевой скрининг летучих соединений, содержащихся в сырах моцарелла [85], робиола [86], бри и камамбер [87], облученных рентгеновским излучением. Образцы были облучены дозами 1, 2 и 3 кГр в случае сыров моцареллы и робиолы и 2, 4 и 6 кГр в случае бри и камамбера. Использовали метод твердофазной микроэкстракции: навеску образца (5 г) экстрагировали при температуре 50 °С в течение 75 мин. Для выявления закономерностей и идентификации выбросов использовали метод МГК. Для изучения полученных профилей применили методы ЛДА и ПЛС-ДА, которые показали высокие значения правильности распознавания, чувствительности и специфичности.

Влияние гамма-излучения на профиль летучих соединений облученного сыра халуми изучили в работе [88]. Образцы облучали дозами 3, 5, 7 и 10 кГр, затем анализировали методом ГХ-МС с предшествующей твердофазной микроэкстракцией. Идентифицировали 97 летучих соединений, причем их количество увеличивалось с увеличением дозы облучения. Методы МГК и ПЛС-ДА показали четкое различие образцов в зависимости от дозы.

Проведенный анализ литературы показывает, что существующие методы «отпечатков пальцев» (хроматографические, спектральные, электрохимические) обладают высокой информативностью и позволяют решать широкий круг задач. Однако их применение ограничено рядом недостатков: высокая стоимость, необходимость в сложном дорогостоящем оборудовании и квалифицированном персонале, необходимость пробоподготовки, а также длительное время анализа. Эти недостатки сокращают их применение при необходимости анализа большого количества образцов

или во внелабораторных условиях. Особенно важно преодолеть эти ограничения в областях, где требуются экспрессные, недорогие и простые в проведении методы.

В связи с этим перспективной альтернативой традиционным методам «отпечатков пальцев» является подход, основанный на проведении индикаторных реакций в 96-луночных планшетах с последующей фотографической регистрацией сигнала. Такой метод не требует полноспектрального оборудования и потенциально может быть адаптирован для создания портативных тест-систем. Кроме того, он имеет простой протокол выполнения и невысокую стоимость анализа, что делает его пригодными для массового скрининга.

Исследование в данной работе направлено на разработку и оптимизацию метода «отпечатков пальцев», основанного на индикаторных реакциях.

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1. Реагенты и образцы

В работе использовали карбоцианиновые красители, полученные от Т.А. Подругиной и И.А. Дорошенко, а также коммерчески доступные карбоцианины. Структуры красителей приведены на схеме 1. Красители были синтезированы на кафедре медицинской химии в соответствии с источниками: **акри-278** [89] **кат-24**, **кат-72** [90], **дор-128** [91], **дор-145** [92], **дор-224.1** [93], **дор-249** [94], **дор-255** [95], **дор-250** [96], **акв-22** [92]

Также использовали коммерчески доступные карбоцианины **Cy5.5-COON**, **Cy7-гидразид** (Lumiprobe Rus, Россия), флуоресцеин, иммобилизованный на SiO₂-ПЭИ, полученный согласно [97]. Навески красителей растворяли в 95% этаноле (Брынцалов-А, Москва, Россия) до получения концентрации 1 г/л.

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 вещества:

1) Лекарственные препараты: аминогликозиды: амикацин, гентамицин, неомицин, ванкомицин, фосфомицин, стрептомицин; цефалоспорины: цефотаксим, цефазолин, цефтриаксон, цефоперазон, цефтазидим, цефалотин, цефепим, цефалексим; сульфаниламиды: сульфадиазин, сульфаметоксазол, сульфатиазол, сульфаметазин,

сульфаметоксипиридазин, фталилсульфатиазол, сульфаниламид, сульфаклор-пиридазин; фенотиазины: промазин, хлорпромазин, прометазин; пенициллины: бензилпенициллин, ампициллин (Sigma–Aldrich).

2) Серосодержащие соединения: 12-меркаптододекановая кислота, меркаптоянтарная кислота, 4-меркаптобензойная кислота, меркаптобензимидазол, тиоцетамид, липоевая кислота (Реахим).

3) Модельные белки: бычий сывороточный альбумин (БСА) (Sigma, кат. № 9048-46-8), человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) (Sigma, кат. № 70024-90-7), γ -глобулин из крови человека (Fluka, кат. № 9007-83-4), лизоцим из белка куриного яйца (Sigma–Aldrich, кат. № 12650-88-3), пепсин из слизистой оболочки желудка свиньи (Sigma, кат. № 9001-75-6), протеиназа-К из *Tritirachium album* (Sigma, кат. № 39450-01-6).

4) Аминокислоты: глицин, аланин, серин, триптофан, L-цистеин, лейцин, глутамат натрия, глутаминовая кислота (Sigma–Aldrich).

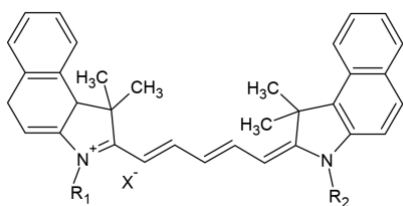
Поверхностно-активные вещества: цетилтриметиламмония бромид (ЦТАБ), додецилсульфат натрия (ДДС), Тритон-X100.

Окислители: пероксид водорода, гипохлорит натрия, периодат калия, нитрит натрия, бромат калия, гидропероксид трет-бутила (t-BuOOH) (5М раствор в *n*-декане).

Другие использованные соединения: натриевая соль ДНК (Деринат, ФЗ Иммунолекс, Россия), мочевины, креатинин, диэтиламин, метиламин, *n*-нитрофенол, фруктоза, глюкоза, фенол, изопропанол, ацетон, ацетальдегид, сукцинат аммония, аскорбат, оксалат, CaCl_2 , NaNO_3 , KCl , MgCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CuSO_4 , CoSO_4 , $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (соль Мора), 3,3'.5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ), KVO_3 .

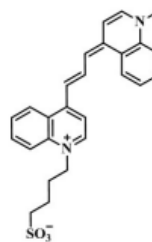
Неорганические соединения производства Реахим и Русхим.

Буферы: фосфатный буферный раствор, pH 6.6 и 7.3 (0.067 М по фосфат-иону), ацетатный буферный раствор pH 5.6 (0.1 М по аниону), водный раствор тетрабората натрия pH 9.2 (0.05 М).

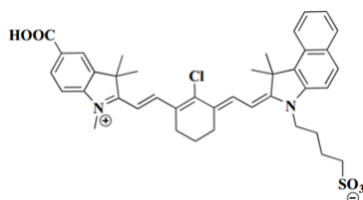


1: $R_1, R_2 = -(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$; $X = \text{Br}^-$

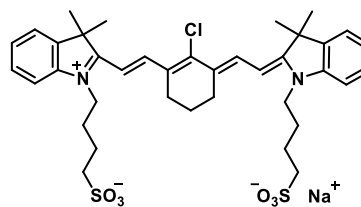
Акри-278



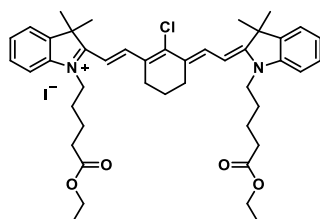
Кат-24



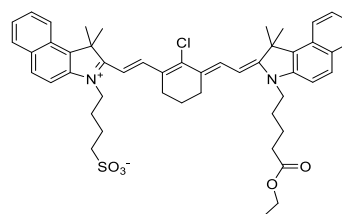
Кат-72



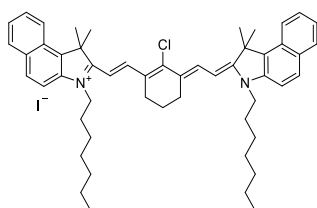
Дор-128



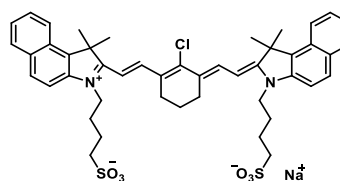
Дор-145



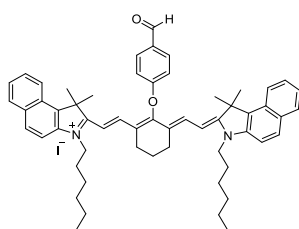
Дор-224.1



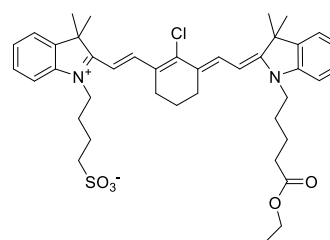
Дор-249



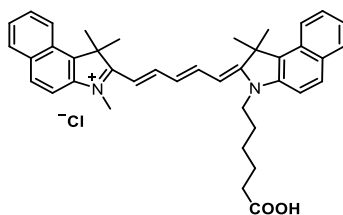
Дор-255



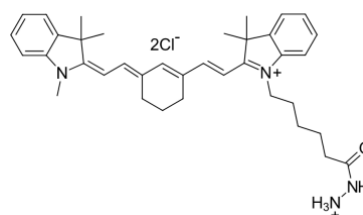
Дор-250



АКВ-22



Cy5.5



Cy7 hydr

Схема 1. Структуры красителей.

2.2. Аппаратура

Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметрах Cary Eclipse (Agilent, США) и Флюорат-02 «Панорама» (Люмэкс, Россия), УФ-видимые спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре СФ-102 (Интерфотофизика, Россия) в кварцевых кюветах длиной 0.2 см. Использовали рН-метр-иономер "Эксперт-001" (Эконикс-эксперт, Россия) с комбинированным рН-полумикроэлектродом ЭСК 10614 (ООО "Измерительная техника"). Образцы экстрагировали на орбитальном шейкере. Для отбора растворов применяли дозаторы на 10 ± 0.5 , 200 ± 1 и 1000 ± 10 мкл. Индикаторные реакции проводили в 96-луночных флуориметрических планшетах (Совтех, Новосибирск, Россия, кат. № М-018). Цифровые фотографии планшетов в видимой и в УФ-областях получали на визуализаторе TLC Vizualizer 2 (Camag, Швейцария). Флуоресценцию в ближней ИК области регистрировали с помощью установки, включающей светодиодный источник (одиннадцать красных светодиодов мощностью 3 Вт, максимум излучения 660 нм; Минифермер, Москва, Россия) и цифровую камеру – модернизированный фотоаппарат Nikon D80 со светофильтром, пропускающим свет с длинами волн более 700 нм (рис. 2).

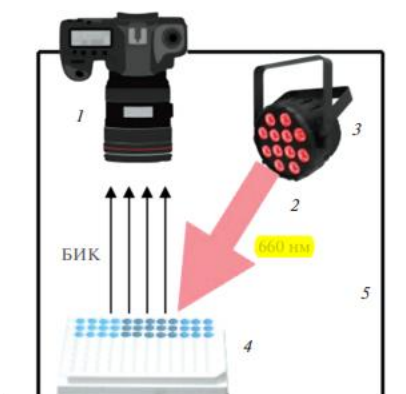


Рис. 2. Установка для регистрации флуоресценции в ближнем ИК-диапазоне: 1 – модернизированный фотоаппарат Nikon D80, 2 – красные светодиоды, 3 – алюминиевый радиатор для отвода тепла, 4 – 96-луночный полистирольный планшет с образцами, 5 – светонепроницаемый кожух.

2.3. Методики проведения индикаторных реакций

Индикаторные реакции проводили в 96-луночных планшетах. Растворы карбоцианиновых красителей концентрацией от 0.025 до 0.1 г/л получали разбавлением водой растворов 1 г/л. В ячейки планшета добавляли с помощью дозаторов буфер, образец, краситель и другие компоненты реакции, объем довели до 300 мкл водой

Millipore. Для каждого образца выполняли 4, 5, 6 или 12 параллельных измерений. Регистрировали изменение поглощения в видимом свете, флуоресценции в УФ-области и флуоресценции в БИК-области каждые несколько минут, пока изменения не становились незначительными (обычно в течение 30–60 мин).

2.4. Альтернативные методы распознавания

Спектры поглощения образцов измеряли с помощью спектрофотометра СФ-102 (Интерфотопизика, Россия) в кварцевых кюветах размером 0.2 см×1.0 см (длина оптического пути 1 см). Поглощение регистрировали в интервале от 900 до 200 нм в 5 параллельных измерениях для каждого образца; спектральные данные обрабатывали в следующих диапазонах: 450–200 нм для печени индейки, 400–200 нм для картофеля, 600–350 нм для куриного мяса, 400–200 нм для соков и 200–400 нм для воды. Спектры флуоресценции были получены на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Agilent Technologies, США) в 96-луночных планшетах в 6 параллельных измерениях (6 лунок планшета) с длинами волн возбуждения и диапазонами эмиссии, указанными в табл. 2 для каждого типа образца, высоким напряжением ФЭУ, «быстрой» скоростью сбора данных (режим “fast”), шириной щели возбуждения и излучения 10 и 20 нм, соответственно. Интенсивность флуоресценции для спектров с добавлением иммобилизованного флуоресцеина регистрировали в диапазоне от 500 до 600 нм для всех образцов при длине волны возбуждения 485 нм.

Таблица 2. Параметры получения собственных спектров флуоресценции образцов облученных продуктов

Образец	Диапазон, нм	Длина волны возбуждения, нм
Печень индейки	400–500	300
Куриное мясо	400–500	340
Картофель	400–600	350
Соки	370–570	350
Воды	350–550	300

3.3'.5.5'-Тетраметилбензидин (ТМБ) окисляли в 96-луночных планшетах периодатом калия [98] или гипохлоритом натрия [99] при pH 6.5; для образцов куриного мяса в качестве окислителя использовали периодат калия, для остальных исследованных образцов (воды, соки, печень индейки и картофель) – гипохлорит натрия. Анализ

антиоксидантной активности по восстановлению железа (FRAP) проводили согласно [100]. В лунки планшета добавляли следующие реагенты: фосфатный буфер (pH 6.6), гексацианоферрат(III) калия (0.03 M) и раствор образца. Затем планшеты нагревали в термостате при 50°C в течение 20 мин, после чего добавляли 6 mM раствор FeCl₃. Реакции FRAP и окисления ТМБ проводили в 96-луночных планшетах, выполняя 6 параллельных измерений для каждого образца. Сигналы измеряли путем получения фотографических изображений в видимом диапазоне три раза в течение одного часа. Оригинальные протоколы для этих реакций подразумевали только однократные измерения, и фактические сигналы действительно не зависели от времени; тем не менее, мы предпочли провести несколько измерений (три измерения в течение 1 часа), чтобы сделать полученные данные более сопоставимыми с данными, полученными с помощью предложенного нами метода в аналогичных условиях.

2.5. Обработка результатов измерений

2.5.1. Обработка изображений

Фотографические изображения планшетов оцифровывали в программе ImageJ (Fiji) или Chrometlica [101] для получения значений интенсивности каждой лунки. Для каждой лунки область, выбранная для получения интенсивности (ROI), была одинаковой и не затрагивала краев лунки. Для видимых изображений проводили RGB-разложение, получая интенсивности красного, зеленого и синего каналов; для ИК изображений получали общую интенсивность. Полученные данные объединяли в матрицы данных, строки которых соответствовали образцам, каждый из которых анализировался обычно в 6 повторениях. Строка матрицы данных, соответствующая ячейке планшета, называется наблюдением. Столбцы матрицы соответствовали исходным переменным, представленным значениями интенсивности в конкретный момент реакции. Размер матрицы данных зависел от используемой индикаторной реакции, поскольку для каждой реакции регистрировали собственный набор временных точек.

2.5.2. Оценка правильности распознавания

Данные обрабатывали хемометрическими методами: метод главных компонент (МГК) использовали в качестве метода «без учителя» для визуализации образцов на графиках счетов. Для реализации метода использовали надстройку XLSTAT для Microsoft Excel (Lumivero, США). Строили графики счетов в координатах 1, 2 и 3 главных компонент или трехмерные графики счетов в программе Statistica 14.

Метод дискриминантного анализа на основе проекций на латентные структуры (ПЛС-ДА), метод линейного дискриминантного анализа (ЛДА), софтмакс регрессия (СР) и алгоритм k ближайших соседей (kNN) использовались в качестве методов с обучением («с учителем»), в которых программное обеспечение получало информацию о распределении образцов между классами. Под софтмакс регрессией в данной работе понимали многоклассовую модель классификации, основанную на использовании софтмакс функции, с помощью которой значения линейного предиктора преобразуются в вероятности принадлежности образца к каждому из классов. Число и состав классов задавали в соответствии с решаемой задачей. При распознавании индивидуальных соединений каждый аналит рассматривали как самостоятельный класс, а параллельные измерения – как наблюдения, принадлежащие этому классу. В таких экспериментах решали задачу многоклассовой классификации. В экспериментах, где требовалось распознать образцы по общему признаку, образцы с одинаковой характеристикой (год выпуска, факто облучения, поглощенная доза) относили к одному классу. В экспериментах, где каждый класс был представлен более чем одним физическим образцом, параллельные измерения (по 6 для каждого образца) перед хемометрической обработкой усредняли, получая одно значение. Такая предобработка позволяла снизить влияние случайных погрешностей и устранить завышение объема выборки за счет параллельных измерений, что снижает риск переобучения моделей. Методы ЛДА, СР и kNN были реализованы с использованием программного обеспечения, разработанного авторами и основанного на библиотеках Python [102]. Для бинарной классификации использовали логистическую регрессию (ЛР). В некоторых экспериментах линейный дискриминантный анализ выполняли в XLSTAT. Алгоритм ПЛС-ДА реализовывали с помощью программного обеспечения The Unscrambler X (Camo Software/AspenTech, США).

Правильность распознавания оценивали на основе различных типов валидации. Из-за ограниченного количества образцов традиционное разделение на обучающую, валидационную и тестовую выборки было невозможным без потери значимой информации. Для преодоления этого ограничения использовали стратегию кросс-валидации в различных вариантах, описанных ниже.

Для моделей ЛДА, построенных в XLSTAT, использовали процедуру рандомной валидации. В каждом независимом запуске XLSTAT 17% набора данных автоматически и случайным образом выбирали в качестве валидационной выборки, а 83% использовали

в качестве обучающей выборки. Правильность распознавания рассчитывали как среднее значение по 5 независимым запускам программного обеспечения.

Для метода ПЛС-ДА использовали k -блочную кросс-валидацию, в которой набор данных случайным образом делили на k блоков, модель обучали на $k - 1$ блоках, а оставшуюся часть использовали в качестве валидационного набора. Операцию повторяли для остальных частей (кросс-валидация). Правильность распознавания рассчитывали, как среднее значение по всем k запускам программы. В результате каждому наблюдению присваивали эталонное значение (0 или 1), соответствующее двум классам, а вероятность принадлежности к конкретному классу оценивали с помощью порогового значения 0.5. Соответственно, наблюдения с расчетным значением <0.5 классифицировали как принадлежащие к одному классу, а наблюдения со значением >0.5 — к другому. Эффективность модели (%) оценивали путем расчета показателей «чувствительности» (доля истинно положительных результатов, формула 1), «специфичности» (доля истинно отрицательных результатов, формула 2), показывающих долю образцов, правильно отнесенных к первому или второму классу, соответственно, и правильности (число правильно классифицированных наблюдений по отношению к общему числу наблюдений в валидационном наборе, формула 3).

$$(1) \text{ Чувствительность} = \frac{TP}{TP+FN}$$

$$(2) \text{ Специфичность} = \frac{TN}{TN+FP}$$

$$(3) \text{ Правильность} = \frac{TP+TN}{TP+TN+FP+FN}$$

TP (True Positive) – доля образцов, правильно классифицированных как принадлежащие к первому классу

TN (True Negative) – доля образцов, правильно классифицированных как принадлежащие ко второму классу

FP (False Positive) – доля образцов, ошибочно классифицированных как принадлежащие к первому классу

FN (False Negative) – доля образцов, ошибочно классифицированных как принадлежащие ко второму классу

Для моделей линейного дискриминантного анализа и софтбокс регрессии, построенных с использованием алгоритма на основе Python (версия 3.12), применяли два варианта k -блочной кросс-валидации: стратифицированную и кросс-валидацию «с исключением по одной группе» (Leave-One-Group-Out – LOGO) (рис.3). Стратифицированная k -блочная кросс-валидация была необходима, когда классы

содержали различное количество наблюдений (при формировании набора данных для проверки каждый блок содержал равный процент образцов из каждого класса, но блоки выбирались случайным образом). В дальнейшем мы не будем повторять термин «кросс-валидация», а стратифицированная валидация будет называться рандомной валидацией, что отражает их концептуальную эквивалентность.

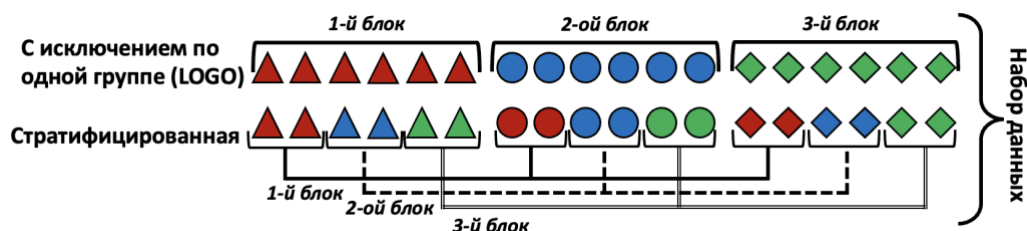


Рис. 3. Схема стратифицированной валидации и валидации LOGO.

Результаты рандомной кросс-валидации использовались для сравнения эффективности распознавания индикаторных реакций; однако эти методы неприменимы для распознавания реальных образцов. Для имитации реальных условий анализа неизвестных образцов использовалась схема кросс-валидации «с исключением по одной группе». В этом подходе набор данных для валидации формировался путем исключения всех наблюдений, принадлежащих одному физическому образцу («группе», например, одному производителю). Проверка повторялась до тех пор, пока каждый образец не был включен в тестовый набор данных. После усреднения параллельных измерений в матрице данных оставалось по одному значению для каждого физического образца. В данном случае валидация «с исключением по одной группе» фактически соответствовала подходу «Leave-One-Out» («с исключением по одному образцу», LOO), поскольку каждая группа представлена одной строкой данных. При таком подходе на каждом шаге из обучающей выборки исключалась строка, соответствующая одному физическому образцу, а модель обучалась на оставшихся данных. Таким образом в работе использовали варианты кросс-валидации:

- Рандомная – случайное разбиение всего набора данных на обучающую и тестовую выборки с сохранением пропорции классов
- LOGO – из обучающего набора удаляются все наблюдения, принадлежащие одному физическому образцу
- LOO – из обучающего набора удаляется одна строка данных. Использовали для усредненных параллельных наблюдений.

Правильность распознавания 100% считали отличной, 90–99% – хорошей, а 80–89% – удовлетворительной.

Результаты и их обсуждение

Глава 3. Характеристики индикаторных реакций

Кинетика изменений зависит от структуры красителя и природы окислителя. В присутствии аналитов скорость реакции может ускоряться или замедляться. Различия между красителями проявляются в положении максимумов, форме спектра и скорости изменения сигнала, что связано с их различной устойчивостью к окислителям за счет различий в структуре. Образование нескольких продуктов реакции требует измерения нескольких типов сигналов: поглощения и флуоресценции в ряде спектральных областей, которые могут демонстрировать различное кинетическое поведение.

3.1. Реакции окисления пероксидом

Для получения разнообразных откликов изучили несколько карбоцианиновых красителей. В присутствии пероксида водорода карбоцианиновые красители медленно окисляются, при этом скорость окисления зависит от структуры красителя. Для ускорения реакции окисления использовали ионы меди(2+) в качестве катализатора. Интенсивность флуоресценции красителей **дор-249**, **дор-145** и **дор-255** возрастает в видимой области, это может объясняться разрушением полиметиновой цепи и образованием продуктов с более короткой системой сопряженных связей, которые, как правило, излучают свет на более коротких длинах волн [89] (рис. 4а). При этом на спектрах поглощения (рис. 4б) всех карбоцианинов интенсивность снижается в области 700–750 нм, что связано с разрушением структуры красителя и образованием бесцветных продуктов. Краситель **дор-128** флуоресцирует в БИК-области, при окислении интенсивность флуоресценции также возрастает при длине волны 840 нм. Для красителя **дор-249** наблюдали увеличение интенсивности флуоресценции в двух спектральных областях при различном времени реакции, что может быть вызвано множественными процессами окисления в системе. Такая сложная схема реакции полезна в предлагаемом методе, поскольку она увеличивает вероятность реакции системы на широкий диапазон аналитов.

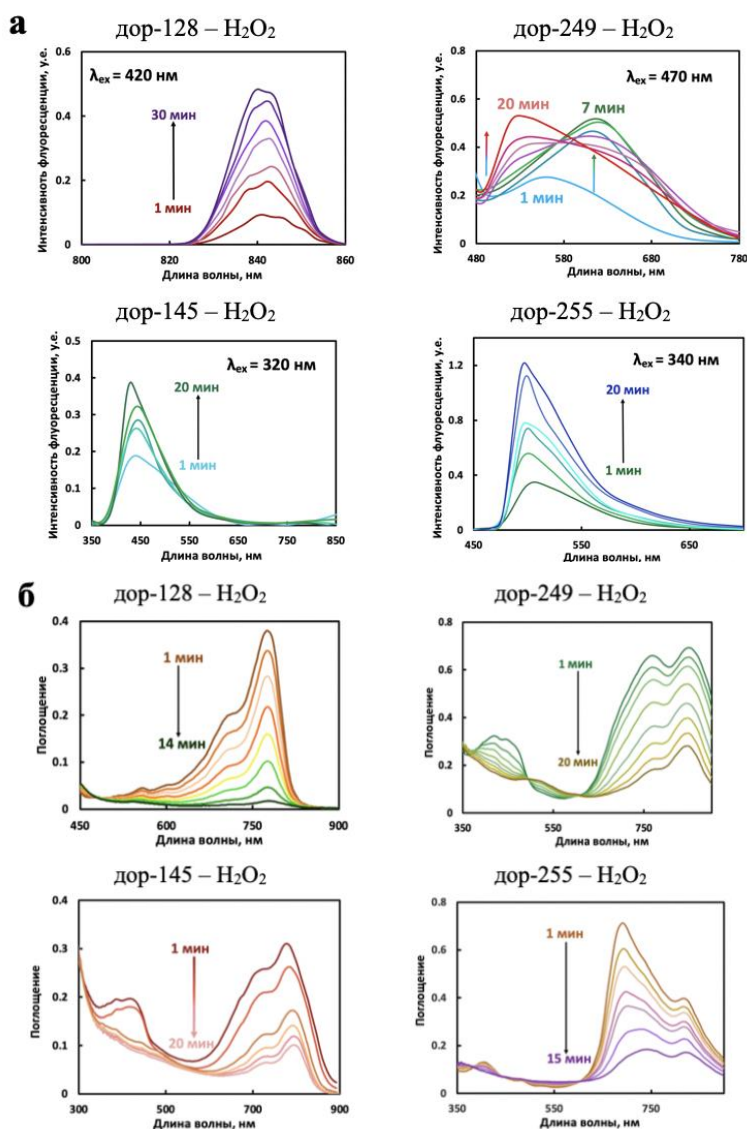


Рис. 4. Спектры флуоресценции (а) и поглощения (б) реакций окисления с использованием пероксида водорода.

3.2. Реакции окисления гипохлоритом

Для реакций с участием гипохлорита наблюдали похожие спектральные изменения: увеличение интенсивности флуоресценции в видимой области и снижение интенсивности поглощения в БИК-области. В отличие от других карбоцианинов интенсивность флуоресценции красителя **дор-128** в БИК-области снижалась с течением времени, что указывает на разрушение структуры (рис. 5а). На спектрах поглощения наблюдали снижение интенсивности в длинноволновой области, что указывает на разрушение исходного красителя. При взаимодействии красителя **дор-145** с NaOCl мгновенно образуется темно-фиолетовый продукт ($\lambda_{\text{max}} = 560 \text{ нм}$, рис.5б), предположительно аддукт, который затем медленно обесцвечивается.

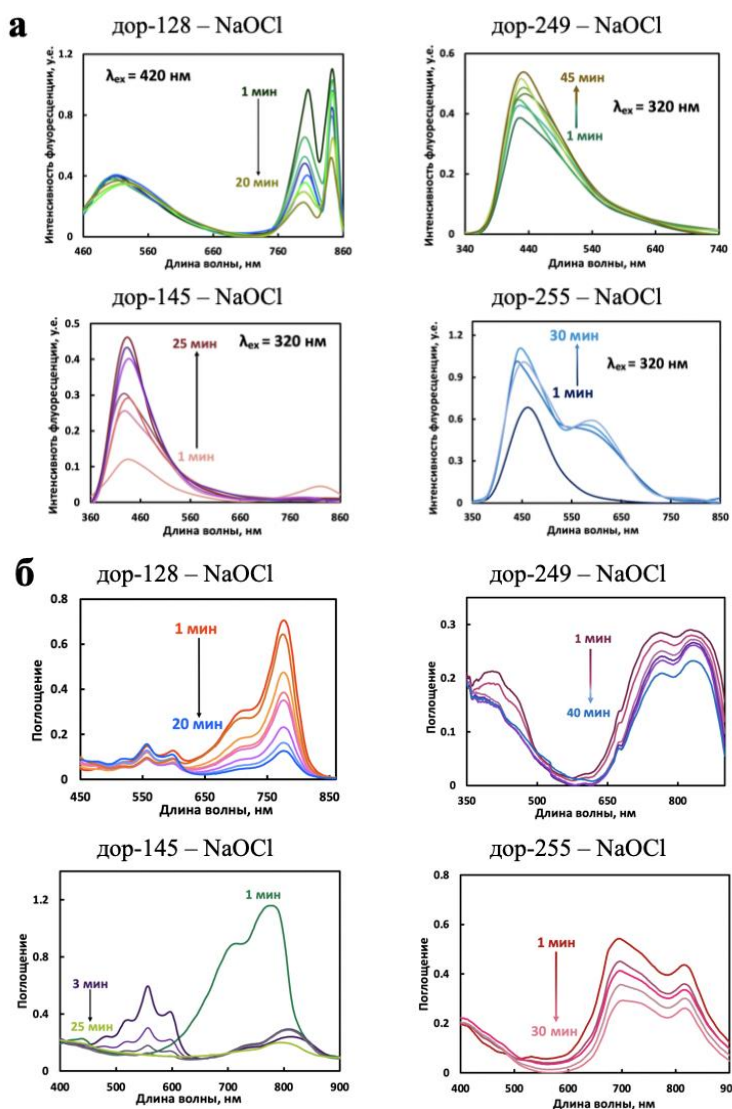


Рис. 5. Спектры флуоресценции (а) и поглощения (б) реакций окисления с использованием гипохлорита натрия.

3.3. Другие окислители

Изучили взаимодействие карбоцианинов с нитритом натрия и броматом калия. Для реакций *дор-145* – $NaNO_2$ и *дор-128* – BrO_3^- наблюдали затухание флуоресценции в БИК-области с максимумом 820 нм. Красители **дор-249** и **дор-224** флуоресцируют в видимой области, на спектрах флуоресценции (рис. 6а) наблюдали увеличение интенсивности, на спектрах красителя **дор-224** наблюдали широкий максимум в диапазоне 550–750 нм, при этом с течением времени изменялась форма спектра. Поглощение красителей снижалось в длинноволновой области после начала реакции (рис. 6б). Для красителя **дор-224** наблюдали смещение максимума в более коротковолновую область сразу после начала реакции.

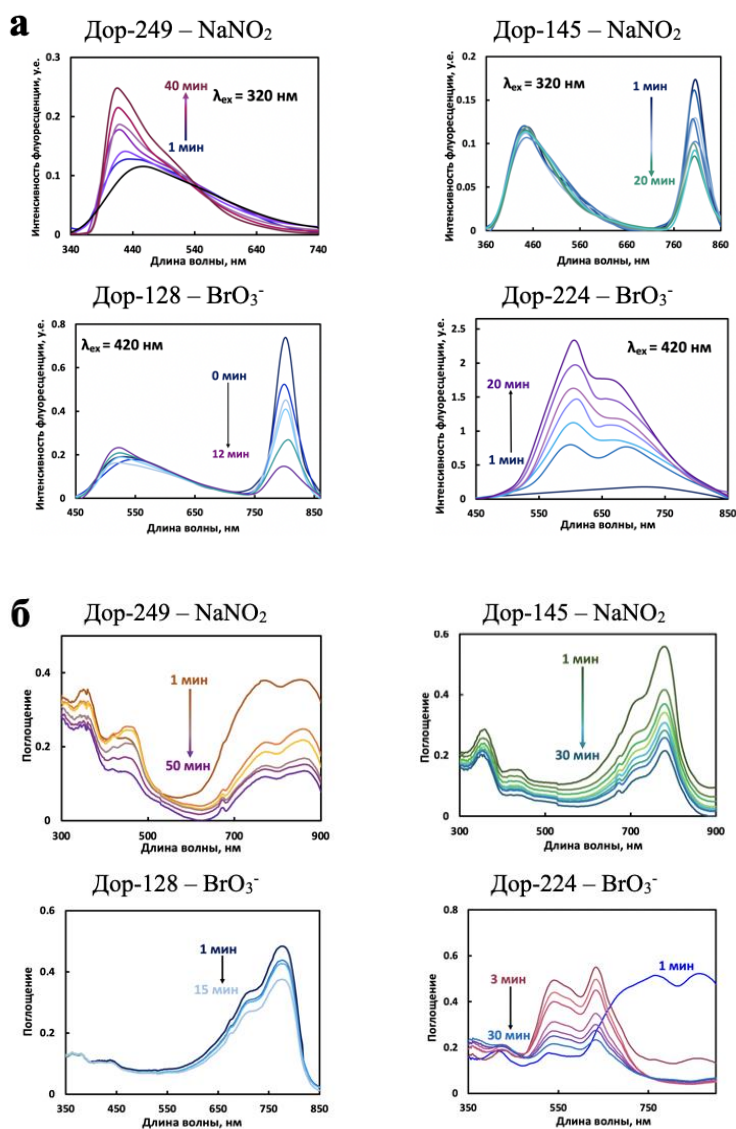


Рис. 6. Спектры флуоресценции (а) и поглощения (б) реакций окисления с использованием нитрита натрия и бромата калия.

Глава 4. Различение модельных соединений

Многие органические соединения не обладают собственной флуоресценцией, не окрашены, не образуют окрашенных комплексов и не взаимодействуют с флуорофорами. Большинство методик основано на прямом взаимодействии флуорофор – аналит. Альтернативным принципом получения сигнала является косвенное определение, что позволяет расширить круг аналитов, за счет получения сигнала от нефлуоресцирующих соединений.

4.1. Распознавание сульфаниламидов¹

Флуориметрию в БИК-диапазоне целесообразно применять для анализа низкомолекулярных аналитов, не обладающих собственной флуоресценцией и не взаимодействующих с флуорофором. Нами рассмотрено влияние низкомолекулярных аналитов на протекание реакций окисления карбоцианиновых красителей. В качестве модельных аналитов были выбраны 8 сульфаниламидов, лекарственные вещества, входящие в состав многих препаратов. В данном разделе предложено использовать реакцию окисления коммерчески доступного красителя пероксидом водорода, катализируемую ионами меди(II). Аналиты способны по-разному изменять скорость индикаторной реакции, за счет чего возможно их различение. При протекании окислительно-восстановительных реакций в присутствии аналитов существует как минимум два возможных механизма: аналит может связываться с катализатором (ионом переходного металла) и изменять его каталитическую активность [103,104]. В этой ситуации могут быть обнаружены соединения, образующие стабильные комплексы меди. Второй возможный механизм – прямое воздействие аналита на скорость окислительно-восстановительной реакции. Такое воздействие может быть обусловлено взаимодействием аналита с радикалами, возникающими в окислительно-восстановительной реакции; в этих процессах могут быть активны соединения различных классов [105].

Для распознавания 8 сульфаниламидов использовали индикаторную реакцию окисления красителя **Cy5.5** пероксидом водорода в присутствии ионов Cu^{2+} в качестве катализатора. В лунки планшета в указанном порядке с помощью дозатора вносили следующие растворы: 1) 0.1 М ацетатный буферный раствор с pH 3.7, 30 мкл; 2) CuSO_4 , 1 мМ, 60 мкл; 3) H_2O_2 , 1 М, 30 мкл; 4) раствор сульфаниламида (схема 2), 5 мМ, 60 мкл; 5) вода, 60 мкл (если раствор аналита приготовлен в этаноле) или 60 мкл этанола (в случае водного раствора аналита); 6) раствор красителя **Cy5.5**, 0.017 г/л, 60 мкл. За момент начала реакции принимали момент добавления красителя. Изменение интенсивности флуоресценции фиксировали в ИК-визуализаторе через различные промежутки времени в течение 30 мин, всего получили 8 фотографий. Полученную

¹ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Степанова И. А., Лебедева А. Н., Шик А. В., Скоробогатов Е. В., Беклемишев М. К. Распознавание и определение сульфаниламидов методом флуориметрии в ближней ИК-области по их влиянию на скорость каталитического окисления карбоцианинового красителя пероксидом водорода // Журн. аналит. химии. 2021. Т. 76, №. 12. С. 1397-1405. (1.27 п.л.; вклад автора 20%).

после оцифровки изображений матрицу общих интенсивностей размером 40x8 (40 наблюдений и 8 переменных) обрабатывали методом главных компонент в программе The Unscrambler X и строили трехмерные графики счетов. Для оценки правильности распознавания использовали восьмиклассовую модель линейного дискриминантного анализа с случайной валидацией, реализованную в программе XLSTAT, каждый сульфаниламид соответствовал отдельному классу.

В боратном буферном растворе фталилсульфатиазол и сульфатиазол ускоряют каталитическую реакцию окисления красителя; другие соединения (сульфадiazин, сульфаметазин, сульфаметоксипиридазин, сульфаклорпиридазин) реакцию замедляют, давая сигнал выше контрольного (рис. 7). Как видно из рис. 8а, на трехмерном графике счетов МГК можно различить все сульфаниламиды, кроме сульфаниламида и сульфаклорпиридазина. На графике счетов ЛДА (рис. 8б) все 8 аналитов могут быть различены. Правильность распознавания, рассчитанная с помощью метода ЛДА с случайной валидацией, составила 100%.

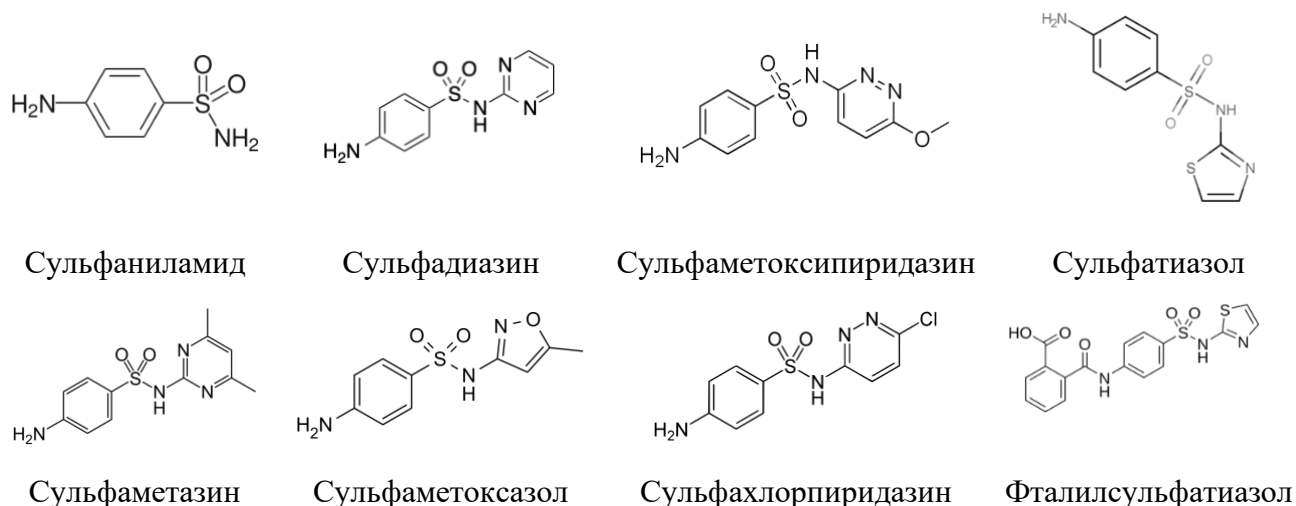


Схема 2. Структурные формулы изученных сульфаниламидов.

