

УДК 543.422.3

РАСПОЗНАВАНИЕ ОБЪЕКТОВ БЛИЗКОГО СОСТАВА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФТОРХИНОЛОНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕАКЦИИ КАРБОЦИАНИНА Су7-ГИДРАЗИН С 4-ДИМЕТИЛАМИНОБЕНЗАЛЬДЕГИДОМ

© 2024 г. В. С. Орехов^а, Е. В. Скоробогатов^{а, *}, М. К. Беклемишев^а

^аМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет
Ленинские горы, 1, стр. 3, Москва, 119991, Россия

*E-mail: skoregy@gmail.com

Поступила в редакцию 22.05.2024 г.

После доработки 28.06.2024 г.

Принята к публикации 02.07.2024 г.

Работа посвящена развитию флуориметрического варианта метода “отпечатков пальцев”, основанного на проведении индикаторных реакций в присутствии объекта. Наблюдение реакции во времени увеличивает объем получаемой информации по сравнению со статическим вариантом, что позволяет улучшить распознавание объектов, а также проводить количественный анализ. В качестве индикаторной реакции предложено использовать взаимодействие коммерческого карбоцианинового красителя с 4-диметиламинобензальдегидом, приводящее к снижению интенсивности флуоресценции и изменению светопоглощения во времени. Три фторхинолона (моксифлоксацин, левофлоксацин и офлоксацин) селективно изменяют сигнал при концентрациях ≥ 1 мкМ; не мешают другие лекарственные вещества, в том числе другие фторхинолоны. Проведено определение офлоксацина в образцах мочи человека через различное время после приема препарата. Показана возможность использования той же индикаторной реакции для распознавания объектов на примере образцов яблочных соков, вытяжек почв и мяса различной степени свежести. Для обработки данных применяли методы хеометрики, в том числе линейный дискриминантный анализ. Дискриминированы 15 яблочных соков с правильностью 97%, 10 яблочных соков производства 2022 и 2023 гг. (94%), 10 образцов почв (99%), и показана возможность определения свежести мяса на примере пяти образцов.

Ключевые слова: флуоресценция, метод “отпечатков пальцев”, карбоцианины, фторхинолоны, распознавание, ЛДА.

DOI: 10.31857/S0044450224110043, EDN: sxbpld

Каталитические индикаторные реакции для обнаружения неорганических ионов предложены еще в начале XX века [1] и получили развитие в 1930-е гг. [2, 3]. На волне интереса к анализу особо чистых веществ в промышленности в 1960-е гг. Яцимирским написана первая монография по кинетическим методам анализа [4]. Позже появились работы по определению органических соединений, один из первых обзоров на эту тему опубликован в 1970 г. [5]. Кинетические методы стали интенсивно развиваться, в журнале *Analytical Chemistry* каждые два года публиковались обзоры [6], с 1983 по 2007 г. девять раз собирался симпозиум *Kinetics in Analytical Chemistry* [7], защищались докторские

диссертации [8]. Однако ограниченная селективность этих методов, с одной стороны, и развитие хроматографических и спектроскопических методов, с другой, привели к снижению интереса к кинетическим методам в 1990–2000-е гг. Были предприняты попытки соединить кинетические методы с сорбционными [9], а еще раньше — с экстракционными, однако это не переломило ситуации, и интерес к кинетическим методам среди аналитиков снизился. Работы с использованием ферментов, начатые в 1980-х гг. [10], к концу 2010-х гг. также в основном завершились [11].

Ситуация стала меняться с привлечением в аналитическую химию методов машинного

обучения, способных обрабатывать большие массивы данных без отнесения отдельных сигналов (“распознавание образов”). Еще на рубеже XX–XXI вв. получили распространение [12] массивы кросс-селективных колориметрических, а позже и флуоресцентных сенсорных элементов, позволившие детектировать аналиты с использованием хеометрической обработки сигналов [13]. Подобные методы “отпечатков пальцев” получили популярность не только для определения отдельных аналитов, но и для распознавания объектов близкого состава, например выявления подделок, установления производителя и т.п. [14] наряду с методами, основанными на электрохимическом отклике (“электронный нос” [15] и “электронный язык” [16]).

К концу 2010-х гг. специалисты по оптическим сенсорным массивам осознали возможность использования кинетического фактора как дополнительной степени свободы, и стали появляться методики, основанные на проведении относительно медленных индикаторных реакций, информацию о которых собирали в разные моменты времени с последующей хеометрической обработкой данных. В первых работах такого рода использовали катализ наночастицами золота и серебра и фотометрическую регистрацию сигнала [17–20], а затем и другие индикаторные реакции [21, 22], причем эти работы были опубликованы независимо друг от друга. В 2020-х гг. появились работы с флуориметрической регистрацией сигнала [22–28], в том числе в ближней ИК-области [22–27]. “Возвращению в строй” кинетических методов способствовал тот факт, что с привлечением методов обработки многомерных данных перевернулась ситуация с селективностью: последняя стала ненужной и вредной, а неселективность — наоборот, стала полезной для получения откликов на разные компоненты образца. Так недостаток кинетических методов обернулся их достоинством.

Большинство работ, выполненных в области кинетических методов “отпечатков пальцев”, посвящено распознаванию отдельных соединений [17, 19–23, 28, 29], однако начиная с 2020 г. стали появляться публикации, рассматривающие решение практических задач, связанных со сравнением объектов близкого состава. Так, распознавали образцы минеральных вод [18], определяли дозы, полученные облученными продуктами питания [24, 27], распознавали образцы сычужных ферментов [25], моторных масел [26]. Решали и задачи количественного анализа [21, 22, 30].

Итак, за век своего развития кинетические методы прошли путь от обнаружения и определения индивидуальных аналитов до распознавания объектов. Интересна возможность решать задачи обоих типов с помощью одной и той же индикаторной системы, показанная в ряде

первых работ [21, 22]. Возможность использовать одни и те же реакции и как селективные (для определения индивидуальных аналитов), и как кросс-селективные (для распознавания объектов) свидетельствует об определенной универсальности развиваемого подхода.

В предварительных опытах мы обнаружили, что реакция 4-диметиламинобензальдегида с коммерчески доступным гептаметиновым карбоцианиновым красителем, содержащим гидразинную группу, дает селективный отклик на присутствие некоторых фторхинолонов.

Цель данной работы — использование этой реакции как для определения фторхинолонов, так и для распознавания объектов близкого состава, не имеющих в своем составе фторхинолонов (на примере яблочных соков, почвенных вытяжек и мясных экстрактов).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и оборудование. Краситель I (Су-7 гидразид), Cas No. 2183440-61-9, мол. масса 635.7, приобретенный в ООО “Люмипроб Рус” (Россия), растворяли в 95%-ном этаноле (ООО “Брынцалов-А”, Россия) и получали раствор с концентрацией 1 г/л. В день проведения эксперимента готовили коллоидный раствор красителя I путем разбавления исходного раствора водой в 10 раз (0.1 г/л). Другие вещества имели квалификацию х. ч. и ч. д. а. или поступали от Sigma-Aldrich (Германия). Растворы бензальдегидов (4-диметиламинобензальдегид (ДМАБ), 3,5-динитробензальдегид, 4-нитробензальдегид) готовили в этаноле с конечной концентрацией 0.05 М. Растворы модельных аналитов (5 мМ) готовили в воде, дополнительно очищенной на установке Millipore. В работе использовали следующие буферные растворы: соляная кислота (1, 0.1 М), ацетатный (0.1 М), глицинатный (pH 9.4, 10.2), фосфатный (pH 7.4). Мешающие компоненты — KCl, NaNO₃, CaCl₂, MgCl₂, мочевины, креатинин, глюкоза, бычий сывороточный альбумин (БСА) — вводили в систему в концентрациях 0.5–2 мМ. Образцы мочи после приема перорально 200 мг офлоксацина получали от добровольца.

