

На правах рукописи

ЯРОШЕНКО ИРИНА СЕРГЕЕВНА

**НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ АНАЛИЗА БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕД С ПОМОЩЬЮ
МУЛЬТИСЕНСОРНЫХ СИСТЕМ**

Специальность 02.00.02 – АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель –
Доктор химических наук, профессор
Карцова Людмила Алексеевна

Санкт-Петербург

2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ.....	9
1.1. МЕТОДЫ АНАЛИЗА СЛОЖНЫХ ОБЪЕКТОВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ	9
1.1.1. <i>Хроматографические и электрофоретические методы анализа объектов со сложной матрицей.....</i>	<i>9</i>
1.1.2. <i>Общие сведения о химических сенсорах и мультисенсорных системах</i>	<i>11</i>
1.2. СЛОЖНЫЕ ОБЪЕКТЫ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ	18
1.2.1. <i>Моча как объект исследования</i>	<i>18</i>
1.2.1.1. <i>Виды клинических исследований мочи</i>	<i>18</i>
1.2.1.2. <i>Мочекаменная болезнь.....</i>	<i>20</i>
1.2.1.3. <i>Методы определения маркеров мочекаменной болезни</i>	<i>22</i>
1.2.2. <i>Чай как объект исследования.....</i>	<i>30</i>
1.2.2.1. <i>Классификация видов чая.....</i>	<i>30</i>
1.2.2.2. <i>Химический состав чая</i>	<i>31</i>
1.2.2.3. <i>Методы исследования чая</i>	<i>33</i>
1.2.2.3.1. <i>Хроматографические методы анализа чая</i>	<i>35</i>
1.2.2.3.2. <i>Электрофоретические методы анализа чая</i>	<i>39</i>
1.2.2.3.3. <i>Элементный анализ чая</i>	<i>40</i>
1.2.3. <i>Препараты традиционной китайской медицины.....</i>	<i>42</i>
1.2.3.1. <i>Основные направления исследований лекарственных препаратов китайской традиционной медицины.....</i>	<i>42</i>
1.2.3.2. <i>Методы исследования препаратов традиционной китайской медицины.....</i>	<i>43</i>
1.3. МЕТОДЫ АНАЛИЗА МНОГОМЕРНЫХ ДАННЫХ	51
1.4. ПРИМЕНЕНИЕ МУЛЬТИСЕНСОРНЫХ СИСТЕМ ПРИ АНАЛИЗЕ СЛОЖНЫХ ОБЪЕКТОВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.....	53

<i>1.4.1. Мультисенсорный подход при анализе мочи.....</i>	<i>53</i>
<i>1.4.2. Анализ чая с помощью мультисенсорных систем.....</i>	<i>55</i>
<i>1.4.3. Применение мультисенсорных систем для анализа растительных препаратов традиционной китайской медицины.....</i>	<i>58</i>

ГЛАВА 2. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЪЕКТОВ И МЕТОДОВ

ИССЛЕДОВАНИЯ.....61

2.1. АППАРАТУРА.....	61
2.2. РЕАГЕНТЫ	66
2.3. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.....	67
2.4. ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИОНОВ В МОЧЕ	68
2.5. ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ ЧАЯ	73
2.6. ПОЛУЧЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИЧЕСКИХ ПРОФИЛЕЙ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ТРАДИЦИОННОЙ КИТАЙСКОЙ МЕДИЦИНЫ (ТКМ).....	75
2.7. АНАЛИЗ МОЧИ С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИСЕНСОРНОЙ СИСТЕМЫ	77
2.8. ИССЛЕДОВАНИЕ ЧАЯ МУЛЬТИСЕНСОРНОЙ СИСТЕМОЙ	78
2.9. ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗЦОВ ПРЕПАРАТОВ ТРАДИЦИОННОЙ КИТАЙСКОЙ МЕДИЦИНЫ С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИСЕНСОРНОЙ СИСТЕМЫ	80
2.10. ПРИМЕНЕНИЕ ХЕМОМЕТРИЧЕСКИХ МЕТОДОВ К ОБРАБОТКЕ ДАННЫХ ОТ МУЛЬТИСЕНСОРНЫХ СИСТЕМ	84
2.10.1. Метод главных компонент	84
2.10.2. Применение логистической регрессии для классификации образцов.....	86
2.10.3. Регрессионный анализ, применяемый для данных, полученных от мультисенсорных систем	87
2.10.3.1. Проекция на латентные структуры (ПЛС1 и ПЛС2)	88
2.10.3.2. Такер1-ПЛС регрессия (3wayPLS).....	89
2.10.4. Матричный корреляционный анализ	91
2.10.4.1. Вычисление коэффициентов матричных корреляций	91
2.10.4.2. Канонический корреляционный анализ	93

ГЛАВА 3. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ И ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СЛОЖНЫХ ОБЪЕКТОВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ	96
3.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИФЕНОЛОВ И КОФЕИНА В ОБРАЗЦАХ ЧАЯ.....	96
3.2. ПОЛУЧЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ПРОФИЛЕЙ ПРЕПАРАТОВ ТРАДИЦИОННОЙ КИТАЙСКОЙ МЕДИЦИНЫ (ТКМ).....	98
3.3. ПОЛУЧЕНИЕ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИХ ПРОФИЛЕЙ ПРЕПАРАТОВ ТРАДИЦИОННОЙ КИТАЙСКОЙ МЕДИЦИНЫ	101
3.4. ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ КОМПОНЕНТОВ В РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТАХ ТРАДИЦИОННОЙ КИТАЙСКОЙ МЕДИЦИНЫ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА.....	102
3.5. ПОЛУЧЕНИЕ РЕФЕРЕНТНЫХ ДАННЫХ ДЛЯ ОБРАЗЦОВ МОЧИ.....	104
ГЛАВА 4. АНАЛИЗ СЛОЖНЫХ ОБЪЕКТОВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИСЕНСОРНЫХ СИСТЕМ	105
.....	105
4.1. СТРАТЕГИЯ ВЫБОРА СЕНСОРОВ В СОСТАВ МУЛЬТИСЕНСОРНОЙ СИСТЕМЫ.....	105
4.2. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕД С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИСЕНСОРНОЙ СИСТЕМЫ	106
ГЛАВА 5. РЕШЕНИЕ ЗАДАЧ НА РАСПОЗНАВАНИЕ ПРИ АНАЛИЗЕ ОБЪЕКТОВ СО СЛОЖНОЙ МАТРИЦЕЙ	115
ГЛАВА 6. ПРИМЕНЕНИЕ РЕГРЕССИОННОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОБЪЕКТОВ СО СЛОЖНОЙ МАТРИЦЕЙ	119
ГЛАВА 7. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАТРИЧНОГО КОРРЕЛЯЦИОННОГО АНАЛИЗА ДЛЯ СЛОЖНЫХ ОБЪЕКТОВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ	129
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	136
ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ И ТЕРМИНЫ	137
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	139

ПРИЛОЖЕНИЕ 1	159
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	161
ПРИЛОЖЕНИЕ 3	162
ПРИЛОЖЕНИЕ 4	165
ПРИЛОЖЕНИЕ 5	168

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Анализ объектов природного происхождения (растительных препаратов, биологических жидкостей человека и животных и др.) вызывает интерес химиков-аналитиков, медиков и фармацевтов в связи с решением проблем ранней диагностики различных заболеваний, контроля качества пищевых продуктов, лекарственной и фитотерапии. Доминирующую роль при идентификации образцов со сложной матрицей играют гибридные методы анализа – хроматографические и электрофоретические. Однако приходится сталкиваться и с такими задачами, где необходимо охарактеризовать объект в целом, ответив на вопросы: «норма» или «патология», качественный или некачественный продукт и т.д. Используя референтные данные и применяя к описаниям сложных объектов хемометрические методы, можно получить и количественные зависимости для ряда параметров.

Именно потенциметрические мультисенсорные системы являются альтернативой традиционным методам разделения при решении таких задач. Основу мультисенсорной системы составляет массив электрохимических сенсоров, обладающих различной перекрестной чувствительностью. Полученная совокупность данных относительно изучаемого объекта затем обрабатывается хемометрическими методами. Преимущества такого подхода заключаются в экспрессности анализа и простоте аппаратного оформления.

Данная работа посвящена выявлению возможностей потенциметрических мультисенсорных систем для анализа объектов природного происхождения: биологические жидкости, растительные препараты традиционной китайской медицины (ТКМ), экстракты различных образцов чая.

Цель работы: выявление возможности применения потенциметрических мультисенсорных систем для анализа сложных объектов природного происхождения.

Решались задачи:

1. Выбор мультисенсорной системы и разработка методологии измерений для каждого из изучаемых объектов.
2. Распознавание объектов растительного происхождения на примере образцов чая и лекарственных препаратов традиционной китайской медицины методом главных компонент.
3. Классификация образцов биологических жидкостей (образцы мочи), принадлежащей здоровым донорам и пациентам с патологией мочекаменной болезни методом логистической регрессии.
4. Определение компонентов биологических объектов методом капиллярного электрофореза и мультисенсорной системой.
5. Получение хроматографических и электрофоретических профилей растительных объектов (лекарственных препаратов на основе традиционной китайской медицины) с целью дальнейшего сопоставления с данными от мультисенсорной системы.
6. Инструментальная количественная оценка параметра горькости препаратов ТКМ по шкале восприятия дегустаторов с использованием потенциометрической мультисенсорной системы.
7. Разработка схем анализа сложных объектов природного происхождения мультисенсорной системой.

Научная новизна:

Установлено, что мультисенсорная система обеспечивает определение ионного состава образцов мочи при использовании данных капиллярного электрофореза в качестве референтных. Анализ образцов мочи мультисенсорной системой с последующей обработкой результатов методом логистической регрессии позволяет проводить классификацию по принципу «норма»/«патология». Подобный подход может быть рекомендован в качестве независимого диагностического критерия мочекаменной болезни на ранней стадии.

Выявлено наличие корреляций между откликами мультисенсорной системы и характеристическими (хроматографическими и электрофоретическими) профилями при анализе образцов растительных препаратов ТКМ. Это позволяет обнаружить общие закономерности в структурах данных, полученных различными аналитическими методами, для одних и тех же образцов

Показана возможность определения суммарного содержания полифенолов и кофеина в образцах ТКМ с использованием мультисенсорной системы.

Практическая значимость работы:

Разработан метод определения ионного состава мочи мультисенсорной системой с целью диагностики мочекаменной болезни на ранней стадии.

Показано, что мультисенсорная система позволяет количественно оценить параметр горькости в препаратах традиционной китайской медицины (ТКМ) и органолептические характеристики различных образцов чая с использованием в качестве референтных показаний дегустаторов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Способ определения ионного состава образцов мочи мультисенсорной системой и их классификация методом логистической регрессии по принципу «норма» - «патология».

2. Результаты количественной оценки эпикатехина, кофеина, теарубигина в образцах чая с помощью мультисенсорной системы, определяющие качество анализируемого продукта.

3. Количественная оценка параметра горькости в препаратах ТКМ и органолептических характеристик образцов чая с применением мультисенсорной системы и показаний дегустаторов в качестве референтных.

4. Способы многомерной обработки данных для обнаружения корреляций в результатах анализа, полученных для одного и того же объекта (образцы чая, растительные препараты традиционной китайской медицины) хроматографическими, электрофоретическими методами и мультисенсорной системой.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ

1.1. Методы анализа сложных объектов природного происхождения

1.1.1. Хроматографические и электрофоретические методы анализа объектов со сложной матрицей

Сложные объекты природного происхождения представляют собой многочисленную и разнообразную группу, к которым относят любые среды растительного и животного происхождения. Анализ биологических жидкостей человека (в первую очередь, плазма и сыворотка крови, моча) является важнейшим источником информации при диагностике различных заболеваний и оптимизации лекарственной терапии и заключается обычно в идентификации и количественном определении аналитов. Лидирующая роль при решении таких задач отводится гибридным методам – хроматографическим и электрофоретическим – в сочетании с различными вариантами *off-* и *on-line* концентрирования [1].