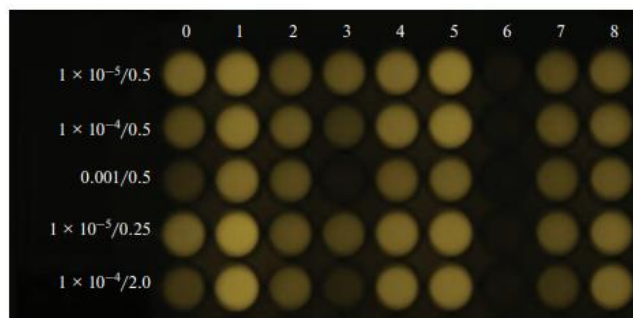


Рис 7. Фотография планшета в БИК-области через 30 мин после начала реакции. Столбец 0 – контрольный опыт, 1 – сульфадиазин, 2 – сульфаметоксазол, 3 – сульфатиазол, 4 – сульфаметазин, 5 – сульфаметоксипиридазин, 6 – фталилсульфатиазол, 7 – сульфаниламид, 8 – сульфаклорпиридазин. Концентрации (М) растворов Cu^{2+} и H_2O_2 , соответственно, показаны слева от изображений через косую черту.

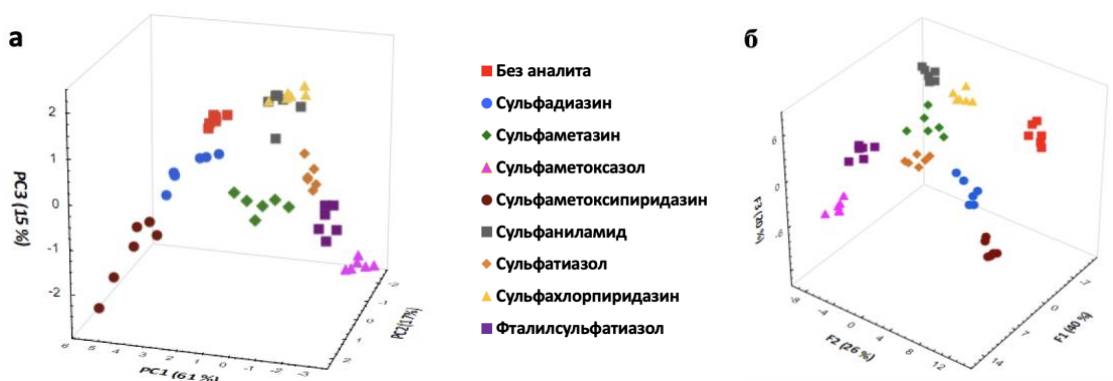


Рис. 8. Графики счетов МГК (а) и ЛДА (б) для 8 сульфаниламидов и контрольного опыта для реакции окисления красителя **Sy5.5** с помощью H_2O_2 при pH 3.7.

Таким образом, индикаторная реакция окисления красителя Sy5.5 пероксидом водорода пригодна для различения сульфаниламидов. Кроме того, предложенная система позволяет получать сигнал в мутных растворах биологических матриц без отделения матрицы, что делает ее пригодной для анализа биологических объектов.

4.2. Распознавание 9 лекарственных веществ²

Исследовали возможности кинетического метода отпечатков пальцев распознавать аналиты сходной структуры, принадлежащие к разным классам. С этой целью изучили реакции окисления четырех карбоцианинов пероксидом водорода в присутствии различных катализаторов. Полученные данные подвергли хемометрической обработке. Выбранные модельные аналиты включали четыре цефалоспорины (цефтриаксон, цефазолин, цефотаксим, цефтазидим), три фенотиазина (прометазин, промазин, хлорпромазин) и два пенициллина (бензилпенициллин,

² При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Shik A. V., Stepanova I. A., Doroshenko I. A., Podrugina T. A., Beklemishev M. K. Carbocyanine-Based Fluorescent and Colorimetric Sensor Array for the Discrimination of Medicinal Compounds // Chemosensors. 2022. Vol. 10, No. 2. Article 88. (1.96 п.л.; вклад автора 30%; IF = 3.7, Q2).

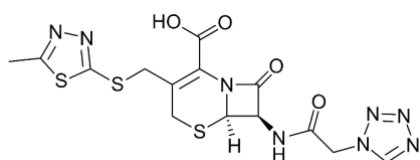
ампициллин) (схема 3). Общим свойством соединений, принадлежащих к бета-лактамной (пенициллины, цефалоспорины) и фенотиазиновой группе, является их способность образовывать комплексы с ионами переходных металлов, что и было использовано в нашем исследовании.

Для распознавания 9 лекарственных веществ использовали красители **кат-72**, **кат-24**, **акри-278** и **дор-128**. Для проведения индикаторных реакций в ячейки добавляли 30 мкл фосфатного буфера (0.067 М, pH 7.4), деионизированную воду до 300 мкл, 30 мкл раствора ЦТАБ (1 мМ) или 30 мкл раствора ДДС (8 мМ) в зависимости от красителя, H₂O₂ 1М, раствор Pd²⁺ или Cu²⁺ 1мМ, 30 мкл раствора аналита (5 мМ) и 30 мкл раствора красителя необходимой концентрации. Для каждой системы выполняли по 4 параллельных опыта, заполняя 4 лунки планшета. Регистрировали сигнал флуоресценции с помощью ИК-визуализатора в БИК-области и с помощью камеры смартфона в видимом свете в течение 25 мин каждые несколько минут. Для обработки выбрали только те фотографии, на которых различие между аналитами было наиболее заметно (табл.3). Полная матрица данных содержала 40 наблюдений и 15 переменных. Данные обрабатывали в программе The Unscrambler X методом главных компонент и в XLSTAT методом линейного дискриминантного анализа, при этом каждому из 9 лекарственных веществ соответствовал отдельный класс. В табл. 3 представлены красители и указано время от начала реакции, использованное для обработки.

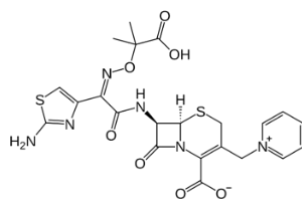
Таблица 3. Индикаторные реакции окисления, использованные в работе

Краситель	Акри-278	Кат-24	Кат-72	Дор-128
Тип изображения*	ИК	ИК и видимое	ИК и видимое	ИК и видимое
RGB-разложение	—	+	+	—
Число переменных	1	6	6	2
Время измерения сигнала после начала реакции, мин	6	2 (ИК) 5 (видимое)	2 (ИК) 5 (видимое)	4 (ИК) 4 (видимое)
То же в присутствии гомогената индейки, мин	50	36 (ИК) 19 (видимое)	11 (ИК) 10 (видимое)	58 (ИК) 33 (видимое)

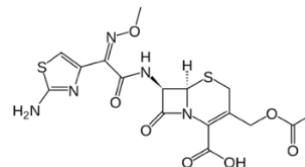
*ИК-изображения планшетов в БИК-области получали с помощью ИК-визуализатора, видимые изображения получали в видимом свете при помощи камеры смартфона.



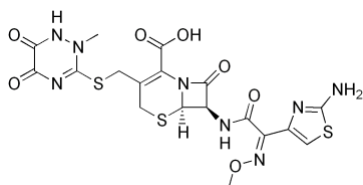
Цефазолин



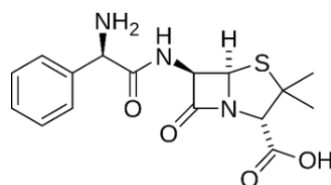
Цефтазидим



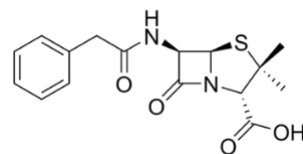
Цефотаксим



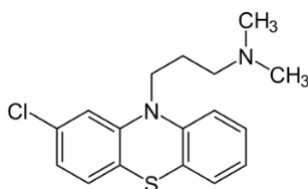
Цефтриаксон



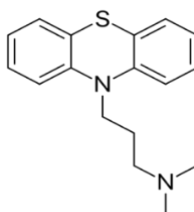
Ампициллин



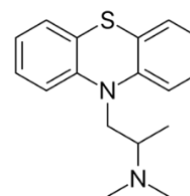
Бензилпенициллин



Хлорпромазин



Промазин



Прометазин

Схема 3. Структура 9 лекарственных веществ

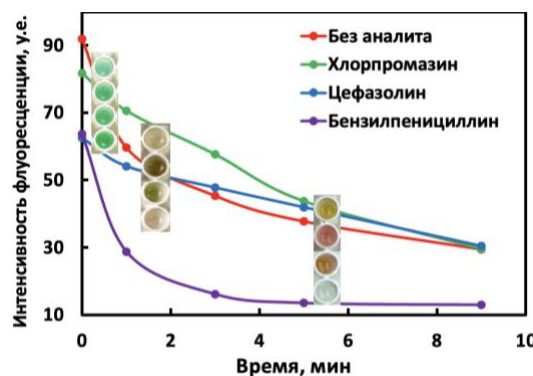


Рис. 9. Интенсивность БИК-флуоресценции красителя **кат-72** в зависимости от времени для трех модельных аналитов (хлорпромазин, цефазолин, бензилпенициллин) и контрольного опыта. Также показаны изображения четырех лунок, содержащих аналиты, в моменты времени 0, 1 и 5 мин (при соответствующем времени). Условия: фосфатный буфер (pH 7.4), 0.5 мМ аналита, 0.1 мМ ЦТАБ, 0.01 г/л красителя **кат-72**, 0.1 М H_2O_2 , 0.1 мМ Cu^{2+} .

Интенсивность флуоресценции красителей в присутствии окислителя и катализатора уменьшается со временем. Добавление аналита изменяет скорость реакции

окисления, что отражается на форме кинетических кривых. На рис. 9 представлены кинетические кривые для красителя **кат-72** в присутствии различных аналитов.

Окисление красителя в присутствии аналитов определяет различную окраску продуктов реакции, что видно из фотографий планшета в видимой области (рис. 10), особенно заметно влияние фенотиазинов в видимой области. В БИК-области наибольшее влияние на флуоресценцию красителя **кат-24** оказывает цефтазидим.

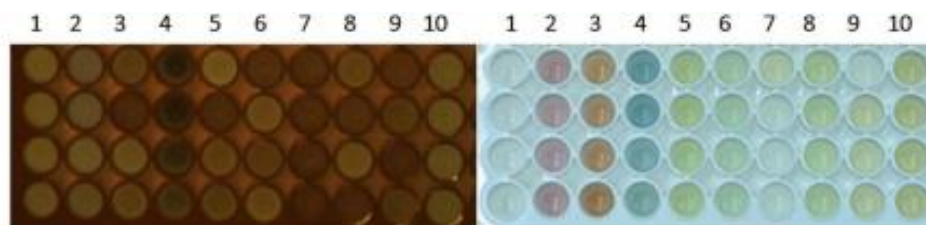


Рис. 10. Фотографии планшета в БИК-области через 2 мин после начала реакции (слева) и в видимом свете через 5 мин (справа). Индикаторная реакция: краситель **кат-24** – H_2O_2 – Cu^{2+} ; без аналита (1-я колонка) и с аналитами: 2 – прометазин, 3 – промазин, 4 – хлорпромазин, 5 – цефтриаксон, 6 – цефазолин, 7 – цефтазидим, 8 – цефотаксим, 9 – бензилпенициллин, 10 – ампициллин. Опыты в каждой колонке из четырех лунок параллельные. Добавляли по 30 мкл растворов: 0.067 М фосфатного буфера (pH 7.4), 1 мМ ЦТАБ, 5 мМ модельного аналита, 0.1 г/л красителя **кат-24**, 1 М H_2O_2 и 0.1 мМ CuSO_4 ; 120 мкл воды.

При окислении красителя **акри-278** в видимом свете не наблюдали заметных изменений со временем, поэтому сигнал регистрировали только в БИК-области. RGB-разложение проводили для фотографий в видимом свете и в БИК-области для красителей **кат-24** и **кат-72**. Всего получили 15 столбцов данных, которые подвергли хемометрической обработке. На рис. 11 показаны график счетов МГК в трех координатах и график счетов ЛДА в координатах F1–F2. Как видно из рис.11 а, все 9 аналитов разделены в пространстве трех главных компонент. Для оценки правильности распознавания использовали метод ЛДА с рандомной валидацией, который показал 100% правильность распознавания 9 аналитов в водном растворе.

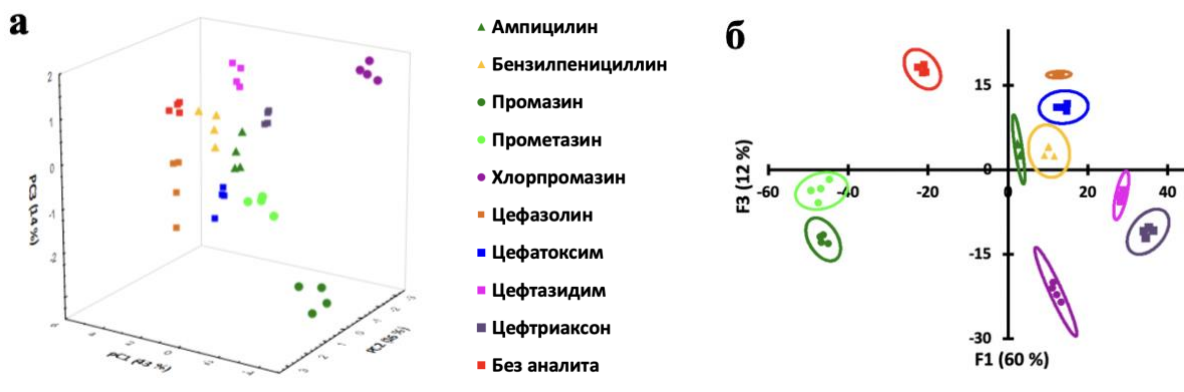


Рис. 11. Графики счетов МГК (а) и ЛДА (б) для 9 лекарственных веществ в водном растворе. Используются реакции окисления красителей **кат-24**, **кат-72**, **дор-128** и **акри-278** пероксидом водорода.

Сравнили способность различных наборов данных, полученных с использованием нескольких индикаторных реакций к распознаванию 9 аналитов в водном растворе (табл. 4). Использование только одного красителя **акри-278** обеспечивает правильность лишь 20%, а использование красителя **дор-128** – 28%, что свидетельствует о недостаточной информативности этих систем по-отдельности. Объединение данных этих двух красителей повышает правильность распознавания до 75%. Иные результаты получены для красителей **кат-24** и **кат-72**. Применение красителя **кат-72** обеспечивает 93%-ную правильность, а **кат-24** – 100%-ную, что указывает на высокую способность этих систем к распознаванию, вероятно, благодаря использованию двух спектральных диапазонов в каждой. Эти результаты свидетельствуют о том, что для достижения максимальной правильности распознавания в данном случае достаточно единственной индикаторной реакции. Заметим, что использование только видимых или только ИК данных для реакций окисления для каждого из красителей (**кат-24** и **кат-72**) дает несколько более низкие значения правильности (90% и 95% соответственно), что подчеркивает важность совместного использования сигналов в разных спектральных областях. При объединении данных малоинформативной реакции (с красителем **акри-278**) и реакции с красителем **кат-72** достигается правильность 98%, что выше, чем результаты правильности каждого из этих красителей по-отдельности. Таким образом, для достижения высокой правильности распознавания достаточно либо данных одной реакции, полученных в разных диапазонах (если природа красителя это позволяет), либо комбинирования нескольких менее информативных реакций.

Таблица 4. Правильность распознавания 9 аналитов в водном растворе для разных исходных наборов данных

Описание набора данных	Правильность, %	Число переменных
Акри-278	20	1
Дор-128	28	2
Акри-278 + дор-128	75	3
Кат-72	93	6
Кат-72 + дор-128	93	8
Кат-72 + акри-278	98	7
Кат-72 + акри-278 + дор-128	98	9
Кат-24	100	6

Кроме редокс-реакций, исследовали также процессы, основанные на агрегации. Обнаруженная ранее в лаборатории возможность флуоресцентной визуализации гидрофобных ионных пар [89] позволила применить подобные системы для целей распознавания. Реакция агрегации включает образование наночастицы посредством взаимодействия аналита и поверхностно-активного вещества; краситель затем растворяется в гидрофобных доменах такой наночастицы, вызывая тем самым увеличение интенсивности флуоресценции. Аналиты, способные участвовать в подобной агрегации, предположительно образуют множественные водородные и/или ионные связи. Мы проводили индикаторную реакцию в присутствии катионного поверхностно-активного вещества (ЦТАБ), предполагая, что образец с большей вероятностью содержит анионные частицы, чем катионные.

Задачей было выяснить применимость описанного подхода для различения модельных соединений на фоне биологической матрицы. Компоненты матрицы, например мяса индейки, могут влиять на сигнал, ухудшая распознавание аналитов. Для различения 9 модельных аналитов в присутствии гомогената мышц индейки, помимо четырех реакций окисления карбоцианиновых красителей, использовали реакцию агрегации гидрофобного красителя **акри-278** ($\lg P = 9,7$ в системе *n*-октанол–вода). Получение сигнала, основанное на реакции агрегации, является примером косвенного определения. Флуоресценция гидрофобного красителя **акри-278** снижается в воде, однако, если аналит формирует агрегат с противоположно заряженным поверхностно-активным веществом, то краситель может сольубилизироваться в полученные гидрофобные домены, за счет чего интенсивность его флуоресценции увеличивается

[89]. Предложенный подход сочетает в себе два принципа получения сигнала: влияние аналитов на скорость индикаторной реакции и усиление флуоресценции красителя вследствие агрегации. На рис. 12 показано влияние цефазолина (гидрофобного аналита) на интенсивность флуоресценции и поглощения красителя **акри-278**.

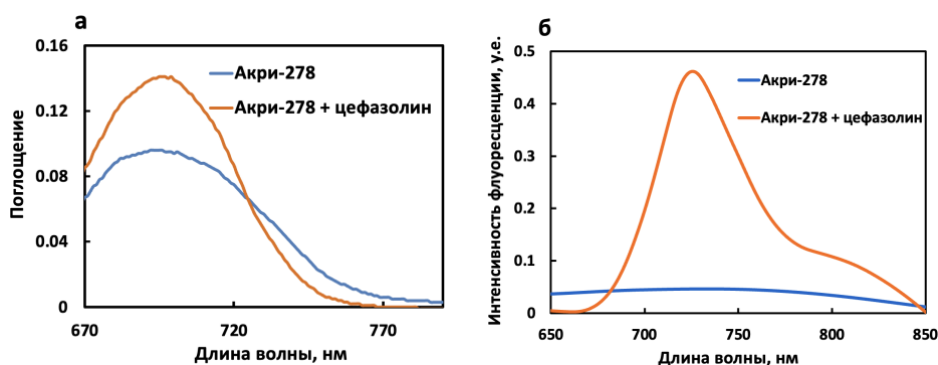


Рис. 12. Реакции агрегации как индикаторные: изменение спектра поглощения (а) и усиление флуоресценции в БИК-области (б) красителя **акри-278** в присутствии цефазолина натрия (анион) и ЦТАБ (гидрофобный катион), ЦТАБ присутствует во всех случаях.

Условия эксперимента были аналогичны условиям эксперимента по различению 9 аналитов в воде. Несмотря на ингибирование реакций окисления в присутствии гомогената индейки, концентрации окислителей и катализаторов оставили теми же, потому что скорости реакций оставались измеримыми.

Качество распознавания аналитов на трехмерном графике счетов МГК было несколько хуже, чем в воде: например, не удастся различить промазин и хлорпромазин на графиках счетов МГК и ЛДА (рис. 13). Несмотря на пересечение эллипсов на графиках счетов, правильность распознавания методом ЛДА с применением случайной валидации составила 100%.

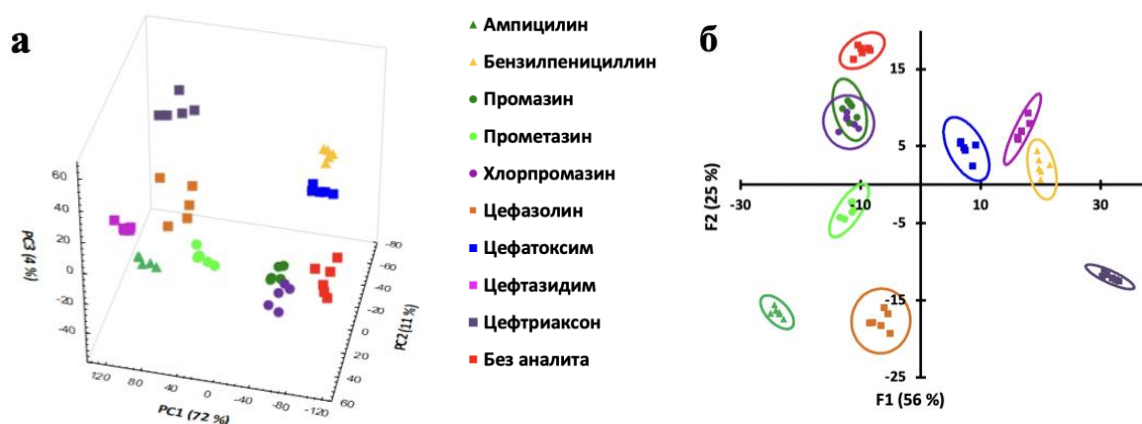


Рис. 13. Графики счетов МГК в трех координатах 1–2 (а) и 1–3 (б) главных компонент и ЛДА в координатах факторов F1–F2 (в) для 9 лекарственных веществ в присутствии гомогената мышц индейки; эллипсы построены для 90% доверительной вероятности.

Таким образом, предложен подход к различению модельных аналитов схожей структуры, основанный на реакциях окисления и агрегации карбоцианиновых красителей. Подход успешно применен для различения лекарственных веществ в водном растворе, а также в присутствии гомогената мышц индейки, что подтверждает устойчивость предложенной платформы к матричным эффектам. Ключевой особенностью является комбинация различных реакций карбоцианиновых красителей, в том числе агрегации, и получение сигнала в нескольких спектральных диапазонах. В сочетании с хеометрической обработкой возможно различить лекарственные вещества, в том числе принадлежащие к одному классу, со 100% правильностью.

4.3. Распознавание модельных белков³

Белки относятся к ключевым биомолекулам, входящим в живые системы. Их распознавание и идентификация представляют собой популярную задачу, решаемую, в том числе, различными методами отпечатков пальцев. Актуальна разработка простых и быстрых подходов к различению белков, особенно при необходимости контроля большого числа образцов.

³ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Shik A. V., Stepanova I. A., Doroshenko I. A., Podrugina T. A., Beklemishev M. K. Carbocyanine-Based Optical Sensor Array for the Discrimination of Proteins and Rennet Samples Using Hypochlorite Oxidation // Sensors. 2023. Vol. 23, No. 9. Article 4299. (1.85 п.л.; вклад автора 60%; IF = 3.7, Q1).

Метод отпечатков пальцев, основанный на индикаторных реакциях, оказался эффективным при распознавании низкомолекулярных аналитов разных классов. В данном разделе мы попытались расширить область применения метода путем распознавания белков как более сложных объектов. Белки различаются по аминокислотному составу и молекулярной массе, что может влиять на их взаимодействие с окислителями и карбоцианиновыми красителями и, как следствие, на протекание индикаторных реакций.

Для распознавания 6 модельных белков (бычий сывороточный альбумин (БСА), альбумин из сыворотки человека (ЧСА), пепсин, лизоцим, γ -глобулин, протеиназа-К) использовали отклики, полученные при окислении красителей **Sy5.5** и **дор-128** гипохлоритом натрия. Навески белков растворяли в фосфатном буфере (рН 7.3) до концентрации 3 г/л. В лунки планшета добавляли следующие компоненты: 1 мкл раствора модельного белка, 30 мкл 5 мМ NaOCl, 30 мкл 0.1 М ацетатного буфера (рН 5.6), 170 мкл деионизированной воды, 60 мкл водного раствора красителя (0.1 г/л для **дор-128** и 0.017 г/л для **Sy5.5**). Для каждого модельного белка выполняли 6 параллельных измерений, заполняя 6 лунок планшета. Планшет с реакционной смесью фотографировали каждые несколько минут для получения четырех типов изображений: (1) поглощение видимого света с помощью камеры смартфона или визуализатора Camag; (2) и (3) флуоресценция при возбуждении УФ-светом (254 и 366 нм) в визуализаторе Camag и (4) флуоресценция в ближнем инфракрасном диапазоне (ИК) при возбуждении красным светом (660 нм) в ИК визуализаторе. Полная матрица данных содержала 36 наблюдений и 49 переменных. Полученные данные обрабатывали методом главных компонент и методом линейного дискриминантного анализа. Результаты метода главных компонент представляли в виде графиков счетов в координатах 1-й и 2-ой главных компонент. Для оценки правильности распознавания использовали процедуру рандомной валидации, при этом каждый из модельных белков рассматривали как отдельный класс.

При смешивании гипохлорита и карбоцианина определенных концентраций реакция окисления происходит практически мгновенно с обесцвечиванием красителя (рис. 14а,б) и значительным уменьшением интенсивности флуоресценции (рис. 14в,г). При предварительном добавлении к гипохлориту белка, например лизоцима, скорость реакции окисления снижается, при этом интенсивность флуоресценции и поглощения также постепенно падают (рис. 14), что делает индикаторную реакцию удобной для наблюдения. Светопоглощение снижается в области 600–700 нм для красителя **Sy5.5** и

в области 700–800 нм для красителя **дор-128**, интенсивность флуоресценции снижается в БИК-области спектра (700–800 нм) для обоих красителей. Вероятно, эти процессы объясняются образованием продуктов окисления белка, хлораминов ($R-NHCl$, $R-NCI_2$) [106], которые, в свою очередь, окисляют краситель.

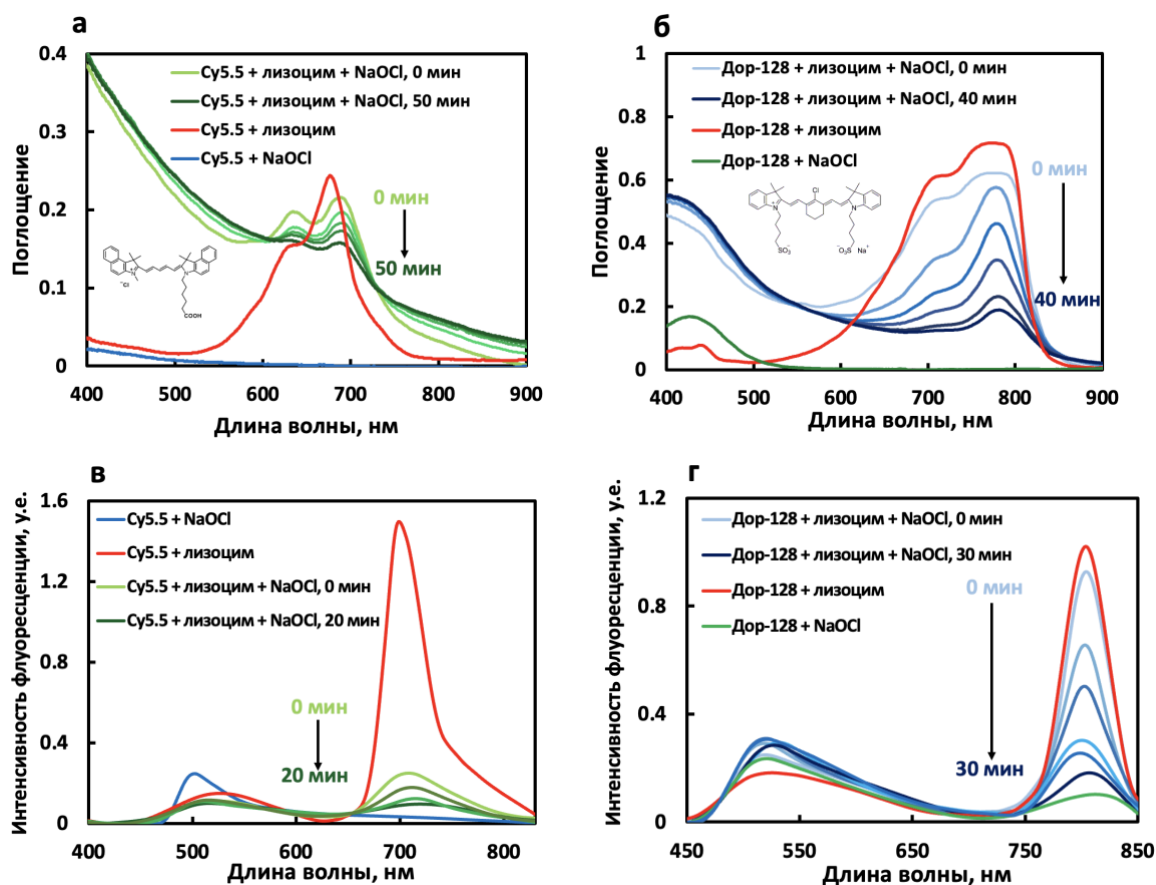


Рис. 14. Спектры поглощения (а, б) и флуоресценции в БИК-диапазоне (в,г) смесей NaOCl – лизоцим – краситель при различном времени реакции для красителей Cy5.5 (а, в) и дор-128 (б, г). Длина волны возбуждения 380 нм для **Cy5.5** и 420 нм для **дор-128**. Количество реагентов на общий объем 300 мкл: 0.3 мкМ NaOCl, 0.15 мкМ лизоцима (относительно аминокислотной единицы), 1.2 нМ **Cy5.5** или 7.5 нМ **дор-128**; ацетатный буфер (pH 5.6).

Предполагали, что порядок смешения реагентов важен для получения кинетики реакции, удобной для наблюдения. Изучили два порядка смешения: 1) гипохлорит натрия смешивали с белком, а затем добавляли буфер, воду и краситель; 2) белок добавляли в лунку, разбавляли водой и буфером, и, наконец, добавляли гипохлорит и краситель (рис. 15). Во втором случае окислитель не полностью реагировал с белком, поскольку раствор был более разбавленным, а вместо этого окислял краситель. Так, на

рис. 15б видно, что сигнал практически не изменяется после второго измерения, а на рис. 15а заметно изменение сигнала со временем. Интенсивность флуоресценции красителя в отсутствие белка сразу же была низкой, что указывает на мгновенное окисление красителя и согласуется с предположением об образовании хлораминов в присутствии белка.

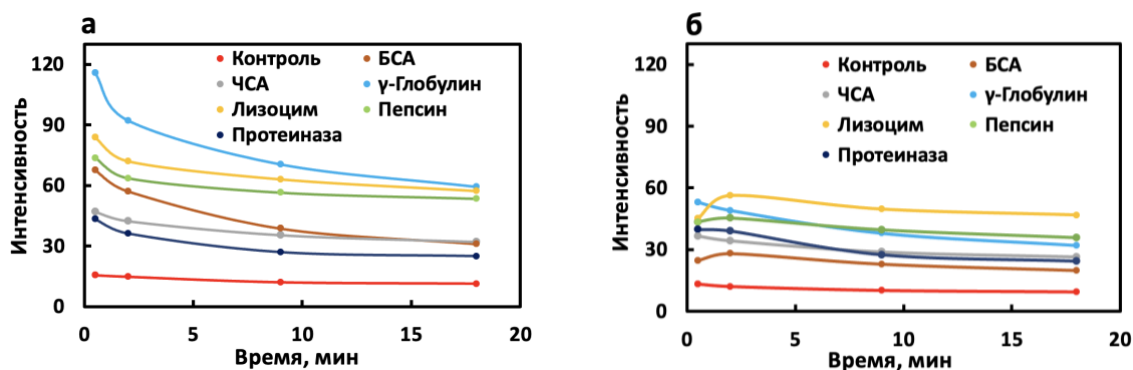


Рис. 15. Зависимость интенсивности флуоресценции в ближнем ИК-диапазоне от времени реакции окисления красителя **Cy5.5** в присутствии модельных белков для двух порядков смешивания: (а) NaOCl, белок, буфер, вода, краситель; (б) NaOCl, буфер, вода, белок, краситель.

Изучили зависимость сигнала от pH для обоих красителей. При значении pH меньше 1 и больше 10 скорость окисления была низкой; напротив, в диапазоне pH 3.0–9.2 наблюдали более выраженные кинетические отличия (рис. 16). Для дальнейших экспериментов выбрали значение 5.6, при котором изменение сигнала во времени было наиболее выражено.

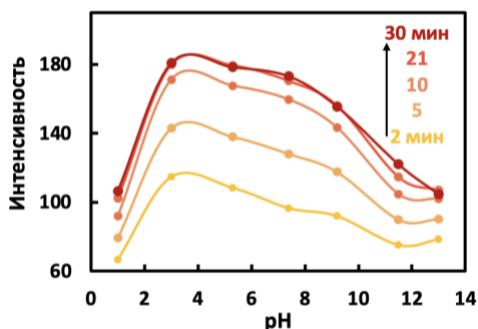


Рис. 16. Зависимость интенсивности красного канала красителя **Cy5.5** от pH в разные моменты времени от начала реакции (реакция в отсутствие объекта).

Влияние количества гипохлорита на сигнал (на примере лизоцима) изучили, добавляя разные концентрации окислителя в лунки планшета. Белок сначала смешивали

с гипохлоритом, затем добавляли остальные реагенты и в последнюю очередь краситель. На рис. 17 показаны фотографии в видимом свете и в БИК-области в разные моменты времени от начала реакции. В отсутствие белка при концентрации гипохлорита более 0.15 мкМ (15 мкл) краситель мгновенно обесцвечивался, а флуоресценция затухала. Медленное окисление красителя наблюдали при меньших концентрациях гипохлорита. В присутствии лизоцима мгновенное обесцвечивание красителя наблюдалось только при высоких концентрациях гипохлорита, тогда как при меньших количествах гипохлорита наблюдалось более медленное окисление в течение 1–4 мин для видимых изображений и значительно более медленное для изображений в БИК-области. Кроме того, при длительном времени реакции (16–43 мин) в присутствии лизоцима краситель обесцвечивался уже при низких концентрациях гипохлорита (2–10 мкл), тогда как в контрольном опыте таких концентраций было недостаточно для разрушения красителя. Это также подтверждает участие в индикаторной реакции продуктов окисления белка.

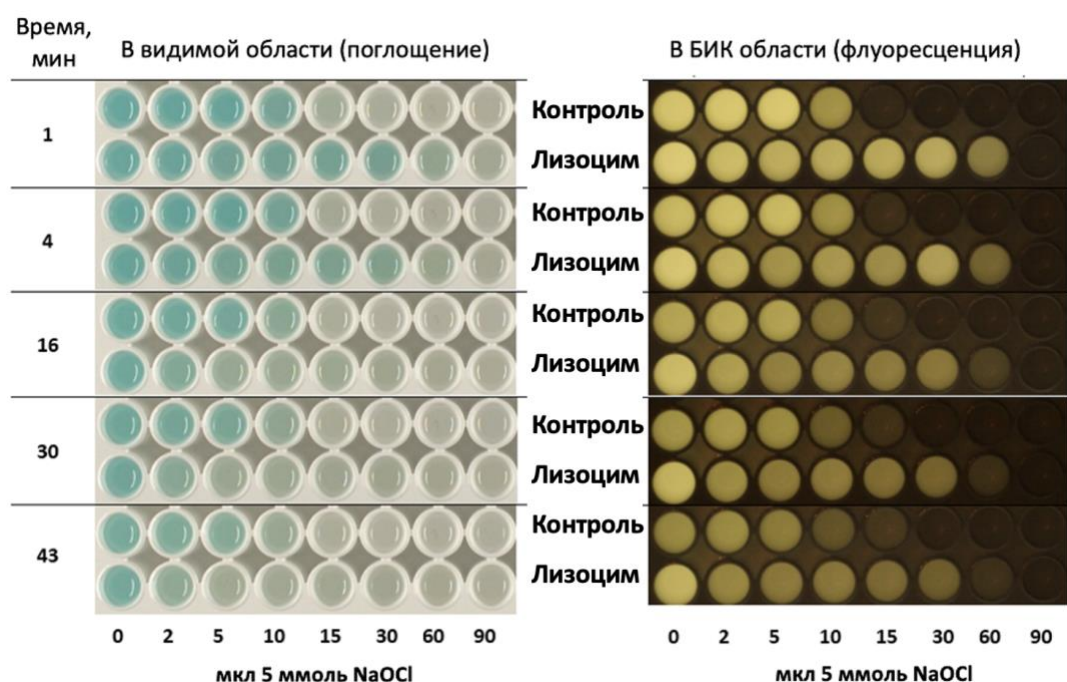


Рис. 17. Фотографии планшета в видимом свете (слева) и в БИК-визуализаторе (справа) для различных концентраций гипохлорита и разного времени от начала реакции; pH 5.3. Верхний ряд для каждого временного интервала – контрольный эксперимент (без белка), нижний ряд – лизоцим. Цифры внизу: объем NaOCl (5 mM). Отсчет времени начинали с момента добавления Cy5.5 в реакционную смесь.

Таким образом, мы выбрали следующие условия для различения модельных белков, описанные также в начале текущего раздела: вначале белок и гипохлорит смешивали в молярном соотношении примерно 2:1, затем добавляли ацетатный буфер с

pH 5.6, после чего добавляли карбоцианиновый краситель, считая добавление последнего началом индикаторной реакции.

Участие продуктов хлорирования белка в индикаторной реакции как окислителей может влиять на распознавание белков. Индивидуальный состав и структура белка определяют его реакционную способность по отношению к гипохлориту. Это, в свою очередь, может приводить к образованию специфичного для каждого белка набора продуктов окисления (преимущественно хлораминов), которые могут быть визуализированы с помощью реакционноспособного восстановителя, такого как карбоцианиновый краситель. Предполагали, что продукты окисления белков будут различаться по количеству образующихся активных групп, и, следовательно, по влиянию на скорость окисления красителя и на состав продуктов его окисления. На рис. 18 приведены кинетические кривые, которые демонстрируют уникальные кинетические профили для каждого белка.

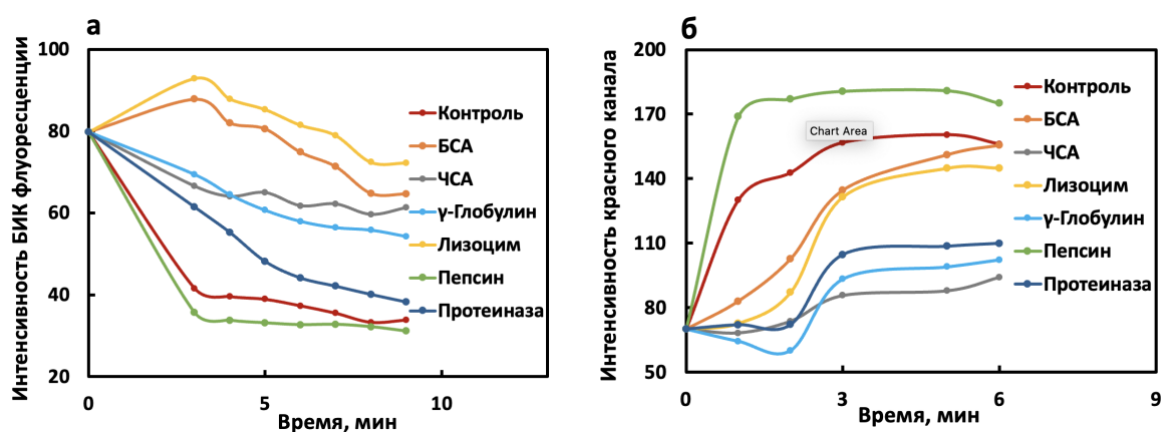


Рис. 18. зависимости от времени флуоресценции в БИК-диапазоне (а) и интенсивности красного канала (б), полученные из изображений реакционных смесей модельный белок – гипохлорит – краситель (Cy5.5). Нулевая точка времени показана одинаковой для всех белков – интенсивность сигнала раствора красителя без NaOCl.

Различение модельных белков проводили в соответствии с выбранными условиями. Реакционные смеси фотографировали в течение 50 мин в четырех спектральных диапазонах. Пример фотографии планшета в видимом свете показан на рис. 19. Судя по разнообразным изменениям цвета, для красителя **дор-128** в присутствии белков изменялась не только скорость окисления красителя, но и природа продуктов.