Десять образцов яблочных соков производства 2022 г. и 5 соков 2023 г. приобретали в местной торговой сети. Отбирали по 20 мл соков из исходной упаковки, переносили в полимерные флаконы и замораживали. Из навесок (200 мг) образцов почв (предоставлены доц. Т.А. Поленовой, МГУ) получали водные вытяжки с помощью фосфатно-солевого буферного раствора (5 мл) в течение суток, центрифугировали и хранили при 4°C. Образец свинины приобретали в местном магазине и делили на равные части (3 г), которые хранили при –18°C. Перед использованием образцы размораживали и выдерживали

определенное время при комнатной температуре, затем экстрагировали водой (5 мл) и анализировали экстракт.

Опыты проводили в 96-луночных флуориметрических планшетах (Thermo Scientific Nunc F96 MicroWell, белые, кат. № 136101, США). Флуоресценцию в ближнем ИК-диапазоне в планшетах регистрировали с помощью установки, содержащей светодиодный источник (11 красных светодиодов мощностью 3 Вт с максимумом излучения 660 нм, Minifermer, Москва, Россия) и цифровую фотокамеру (в фотоаппарате Nikon D80 стандартный светофильтр, расположенный перед матрицей, заменили на светофильтр с пропусканием выше 700 нм) [31]. Отражение/поглощение лунок планшета регистрировали с помощью визуализатора Visualizer 2 (Camag, Швейцария).

Методика эксперимента. Для проведения индикаторной реакции красителя I с бензальдегидом в лунке планшета смешивали: 120 мкл воды, 60 мкл модельного аналита, 30 мкл 0.1 г/л красителя I, 60 мкл 1 М HCl для создания кислой среды, 30 мкл 0.05 М ДМАБ (общий объем 300 мкл; конкретные условия указаны в подписях к рисункам; вещества добавляли в лунку в том порядке, в котором они перечислены). Как правило, варьировали только количество добавленных модельных аналитов или других компонентов и объем воды. За начало реакции принимали момент добавления в систему бензальдегида.

За протеканием реакции следили по изменению флуоресценции в ближней ИК-области (с помощью ИК-визуализатора, выдержка 1/60 с) и светопоглощению в видимой области (с помощью визуализатора Camag). Серии изображений планшета регистрировали, как правило, в течение 135 мин, периодически фотографируя реакционные смеси: при времени протекания реакции от 0 до 45 мин – с интервалом 5 мин, от 45 до 135 мин – с интервалом 45 мин (в первой части интервалы короче, так как этот участок более информативен). Фотографии оцифровывали в программе ImageJ, получая усредненные значения интенсивностей по лунке планшета. В случае флуоресценции рассчитывали общую интенсивность каналов R, G и B, а для светопоглощения раскладывали изображение на отдельные каналы, получая свое значение для каждого. Для распознавания объектов проводили по шесть параллельных опытов (кроме образцов мяса – 4 опыта) в одном планшете. Полученные значения интенсивностей каналов поглощения и флуоресценции обрабатывали методом линейного дискриминантного анализа (ЛДА) помощью программного обеспечения XLSTAT (версия 2016.02.28451).

Математическое обеспечение. Нами прописан алгоритм оценки правильности распознавания образцов моделью, построенной по методу

линейного дискриминантного анализа в программе Visual Studio на языке программирования Python с выбором переменных на основе теста MANOVA [32], который позволяет получать значение правильности распознавания образцов и доверительный интервал полученного значения.

Цикл работы алгоритма включал: 1) разделение наблюдений на тренировочный (70%) и валидационный (30%) наборы; 2) определение значимости переменных тренировочного набора по результатам теста MANOVA; 3) разделение тренировочного набора на основной (70% тренировочного набора) и тестовый (30% тренировочного набора); 4) определение необходимого для распознавания числа переменных по результатам предсказания тестового набора на основном при разном числе выбранных переменных; 5) предсказание валидационного набора на тренировочном и получение значения правильности распознавания.

Для выбора переменных и определения их числа (2-я стадия) алгоритм сначала определяет переменную с наибольшей межгрупповой дисперсией и наименьшей внутригрупповой, далее находит вторую переменную, которая совместно с первой увеличивает межгрупповую дисперсию. Последующие переменные аналогичным образом добавляются в набор, по результату теста получается последовательность добавления переменных в набор по их значимости в увеличении дисперсии. Далее определяется необходимое для построения модели ЛДА число переменных (стадии 3 и 4). Для этого необходимо провести предсказание тестового набора на основном при разном числе переменных. По результатам этого этапа получают значения правильности оценки тестового набора для каждого числа использованных переменных, что позволяет выбрать наилучшее число переменных (с наибольшим значением правильности распознавания).

Разработанный алгоритм дает возможность оценивать правильность распознавания образцов моделью ЛДА в автоматическом режиме, получая по результатам n итераций значение правильности распознавания с доверительным интервалом, чего не позволяют коммерческие пакеты, например XLSTAT. Предложенный алгоритм использовали для оценки правильности распознавания соков и почвенных вытяжек с числом валидаций $n = 200$ и доверительной вероятностью $P = 0.95$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор индикаторной реакции. Благодаря гидразинной группе (схема 1) краситель I способен образовывать основание Шиффа в реакции с бензальдегидами, что должно приводить

к получению новой сопряженной структуры, перераспределению электронной плотности и изменению спектральных характеристик красителя. Протестировали три бензальдегида: 4-диметиламинобензальдегид, 3,5-динитробензальдегид и 4-нитробензальдегид.

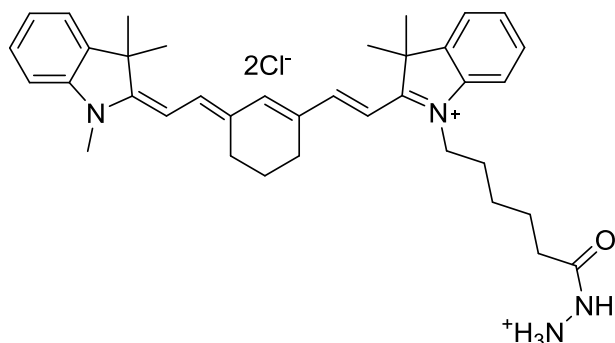


Схема 1. Структура красителя I.

Реакция красителя I с 3,5-динитробензальдегидом или 4-нитробензальдегидом не привела к существенному изменению интенсивности флуоресценции/светопоглощения во времени. В то же время взаимодействие I с ДМАБ в присутствии соляной кислоты или ацетатного буферного раствора показало уменьшение интенсивности флуоресценции, а в среде соляной кислоты — также заметное изменение светопоглощения.