При выборе схемы подготовки проб к анализу учитывается не только его надежность и точность, но и простота эксплуатации, а также время, необходимое для выполнения процедуры [2].

Методы пробоподготовки биологических образцов зависят, в первую очередь, от их агрегатного состояния и природы аналитов.

На рис. 1 представлена общая схема пробоподготовки объекта со сложной матрицей [1].

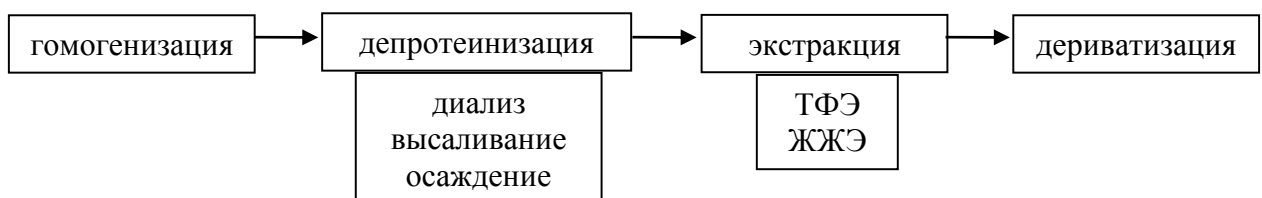


Рис. 1. Схема подготовки биологического объекта к анализу.

В случае твердых образцов пробоподготовка включает стадии измельчения и гомогенизации образцов. Для измельчения таких твердых образцов, как волосы и кожа, применяют ультразвук и гомогенизацию с кварцевым песком на

холоде [3]. Известен способ пробоподготовки биологических тканей путем их охлаждения жидким азотом до хрупкого состояния с последующим измельчением [1].

Для биологических образцов важной стадией пробоподготовки является *депротеинизация* – отделение белков и липидов, затрудняющих определение целевых компонентов и резко сокращающих время жизни хроматографических колонок. В случае капиллярного электрофореза (КЭ) белки могут сорбироваться на стенках кварцевого капилляра, влияя на воспроизводимость результатов анализа [4].

Одним из лучших методов отделения белков от низкомолекулярных соединений является диализ, основанный на процессах осмоса и диффузии: молекулы определяемого низкомолекулярного аналита, в отличие от биополимеров, проходят через мембрану. Скорость диализа обычно крайне низка, для его ускорения увеличивают площадь мембраны и температуру, непрерывно меняя при этом растворитель [1].

В случае жидкофазных объектов и водных вытяжек из твердых образцов, содержащих значительное количество белков, предварительно проводят высаливание последних 1 М раствором гидроксида натрия или насыщенным раствором хлорида натрия. Полную депротеинизацию проводят осаждением белков кислотой (хлорной или трихлоруксусной) или смешивающимися с водой растворителями [5].

Липиды и пигменты из биологических объектов чаще всего удаляют экстракцией хлороформом, диэтиловым эфиром или гексаном [6].

Для предварительного концентрирования аналитов применяют преимущественно сорбционное концентрирование и/или жидкостно-жидкостную экстракцию (ЖЖЭ) [1].

Повышению селективности анализа биологических объектах способствует грамотный выбор дериватизации (пред- или постколоночной) для перевода определяемых компонентов в требуемую аналитическую форму [1]. Выбор зависит от конкретной задачи.

Чаще используют вариант предколоночной дериватизации, позволяющей оптимизировать условия реакции; избыток реагента не мешает детектированию [7].

Процедуру получения производных широко применяют и при электрофоретическом определении аналитов для перевода их в ионогенную форму (капиллярный зонный электрофорез) или с целью повышения чувствительности детектирования [8, 9].

Для снижения пределов обнаружения используют различные варианты концентрирования, что особенно актуально для метода КЭ, где концентрационная чувствительность УФ-детектирования значительно ниже, чем в ВЭЖХ. Разработанные варианты внутрикапиллярного (*on-line*) концентрирования, в основе которых изменение электрофоретических подвижностей аналитов за счет различий в электропроводности (*стэкинг*), рН рабочего буфера (динамический рН-скачок) или использование мицеллообразующих агентов (*свитчинг*) в концентрации, превышающей критическую концентрацию мицеллообразования (ККМ), позволили существенно расширить аналитические возможности метода КЭ, в первую очередь, при решении задач клинической диагностики [10, 11].

Современными тенденциями в пробоподготовке образцов природного происхождения к анализу являются миниатюризация и автоматизация. Для снижения возможных ошибок и повышения точности необходима минимизация количества стадий при пробоподготовке [12].

1.1.2. Общие сведения о химических сенсорах и мультисенсорных системах

В современной аналитической химии активно развивается направление, связанное с разработкой и применением химических сенсоров.

Обычно к химическим сенсорам относят датчики, реагирующие на изменение содержания компонентов среды, в которой они находятся или с которой контактируют [13].

Химический сенсор имеет несколько элементов:

- * *чувствительный слой*, который дает отклик на изменение содержания определяемого компонента;
- * *трансдюсер* (от англ. *transducer* - преобразователь) – преобразователь энергии в электрический или световой сигнал;
- * *токоотвод*, передающий сигнал от трансдюсера к измерительному прибору.

Этот сигнал и является аналитическим, обеспечивая информацию о составе среды. В основе работы сенсоров заложены принципы химических реакций, если аналитический сигнал возникает вследствие взаимодействия определяемого компонента с *чувствительным слоем*, или физические принципы, если измеряется какой-либо физический параметр (поглощение или отражение света, масса, проводимость).

В [14] приведена общая классификация химических сенсоров (рис. 2).

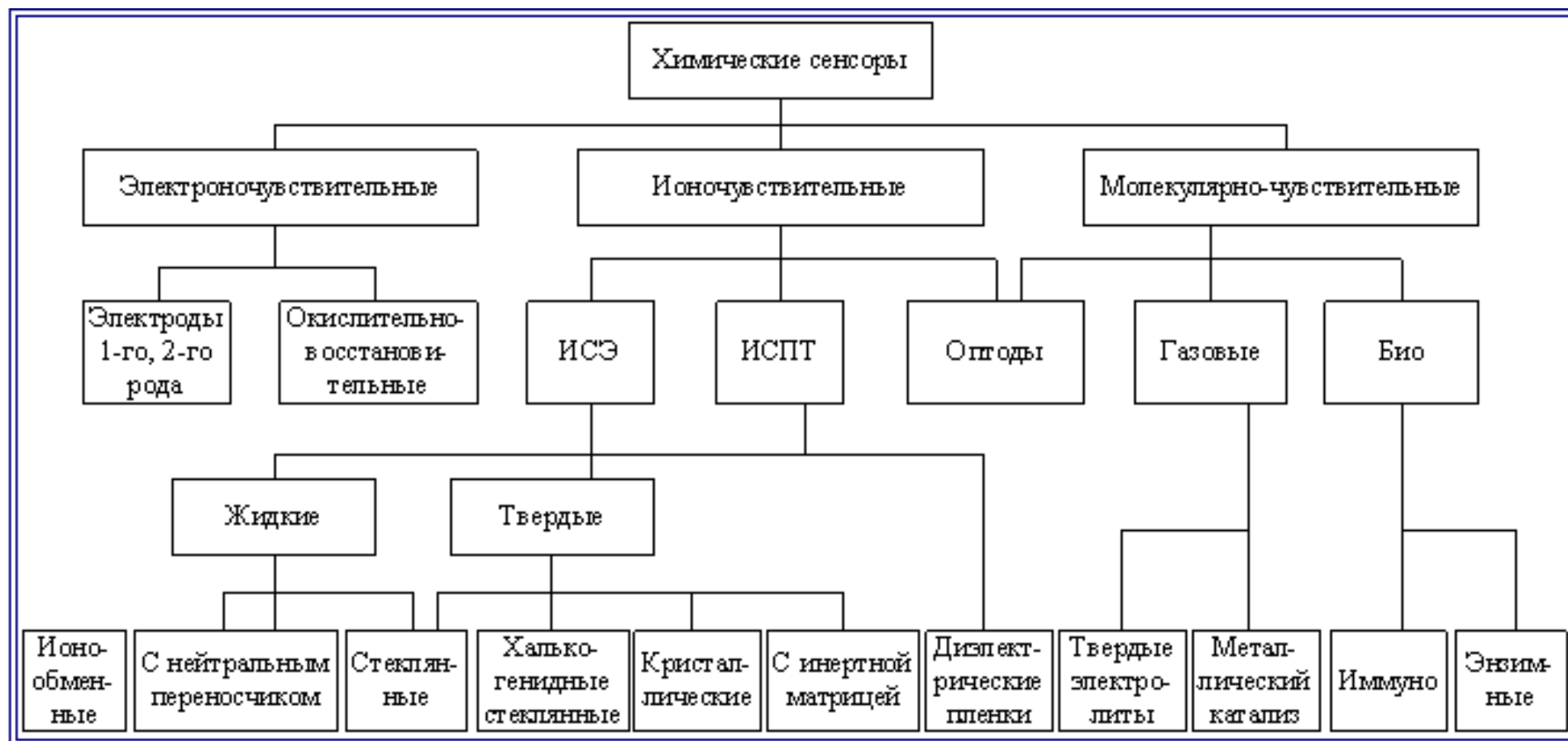


Рис. 2. Классификация химических сенсоров [14].

В конце XX в. сформировался подход, заключающийся в использовании не отдельных высокоселективных сенсоров, а в применении набора (массива) сенсоров, представляющего собой мультисенсорную систему типа «электронный язык» (ЭЯ). Он может включать любые химические сенсоры независимо от того, на каком физическом принципе они работают.

Для успешного применения мультисенсорной системы необходимо, чтобы в состав массива входили сенсоры с перекрестной чувствительностью к различным компонентам анализируемой среды [15].

Разные сенсоры массива должны и по-разному откликаться на наличие и концентрацию присутствующих в образце веществ. Их отклик должен отличаться высокой стабильностью и воспроизводимостью в реальных многокомпонентных средах.

По способу передачи сигнала различают 2 типа сенсоров: с жидким и твердым контактом (рис.3).

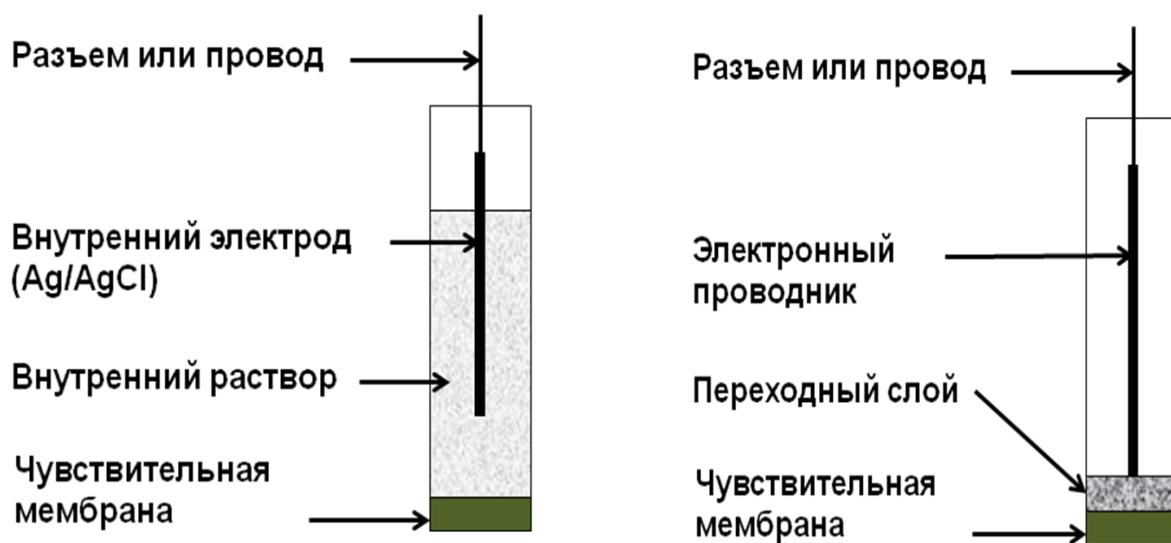


Рис. 3. Сенсоры с жидким (слева) и твердым (справа) контактом [14].