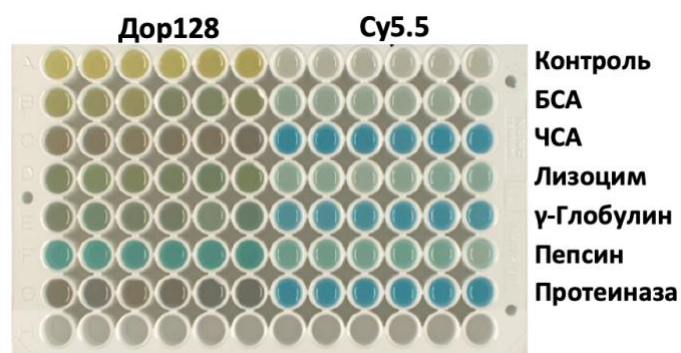


Рис. 19. Изображение планшета с реакционной смесью $NaOCl$ – краситель – модельные белки в видимом свете. Шесть левых колонок – краситель **дор-128** при времени 1 мин, шесть правых колонок – краситель **Cy5.5** при времени 12 мин.

Для распознавания (белков) использовали 10 фотографий для красителя **дор-128** и 9 фотографий для красителя **Cy5.5**, в сумме 49 колонок с данными, поскольку для видимых изображений делали RGB разложение. С использованием этого набора данных построили график счетов МГК (на рис. 20 приведен график счетов в координатах ГК1–ГК3). Правильность распознавания оценивали с помощью метода ЛДА.

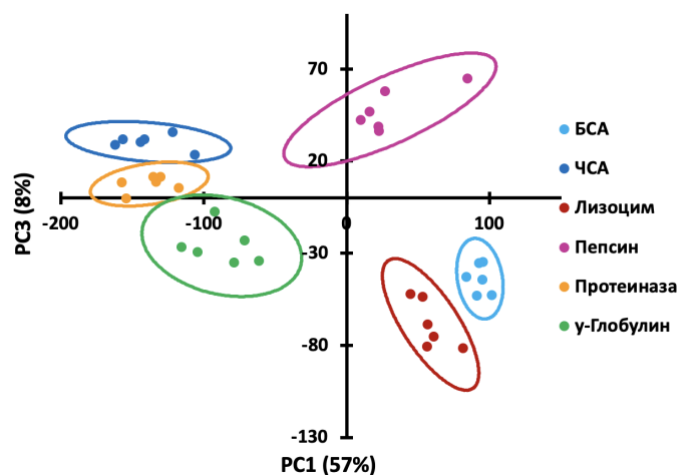


Рис. 20. График счетов МГК для 6 модельных белков, построенный по объединенным данным, полученным от реакций окисления красителей **Cy5.5** и **дор-128** гипохлоритом.

Попытались выяснить, можно ли уменьшить исходный набор данных из 49 столбцов, используемый для распознавания (комбинация сигналов двух красителей в нескольких спектральных областях). Для упрощения эксперимента желательно было исключить некоторые измерения, например, флуоресценцию в УФ-области. С этой

целью постепенно сокращали набор данных, последовательно исключая столбцы (табл. 5). Результаты показали, что 100% правильность распознавания достигается только при использовании полного набора данных, а также при исключении интенсивности УФ-флуоресценции красителя **дор-128**. Наиболее информативными являются данные реакции с красителем **Cy5.5**. При использовании только его сигнала, с условием измерения во всех четырех областях, правильность распознавания составила 98%, что практически не уступает полному набору данных. Напротив, полное исключение данных красителя **Cy5.5** ухудшает правильность распознавания до 83%. Дальнейшее сокращение данных показало, что ключевую роль играет комбинация сигналов в разных спектральных областях. Например, использование только поглощения в видимой области красителя **Cy5.5** дало правильность 88%, тогда как добавление к нему данных ИК-флуоресценции повысило правильность до 95%.

Таблица 5. Правильность распознавания (%) 6 модельных белков с использованием разных наборов данных. Использована случайная валидация

Cy5.5				Дор-128			Правильность	Число переменных
Вид	УФ (366)	УФ (254)	ИК	Вид	УФ (366)	ИК		
+	+	+	+	+	+	+	100	49
+	+	+	+	+	-	+	100	43
+	-	-	+	+	+	+	93	43
+	-	-	+	+	-	+	95	37
+	-	-	-	+	-	-	93	33
-	-	-	-	+	+	+	83	26
+	+	+	+	-	-	-	98	23
-	-	-	-	+	-	+	93	20
+	-	-	+	-	-	-	95	17
-	-	-	-	+	-	-	91	18
+	-	-	-	-	-	-	88	15

Таким образом, предложен подход к различению индивидуальных белков, основанный на их взаимодействии с гипохлорит-ионом. Различия в свойствах продуктов окисления белков играют ключевую роль в получении разнообразных откликов при введении белков в индикаторные реакции. Найдены условия получения таких откликов с использованием двух карбоцианиновых красителей, один из которых является коммерчески доступным. Применение кинетических данных и измерение сигнала в разных спектральных диапазонах позволяет использовать всего лишь два красителя в

составе массива сенсоров. Достигнута 100% правильность распознавания модельных белков, что подтверждает надежность предложенного подхода.

4.4. Распознавание аминокликозидов, цефалоспоринов и серосодержащих соединений⁴

Применимость кинетического метода отпечатков пальцев была исследована на возможности различения модельных аналитов разных групп (аминокликозиды, цефалоспорины, серосодержащие соединения). Систематически изучили 8 реакций, включающих окисление 4 карбоцианиновых красителей пероксидом водорода и гипохлоритом натрия. Цель состояла в выявлении реакций, обладающих наиболее высокой способностью к различению аналитов. Кроме того, необходимо было выяснить, сколько, индикаторных реакций требуется скомбинировать для достижения полного распознавания.

Использовали восемь индикаторных реакций с красителями **дор-145**, **дор-249**, **дор-128** и **дор-255**, из которых четыре включали окисление пероксидом водорода, а другие четыре – гипохлоритом натрия. В лунки планшета с помощью многоканального дозатора добавляли в указанном порядке для пероксидных реакций следующие компоненты: 30 мкл 0.067 М фосфатного буфера (pH 7.4), 30 мкл этанола, 30 мкл 5 мМ водного раствора модельного аналита, 30 мкл 1 М H₂O₂, 30 мкл 1 мМ CuSO₄ в качестве катализатора, 30 мкл 0,1 г/л раствора красителя в воде; для гипохлоритных реакций: 30 мкл 0.1 М ацетатного буфера (pH 5.6), 30 мкл этанола, 30 мкл 5 мМ водного раствора модельного аналита, 30 мкл 5 мМ NaOCl, 30 мкл 0.1 г/л раствора красителя в воде. Объем ячейки доводили до 300 мкл с помощью деионизированной воды. За момент начала реакции принимали момент добавления красителя. Изменения поглощения в видимом свете и флуоресценции в БИК-области регистрировали с помощью визуализатора Camag и ИК-визуализатора, соответственно. Для видимых фотографий проводили RGB разложение, для фотографий в ИК свете использовали значение общей интенсивности. Полученную матрицу данных обрабатывали методом линейного дискриминантного анализа в XLSTAT и строили доверительные эллипсы для 90%

⁴ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Shik A. V., Stepanova I. A., Doroshenko I. A., Bliznyuk U. A., Podrugina T. A., Chernyaev A. P., Rodin I. A., Beklemishev M. K. Recognition of Samples of Similar Composition Using Kinetic-Based Optical Fingerprinting Strategy: Choice of Indicator Reactions // Talanta. 2026. Vol. 308. Article 129805. (1.62 п.л.; вклад автора 70%; IF = 5.6, Q1).

вероятности. Для расчета правильности распознавания применяли значение рандомной валидации. Для каждой группы модельных соединений получали отдельную многоклассовую модель, каждое индивидуальное соединение соответствовало отдельному классу. Матрица данных содержала 48 наблюдений в случае цефалоспоринов и серосодержащих соединений и 46 наблюдений в случае аминокликозидов. Число переменных зависело от индикаторной реакции.

Для каждой из трех групп модельных соединений построили графики счетов ЛДА, иллюстрирующие разделение аналитов. На рисунке приведены такие графики для индикаторных реакций, показавших 100% правильность распознавания для каждой группы модельных соединений. На рис. 21 (а) и (б) представлены графики счетов для 8 цефалоспоринов и 6 аминокликозидов, соответственно, введенных в реакцию *дор-145* – H_2O_2 . Для серосодержащих соединений наилучшее различение демонстрирует реакция *дор-145* – $NaOCl$ (рис. 21в).

В табл. 6 приведены значения правильности распознавания модельных аналитов для восьми индикаторных реакций. Для цефалоспоринов наиболее эффективными оказались реакции с пероксидом водорода, особенно с красителями **дор-145** и **дор-249** (100% и 90%, соответственно). Для аминокликозидов максимальная правильность была достигнута с помощью реакции *дор-145* – H_2O_2 , однако, высокие значения правильности также дают реакции *дор-249* – H_2O_2 (97%) и *дор-255* – $NaOCl$ (97%). Для серосодержащих соединений выделяются реакции с гипохлоритом, так, с помощью реакции *дор-145* – $NaOCl$ была достигнута 100% правильность. В целом, реакции окисления с участием пероксида водорода показали лучшую способность к различению: найдено 9 реакций с правильностью выше 90%, а то время как с гипохлоритом таких реакций только 5.

Следует заметить, что универсальной реакции, с помощью которой можно было бы одинаково хорошо различить все модельные соединения, не существует. Например, реакция *дор-145* – H_2O_2 , идеально «работающая» для цефалоспоринов и аминокликозидов, распознает серосодержащие соединения лишь с 88% правильностью. Реакция *дор-145* – $NaOCl$, оказавшаяся лучшей для серосодержащих соединений, хуже распознает цефалоспорины (85%) и особенно аминокликозиды (43%). Тем не менее, с помощью индикаторных реакций *дор-249* – H_2O_2 и *дор-128* – H_2O_2 возможно различение всех трех групп модельных соединений с правильностью выше 90%.

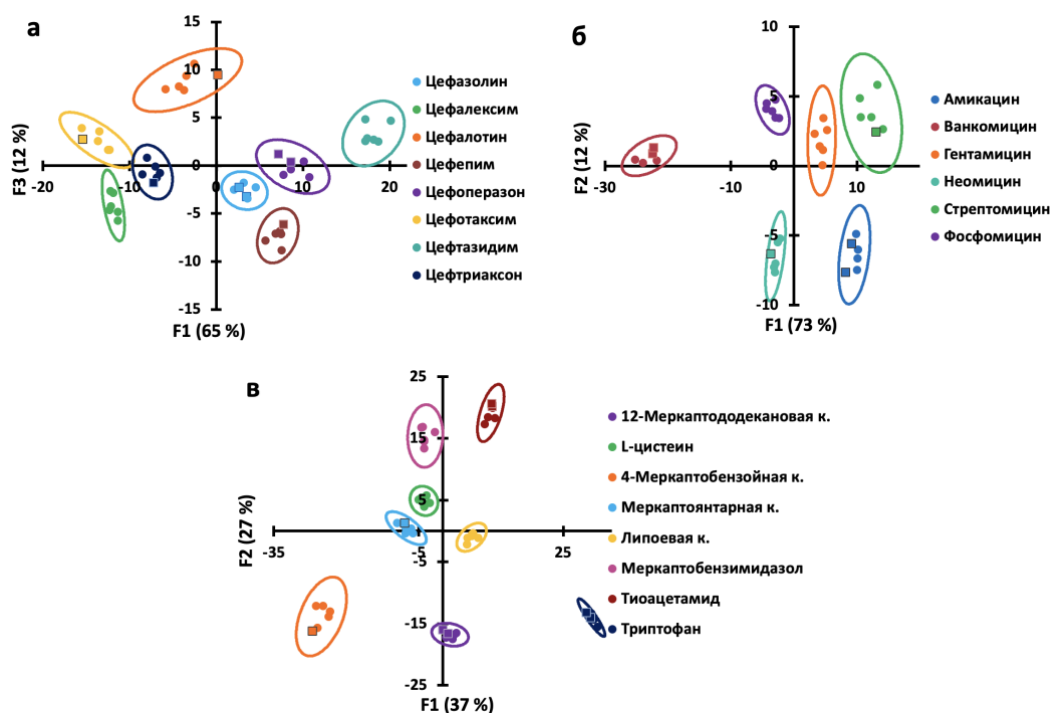


Рис. 21. Графики счетов ЛДА: а) реакция *дор-145* – H_2O_2 в присутствии 8 цефалоспоринов; б) реакция *дор-145* – H_2O_2 в присутствии 6 аминогликозидов; в) реакция *дор-145* – $NaOCl$ в присутствии 8 серосодержащих соединений.

Таблица 6. Правильность распознавания (%) модельных соединений разных групп методом ЛДА с рандомной валидацией

Индикаторная реакция	8 цефалоспоринов	6 аминогликозидов	8 серосодержащих соединений
Дор-145 – $NaOCl$	85	43	100
Дор-249 – $NaOCl$	95	55	98
Дор-128 – $NaOCl$	60	83	98
Дор-255 – $NaOCl$	80	97	83
Дор-145 – H_2O_2	100	100	88
Дор-249 – H_2O_2	90	97	95
Дор-128 – H_2O_2	95	93	95
Дор-255 – H_2O_2	85	70	93
Число реакций с правильностью >90%	4	4	6

В результате систематического изучения 8 индикаторных реакций установлено, что комбинация нескольких систем не является обязательной для достижения 100% правильности распознавания. Достаточно одной реакции, которая обеспечит надежное распознавание всех модельных аналитов. Для выбора такой реакции достаточно изучить ограниченное число систем (в данном случае 8).

Глава 5. Применение кинетического метода отпечатков пальцев к реальным объектам

5.1. Классификация яблочных соков⁵

Свежесть продуктов, в том числе соков, является основным показателем их качества и безопасности. В процессе хранения в соках происходят различные процессы, которые влияют на органолептические свойства и ухудшают качество. Поэтому актуальна разработка простых и экспрессных методов контроля сроков годности. Нам не удалось найти в литературе работ, посвященных определению срока хранения или года производства соков. Мы исследовали пять яблочных соков разных производителей, произведенных в 2022 и 2023 году. Задачей было выбрать подходящие индикаторные реакции и методы обработки данных для бинарной классификации по году производства.

Образцы яблочного сока приобрели в местном магазине. Образцы 2022 года хранились невскрытыми в течение года при комнатной температуре, после чего были заморожены и хранились при -18°C . Образцы 2023 года были заморожены сразу после покупки (табл. 7).

Таблица 7. Нумерация и характеристики образцов яблочного сока без добавления сахара

№	Год производства*	№	Год производства*	Производитель	Калорийность на 100 гр	Примечание
1	2022	6	2023	Агуша	48	Восстановленный
2		7		Малыш	45	
3		8		Мой	46	
4		9		Сады Придонья	44	Прямого отжима
5		10		Ашан	40	Восстановленный

* Разница в сроках производства между двумя образцами каждой марки составляла 13–14 месяцев.

⁵ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Shik A. V., Stepanova I. A., Doroshenko I. A., Bliznyuk U. A., Podrugina T. A., Chernyaev A. P., Rodin I. A., Beklemishev M. K. Recognition of Samples of Similar Composition Using Kinetic-Based Optical Fingerprinting Strategy: Choice of Indicator Reactions // Talanta. 2026. Vol. 308. Article 129805. (1.62 п.л.; вклад автора 70%; IF = 5.6, Q1).

Для различения яблочных соков изучили восемь индикаторных реакций, включающих комбинации четырех красителей и двух окислителей (пероксид водорода и гипохлорит натрия). Для пероксидных и гипохлоритных реакций использовали протоколы, указанные в разделе 3.2.3, добавляя по 30 мкл яблочного сока в ячейку. Для каждого образца выполняли по 6 параллельных измерений. Сигнал измеряли в видимой и БИК-области спектра. Полученная матрица данных была разделена на два класса: соки 2022 и 2023 года производства, каждый из которых содержал по 5 образцов сока, выполненных в 6 параллельных измерениях, которые усреднили для дальнейшей обработки. Матрица данных содержала 60 переменных в случае неусредненных данных и 10 переменных в случае усредненных, число переменных указано в табл. 8. Данные обрабатывали методами ПЛС-ДА, ЛДА и логистической регрессии (ЛР) (табл. 8). строили графики счетов МГК и ПЛС-ДА и график классификации ПЛС-ДА. Подробное описание расчета чувствительности, специфичности и правильности для метода ПЛС-ДА описано в разделе 2.5.2.

Результаты, приведенные в табл.8, позволяют сравнить, насколько эффективно 8 индикаторных реакций распознают соки разного года производства, и каким образом методы обработки данных влияют на правильность распознавания. Реакции с использованием гипохлорита хуже классифицировали образцы, чем реакции с пероксидом водорода. Только одна реакция (*дор-145* – $NaOCl$) показала правильность распознавания 90% с использованием метода ПЛС-ДА, тогда как с использованием ЛДА и ЛР правильность была ниже. Реакции с участием пероксида водорода показали более высокую способность к распознаванию. Полнее всего образцы были классифицированы с помощью реакции *дор-249* – H_2O_2 : с помощью методов ПЛС-ДА и ЛДА была достигнута правильность 100%.

Оценили влияние предварительного усреднения параллельных измерений на эффективность распознавания соков. Для этого обработали неусредненные данные и усредненные по 6 параллельным измерениям с применением валидации LOGO и LOO, соответственно. Как видно из табл. 8, усреднение данных приводит к значительному повышению правильности распознавания. Так, в случае неусредненных данных, ни одна из 8 индикаторных реакций не позволила достичь правильности выше 90%. При использовании усреднения три реакции показали правильность выше 90% при обработке данных хотя бы одним методом, Усреднение данных позволяет лучше выявлять различие между классами, игнорируя внутриклассовую дисперсию.

Сравнение трех методов хемометрической обработки показало, что лучшие результаты дает метод ПЛС-ДА: именно с использованием этого метода три из восьми реакций превысили правильность 90%. Методы ЛДА и ЛР обеспечили высокую правильность с одной индикаторной реакцией.

В табл. 8 также представлены значения чувствительности и специфичности для усредненных данных. Для нашей задачи более важными были высокие значения чувствительности, поскольку именно они показывают способность системы правильно относить образцы к первому классу, то есть выявлять более старые и потенциально просроченные. Реакции с пероксидом водорода показали более высокие значения чувствительности, чем реакции с гипохлоритом, что свидетельствует о лучшей способности этих систем правильно классифицировать образцы 2022 года производства. Метод ПЛС-ДА обеспечил наибольшее количество значений чувствительности, превышающих 90%, что свидетельствует о его лучшей способности выявлять старые соки.

Таблица 8. Чувствительность/специфичность/правильность (%) классификации яблочных соков, произведенных в два разных года, рассчитанные с использованием методов ПЛС-ДА, ЛДА и ЛР. Для неусредненных данных приведена только правильность классификации

<i>Усредненные данные, валидация LOO</i>					
Индикаторная реакция	Число переменных	ПЛС-ДА	ЛДА	ЛР	Число методов с правильностью >90%
Дор-145 – NaOCl	18	100/80/ 90	80/20/50	80/60/70	1
Дор-249 – NaOCl	21	20/80/50	0/20/10	0/20/10	0
Дор-128 – NaOCl	27	40/40/40	80/40/60	60/40/50	0
Дор-255 – NaOCl	36	20/40/30	40/40/40	60/60/60	0
Дор-145 – H ₂ O ₂	21	80/60/70	60/60/60	80/60/70	0
Дор-249 – H ₂ O ₂	21	100/100/ 100	100/100/ 100	80/100/ 90	3
Дор-128 – H ₂ O ₂	21	80/60/70	80/40/60	80/60/70	0
Дор-255 – H ₂ O ₂	21	100/100/ 100	80/60/70	80/60/70	1
Число реакций с правильностью >90%		3	1	1	
<i>Неусредненные данные, валидация LOGO</i>					
Индикаторная реакция	Число переменных	ПЛС-ДА	ЛДА	ЛР	Число методов с правильностью >90%
Дор-145 – NaOCl	18	42	45	55	0
Дор-249 – NaOCl	21	55	45	15	
Дор-128 – NaOCl	27	52	55	55	
Дор-255 – NaOCl	36	53	57	58	
Дор-145 – H ₂ O ₂	21	70	73	77	0
Дор-249 – H ₂ O ₂	21	83	73	77	
Дор-128 – H ₂ O ₂	21	58	60	67	
Дор-255 – H ₂ O ₂	21	82	82	72	
Число реакций с правильностью >90%		0	0	0	

Оптимальными системами для классификации образцов яблочного сока являются индикаторные реакции с пероксидом водорода в сочетании с методом ПЛС-ДА. Качество распознавания зависело от способа хемометрической обработки, что подчеркивает важность выбора правильного метода.

На рис. 22 представлены результаты классификации образцов сока, произведенных в 2022 и 2023 годах, с использованием реакции *дор-255 – H₂O₂* методами

ПЛС-ДА (рис. 22а–в) и МГК (рис. 22г). График классификации ПЛС-ДА (рис. 22а) показывает предсказанные моделью значения, а горизонтальная линия на уровне 0.5 разделяет два класса. Разброс точек на графике показывает достаточно четкое разделение образцов, всего три образца из 60 были классифицированы неправильно. На графике счетов ПЛС-ДА (рис. 22б) видны два разделенных кластера образцов, соответствующих разным годам производства. Таблица нагрузок (рис. 22в) объясняет вклад переменных для первых трех факторов ПЛС-ДА. Наибольшие по модулю значения указывают на переменные, вносящие основной вклад в разделение образцов. В первый фактор наибольший вклад вносят нагрузки переменных синего канала (В), причем их значения остаются высокими во все моменты времени, что указывает на необходимость измерений в течение протекания реакции. На графике счетов МГК в координатах первых двух главных компонент (рис. 22г) наблюдается тенденция к разделению образцов, но классы частично перекрываются, поскольку МГК является методом «без учителя».

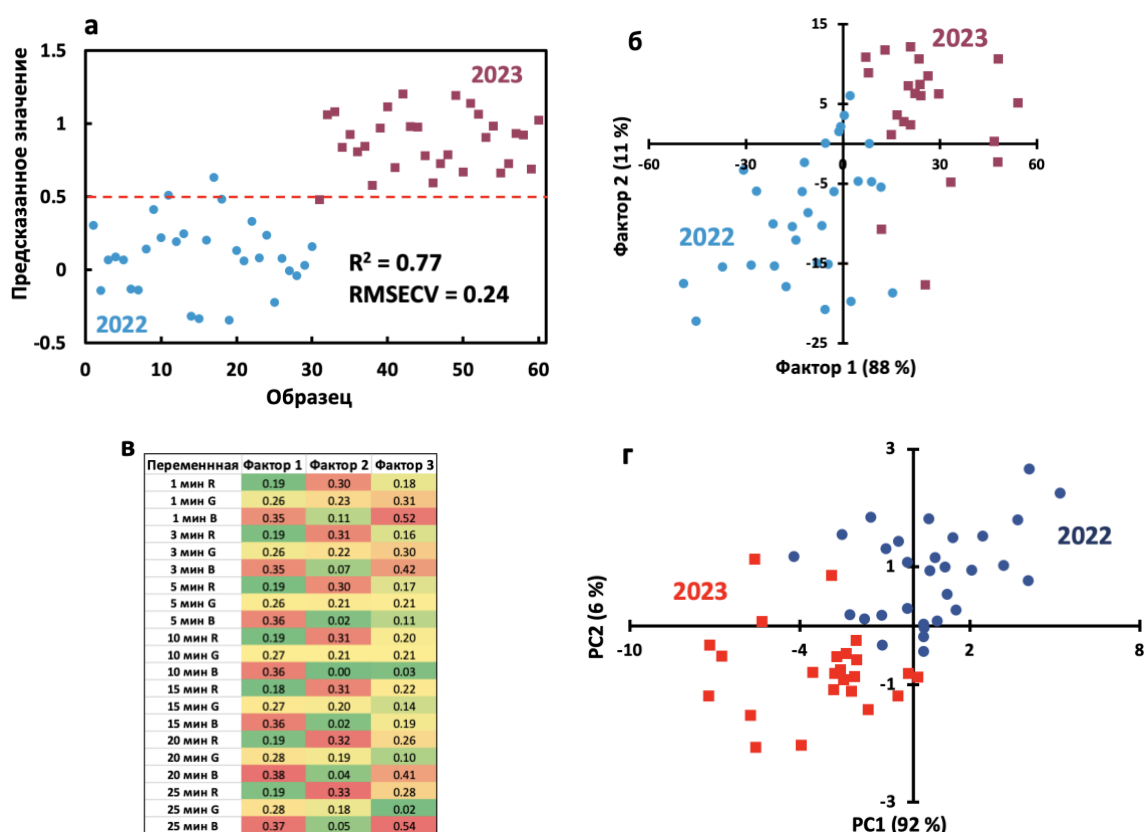


Рис. 22. График классификации ПЛС-ДА (а), график счетов ПЛС-ДА (б), таблица нагрузок для ПЛС-ДА (в), график счетов МГК (г) для образцов сока разного года производства, введенных в реакцию $\text{dop-255} - \text{H}_2\text{O}_2$.

Таким образом, разработан подход к различению яблочных соков двух разных годов производства, основанный на изменении сигналов карбоцианиновых красителей в присутствии образца сока. На примере 8 индикаторных реакций с пероксидом водорода и с гипохлоритом натрия показано, что для достижения максимальной правильности распознавания важен правильный выбор индикаторной системы и метода хемометрической обработки. Выявили, что наиболее эффективны для данной задачи реакции с участием пероксида водорода. Сравнение различных способов обработки данных показало, что метод ПЛС-ДА более эффективен, чем метод ЛДА и логистическая регрессия, обеспечив наибольшее число реакций с правильностью выше 90%.

5.2. Распознавание сычужных ферментов⁶

Образцы сычужных ферментов различных производителей приобретали в компании «Здоровеево» (Москва, Россия, <https://www.zdoroveevo.ru>). Образцы (табл. 9) были получены из разного сырья и имели различное соотношение химозина и пепсина. В качестве вспомогательного вещества в состав всех образцов входил хлорид натрия. Фактическое содержание белка в препаратах, определенное нами по методу Брэдфорд, основанного на зависимости светопоглощения красителя кумасси G-250 от количества белка в растворе, также показано в табл. 9. Навеску красителя кумасси G-250 растворяли в этаноле, добавляли ортофосфорную кислоту и фильтровали полученный раствор. Готовили серию разведений БСА в фосфатном буфере в диапазоне 5–25 мкг/мл. В ячейку планшета вносили 10 мкл стандартного образца или раствора фермента и 200 мкл реагента Бредфорд и выдерживали при комнатной температуре 10 мин. Измеряли оптическую плотность при длине волны 595 нм и получали линейную зависимость оптической плотности от концентрации БСА. Концентрацию белка в образцах ферментов рассчитывали по градуировочному графику.

⁶ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Shik A. V., Stepanova I. A., Doroshenko I. A., Podrugina T. A., Beklemishev M. K. Carbocyanine-Based Optical Sensor Array for the Discrimination of Proteins and Rennet Samples Using Hypochlorite Oxidation // *Sensors*. 2023. Vol. 23, No. 9. Article 4299. (1.85 п.л.; вклад автора 60%; IF = 3.7, Q1).

Таблица 9. Номера сычужных ферментов и их характеристики

№	Состав	Общее содержание белка, %
1	Химозин из дрожжей <i>Kluyveromyces lactis</i> y (Испания)	10.0
2	Химозин 90% / бычий пепсин 10% (Россия)	7.4
3	Химозин из грибов <i>Rhizomucor miehei</i> (Китай)	14.9
4	Телячий химозин 50% / бычий пепсин 50% (Италия)	5.9
5	Бычий пепсин 50% / птичий пепсин 50% (Россия)	9.3
6	Химозин 70–80% / бычий пепсин 20–30% (Россия)	6.2
7	Пепсин из грибов <i>Rhizomucor miehei</i> (Италия)	14.3
8	Химозин 90% / бычий пепсин 10% (Франция)	13.3
9	Химозин 90% / бычий пепсин 10% (Россия)	7.4
10	Пепсин из грибов <i>Rhizomucor miehei</i> fungus (Япония)	14.7

Все образцы содержали только два фермента: химозин и пепсин из различного сырья, причем в разных соотношениях, что могло усложнить задачу распознавания.

Использовали растворы сычужных ферментов концентрацией 3 г/л, растворенных в воде. Проводили индикаторные реакции, как указано в разделе 3.2.3, используя реакции окисления красителей **дор-128** и **Су5.5** гипохлоритом и получая фотографии планшетов в течение 40 мин. Полная матрица данных содержала 66 наблюдений и 34 переменные. Данные обрабатывали методом ЛДА с рандомной валидацией, при этом каждый из 10 образцов сычужных ферментов рассматривали как отдельный класс.

Исследовали, сколько измерений достаточно для достижения максимальной правильности распознавания образцов ферментов. В табл. 10 представлены результаты расчета правильности при использовании сигналов двух индикаторных реакций, измеренных в трех спектральных диапазонах (поглощение в видимой области, флуоресценция в УФ и в ИК-областях). Комбинируя эти сигналы, получили наборы данных, состоящие из 9–34 столбцов. При использовании сигнала красителя дор-128 только в видимой области правильность составляет лишь 74%, добавление к нему измерения в ИК-области незначительно повышает правильность до 77%, а использование сигналов во всех трех областях позволяет получить правильность уже 97%. Аналогичные сигналы реакции с красителем Су5.5 дают правильность 94% и 97% соответственно. Максимальная правильность распознавания (100%) достигается при объединении сигналов обоих красителей, измеренных в видимой и в ИК-областях.

Дальнейшее расширение набора данных незначительно снижает правильность, что может быть связано с избыточностью данных. Принципиально важно, что 100% правильности можно достичь, лишь объединив данные, полученные от двух красителей в нескольких спектральных областях.

Таблица 10. Правильность распознавания 10 образцов сычужных ферментов и контроля с использованием разных наборов данных. Использована рандомная валидация

Су5.5			Дор-128			Правильность	Число переменных
Вид	УФ (254)	ИК	Вид	УФ (366)	ИК		
-	-	-	+	-	-	74	18
-	-	-	+	-	+	77	19
+	-	-	-	-	-	94	9
+	-	+	-	-	-	97	11
+	+	+	-	-	-	97	14
-	-	-	+	+	+	97	20
+	-	-	+	-	-	97	27
+	-	+	+	-	+	100	30
+	-	+	+	+	+	100	31
+	+	+	+	-	+	97	33
+	+	+	+	+	+	96	34

Результат различения образцов ферментов с помощью двух индикаторных реакций показан на графике счетов ЛДА (рис. 23) В наиболее благоприятном варианте распознавание характеризуется 100% правильностью при использовании рандомной валидации. Корреляции соотношения пепсина и химозина с аналитическим сигналом не нашли, и это позволило считать, что основную роль в распознавании играет происхождение препарата.

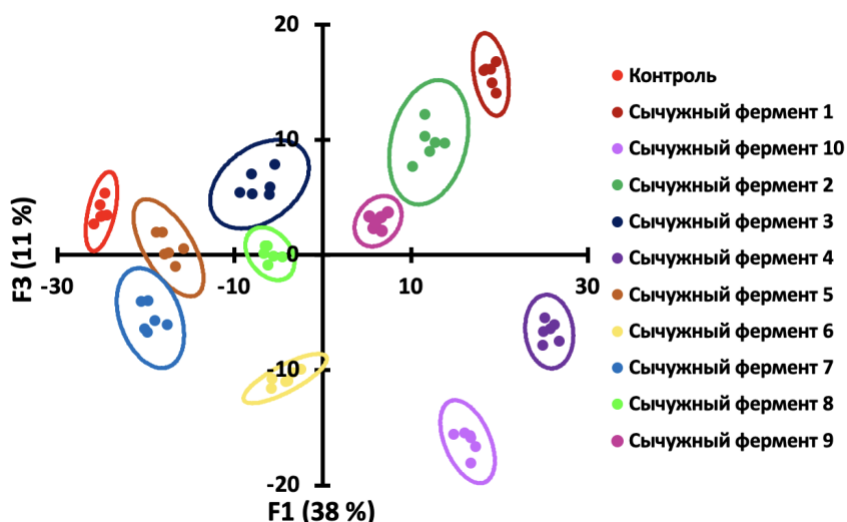


Рис. 23. График счетов ЛДА в координатах факторов F1–F3 для 10 образцов сычужных ферментов разных производителей и контроля с эллипсами для доверительной вероятности 90%. Данные получены от реакций **Cy5.5** и **доp-128** с гипохлоритом.

В результате разработан подход к распознаванию белковых препаратов на примере образцов сычужных ферментов. Результаты подтверждают применимость предложенного метода на основе матрицы из двух сенсоров для распознавания 10 сычужных ферментов разных производителей. Для распознавания достаточно двух элементов массива (двух индикаторных реакций) за счет обеспечения необходимого объема данных путем проведения измерений во времени. Показано, что для достижения максимальной правильности распознавания достаточно измерения поглощения в видимой области и флуоресценции в ИК-области, однако важно использовать комбинацию двух красителей.

5.3. Классификация моторных масел⁷

Многие аналиты относятся к гидрофобным соединениям, и использование нового метода в неводной среде требует адаптации методик. К таким аналитам относятся моторные масла, представляющие собой многокомпонентные смеси. Кинетический метод отпечатков пальцев ранее не применялся нами к жирорастворимым образцам из-

⁷ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Pypin A. A., Shik A. V., Stepanova I. A., Doroshenko I. A., Podrugina T. A., Beklemishev M. K. A Reaction-Based Optical Fingerprinting Strategy for the Recognition of Fat-Soluble Samples: Discrimination of Motor Oils // Sensors. 2023. Vol. 23, No. 18. Article 7682. (1.62 п.л.; вклад автора 30%; IF = 3.7, Q1).

за предполагаемой несовместимости индикаторных реакций, проводимых в водной среде, с гидрофобной природой масел. Задачей была разработка индикаторных реакций, пригодных для распознавания жирорастворимых образцов. Требовалось выбрать реакции, протекающие в растворах с относительно низким содержанием воды, и применить их к различению 6 моторных масел 4-х производителей. Моторные масла часто фальсифицируют, поэтому мы попытались применить метод для классификации масел на высококачественные масла и их более дешевые аналоги. Для упрощения методики исследовали возможность использования камеры смартфона вместо визуализатора.

Синтетические моторные масла четырех производителей были предоставлены местным поставщиком (табл. 11). Каждое из высококачественных масел SRS 5W30, 5W40 и 10W40 имело свой более дешевый аналог (LUK, EVE и GAZ, соответственно).

Таблица 11. Характеристики моторных масел

Обозначение	Название	Маркировка SAE	Производитель
SRS 5W30	Cargolub TFX	5W30	SRS Schmierstoff Vertrieb GmbH
SRS 5W40	Cargolub TFX	5W40	SRS Schmierstoff Vertrieb GmbH
SRS 10W40	Cargolub TFX	10W40	SRS Schmierstoff Vertrieb GmbH
LUK	Genesis Armortech	5W30	Лукойл (LLK International)
EVE	Everest	5W40	US Global Petroleum
GAZ	Gazpromneft Premium	10W40	Gazpromneft-SM

Моторные масла смешивали с абсолютным этанолом в соотношении 1:29 (об/об) и хранили в течение суток, после чего удаляли образовавшийся незначительный осадок. Полученные этанольные растворы использовали в качестве образцов масла на протяжении всего исследования. 1М раствор HCl в этаноле готовили путем смешивания концентрированного водного раствора HCl (10 M) с абсолютным этанолом (1:9, об/об). Для приготовления царской водки в качестве окислителя готовили смесь концентрированных водных растворов HCl (10 M) и HNO₃ (70% по массе) в соотношении 1:15 (об/об), которой давали постоять не менее 24 ч перед использованием. Раствор t-BuOON готовили из 5 M раствора в *n*-декане путем разбавления абсолютным этанолом. Условия индикаторных реакций приведены в табл. 12.

Для проведения индикаторных реакций в 96-луночном планшете каждый образец масла помещали в 6 лунок (для получения 6 повторений), а все остальные реагенты добавляли многоканальным дозатором в последовательности, указанной в табл. 12.

Момент добавления последнего реагента считали началом реакции. Каждые несколько минут для каждого планшета делали два вида снимков: (1) в видимом диапазоне для мониторинга поглощения и (2) в БИК-диапазоне с помощью ИК визуализатора для мониторинга интенсивности флуоресценции при возбуждении красным светом. Фотографические изображения оцифровывали и получали матрицу данных, в которой строки представляли собой образцы моторного масла в 6 повторениях (всего 36), а столбцы – каналы интенсивности в разные моменты времени (число переменных указано в табл. 13). Данные обрабатывали методом ЛДА или с помощью алгоритма kNN.

Таблица 12. Условия проведения индикаторных реакций с образцами моторного масла в 96-луночных планшетах

Краситель	Окислитель	Другие компоненты
Cy7	t-BuOOH	а) 10 мкл раствора моторного масла; б) 10 мкл красителя Cy7 0.1 г/л; в) 10 мкл 1 М HCl; г) 180 мкл EtOH; д) 90 мкл 0.5 М t-BuOOH
	t-BuOOH (Cu ²⁺ как катализатор)	а) 10 мкл раствора моторного масла; б) 10 мкл красителя Cy7 0.1 г/л; в) 10 мкл 1 М HCl; г) 200 мкл EtOH; д) 10 мкл 1·10 ⁻⁴ М Cu ²⁺ ; е) 60 мкл 0.5 М t-BuOOH
	HNO ₃	а) 10 мкл раствора моторного масла; б) 10 мкл красителя Cy7 0.1 г/л; в) 250 мкл этанола; г) 30 мкл концентрированной азотной кислоты.
	Царская водка	а) 10 мкл раствора моторного масла; б) 10 мкл царской водки; в) 270 мкл этанола; г) 10 мкл красителя Cy7 0.1 г/л.
	O ₂	а) 10 мкл раствора моторного масла; б) 10 мкл красителя Cy7 0.1 г/л; в) 60 мкл концентрированной соляной кислоты; г) 220 мкл этанола.
Дор-250	t-BuOOH	а) 10 мкл раствора моторного масла; б) 10 мкл красителя дор-250 0.1 г/л; в) 10 мкл 1 М HCl; г) 180 мкл EtOH; д) 90 мкл 0.5 М t-BuOOH
	t-BuOOH (Cu ²⁺ как катализатор)	а) 10 мкл раствора моторного масла; б) 10 мкл красителя дор-250 0.1 г/л; в) 10 мкл 1 М HCl; г) 220 мкл EtOH; д) 20 мкл 1·10 ⁻⁴ М Cu ²⁺ ; е) 30 мкл 0.5 М t-BuOOH
	HNO ₃	а) 10 мкл раствора моторного масла; б) 10 мкл красителя дор-250 0.1 г/л; в) 250 мкл этанола; г) 30 мкл концентрированной азотной кислоты.
	Царская водка	а) 30 мкл раствора моторного масла; б) 30 мкл царской водки; в) 230 мкл этанола; г) 10 мкл красителя дор-250 0.1 г/л

Необходимо было разработать индикаторные реакции, которые можно проводить в среде с достаточно низким содержанием воды, в которой при этом

компоненты масла оставались бы в растворе, не образуя отдельную фазу. Для окисления красителей **Cy7** и **доp-250** протестировали ряд окислителей: жирорастворимые (трет-бутилгидроксипероксид (t-BuOOH)), водорастворимые (концентрированная азотная и соляная кислоты, царская водка (смесь концентрированных азотной и соляной кислот)), и атмосферный кислород. При проведении реакций с этими реагентами не наблюдали расслоения фаз. Подробные условия проведения индикаторных реакций представлены в табл. 12.

На рис. 24 показаны примеры изображений в видимом свете, полученные с помощью камеры смартфона. Видно, что визуальное распознавание образцов затруднено, поэтому требовалась дальнейшая хеометрическая обработка. Для некоторых систем построили кинетические кривые для каждого масла, выбирая для построения те каналы, при которых наблюдали наибольшее разделение образцов (рис. 25). Видно, что моторные масла по-разному влияют на формы кинетических кривых, однако полное распознавание не было достигнуто.