Спектры поглощения и флуоресценции системы краситель I–ДМАБ приведены на рис. 1. Краситель флуоресцирует в ближней

ИК-области спектра (775 нм), однако в водном растворе интенсивность этой полосы снижается, и в реакционной смеси эмиссия на спектрофлуориметре в этой области почти не проявляется (рис. 1а), поэтому флуоресценцию реакционной смеси регистрировали более чувствительным фотографическим методом с помощью ИК-визуализатора (рис. 2). Полоса эмиссии красителя при 530 нм, наблюдаемая в водном растворе (рис. 1а), аналитического значения не имеет. Спектры поглощения системы краситель I–ДМАБ (рис. 1б) показывают уменьшение сигнала со временем. Во всех последующих экспериментах светопоглощение регистрировали также фотографическим методом с помощью визуализатора.

Скрининг по модельным анализам. Индикаторную реакцию проводили в присутствии 25 модельных лекарственных веществ разной природы. Большинство анализатов не влияет на скорость реакции, тогда как в присутствии левофлоксацина флуоресценция падает со временем (рис. 2). Некоторые соединения понижают сигнал уже в начальный момент (цефтазидим, ниацин, анальгин, амикацин), что может объясняться быстрым взаимодействием красителя и лекарственного вещества при смешении растворов, однако описанный эффект не зависит от времени и, соответственно, не мешает определению фторхинолонов. Сигнал левофлоксацина в первые 5 мин неотличим от контрольного, однако затем реакция ускоряется (рис. 3). Аналогичным образом на протекание индикаторной

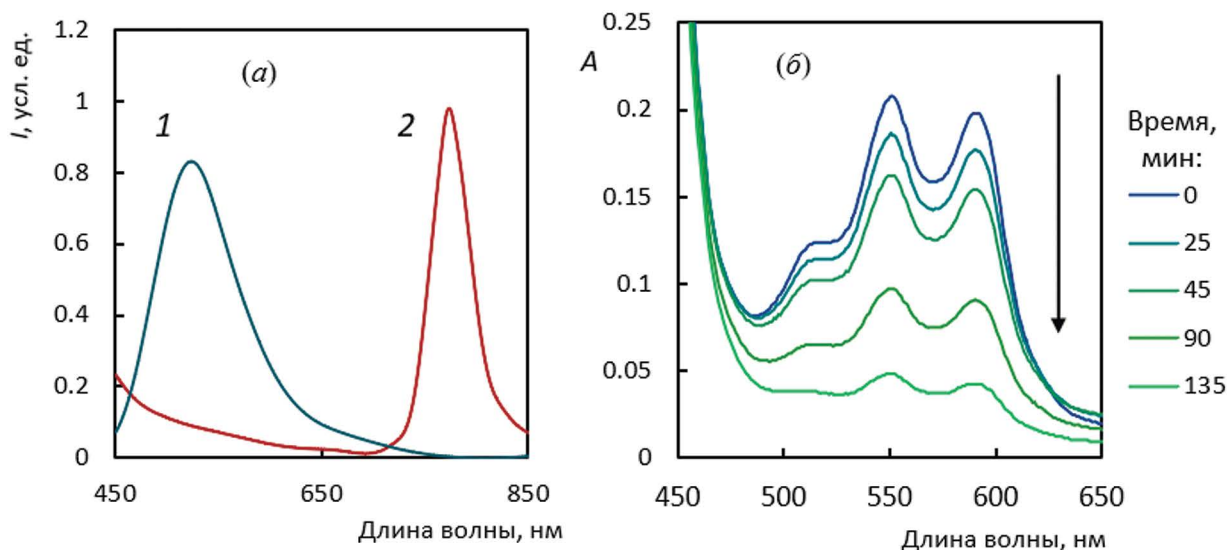


Рис. 1. (а) Спектры флуоресценции: 1 — реакционной смеси непосредственно после смешения реагентов; 2 — красителя I (5 мг/л в этаноле), длина волны возбуждения 435 нм. (б) Спектры поглощения реакционной смеси через различные промежутки времени после начала индикаторной реакции. Условия: 1 мМ оксифлоксацин, 5 мг/л краситель I, 0.1 М HCl, 5 мМ ДМАБ.

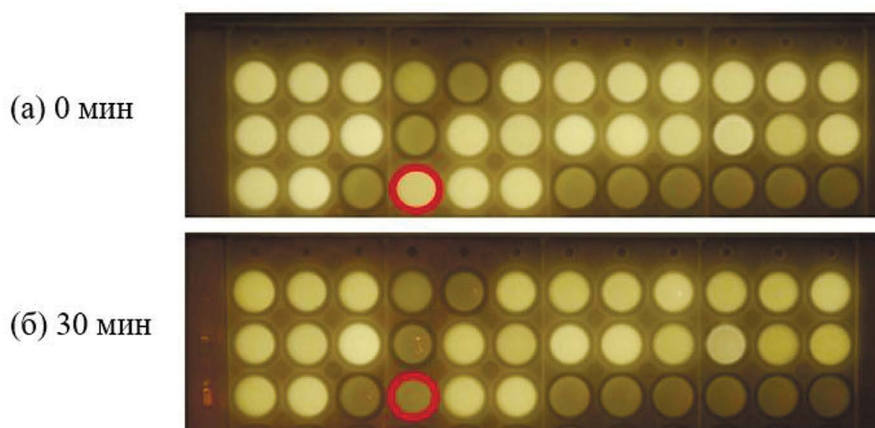


Рис. 2. Фотографии флуоресцирующего планшета с 25 модельными анализитами в ближней ИК-области через 0 (а) и 30 мин (б) от начала протекания индикаторной реакции (в выделенной лунке присутствует левофлоксацин). Условия: 1 мМ модельный анализит, 10 мг/л краситель I, 0.01 М HCl, 5 мМ ДМАБ.

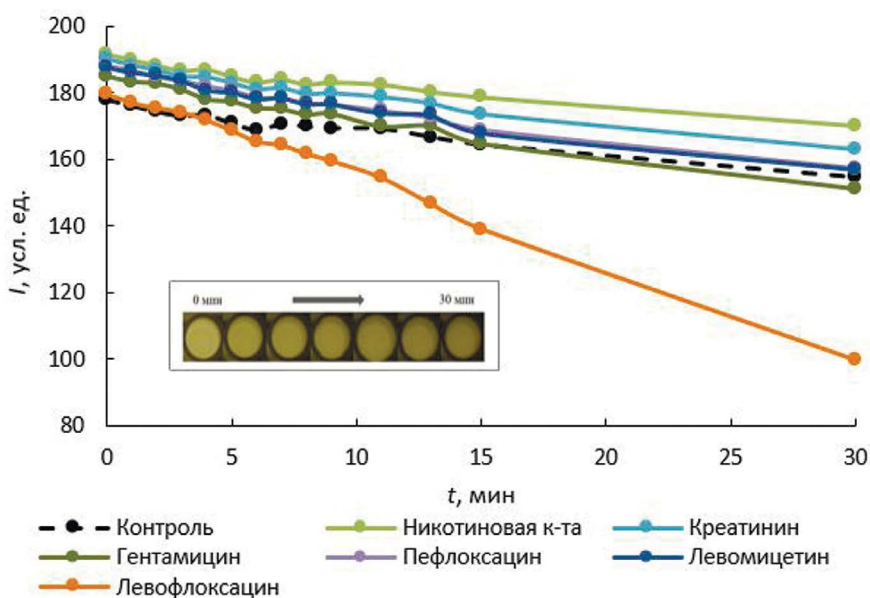


Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции красителя I в ближнем ИК-диапазоне (возбуждение при 660 нм) от времени в присутствии модельных анализитов, перечисленных в легенде (контроль — вода). На вставке приведено изображение лунки планшета, содержащей левофлоксацин, для различного времени от начала реакции. Условия: 1 мМ модельный анализит, 10 мг/л краситель I, 0.01 М HCl, 5 мМ ДМАБ.