Ключевые элементы сенсоров – чувствительные мембраны, среди которых можно выделить три основных вида [14]:

* *твердые мембраны*, изготовленные из моно- или поликристаллического вещества (порошка), малорастворимого в воде и обладающего частичной ионной проводимостью;

* *стеклянные мембраны*, в которых формирование отклика протекает в тонком гелеобразном слое, образованном на внешней поверхности стекла, после выдерживания (кондиционирования) в соответствующем водном растворе.

* *полимерные пластифицированные мембраны*. Их получают введением ионофоров, нейтральных переносчиков и липофильных добавок в полимерную (например, поливинилхлоридную) матрицу, эластичность и проводимость которой придает наличие пластификаторов. Полимерные мембраны имеют в составе катион- или анион-чувствительные лиганды, а также вещества, чувствительные к органическим веществам.

При попадании в матрицу такой мембраны дополнительного количества, например, катионов из раствора, межфазный потенциал меняется, что регистрируется вольтметром в качестве аналитического сигнала.

Измерения с массивом мультисенсорной системы, состоящим из таких сенсоров, аналогичны подобным системам с отдельными электродами: измеряется э.д.с. электрохимической ячейки, состоящей из массива сенсоров и электрода сравнения. Для измерений используют многоканальные вольтметры с высоким входным импедансом. Управление измерениями и запись данных осуществляется с помощью компьютера (рис. 4) [14].

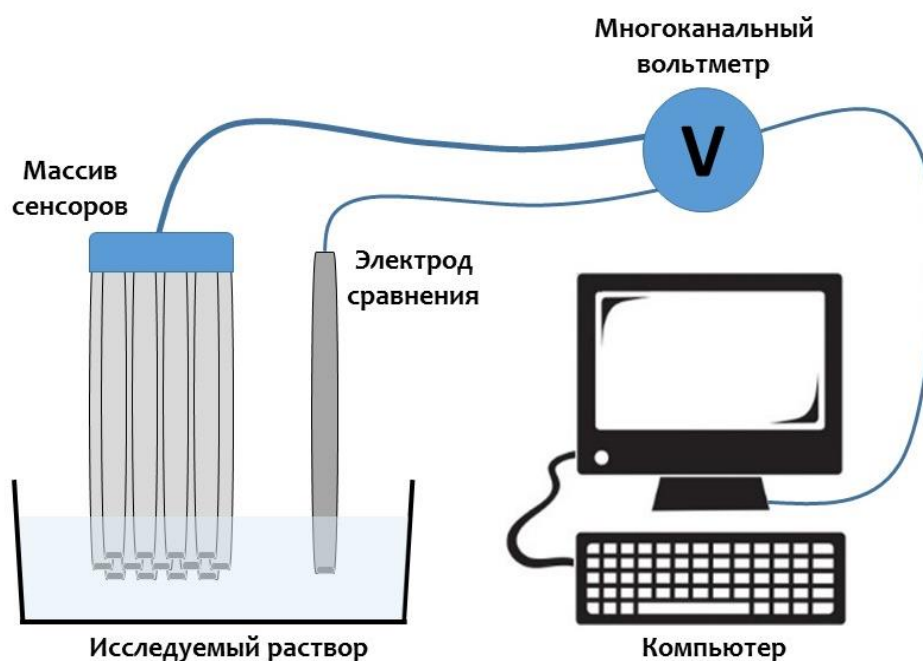


Рис. 4. Схема работы потенциометрической мультисенсорной системы [14].

Результатом анализа образца мультисенсорной системы является набор откликов сенсоров, характеризующих качественный и количественный состав образца. Полученная совокупность данных подвергается современным методам математической обработки многомерных данных для извлечения полезной аналитической информации [16].

При анализе многомерных данных применяют различные подходы в зависимости от поставленной экспериментальной задачи:

- *количественный анализ*. Прогнозирование концентраций веществ и различных свойств образца (физико-химических, органолептических). Используемые методы: проекция на латентные структуры (ПЛС), искусственные нейронные сети (ИНС) и др.;

- *качественный анализ*. Распознавание, классификация, отнесение неизвестного образца к конкретному классу. Применяют: метод главных компонент (МГК), формальное независимое моделирование аналогий классов и др. [16].

Можно отметить основные тенденции в развитии обсуждаемого подхода [17]:

- усовершенствование материалов для чувствительных мембран;
- поиск и применение новых алгоритмов для обработки многомерных данных;
- использование мультисенсорных систем для решения актуальных прикладных задач.

Чаще всего потенциометрические мультисенсорные системы применялись для анализа пищевых продуктов. Так, например, решались задачи классификации таких напитков как чай, кофе, лимонад, соки [18].

Немало исследований, посвящено вину, в котором проводились оценки вкуса по показаниям дегустаторов [19-20], устанавливалось содержание различных компонентов, изменяющих свой состав при хранении [21-22] и влияющих на качество напитка [23]; объектом анализа мультисенсорной системы становилось пиво [24-25], в котором определялось сочетание

различных вкусовых оттенков [24]. Референтные данные, получаемые от группы дегустаторов, являются «отправными точками», по которым калибруется система. При этом следует отметить субъективность такого подхода, чего лишен инструментальный подход. Выявлена корреляция с человеческим восприятием и показана перспективность подобного способа оценки вкусовых качеств [19-20, 24].

В [26] предложено использовать мультисенсорную систему для распознавания образцов молока здоровых и больных животных. В [27-28] обсуждаются возможности применения мультисенсорной системы с целью мониторинга биотехнологических процессов.

Важной проблемой промышленного контроля является одновременное определение редкоземельных элементов в облученном ядерном топливе, для чего были разработаны новые сенсоры и системы, способные определять одновременно содержание нескольких лантаноидов (от лантана до лютеция) [29-31].

Мультисенсорные системы весьма перспективны при решении задач экологического контроля. Так, в [32] проводилось исследование грунтовых вод на наличие таких тяжелых металлов как медь, цинк, марганец, железо. Проведена оценка токсичности водной среды, где референтные данные для калибровки сенсорной системы получены биологическими методами. Доказано, что мультисенсорная система способна адекватно оценить токсичность воды, что в перспективе может с успехом заменить подходы с использованием биоты [33].

Перед производителями фармацевтической продукции уже давно стоит проблема распознавания уровня горькости лекарственных препаратов: от этого зависит способ и степень маскирования действующего вещества в готовой таблетке. Ранее для оценки этого параметра использовали лабораторных животных. Установлено, что результаты, полученные с использованием мультисенсорной системы, и референтные данные хорошо коррелируют между собой [34, 35].

Применение мультисенсорной системы при анализе объектов со сложной матрицей подразумевает использование различных методов обработки данных [36-39].

Таким образом, мультисенсорные системы могут обеспечить решение широкого круга аналитических задач [40].

1.2. Сложные объекты природного происхождения

В последние десятилетия все большее внимание уделяется анализу сложных объектов природного происхождения; среди них образцы чая, препараты китайской народной медицины, биологические жидкости: моча, плазма и сыворотка крови (Приложение 1).

1.2.1. Моча как объект исследования

Моча является биологической жидкостью человека. Ее образование и выделение — один из важнейших факторов поддержания постоянства внутренней среды организма. Схема процесса образования мочи в организме представлена в Приложении 2 [41].

1.2.1.1. Виды клинических исследований мочи

Анализ мочи, включающий органолептическое, микроскопическое, физико-химическое или биохимическое исследование [42], — вид лабораторного исследования, проводимый с целью диагностики различных заболеваний и позволяющий оценить общее состояние организма и своевременно назначить лекарственную терапию.

При этом *органолептические* показатели являются основными в общем анализе мочи. При подозрении на заболевание мочевыделительной системы обязательно назначается *микроскопическое* исследование.

Образец центрифугируют, сливают надосадочную жидкость и исследуют мочевой осадок, выделяя организованный (*форменный*) и неорганизованный (*кристаллический*) осадок (рис. 5).

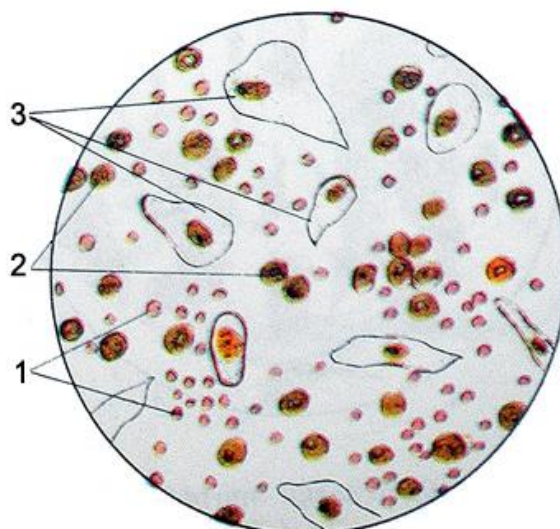


Рис. 5. Элементы организованного осадка мочи. 1 – эритроциты, 2 – лейкоциты, 3 – клетки эпителия [42].

Неорганизованные осадки мочи состоят из солей в виде кристаллов и аморфной массы. При $\text{pH} < 7$ встречаются кристаллы мочевой кислоты, ураты, оксалаты, фосфаты и др. Элементы неорганизованного осадка мочи представлены на рис. 6.



Рис. 6. Элементы неорганизованного осадка мочи. 1 – кристаллы мочевой кислоты, 2 – ураты, 3 – оксалаты [42].

При *физико-химических* исследованиях мочи обычно получают информацию о плотности и кислотности образцов. В норме плотность мочи составляет $\sim 1010\text{—}1025$ г/л. Она повышается при обезвоживании. Сниженная плотность может свидетельствовать о почечной недостаточности. Значение pH мочи колеблется от 5,0 до 7,0. Кислотность этой биологической жидкости

существенно зависит от характера принимаемой пищи, физической нагрузки и др.

Биохимическое исследование назначают при детальном анализе образцов мочи пациентов с различными патологиями. Содержание конкретного компонента может свидетельствовать о наличии или отсутствии заболевания. Основными диагностическими маркерами являются белок, глюкоза, кетоны, билирубин и др. [43].

1.2.1.2. Мочекаменная болезнь

Мочекаменная болезнь (МКБ) – это нарушение обмена веществ, характеризующееся формированием конкрементов, т.е. плотных образований (лат. *concrementum* — скопление, срастание) в почках и органах мочевыделительной системы [43]. История изучения маркеров МКБ весьма длительна [44], и число публикаций, посвященных этой проблеме, постоянно увеличивается (рис. 7).