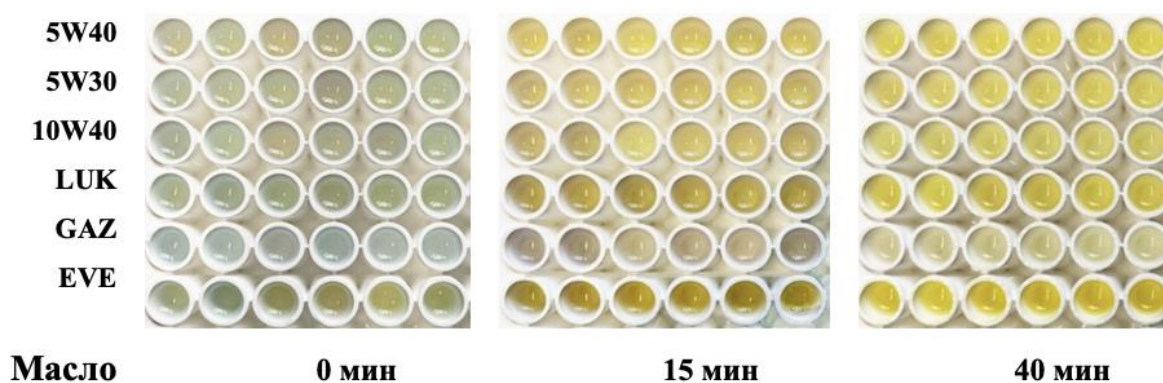


Рис. 24. Изображения реакционной системы *моторное масло + краситель Cy7 + HNO3*, полученные с помощью камеры смартфона. В строках лунок – параллельные опыты для одного и того же образца. Под каждым изображением указано время после начала реакции.

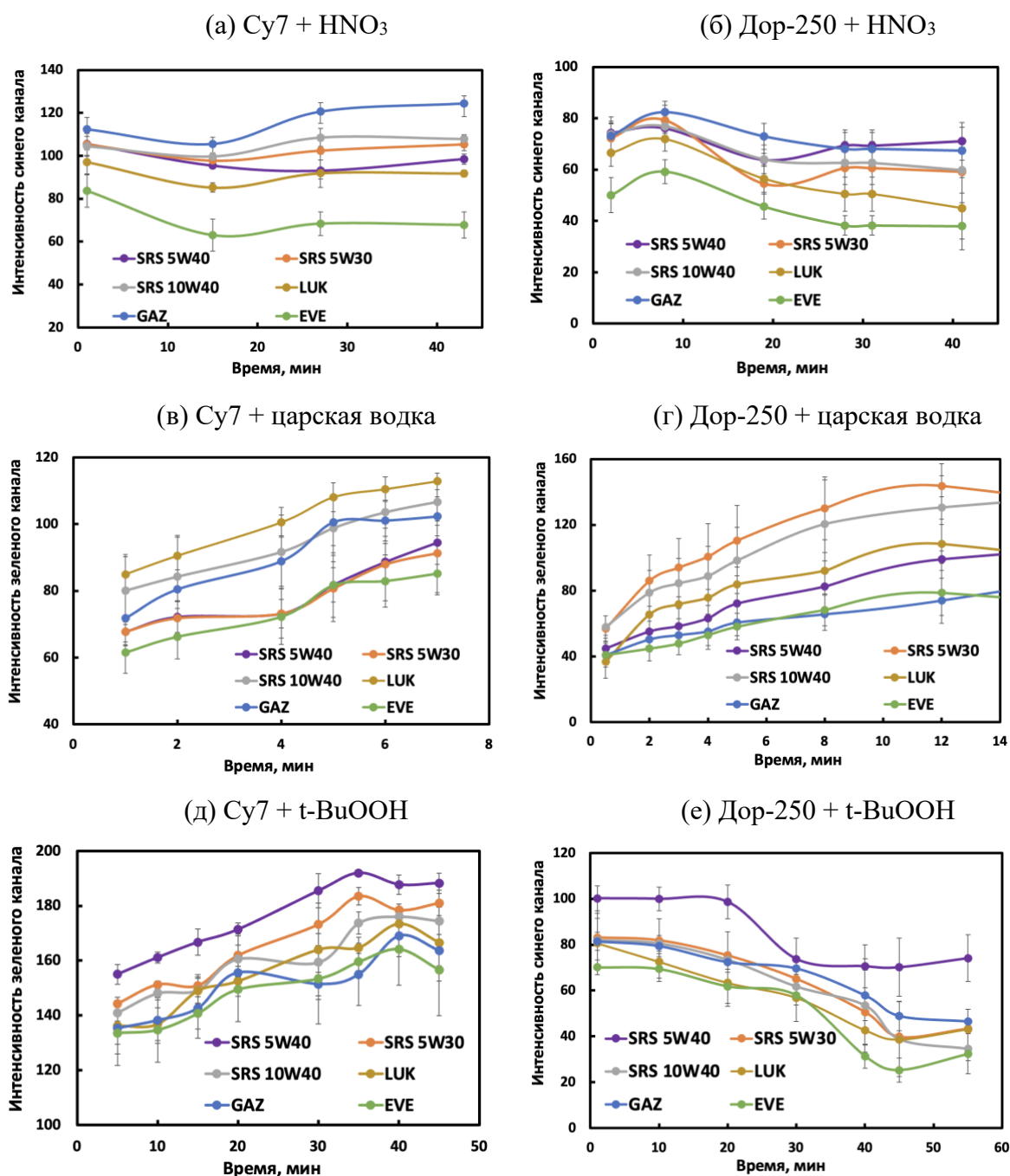


Рис. 25. Кинетические кривые индикаторных реакций в присутствии образцов масла, показанных в легенде. Каждая кривая является результатом усреднения по 6 повторным измерениям, полосы погрешностей соответствуют стандартным отклонениям.

Правильность распознавания 6 образцов моторного масла оценивали с помощью методов ЛДА, софтмакс регрессии (СР) и алгоритма kNN с применением случайной валидации (табл. 13). Для методов СР и kNN не было найдено ни одной реакции, которая различала бы все 6 образцов с правильностью выше 90%. Лучшие результаты для

красителя **Су7** были достигнуты с использованием окисления азотной кислотой и кислородом воздуха, правильность для этих реакций составила 94% и 92%, соответственно. Правильность 94% также была получена при использовании реакции каталитического окисления красителя **дор-250** трет-бутилгидроксипероксидом. Для обоих красителей наименее эффективной для различения моторных масел оказалась реакция с царской водкой. С помощью методов СР и kNN различение образцов было хуже, чем с помощью метода ЛДА. Так, максимальная правильность составила 89% и 78% для СР и kNN, соответственно.

Для визуализации распознавания образцов построили графики счетов ЛДА для реакций $\text{Су7} - \text{HNO}_3$ и $\text{Су7} - \text{HCl}$ (рис. 26). Для каждой группы точек построили эллипсы для 90% доверительной вероятности, валидационные точки обведены черным. Не была достигнута 100%-ная правильность распознавания, что также видно из графиков счетов, на которых некоторые валидационные точки отнесены неправильно.

Таблица 13. Правильность различения (%) 6 моторных масел с использованием индивидуальных индикаторных реакций

Краситель	Окислитель	Число переменных	Тип данных	Правильность, %		
				ЛДА	СР	kNN
Су7	t-BuOOH	40	Вид. + БИК	75	72	57
	t-BuOOH (Cu^{2+} катализатор)	47	Вид. + БИК	81	69	56
	«Царская водка»	24	Вид.	64	72	53
	O_2 (HCl)	18	Вид.	92	89	78
	HNO_3	15	Вид.	94	81	72
Дор-250	t-BuOOH	52	Вид. + БИК	67	78	47
	t-BuOOH (Cu^{2+} катализатор)	72	Вид. + БИК	94	69	50
	«Царская водка»	27	Вид.	44	72	50
	HNO_3	18	Вид.	83	78	58

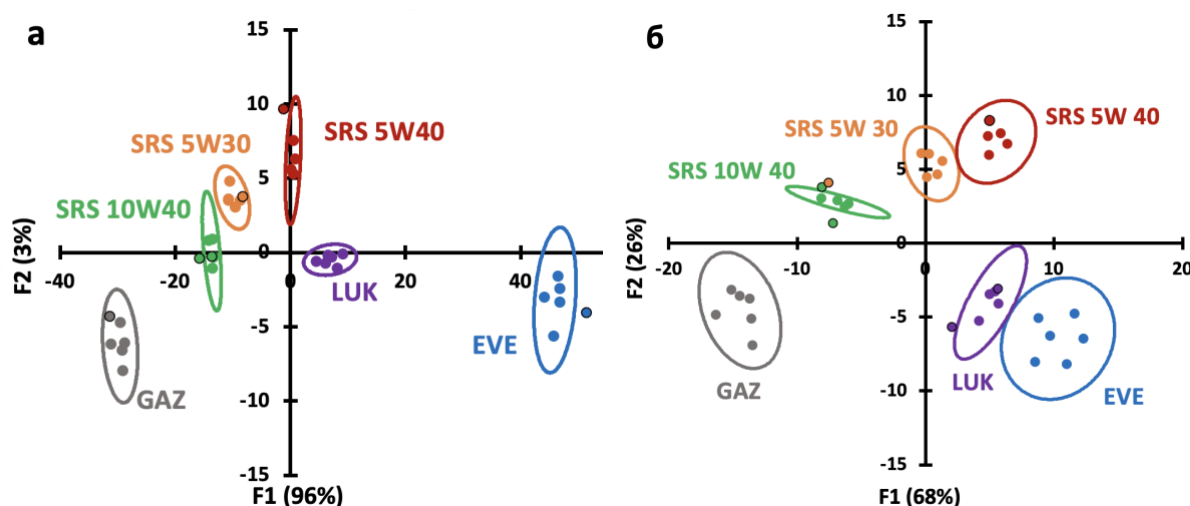


Рис. 26. Графики счетов ЛДА для 6 моторных масел: а) реакция красителя **Су7** с концентрированной азотной кислотой, б) реакция красителя **Су7** с кислородом воздуха в присутствии концентрированной соляной кислоты.

Другой задачей была разработка простого и недорогого метода для различения дорогих моторных масел и их более дешевых аналогов (потенциального фальсификата). Полученные ранее данные объединили в два класса и обработали теми же хемометрическими методами (ЛДА, ЛР) и ПЛС-ДА. В реальных условиях обычно требуется определить принадлежность неизвестного образца к тому или иному классу, поэтому в данном случае использовали валидацию LOO, предварительно усреднив параллельные измерения.

В табл. 14 представлена правильность распознавания для каждой индикаторной реакции. По сравнению с различением 6 образцов, для классификации моторных масел оказались эффективными другие индикаторные реакции. 100%-ную правильность распознавания дорогих моторных масел и их более дешевых аналогов показали реакции окисления красителей **Су7** и **доп-250** азотной кислотой. Кроме того, реакции с использованием третбутилгидроксипероксида и царской водки показали правильность выше 80%, что можно считать удовлетворительным результатом при применении валидации LOO на усредненных данных. Методы ЛДА и ПЛС-ДА лучше распознавали образцы, чем метод ЛР, который оказался неэффективен для данной задачи.

Таблица 14. Правильность классификации (%) моторных масел на высококачественные и более дешевые аналоги (два класса) с использованием индивидуальных индикаторных реакций. В методах использована валидация LOO, проведено усреднение по 6 параллельным измерениям

Краситель	Окислитель	Правильность, %		
		ЛДА	ЛР	ПЛС-ДА
Су7	t-BuOOH	33	67	83
	t-BuOOH (Cu ²⁺ катализатор)	67	83	50
	Царская водка	33	50	50
	O ₂ (HCl)	67	67	50
	HNO ₃	100	83	100
Дор-250	t-BuOOH	67	67	67
	t-BuOOH (Cu ²⁺ катализатор)	50	67	67
	Царская водка	83	50	67
	HNO ₃	67	67	100

Таким образом, на примере моторных масел разработали подход к распознаванию жирорастворимых образцов с использованием индикаторных реакций, проводимых в среде с низким содержанием воды. С помощью реакции красителя **Су7** с азотной кислотой 6 моторных масел распознаны с правильностью 94% методом ЛДА. При использовании индикаторных реакций обоих красителей с азотной кислотой образцы масел классифицированы на два класса (дорогой – дешевый) с 100% правильностью. Методика, основанная на использовании камеры смартфона, является простой и быстрой, что позволяет использовать ее для испытаний различных объектов при отсутствии полноспектрального оборудования и визуализаторов.

5.4. Распознавание вод из разных источников⁸

Вода – незаменимый природный ресурс и важный объект окружающей среды. Все источники воды требуют строгого аналитического контроля, что подразумевает необходимость проведения большого числа анализов, желательно не требующих дорогого оборудования и длительного времени. Это делает актуальной разработку

⁸ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Skorobogatov E. V., Shik A. V., Sobolev P. V., Stepanova I. A., Orekhov V. S., Ustyuzhanin A. O., Koksharova M. V., Ikhlaynen Y. A., Timchenko Y. V., Rodin I. A., Beklemishev M. K. Monitoring Different Water Types for Engine Oil-Water-Soluble Fraction and Iron(2+) Using a Reaction-Based Optical Sensing Strategy: A Proof-of-Concept Study // Industrial & Engineering Chemistry Research. 2024. Vol. 63, No. 28. P. 12336-12349. (1.6 п.л.; вклад автора 30%; IF = 3,9; Q1).

доступных и высокопроизводительных методов скрининга, которые можно было бы использовать для предварительного анализа источников водоснабжения. Задачей данного раздела было исследовать применимость кинетического метода отпечатков пальцев для различения типов и отдельных образцов вод.

11 образцов воды из скважин, родников, колодцев, пруда и водопровода были предоставлены Аналитическим центром Химического факультета МГУ. Характеристики образцов представлены в табл. 15. При отборе проб соблюдали общие требования [107]. Содержание неорганических компонентов оценивали методом рентгенофлуоресцентного анализа с полным отражением (РФА ПВО) (результаты получены доц. Д.Г.Филатовой; табл. 16).

При проведении индикаторных реакций в ячейки планшета добавляли буфер, окислитель, образец воды объемом 100 мкл и краситель, объем ячейки доводили до 300 мкл деионизированной водой. Данные, полученные после фотографирования планшетов, обрабатывали методом линейного дискриминантного анализа в XLSTAT. Матрица данных содержала 66 наблюдений, число переменных для каждой индикаторной реакции указано в табл. 17. Рассчитывали правильность распознавания как среднее из пяти запусков программы. Кроме того, для различения типов воды таблица данных была реорганизована так, что воды из источников одного типа были объединены в отдельные классы. При распознавании 11 образцов воды, каждый образец рассматривали как отдельный класс; при распознавании вод по типам образцы объединили в соответствии с их происхождением и использовали пятиклассовую модель.

Таблица 15. Характеристика образцов воды

Образец	Цветовая степень	Мутность*	pH	Жесткость (dH)	MnO ₄ ⁻ индекс**	F ⁻	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Сухой остаток***
Скважина-1	3.9	1	6.7	2.1	1.5	0.03	18	36	25	180
Скважина-2	5.8	1	7.4	3.9	2.7	0.3	32	4.8	22	340
Скважина-3	8.4	1	7.3	0.1	3.6	0.03	97	1.8	160	750
Водопровод-1	5.3	1	6.8	0.1	3.5	1.5	3.9	4.3	8.1	500
Водопровод-2	3.4	1.1	7.6	6.4	1.3	0.3	32	3.4	27	340
Колодец-1	57	30	6.6	2.8	2.1	0.6	60	2.3	73	630
Колодец-2	5.0	1	6.3	2.9	3.0	0.3	0.5	0.5	0.5	380
Родник-1	29	8.1	7.6	27	3.8	0.3	200	38	900	2500
Родник-2	2.3	1	6.4	8.4	1.2	0.03	120	2.3	62	470
Пруд-1	7.5	1	7.3	8.3	1.1	0.5	90	4.2	84	740

* Единицы измерения мутности формазина. ** мг кислорода/л. *** мг/л.

Таблица 16. Содержание неорганических компонентов проб воды по данным РФА ПВО, (мг/л)

Образец	Mg	Cl	K	Ca	Ti	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	Br	Sr
Скважина-1	5.3	14.2	1.45	20.4	0.35	0.006	0.04	0.012	0.10	0.35	0.015	0.062
Скважина-2	10.4	16.3	1.73	35.8	0	0.011	0.022	0	0	0.026	0.0096	0.11
Скважина-3	0	61.5	0.29	0.35	0	0	0.008	0	0.0038	0.031	0.056	0
Водопровод-1	0	2.01	1.66	0.26	0	0	0.01	0	0.02	0.050	0.010	0.002
Водопровод-2	15.3	20.4	3.11	21.3	0	0	0	0	0	0.016	0.024	0.84
Колодец-1	0	36.3	3.02	26.1	0.016	0	0.21	0.012	0.0094	0.041	0.017	0.14
Колодец-2	0	94.3	0.79	28.8	0	0	0.012	0.004	0.014	0.14	0.049	0.08
Родник-1	26.6	119	8.54	151.3	0	0	0.021	0	0.0056	0.010	0.299	3.7
Родник-2	9.9	86.5	1.20	62.9	0	0	0.011	0	0	0.021	0.036	0.11
Пруд-1	5.5	42.6	4.17	49.0	0	0	0.0058	0	0	0.007	0.089	0.34
Пруд-2	13.1	47.2	3.10	35.4	0	0	0.010	0	0	0.009	0.026	0.76

На рис. 27 представлены кинетические кривые для реакции *доp-145* – *NaOCl*. Видно, что визуальное различие с использованием кинетических кривых, построенных в одном диапазоне, невозможно, и требуется дальнейшая хеометрическая обработка. Всего изучили 11 индикаторных реакций (табл. 17), однако высокой правильности (100%) удалось достичь лишь с использованием реакции *доp-145* – *NaOCl*. Трехмерные графики счетов ЛДА (рис. 28б) демонстрируют различие всех 11 образцов вод с помощью упомянутой реакции.

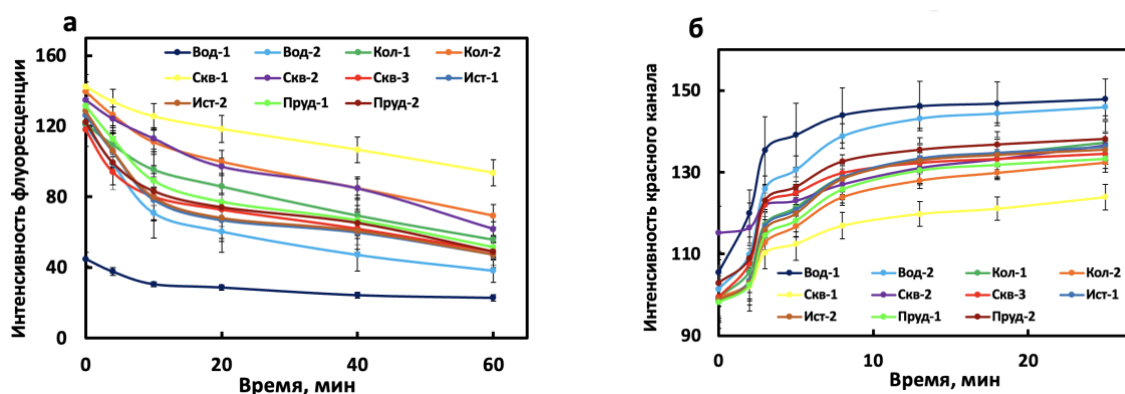


Рис. 27. Кинетические кривые для реакции *доp-145*-*NaOCl*, полученные путем измерения флуоресценции в БИК-области (а) и поглощения в видимой (красный канал; б). Доверительные интервалы представляют собой стандартное отклонение, рассчитанное на основе 6 параллельных экспериментов.

Другой задачей было различие чистых образцов вод по типам. Для этого полученные ранее данные перегруппировали в 5 классов по типам вод и обработали

методом ЛДА, что позволило различить все 5 типов вод (колодезная, родниковая, водопроводная, из пруда и из скважины) с правильностью 96% (рис. 28а).

Таблица 17. Правильность распознавания 11 вод с использованием метода ЛДА с случайной валидацией

Индикаторная реакция	Число переменных	Правильность, (%)
Дор-145 – NaOCl	33	100
Дор-145 – H ₂ O ₂	23	83
Акри-278 – H ₂ O ₂	30	83
Дор-128 – H ₂ O ₂	18	80
Дор-255 – H ₂ O ₂	41	79
Су5.5 – NaOCl	28	78
Су7 hydr - HCl	52	77
Дор-249 – H ₂ O ₂	27	73
Дор-249 – NaOCl	27	73
Дор-128 – NaOCl	18	58
Дор-255 – NaOCl	27	33

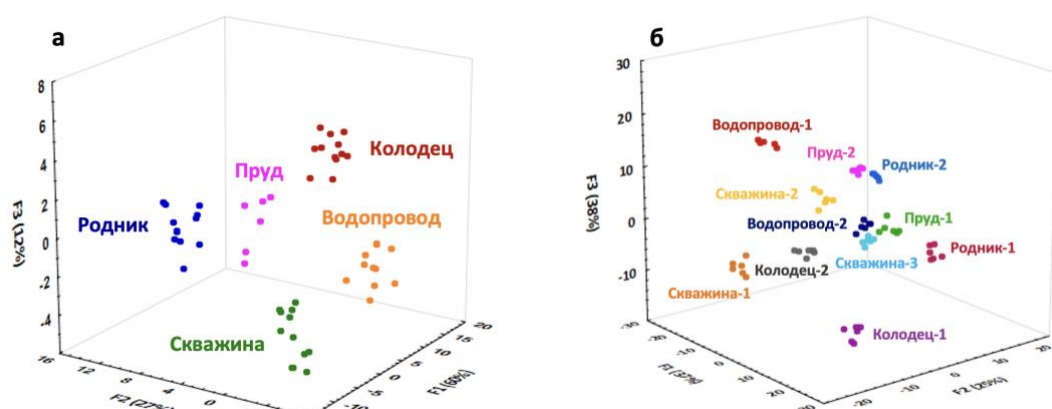


Рис. 28. Графики счетов ЛДА для 5 типов природных вод (а) и 11 вод из разных источников (б), введенных в реакцию *дор-145 – NaOCl*.

5.5. Обнаружение загрязнителей в природных водах

Задачей было распознавание искусственно загрязнённых вод и чистых образцов. Выбрали два типа загрязнителей – органический и неорганический – и исследовали возможность их обнаружения в природной воде. В качестве органического загрязнителя выбрали моторное масло, водорастворимая фракция (ВРФ) которого может попадать в природные воды и источники водоснабжения в местах, прилегающих к автомойкам и автомастерским. Стремались продемонстрировать возможность обнаружения водорастворимой фракции в различных типах вод и оценить ее количество, определяемое как степень разбавления. Неорганическим модельным анализом было

железо(II), которое в большом количестве содержится в грунтовых водах, а его концентрация часто превышает максимально допустимую концентрацию. Влияние железа (II) изучали так же, как влияние ВРФ моторного масла.

Для обогащения вод железом(II) в образцы добавляли свежеприготовленный раствор соли Мора $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, поскольку она является наиболее стабильной формой железа(II). Конечная концентрация железа в экспериментах составляла 0.3 мг/л, поскольку таковы рекомендации ВОЗ по общему содержанию железа в питьевой воде [108]

Для искусственного загрязнения образца воды моторным маслом (использовали масла Лукойл и Газпром) 12,5 мл образца воды смешивали со 100 мкл масла в стеклянной пробирке, встряхивали вручную в течение 30 секунд и помещали на орбитальный шейкер (100 мин^{-1}) на 24 ч [109]. Затем образцы оставляли на 4 ч для осаждения возможной эмульсии, а водную фазу отделяли фильтрацией через смоченный целлюлозный фильтр («синяя лента», размер пор 2–3 мкм) для получения прозрачного раствора водорастворимой фракции (ВРФ); этот раствор дополнительно разбавляли соответствующим образцом воды для получения различных разведений водорастворимой фракции и вводили в индикаторную реакцию необходимый объем раствора.

При проведении индикаторной реакции *dop-145* – *NaOCl* использовали 7 образцов воды с добавлением водорастворимой фракции моторного масла или ионов железа(II) и 7 образцов тех же природных вод без добавления упомянутых загрязнителей. Таблица данных содержала 14 классов и была обработана методом линейного дискриминантного анализа в XLSTAT. Кроме того, для моделирования реальной ситуации, в которой анализу подвергается неизвестный образец, данные делили на два класса (чистые и загрязненные образцы) и использовали валидацию с «исключением по одной группе».

Моторное масло содержит углеводороды и до 20% по объему диспергаторов, детергентов, антифрикционных, противоизносных, антикоррозионных, пеногасителей, загустителей и других добавок. При контакте этой смеси с водой водорастворимые компоненты переходят в нее, что и приводит к загрязнению. Мы насытили чистые образцы природных вод водорастворимой фракцией моторного масла марки «Лукойл» и ввели их в реакцию *dop-145* – *NaOCl*, поскольку она оказалась наиболее перспективной для различения чистых образцов вод. На графике счетов ЛДА (рис. 29а) чистые и загрязненные образцы образуют две группы; правильность распознавания

составила 92% с использованием случайной валидации и 93% с использованием валидации LOGO.

Помимо различия чистых и загрязненных образцов, продемонстрировали возможность обнаружения ВРФ моторного масла различной степени разбавления и оценили максимально возможную степень разбавления, которую можно обнаружить. С этой целью образцы воды, содержащие ВРФ, разбавляли чистой водой того же образца в различных пропорциях, вплоть до 1:35, и полученные растворы вводили в индикаторную реакцию *доp-145* – *NaOCl* (использовали водопроводную и колодезную воду). На графике счетов ЛДА (рис. 29б) максимальное разбавление (35-кратное) дифференцировано от соответствующих чистых образцов и от меньших степеней разбавления. Правильность различения составила 92%, что подтверждает применимость индикаторной реакции для различения различных степеней разбавления ВРФ моторного масла между собой и от незагрязненных образцов колодезной и водопроводной воды.

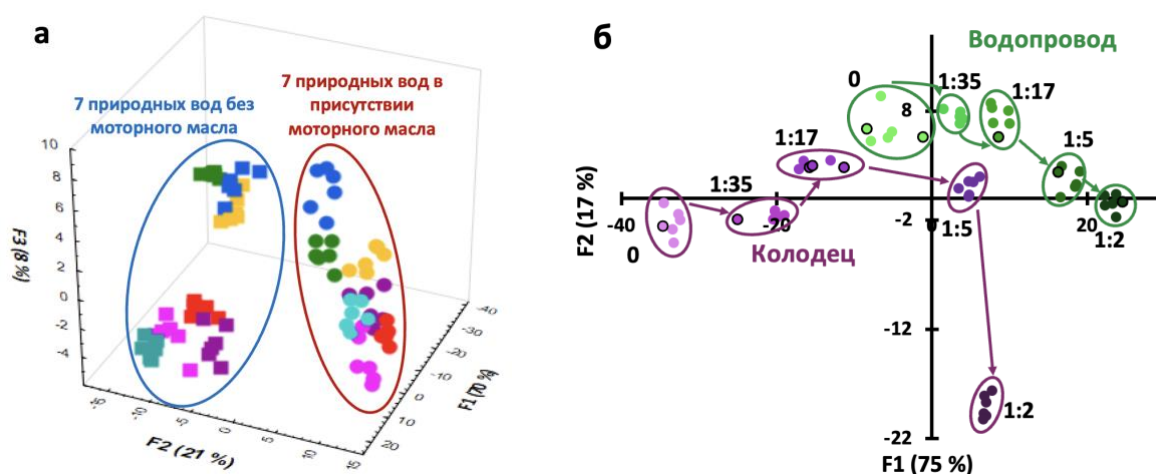


Рис. 29. Графики счетов ЛДА для 7 природных вод в присутствии и в отсутствие (а) водорастворимой фракции моторного масла Лукойл; (б) различное разбавление моторного масла Газпром в водопроводной и в колодезной воде. Реакция *доp-145* – *NaOCl*.

Изучили возможность различения 6 марок моторных масел по их водорастворимым фракциям (табл. 11). Образец природной воды (колодец №2) был насыщен различными маслами (1–6), и индикаторную реакцию *доp-145*– *NaOCl* проводили в присутствии загрязненной воды. На рис. 30 представлены фотографии планшетов в видимом свете при разном времени реакции. Как видно из рис. 30а, образцы моторного масла можно различить, кроме образцов 3 и 4, что означает, что марку масла, загрязняющего воду, можно определить, если доступны стандартные образцы масел.

В другом эксперименте использовали образцы воды из колодца №2 и воды Миллипор, оба загрязненные ВРФ 6 разных масел, всего 12 образцов. С помощью реакции *доp-145*– *NaOCl* было возможно различить эти 12 образцов с правильностью 95% методом ЛДА. На рис. 30б представлен график счетов ЛДА, на котором образцы природной воды и воды Миллипор образуют две отдельные группы. Таким образом, возможно не только обнаружить факт загрязнения моторным маслом, но и распознать масла по их ВРФ, что будет полезно для выявления источника загрязнения.

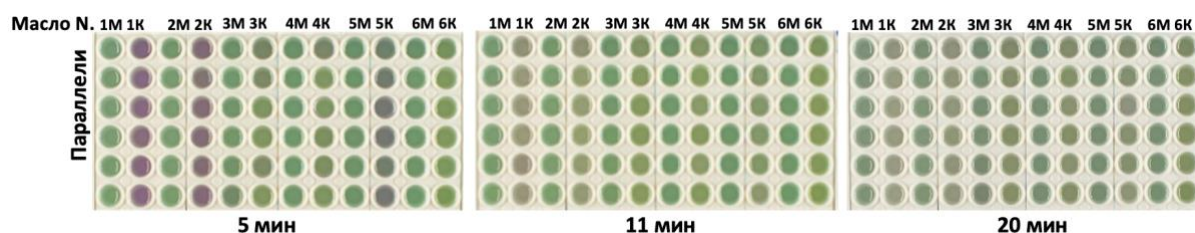


Рис. 30. Изображения планшетов с реакционными смесями (реакция *доp-145*– *NaOCl*) в видимой области с образцами масел 1–6 в воде Millipore (M) и в воде из колодца (K) при трех разных временах от начала реакции.

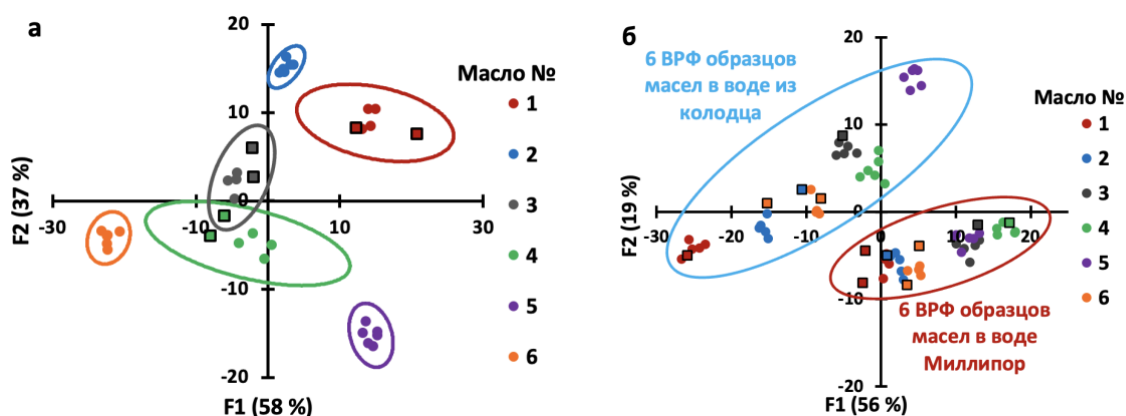


Рис. 31. а) График счетов ЛДА для ВРФ 6 моторных масел в образце воды из колодца № 2 с использованием индикаторной реакции *доp-145*– *NaOCl*; б) график счетов ЛДА для образцов воды из колодца №2 и воды Миллипор, загрязненных ВРФ 6 разных масел.

Для демонстрации возможности более широкого применения предложенного метода показали возможность различения 7 природных вод, искусственно загрязненных ионами железа(II) и чистых образцов тех же вод. Желательно было обнаруживать ионы железа в концентрации на уровне ПДК, поэтому в индикаторную реакцию *доp-145* –

$NaOCl$ вводили образцы вод, содержащих 0.3 мг/л железа. Как видно из рис. 32а, на графике счетов ЛДА образцы воды, загрязненные железом, отделены от чистых образцов тех же вод. Все типы вод (14 классов) могут быть различены с правильностью 95% методом ЛДА с рандомной валидацией, а чистые и загрязнённые образцы классифицированы с правильностью 100% с помощью валидации LOGO.

Чтобы выявить, позволяет ли предложенный подход различать разные уровни содержания железа(II), в индикаторную реакцию вводили воду из пруда, скважины, колодца и воду Миллипор с различным содержанием железа(II). При обработке данных 4 типа воды объединили в 4 класса по содержанию железа. Установили, что с помощью индикаторной реакции *дор-145* – $NaOCl$ можно оценить порядок концентрации железа(II) в диапазоне 0.3 – 0.003 мг/л в воде из пруда, скважины, колодца (рис. 32б). Кроме того, изучили влияние на аналитический сигнал некоторых катионов и гуминовых кислот, которые могут присутствовать в природных водах. Как видно из табл. 18, наибольшее влияние оказывают ионы железа(III) и гуминовые кислоты, вызывая увеличение сигнала, а также ионы меди(II) и аммония, вызывая уменьшение сигнала. Таким образом, с помощью выбранной индикаторной реакции железо(II) может быть обнаружено в присутствии неорганических соединений и гуминовых кислот.

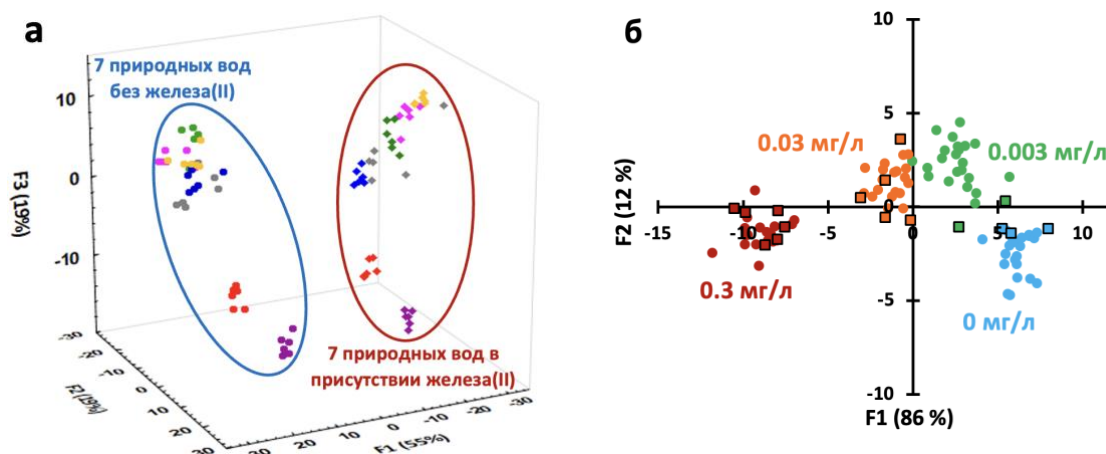


Рис. 32. Графики счетов ЛДА для 7 природных вод в присутствии и в отсутствие (а) ионов железа(II); (б) разные концентрации железа(II) в природной воде. Реакция *дор-145* – $NaOCl$.

Таблица 18. Концентрации (мг/л) компонентов, мешающих сигналу индикаторной реакции *dor-145* – *NaOCl* в присутствии 0.3 мг/л железа(II) (зеленый канал поглощения)

NH_4^+	Na^+	Mg^{2+}	K^+	Ca^{2+}	Fe^{3+}	Co^{2+}	Cu^{2+}	Zn^{2+}	Гуминовые кислоты
1.5	≥ 100	≥ 100	≥ 170	≥ 250	0.3	≥ 1.0	0.1	≥ 500	0.2

Таким образом, предложенный метод может быть использован для обнаружения водорастворимой фракции моторного масла в различных типах вод и для полуколичественной оценки ее содержания (степени разбавления). Также возможно обнаружение повышенных концентраций железа(II) в природных водах с использованием той же индикаторной реакции.

5.6. Обнаружение соединений разных классов в природной воде⁹

Задачей данного раздела было дальнейшее изучение влияния различных веществ на протекание наиболее эффективной реакции – окисления красителя **dor-145** гипохлоритом натрия. Необходимо было выяснить характер действия низкомолекулярных аналитов, влияние их концентраций и совместного присутствия разных аналитов и выяснить возможность обнаружения аналитов в природной воде.

В типичном эксперименте в лунки планшета добавляли следующие растворы: 30 мкл 0.1 М ацетатного буферного раствора (pH 5.6), 30 мкл этанола, 30 мкл образца или раствора модельного аналита (5 мМ, если не указано иное), воду до 300 мкл, 30 мкл 0.0025 М гипохлорита натрия, 30 мкл 0.1 г/л красителя **dor-145**. При проведении реакции в присутствии природной воды в каждую лунку добавляли 120 мкл воды. Момент добавления красителя принимали за начало реакции, после чего реакционные смеси фотографировали с помощью визуализаторов. Как правило, изображения получали через 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20 и 30 мин после начала реакции. Фотографии обрабатывали для получения интенсивностей каналов RGB с помощью программного обеспечения Chrometrica.

⁹ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Shik A. V., Skorobogatov E. V., Akhmetov R. M., Doroshenko I. A., Podrugina T. A., Sugakov G. K., Beklemishev M. K. A Reaction-Based Approach to Colorimetric Detection of Organic Analytes in Water Using a Chlorine-Containing Carbocyanine Dye and Hypochlorite // Chemosensors. 2024. Vol. 12, No. 11. Article 224. (1.96 п.л.; вклад автора 60%; IF = 3.7, Q2).

В отсутствие аналитов раствор красителя **дор-145** в этаноле при разбавлении водой меняет окраску с изумрудной на травянисто-зеленую; этот процесс происходит быстрее в щелочной среде (рис. 34а). Сначала изучили взаимодействие некоторых аналитов с красителем **дор-145** без окислителя. Предположительно, аналиты конкурируют с гидроксильной группой (воды), и замещают атом хлора в красителе с образованием травянисто-зеленого продукта. Тем не менее, при проведении скрининга – взаимодействия ряда аналитов с красителем в планшете – мы не выявили заметных цветовых различий; замедление реакции наблюдали только для нескольких аналитов (ДНК, БСА, сукцинат, три поверхностно-активных вещества и аскорбат). Аминосоединения не дают видимого эффекта в этой системе. На рис. 33 показан график счетов МГК и фотография планшета в видимой области при времени от начала реакции 8 мин.

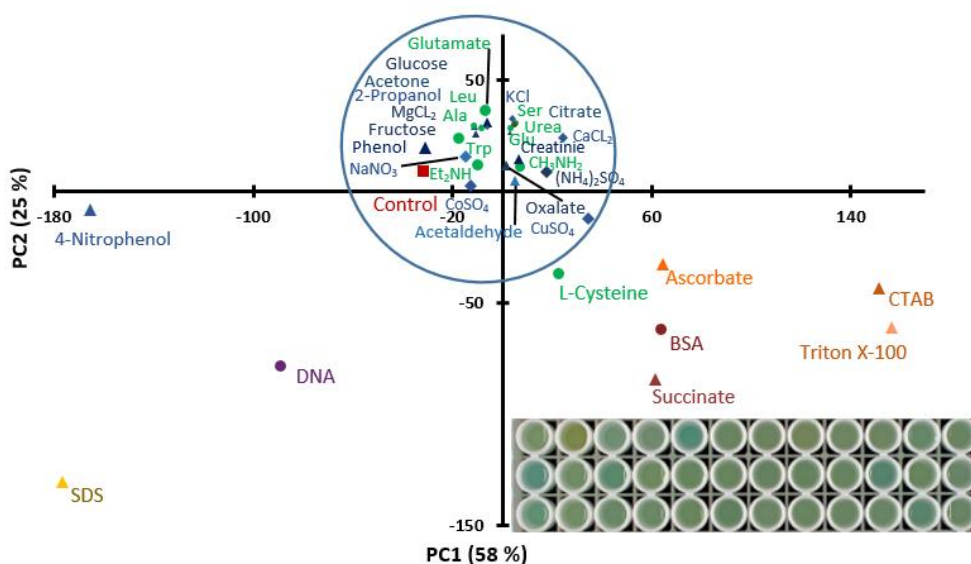


Рис. 33. График счетов МГК, построенный для красителя **дор-145** с модельными аналитами (показаны на рисунке) без NaOCl. Вставка: изображение планшета через 8 мин после смешивания реагентов. Модельные аналиты: 1-й ряд: контроль, 4-нитрофенол, Тритон X-100, ЦТАБ, ДДС, фруктоза, глюкоза, фенол, изопропанол, ацетон, ацетальдегид, контроль; 2-й ряд: сукцинат, оксалат, аскорбат, цитрат, серин, глутамат, лейцин, глутамин, аланин, цистеин, триптофан, БСА; 3-й ряд: ДНК, диэтиламин, метиламин, креатинин, мочевины, CaCl₂, NaNO₃, KCl, MgCl₂, (NH₄)₂SO₄, CuSO₄, CoSO₄. Концентрация органических аналитов в лунке составляла 0.5 мМ, неорганических соединений 1 мМ, Cu²⁺ и Co²⁺ 0.1 мМ, БСА 0.3 г/л, ДНК 0.025 г/л.