реакции влияют еще два фторхинолона: моксифлоксацин и офлоксацин. Такая избирательность системы краситель I—ДМАБ—HCl стала основой для разработки методики определения левофлоксацина, офлоксацина и моксифлоксацина.

Определение фторхинолонов. Варьирование концентрации HCl в интервале 0.01–0.2 М показало, что, начиная с концентрации HCl 0.05 М и выше, присутствие фторхинолонов (левофлоксацина, офлоксацина и моксифлоксацина) изменяет не только флуоресценцию, но и светопоглощение реакционной смеси

с наибольшим откликом при 0.2 М HCl. Изменение интенсивности каналов R, G, B во времени приведено на рис. 4 для моксифлоксацина; можно видеть, что с увеличением концентрации антибиотика тушение флуоресценции ускоряется (рис. 4а), изменяются также интенсивности каналов светопоглощения (рис. 4б–г). В дальнейшем для построения градуировочных зависимостей использовали не только флуоресценцию, но и светопоглощение (интенсивность канала B). В качестве аналитического сигнала использовали эффективную оптическую плотность — отрицательный

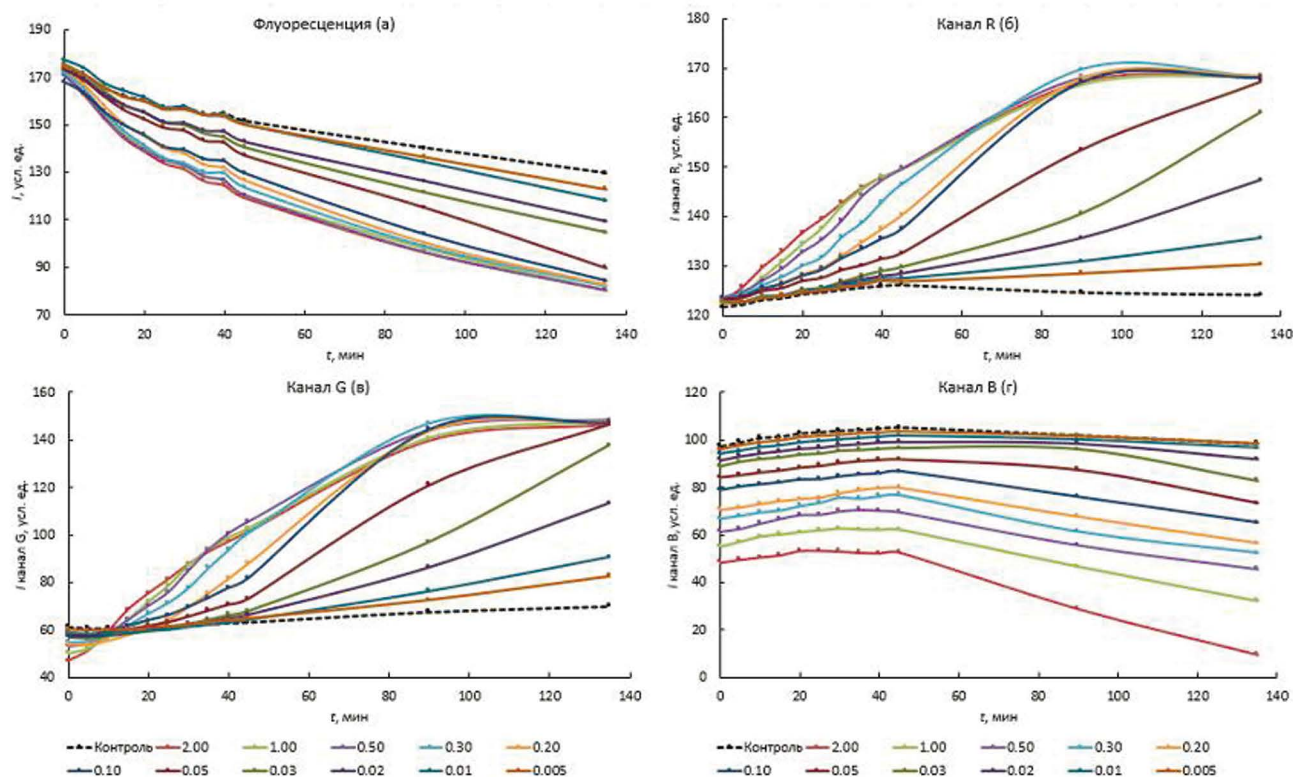


Рис. 4. Зависимости интенсивности флуоресценции красителя I (а) и его светопоглощения на каналах R, G, B (б)–(г) от времени для разных количеств моксифлоксацина (мМ). Условия: 10 мг/л краситель I , 0.2 М HCl, 5 мМ ДМАБ.

десятичный логарифм отношения интенсивности для лунки с аналитом I к лунке с контролем I_0 (1):

$$A_{эфф} = -\lg \frac{I}{I_0}. \quad (1)$$

Как видно из рис. 4, разные каналы чувствительны к фторхинолону в различных концентрационных диапазонах. В соответствии с этим градуировочные зависимости строили для светопоглощения и флуоресценции в разных диапазонах, перекрывающих область концентраций от 5×10^{-6} до 2×10^{-3} М (табл. 1).

Аналогично градуировочные зависимости построили для левофлоксацина и офлоксацина, а общие диапазоны определяемых содержаний для всех трех фторхинолонов, составленные из линейных диапазонов по отдельным каналам, приведены в табл. 2. Также показана возможность определения моксифлоксацина и левофлоксацина на фоне других фторхинолонов, не дающих сигнала в исследуемой индикаторной реакции (на примере пефлоксацина) в том же концентрационном диапазоне (табл. 2). В случае присутствия двух или более соединений из этой группы (левофлоксацина, офлоксацина и моксифлоксацина) возможно только их суммарное определение.

Мешающее влияние других веществ изучали на примере определения левофлоксацина. В качестве мешающих компонентов изучали основные компоненты мочи и ряд модельных аналитов, в том числе другие фторхинолоны. Мешающие компоненты вводили в систему и регистрировали их влияние на интенсивность флуоресценции и светопоглощения. При введении мешающих компонентов наблюдали относительный сдвиг интенсивностей от контрольного опыта во всем интервале времени без изменения скорости протекания реакции, вследствие чего усредняли влияние по времени. Для этого рассчитывали относительное среднее отклонение отношения интенсивностей каналов и контрольного опыта I/I_k , где I – интенсивность канала лунки планшета с левофлоксацином и мешающим компонентом, I_k – интенсивность канала лунки планшета с левофлоксацином контрольного опыта (без мешающего компонента). Наибольшее влияние на сигнал флуоресценции оказывают БСА, мочевины, CaCl_2 и ципрофлоксацин (рис. 5). В то же время влияние этих компонентов на каналы светопоглощения незначительно; использование для построения градуировочных зависимостей канала R позволяет снизить влияние всех компонентов до 2–4%, для каналов G и B влияние составляет 2–8%.