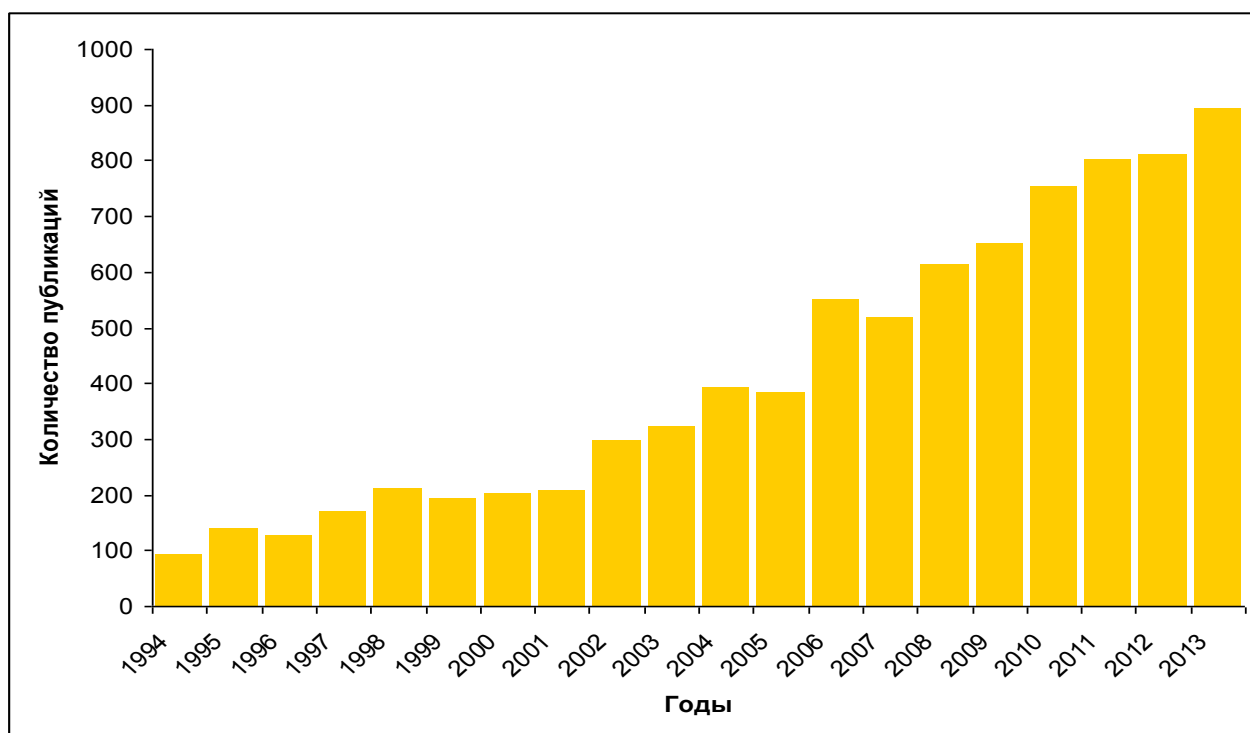


Рис. 7. Число публикаций, посвященных исследованию мочи, за два последних десятилетия, согласно данным издательства Elsevier.

Почти 40% всех урологических заболеваний относятся к МКБ. Механизм процесса камнеобразования обсуждается в [45]. В течение длительного времени это заболевание может протекать бессимптомно и выявляется на ранней стадии по результатам биохимического анализа [45-47].

Наиболее распространены кальциевые камни (около 65% всех камней) [45]. Оксалат и фосфат кальция представляют собой серо-черные, реже белые камни малого диаметра (<1см). Если в моче имеется значительное количество цитрат-ионов, способных вступить в конкурирующие взаимодействия, оксалатный камень не образуется (рис. 8). Образованию фосфатно-кальциевых камней способствует низкий уровень рН. Присутствие заметного количества ионов магния снижает вероятность такого камнеобразования. Для образования кальциевых камней благоприятны такие факторы как значение $pH < 7$, высокое содержание ионов кальция, оксалата, фосфата, низкое содержание ионов цитрата и магния.

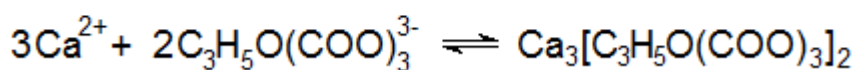


Рис. 8. Общая схема камнеобразования: (а) – оксалата, (б) – фосфата.

Формированию уратных камней способствует повышенное содержание мочевой кислоты и ее солей – уратов, что может быть спровоцировано злоупотреблением мяса и рыбы, богатых пуриновыми основаниями, что сопровождается малым объемом суточной мочи и низким значением рН. Гораздо реже встречаются карбонатные, цистиновые, ксантиновые и другие камни [48-50]. При МКБ обычно обнаруживается не один вид камня, а их смесь. Например,

ураты встречаются вместе с кальциевыми камнями или со струвитами, представляющими собой длинные слоистые ветвеобразные камни [47].

На скорость роста кристаллов влияют различные вещества, присутствующие в моче: промоторы и ингибиторы камнеобразования (табл.1).

Таблица 1. Промоторы и ингибиторы камнеобразования [45]

Функция	Вещество	Заключение
Промоторы	Кальций	Гиперкальцийурия
	Аммоний	Гипераммонийурия
	Оксалат	Гипероксалурия
	Фосфат	Гиперфосфатурия
	Урат	Гиперурикурия
Ингибиторы	Магний	Гипомагниурия
	Цитрат	Гипоцитратурия

1.2.1.3. Методы определения маркеров мочекаменной болезни

В работе [51], посвященной выявлению маркеров МКБ, сделан акцент на необходимости измерения содержания ионов Ca^{2+} в плазме крови, а также контроля ионов кальция и фосфат-ионов в суточной моче. Позднее для оценки возможности возникновения МКБ предложено использовать различные соотношения концентраций ионов кальция/цитрата и кальция/магния [52]. Идея математической обработки полученных данных по содержанию камнеобразующих солей и кислот в моче для обоснования диагноза подкреплена компьютерными программами [52].

В 1980-е гг. предложена методика оценки риска возникновения МКБ, т. н. “индексы Тизелиуса”. Она включает 7 параметров, среди которых: объем, pH, содержание ионов кальция, магния, оксалата, цитрата, фосфата [53]. Чем больше индекс Тизелиуса, тем вероятность камнеобразования больше.

В [54-55] предлагается при диагностике МКБ определять лишь два параметра: содержание ионов кальция и оксалата, а в [43] отмечено, что для полноты заключения необходимо знать и уровень креатинина – одного из

конечных продуктов белкового обмена в организме, позволяющего судить о состоянии почек и мышечной системы человека.

Авторы [56] считают, что риск возникновения МКБ возрастает также и при снижении содержания стабилизаторов формирующейся коллоидной системы – пересыщенного раствора мочи, основным из которых является белок *Тамма-Хорсфалла* (БТХ), представляющий собой гликопротеин с молекулярной массой $1,42 \cdot 10^6$ D, состоящий из 616 аминокислотных остатков. Он присутствует в моче здоровых людей в виде мономеров диаметром ~ 200 нм. У лиц, страдающих МКБ, белок полимеризуется в частицы размером ~ 1 мкм. При его недостатке в моче ионы-камнеобразователи агрегируются в микро- (<10 мкм), а затем и в более крупные кристаллы (>50 мкм). При избытке белка Тамма-Хорсфалла его полимеры становятся ядром-затравкой для камнеобразования. Диапазон концентраций белка Тамма-Хорсфалла в моче здорового человека довольно узок (20-70 мг в сутки) [56].

Таким образом, на начальную стадию МКБ могут указывать определенные концентрации ингибиторов и промоторов камнеобразования, их соотношение, а также количество белка Тамма-Хорсфалла в моче. Кроме того, необходимо знать концентрацию креатинина, уровень кислотности и плотность мочи.

Подготовка пробы к анализу достаточно проста: растворенные аналиты легко экстрагируются или определяются непосредственно в моче при ее разбавлении [47, 50].

Одним из важнейших этапов является отбор образца и его хранение. Для выявления маркеров МКБ используют мочу, собранную пациентом в течение 24 ч. Диурез (объем суточной мочи) составляет обычно 1-2 л [57].

Чтобы избежать разрушения компонентов мочи при хранении, используют различные приемы, адаптированные к выбранному способу анализа (ионный состав, микробиологические/бактериологические, гормональные исследования): охлаждение, замораживание, а также добавки кислот, оснований, формальдегида, толуола и тимола в качестве консерваторов [58-59]. Для исследования ионного состава достаточно процедуры охлаждения. Доказано,

что ионный состав мочи, оставленной на хранение в течение 5 лет при -70°C , меняется всего на 5% [59].

К тест-методам анализа мочи, относят варианты, основанные на ферментативных реакциях. Реагентные полоски, изготовленные из специальных волокнистых материалов, могут быть предназначены как для определения отдельных показателей (*монофункциональные*), так и для комплексного исследования с чередованием реагентных зон (*полифункциональные*) [57]. К их достоинствам относят простоту и экспрессность, однако результаты часто оказываются завышенными из-за возможных перекрестных реакций.

Интересный подход («Литос-система») предложен в [60], в основе которого т.н. метод *клиновидной дегидратации* мочи, размещенной на прозрачной плоскости. Дегидратированная капля биологической жидкости представляется в виде сухой пленки (*фацции*) с четким изображением фиксированных структур.

В моче здоровых людей белковые и минеральные элементы связаны между собой непрочно, и при высыхании белки распределяются по периферии капли, а соли локализуются в центре (рис.9, а). При активном процессе камнеобразования белковые и минеральные элементы прочно связаны между собой, белок «тянет» соль в краевую зону, где она и кристаллизуется. Полная кристаллизация солями поверхности капли свидетельствует о высокой активности камнеобразования (рис. 9, б).

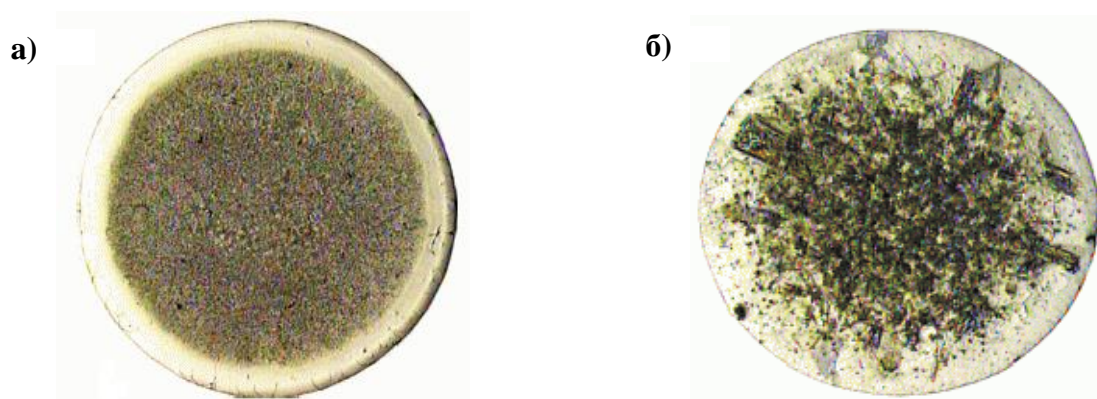


Рис. 9. Результат анализа «Литос-системой» образца мочи здорового человека - (а), страдающего МКБ – (б) [60].

Существуют публикации по определению содержания компонентов мочи с использованием ионоселективных электродов (ИСЭ) [61-62]. Однако одновременное присутствие конкурирующих ионов может приводить к завышению или занижению полученных данных для конкретного аналита. В связи с этим состав мембранных систем для сенсоров постоянно совершенствуется [61]. Так, для определения ионов кальция в моче предлагается миниатюрный датчик, который линейно откликается в системе *электролит-мембрана-диэлектрик-полупроводник*, что подтверждается как в растворах хлорида кальция, так и в различных образцах мочи [62].

Помимо значительных концентраций неорганических ионов, в моче присутствуют органические молекулы, способные оседать и накапливаться на поверхности мембраны. Это приводит к искажению результатов и недолгому времени службы сенсоров. В [63] предложено очищать мочу от органических компонентов твердофазной экстракцией (ТФЭ) перед тем, как исследовать ее с помощью ИСЭ. При этом показания сенсоров стабильны, и датчики служат продолжительный период времени.

Кроме потенциометрии используются и другие электрохимические методы, в основном, вольтамперометрия. Описаны способы определения содержания в моче натрия [64], фосфата [65], креатинина [66], мочевой кислоты [67-69] с использованием угольно-пастовых, графитовых, медных и золотых электродов.

Перспективным для решения обсуждаемой проблемы является применение биосенсоров, аналитический сигнал которых основан на различных биохимических реакциях. Например, при определении креатинина в моче используют *реакцию Яффе* – взаимодействие креатинина с пикриновой кислотой в щелочной среде с образованием красновато-желтой окраски (рис. 10) [70-73].