Другую ситуацию наблюдали **в присутствии гипохлорита**. В контрольном опыте при добавлении красителя к гипохлориту практически сразу же образуется продукт с насыщенной фиолетовой окраской, при этом наблюдается тушение флуоресценции в БИК-области (рис. 34а). В щелочной среде краситель не обладает БИК-флуоресценцией, а в видимом свете сразу же образуется травянисто-зеленый продукт гидролиза. Однако при добавлении реакционноспособного аналита, например, триптофана, образуется продукт замещения хлора, и фиолетовая окраска через несколько минут переходит в травянисто-зеленую. Влияние модельных аналитов в воде Миллипор и в воде из скважины показано на рис. 34б. В **воде Миллипор** сильные восстановители (аскорбат, цистеин) ингибируют окисление красителя, что позволяет долго сохранять изумрудный цвет раствора. Другие соединения замедляют исчезновение фиолетовой окраски: аминокислоты (серин, лейцин, глутамин, аланин), амины (метиламин, диэтиламин), мочевины и кислородсодержащие соединения (сукцинат, оксалат, ацетальдегид), а также ионы NH_4^+ , Ca^{2+} и Mg^{2+} . Триптофан образует травянисто-зеленый продукт. Додецилсульфат (ДДС) дает продукт уникального желтого цвета, Тритон Х-100 вызывает быстрое обесцвечивание, в то время как ЦТАБ оказывает незначительное влияние. Малые молекулы (изопропанол, ацетальдегид и ацетон, цитрат) и сахара демонстрируют лишь слабое влияние на эту реакцию.

В **воде из скважины** (рис. 34б) наблюдаются похожие эффекты, но реакция протекает быстрее. Аскорбат и цистеин проявляют наибольшую активность, аналогично среде воды Миллипор, но изумрудно-зеленый цвет исходного красителя сохраняется в течение первых 5 мин реакции также в присутствии триптофана, БСА и фенола. ДНК также оказывает более сильное воздействие, чем в воде Миллипор, давая зеленый продукт. Аминокислоты, оксалат и сукцинат замедляют появление фиолетового цвета и его обесцвечивание; такое же поведение наблюдается для аминов, мочевины, креатинина, NH_4^+ и Mg^{2+} . Эффекты поверхностно-активных веществ в основном такие же, как и в дистиллированной воде.

Краситель **дор-145** флуоресцирует также в БИК-области. После добавления окислителя флуоресценция красителя мгновенно затухает (рис. 34б), но некоторые модельные аналиты сохраняют сигнал, что может быть связано с сохранением структуры красителя. В отличие от воды Миллипор, в воде из скважины большее число аналитов не вызывают тушение флуоресценции (рис. 34б).

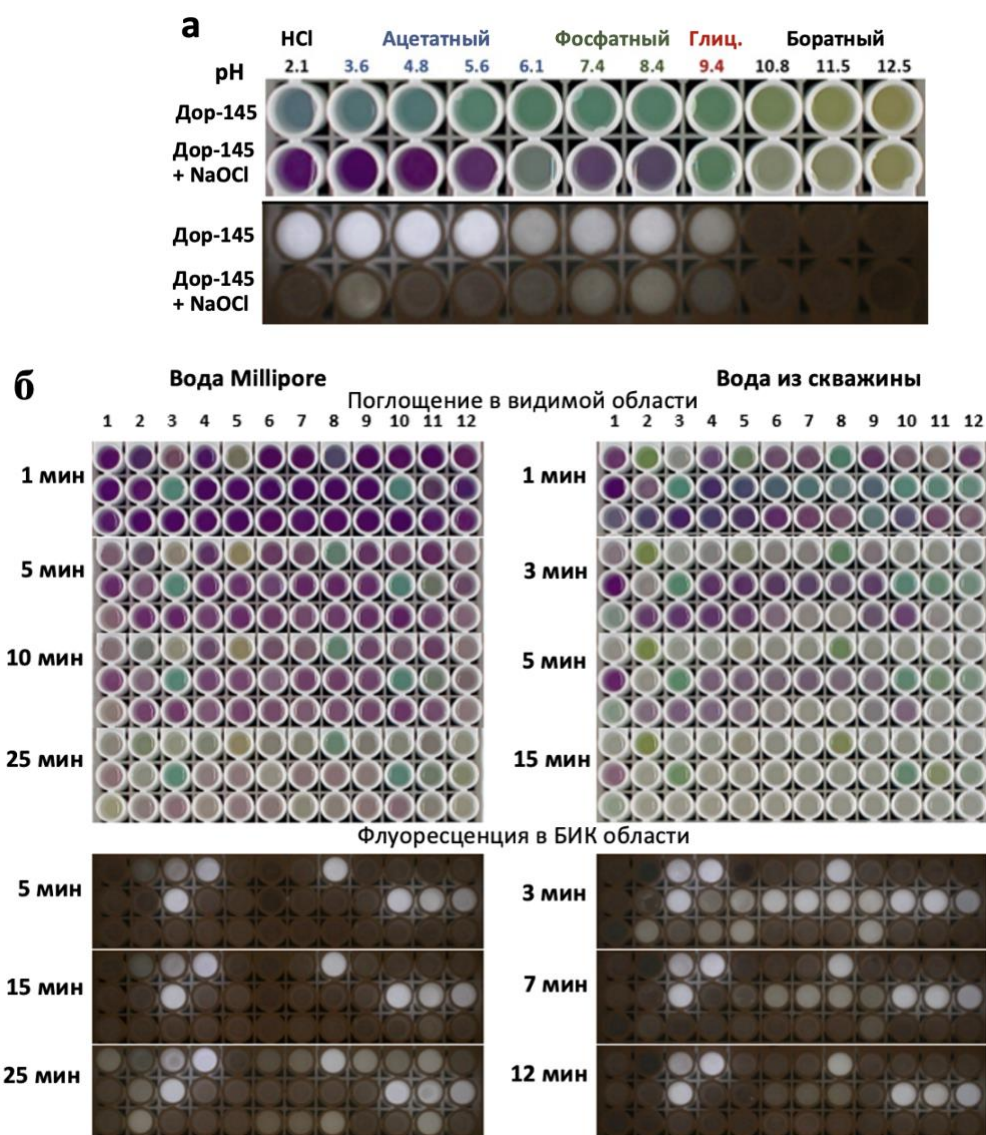


Рис. 34. а – зависимость от pH красителя **дор-145** в присутствии и в отсутствие NaOCl, время от начала реакции 2 мин (для создания нужного pH использованы: соляная кислота 1 М, ацетатный, фосфатный, глициновый, боратный буферы); б – изображения планшетов с реакционными смесями красителя **дор-145** с NaOCl в присутствии модельных соединений, полученные в разное время после начала реакции. Концентрации в конечной реакционной смеси: NaOCl 0.25 мМ, краситель дор-145, ацетатный буфер (pH 5.6) 10 мМ, модельные органические аналиты 0.5 мМ, неорганические соединения 1 мМ, Cu^{2+} и Co^{2+} 0.1 мМ, БСА 0.3 г/л, ДНК 0.025 г/л. Модельные аналиты, 1-й ряд: контроль, 4-нитрофенол, Тритон X-100, ЦТАБ, ДДС, фруктоза, глюкоза, фенол, изопропанол, ацетон, ацетальдегид, контроль; 2-й ряд: сукцинат, оксалат, аскорбат, цитрат, серин, глутамат, лейцин, глутамин, аланин, цистеин, триптофан, БСА; 3-й ряд: ДНК, диэтиламин, метиламин, креатинин, мочеви́на, CaCl_2 , NaNO_3 , KCl, MgCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CuSO_4 , CoSO_4 .

Наблюдаемая сложная картина изменений цвета может быть объяснена различными процессами. Замедление исчезновения изумрудного окрашивания красителя (происходящего, вероятно, за счет прямой реакции с гипохлоритом) обусловлено присутствием восстановителей, препятствующим этому процессу. Замедление обесцвечивания фиолетового продукта может быть объяснено захватом радикалов хлора модельными аналитами. Образование травянисто-зеленой окраски, предположительно, происходит за счет замещения атома хлора в красителе и протекает быстрее с нуклеофильными аналитами (триптофан, фенолы). Разницу между эффектом аналитов в воде Миллипор и в воде из скважины можно объяснить присутствием в природной воде солей и органических веществ, которые могут влиять на скорость реакции и на действие модельных аналитов.

Для визуализации данных, полученных в виде фотографий, построили графики счетов МГК (рис. 35). В воде Миллипор (рис. 35а) более реакционноспособные соединения отображены в виде точек, расположенных далеко от контрольного образца, а нереакционноспособные аналиты образуют область вокруг контроля, и их трудно отличить друг от друга. В присутствии воды из скважины (рис. 35б) можно выделить дополнительные группы умеренно реакционноспособных аминокислот (аланин, глутамат, глутамин, лейцин) и менее реакционноспособных азотсодержащих соединений (креатинин, мочеви́на, метиламин, серин, диэтиламин). Кислородсодержащие соединения и неорганические соли формируют группу вокруг контрольного образца. Таким образом, в природной воде увеличивается разнообразие сигналов модельных аналитов по сравнению с водой Миллипор.

Кроме того, построили график счетов ЛДА с 6 параллельными экспериментами для каждого аналита в природной воде (рис. 35в). Видно, что 8 наиболее реакционноспособных аналитов (триптофан, фенол, БСА, аскорбат, цистеин, ДНК, метиламин и ДДС) отличаются друг от друга и от большой группы менее реакционноспособных соединений. Далее исключили 8 упомянутых соединений из обработки и построили график ЛДА для оставшихся аналитов. Менее реакционноспособные соединения могут быть дополнительно разделены на группы: 8 азотсодержащих соединений (амины, амиды и аминокислоты) образуют отдельный кластер.

Таким образом, реакция *доp-145* – *NaOCl* может быть использована для различения соединений разных групп, особенно азотсодержащих соединений, в

природной воде. Это дает возможность обнаружить и выявить вероятную природу преобладающего загрязнителя.

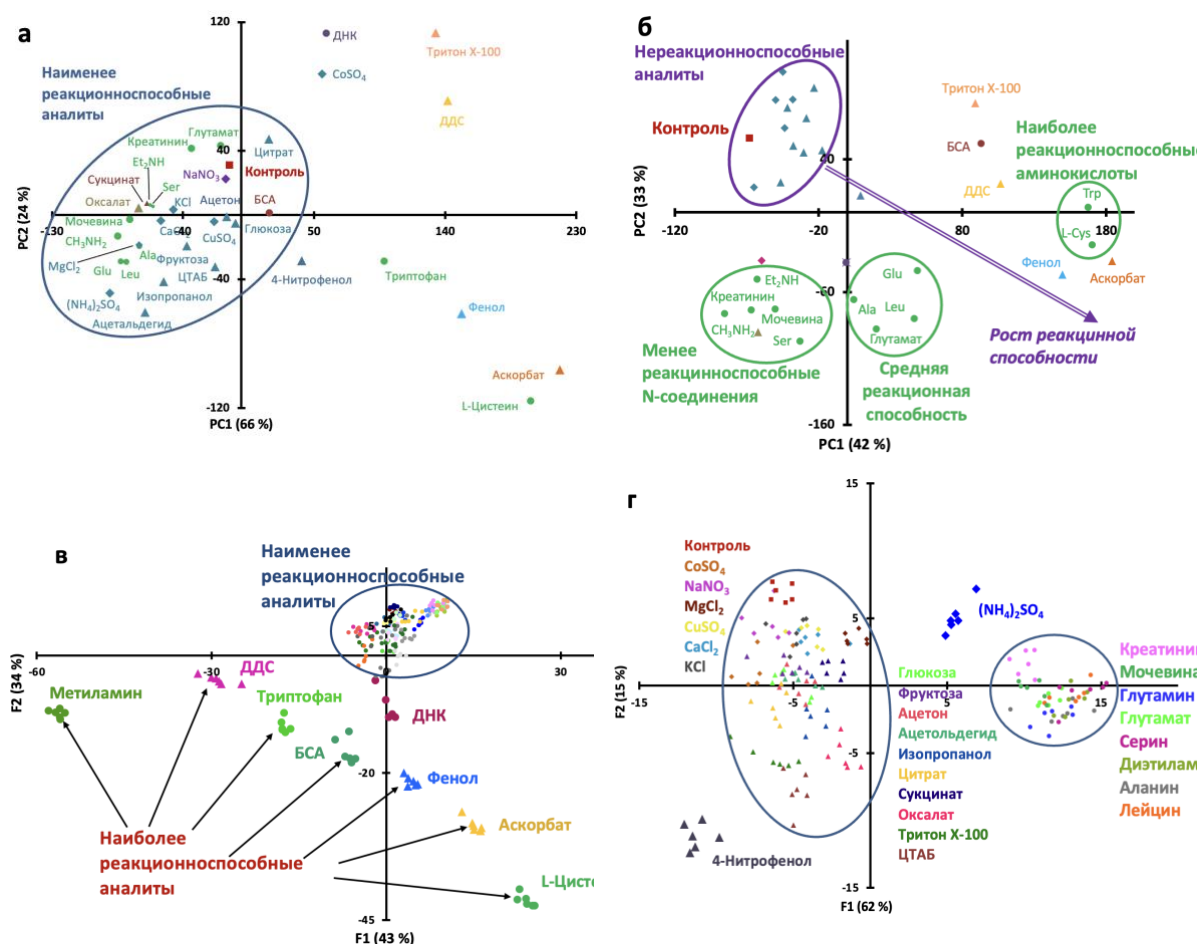


Рис. 35. Графики счетов МГК для воды из скважины № 2 (а) и воды Миллипор (б) в присутствии органических и неорганических аналитов; (в) график счетов ЛДА для реакции *dop-145* – *NaOCl* с 6 параллелями для каждого модельного аналита в воде из скважины; (г) график счетов ЛДА для менее реакционноспособных аналитов в присутствии воды из скважины.

Изучили влияние **концентрации** модельных аналитов в воде из скважины на примере триптофана, БСА, ДНК и цистеина в качестве более реакционноспособных аналитов, а также диэтиламина, мочевины и гуминовых кислот как менее реакционноспособных. Реакционноспособные аналиты при концентрациях $\geq 5 \times 10^{-5}$ М демонстрируют отчетливый изумрудно-зеленый цвет в первые минуты реакции, что в основном обусловлено присутствием исходного красителя, тогда как при $\leq 5 \times 10^{-6}$ М образуется фиолетовый продукт (рис. 36). Менее реакционноспособные аналиты

показывают различную интенсивность фиолетовой окраски при любых концентрациях. Со временем в присутствии реакционноспособных аналитов образуется травянисто-зеленый продукт, а изумрудный оттенок сохраняется только в присутствии большого количества цистеина. Отдельные аналиты могут быть обнаружены в лунке планшета при следующих концентрациях: триптофан – 5×10^{-8} М (через 3 мин), цистеин – 5×10^{-6} М (через 3 мин), диэтиламин – 1×10^{-6} М (через 3 мин), мочевины – 5×10^{-5} М (через 3 мин), гуматы не дают сигнала, кроме собственного желтого цвета. Упомянутые эффекты относятся к более высокой концентрации гипохлорита (правая часть рисунка). При более низкой концентрации гипохлорита пределы обнаружения были такими же или более высокими.

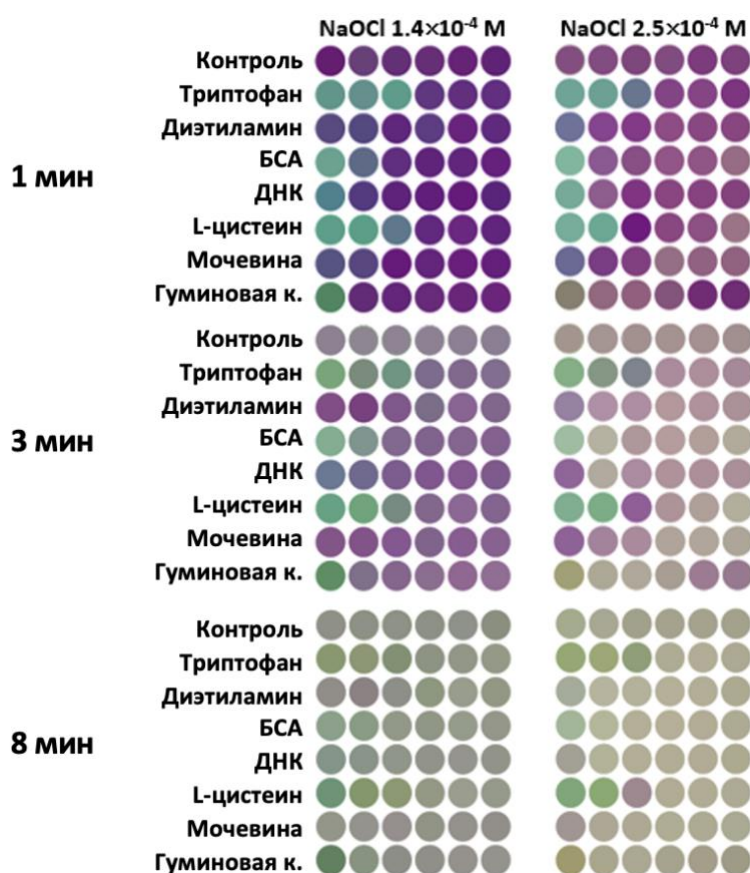


Рис. 36. Окраска реакционных смесей системы *доp-145* – *NaOCl* для двух концентраций *NaOCl* (указаны над столбцами) в присутствии модельных соединений (перечислены слева) и воды из скважины (№ 2). Строки соответствуют различным соединениям, концентрация которых уменьшаются в лунках слева направо на порядок: 1 – контроль; 2 – триптофан, от 0.5 мМ до 50 нМ; 3 – диэтиламин, от 0.1 мМ до 10 нМ; 4 – БСА, от 0.03 г/л до 3 мкг/л; 5 – L-цистеин, от 0.5 мМ до 50 нМ; 6 – мочевины, от 0.5 мМ до 50 нМ; 7 – гуминовые кислоты, от 0.023 г/л до 2.3 мкг/л. Время от начала реакции указано в колонке слева.

Таким образом, в данном разделе показали, что соединения разной реакционной способности по-разному влияют на скорость протекания реакции и, предположительно, на состав продуктов окисления. Этим можно объяснить эффективное распознавание образцов природных вод (разд. 3.3.6) с помощью индикаторной реакции *дор-145* – *NaOCl*. В результате окисления красителя образуются продукты реакции различного цвета, что позволяет получать аналитический сигнал от реакционноспособных соединений: аминов и аминокислот, белков, ДНК, фенолов и некоторых других. Перечисленные сигналы замедляют или ингибируют окисление красителя, что сопровождается изменением цвета по сравнению с контрольным опытом. Детектирование достаточно селективно, чтобы отличать наиболее реакционноспособные соединения друг от друга и от менее реакционноспособных, а также азотсодержащие органические соединения от других модельных аналитов.

5.7. Обнаружение сброса сточных вод¹⁰

Мониторинг качества источников водоснабжения требует разработки недорогих и эффективных методов. Особенное внимание необходимо уделять обнаружению внезапных сбросов сточных вод в систему водоснабжения. Задачей данного раздела была разработка подхода к обнаружению сточной воды в водопроводной и речной воде путем проведения индикаторной реакции в присутствии образцов и регистрации изменения сигнала в течение времени.

Пробы сточных вод, собранные на различных участках канализационной системы Московской области, были предоставлены Аналитическим центром. Некоторые характеристики сточных вод представлены в табл. 19. Пробы речной воды отбирали из Москвы реки в течение пяти дней, а пробы водопроводной воды – в лаборатории в течение пяти дней. Воды вводили в индикаторные реакции без пробоподготовки. В качестве индикаторных реакций использовали окисление красителей **дор-145** и **дор-249** гипохлоритом и нитритом натрия и красителя **дор-128** пероксидом водорода. Для каждого образца выполняли 12 параллельных опытов. В некоторых опытах образец сточной воды разбавляли речной или водопроводной водой в нужное количество раз. Изменения поглощения и БИК-флуоресценции реакционных

¹⁰ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Shik A. V., Akhmetov R. M., Sugakov G. K., Filatova D. G., Doroshenko I. A., Podrugina T. A., Beklemishev M. K. Facile detection of illicit wastewater discharge into a water source using a kinetic-based optical fingerprinting strategy // Anal. Meth. 2025. Vol. 17. P. 8061-8072. (1.39 п.л.; вклад автора 60%; IF = 2.7, Q2).

смесей в 96-луночных планшетах фиксировали с помощью визуализаторов в течение 40 мин каждые 5 мин. В типичном эксперименте исследовали 4 образца водопроводной или речной воды и 7 образцов сточных вод, разбавленных в различной степени водопроводной или речной водой, отобранной в другой день (неразбавленная, 1:2, 1:10, 1:30, 1:100, 1:300 и 1:1000), что в общей сложности давало 11 образцов; 12 параллельных наблюдений для каждого образца давали в общей сложности 132 наблюдения на эксперимент. Полученную матрицу данных обрабатывали МГК, ПЛС-ДА, ЛДА и методом софтмакс регрессии (СР).

Таблица 19. Характеристики сточных вод

Параметр	Сточная вода №			
	71	45	67	74
рН	7.1	6.5	8.9	6.8
Мутность, НЕМ*	11	8.1	2.5	1.1
БПК*, мг/л	>1000	100 ± 14	–	–
ХПК*, мг/л	>2000	167 ± 25	–	–
Общий азот, мг/л	30 ± 3	100 ± 14	40 ± 1	30 ± 3
NO ₃ ⁻ , мг/л	9.2 ± 0.9	5.1 ± 0.1	0.34 ± 0.05	11 ± 1
NO ₂ ⁻ , мг/л	0.094±0.016	0.088±0.014	0.063±0.012	>1.0
Cl ⁻	0.2	<0.10	<0.10	<0.10

*НЕМ – нефелометрическая единица мутности, БПК – биологическое потребление кислорода, ХПК – химическое потребление кислорода.

Мониторинг источников воды моделировали путем анализа нескольких проб водопроводной или речной воды, отобранных в разные дни. Загрязнение имитировали путем смешивания чистых образцов со сточными водами. Необходимо было установить минимальное разбавление сточных вод, которое можно обнаружить. Предполагали, что для образцов незагрязненной воды, собранных в течение нескольких дней, все группы точек на графиках счетов ЛДА или МГК будут располагаться близко друг к другу. При изменении состава образца за счет введения сточной воды образец будет визуализироваться как выброс на графике счетов.

Для оценки применимости метода исследовали возможность обнаружения сточной воды различной степени разбавления в водопроводной воде. В первом эксперименте в качестве контроля использовали водопроводную воду, отобранную только в один день. Фотографии планшетов (рис. 37а,в) для реакций *dop-145* – *NaOCl* и *dop-249* – *NaOCl* показывают, что сточную воду в низком разбавлении (до 1:30) легко визуально отличить от чистого образца. В то же время, после оцифровки фотографий

кинетические кривые для разных разведений возможно отличить от неразбавленной сточной воды № 71 (рис. 37б). На рис. 37г показана зависимость интенсивности поглощения красного канала от степени разбавления для двух индикаторных реакций, представляющая собой плавную кривую с максимумом.

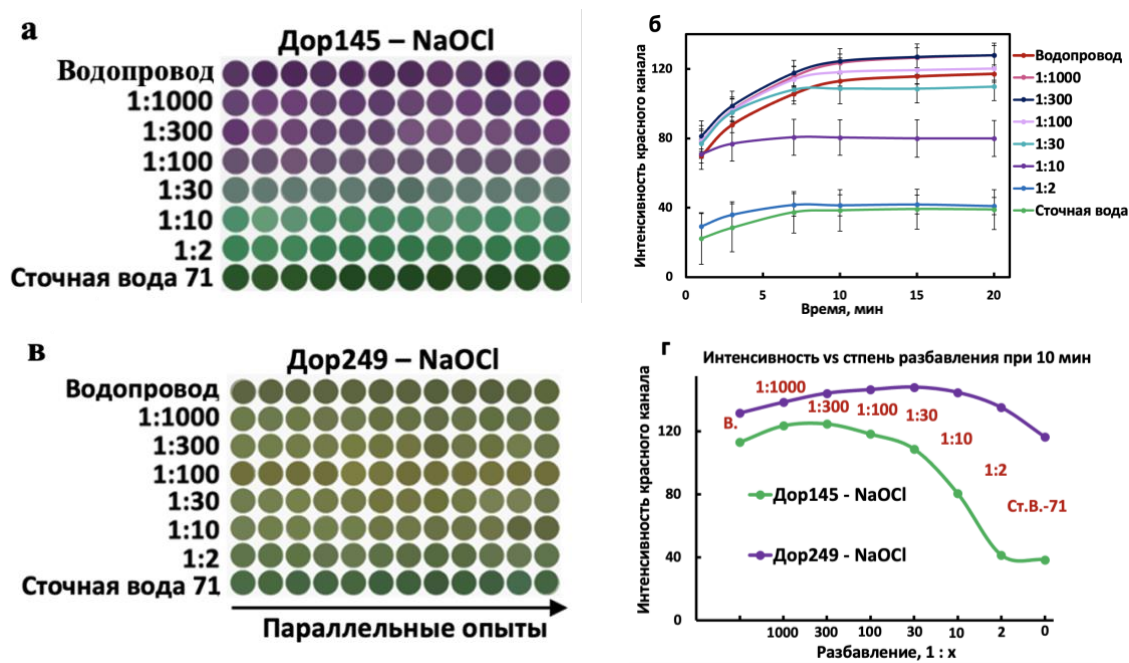


Рис. 37. Сигналы до хемометрической обработки: (а, в) оцифрованные изображения планшетов в видимой области для реакций *dor-145* – *NaOCl* и *dor-249* – *NaOCl* для 10 и 15 мин соответственно, в присутствии водопроводной воды и сточных вод, разбавленных в разное количество раз (разбавления показаны слева от планшетов). Каждый ряд соответствует одному образцу (12 параллельных экспериментов). (б) кинетические кривые реакции *dor-145* – *NaOCl*, полученные путем измерения поглощения (красный канал) для различного содержания сточной воды № 71 в водопроводной воде; (г) сигнал при $t = 10$ мин в зависимости от разбавления для реакций *dor-145* – *NaOCl* и *dor-249* – *NaOCl*.

Сигналы, полученные в течение протекания реакций, для неразбавленных образцов сточных вод и образцов различной степени разбавления обрабатывали методами главных компонент, линейного дискриминантного анализа и софтмакс регрессии. Поскольку основной задачей было различение чистой воды и сильно разбавленных сточных вод, для построения графика счетов МГК объединили все разбавления, кроме 1:2, в один класс. Полученные графики счетов (рис. 38) показывают, что незагрязненная водопроводная вода, неразбавленная сточная вода и другие разбавления представляют

собой разные группы точек. На графиках счетов МГК (рис. 38а,в) наблюдали достаточно четкую кластеризацию групп при использовании реакций *дор-145* – NaOCl и *дор-128* – H_2O_2 , что свидетельствует о высокой дискриминирующей способности этих реакций. Однако для большинства реакций хорошее различение групп требовало метода «с учителем», такого как ЛДА. Кроме того, на графике счетов ЛДА для реакции *дор-145* – NaOCl в присутствии сточной воды №74 (рис. 38д) можно различить все разбавления от 1:2 до 1:1000.

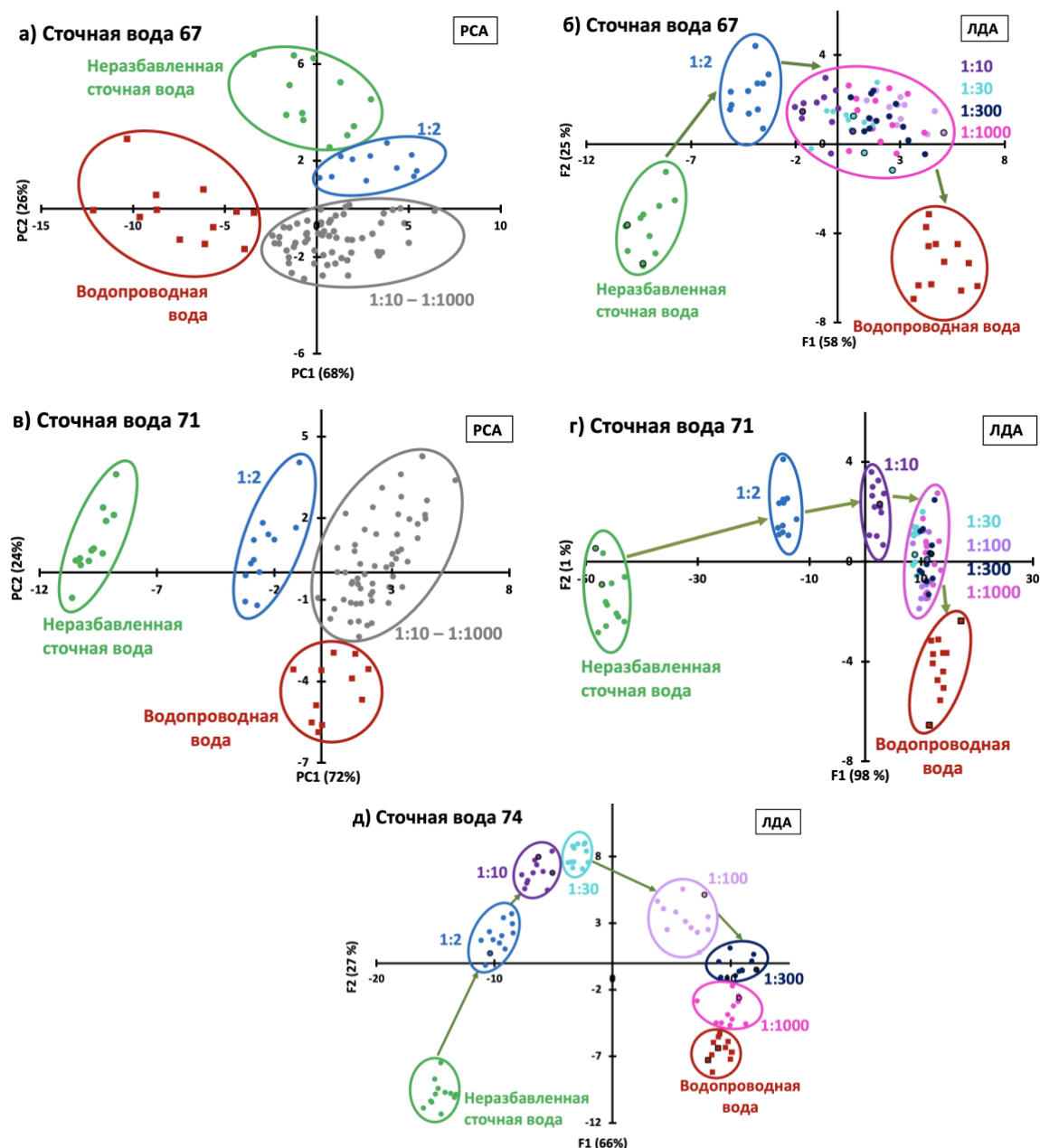


Рис. 38. Графики счетов МГК (а,в) и ЛДА (б,г,д) для водопроводной воды, отобранной в один день в присутствии сточной воды № 67 (а,б), №71 (в,г) и № 74 (д); индикаторные реакции: (а, б, д) *дор-145* – NaOCl , (в, г) *дор-128* – H_2O_2 .

Для моделирования реальной ситуации мониторинга воды, водопроводную воду отбирали в течение пяти дней. Образцы четырех дней использовали как незагрязненные, а воду, отобранную в пятый день, – для разбавления сточных вод. Аналогично предыдущему эксперименту, для визуализации распознавания строили графики счетов ЛДА. На графиках (рис. 39а,б) видно, что образцы водопроводной воды образуют одну группу точек, которая отличается от других разбавлений; кроме того, можно различить разбавления 1:10 и 1:30. Для реакции *dop-249* – *NaOCl* можно выделить группу разбавления 1:1000, что указывает на высокую дискриминирующую способность данной реакции.

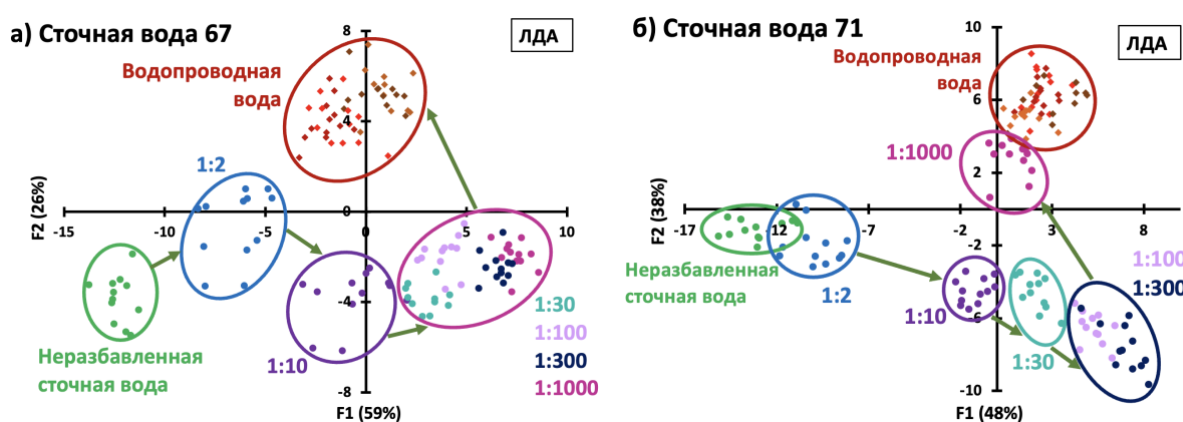


Рис. 39. Графики счетов ЛДА для водопроводной воды, отобранной в несколько разных дней в присутствии сточной воды №67(а) и №71 (б); индикаторные реакции: *dop-145* – *NaOCl* (а), *dop-249* – *NaOCl* (б).

Для оценки правильности распознавания рассмотрели четыре класса: водопроводная вода (незагрязненная); сточная вода № 71, разбавленная водопроводной водой в соотношении 1:2; сточная вода № 71, разбавленная водопроводной водой в соотношениях 1:10, 1:30, 1:100, 1:300 и 1:1000 (5 разведений объединили в один класс), и неразбавленная сточная вода. Результаты приведены в табл. 20. Если водопроводная вода была отобрана в один день, то все использованные индикаторные реакции различают 4 класса с правильностью выше 90% хотя бы одним из использованных методов. Далее чистую воду, отобранную в течение четырех дней, объединили в один класс. Поскольку данная задача оказалась сложнее, чем с водопроводной водой, отобранной в течение одного дня, правильность распознавания методом софтмакс регрессии для трех реакции снизилась ниже 90%, а с помощью реакции *dop-128* – *H₂O₂* невозможно было различить образцы. Тем не менее, некоторые индикаторные реакции

показали высокую правильность с использованием метода ЛДА. Лучший результат продемонстрировала реакция *дор-145* – *NaOCl*, позволив различить незагрязненную водопроводную воды и водопроводную воду с добавлением 0.1% сточной воды с правильностью 98%.

Таблица 20. Правильность распознавания (%) образцов водопроводной воды, отобранной однократно и в течение 5 дней, с добавлением сточной воды № 71 и незагрязненной водопроводной воды. Результаты представлены для методов ЛДА/СР с рандомной валидацией

Индикаторная реакция	Вода отобрана:	
	1 день	5 дней
Дор-145 – NaOCl	97/96	98/95
Дор-145 – NaNO ₂	96/97	–
Дор-249 – NaOCl	93/95	92/88
Дор-249 – NaNO ₂	89/92	96/89
Дор-128 – H ₂ O ₂	95/94	72/58

Более сложной задачей было обнаружение загрязнения в **природных** водах, состав которых может изменяться со временем. В качестве загрязненных образцов использовали сточные воды, в разной степени разбавленные речной водой (от 1:2 до 1:1000). Образцы речной воды, отобранные в четыре других дня, служили незагрязненными образцами. Возможность распознавания образцов показали на графиках счетов МГК и ЛДА (рис. 40). На графиках счетов МГК для реакции *дор-249* – *NaOCl* речная вода отличима от различных разбавлений сточных вод № 74 и № 71, включая 1:1000. На графиках счетов ЛДА для той же реакции возможно различать даже отдельные разбавления. Правильность распознавания с использованием методов ПЛС-ДА, ЛДА и софтмакс регрессии (СР) представлена в табл. 21. Перед обработкой 6 параллельных измерений усредняли, и матрица данных состояла из 22 строк. Для сточных вод № 71 и № 74 правильность распознавания 4 классов была выше 90% с использованием двух изученных индикаторных реакций (окисление красителей **дор-145** и **дор-249** гипохлоритом). Сточные воды № 45 и № 67, напротив, возможно было различить с помощью реакций *дор-128* – *H₂O₂* и *дор-145* – *NaNO₂*, соответственно. Объединение реакций позволило повысить правильность распознавания для сточной воды №45: индивидуальные реакции, показавшие низкую правильность, при объединении позволяли получить результат вплоть до 100%. Для данной задачи метод

ЛДА был более эффективен, чем ПЛС-ДА; метод СР не показал результатов выше 90% при использовании индивидуальных индикаторных реакций.

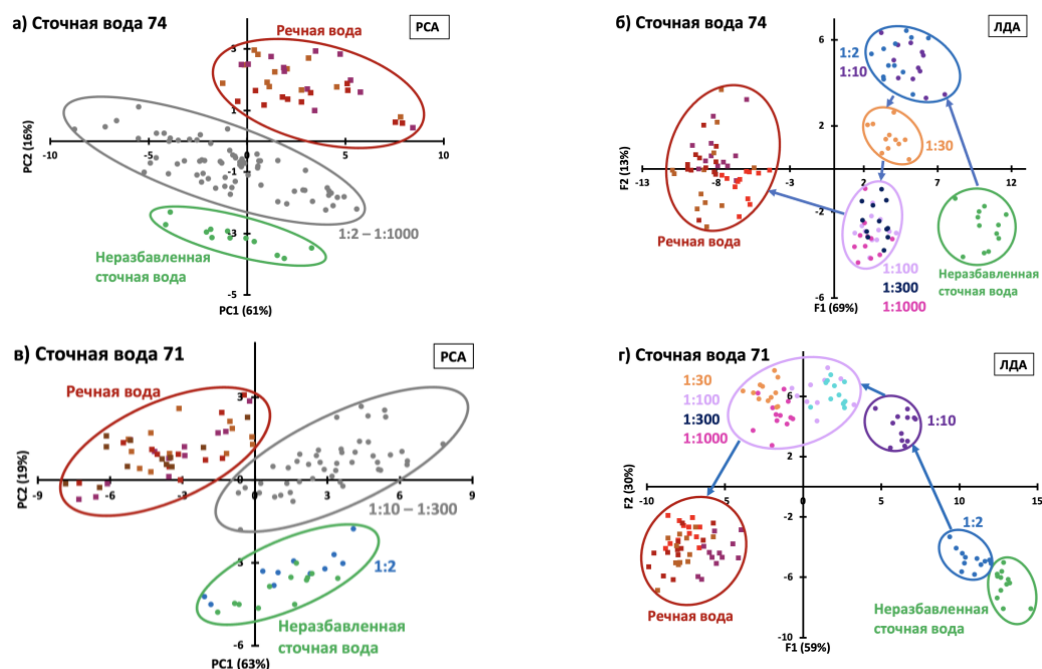


Рис. 40. Графики счетов МГК (а, в) и ЛДА (б, г) для речной воды, собранной в разные дни в присутствии сточной воды №74 (а,б) и №71 (в,г) разной степени разбавления. Индикаторная реакция *дор-249* – *NaOCl*.