Таблица 1. Характеристики градуировочных зависимостей для определения моксифлоксацина (x – концентрация, М; y – эффективная оптическая плотность (формула 1) при времени, указанном в таблице)

Канал	Уравнение градуировочной зависимости	Линейный диапазон, М	Время протекания реакции, мин	Коэффициент детерминации, R^2
Флуоресценция	$y = 79x + 0.06$	$1 \times 10^{-4} - 5 \times 10^{-4}$	45	0.97
	$y = 2.8 \times 10^3 x + 0.01$	$5 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-5}$	135	0.98
Светопоглощение (В)	$y = 2.0 \times 10^3 x + 0.14$	$1 \times 10^{-4} - 2 \times 10^{-3}$	90	0.98
	$y = 1.2 \times 10^3 x + 0.002$	$5 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-4}$	25	0.997

Определение офлоксацина в моче. Для изучения влияния офлоксацина на протекание индикаторной реакции в присутствии мочи использовали четыре пробы мочи добровольца: первая – до приема офлоксацина и три пробы – через 7, 9 и 24 ч после перорального приема 200 мг офлоксацина соответственно. Как и в предыдущем разделе, построили градуировочные зависимости содержания офлоксацина от интенсивности флуоресценции и светопоглощения в матрице мочи до приема антибиотика. Несмотря на введение в систему мочи, характер индикаторной реакции и ее отклик на офлоксацин не изменились, диапазон определяемых концентраций составил $1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3}$ М. Для определения содержания офлоксацина в моче после приема 200 мг антибиотика использовали

Таблица 2. Концентрационные диапазоны определения фторхинолонов (содержат несколько линейных участков, см. табл. 1)

Аналит	Диапазон определяемых концентраций, М
Моксифлоксацин	$5 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-3}$
Моксифлоксацин + 1 мМ пефлоксацина	$5 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-3}$
Лев офлоксацин	$1 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-3}$
Лев офлоксацин + 0.33 мМ пефлоксацина	$1 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-3}$
Офлоксацин	$1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3}$

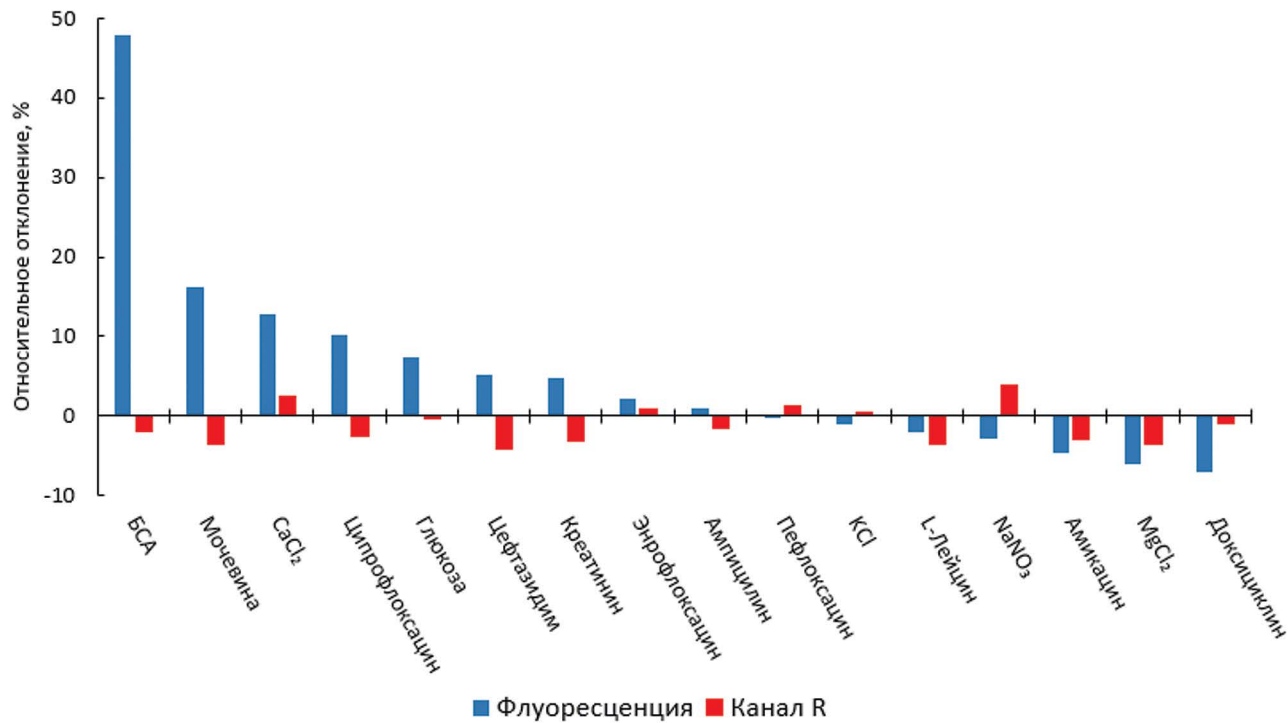


Рис. 5. Относительное отклонение интенсивностей флуоресценции и светопоглощения (канал R) при введении мешающих компонентов в систему краситель I–ДМАБ–0.2 М HCl–левофлоксацин.

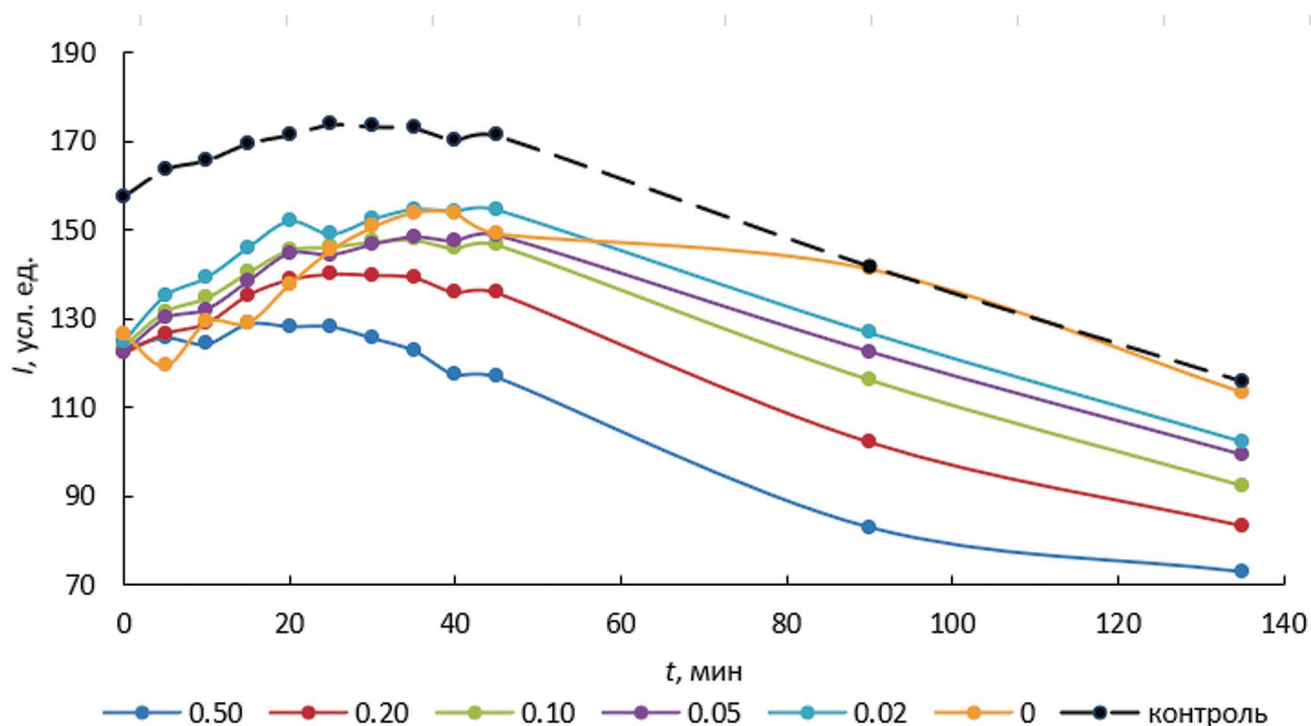


Рис. 6. Зависимости интенсивности флуоресценции красителя I от времени при добавлении указанных концентраций офлоксацина в присутствии мочи, полученной через 9 ч после приема 200 мг офлоксацина (контроль — моча до приема офлоксацина). Условия: 60 мкл мочи, 10 мг/л краситель I, 0.2 М HCl, 5 мМ ДМАБ.