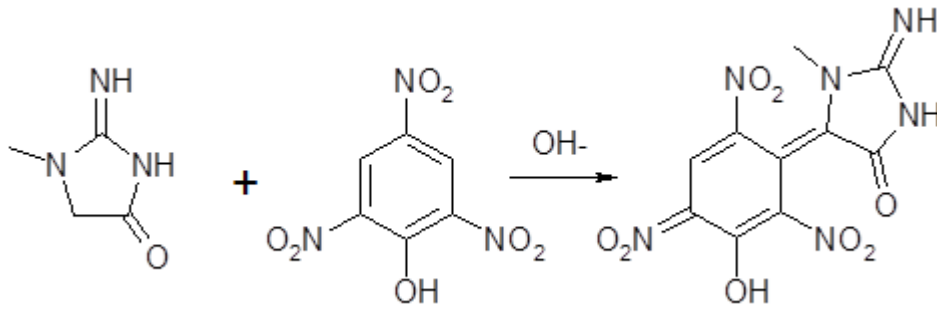


Рис. 10. Реакция Яффе.

Среди многообразия биосенсоров для определения мочевой кислоты в моче наиболее интересной представляется «сэндвичевая система» [74], состоящая из нескольких слоев: поликарбонатная мембрана – уриказа - ацетат целлюлозы - фталоцианин кобальта - планарная электродная система (рис. 11). На первой стадии мочевая кислота превращается в аллантаин с выделением перекиси водорода, которая восстанавливает ионы Co^{2+} до Co^+ . На второй – происходит окисление ионов Co^+ до Co^{2+} , что регистрируется в качестве аналитического сигнала. В [75] обсуждается экспрессность такого анализа и низкая стоимость производства подобных «сэндвичевых систем».

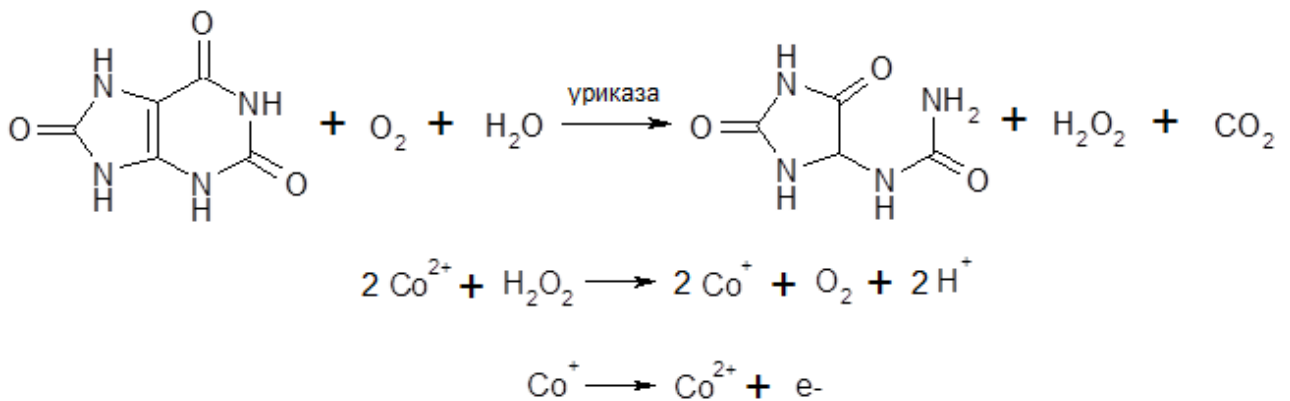


Рис. 11. Принцип, лежащий в основе работы биосенсора на мочевую кислоту.

Разработаны биосенсоры для определения оксалат-иона в моче [76-78]. В их основе лежит реакция окисления щавелевой кислоты оксалат-оксидазой с выделением углекислого газа и образованием пероксида водорода (рис. 12) [78].

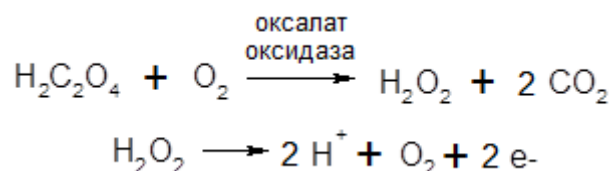


Рис. 12. Принцип, лежащий в основе работы биосенсора на оксалат-ион.

Основным достоинством биосенсоров считается высокая селективность, обусловленная специфичностью протекающих реакций. К недостаткам относят сложность воспроизводимости микроструктуры поверхности при нанесении слоя биологически активного фермента.

Среди гибридных методов анализа при определении маркеров МКБ наибольшее распространение получили хроматографические [79-82] и электрофоретические [82-88] методы.

Так, для обнаружения ионов кальция и магния в моче используют ионную хроматографию с пьезоэлектрическим детектором [79]. На катионообменной колонке длиной 15 см (5×150 мм) с использованием подвижной фазы с рН 4.0 и добавками винной кислоты и этилендиамина достигались времена элюирования для ионов магния и кальция 2,2 и 2,7 мин, соответственно. В [80] предложена пробоподготовка образцов мочи, включающая фильтрацию образцов для удаления белковых компонентов, с последующим определением мочевой кислоты методом ионной хроматографии с кондуктометрическим детектором в изократическом режиме.

Совместное определение креатинина и мочевой кислоты рекомендуют проводить методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим [81] или УФ-детектированием [82]. Использование тандемной масс-спектрометрии, как одного из самых чувствительных методов анализа, приводит к низким пределам обнаружения (10 мг/л для креатинина и 5 мг/л для мочевой кислоты) и малым временам элюирования аналитов (1,2 мин в случае креатинина и 1,7 мин - для мочевой кислоты). Используют изократический и градиентный режимы элюирования [81].

В [82] предложен метод совместного определения креатинина и мочевой кислоты методом гидрофильной ВЭЖХ (HILIC) с фосфатным буфером (рН 4,75) в качестве элюирующей системы и спектрофотометрическим детектированием (205 нм). Пробоподготовка включала осаждение белков ацетонитрилом, фильтрование надосадочной жидкости с последующим разбавлением.

Метод капиллярного электрофореза, характеризующийся существенно большей эффективностью по сравнению с ВЭЖХ, предпочтителен для определения ионных и ионогенных маркеров МКБ. Первые публикации по определению катионов и анионов в моче методом КЭ появились в конце XX в. [86]. Совместное определение катионов аммония, натрия, калия, кальция, магния, а также анионов хлорида, нитрата и сульфата обсуждается в [49, 83]. Применяется косвенное УФ-детектирование: в рабочий буфер вводят поглощающие добавки (при определении катионов - бензимидазол, а анионов - хромат-ионы).

Успешное определение органических анионов (урат, цитрат и оксалат) методом КЭ с УФ детектированием обсуждается в [49, 84-86]. Отмечено, что использование 0,2 М фосфатного буфера (рН 6,0) приводит к довольно высокой силе тока (до 210 мкА), что обеспечивает совместное определение оксалат- и цитрат-ионов [49]. Применение для этих целей микрофлюидных чипов позволило снизить объем вводимой пробы и пределы обнаружения в десятки раз [87].

В [88] основные маркеры МКБ определяли методом капиллярного изотахофореза с кондуктометрическим детектированием. Используя различные системы ведущих и терминальных электролитов, проведен качественный и количественный анализ органических (урат, оксалат) и неорганических ионов (фосфат, а также ионы кальция, магния, натрия, аммония) с пределами обнаружения ~ 10 ммоль/л. Общее время анализа по сравнению с ионной хроматографией и капиллярным зонным электрофорезом (КЗЭ) оказалось существенно меньше.

Один из важнейших маркеров МКБ - белок Тамма-Хорсфалла — определяют методом динамического светорассеяния [89], позволяющим оценить размер частиц этого биополимера. Если значение указанной величины достигает ≥ 1 мкм, это свидетельствует о большой вероятности возникновения МКБ. Содержание белка Тамма-Хорсфалла в моче определяют эксклюзионной хроматографией [90], а также методом ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием [91]. Установлено, что соотношение креатинина и белка Тамма-Хорсфалла в моче свидетельствует о различных почечных патологиях.

Основные тенденции при определении маркеров МКБ приведены в табл. 2.

Таблица 2. Основные методы анализа, применяемые при определении маркеров мочекаменной болезни

Метод		Определяемые компоненты	Ссылки
Тест-методы		рН	[57]
Электрохимические	Потенциометрия	Кальций, Натрий, Креатинин	[62], [63], [70]
	Вольтамперометрия	Натрий, Фосфат, Креатинин, Мочевая кислота, Оксалат	[64], [65], [66], [70], [67-69], [76]
Биосенсоры с различными способами детектирования	Потенциометрическое	Креатинин Мочевая кислота, Оксалат	[70-72], [74-75], [76-78]
	Люминисцентное		
	Амперометрическое		
Хроматография	Ионная	Кальций, магний, мочевая кислота	[79], [80]
	Эксклюзионная	Белок Тамма- Хорсфалла	[90]
	ВЭЖХ	Креатинин, мочевая кислота, Белок Тамма- Хорсфалла	[81-82] [91]
Капиллярный электрофорез		Аммоний, калий, натрий, кальций, магний, нитрат, сульфат, фосфат, мочевая кислота, креатинин, оксалат, цитрат	[49], [83], [87], [49], [84-88]

1.2.2. Чай как объект исследования

1.2.2.1. Классификация видов чая

Чай – напиток, получаемый завариванием или настаиванием листа чайного куста (*Camellia sinensis*). Все виды чая производят из одного и того же растения, отличия состоят в обработке. Существует несколько подходов к классификации сортов чая. Наиболее распространенный – классификация по степени ферментации, т.е. окисления клеточного сока чайного листа под воздействием различных факторов. Подразделяют чай на 6 групп: *черный, зеленый, желтый, белый, оолонг* и *пуэр* (табл. 3) [92].

Таблица 3. Основные виды чая [92]

Название чая	Основные отличия
Зеленый	Неферментированный
Оолонг	Ферментирован на 25-60%
Белый	Неферментированный. Особые условия выращивания
Желтый	Производится из полураспустившихся почек
Черный	Полная ферментация
Пуэр	Двойная ферментация

За несколько последних десятилетий *зеленый* чай неоднократно являлся объектом медико-биологических исследований с целью определения влияния на здоровье человека [92]. Главная особенность производства зеленого чая заключается в технологии обработки, при которой не происходит ферментации чайного листа. Именно поэтому зеленый чай характеризуется максимальным содержанием катехинов – антиоксидантов полифенольного типа.

Чай с частичной ферментацией называют *оолонг*. Разная степень ферментации и других технологических приемов обеспечивает разнообразие вкуса и аромата. Такой чай сочетает в себе лучшие качества зеленого и черного за счет благоприятной комбинации катехинов и их полимерных молекул – теафлавинов и теарубигинов.

В последние годы весьма популярным стал *белый* чай. Уникальные качества и его аромат связаны с условиями выращивания и переработки. Он плохо хранится и транспортируется, т.к. из-за отсутствия ферментации очень требователен к условиям хранения. Его собирают, когда почки покрыты тонкими белыми ворсинками, а листья еще не распустились. Оздоровительное действие

белого чая связано с повышенным содержанием в нем полифенолов (в 15-20 раз больше, чем в других сортах чая).

Желтый чай, достаточно редкий, относят к слабо ферментированным. Технология его производства заметно отличается: используют нераспустившиеся почки в строго определенное время, соблюдая главные критерии: не собирать в дождь, не собирать поврежденные почки и т.д. В итоге на изготовление 1 кг желтого чая отбирают 50 тыс. чайных почек высшего качества. Особенность такого чая в большем, чем в зеленом и черном, содержании кофеина.