Таблица 21. Правильность распознавания (%) образцов речной воды, отобранной в течение пяти дней, с добавленной сточной водой разной степени разбавления. Использованы методы ЛДА/СР/ПЛС-ДА с валидацией LOO

Индикаторная реакция	Сточная вода №			
	71	74	45	67
Дор-145 – NaOCl	100/86/96	91/86/96	64/77/64	-
Дор-145 – NaNO ₂	77/86/86	-	46/64/59	91/86/77
Дор-249 – NaOCl	100/86/92	100/77/100	77/68/73	59/86/82
Дор-128 – H ₂ O ₂	64/50/59	-	100/82/77	-
1+4	86/86/ 91	-	91/91/100	-
1+3	86/ 100/100	86/91/96	91/77/86	-
2+3	100/96/100	-	86/68/ 91	96/86/86
3+4	100/91/86	-	86/ 91/86	-

Примечание: Данные разбили на четыре класса: речная вода (незагрязненная); неразбавленная сточная вода; сточная вода, разбавленная водопроводной водой в соотношении 1:2; сточная вода, разбавленная речной водой в соотношениях 1:10, 1:30, 1:100, 1:300 и 1:1000 (5 разведений были объединены в один класс).

Заметим, что для обнаружения неожиданного попадания загрязнителя в чистую воду обычно не требуется 4-х классовое распознавание. Нужно различить незагрязненную речную воду и речную воду, содержащую минимальное количества загрязнителя. Для выполнения этой задачи рассчитали правильность бинарной классификации (табл. 22). Результаты показывают, что загрязнение теми сточными водами (№ 67), которое невозможно было обнаружить при 4-х классовой классификации, можно обнаружить при более простой задаче со 100% правильностью. Кроме того, для получения высокой правильности для сточной воды № 45 нет необходимости объединять данные индикаторных реакций. Тем не менее, система *дор-128* – H_2O_2 , малоэффективная в предыдущем эксперименте, не дала высокой правильности и при различении двух классов. Реакции *дор-249* – $NaOCl$ было достаточно, чтобы обнаружить загрязнение речной воды любой из четырех сточных вод с использованием как метода ЛДА, так и логистической регрессии. На графиках МГК (рис. 41) также видны визуальные различия между группами образцов.

Таблица 22. Правильность распознавания (%) незагрязненных образцов речной воды, отобранной в течение 5 дней, и образцов с добавлением 0.1% по объему сточной воды (разбавление 1:1000). Использованы методы ЛДА/ЛР с применением рандомной валидации

Индикаторная реакция	Сточная вода №			
	71	74	45	67
Дор-145 – $NaOCl$	93/92	100/92	73/67	–
Дор-145 – $NaNO_2$	97/93	–	85/78	100/100
Дор-249 – $NaOCl$	97/97	100/97	97/87	98/97
Дор-128 – H_2O_2	63/75	–	82/77	–

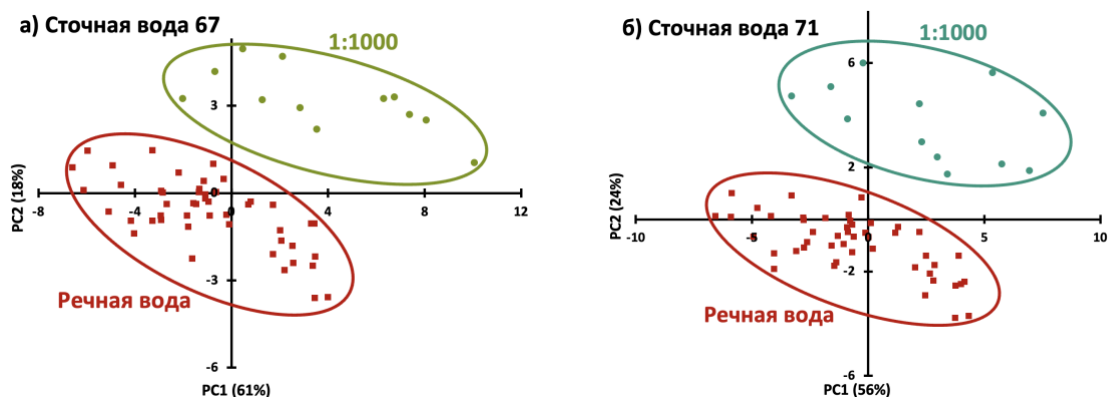


Рис. 41. Графики счетов МГК для незагрязненной речной воды и сточных вод № 67 (а) и № 71 (б), разбавленных речной водой в 1000 раз, с использованием реакции *дор-249* – *NaOCl*.

Таким образом, разработали подход к выявлению неожиданных загрязнений источников водоснабжения сточными водами. Показали, что загрязнение сточной водой может быть обнаружено в водопроводный и в речной воде, отобранных в течение нескольких дней, в соотношении 1:1000 по объему. Образцы, содержащие сточную воду, могут быть визуально различены на графиках счетов и распознаются с правильностью выше 90% хотя бы одной индикаторной реакцией.

5.8. Установление факта облучения продуктов¹¹

Облучение пищевых продуктов широко используют для различных целей, таких как продление срока хранения, подавление вредоносных микроорганизмов, стимуляция или предотвращение прорастания. В результате облучения в продукте происходят различные процессы, влияющие на его состав. Необходимая доза зависит от цели облучения и типа продукта: например, для подавления прорастания корнеплодов требуются дозы 50–150 Гр, в то время как для обеззараживания мяса или рыбы используют дозы вплоть до 10 кГр. При несоблюдении регламента во время облучения

¹¹ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

- 1) Shik A. V., Stepanova I. A., Doroshenko I. A., Bliznyuk U. A., Podrugina T. A., Chernyaev A. P., Rodin I. A., Beklemishev M. K. Recognition of Samples of Similar Composition Using Kinetic-Based Optical Fingerprinting Strategy: Choice of Indicator Reactions // *Talanta*. 2026. Vol. 308. Article 129805. (1.62 п.л.; вклад автора 70%; IF = 5.6, Q1).
- 2) Shik A. V., Stepanova I. A., Koksharova M. V., Doroshenko I. A., Podrugina T. A., Bliznyuk U. A., Borshchegovskaya P. Yu., Chernyaev A. P., Ananieva I. A., Rodin I. A., Beklemishev M. K. Estimation of irradiation doses in chicken samples using a reaction-based fingerprinting method // *Food Chem*. 2025. Vol. 482. Article 144073. (1.27 п.л.; вклад автора 60%; IF = 9.8, Q1).

рекомендуемая доза может быть превышена или продукт, наоборот, получит меньшую дозу. Необходимость контроля дозы после облучения требует разработки простых и высокопроизводительных методов мониторинга поглощенной дозы и установления факта облучения. Предполагали, что предлагаемый вариант метода отпечатков пальцев будет чувствителен к изменениям, происходящим в продуктах под действием облучения. Задачей данного раздела была разработка методики выявления факта облучения таких продуктов как картофель, сырая печень индейки и сырое куриное мясо.

Свободные радикалы, образующиеся в пищевых продуктах в результате воздействия рентгеновских лучей, инициируют физические и химические изменения в образце, зависящие от дозы облучения. Свободные радикалы атакуют липиды, белки и углеводы, образуя органические радикалы и стабильные соединения, концентрация которых определяется двумя конкурирующими процессами: разложением под действием облучения и накоплением в результате распада других соединений и биомакромолекул [110,111]. Все эти изменения зависят от дозы и могут изменять скорость индикаторных реакций.

Клубни сырого картофеля сорта Лина облучали в Институте ядерной физики им. Скобельцына МГУ (Москва, Россия) с использованием линейного ускорителя электронов непрерывного действия УЭЛР-1–25-Т-001 с энергией 1 МэВ и максимальной средней мощностью пучка 25 кВт. Ток пучка варьировали от 50 до 500 нА, а температура окружающей среды составляла ~20 °С. Клубни помещали на дюралюминиевую пластину размером 35 мм × 182 мм, расположенную на расстоянии 12.5 см от выхода пучка, и облучали с двух сторон. В одном эксперименте каждую дозу применяли к шести клубням, а шесть клубней служили контрольными (необлученными) образцами. Поглощенную дозу оценивали по заряду, поглощенному дюралюминиевой пластиной. Эксперимент проводили сотрудники НИИЯФ МГУ.

Облученные клубни натерли на терке. Дальнейшие опыты проведены автором: к навескам продукта (2.0 ± 0.1 г) добавляли по 5 мл воды и 150 мкл 0.1 М аскорбиновой кислоты и экстрагировали на орбитальном шейкере в течение суток при комнатной температуре (120 об/мин). Для проведения эксперимента использовали три разных необлученных клубня, три клубня с поглощенной дозой 100 Гр и три клубня с поглощенной дозой 1000 Гр, при этом для каждого клубня получили по три одинаковых экстракта. В индикаторные реакции вводили 6 необлученных образцов, 5 образцов с

поглощенной дозой 100 Гр и 5 образцов с поглощенной дозой 1000 Гр, для каждого образца выполняли 6 параллельных опытов.

Для облучения куриного мяса трех производителей и печени индейки использовали линейный ускоритель электронов непрерывного действия УЭЛР-1–25-Т-001 с эффективной энергией 1 МэВ и максимальной средней мощностью пучка 25 кВт (НИИЯФ МГУ). Двенадцать образцов куриной грудки размером 15 мм×15 мм×7 мм помещали в чашки Петри диаметром 37 мм, по 4 образца от каждого из 3 производителей. Толщина образцов определялась необходимостью обеспечения равномерности дозы до 70%. Ток пучка варьировали от 50 до 500 нА, а температура окружающей среды составляла приблизительно 20°C. Образцы помещали на дюралюминиевую пластину размером 35 мм×182 мм, расположенную на расстоянии 125 мм от выхода пучка, и облучали с двух противоположных сторон для обеспечения равномерности дозы.

Дальнейшие операции проведены автором: каждый из двенадцати облученных образцов массой 2.5 г помещали в полипропиленовый флакон объемом 20 мл, содержащий 5.0 мл деионизованной воды, и экстрагировали на орбитальном шейкере при 120 об/мин при комнатной температуре в течение 24 ч. Надосадочную жидкость центрифугировали и хранили в морозильной камере при –18°C в пробирках типа Эппендорф. Экстракты размораживали, помещая пробирки в воду комнатной температуры непосредственно перед анализом.

Для обработки данных в данном разделе (3.3.10) образцы подразделяли на два класса – облученные и необлученные. Для оценки правильности классификации облученных и необлученных образцов использовали методы ПЛС-ДА, ЛДА и логистической регрессии (ЛР).

Для классификации облученных и необлученных образцов картофеля, куриного мяса и печени индейки сравнили 8 индикаторных реакций, в которых использовали 4 карбоцианиновых красителя и пероксид водорода или гипохлорит натрия в качестве окислителей. В табл. 23–25 приведены чувствительность (способность правильно соотносить необлученные образцы), специфичность (способность правильно соотносить облученные образцы) и правильность распознавания для каждой индикаторной реакции, данные которой были обработаны тремя методами (ПЛС-ДА, ЛДА, ЛР).

Данные для образцов картофеля состояли из 36 необлученных образцов и по 30 образцов с поглощенной дозой 100 Гр и 1000 Гр, объединенных в один класс. Матрица

данных содержала 96 наблюдений, число переменных для каждой реакции указано в табл. 23.

Для реакции *дор-249* – H_2O_2 , показавшей самую высокую правильность распознавания факта облучения (99%) с использованием метода ПЛС-ДА, на рис. 42 показаны графики счетов и классификации ПЛС-ДА. На графике счетов (рис. 42а) видно, что два класса образцов образуют две группы, а график классификации (рис. 42б) показывает эффективность модели с минимальной ошибкой классификации (только один образец соотнесен неправильно). Таблица нагрузок (рис. 42в) показывает вклад каждой переменной (поглощение красного (R), зеленого (G) и синего (B) каналов) в формирование факторов 1,2,3. На наиболее значимый фактор 1 в большей степени влияют зеленый и синий каналы во всех временных точках, особенно в моменты 25 и 40 мин, что подчеркивает необходимость измерений на протяжении всего времени протекания реакции.

Таблица 23. Правильность распознавания (%) облученных и необлученных образцов картофеля с использованием ПЛС-ДА, ЛДА, ЛР с рандомной валидацией. Через **дробную черту** приведены значения чувствительности/специфичности/правильности (%)

Индикаторная реакция	Число переменных	ПЛС-ДА	ЛДА	ЛР	Число методов с правильностью >90%
Дор-145 – NaOCl	15	100/92/ 95	100/86/ 93	96/94/ 95	3
Дор-249 – NaOCl	21	97/95/ 96	89/84/86	67/88/80	1
Дор-128 – NaOCl	29	92/93/ 93	84/91/89	83/92/88	1
Дор-255 – NaOCl	18	78/85/82	76/74/75	67/88/79	0
Дор-145 – H_2O_2	24	83/97/ 92	81/96/ 90	78/95/88	2
Дор-249 – H_2O_2	21	100/98/ 99	96/94/ 95	77/81/82	2
Дор-128 – H_2O_2	25	100/78/86	93/77/83	88/89/88	0
Дор-255 – H_2O_2	21	67/77/73	77/64/74	80/81/80	0
Число реакций с правильностью >90%		5	3	1	

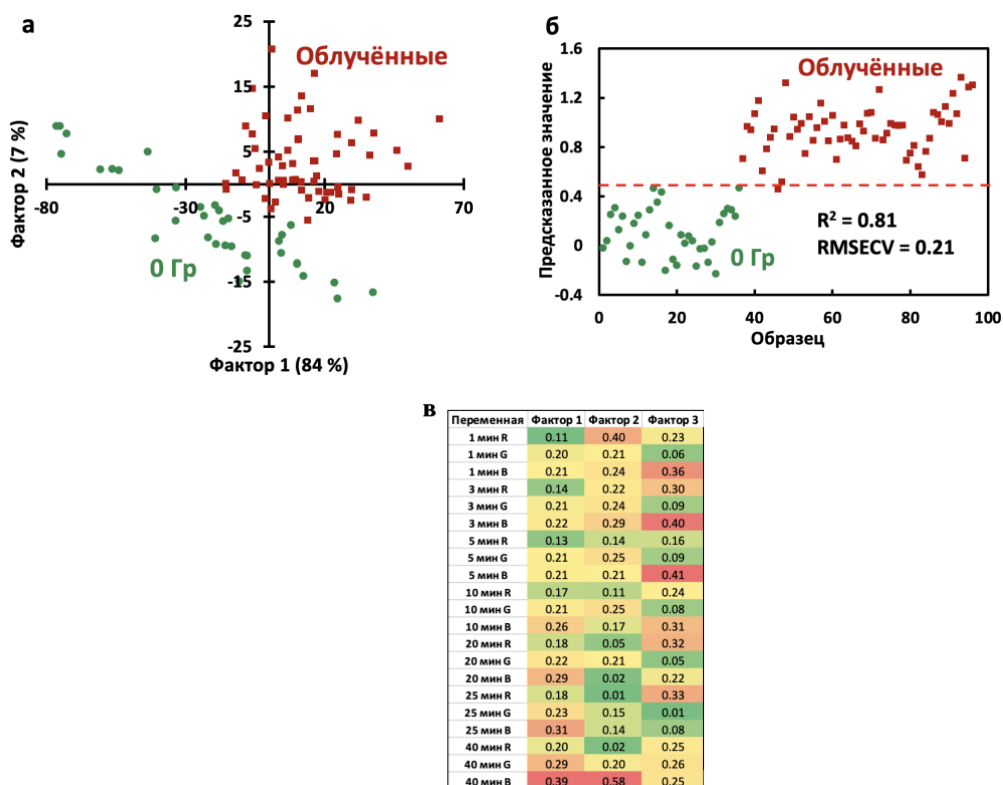


Рис. 42. График счетов ПЛС-ДА (а), график классификации ПЛС-ДА (б), таблица нагрузок для ПЛС-ДА (в), для облученных и необлученных образцов картофеля, введенных в реакцию $\text{доp-249} - \text{H}_2\text{O}_2$.

Изучили 12 образцов куриного мяса трех производителей, три из которых были необлученными и использовались в качестве контрольных, другие образцы трех производителей были облучены дозами 250 Гр, 1000 Гр и 5000 Гр. Матрица данных содержала 72 наблюдения, число переменных указано в табл. 24.

Реакция $\text{доp-255} - \text{NaOCl}$ позволила различить облученные и необлученные образцы куриного мяса с правильностью 97% с использованием модели ПЛС-ДА (табл. 24). Специфичность для данной реакции равна 100%, что свидетельствует о высокой способности системы выявлять облученные образцы. Как показано на графике счетов ПЛС-ДА (рис. 43а), облученные образцы можно отличить от необлученных, а на графике классификации ПЛС-ДА (рис. 43б) предсказанные значения для двух классов различаются практически безошибочно. Согласно таблице нагрузок (рис. 43в), наибольший вклад в формирование фактора 1 вносит поглощение красного канала. Факторы 2 и 3, объясняющие небольшой процент дисперсии, подвержены влиянию флуоресценции в видимой области.

Таблица 24. Распознавание облученных и необлученных образцов куриного мяса с использованием ПЛС-ДА, ЛДА, ЛР с случайной валидацией. Приведены значения чувствительности/специфичности/правильности (%)

Индикаторная реакция	Число переменных	ПЛС-ДА	ЛДА	ЛР	Число методов с правильностью >90%
Дор-145 – NaOCl	35	78/98/ 93	92/98/ 96	75/98/ 94	3
Дор-249 – NaOCl	24	78/96/ 92	54/80/76	70/92/88	1
Дор-128 – NaOCl	30	89/96/ 94	83/90/ 90	83/93/ 92	3
Дор-255 – NaOCl	21	89/100/ 97	92/95/ 93	92/98/ 96	3
Дор-145 – H ₂ O ₂	25	67/96/89	88/95/ 93	63/90/86	1
Дор-249 – H ₂ O ₂	46	100/94/ 96	85/92/86	83/92/ 92	2
Дор-128 – H ₂ O ₂	18	44/93/81	71/82/79	21/84/69	0
Дор-255 – H ₂ O ₂	39	83/89/88	88/88/89	79/92/ 90	1
Число реакций с правильностью >90%		5	4	5	

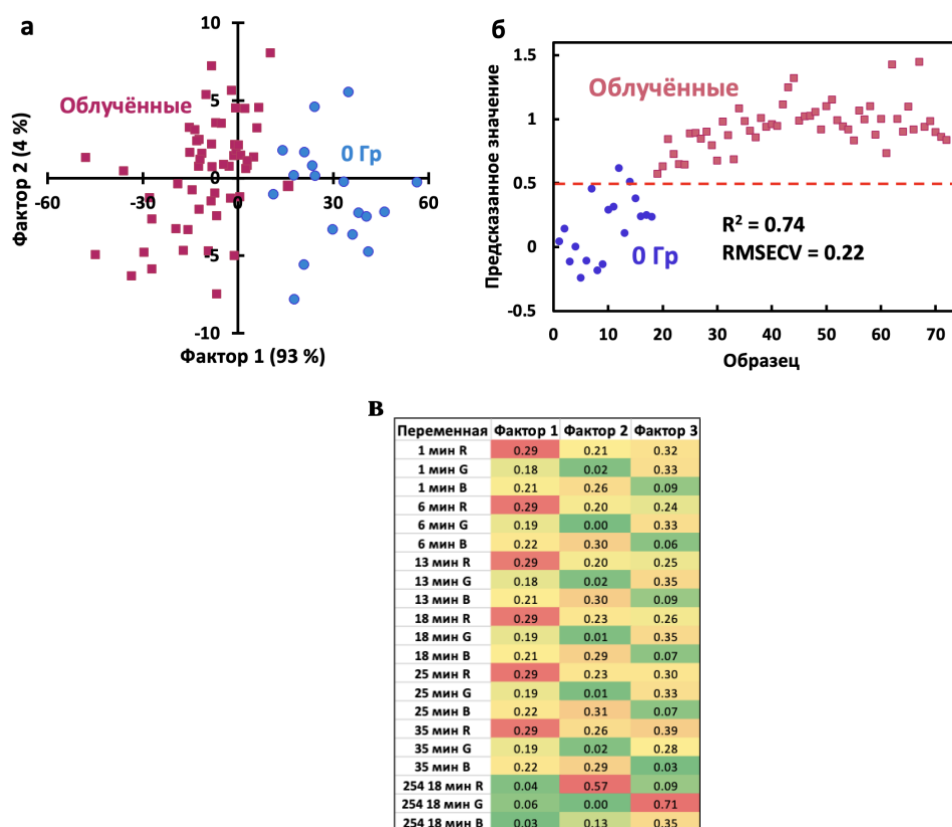


Рис. 43. График счетов ПЛС-ДА (а), график классификации ПЛС-ДА (б), таблица нагрузок для ПЛС-ДА (в), для облученных и необлученных образцов куриного мяса, введенных в реакцию дор-255 – NaOCl.

Реакции с использованием гипохлорита в качестве окислителя оказались более информативными, чем с пероксидом; с помощью реакций окисления красителей **дор-128** и **дор-255** можно классифицировать образцы любым из трех методов (табл. 24).

Образцы печени индейки были облучены дозами 100 и 1000 Гр, при этом использовали два контрольных образца, четыре образца с поглощенной дозой 100 Гр и четыре образца с поглощенной дозой 1000 Гр. Матрица данных содержала 60 наблюдений, число переменных указано в табл. 25. В табл. 25 представлены результаты классификации с использованием трех методов. Метод ЛДА демонстрирует максимальную правильность, чувствительность и специфичность (100%) для реакции *дор-249 – NaOCl*. При этом метод ПЛС-ДА дал большее число значений правильности, превышающей 90% (для 6 из 8 реакций). Не менее важно, что с помощью метода ПЛС-ДА достигнуты высокие значения специфичности, несмотря на низкие показатели чувствительности. В данной задаче именно специфичность определяет способность реакции обнаруживать облученные образцы, что играет важную роль при выборе индикаторной системы. Рис. 44 демонстрирует возможность распознавания факта облучения печени индейки с помощью реакции *дор-249 – NaOCl*. На рис. 44а показан график счетов ПЛС-ДА, на котором облученные и необлученные образцы образуют визуально различимые группы. На графике классификации ПЛС-ДА (рис. 44б) всего один необлученный образец находится выше линии границы, что означает его неправильное отнесение к классу необлученных образцов.

Примечательно, что для образцов печени индейки перекисные системы проявили себя лучше, чем гипохлоритные, что может быть связано с взаимодействием пероксида водорода с ферментами, содержащимися в печени индейки.

Таблица 25. Распознавание облученных и необлученных образцов печени индейки с использованием методов ПЛС-ДА, ЛДА и ЛР с рандомной валидацией. Приведены значения чувствительности/специфичности/правильности (%)

Индикаторная реакция	Число переменных	ПЛС-ДА	ЛДА	ЛР	Число методов с правильностью >90%
Дор-145 – NaOCl	17	75/96/ 92	75/85/83	40/98/88	1
Дор-249 – NaOCl	21	92/100/ 98	100/100/ 100	95/96/ 95	3
Дор-128 – NaOCl	22	83/96/ 93	85/85/85	75/98/ 93	2
Дор-255 – NaOCl	18	17/100/83	77/50/72	68/92/83	0
Дор-145 – H ₂ O ₂	18	83/98/ 95	85/96/ 93	60/89/83	2
Дор-249 – H ₂ O ₂	21	100/96/ 97	100/96/ 97	75/98/ 93	3
Дор-128 – H ₂ O ₂	21	42/96/85	87/45/78	92/55/83	0
Дор-255 – H ₂ O ₂	24	67/96/ 90	75/89/87	90/98/ 97	2
Число реакций с правильностью >90%		6	3	4	13

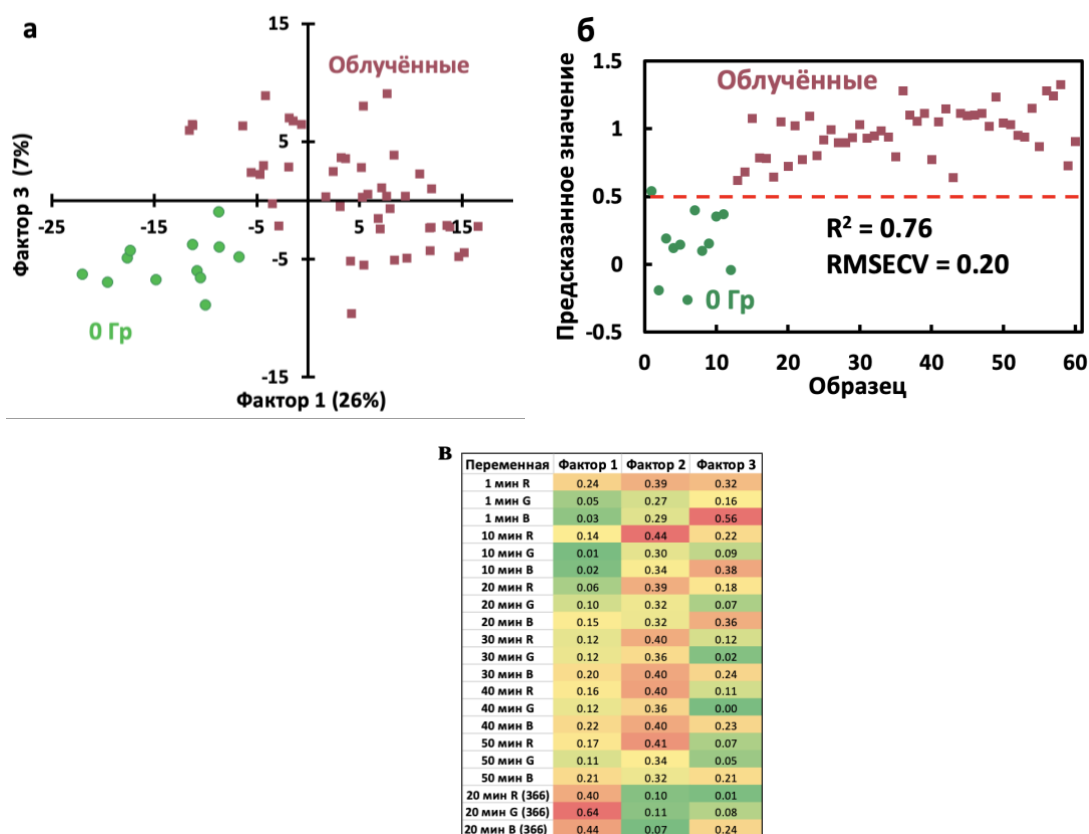


Рис. 44. График счетов ПЛС-ДА (а), график классификации ПЛС-ДА (б), таблица нагрузок для ПЛС-ДА (в), для облученных и необлученных образцов печени индейки, введенных в реакцию дор-249 – NaOCl.

Таким образом, мы предложили подход к различению образцов пищевых продуктов с использованием различных методов хемометрики с применением рандомной кросс-валидации. Наиболее подходящим для бинарной классификации оказался метод ПЛС-ДА. Что касается выбора индикаторной системы, универсальной реакции для распознавания факта облучения разных продуктов не существует. Так, для образцов картофеля наиболее эффективна реакция *dop-145 – NaOCl*, для различения образцов куриного мяса наиболее подходящими реакциями оказались *dop-128 – NaOCl* и *dop-255 – NaOCl*, а для образцов печени индейки лучший результат был достигнут с помощью реакций *dop-249 – NaOCl* и *dop-249 – H₂O₂*.

В реальном эксперименте неизвестный образец вводится в виде группы из нескольких параллельных опытов (в нашем случае 6), поэтому для воссоздания ситуации анализа неизвестного образца мы применили валидацию LOGO. Параллельные измерения, относящиеся к одному физическому образцу, были усреднены, чтобы исключить влияние случайных внутригрупповых различий и более точно оценить способность метода находить различия между образцами, следовательно, валидация LOGO соответствовала LOO. Матрицы данных для образцов куриного мяса, картофеля и печени индейки состояли из 12, 16 и 10 строк, соответственно. Значения правильности, рассчитанные с применением методов ЛДА, логистической регрессии (ЛР) и ПЛС-ДА, оказались несколько ниже, чем полученные с использованием рандомной валидации (табл. 26). Тем не менее, удалось найти достаточно комбинаций красителя и окислителя, которые позволили классифицировать образцы с высокой правильностью. Образцы куриного мяса были распознаны с помощью всех четырех изученных гипохлоритных реакций. Наиболее высокие результаты правильности были получены с помощью реакции *dop-255 – NaOCl*. Облученные и необлученные образцы картофеля распознавались с правильностью 94% несколькими индикаторными реакциями. Метод ПЛС-ДА оказался наиболее подходящим для данной задачи, показав высокую правильность в 10 случаях против 6 случаев для ЛДА и ЛР. В целом, гипохлоритные реакции показали себя более эффективными по сравнению с пероксидными (9 реакций с высокой правильностью против 7). Реакции с красителем ***dop-249*** обеспечивали высокую правильность (выше 90%) для всех изученных типов продуктов, что позволяет рассматривать их как наиболее перспективные для данной задачи, но не как универсальное решение для всех типов облученных продуктов.

Таблица 26. Правильность распознавания (%) облученных и необлученных продуктов питания с помощью ЛДА/ЛР/ПЛС-ДА (значения, разделенные косой чертой) с использованием валидации LOO

Индикаторная реакция	Куриное мясо	Картофель	Печень индейки	Всего для NaOCl и H ₂ O ₂
Дор-145 – NaOCl	75/ 92 /75	75/81/ 94	70/70/ 90	9
Дор-249 – NaOCl	83/75/ 92	94 /63/ 94	70/80/ 100	
Дор-128 – NaOCl	75/ 92 /75	69/75/69	70/ 90 /70	
Дор-255 – NaOCl	92/100/100	69/63/75	70/70/70	
Дор-145 – H ₂ O ₂	92 /58//83	94 /75//81	80/70/70	7
Дор-249 – H ₂ O ₂	83/75/ 92	81/75/ 94	100/100/100	
Дор-128 – H ₂ O ₂	33/58/58	69/75/88	70/70/ 90	
Дор-255 – H ₂ O ₂	83/67/83	38/69/75	70/ 90 /50	
Число реакций с правильностью >90%	6	4	6	

Предложенный метод успешно применен для классификации облученных и необлученных образцов картофеля, куриного мяса и печени индейки. Правильность классификации облученных и необлученных продуктов варьируется в зависимости от выбранной индикаторной реакции для каждого типа образца и от метода обработки данных. Достаточно изучить ограниченный набор реакций, чтобы выбрать подходящую. Возможность различать облученные и необлученные образцы показали, используя метод валидации LOO на усредненных данных.

5.9. Определение порядка дозы облученных продуктов¹²

Предыдущий раздел посвящен применению кинетического метода отпечатков пальцев для бинарной классификации облученных образцов. В данном разделе мы исследовали возможность применить индикаторные реакции для различения продуктов, облученных различными дозами.

5.9.1. Картофель, облученный ускоренными электронами и рентгеновским излучением

Задачей данного раздела было различение необлученных образцов картофеля и образцов, облученных ускоренными электронами в диапазоне от 10 Гр до 10 кГр, а также облученных рентгеновским излучением в диапазоне от 100 Гр до 5 кГр.

Цельные клубни сырого картофеля (2023 г.) облучали в Институте ядерной физики им. Скобельцына МГУ (Москва, Россия), как описано выше в разд. 3.3.10. В результате получили образцы, облученные дозами 10 и 100 Гр, а также 1 и 10 кГр. После облучения клубни очищали от кожуры овощечисткой и ею же снимали часть клубня. Навески полученного продукта (4 г) помещали в полипропиленовые виалы объемом 20 мл и добавляли по 10 мл воды. Для предотвращения потемнения экстрактов добавляли 100 мкл 0.1 М раствора аскорбиновой кислоты или сульфита натрия.

В данном разделе использовали два типа индикаторных реакций: агрегации (разд. 3.2.2) и окисления карбоцианиновых красителей. Концентрации реагентов (окислителей) были выбраны на основе предыдущих исследований.

¹² При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

- 1) Shik A. V., Skorobogatov E. V., Bliznyuk U. A., Chernyaev A. P., Avdyukhina V. M., Borschegovskaya P. Yu., Zolotov S. A., Baytler M. O., Doroshenko I. A., Podrugina T. A., Beklemishev M. K. Estimation of doses absorbed by potato tubers under electron beam or X-ray irradiation using an optical fingerprinting strategy // Food Chem. 2023. Vol. 414. Article 135668. (1.27 п.л.; вклад автора 40%; IF = 9.8, Q1).
- 2) Shik A. V., Sobolev P. V., Zubritskaya Y. V., Baytler M. O., Stepanova I. A., Chernyaev A. P., Borschegovskaya P. Yu., Zolotov S. A., Doroshenko I. A., Podrugina T. A., Bliznyuk U. A., Rodin I. A., Beklemishev M. K. Rapid testing of irradiation dose in beef and potatoes by reaction-based optical sensing technique // J. Food Comp. Anal. 2024. Vol. 127. Article 105946. (1.39 п.л.; вклад автора 60%; IF = 4.6, Q1).
- 3) Shik A. V., Stepanova I. A., Koksharova M. V., Doroshenko I. A., Podrugina T. A., Bliznyuk U. A., Borschegovskaya P. Yu., Chernyaev A. P., Ananieva I. A., Rodin I. A., Beklemishev M. K. Estimation of irradiation doses in chicken samples using a reaction-based fingerprinting method // Food Chem. 2025. Vol. 482. Article 144073. (1.27 п.л.; вклад автора 60%; IF = 9.8, Q1).
- 4) Shik A. V., Stepanova I. A., Doroshenko I. A., Bliznyuk U. A., Podrugina T. A., Chernyaev A. P., Rodin I. A., Beklemishev M. K. Recognition of Samples of Similar Composition Using Kinetic-Based Optical Fingerprinting Strategy: Choice of Indicator Reactions // Talanta. 2026. Vol. 308. Article 129805. (1.62 п.л.; вклад автора 70%; IF = 5.6, Q1).

Для проведения окислительно-восстановительных реакций в 96-луночные планшеты многоканальным дозатором вносили следующие растворы в указанном порядке: фосфатный буфер (pH 7.4, 0.067 М), 30 мкл; вода (до общего объема 300 мкл); 1 мМ ЦТАБ, 30 мкл; водный экстракт картофеля, 25 мкл; 1 М H_2O_2 , 30 мкл, 1 мМ CuSO_4 , 30 мкл; и 0.1 г/л красителя **кат-72** или **дор-145** в воде, 30 мкл. Сигнал регистрировали в течение 15 мин каждые 3 мин с помощью камеры смартфона в видимом свете и с помощью ИК-визуализатора в БИК-области. Для каждой дозы анализировали три клубня картофеля по 5 повторений для каждого.

В случае агрегативной системы в ячейки планшета вносили следующие реагенты: фосфатный буфер (pH 7.4), 30 мкл; вода (до общего объема 300 мкл); ЦТАБ 1 ммоль/л, 70 мкл; картофельный экстракт, 25 мкл; краситель **акри-278**, 0.04 г/л в воде, 30 мкл. Изображения получали один раз, поскольку результат не зависел от времени.

В первом эксперименте образцы одного сорта картофеля были облучены дозами 10 Гр, 100 Гр, 1 кГр и 10 кГр. Для каждой дозы в эксперименте использовали по два клубня. Матрица данных содержала 50 наблюдений (5 доз x 2 клубня x 5 параллельных измерений) и 22 переменные. На графике счетов ЛДА (рис. 45) не наблюдали полного разделения групп, однако группу необлученных образцов можно было отделить от образцов, облученных дозой 100 Гр и более высокими дозами; кроме того, дозы 100 Гр, 1 кГр и 10 кГр различались между собой. Правильность распознавания методом софтмакс регрессии с рандомной валидацией составила 94% (табл. 27).

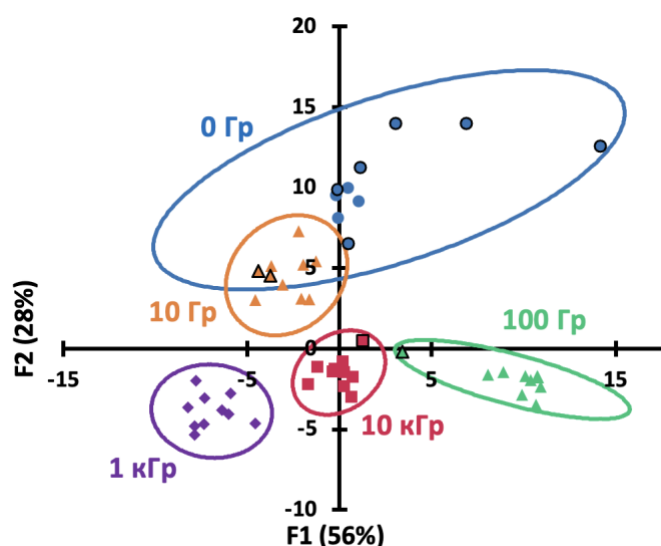


Рис 45. График счетов ЛДА для образцов картофеля, облученных ускоренными электронами в диапазоне 10 Гр – 10 кГр. Эллипсы строили для 90% доверительной вероятности. Валидационные точки обведены черным цветом.

Может возникнуть ситуация, когда клубни, облученные известной дозой, будут принадлежать к одному сорту, а клубни с неизвестной дозой – к другому сорту. Во втором эксперименте мы протестировали два сорта картофеля, по три клубня на каждую дозу (0 Гр, 100 Гр, 1 кГр, 10 кГр). Матрица данных содержала 120 наблюдений (2 сорта x 4 дозы x 3 клубня x 5 параллельных измерений) и 18 переменных. На рис. 46 представлены примеры фотографических изображений планшета в БИК-области и в видимом свете для реакции *доп-145* – H_2O_2 . Видно, что различия между образцами не сильно выражены, поэтому изображения подвергли хемометрической обработке.

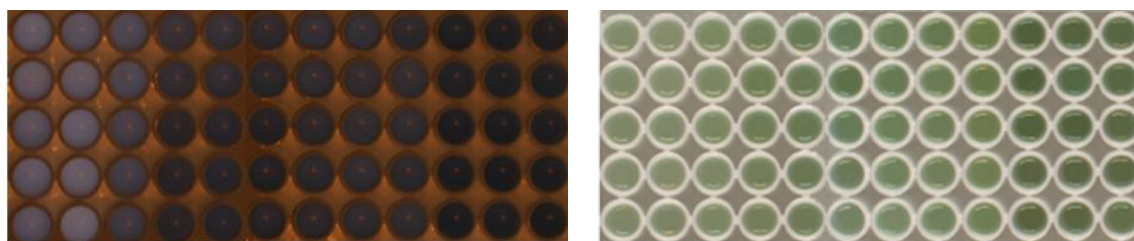


Рис. 46. Фотографии планшета в БИК-области (слева) и в видимом свете (справа) для индикаторной реакции *доп-145* – H_2O_2 . Использован экстракт картофеля с добавлением аскорбиновой кислоты. Каждой дозой облучали три разных клубня. Параллельные опыты расположены вертикально. Порядок образцов, слева направо: колонки 1–3: 0 Гр (необлученные); 4–6: 100 Гр; 7–9: 1 кГр; 10–12: 10 кГр. Время от начала реакции – 11 мин.

На рис. 47 представлены графики счетов ЛДА для первого (а), второго (б) и одновременно обоих сортов (в). Полное разделение на графике счетов наблюдается только для первого сорта картофеля, для второго сорта образцы, облученные дозами 100 Гр и 1 кГр, не разделены. При объединении двух сортов группы точек, соответствующие разным дозам, частично перекрывались. Правильность распознавания доз для двух сортов картофеля вместе составила 88% (табл. 27). Следовательно, различение доз, хотя и менее эффективное, может быть достигнуто даже для смеси сортов картофеля. Этот эксперимент моделирует ситуацию, когда образцы получают известные дозы, а неизвестные образцы принадлежат к разным сортам. Рассмотренный пример показывает, что эти два сорта обладают разными свойствами, но облученные клубни разных сортов можно анализировать вместе как один набор данных, и результат различения может быть удовлетворительным.