метод добавок. На примере образца, взятого через 9 ч после приема, показано, что добавка офлоксацина ускоряет тушение флуоресценции, что хорошо заметно при времени 90–135 мин от начала реакции (рис. 6).

Для определения офлоксацина методом добавок использовали сигналы при 90 или 135 мин, строя зависимость эффективной оптической плотности от концентрации добавки. По пересечению линии тренда с осью абсцисс находили содержание офлоксацина в лунке. По результатам измерения светопоглощения проводили аналогичные расчеты и получали содержания аналита, после чего эти значения вместе со значением, полученным по результатам флуоресценции, усредняли. Итоговое содержание офлоксацина в образце через 9 ч после приема антибиотика — 0.21 ± 0.07 мг/л ($n = 4$, $P = 0.95$). Для проверки правильности результата регистрировали собственную флуоресценцию офлоксацина при возбуждении длинами волн 254 и 366 нм, проводя аналогичные расчеты по методу добавок. Результат определения по собственной флуоресценции офлоксацина для образца через 9 ч после приема антибиотика составил 0.21 ± 0.08 мг/л, что сходится с содержанием, полученным по предлагаемой методике. Аналогичные расчеты проводили для всех проб мочи (через 7, 9 и 24 ч после приема), результаты приведены в табл. 3.

Во всех случаях можно говорить о правильном определении офлоксацина предлагаемым способом.

Распознавание объектов близкого состава. Целью работы было изучение возможности применения одной и той же индикаторной реакции как для селективного определения отдельных веществ, так и для решения задач, требующих кросс-селективности (распознавание образцов яблочных соков, почв и мяса). Использовали индикаторную реакцию, с помощью которой определяли концентрацию офлоксацина в моче (краситель I—ДМАБ—0.2 М HCl). Для каждого объекта получали кинетические кривые

Таблица 3. Результаты (мг/л) определения офлоксацина в пробах мочи после приема 200 мг препарата (индикаторная реакция: $n = 4$, $P = 0.95$; собственная флуоресценция: $n = 2$, $P = 0.95$)

Время отбора образца, ч	По предлагаемой методике	По собственной флуоресценции
7	0.22 ± 0.03	0.25 ± 0.06
9	0.21 ± 0.07	0.21 ± 0.08
24	0.11 ± 0.04	0.12 ± 0.02

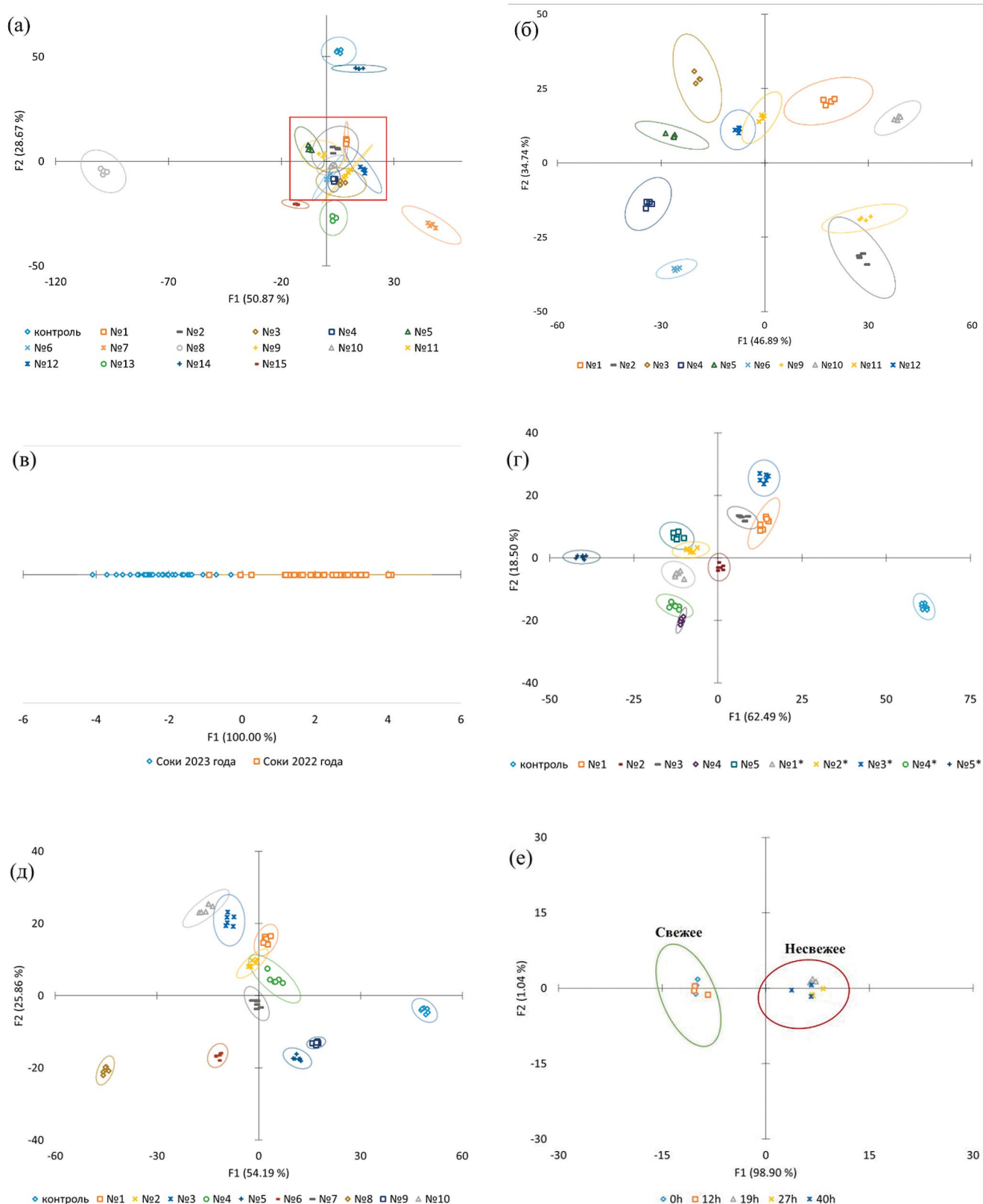


Рис. 7. Графики счетов линейного дискриминантного анализа: (а) 15 образцов яблочных соков производства 2022 г.; (б) 10 образцов яблочных соков производства 2022 г. из группы, выделенной квадратом на рис. 7а; (в), (г) 10 образцов яблочных соков производства 2022 и 2023 гг. (по 5 образцов); (д) 10 почвенных вытяжек; (е) 5 вытяжек из мяса различной степени свежести (указано время хранения образца при комнатной температуре). Условия: (а)–(г) 120 мкл сока; (д) 120 мкл вытяжки почвы; (е) 100 мкл водной вытяжки мяса; везде: 10 мг/л краситель I, 0.2 М HCl, 5 мМ ДМАБ.