Черный чай прошел длительную технологическую цепочку в процессе изготовления. Ферментацию прекращают, когда аромат чая становится оптимальным, что устанавливают только опытные специалисты. Характерный черный цвет и особый «смолистый» аромат обусловлен высоким содержанием теафлавинов и теарубигинов.

Чай вида *пуэр* является постферментированным, или сильно ферментированным, поскольку в процессе производства помимо обычной ферментации, чайный лист подвергается стадии дополнительного старения – вторичной ферментации или "вылѐживанию" чая в течение нескольких лет. Это позволяет удалить горечь и грубость свежего листа. Особенность чая пуэр: несмотря на меньшее содержание катехинов, он сопоставим по антиоксидантной активности с зеленым чаем, у которого содержание катехинов значительно больше [92].

1.2.2.2. Химический состав чая

В начале XX в. были проведены первые исследования химии чая на яванских плантациях, но и на сегодняшний день его точный химический состав до конца не установлен. В чае содержится около 500 различных веществ, сочетание которых уникально и не может быть заменено никакими другими растениями, и тем более — химическими препаратами [92].

Чайный лист состоит из воды и сухого вещества. В зеленых листьях чая, т.е. в исходном сырье, 73-81% воды и лишь 19-27% — сухих веществ. В готовом чае, наоборот, на долю воды приходится 3-7%, а сухих веществ — 93-97% [92].

В свою очередь, сухие вещества делятся на *растворимые* и *не растворимые* в воде. Водорастворимую фракцию сухого вещества в технологии чая называют *экстрактом*. Нерастворимая фракция — это балластные вещества, остающиеся в разваренном листе в виде остатка после заваривания. В технологии чая эту часть называют *разваркой*. При переработке зеленого чайного листа изменяется, главным образом, содержание экстрактивных веществ.

Химические соединения, входящие в состав чая, приведены в табл. 4.

Таблица 4. Химический состав чая [92]

Экстрактивные вещества	41-58%	Балластные вещества	42-59%
Фенольные соединения (катехины, антоцианы и др.)	14-26%	Белки	20-22%
Углеводы (моносахариды, дисахариды)	4-5%	Нерастворимые углеводы (целлюлоза, крахмал, гемицеллюлоза)	5-18%
Алкалоиды (кофеин, гуанин, аденин, теофиллин)	2-4%	Пектиновые вещества (протопектин)	8-9%
Гидроаскорбиновая кислота	2-3%	Лигнин	6-7%
Пектиновые вещества (гидропектин)	2-3%	Смолы	2-3%
Минеральные вещества (К, Са, Mg, Fe, Si, Na, Al, Mn, Sr, Ni, Cu, Zn, Ba, Rb, Ti, Cr, Sn, Ag, V, I)	3-4%		
Органические кислоты (щавелевая, яблочная, янтарная, лимонная, молочная и др.)	1%		
Прочие растворимые вещества: водорастворимые витамины (В ₁ , В ₂ , В ₃ , С, РР, К, U, Р); азотистые вещества (растворимые в воде белки, аминокислоты); ферменты (окислительные и гидролитические); ароматические вещества; спирты; пигменты (хлорофилл, каротин и ксантофилл)	10-12%	Прочие нерастворимые вещества: нерастворимые (соединенные с белками) дубильные вещества; жирорастворимые витамины (А, К, Е); нерастворимые минеральные вещества; нерастворимые ферменты (соединенные с нерастворимой частью клетки)	1-2%

Во время технологической переработки сырья полифенольные соединения зеленого листа претерпевают окислительные превращения. Именно с этим связано присутствие в черном чае, в отличие от зеленого, теафлавинов и теарубигинов (продуктов конденсации флаван-3-олов) (рис. 13), определяющих аромат и интенсивную окраску черного чая.

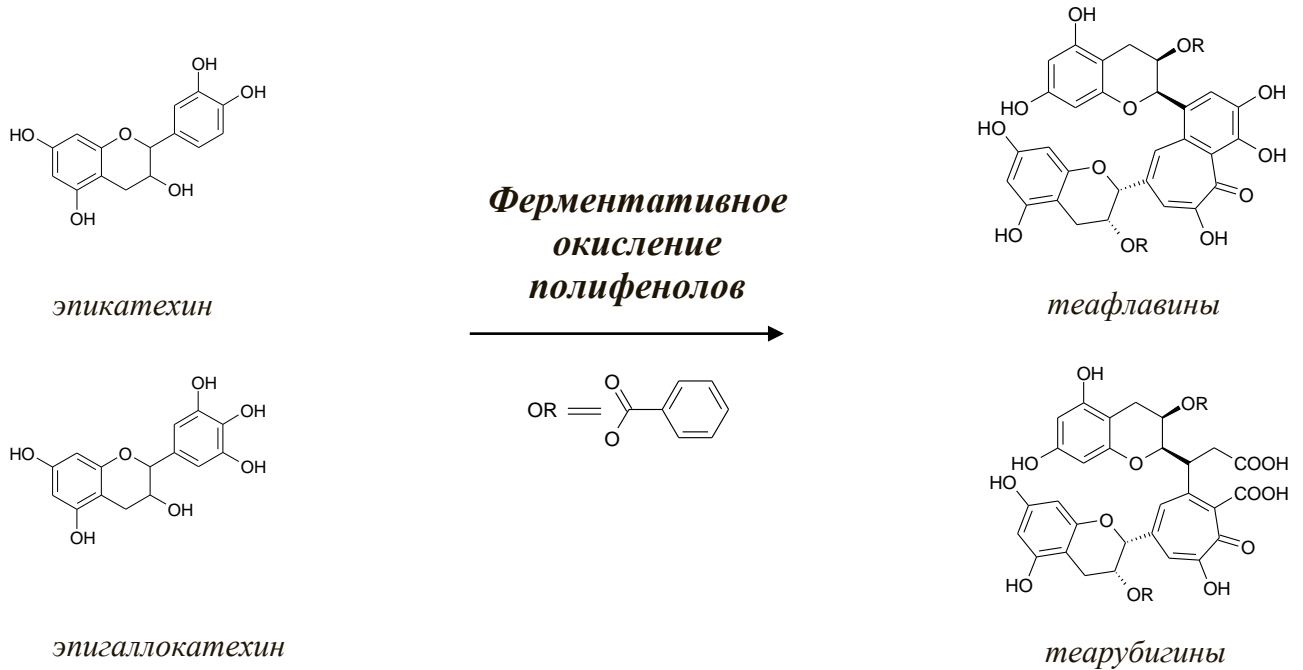


Рис.13. Схема образования конденсированных полифенолов в процессе получения черного чая на стадии ферментации [92].

По степени ферментации различают слабоферментированные (*зеленые, белые, желтые*), полуферментированные, или улуны (*красные, синие, фиолетовые*), ферментированные (*черные*) и переферментированные (пу-эры) сорта.

Для оценки качества чая используют следующие критерии: антиоксидантная активность (суммарное содержание полифенолов); оценка аромата; содержание аминокислот; кофеина и др. Так, для оценки качества черного чая предлагается использовать отношение концентрации теафлавинов к концентрации теарубигинов. Свежий качественный черный чай должен содержать теафлавинов > 1%, теарубигинов ~ 10%, и их отношение >0,1 [92].

1.2.2.3. Методы исследования чая

Методы определения качества готовой чайной продукции делят на *субъективные* и *объективные*. К субъективным – относят обычную дегустацию. Чаще применяют объективные методы: химические, физические, физико-химические, биохимические и др.

При этом решаются задачи:

- установление зависимости количественного содержания активных компонентов чая от условий его выращивания;
- установление зависимости качества чая от его химического состава и оптимизация соответствующих технологий производства;
- объективная оценка качества чая по содержанию в нем некоторых соединений или групп соединений (несмотря на большие успехи физико-химических методов в установлении состава чая, качество его преимущественно оценивается органолептически);
- определение биодоступности и биосуваемости компонентов чая;
- исследование возможности применения чая и продуктов на его основе для антиоксидантной терапии при окислительных стрессах.

За последние 20 лет интерес к исследованиям химического состава пищевых продуктов, в частности чая, значительно возрос (рис. 14).

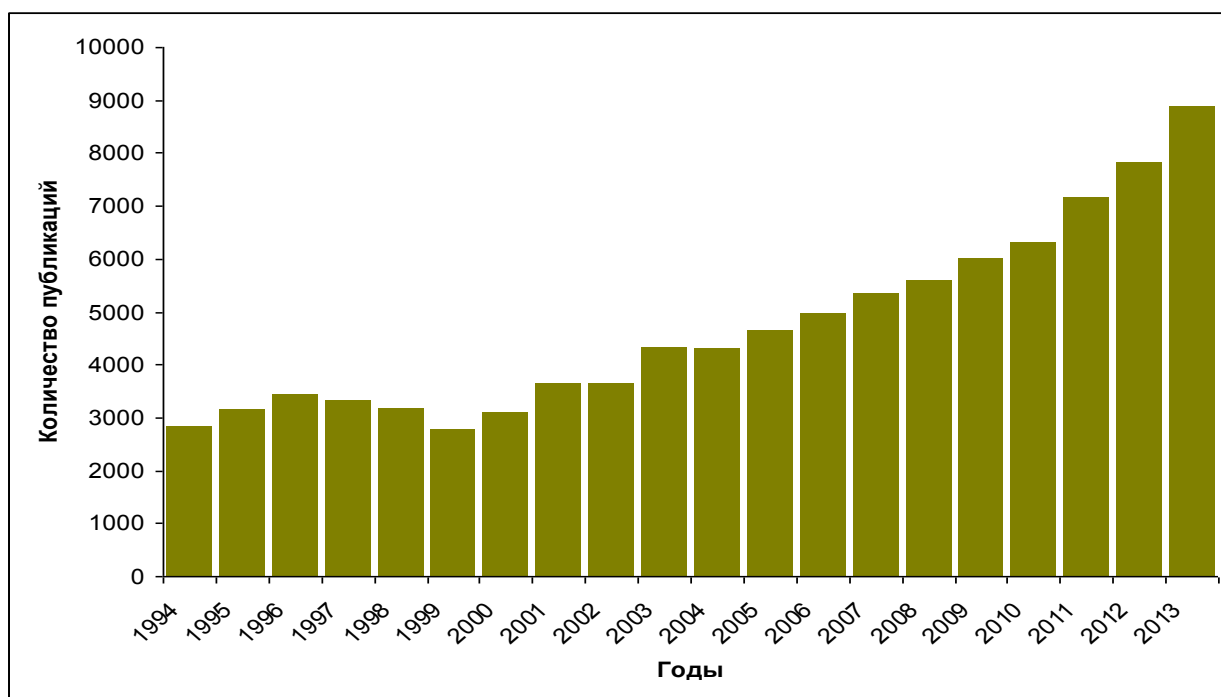


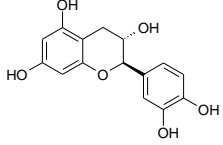
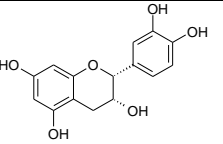
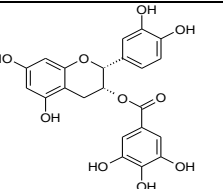
Рис. 14. Число публикаций, посвященных исследованию чая, за два последних десятилетия, согласно данным Elsevier.

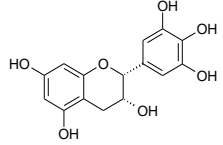
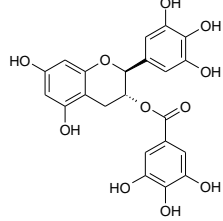
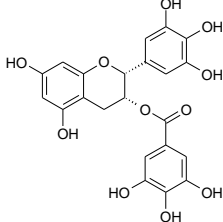
1.2.2.3.1. Хроматографические методы анализа чая

Первые работы по определению химического состава чая хроматографическими методами появились более 30 лет назад [93-94], а в последнее десятилетие интерес к этой проблеме существенно возрос [92, 95] в связи с появлением многочисленных публикаций о положительном воздействии чая на здоровье человека.