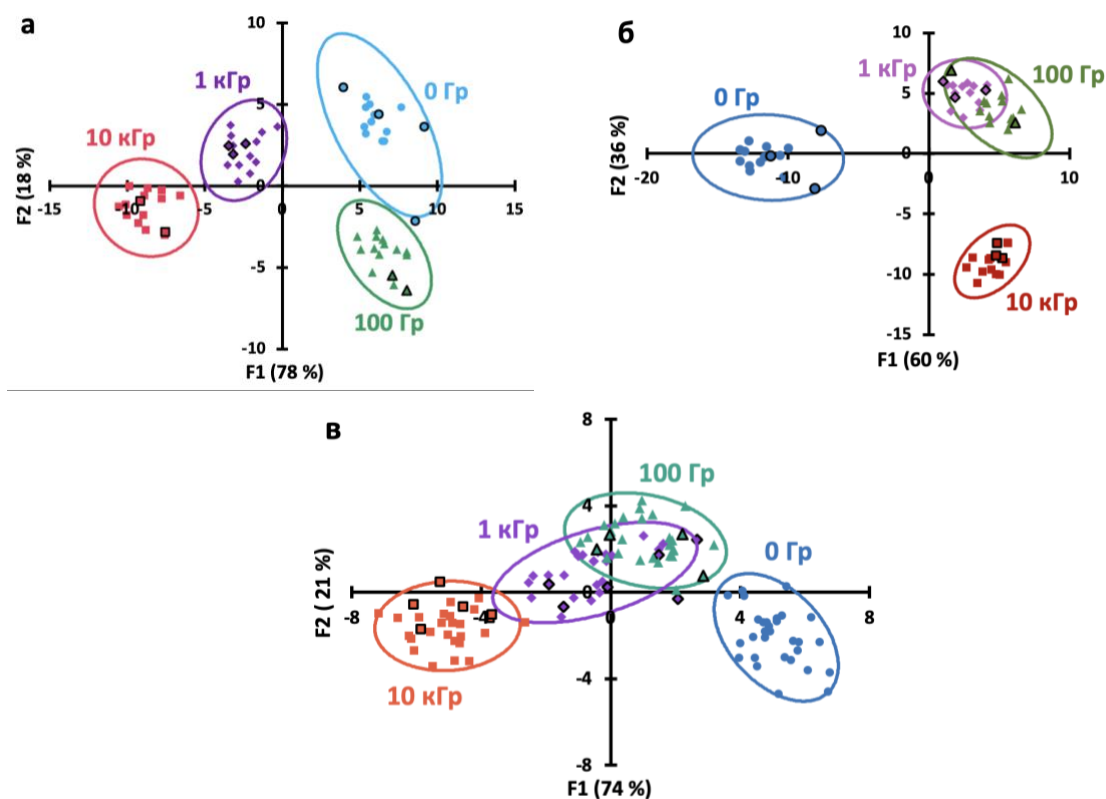


Рис. 47. Графики счетов ЛДА для образцов картофеля, облученных ускоренными электронами. (а) первый сорт, (б) – второй сорт, (в) оба сорта. (а, б) эллипсы строили для 95% (а,б) и 90% доверительной вероятности (в). Валидационные точки обведены черным цветом.

Рентгеновское облучение картофеля проводили на кафедре физики ускорителей и радиационной медицины МГУ с помощью установки ДРОН УМ-2 с источником питания ПУР5/50 и рентгеновской трубкой БСВ-23 с медным анодом, согласно методике [111]. Перед облучением клубни разрезали на параллелепипеды толщиной 6 мм, длиной 6 мм и высотой 15 мм, которые помещали в полипропиленовые пробирки объемом 2 мл и диаметром 9 мм. Каждый образец помещали непосредственно перед бериллиевым окном рентгеновской трубки. Ток трубки составлял 26 мА, напряжение — 30 кВ. Каждую дозу (100, 1000 и 5000 Гр) применяли к двум идентичным образцам; два необлученных образца служили контрольными. Для приготовления водного экстракта к каждому из образцов добавляли по 1 мл деионизированной воды и 15 мкл 0.1 М раствора аскорбиновой кислоты в качестве антиоксиданта. Подготовленные образцы перемешивали на орбитальном шейкере (120 об/мин) в течение 9 ч, а затем хранили в течение 10–12 часов при комнатной температуре, после чего порции полученных картофельных экстрактов смешивали с компонентами индикаторных реакций.

Несмотря на то, что облучение ускоренными электронами может быть более эффективным, чем облучение рентгеновским излучением той же дозы [111], мы оценили возможность различения образцов с разной поглощённой дозой. Для каждого образца выполняли 5 повторений. Использовали реакцию окисления красителя **дор-145** пероксидом водорода и реакцию агрегации красителя **акри-278**. Матрица данных содержала 40 наблюдений (4 дозы x 2 клубня x 5 повторений) и 24 переменных. Полученную матрицу данных обрабатывали методом ЛДА и софтмакс регрессии (табл. 27). С использованием рандомной валидации достигнута правильность 100% обоими методами. На рис. 48 представлен график счетов ЛДА, на котором образцы с разной поглощенной дозой могут быть различены.

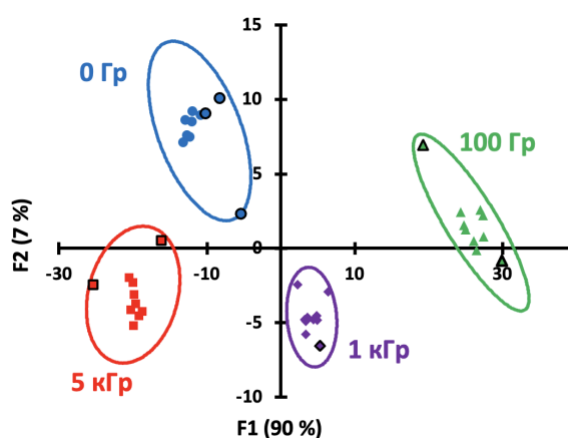


Рис. 48. График счетов ЛДА для образцов картофеля, облученного рентгеновским излучением. Валидационные точки обведены черной рамкой. Эллипсы строили для доверительной вероятности 90%. Использована реакция окисления красителя **дор-145** пероксидом водорода и реакция агрегации красителя **акри-278**.

Таблица 27. Правильность (%) оценки поглощенной дозы для образцов картофеля, облученного различными видами излучения. ЛДА/СР, два сорта объединены в один класс

Облучение	Кросс-валидация		
	рандомная	LOGO без усреднения	LOO с усреднением
Электронами*	88/94	68/74	90/60
Электронами**	88/88	75/71	67/71
Рентгеновскими лучами	100/100	30/28	38/50

* – 0, 10, 100 Гр, 1,10 кГр, 1 сорт по 2 клубня

** – 0, 100 Гр, 1,10 кГр, 2 сорта по 3 клубня

Полученные результаты подтвердили, что для различения дозы образцы можно экстрагировать водой. Образцы разных сортов, облученные ускоренными электронами в диапазоне от 10 Гр до 10 кГр, можно различить с 94% правильностью методом софтмакс регрессии с рандомной валидацией. При использовании валидации LOGO, которая более пригодна для реальных практических задач, правильность классификации ожидаемо резко снижается (табл. 27). Это указывает на то, что в данном случае сигнал зависит от сорта картофеля, а не только от поглощенной дозы. Кроме того, для получения высоких значений правильности при LOGO валидации в данном эксперименте было недостаточно образцов в каждом классе. Усреднили 5 параллельных измерений для каждого образца. В этом случае удалось достигнуть правильности 90% методом ЛДА для образцов, облученных дозами в диапазоне от 10 Гр до 10 кГр. Образцы, облученные ускоренными электронами в диапазоне от 100 Гр до 10 кГр и рентгеновским излучением, не удалось распознать. Правильность классификации может быть повышена путем использования большего числа клубней каждого сорта и каждой дозы. Увеличение выборки позволит модели обучиться на закономерностях, связанных с облучением, и снизить влияние сортовых особенностей.

5.9.2. Фарш говядины и картофель, облученные рентгеновским излучением

В данном разделе представлено дальнейшее развитие подхода к определению порядка поглощенной дозы, основанного на проведении индикаторных реакций в присутствии образца. Для оценки дозы, поглощенной образцами мясного фарша и картофеля, изучили широкий круг индикаторных реакций с использованием различных красителей и окислителей. Для повышения экспрессности методики изучили различные условия экстракции образцов. Кроме того, необходимо было выбрать методы обработки данных для получения высокой правильности распознавания.

Образцы картофеля и говядины облучали с помощью настольного рентгеновского аппарата ЛНК-268 (ООО «Диагностика-М», Россия), состоящего из рентгеновского аппарата РАП 100-10 с рентгеновской трубкой 1БПВ23-100, имеющей молибденовый анод и бериллиевое выходное окно. Образцы помещали в рентгеновский аппарат на расстоянии 12 см от бериллиевого окна. Для обеспечения необходимой мощности дозы облучения выбирали напряжение трубки 80 кВ и ток 2 мА. Для обеспечения максимальной равномерности дозы в образцах 6 клубней картофеля диаметром 40 ± 2 мм очищали от кожуры и нарезали ломтиками, после чего из каждого клубня вырезали по три ломтика толщиной 2 мм и весом 2.0 ± 0.1 г. Ломтики картофеля

помещали по отдельности в чашки Петри диаметром 40 мм. Мелко нарезанные образцы (фарш) говядины массой 2.5 ± 0.1 г помещали в чашки Петри диаметром 40 мм для получения равномерного слоя толщиной порядка 2 мм. Всего подготовили 4 образца говяжьего фарша и 4 ломтика картофеля для облучения двумя дозами, по 2 образца говядины и 2 образца картофеля для каждой дозы, оставив 2 необлученных образца картофеля и 2 необлученных образца фарша в качестве контрольных образцов. Образцы получали дозы 100 и 1000 Гр.

Для приготовления водных экстрактов облученные образцы говяжьего фарша и картофеля переносили в полипропиленовые вials объемом 20 мл, содержащие 5.0 мл деионизированной воды, к которой добавляли по 100 мкл 0.1 М раствора аскорбиновой кислоты для предотвращения окисления образцов. Экстракцию образцов картофеля проводили в двух вариантах: экстракция 24 ч при комнатной температуре (23°C) (картофель I) и экстракция в течение 1 часа при $70 \pm 1^\circ\text{C}$ (картофель II). Образцы говядины экстрагировали в трех вариантах: 24 часа при комнатной температуре (мясо I), 1 ч при $60 \pm 1^\circ\text{C}$ (мясо II) или 1 час при комнатной температуре (мясо III). Образцы говядины I и картофеля I помещали на орбитальный шейкер со скоростью 120 об/мин для экстракции в течение 24 ч при комнатной температуре. Образцы картофеля II и говядины II помещали в водяной термостат и экстрагировали в течение 60 мин при температурах 60°C и 70°C, соответственно. Образцы говядины III помещали на орбитальный шейкер со скоростью 120 об/мин для экстракции в течение 60 мин при комнатной температуре.

Экстракты отделяли от твердых частиц центрифугированием и вводили 20 мкл экстрактов в индикаторные реакции. Для последующих экспериментов экстракты хранили при -18°C в пластиковых пробирках и размораживали при комнатной температуре в день эксперимента. Всего рассмотрена 21 индикаторная реакция; ниже приведены результаты для 10 наиболее эффективных систем. Матрица данных как для образцов мясного фарша, так и для образцов картофеля содержала 36 наблюдений (2 образца $\times$ 3 дозы $\times$ 6 повторений). Данные обрабатывали методами ЛДА, софтмакс регрессии (CP) и kNN.

На рис. 49 представлены примеры фотографических изображений в видимой области для образцов картофеля. Оцифрованные данные, представляющие собой интенсивности лунок планшета, можно представить в виде кинетических кривых, иллюстрирующих протекание индикаторных реакций в присутствии образцов (рис. 50).

Форма кривых зависит как от поглощенной дозы, так и от условий экстракции. В некоторых случаях дозы плохо различаются в начале реакции, но со временем различие становится более заметным. Обработка всей кинетической кривой увеличивает количество информации от образца и делает различие доз более правильным.

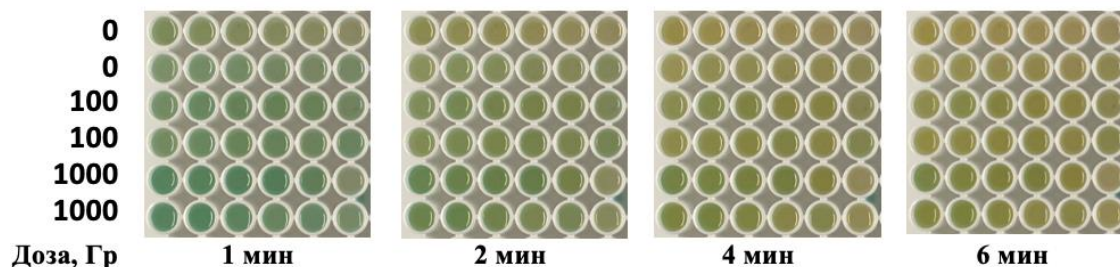


Рис. 49. Фотографии 96-луночного планшета с образцами картофеля П, облученными дозами 0, 100 и 1000 Гр (показано слева) в смеси с красителем дор-128, NaOCl и лизоцимом. Время от начала реакции указано под изображением. Каждый образец исследовали в 6 повторениях (ряды планшета), по два образца на дозу.

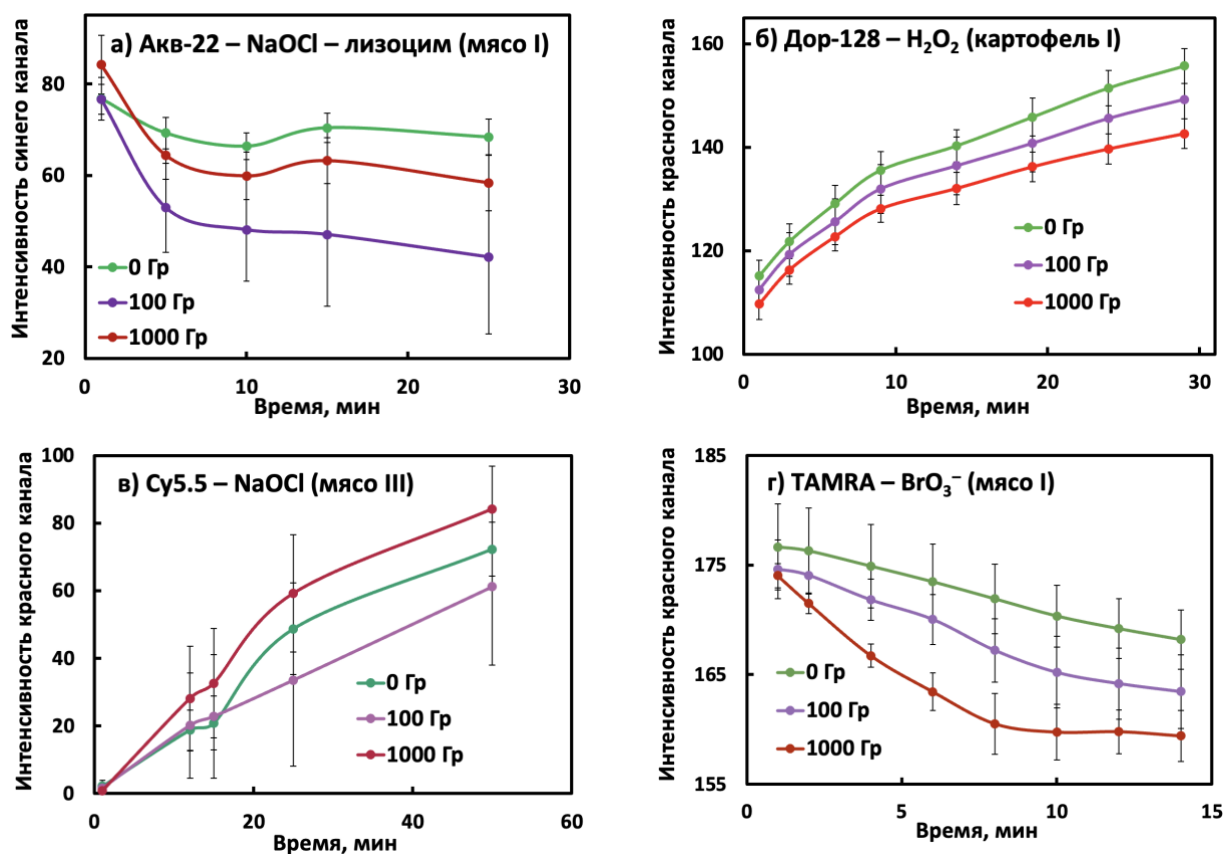


Рис. 50. Примеры кинетических кривых для некоторых индикаторных реакций; названия систем указаны на изображениях. Доверительные интервалы, соответствующие стандартному отклонению, были рассчитаны на основе 12 измерений одной дозы (2 образца).

Фотографические изображения, полученные в разные моменты времени, были обработаны методами ЛДА, СР и kNN для оценки правильности распознавания необлученных образцов и облученных дозами 100 Гр и 1000 Гр. Эффективность классификации (табл. 28) зависела от типа индикаторной реакции, образца и условий экстракции. Как правило, метод ЛДА показывал более высокие значения правильности. Правильность выше 90% для образцов мяса достигается в пяти случаях с применением метода ЛДА, и лишь одном случае методами СР и kNN. Для образцов картофеля метод показал значения правильности выше 90% в трех случаях, в то время как метод СР в двух, а метод kNN в одном. Наиболее универсальной реакцией была $Cy5.5 - NaOCl$, позволившая различать дозы с правильностью выше 90% как в образцах мяса, так и в образцах картофеля при экстракции 24 ч при комнатной температуре. В целом, реакции, показавшие высокую правильность, проводились с гипохлоритом в качестве окислителя. Также можно отметить, что добавление белка в реакцию окисления красителя **дор-128** в случае образцов мяса повышало правильность распознавания (табл. 28).

Условия экстракции значительно влияют на правильность распознавания. Длительное время (24 ч) экстракции при комнатной температуре дает заметно более высокие результаты, чем нагревание в течение одного часа. Так, при часовом нагревании образцы были распознаны с использованием только одной реакции: *Дор-128 – H_2O_2* для мяса и $Cy5.5 - NaOCl$ для картофеля. Образцы мяса, экстрагированные в течение часа при комнатной температуре, не удалось распознать, правильность не превышала 64%. Вероятно, это связано с неполным переходом некоторых важных маркеров в воду. Для образцов картофеля экстракция в течение суток также была более эффективной, чем нагревание в течение часа (табл. 29).

Таблица 28. Правильность оценки дозы (0, 100, 1000 Гр) в образцах мясного фарша (%) с помощью индивидуальных индикаторных реакций после экстракции в различных условиях

Индикаторная реакция	24 ч, 23°C (мясо I)			1 ч, 60°C (мясо II)			1 ч, 23°C (мясо III)		
	ЛДА	СР	kNN	ЛДА	СР	kNN	ЛДА	СР	kNN
ТАМРА – BrO ₃ ⁻ (1)	97	92	86	56	44	50	47	64	42
Cy5.5 – NaOCl (2)	92	89	83	53	81	58	44	36	36
Акв-22 – лизоцим – NaOCl (3)	92	86	86	36	61	44	33	53	36
Дор-128 – H ₂ O ₂ (4)	86	89	83	92	89	92	50	58	47
Дор-255 – H ₂ O ₂ (5)	86	82	78	78	58	50	53	53	42
Дор-128 – BrO ₃ ⁻ (6)	83	53	44	78	53	44	–	–	–
Дор-128 – БСА – NaOCl (7)	72	64	33	83	86	75	43	50	43
Дор-128 – γ-глобулин – NaOCl (8)	69	72	64	86	81	50	44	50	42
Дор-128 – NaOCl (9)	61	64	44	64	72	72	–	–	–
Дор-128 – хлорамин Б (10)	61	56	50	28	50	39	55	55	43

Таблица 29. Правильность оценки дозы (0, 100, 1000 Гр) в образцах картофеля (%) с помощью индивидуальных индикаторных реакций после экстракции в различных условиях. Представлены результаты расчетов с использованием рандомной валидации

Индикаторная реакция	24 ч, 23°C (картофель I)			1 ч, 70°C (картофель II)		
	ЛДА	СР	kNN	ЛДА	СР	kNN
Cy5.5 – NaOCl	97	92	75	97	81	56
Дор-128 – NaOCl	94	97	97	58	50	53
Дор-128 – лизоцим – NaOCl	–	–	–	78	81	78
Cy5.5 – лизоцим – NaOCl	–	–	–	70	63	47
ТАМРА – BrO ₃ ⁻	67	81	83	78	72	56
Дор-128 – H ₂ O ₂	44	39	36	61	61	56

Для облученных образцов мясного фарша предприняли попытку объединить данные нескольких индикаторных реакций (табл. 30). Добавление к реакции №4 (дор-128 – H₂O₂) данных реакций №9 (дор-128 – NaOCl) или №10 (дор-128 – хлорамин Б) позволило повысить правильность с 92% до 97% для образцов, экстрагируемых при нагревании (мясо II). Для образцов, экстрагируемых при комнатной температуре, правильность методом ЛДА увеличилась с 86% до 97% при использовании данных реакций 4 и 10. Примечательно, что при использовании объединенных данных реакций №7 (дор-128 – БСА – NaOCl) и №8 (дор-128 – γ-глобулин – NaOCl) правильность

оказалась ниже, чем при использовании индивидуальных реакций как для мяса I, так и для мяса II.

Таблица 30. Правильность оценки дозы (0, 100, 1000 Гр) в образцах мясного фарша (%) с помощью объединения нескольких индикаторных реакций

Индикаторные реакции	24 ч, 23°C (мясо I)			1 ч, 60°C (мясо II)		
	ЛДА	СР	kNN	ЛДА	СР	kNN
7 + 8	58	75	53	72	83	78
9 + 10	53	73	33	56	78	75
8 + 9 + 10	81	72	31	81	81	72
7 + 8 + 9 + 10	81	75	42	75	86	78
4 + 9	86	94	92	94	92	94
4 + 10	97	89	83	89	89	81

Результаты метода ЛДА визуализировали в виде графиков счетов (рис. 51, рис. 52). На рис. 51а,г и 52а,в представлены графики счетов для образцов, экстрагируемых в течение суток при комнатной температуре, введенных в наиболее эффективные индикаторные реакции. На графиках наблюдается четкое разделение образцов, облученных разными дозами, что соответствует высокой правильности, полученной с помощью реакций $Cy5.5 - NaOCl$ (рис. 51а) и $акв-22 - лизоцим - NaOCl$ (рис. 51г) для образцов мясного фарша и $дор-128 - NaOCl$, (рис. 52а) и $Cy5.5 - NaOCl$ (рис. 52в) для образцов картофеля. Образцы мясного фарша, подвергнутые экстракции при нагревании, не были разделены на графиках счетов, однако с использованием реакции $дор-128 - БСА - NaOCl$ (правильность 83%) возможно отличить необлученные образцы от облученных. Для образцов картофеля, введенных в реакцию $Cy5.5 - NaOCl$, необлученные образцы нельзя было отличить от образцов с поглощенной дозой 100 Гр, несмотря на правильность 97%. Образцы мясного фарша, экстрагируемые в течение часа при комнатной температуре, не были разделены на графике счетов, что подтверждает неэффективность данных условий экстракции.

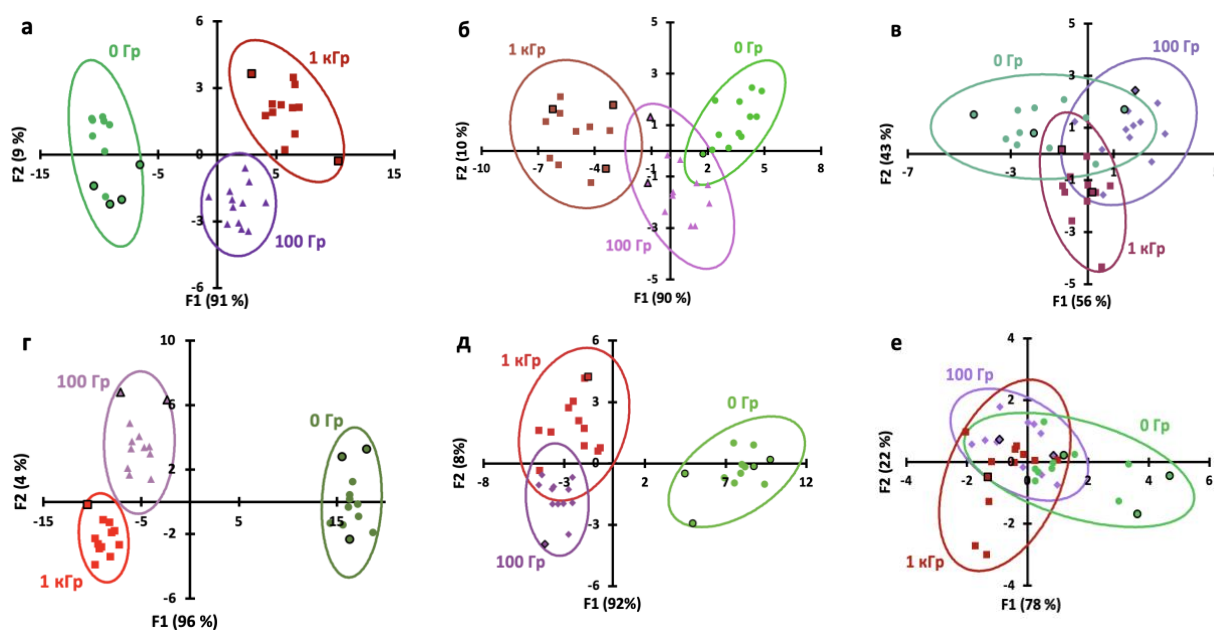


Рис. 51. Графики счетов ЛДА для облученных разными дозами образцов говядины, введенных в реакции: (а,б,в) *Cy5.5 – NaOCl*, (г,е) *акв-22 – лизоцим – NaOCl*, (д) *дор-128 – БСА – NaOCl*. Экстракция 24 ч, 23 °С (а,г), экстракция 1 ч, 60 °С (б,д), экстракция 1 ч, 23 °С (в,е). Валидационные точки обведены черным цветом. Доверительные эллипсы построены для 90% вероятности.

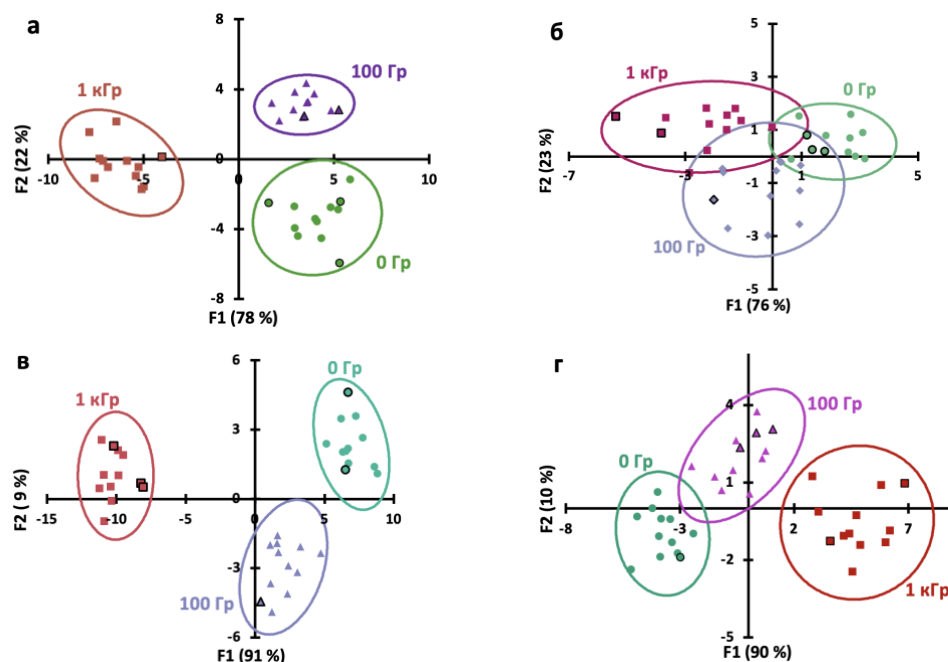


Рис. 52. Графики счетов ЛДА для облученных разными дозами образцов картофеля, введенных в реакции: (а,б) *дор-128 – NaOCl*, (в,г) *Cy5.5 – NaOCl*, экстракция 24 ч, 23 °С (а,в), экстракция 1 ч, 70 °С (б,г). Валидационные точки обведены черным цветом. Доверительные эллипсы построены для 90% вероятности.

Таким образом, предложенный метод позволил различать образцы мясного фарша и картофеля, облученных рентгеновским излучением (дозы 100 и 1000 Гр), от необлученных. Выбрали наиболее подходящие индикаторные реакции, позволившие различать образцы с правильностью 92–97%. Показали, что наиболее эффективна экстракция в течение суток при комнатной температуре. Однако ускоренная экстракция при нагревании может быть использована при правильном выборе индикаторной реакции, что может быть полезно при работе со скоропортящимися продуктами в условиях ограниченного времени. Объединение реакций в условиях длительной экстракции не дает явного преимущества перед использованием одной наиболее эффективной индикаторной реакции.

5.9.3. Мясо курицы, печень индейки и картофель, облученные ускоренными электронами

Использовали те же образцы и индикаторные реакции, что и в разделе 3.3.8. Для оценки порядка поглощенной дозы данные разделили на несколько классов, включающих различные дозы и контрольные образцы.

Куриное мясо было получено от трех производителей; задачей являлось выяснить, возможно ли использовать образцы другого производителя в качестве контрольных при определении дозы. Исследовали 11 индикаторных реакций (табл. 31), которые включали как реакции, использованные ранее, так и новые комбинации красителей и окислителей: реакция *дор-128* – *NaOCl* включала предварительное предокисление, реакция *акри-278* – *H₂O₂* включала предварительный нагрев экстрактов куриного мяса, реакция *дор-224* – *KBrO₃* ранее не была изучена. Также исследовали окисление ранее не изученного красителя **дор-286** пероксидом водорода (реакция 10).

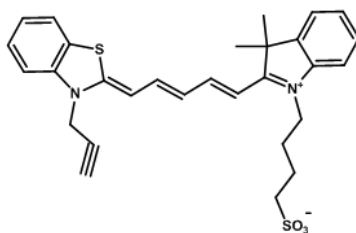


Схема 4. Структура красителя дор-286.

Полученные матрицы данных, состоящие из 72 наблюдений (3 производителя × 4 дозы × 6 повторений) и различного числа переменных (табл. 31), были подвергнуты обработке различными хемометрическими методами. Образцы трех производителей, облученных одинаковой дозой, были объединены в один класс. Таким образом,

необходимо было оценить правильность различения образцов на 4 класса (табл. 31). Сигналы различались для разных производителей, что могло повлиять на правильность различения доз. Однако с использованием трех реакций из 11 была достигнута правильность выше 90% методом софтмакс регрессии с рандомной валидацией. Наиболее подходящими для различения доз в образцах куриного мяса оказались реакции с использованием пероксида водорода (реакции 1 и 3). Кроме того, предварительное окисление образцов гипохлоритом позволило повысить правильность с 88% до 93% (реакции 7 и 4).

Для проверки, возможно ли различать дозы в случае, если неизвестные образцы будут от другого производителя, использовали валидацию LOO, усреднив при этом параллельные измерения для каждого образца. Правильность классификации ухудшилась, что свидетельствует о том, что при использовании некоторых индикаторных систем различие между производителями превышает различие между образцами, облученными разными дозами. Образцы от разных производителей, вероятно, имеют разные биохимические показатели, которые влияют на сигнал индикаторных реакций. Однако даже при использовании валидации LOO, которая приближает эксперимент к реальным условиям, удалось найти две реакции (реакции 1 и 6), которые распознали образцы с правильностью 92%. Полученные результаты позволяют рассматривать предложенный метод как потенциально применимый метод распознавания поглощенной дозы в образцах куриного мяса, однако для улучшения качества распознавания необходимо расширить выборку, включив в нее как можно больше производителей.

Таблица 31. Правильность (%) оценки дозы для образцов трех производителей куриного мяса с использованием рандомной валидации и валидации LOO. Для валидации LOO использованы усредненные данные

Индикаторная реакция	Число переменных	Использованные каналы	Рандомная			LOO		
			СР	ЛДА	kNN	СР	ЛДА	kNN
Дор-255 – H ₂ O ₂ (1)	39	вид/254/366/ИК	94	88	82	83	92	67
Дор-249 – H ₂ O ₂ (2)	45	вид/254/366	89	76	69	58	25	50
Акри-278 – H ₂ O ₂ (3)	71	вид/254/366/ИК	93	74	57	67	67	67
Дор-128 – NaOCl* (4)	72	вид/254/36/ИК	93	74	57	25	33	8
Дор-224 – KBrO ₃ (5)	46	вид/254/366	82	75	68	50	75	75
Акри-278 – H ₂ O ₂ ** (6)	72	вид/254/366/ИК	81	71	76	92	92	83
Дор-128 – NaOCl (7)	30	вид/ИК	88	74	76	50	50	50
Дор-255 – NaOCl (8)	21	вид/254	67	69	61	58	25	58
Дор-145 – NaOCl (9)	35	вид/ИК	76	76	68	67	67	25
Дор-286 – H ₂ O ₂ (10)	45	вид/366	65	58	43	33	50	33
Су7 – HCl (11)	24	вид	35	42	24	58	42	50

*Предокисление гипохлоритом в течение 5 мин.

**Предварительный нагрев до 75 °С в течение 20 мин.

Для повышения правильности распознавания мы предприняли попытку объединить данные 2–3 индикаторных реакций. Как видно из табл. 32, результаты улучшились по сравнению с использованием одной реакции, в которой максимальная правильность составила 94%. Правильность выше 90% была также достигнута методом ЛДА, в то время как при использовании одной реакции правильность распознавания не превышала 88%. Кроме того, попытались распознать образцы, используя валидацию LOO и усредняя результаты 6 параллельных опытов для каждого образца. Для некоторых комбинаций индикаторных реакций (1+5, 1+2+3) удалось достичь правильности 100%, что выше, чем при использовании единственной индикаторной реакции. Часть результатов LOO валидации оказалась ниже, чем рандомной, что означает заметное влияние производителя образца на правильность распознавания, но при успешном подборе индикаторных реакций это влияние может быть снижено.

Таблица 32. Правильность (%) оценки дозы в образцах куриного мяса с использованием объединенных данных по 2 или 3 индикаторным реакциям (объединенные данные для 3 производителей и 4 доз, использована рандомная валидация или валидация LOO)

Индикаторные реакции	Рандомная			LOO		
	СР	ЛДА	kNN	СР	ЛДА	kNN
1 + 3	100	90	97	92	83	83
1 + 2	99	82	89	83	83	58
2 + 3	97	89	75	75	33	67
1 + 5	94	92	86	92	100	83
3 + 7	93	72	79	67	67	58
2 + 7	90	76	78	75	67	50
4 + 5	88	92	75	50	75	75
2 + 4	89	85	71	50	33	75
2 + 5	89	83	76	50	75	75
1 + 2 + 3	100	97	90	100	83	83
2 + 3 + 7	99	88	85	67	67	58

Аналогично разд. 3.3.8, сравнили способность 8 индикаторных реакций различать пищевые продукты, облученные разными дозами. В табл. 33 представлена правильность распознавания образцов куриного мяса, картофеля и печени индейки с использованием методов ЛДА и софтмакс регрессии (СР). Для куриного мяса только реакция *dop-255* – H_2O_2 показала высокую правильность распознавания ($\geq 90\%$). Для образцов картофеля и печени индейки было найдено по две таких реакции. Кроме того, некоторые другие реакции показали правильность в диапазоне 80–89%, что считали удовлетворительным для многоклассовой классификации. Для образцов картофеля и печени индейки более высокие результаты распознавания продемонстрировал метод ЛДА, а для образцов куриного мяса более подходящим был метод софтмакс регрессии.

Таблица 33. Правильность распознавания (%) нескольких доз в облученных образцах с использованием ЛДА/СР с рандомной валидацией

Индикаторная реакция	Куриное мясо (3 дозы и контроль)		Картофель (2 дозы и контроль)		Печень индейки (2 дозы и контроль)	
	ЛДА	СР	ЛДА	СР	ЛДА	СР
Дор-145 – NaOCl	76	76	93	91	78	87
Дор-249 – NaOCl	56	69	83	79	95	85
Дор-128 – NaOCl*	74	88	83	75	70	60
Дор-255 – NaOCl	69	67	68	64	60	67
Дор-145 – H ₂ O ₂	86	68	83	81	92	82
Дор-249 – H ₂ O ₂	76	89	93	83	62	57
Дор-128 – H ₂ O ₂	57	38	83	83	42	60
Дор-255 – H ₂ O ₂	88	96	61	72	85	85

*Без предварительного окисления.

В реальном эксперименте неизвестные образцы могут быть получены от одного производителя, в то время как образцы, облученные известными дозами, могут быть от другого производителя. Различия в сорте картофеля, производителя мяса, условиях содержания, хранения и в других факторах могут существенно влиять на химический состав образца, и, как следствие, на протекание индикаторных реакций. Соответственно, необходимо оценить способность метода различать дозы при использовании образцов одного производителя в качестве валидационного набора данных (валидация LOGO). Предварительно провели усреднение 6 параллельных измерений для каждого образца, в данном случае LOGO валидация формально соответствовала LOO. Как и ожидали, результаты, представленные в табл. 34 оказались ниже, чем с применением рандомной валидации, тем не менее для каждого типа продукта была найдена реакция, показавшая правильность выше 90%. Образцы куриного мяса и печени индейки были распознаны с помощью реакции *дор-255 – H₂O₂*. Для образцов картофеля наиболее подходящей была реакция *дор-249 – H₂O₂*. В большинстве случаев метод ЛДА превосходил метод софтмакс регрессии, что указывает на его большую пригодность в решении данного типа задачи. Примечательно, что в некоторых случаях правильность распознавания с использованием валидации LOO после усреднения параллельных наблюдений была выше, чем с применением рандомной валидации. Результаты валидации LOO выявили, что предложенный метод может быть применен при распознавании поглощенных доз в облученных продуктах, в том числе полученных от разных производителей.

Таблица 34. Правильность распознавания (%) нескольких доз в облученных образцах с использованием методов ЛДА/СР с использованием валидации LOO. Используются усредненные данные

Индикаторная реакция	Куриное мясо (3 дозы и контроль)		Картофель (2 дозы и контроль)		Печень индейки (2 дозы и контроль)	
	ЛДА	СР	ЛДА	СР	ЛДА	СР
Дор-145 – NaOCl	67	67	81	69	90	50
Дор-249 – NaOCl	50	42	69	56	50	50
Дор-128 – NaOCl*	50	50	56	56	50	50
Дор-255 – NaOCl	25	58	50	38	30	40
Дор-145 – H ₂ O ₂	42	25	81	50	50	60
Дор-249 – H ₂ O ₂	25	58	94	63	60	60
Дор-128 – H ₂ O ₂	25	0	69	69	10	30
Дор-255 – H ₂ O ₂	92	83	38	50	100	80

*без предварительного окисления

На рис. 53а показан график счетов ЛДА, который демонстрирует, что необлученные образцы печени индейки возможно отличить от облученных дозами 100 Гр и 1000 Гр. Также представлен график счетов МГК (рис.53б), показывающий четкое различие между образцами, облученными дозой 1000 Г и необлученными. Таблица нагрузок (рис. 53в) показывает переменные, которые вносят наибольший вклад в формирование факторов ЛДА. Наибольшие значения нагрузок для фактора 1 соответствуют синему каналу, а для фактора 2 – красному. Значения нагрузок увеличиваются со временем, что указывает на важность измерения сигнала во всех временных точках протекания реакции. Рис. 54 демонстрирует различие образцов куриного мяса методом МГК для образцов, облученных дозами 250 Гр и 1000 Гр, и методом ЛДА для образцов, облученных дозами 250 Гр, 1000 Гр и 5 кГр. В обоих случаях образцы можно различить визуально.

Ни одна реакция не оказалась универсально подходящей для оценки доз во всех продуктах питания, однако, тестирования не более восьми реакций было достаточно, чтобы найти хотя бы одну эффективную реакцию.