флуоресценции и светопоглощения, аналогичные приведенным на рис. 4, однако близкий состав объектов не позволял делать выводы об их сходстве или различии при визуальном анализе кинетических кривых, поэтому полученные данные обрабатывали методом линейного дискриминантного анализа.

Для распознавания яблочных соков использовали 15 образцов производства 2022 г. и 5 образцов 2023 г. В первой серии опытов проводили дискриминацию 15 индивидуальных образцов 2022 г. (рис. 7а). Образцы № 7, 8, 13, 14, 15 и контрольный образец в наибольшей степени влияют на сигнал, что говорит о возможности отличить их от остальных образцов (№ 1–6 и 9–12), точки которых выделены прямоугольником. Для повышения дискриминирующей способности системы данные для этих образцов обрабатывали отдельно (рис. 7б), что позволило разделить 15 образцов сока на 13 индивидуальных групп, 5 групп на первом графике и 8 групп на втором.

Во второй серии опытов распознавали 5 образцов соков 2022 г. и 5 образцов 2023 г. Визуальное представление дискриминации образцов на две группы (рис. 7в) показывает явное различие двух групп соков разного времени производства (независимо от бренда), хотя правильность распознавания по результатам валидации (табл. 4) составляет только 80%. В то же время распознавание 10 индивидуальных брендов для этой же серии опытов возможно с правильностью 94% (рис. 7в, г). Такое различие значений правильности можно связать с особенностями работы алгоритма ЛДА: в случае двух групп число новых независимых переменных составляет $n - 1 = 1$ (n – число групп), в результате дискриминация происходит по одной координате, тогда как для дискриминации на 10 индивидуальных групп алгоритм использует 9 координат, что значительно увеличивает дискриминирующую способность системы.

Для водных вытяжек почв проведен эксперимент по индивидуальному распознаванию. На графике счетов ЛДА (рис. 7д) в координатах F1–F2 представлено разделение образцов почв и контрольного образца на 6 индивидуальных групп и две группы (из двух и трех образцов). Правильность распознавания составляет 99%, столь высокое значение объясняется дискриминацией образцов в других координатах (F3–F9).

Последним объектом исследования стали образцы водных вытяжек мяса (свинины). Получено 15 водных вытяжек образцов, хранившихся в течение 0, 12, 19, 27, 40 ч при комнатной температуре в трех параллельных опытах. Обнаружено, что образцы мяса при времени хранения 19, 27 и 40 ч вызывают значительное разгорание флуоресценции; светопоглощение в этом случае не представляет интереса, так как на этот сигнал существенно влияет матрица вытяжки. Обработка данных флуоресценции показала возможность распознавания степени свежести мяса (рис. 7е). Для подтверждения результатов распознавания регистрировали также органолептические параметры образцов: образец через 12 ч имел легкий запах без видимых признаков порчи, образцы при 19, 27 и 40 ч хранения имели неприятный запах и темный цвет.

Кинетический метод “отпечатков пальцев” предполагает получение большего объема данных, чем статические методы, что в случае распознавания можно использовать для повышения дискриминирующей способности системы, а в случае определения – для повышения его селективности. Для применения в кинетическом методе предложена новая индикаторная реакция (взаимодействие карбоцианинового красителя и 4-диметиламинобензальдегида), пригодная как для определения отдельных соединений, так и для распознавания объектов близкой природы. Показана возможность определения трех фторхинолонов, в том числе в биологических матрицах, без пробоподготовки, селективно по отношению к другим лекарственным веществам, в том числе другим фторхинолонам; диапазон определяемых концентраций отвечает потребности анализа реальных объектов. Несмотря на высокую селективность индикаторной реакции к фторхинолонам, система может быть использована для распознавания объектов, что можно объяснить различными механизмами влияния компонентов образца на протекание реакции. Представленные результаты свидетельствуют о высоком потенциале кинетического метода “отпечатков пальцев”.

Таблица 4. Результаты оценки правильности распознавания образцов яблочных соков и почвенных вытяжек

Яблочные соки			Почвы
индивидуальные образцы 2022 г. (15 шт.)	индивидуальные образцы 2022 г. (5 шт.) и 2023 г. (5 шт.)	группы образцов 2022 г. (5 шт.) и 2023 г. (5 шт.)	индивидуальные образцы (10 шт.)
97.0 ± 0.6%	94.6 ± 0.6%	80.3 ± 1.2%	99.1 ± 0.3%

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование проводилось при поддержке Российского научного фонда (проект № 20-13-00330-П).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Имеется одобрение Комиссии по биоэтике МГУ (заявка №31-ч, протокол заседания Комиссии №161-д-з от 18.04.2024). Участник исследования дал добровольное письменное информированное согласие после получения разъяснений о характере предстоящего исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Curtman L.J., Rothberg P. Application of the "glow reaction" to the qualitative detection of the platinum metals // J. Am. Chem. Soc. 1911. V. 33. P. 718. <https://doi.org/10.1021/ja02218a010>
2. Feigl F., Fränkel E. Beiträge zur analytischen verwertung von katalysen-reaktionen // Ber. Dtsch. Chem. Ges. 1932. V. 65. P. 539. <https://doi.org/10.1002/cber.19320650407>
3. Szébellédy L., Bárfay M. Mangannaehweis mittels katalyse // Z. Anal. Chem. 1936. V. 106. P. 408. <https://doi.org/10.1007/BF01376681>
4. Яцимирский К.Б. Кинетические методы анализа. М.: Химия. 1967. 200 с.
5. Дружинин А.А. Кинетические методы анализа органических соединений // Журн. Всес. хим. о-ва им. Менделеева. 1970. Т. 15. С. 529.
6. Crouch S.R., Scheeline A., Kirkor E.S. Kinetic determinations and some kinetic aspects of analytical chemistry // Anal. Chem. 2000. V. 72. P. 53. <https://doi.org/10.1021/a1000004b>
7. Palleschi G. Kinetics in analytical chemistry // Anal. Bioanal. Chem. 2005. V. 381 P. 1321. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-3128-1>
8. Муштакова С.П. Теория действия и применение органических редокс-реагентов ряда дифениламина в спектрофотометрическом анализе: Дис. ... докт. хим. наук. Саратов, 1987. 400 с.
9. Беклемишев М.К. Новые индикаторные системы в кинетических методах анализа. Сорбционно-кинетический метод. Дис. ... докт. хим. наук. М.: МГУ, 2011. 367 с.
10. Шеховцова Т.Н. Ферментативные методы анализа: Определение эффикторов гидролаз и оксидоредуктаз. Дис. ... докт. хим. наук. М.: МГУ, 1996. 335 с.
11. Веселова И.А. Оптические сенсорные системы на основе пероксидазы для определения органических биологически активных веществ. Дис. ... докт. хим. наук. М.: МГУ, 2018. 272 с.
12. Dickinson T., White J., Kauer J., Walt D.R. A chemical-detecting system based on a cross-reactive optical sensor array // Nature. 1996. V. 382. P. 697. <https://doi.org/10.1038/382697a0>
13. Anzenbacher P., Palacios M.A. Array-based sensors / Chemosensors: Principles, Strategies, and Applications. 1st Ed. / Eds. Wang B., Anslyn E.V. John Wiley & Sons, 2011. 544 p.
14. Sádecká J., Tóthová J. Fluorescence spectroscopy and chemometrics in the food classification – a review // Czech. J. Food Sci. 2007. V. 25. P. 159. <http://doi.org/10.17221/687-CJFS>
15. Askim J.R., Mahmoudia M., Suslick K.S. Optical sensor arrays for chemical sensing: The optoelectronic nose // Chem. Soc. Rev. 2013. V. 42. P. 8649. <https://doi.org/10.1039/C3CS60179J>
16. Власов Ю.Г., Легин А.В., Рудницкая А.М. Электронный язык: химические сенсорные системы для анализа водных сред // Журн. общ. химии. 2008. Т. 78. С. 2532. <https://doi.org/10.1134/S1070363208120335>. (Vlasov Y.G., Legin A.V., Rudnitskaya A.M. Electronic tongue: Chemical sensor systems for analysis of aquatic media // Russ. J. Gen. Chem. 2008. V. 78. P. 2532. <https://doi.org/10.1134/S1070363208120335>)
17. Yang J., Lu Y., Ao L., Wang F., Jing W., Zhang S., Liu Y. Colorimetric sensor array for proteins discrimination based on the tunable peroxidase-like activity of AuNPs-DNA conjugates // Sens. Actuators B. 2017. V. 245. P. 66. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.01.119>
18. Shariati-Ra M., Mozaffari Y. Water discrimination based on the kinetic variations of AgNP spectrum // RSC Adv. 2020. V. 10. P. 34459. <http://doi.org/10.1039/D0RA06000C>
19. Liu L., Zhang L., Liang Y. A simple visual strategy for protein detection based on oxidase-like activity of silver nanoparticles // Food Anal. Methods. 2021. V. 14. P. 1852. <https://doi.org/10.1007/s12161-021-02011-6>
20. Wang F., Na N., Ouyang J. Particle-in-a-frame gold nanomaterials with an interior nanogap-based sensor array for versatile analyte detection // Chem. Commun. 2021. V. 57. P. 4520. <https://doi.org/10.1039/D1CC01094H>
21. Wang L., Hu Z., Wu S., Pan J., Xu X., Niu X. A peroxidase-mimicking Zr-based MOF colorimetric sensing array to quantify and discriminate phosphorylated proteins // Anal. Chim. Acta. 2020. V. 1121. P. 26. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.04.073>
22. Степанова И.А., Лебедева А.Н., Шик А.В., Ско-робогатов Е.В., Беклемишев М.К. Распознавание