Наиболее важные компоненты чая **катехины** – антиоксиданты полифенольного типа, которые также содержатся в овощах, фруктах, зерне, приправах, вине, кофе и какао и обладают противораковым, антибактериальным и противовоспалительным действием. Содержание отдельных полифенолов в растениях определяет их окраску, аромат, вкус овощей и плодов (табл. 5).

Таблица 5. Структурные формулы основных полифенолов чая и их среднее содержание в побеге цейлонского чая [92]

Тривиальное название	Принятое обозначение	Название по ИЮПАК	Структурная формула	Среднее содержание г / 100 г
(+)-катехин	(+)-С	[2R,3S]-2-[3,4-дигидроксифенил]-3,4-дигидро-1[2H]-бензопиран-3,5,7-триол		0,35
(-)-эпикатехин	(-)-ЕС	[2R,3R]-2-[3,4-дигидроксифенил]-3,4-дигидро-1[2H]-бензопиран-3,5,7-триол		0,63
(-)-эпикатехин галлат	(-)-ЕСG	[2R,3R]-2-[3,4-дигидроксифенил]-3,4-дигидро-1[2H]-бензопиран-3,5,7-триол 3-[3,4,5-тригидроксibenзоат]		2,75

(-)- эпигаллокатехин	(-)-EGC	[2R,3R]-2-[3,4,5- тригидроксифенил]-3,4- дигидро-1[2H]- бензопиран-3,5,7-триол		2,35
(-)-галлокатехин галлат	(-)-GCG	[2S,3R]-2-[3,4,5- тригидроксифенил]-3,4- дигидро-1[2H]- бензопиран-3,5,7-триол 3-[3,4,5- тригидроксибензоат]		0,37
(-)- эпигаллокатехин галлат	(-)-EGCG	[2R,3R]-2-[3,4,5- тригидроксифенил]-3,4- дигидро-1[2H]- бензопиран-3,5,7-триол 3-[3,4,5- тригидроксибензоат]		10,55

При газохроматографическом определении катехинов с использованием пламенно-ионизационного (ГХ-ПИД) или масс-спектрометрического детектирования (ГХ-МС) в изотермическом или режиме программирования температуры необходима предварительная дериватизация – перевод аналитов в летучие производные [96].

В [97-99] рассматривается возможность разделения и количественного определения смеси катехинов методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) (н.ф. - силикагель; элюирующая система содержала метанол, этилацетат и уксусную кислоту в соотношении 50:50:1, объемн.).

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым (УФ) [100-102] или электрохимическим детектором (ЭД) [103] является наиболее распространенным методом определения полифенолов. При этом последний характеризуется значительно большей чувствительностью к полифенолам (для эпикатехина, например, чувствительность ЭД в 90 раз превышает УФ) [103]. Увеличение числа электроактивных фенольных

гидроксильных групп приводит к снижению окислительного потенциала: чем меньше его величина, тем больше его антиоксидантная активность.

При определении полифенолов методом ВЭЖХ с УФ-детектором приходилось учитывать то обстоятельство, что в спектре поглощения катехинов имеется два максимума в области 200 и 280 нм; интенсивность поглощения при 200 нм максимальна, но при этой длине волны поглощают и другие аналиты. Поэтому при анализе сложных объектов выбирают диапазон 275-280 нм [100, 102].

Профессиональные дегустаторы при оценке аромата чая используют такие критерии как свежий, резкий, сильный, ароматный, пресыщенный и др. Необходимо установить, какие конкретные химические соединения стоят за этими характеристиками.

В [104-105] оценку аромата чая проводили газохроматографическим методом на капиллярных колонках в режиме программирования температуры с пламенно-ионизационным или масс-спектрометрическим детектором. Всего идентифицировано около 300 летучих соединений, определяющих аромат. В некоторых работах летучие компоненты выявляют, анализируя равновесный пар, используя статический и динамический варианты парофазного анализа [92].

Другой важный показатель качества чая - содержание теанина (аминокислоты, придающей чаю сладковатый вкус). В [106] проведено совместное определение аминокислот и сахаров методом анионообменной хроматографии с амперометрическим детектором в импульсном режиме с Au-электродом.

В табл. 6 представлены основные хроматографические методы, применяемые для установления химического состава чая.

Таблица 6. Хроматографические методы, применяемые для анализа чая

№	Методы	Особенности метода	Ссылка
1	Газовая хроматография	Летучие компоненты, определяющие аромат чая. Малолетучие в виде триметилсилильных производных	[93, 94]
2	Газовая хромато-масс-спектрометрия	Для идентификации соединений	[107]
3	Бумажная хроматография	Двумерная хроматография со спектрофотометрической визуализацией	[108]
4	Тонкослойная хроматография	Разделение катехинов на целлюлозных пластинах; на пластинах с химически модифицированными фазами	[99]
5	Высокоэффективная жидкостная хроматография	Определение полифенолов чая. Идентификация теафлавинов и др.	[109, 110]
6	Высокоскоростная противоточная хроматография	Разделение теафлавинов черного чая	[111]
7	Препаративная ВЭЖХ и противоточная хроматография	Выделение в чистом виде эпигаллокатехингаллата из зеленого чая	[112]
8	Хиральная хроматография	Разделение оптических изомеров катехинов	[113]
9	Ионная хроматография	Разделение катионов; анионов двухосновных кислот	[114]
10	Эксклюзионная хроматография	Разделение высокомолекулярных соединений	[115]

1.2.2.3.2. Электрофоретические методы анализа чая

Широкое распространение при анализе природных объектов и биологических жидкостей человека получил метод капиллярного электрофореза (КЭ) с УФ-детектором, нашедший применение и для установления химического анализа чая.

Более ранние работы в основном посвящены определению полифенольных соединений в режиме капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) [116-117].

Известно, что при высоких значениях pH полифенольные соединения нестабильны. В качестве буферного электролита применяют боратный буфер с pH 8.0 – 9.5. Кроме того, в этих условиях образуются боратный комплекс с полифенолами – ионогенная аналитическая форма (рис.15).

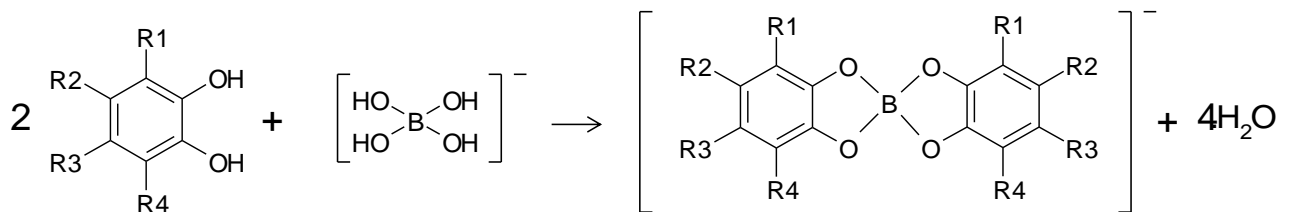


Рис.15. Схема образования боратного комплекса с полифенолами [116].

В [117] полифенолы в растительных объектах определяли методом неводного КЭ, обеспечившим определение трудно растворимых аналитов в водных средах.

В [118] для определения полифенолов в состав буферного электролита добавляли тетраэтиламмоний тетрафторборат. При этом происходило обращение электроосмотического потока (ЭОП) и взаимодействие полифенолов с катионами тетраэтиламмония. Рабочий электролит готовили на основе цитратного буфера (pH 4.0) с целью предотвращения диссоциации фенольных гидроксидов. Полифенолы мигрировали к детектору в составе положительно заряженного комплекса с тетраметиламмонием. Селективность разделения увеличивалась за счет взаимодействия полифенолов не только со свободными

катионами, но и с положительно заряженной поверхностью кварцевого капилляра.

В последнее время появилось значительное количество публикаций по определению полифенолов совместно с другими компонентами анализируемого образца методом мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ), позволяющим определять в чае соединения и неиногенной природы [119-122].

Для регистрации полифенольных соединений обычно используют спектрофотометрический детектор [116] или детектор на диодной матрице [118]. Катехины чаще всего детектируют при 200 нм.

Авторы в [123] предлагают метод совместного определения чайных полифенолов и кофеина при простейшей пробоподготовке, заключающейся в экстракции аналитов горячей водой.

В [119] совместно с полифенолами определяют аскорбиновую кислоту, которая плохо поглощает при 200 нм, и теанин, имеющий максимум поглощения при 194 нм. В качестве рабочих длин волн выбраны 194 и 270 нм. Использование детектора на диодной матрице к тому же позволяет проводить идентификацию неизвестных аналитов по спектрам поглощения.

1.2.2.3.3. Элементный анализ чая

Чайный лист является источником минеральных веществ. Чтобы получить оценку биологической доступности, необходимы адекватные *in-vitro* и *in-vivo* тесты.

Изучены условия проникновения конкретных элементов из почвы в чайный лист. При $pH < 4,5$ в растворимые формы легко переходят ионы Al^{3+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , которые затем попадают уже и в само растение, образуя в клетках комплексные соединения с органическими веществами клеток чайного куста. Важно отметить, что концентрации минеральных веществ варьируют в различных органах и зависят от возраста растения. Например, молодые листья имеют низкий уровень концентраций для ионов Al^{3+} и Pb^{2+} (1-10 мкг/г сухого веса) и высокий – для ионов Cu^{2+} и Zn^{2+} (10-100 мкг/г сухого веса). Выделяют

три группы минеральных веществ по степени экстракции при заваривании чая (табл.7).

Таблица 7. Экстракция элементов из чайного листа при заваривании [124]

Степень экстракции	Элементы
Высокая (>55%)	Co, Cs, K, Na, Ni, Rb, Tl
Средняя (20-55%)	Al, B, Cu, Cr, Mn, Mg, P, Zn
Низкая (<20%)	Ba, Ca, Fe, Mo, Sn, Sr, V, Zr

Степень экстракции зависит от способности элемента переходить из комплекса с органической матрицей в раствор при заваривании.

Обычно общую концентрацию элементов в чайном листе и уже в готовом чайном напитке определяют спектральными методами, для многоэлементного анализа в широком диапазоне концентраций применяют индуктивно-связанную плазму (ИСП) [124]; для определения токсичных элементов - нейтронно-активационный анализ [124].

1.2.3. Препараты традиционной китайской медицины

Китайская фармакология накопила колоссальный опыт применения препаратов на основе традиционной китайской медицины (ТКМ) [125-130].

Жители Китая полагают, что активное внедрение ТКМ в медицинскую практику за последние полвека способствовало увеличению средней продолжительности с 50 до 73 лет.

Число публикаций, посвященных исследованиям препаратов китайской народной медицины, за последние 20 лет значительно возросло (рис. 16).