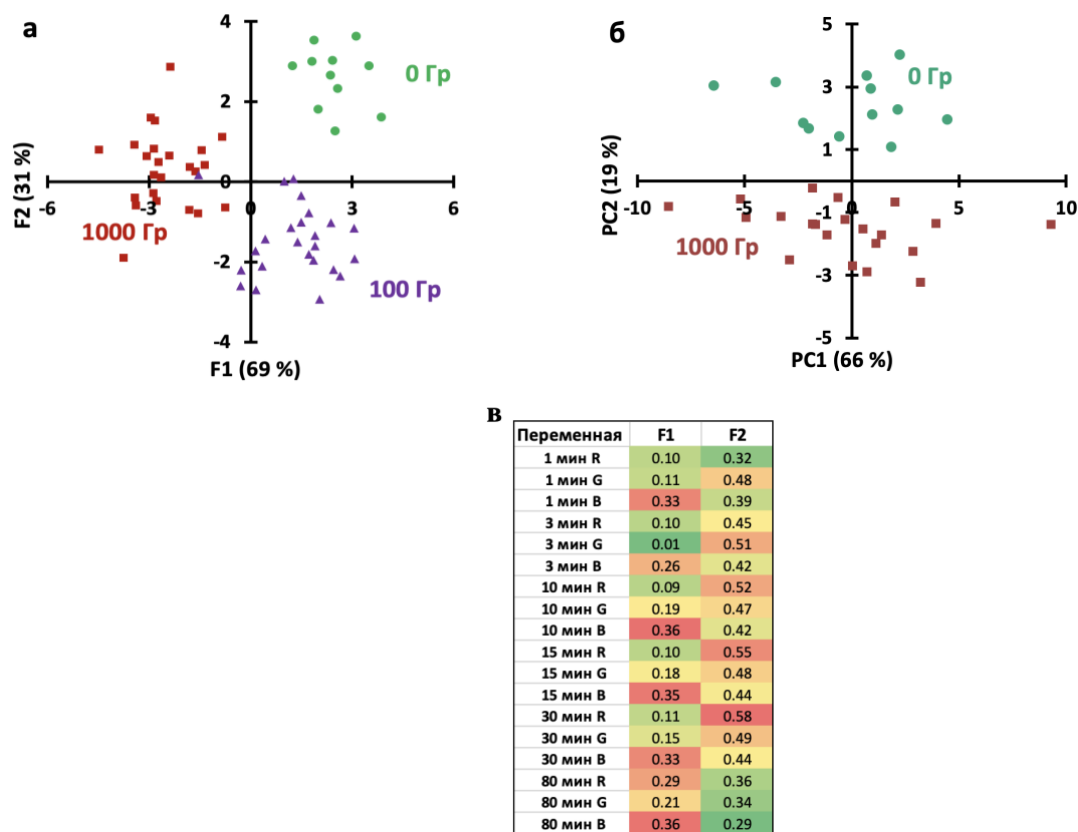


Рис. 53. График счетов ЛДА для реакции *дор-145* – H_2O_2 в присутствии образцов печени индейки, облученных разными дозами (а); (б) график счетов МГК для необлученных образцов печени индейки и облученных дозой 1000 Гр, использована реакция *дор-249* – $NaOCl$; (в) – таблица нагрузок ЛДА для графика (а).

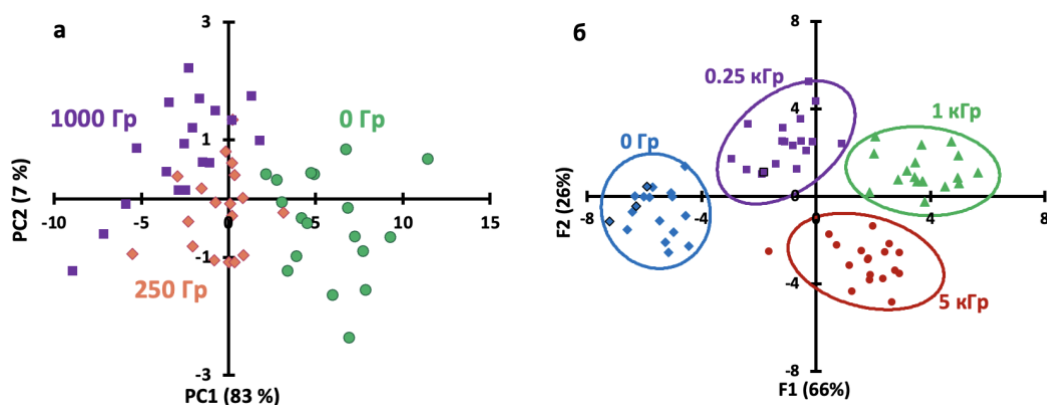


Рис. 54. (а) График счетов МГК для образцов куриного мяса, облученных разными дозами, использована реакция *дор-255* – $NaOCl$; (б) график счетов ЛДА для образцов куриного мяса, облученных разными дозами, введенных в реакцию *дор-249* – H_2O_2 .

Наиболее эффективны для оценки доз реакции окисления карбоцианиновых красителей перекисью или гипохлоритом; это справедливо для любого типа пищевых продуктов, изученных нами с использованием кинетического метода отпечатков пальцев (картофель, говядина, печень индейки и куриное мясо). При этом для каждого нового типа продуктов по-прежнему необходимо проводить выбор индикаторных реакций. Такой выбор осуществим, поскольку подходящая система, как правило, может быть найдена среди 5–10 протестированных реакций. Результаты подтвердили необходимость тестирования различных методов хемометрики, используемых для обработки данных, поскольку лучшие результаты для разных пищевых продуктов дают разные методы.

Глава 6. Сравнение кинетического метода отпечатков пальцев с альтернативными методами¹³

Для оценки эффективности предложенного метода было необходимо сравнить его с существующими. В случае методов распознавания два метода можно корректно сравнивать только в том случае, если оба применяются к одному и тому же образцу. Для сравнения эффективности предложенного подхода, основанного на проведении индикаторных реакций, с альтернативными методами отпечатков пальцев, описанными в литературе, мы провели все эксперименты, используя идентичные образцы. Предложенный метод был представлен лучшими индикаторными реакциями, которые обеспечили высокую правильность распознавания (>90%). Альтернативные методы распознавания образцов включали измерение спектров поглощения в УФ-видимой области и спектров собственной флуоресценции, анализ антиоксидантной способности восстановления железа (FRAP), измерение спектров флуоресценции после добавления флуорофора (флуоресцеин, ковалентно связанный с нанопорошком SiO₂), а также реакции окисления 3,3'.5.5'-тетраметилбензидина (ТМБ): периодатом калия для образцов куриного мяса и гипохлоритом натрия для остальных исследованных образцов.

¹³ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Shik A. V., Stepanova I. A., Doroshenko I. A., Bliznyuk U. A., Podrugina T. A., Chernyaev A. P., Rodin I. A., Beklemishev M. K. Recognition of Samples of Similar Composition Using Kinetic-Based Optical Fingerprinting Strategy: Choice of Indicator Reactions // Talanta. 2026. Vol. 308. Article 129805. (1.62 п.л.; вклад автора 70%; IF = 5.6, Q1).

Результаты распознавания нескольких доз в облученных продуктах, образцов воды и соков разного года производства, представленные в табл. 35 показали, что ни один из пяти альтернативных методов не продемонстрировал высокой правильности для всех изученных образцов. Так, ни один из методов нельзя было использовать для различения образцов куриного мяса (правильность не превысила 72%). Реакция окисления ТМБ гипохлоритом оказалась применимой только для различения образцов печени индейки, а метод FRAP и измерение спектров собственной флуоресценции не смогли различить ни один из образцов. УФ-видимая спектроскопия продемонстрировала хорошую правильность для 3 из 5 типов образцов, однако, измерение спектров поглощения требует применения полноспектрального оборудования.

Таблица 35. Правильность (%) распознавания образцов с помощью предложенного метода и альтернативными методами. Показаны результаты методов ЛДА/СР с рандомной валидацией. Для образцов воды показаны результаты метода ЛДА

Образец	Индикаторная реакция	Альтернативные методы				
		Собственная флуоресценция	Спектры поглощения	Окисление ТМБ**	FRAP	Добавление Flu-SiO ₂
11 вод	100	38	96	78	71	20
Мясо курицы*	88/ 96	54/63	28/22	64/58	72/68	31/54
Печень индейки*	95 /85	83/83	60/42	83/ 92	32/32	-
Картофель*	93 / 91	53/75	95 /81	64/68	38/34	75/ 93
Соки	88/ 90	63/67	98 /70	83/83	65/65	43/52
>90%	5	0	3	1	0	1

*Распознавание 4 доз куриного мяса, 3 доз печени индейки и картофеля

** Для образцов куриного мяса применяли реакцию окисления ТМБ периодатом калия, для остальных образцов – гипохлоритом натрия.

Необходимо было показать важность измерений сигнала в течение времени протекания реакции. Для этого обработали данные, полученные только от одной фотографии, сделанной в середине реакции (табл. 36). Как и ожидалось, данный подход не обеспечил высокой правильности (максимальный результат 86%). Это подтверждает, что одного изображения недостаточно для полного различения образцов. Таким образом, продемонстрировали, что периодическое измерение сигнала является критически важным для надежного распознавания образцов.

Таблица 36. Правильность (%) распознавания образцов с использованием всех данных индикаторной реакции и с использованием одной фотографии методами ЛДА/СР с рандомной валидацией

Образец	Предложенный метод	
	Индикаторная реакция	1 изображение
11 вод	100	75
Куриное мясо*	88/ 96	78/86
Печень индейки*	95 /85	58/53
Картофель*	93 / 91	45/45
Соки	88/ 90	78/77
Правильность >90%	5	0

*Распознавание 4 доз куриного мяса, 3 доз печени индейки и картофеля

Таким образом, сравнение предложенного метода с альтернативными подходами к распознаванию образцов показало, что метод «отпечатков пальцев», основанный на индикаторной реакции, превосходит существующие методы по эффективности распознавания различных типов образцов (воды, соки, облученные продукты). Только предложенный метод обеспечил правильность выше 90% для всех пяти исследованных типов образцов. Кроме того, подтвердили важность использования кинетического подхода: ни один тип образцов не удалось распознать с правильностью выше 90% при использовании только одной фотографии. Предложенный кинетический метод «отпечатков пальцев» является более универсальным и информативным при правильном выборе индикаторной реакции.

Заключение

Работа посвящена развитию кинетического метода отпечатков пальцев для различения образцов близкого состава. Принцип метода основан на выявлении влияния компонентов образца на протекание индикаторной реакции в растворе с регистрацией светопоглощения и интенсивности флуоресценции продуктов. Показана применимость этого подхода для распознавания объектов разной природы. Изучен ряд индикаторных реакций окисления карбоцианиновых красителей разной структуры с различными окислителями; для различения каждого типа образцов выбраны системы, дающие наилучшие результаты. Подтверждено, что кинетические варианты предлагаемых методик эффективнее по сравнению со статическими, фиксирующими сигнал однократно (в единственной временной точке). Измерение сигнала в разных спектральных диапазонах позволяет дополнительно повышать правильность распознавания.

Продемонстрированы достоинства развиваемого метода: простота выполнения, отсутствие необходимости в полносpekтральных приборах, экспрессность, минимальная пробоподготовка или ее отсутствие, малый расход образцов и реактивов, высокая производительность, возможность распознавания объектов разной природы, возможность перевода методик во внелабораторный вариант. Отмечены ограничения метода: необходимость выбора индикаторной реакции для объекта каждого нового типа, невозможность создания постоянной базы данных аналитических сигналов, необходимость получения экстрактов твердых образцов, необходимость анализа образцов сравнения параллельно с неизвестными, необходимость введения целого ряда различных растворов в 96-луночный планшет.

Выводы

1. Показана возможность использования предложенного кинетического подхода для различения и классификации образцов близкого состава различной природы. Использование получаемых во времени сигналов единственной индикаторной реакции позволяет сформировать достаточный для распознавания объем данных вместо массива нескольких сенсорных элементов, сигнал каждого из которых измерялся бы однократно.

2. Среди индикаторных реакций с участием карбоцианиновых красителей в комбинации с различными окислителями наиболее перспективны реакции окисления гептаметиновых карбоцианиновых красителей гипохлоритом натрия или пероксидом водорода. Не найдена универсальная реакция, оптимальная для распознавания всех типов объектов.

3. Возможности предложенного подхода продемонстрированы при распознавании индивидуальных веществ разных классов, модельных белков и сычужных ферментов, классификации яблочных соков разных лет производства, моторных масел как жирорастворимых объектов, оценке поглощенной дозы облученных продуктов питания и мониторинге качества вод.

4. Сопоставление данных исследований, обработанных разными хемометрическими методами «с учителем», показало, что наилучший метод определяется типом объекта и решаемой задачи: для двухклассовой классификации в большинстве случаев наиболее эффективен ПЛС-ДА, а при различении образцов, принадлежащих нескольким классам, наибольшая правильность чаще всего достигается с использованием ЛДА.

5. Показано, что предлагаемый подход к распознаванию объектов имеет преимущества по сравнению с методами распознавания по спектрам собственной флуоресценции и поглощения, основанных на измерении интенсивности эмиссии образцов с добавленным флуорофором, по реакциям определения антиоксидантной активности и окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина.

Список литературы

1. Alaerts G., Dejaegher B., Smeyers-Verbeke J., Vander Heyden Y. Recent Developments in Chromatographic Fingerprints from Herbal Products: Set-Up and Data Analysis // Comb. Chem. High Throughput Screen. 2010. Vol. 13. P. 900-922.
2. Vandeginste B. G. M., Massart D. L., Buydens L. M. C., De Jong S., Lewi P. J., Smeyers-Verbeke J. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics. Part B. Amsterdam: Elsevier. 1998.
3. Daszykowski M., Walczak B., Massart D. L. Projection methods in chemistry // Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. 2003. Vol. 65. P. 97-112.
4. Massart D. L., Kaufman L. The interpretation of analytical chemical data by the use of cluster analysis. New York: Wiley. 1983.
5. Vogt W., Nagel D., Sator H. Cluster Analysis in Clinical Chemistry: A Model. New York: Wiley. 1987.
6. Alaerts G., Dejaegher B., Smeyers-Verbeke J., Vander Heyden Y. Recent Developments in Chromatographic Fingerprints from Herbal Products: Set-Up and Data Analysis // Comb. Chem. High Throughput Screen. 2010. Vol. 13. P. 900-922.
7. Custers D., Courselle P., Apers S., Deconinck E. Chemometrical analysis of fingerprints for the detection of counterfeit and falsified medicines // Rev. Anal. Chem. 2016. Vol. 35. P. 145-168.
8. Fisher R. A. The Use Of Multiple Measurements In Taxonomic Problems // Ann. Eugen. 1936. Vol. 7. P. 179-188.
9. Wu W., Mallet Y., Walczak B., Penninckx W., Massart D. L., Heuerding S., Erni F. Comparison of regularized discriminant analysis linear discriminant analysis and quadratic discriminant analysis applied to NIR data // Anal. Chim. Acta. 1996. Vol. 329. P. 257-265.
10. Biancolillo A., Marini F. Chemometric Methods for Spectroscopy-Based Pharmaceutical Analysis // Front. Chem. 2018. Vol. 6. P. 576.
11. Yang J., Yang J. Why can LDA be performed in PCA transformed space? // Pattern Recognit. 2003. Vol. 36. P. 563-566.
12. Lee L. C., Liong C.-Y., Jemain A. A. Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) for classification of high-dimensional (HD) data: a review of contemporary practice strategies and knowledge gaps // Analyst. 2018. Vol. 143. P. 3526-3539.

13. Barker M., Rayens W. Partial least squares for discrimination // J. Chemom. 2003. Vol. 17. P. 166-173.
14. Gemperline P., ed. Practical Guide to Chemometrics. Boca Raton: CRC Press. 2006.
15. Zhang S. Challenges in KNN Classification // IEEE Trans. Knowl. Data Eng. 2022. Vol. 34. P. 4663-4675.
16. Dupont M. F., Elbourne A., Cozzolino D., Chapman J., Truong V. K., Crawford R. J., Latham K. Chemometrics for environmental monitoring: a review // Anal. Methods. 2020. Vol. 12. P. 4597-4620.
17. Maier H. R., Dandy G. C. Neural networks for the prediction and forecasting of water resources variables: a review of modelling issues and applications // Environ. Model. Softw. 2000. Vol. 15. P. 101-124.
18. Gardner M. W., Dorling S. R. Artificial neural networks (the multilayer perceptron). a review of applications in the atmospheric sciences // Atmos. Environ. 1998. Vol. 32. P. 2627-2636.
19. Deconinck E., Sacré P. Y., Coomans D., De Beer J. Classification trees based on infrared spectroscopic data to discriminate between genuine and counterfeit medicines // J. Pharm. Biomed. Anal. 2012. Vol. 57. P. 68-75.
20. Kotsiantis S. B. Decision trees: a recent overview // Artif. Intell. Rev. 2013. Vol. 39. P. 261-283.
21. Westad F., Marini F. Validation of chemometric models. A tutorial // Anal. Chim. Acta. 2015. Vol. 893. P. 14-24.
22. Yates L. A., Aandahl Z., Richards S. A., Brook B. W. Cross validation for model selection: A review with examples from ecology // Ecol. Monogr. 2023. Vol. 93. Article 1557.
23. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare. European Pharmacopoeia. 8th ed. Strasbourg: Council of Europe. 2015.
24. United States Pharmacopoeia. 38th ed. Rockville, United States Pharmacopeial Convention, 2015.
25. Acevska J., Stefkov G., Cvetkovikj I., Petkovska R., Kulevanova S., Cho J., Dimitrovska A. Fingerprinting of morphine using chromatographic purity profiling and multivariate data analysis // J. Pharm. Biomed. Anal. 2015. Vol. 109. P. 18-27.
26. Custers D., Krakowska B., De Beer J. O., Courselle P., Daszykowski M., Apers S., Deconinck E. Testing of complementarity of PDA and MS detectors using

- chromatographic fingerprinting of genuine and counterfeit samples containing sildenafil citrate // *Anal. Bioanal. Chem.* 2016. Vol. 408. P. 1643-1656.
27. Custers D., Cauwenbergh T., Bothy J. L., Courselle P., De Beer J. O., Apers S., Deconinck E. ATR-FTIR spectroscopy and chemometrics: An interesting tool to discriminate and characterize counterfeit medicines // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015. Vol. 112. P. 181-189.
 28. El Orche A., Adade C. A., Mefetah H., Cheikh A., Karrouchi K., El Karbane M., Bouatia M. Chemometric Analysis of UV-Visible Spectral Fingerprints for the Discrimination and Quantification of Clinical Anthracycline Drug Preparation Used in Oncology // *Biomed Res. Int.* 2021. Vol. 2021.
 29. Storme-Paris I., Rebiere H., Matoga M., Civade C., Bonnet P.-A., Tissier M. H., Chaminade P. Challenging Near InfraRed Spectroscopy discriminating ability for counterfeit pharmaceuticals detection // *Anal. Chim. Acta.* 2010. Vol. 658. P. 163-174.
 30. de Peinder P., Vredenbregt M. J., Visser T., de Kaste D. Detection of Lipitor® counterfeits: A comparison of NIR and Raman spectroscopy in combination with chemometrics // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008. Vol. 47. P. 688-694.
 31. Been F., Roggo Y., Degardin K., Esseiva P., Margot P. Profiling of counterfeit medicines by vibrational spectroscopy // *Forensic Sci. Int.* 2011. Vol. 211. P. 83-100.
 32. Lu F., Weng X., Chai Y., Yang Y., Yu Y., Duan G. A novel identification system for counterfeit drugs based on portable Raman spectroscopy // *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.* 2013. Vol. 127. P. 63-69.
 33. Assi S., Arafat B., Lawson-Wood K., Robertson I. Authentication of Antibiotics Using Portable Near-Infrared Spectroscopy and Multivariate Data Analysis // *Appl. Spectrosc.* 2021. Vol. 75. P. 434-444.
 34. Ntakatsane M., Chen P., Liu J., Mosebi P., Xu L., Matebesi P., Cui W., Wang Y. Multi-dimensional fluorescence spectroscopy coupled with chemometrics in rapid antibiotic detection and discrimination // *J. Food Meas. Charact.* 2020. Vol. 14. P. 1892-1900.
 35. Foschi M., Marziale M., Biancolillo A. Advanced Analytical Approach Based on Combination of FT-IR and Chemometrics for Quality Control of Pharmaceutical Preparations // *Pharmaceuticals.* 2022. Vol. 15. P. 763.
 36. Monakhova Y. B., Diehl B. W. K. Combining ¹H NMR spectroscopy and multivariate regression techniques to quantitatively determine falsification of porcine heparin with bovine species // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015. Vol. 115. P. 543-551.

37. Wei Z., Wang J. Detection of antibiotic residues in bovine milk by a voltammetric electronic tongue system // *Anal. Chim. Acta*. 2011. Vol. 694. P. 46-56.
38. Vaclavik L., Lacina O., Hajslova J., Zweigenbaum J. The use of high-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry coupled to advanced data mining and chemometric tools for discrimination and classification of red wines according to their variety // *Anal. Chim. Acta*. 2011. Vol. 685. P. 45-51.
39. Springer A. E. Wine authentication: a fingerprinting multiclass strategy to classify red varieties through profound chemometric analysis of volatiles // *Eur. Food Res. Technol.* 2019. Vol. 245. P. 179-190.
40. Coetzee P. P., van Jaarsveld F. P., Vanhaecke F. Intraregional classification of wine via ICP-MS elemental fingerprinting // *Food Chem.* 2014. Vol. 164. P. 485-492.
41. Papotti G., Bertelli D., Graziosi R., Silvestri M., Bertacchini L., Durante C., Plessi M. Application of One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy for the Characterization of Protected Designation of Origin Lambrusco Wines of Modena // *J. Agric. Food Chem.* 2013. Vol. 61. P. 1741-1746.
42. Casale M., Oliveri P., Armanino C., Lanteri S., Forina M. NIR and UV-vis spectroscopy, artificial nose and tongue: Comparison of four fingerprinting techniques for the characterisation of Italian red wines // *Anal. Chim. Acta*. 2010. Vol. 668. P. 143-148.
43. Cheah W. L., Fang M. HPLC-Based Chemometric Analysis for Coffee Adulteration // *Foods*. 2020. Vol. 9. Article 880.
44. Núñez N., Pons J., Saurina J., Núñez O. Non-targeted high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection fingerprinting for the classification, authentication, and fraud quantitation of instant coffee and chicory by multivariate chemometric methods // *LWT*. 2021. Vol. 147. Article 111646.
45. Núñez N., Saurina J., Núñez O. Authenticity Assessment and Fraud Quantitation of Coffee Adulterated with Chicory, Barley, and Flours by Untargeted HPLC-UV-FLD Fingerprinting and Chemometrics // *Foods*. 2021. Vol. 10. Article 840.
46. Núñez N., Saurina J., Núñez O. Non-targeted HPLC-FLD fingerprinting for the detection and quantitation of adulterated coffee samples by chemometrics // *Food Control*. 2021. Vol. 124. Article 107912.
47. Oliveira R. C. S., Oliveira L. S., Franca A. S., Augusti R. Evaluation of the potential of SPME-GC-MS and chemometrics to detect adulteration of ground roasted coffee with roasted barley // *J. Food Compos. Anal.* 2009. Vol. 22. P. 257-261.

48. da Silva Taveira J. H., Borém F. M., Figueiredo L. P., Reis N., Franca A. S., Harding S. A., Tsai C.-J. Potential markers of coffee genotypes grown in different Brazilian regions: A metabolomics approach // *Food Res. Int.* 2014. Vol. 61. P. 75-82.
49. Dong W., Hu R., Long Y., Li H., Zhang Y., Zhu K., Chu Z. Comparative evaluation of the volatile profiles and taste properties of roasted coffee beans as affected by drying method and detected by electronic nose, electronic tongue, and HS-SPME-GC-MS // *Food Chem.* 2019. Vol. 272. P. 723-731.
50. Yulia M., Suhandy D. Quantification of Corn Adulteration in Wet and Dry-Processed Peaberry Ground Roasted Coffees by UV-Vis Spectroscopy and Chemometrics // *Molecules.* 2021. Vol. 26. Article 6091.
51. de Carvalho Couto C., Freitas-Silva O., Morais Oliveira E. M., Sousa C., Casal S. Near-Infrared Spectroscopy Applied to the Detection of Multiple Adulterants in Roasted and Ground Arabica Coffee // *Foods.* 2021. Vol. 11. Article 61.
52. Marquetti I., Link J. V., Lemes A. L. G., dos S. Scholz M. B., Valderrama P., Bona E. Partial least square with discriminant analysis and near infrared spectroscopy for evaluation of geographic and genotypic origin of arabica coffee // *Comput. Electron. Agric.* 2016. Vol. 121. P. 313-319.
53. Giménez-Campillo C., Arroyo-Manzanares N., Campillo N., Díaz-García M. C., Viñas P. A volatilomic approach using ion mobility and mass spectrometry combined with multivariate chemometrics for the assessment of lemon juice quality // *Food Control.* 2025. Vol. 169. Article 111027.
54. Brendel R., Schwolow S., Rohn S., Weller P. Volatilomic Profiling of Citrus Juices by Dual-Detection HS-GC-MS-IMS and Machine Learning. An Alternative Authentication Approach // *J. Agric. Food Chem.* 2021. Vol. 69. P. 1727-1738.
55. Vervoort L., Grauwet T., Kebede B. T., Van der Plancken I., Timmermans R., Hendrickx M., Van Loey A. Headspace fingerprinting as an untargeted approach to compare novel and traditional processing technologies: A case-study on orange juice pasteurisation // *Food Chem.* 2012. Vol. 134. P. 2303-2312.
56. Vaclavik L., Schreiber A., Lacina O., Cajka T., Hajslova J. Liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolomics for authenticity assessment of fruit juices // *Metabolomics.* 2012. Vol. 8. P. 793-803.
57. Boggia R., Casolino M. C., Hysenaj V., Oliveri P., Zunin P. A screening method based on UV-Visible spectroscopy and multivariate analysis to assess addition of filler juices and water to pomegranate juices // *Food Chem.* 2013. Vol. 140. P. 735-741.

58. Aykac B., Cavdaroglu C., Ozen B. Authentication of pomegranate juice in binary and ternary mixtures with spectroscopic methods // *J. Food Compos. Anal.* 2023. Vol. 117. Article 105100.
59. Hamidi Z., Jamalzadeh A., Jahani R., Parastar H., Kobarfard F., Yazdanpanah H. Fingerprinting lime juice: When portable spectroscopy meets chemometrics. An innovative technique for fraud identification // *J. Food Compos. Anal.* 2025. Vol. 144. Article 107684.
60. Cozzolino D., Cynkar W., Shah N., Smith P. Varietal Differentiation of Grape Juice Based on the Analysis of Near- and Mid-infrared Spectral Data // *Food Anal. Methods.* 2012. Vol. 5. P. 381-387.
61. Monago-Maraña O., Zapardiel Palenzuela A., Crevillén A. G. Untargeted authentication of fruit juices based on electrochemical fingerprints combined with chemometrics. Adulteration of orange juice as case of study // *LWT.* 2024. Vol. 209. Article 116797.
62. Dávila-Santiago E., Shi C., Mahadwar G., Medeghini B., Insinga L., Hutchinson R., Good S., Jones G. D. Machine Learning Applications for Chemical Fingerprinting and Environmental Source Tracking Using Non-Target Chemical Data // *Environ. Sci. Technol.* 2022. Vol. 56. P. 4080-4090.
63. López-Roldán R., Platikanov S., Martín-Alonso J., Tauler R., González S., Cortina J. L. Integration of Ultraviolet-Visible spectral and physicochemical data in chemometrics analysis for improved discrimination of water sources and blends for application to the complex drinking water distribution network of Barcelona // *J. Clean. Prod.* 2016. Vol. 112. P. 4789-4798.
64. Zhang Y., Liu Y., Zhou A., Zhang L. Identification of groundwater pollution from livestock farming using fluorescence spectroscopy coupled with multivariate statistical methods // *Water Res.* 2021. Vol. 206. Article 117754.
65. Feng C., Zhao N., Yin G., Gan T., Yang R., Chen M., Duan J., Hu Y. A new method for detecting mixed bacteria based on multi-wavelength transmission spectroscopy technology // *Spectrochim. Acta A.* 2022. Vol. 270. Article 120852.
66. Zhu Q., Gu A., Li D., Zhang T., Xiang L., He M. Online recognition of drainage type based on UV-vis spectra and derivative neural network algorithm // *Front. Environ. Sci. Eng.* 2021. Vol. 15. Article 136.
67. Li Q., Liu R., Bi Z. Real-time discrimination of contamination source composed of multiple pollutants in surface water based on deep learning and UV-Vis spectral

- abundance estimation methodology // *Spectrochim. Acta A*. 2024. Vol. 307. Article 123635.
68. Lourenço N. D., Chaves C. L., Novais J. M., Menezes J. C., Pinheiro H. M., Diniz D. UV spectra analysis for water quality monitoring in a fuel park wastewater treatment plant // *Chemosphere*. 2006. Vol. 65. P. 786-791.
 69. Moufid M., Tiebe C., El Bari N., Hamada Fakra D. A., Bartholmai M., Bouchikhi B. Pollution parameters evaluation of wastewater collected at different treatment stages from wastewater treatment plant based on E-nose and E-tongue systems combined with chemometric techniques // *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2022. Vol. 227. Article 104593.
 70. Wang B., Li X., Chen D., Weng X., Chang Z. Development of an electronic nose to characterize water quality parameters and odor concentration of wastewater emitted from different phases in a wastewater treatment plant // *Water Res.* 2023. Vol. 235. Article 119878.
 71. Moreno L., Merlos A., Abramova N., Jiménez C., Bratov A. Multi-sensor array used as an “electronic tongue” for mineral water analysis // *Sens. Actuators B*. 2006. Vol. 116. P. 130-134.
 72. Stefanova R., Vasilev N. V., Spassov S. L. Irradiation of Food, Current Legislation Framework, and Detection of Irradiated Foods // *Food Anal. Methods*. 2010. Vol. 3. P. 225-252.
 73. Horvatovich P., Werner D., Jung S., Miesch M., Delincee H., Hasselmann C., Marchioni E. Determination of 2-Alkylcyclobutanones with Electronic Impact and Chemical Ionization Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) in Irradiated Foods // *J. Agric. Food Chem.* 2006. Vol. 54. P. 1990-1996.
 74. Lee H.-J., Byun M.-W., Kim K.-S. Detection of Radiation-Induced Hydrocarbons and 2-Alkylcyclobutanones in Irradiated Perilla Seeds // *J. Food Prot.* 2000. Vol. 63. P. 1563-1569.
 75. Gadgil P., Hachmeister K. A., Smith J. S., Kropf D. H. 2-Alkylcyclobutanones as Irradiation Dose Indicators in Irradiated Ground Beef Patties // *J. Agric. Food Chem.* 2002. Vol. 50. P. 5746-5750.
 76. Crews C., Driffield M., Thomas C. Analysis of 2-alkylcyclobutanones for detection of food irradiation: Current status, needs and prospects // *J. Food Compos. Anal.* 2012. Vol. 26. P. 1-11.
 77. Campaniello M., Marchesani G., Zianni R., Tarallo M., Mangiacotti M., Chiaravalle A. E. Validation of an alternative method for the identification of 2-dodecylcyclobutanone

- (2-DCB) of irradiated meats by solid-phase microextraction (SPME) gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) // *Int. J. Food Sci. Technol.* 2020. Vol. 55. P. 961-969.
78. Zhang Z., Zhang Y., Liu X., Xiang P., Le W. Comparison of radiation-induced hydrocarbons formed in three irradiated oilseeds // *Radiat. Phys. Chem.* 2024. Vol. 214. Article 111311.
 79. Maija A., Sjöberg K., Tuominen J. P., Kiutamo T., Luukkonen S. M. Evaluation of a gas chromatographic method for detection of irradiation of chicken and a chicken meat product // *J. Sci. Food Agric.* 1992. Vol. 59. P. 65-75.
 80. Furuta M., Dohmaru T., Katayama T., Toratani H., Takeda A. Detection of Irradiated Frozen Deboned Seafood with the Level of Radiolytic H₂ and CO Gases as a Probe // *J. Agric. Food Chem.* 1997. Vol. 45. P. 3928-3931.
 81. Desrosiers M. F., Wilson G. L., Hunter C. R., Hutton D. R. Estimation of the absorbed dose in radiation-processed food. 1. Test of the EPR response function by a linear regression analysis // *Int. J. Rad. Appl. Instrum. A.* 1991. Vol. 42. P. 613-616.
 82. Desrosiers M. F., Le F. G. Estimation of the absorbed dose in radiation-processed food. 3: The effect of time of evaluation of the accuracy of the estimate // *Appl. Radiat. Isot.* 1993. Vol. 44. P. 439-442.
 83. Polat M., Korkmaz M., Dulkan B., Korkmaz Ö. Detection of irradiated chicken and dosimetric properties of drumsticks bones // *Radiat. Phys. Chem.* 1997. Vol. 49. P. 363-369.
 84. El-Gebaly S., El-Faramawy N., Kahil H. Thermoluminescence response of bone hydroxyapatite // *Opt. Mater. (Amst).* 2022. Vol. 134. Article 113089.
 85. Zianni R., Mentana A., Tomaiuolo M., Campaniello M., Iammarino M., Centonze D., Palermo C. Volatolomic approach by HS-SPME/GC-MS and chemometric evaluations for the discrimination of X-ray irradiated mozzarella cheese // *Food Chem.* 2023. Vol. 423. Article 136239.
 86. Mentana A., Palermo C., Tomaiuolo M., Campaniello M., Centonze D., Zianni R. Evaluation of aroma fingerprint in X-ray irradiated Robiola cheese over time by volatolomic and chemometric approaches // *Int. Dairy J.* 2025. Vol. 163. Article 106182.
 87. Palermo C., Mentana A., Tomaiuolo M., Campaniello M., Iammarino M., Centonze D., Zianni R. Headspace Solid-Phase Microextraction/Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Chemometric Approach for the Study of Volatile Profile in X-ray Irradiated Surface-Ripened Cheeses // *Foods.* 2024. Vol. 13. Article 416.

88. Amaliyah S., Aurum F. S., Pratiwi T. A., Damayanti E., Yusmaman W. M., Febrisiantosa A., Putra N. L., Fitrianto N., Pratiwi D., Setiyawan A. I., Karimy M. F., Ndraha N., Ningrum A., Aditya S. HS-SPME-GC-MS-based chemometric analysis reveals dose-dependent changes in volatile compounds of gamma-irradiated halloumi-type cheese // *Int. Dairy J.* 2026. Vol. 179. Article 106665.
89. Zakharenkova S. A., Katkova E. A., Doroshenko I. A., Kriveleva A. S., Lebedeva A. N., Vidinchuk T. A., Shik A. V., Abramchuk S. S., Podrugina T. A., Beklemishev M. K. Aggregation-based fluorescence amplification strategy: “turn-on” sensing of aminoglycosides using near-IR carbocyanine dyes and pre-micellar surfactants // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2021. Vol. 247. Article 119109.
90. Shik A. V., Stepanova I. A., Doroshenko I. A., Podrugina T. A., Beklemishev M. K. Carbocyanine-Based Fluorescent and Colorimetric Sensor Array for the Discrimination of Medicinal Compounds // *Chemosensors.* 2022. Vol. 10. No. 2. Article 88.
91. Narayanan N., Patonay G. A New Method for the Synthesis of Heptamethine Cyanine Dyes: Synthesis of New Near-Infrared Fluorescent Labels // *J. Org. Chem.* 1995. Vol. 60. P. 2391-2395.
92. Doroshenko I. A., Aminulla K. G., Azev V. N., Kulinich T. M., Vasilichin V. A., Shtil A. A., Podrugina T. A. Synthesis of modified conformationally fixed tricarbocyanine dyes for conjugation with therapeutic agents // *Mendeleev Commun.* 2021. Vol. 31. P. 615-617.
93. Shik A. V., Stepanova I. A., Koksharova M. V., Doroshenko I. A., Podrugina T. A., Bliznyuk U. A., Borshchegovskaya P. Yu., Chernyaev A. P., Ananieva I. A., Rodin I. A., Beklemishev M. K. Estimation of irradiation doses in chicken samples using a reaction-based fingerprinting method // *Food Chem.* 2025. Vol. 482. Article 144073.
94. Onoe S., Temma T., Shimizu Y., Ono M., Saji H. Investigation of cyanine dyes for in vivo optical imaging of altered mitochondrial membrane potential in tumors // *Cancer Med.* 2014. Vol. 3. P. 775-786.
95. Ellis D., Bouchard C., Lantagne G. Removal of iron and manganese from groundwater by oxidation and microfiltration // *Desalination.* 2000. Vol. 130. P. 255-264.
96. Pypin A. A., Shik A. V., Stepanova I. A., Doroshenko I. A., Podrugina T. A., Beklemishev M. K. A Reaction-Based Optical Fingerprinting Strategy for the Recognition of Fat-Soluble Samples: Discrimination of Motor Oils // *Sensors.* 2023. Vol. 23. No. 18. Article 7682.

97. 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 // *Microchem. J.* 2017. Vol. 135. P. 48-54.
98. Apichai S., Kummuntakoon P., Pattananandecha T., Julsrigival J., Sawangrat K., Ogata F., Kawasaki N., Grudpan K., Saenjum C. Sustainable Downscaled Catalytic Colorimetric Determination of Manganese in Freshwater Using Smartphone-Based Monitoring Oxidation of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine by Periodate // *Molecules*. 2022. Vol. 27. No. 15. Article 4841.
99. Mu C., Lu H., Bao J., Zhang Q. Visual colorimetric ‘turn-off’ biosensor for ascorbic acid detection based on hypochlorite-3,3',5,5',-Tetramethylbenzidine system // *Spectrochim. Acta A*. 2018. Vol. 201. P. 61-66.
100. Berker K. I., Demirata B., Apak R. Determination of Total Antioxidant Capacity of Lipophilic and Hydrophilic Antioxidants In the Same Solution by Using Ferric-Ferricyanide Assay // *Food Anal. Methods*. 2012. Vol. 5. P. 1150-1158.
101. Ахметов Р. А. Chrometrica: AI-powered colorimetric automation [Электронный ресурс]. 2024. URL: <https://chrometrica.ru>. (дата обращения: 18.05.2026).
102. Скоробогатов Е. В. LDA_STVAL: программа для дискриминантного анализа. [Электронный ресурс]. 2024. URL: <https://drive.google.com/file/d/1MqTXvCpTe9UuiwVLgiDGkFT8vnJl1Bnt/view>. (дата обращения: 18.05.2026).
103. Milovanovic G. A., Trifkovic L. A kinetic method for the determination of the insecticide endosulfan // *J. Serb. Chem. Soc.* 1997. Vol. 62. No. 12. P. 1233-1237.
104. Crouch S. R., Scheeline A., Kirkor E. S. Kinetic Determinations and Some Kinetic Aspects of Analytical Chemistry // *Anal. Chem.* 2000. Vol. 72. P. 53-70.
105. Belyaeva L. Yu., Beklemishev M. K. Determination of glucose by a kinetic method on a thin-layer chromatogram using the oxidation of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine with hydrogen peroxide // *J. Anal. Chem.* 2011. Vol. 66. P. 425-432.
106. Hawkins C. L., Pattison D. I., Davies M. J. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins // *Amino Acids*. 2003. Vol. 25. P. 259-274.
107. ISO 5667-3:2024. Water quality - Sampling - Part 3: Preservation and handling of water samples. Geneva: International Organization for Standardization. 2024
108. Iron in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality [Электронный ресурс]. Geneva: World Health

- Organization. 2003. URL: <https://cdn.who.int/media/docs/default-source/wash-documents/wash-chemicals/iron-bd.pdf> (дата обращения: 18.05.2026).
109. da Silva C. M. F., da Silva E. D., Melchuna A., Arinelli L., Hori E. S., Lucas E. F. Correlation between Methods to Determine Total Oil and Grease in Synthetic Oily Water Using Heavy Oil: Gravimetry vs Fluorimetry // Ind. Eng. Chem. Res. 2022. Vol. 61. P. 18243-18249.
110. Bliznyuk U. A., Avdyukhina V. M., Borshchegovskaya P. Yu., Bolotnik T. A., Ipatova V. S., Rodin I. A., Ikhmalainen Yu. A., Studenikin F. R., Chernyaev A. P., Shinkarev O. V., Yurov D. S. Determination of chemical and microbiological characteristics of meat products treated by radiation // Ind. Lab. Diagn. Mat. 2021. Vol. 87. No. 6. P. 5-13.
111. Bliznyuk U., Avdyukhina V., Borshchegovskaya P., Bolotnik T., Ipatova V., Nikitina Z., Nikitchenko A., Rodin I., Studenikin F., Chernyaev A., Yurov D. Effect of electron and X-ray irradiation on microbiological and chemical parameters of chilled turkey // Sci. Rep. 2022. Vol. 12. No. 1. Article 750.