- и определение сульфаниламидов методом ближней ИК-флуориметрии по их влиянию на скорость каталитического окисления карбоцианинового красителя пероксидом водорода // Журн. аналит. химии. 2021. Т. 76. С. 1397.
<https://doi.org/10.1134/S1061934821120121>. (Stepanova I.A., Lebedeva A.N., Shik A.V., Skorobogatov E.V., Beklemishev M.K. Recognition and determination of sulfonamides by near-IR fluorimetry using their effect on the rate of the catalytic oxidation of a carbocyanine dye by hydrogen peroxide // J. Anal. Chem. 2021. V. 76. P. 1397.
<https://doi.org/10.1134/S1061934821120121>)
23. 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. V. 10. P. 88.
<https://doi.org/10.3390/chemosensors10020088>
24. Shik A.V., Skorobogatov E.V., Bliznyuk U.A., Chernyaev A.P., Avdyukhina V.M., Borschegovskaya P.Y., et al. Estimation of doses absorbed by potato tubers under electron beam or X-ray irradiation using an optical fingerprinting strategy // Food Chem. 2023. V. 414. Article 135668.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135668>
25. 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. V. 23. P. 4299.
<https://doi.org/10.3390/s23094299>
26. 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. V. 23. P. 7682.
<https://doi.org/10.3390/s23187682>
27. Shik A.V., Sobolev P.V., Zubritskaya Y.V., Baytler M.O., Stepanova I.A., Chernyaev A.P., et al. Rapid testing of irradiation dose in beef and potatoes by reaction-based optical sensing technique // J. Food Compos. Anal. 2024. V. 127. Article 105946.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105946>
28. Liu C., Qian Z., Chen Z. A dual channel fluorescence tongue for catechin recognition based on the MnO₂ nanorods–Amplex Red–o-phenylenediamine reaction system // Anal. Methods. 2023. V. 15. P. 6476.
<https://doi.org/10.1039/D3AY01748F>
29. Jing W., Shi Q., Zheng M., Yang Y., Qiang S., Jia Z., et al. Smartphone-assisted nanozyme sensor array constructed based on reaction kinetics for the discrimination and identification of phenolic compounds // Anal. Chim. Acta. 2024. V. 1287. Article 342133.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.342133>
30. Pargari M., Marahel F., Goodajdar B.M. Kinetic spectrophotometric method and neural network model application for the quantitation of epinephrine by starch-capped AgNPs sensor in blood and urine // J. Anal. Chem. 2022. V. 77. P. 484.
<https://doi.org/10.1134/S1061934822040074>
31. Захаренкова С.А., Лебедева М.И., Лебедева А.Н., Дорошенко И.А., Кривцов Г.Г., Ежов А.А., Подругина Т.А., Беклемишев М.К. Средства визуализации доставки лекарственных веществ с использованием анионированных хитозанов / Сб. тезисов 5-й Российской конференции по медицинской химии с международным участием “МедХим-Россия 2021”. Волгоградский государственный медицинский университет, 2021. С. 432.
<https://doi.org/10.19163/MedChemRussia2021-2021-432>
32. XLSTAT-Pro. User’s manual. Addinsoft, 2003. P. 124.
<https://www.xlstat.com/en/solutions/features/discriminant-analysis-da> (20.04.2024).

RECOGNITION OF OBJECTS OF SIMILAR COMPOSITION AND DETERMINATION OF FLUOROQUINOLONES USING THE REACTION OF CARBOCYANINE Cy7-HYDRAZINE WITH 4-DIMETHYLAMINO BENZALDEHYDE

V. S. Orekhov^a, E. V. Skorobogatov^{a,*}, M. K. Beklemishev^a

^a*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry
Moscow, Russia*

**E-mail: skoregy@gmail.com*

Abstract. The study is devoted to the development of a fluorimetric version of the “fingerprint” method based on conducting indicator reactions in the presence of an object. Observing the reaction over time increases the amount of information received compared to the static version, which allows for improved object recognition, as well as quantitative analysis. As an indicator reaction, it is proposed to use the interaction of a commercial carbocyanine dye with 4-dimethylaminobenzaldehyde, which leads to a decrease in the intensity of fluorescence and a change in light absorption over time. Three fluoroquinolones (moxifloxacin, levofloxacin and ofloxacin) selectively alter the signal at concentrations $\geq 1 \mu\text{M}$; other medicinal substances, including other fluoroquinolones, do not interfere. Ofloxacin was determined in human urine samples at different times after taking the drug. The possibility of using the same indicator reaction for object recognition is shown on the example of samples of apple juices, soil extracts and meat of varying degrees of freshness. Chemometrics methods, including linear discriminant analysis, were used to process the data. 15 apple juices were discriminated with 97% accuracy, 10 apple juices produced in 2022 and 2023 (94%), 10 soil samples (99%), and the possibility of determining the freshness of meat was shown using the example of five samples.

Keywords: fluorescence, fingerprint method, carbocyanins, fluoroquinolones, recognition, LDA.