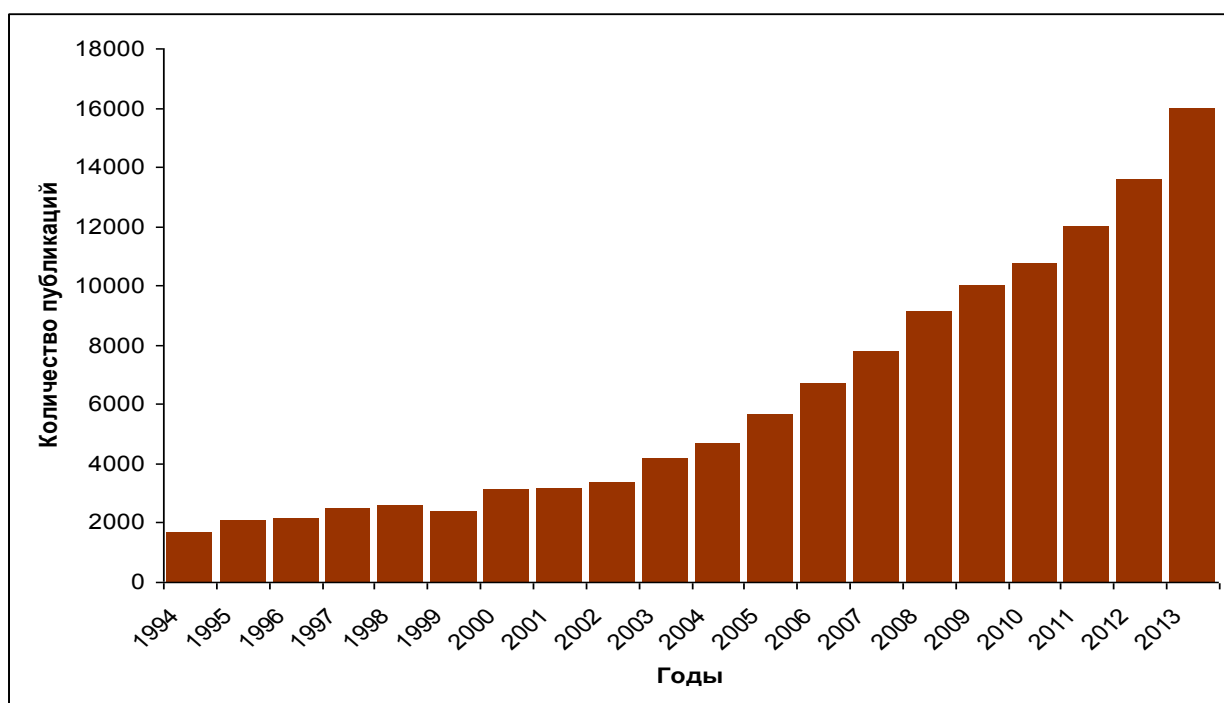


Рис. 16. Число публикаций, посвященных исследованию ТКМ, за два последних десятилетия (по данным Elsevier).

1.2.3.1. Основные направления исследований лекарственных препаратов китайской традиционной медицины

Более 2000 наименований лекарственных средств применяют в китайской медицине. Не менее трех четвертей из них составляют лекарства растительного происхождения (корни, цветы, травы, плоды или кора дерева); остальное - животного и минерального происхождения.

Опыт применения лекарственных средств накапливался в Китае в течение нескольких тысячелетий. К настоящему времени удалось определить лечебное действие примерно 200 видов лекарственных растений [127]. Считается, что для лекарственных средств, применяемых в китайской народной медицине, действие на организм больного медленнее по сравнению с современными химиотерапевтическими препаратами, и при высокой эффективности они в силу природного происхождения практически не токсичны.

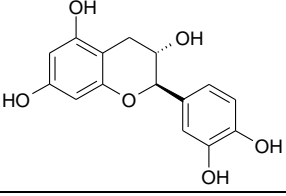
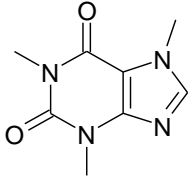
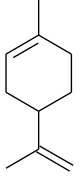
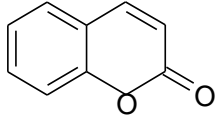
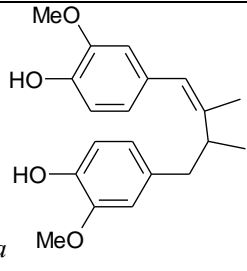
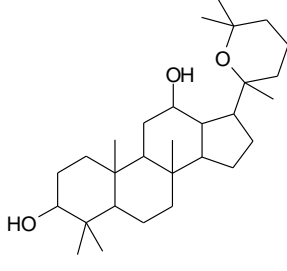
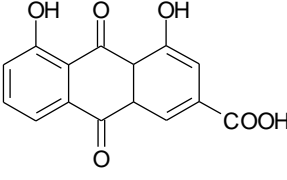
Комплекс научных исследований, связанный с максимальным установлением состава ТКМ, изучением действия на организм человека и созданием на его основе лекарственных средств, воплотился в реализации проекта "Herbalome" (*хербаломика*, по аналогии с метаболомикой и протеомикой, изучающей белки, их функции и взаимодействия в живых организмах) [131-137].

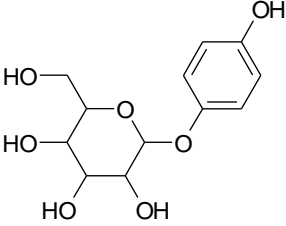
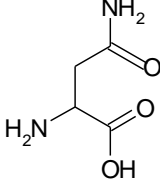
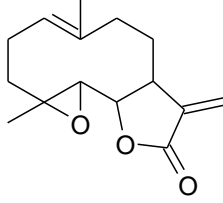
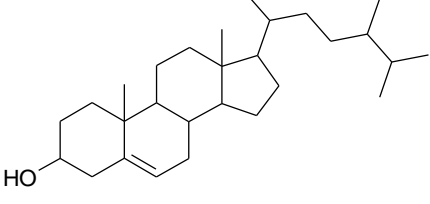
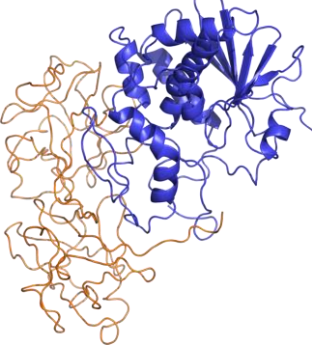
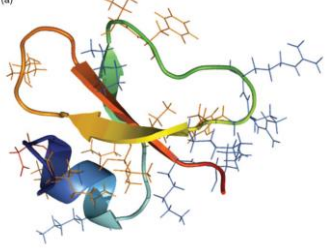
Таким образом, ТКМ в современном мире, как и многие столетия назад, занимается в основном *фармакогнозией*, т.е. изучением лекарственных препаратов, получаемых из природного сырья – источников фармакологически активных веществ с целью выявления морфологических признаков растений, географии их обитания, химического состава, способов и заготовки сырья и т.д. Необходимым является нормирование и стандартизация лекарственного растительного сырья, а также поиск новых лекарственных средств растительного происхождения для расширения ассортимента и создания более эффективных лекарств [138].

1.2.3.2. Методы исследования препаратов традиционной китайской медицины

Классы веществ, наиболее часто определяемые в препаратах ТКМ, представлены в табл. 8 [133].

Таблица 8. Классы веществ, наиболее часто определяемые в растительных препаратах традиционной китайской медицины [133]

Класс веществ	Типичный представитель	Частота упоминания в научных изданиях
Полифенолы	 <i>катехин</i>	40,7%
Алкалоиды	 <i>кофеин</i>	14,4%
Терпеноиды	 <i>лимонен</i>	12,6%
Кумарины	 <i>кумарин</i>	7,7%
Лигнаны	 <i>гваяретовая кислота</i>	5,6%
Сапонины	 <i>панаксадиол</i>	4,4%
Антрахиноны	 <i>реин</i>	3,6%

Гликозиды	 <p><i>арбутин</i></p>	2,2%
Амиды	 <p><i>аспарагин</i></p>	1,7%
Лактоны	 <p><i>партенолид</i></p>	1,4%
Стероиды	 <p><i>β-ситостерол</i></p>	1,2%
Гликопротеины	 <p><i>рицин</i></p>	0,8%
Пептиды	 <p><i>дефензин</i></p>	0,5%
Другие		3,2%

В растениях фенольные соединения выполняют различные функции: защищают от УФ-излучения, являются ростовыми гормонами, пигментами и ароматизаторами. В пищевых продуктах их присутствие способствует окислительной стабильности и требуемым органолептическим характеристикам (горечь, аромат, терпкость) [139]. Необходимы селективные методы, обеспечивающие низкие пределы обнаружения подобных биоактивных соединений [140].

Подготовка образца является первым и очень важным шагом для любого инструментального анализа ТКМ, поскольку требуется удалить матричные компоненты, сохранив количество определяемого вещества, необходимое для анализа. Традиционные процедуры пробоподготовки включают измельчение (высушенного или замороженного образца), гомогенизацию, экстракцию растворителем, центрифугирование, фильтрование [139].

Наиболее часто используют методы хроматографии (ТСХ, ВЭТСХ, ВЭЖХ, ГХ) и капиллярного электрофореза (КЗЭ, МЭКХ) в сочетании с различными вариантами детектирования и концентрирования [141-157].

Планарная хроматография (ТСХ и ВЭТСХ) является удобным и недорогим методом разделения для анализа образцов растительных препаратов [141]. В связи с появлением видео-систем ТСХ может быть применена для количественного анализа [142]. В [143] авторы используют термостатируемую микротонкослойную хроматографию, достигая разделения 10 веществ в одно- и до 180 для двумерного вариантов проявления. В [144] ТСХ пластина совмещена с масс-спектрометром. Для сокращения времени анализа применяют и высокие давления [145]. Чтобы исключить испарение подвижной фазы, используют низколетучие элюирующие системы [146].

Таким образом, ТСХ остается на лидирующих позициях при получении первичных характеристических профилей образцов лекарственных препаратов, что важно при экспрессной оценке их качества [147].

Газовая хроматография (ГХ) является признанным методом анализа летучих компонентов препаратов ТКМ в связи с высокой чувствительностью,

стабильностью и эффективностью, особенно в сочетании с масс-спектрометрическим детектором. В обзоре [148] описаны методики пробоподготовки растительных препаратов к ГХ анализу, включающие парофазную и твердофазную микроэкстракцию из одной капли, микроэкстракцию горячим водяным паром высокого давления и др. Преимуществами таких подходов является отсутствие необходимости в использовании для экстракции органических растворителей [148].

Для анализа сложных смесей все большее значение приобретает метод двумерной ГХ. Принцип действия следующий: проба последовательно проходит через две колонки с различными механизмами разделения, что заметно облегчает идентификацию неизвестных аналитов (рис. 17). Иногда размещают 2 детектора – на выходе из первой колонки и выходе - из второй [149].

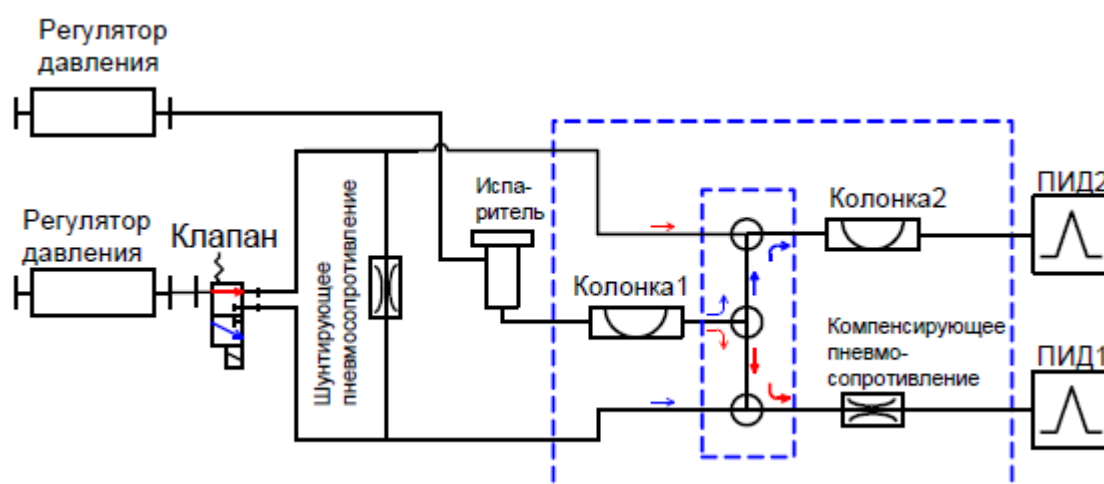


Рис. 17. Алгоритм работы двумерной газовой хроматографии.

Так, в [150] разделены одновременно 769 соединений в растении *Notopterygium incisum*. Двумерная газовая хроматография может быть использована для обнаружения некоторых микрокомпонентов и примесей, получения «отпечатков пальцев» образцов и идентификации неизвестных летучих соединений в препаратах ТКМ [148].

Благодаря эффективному разделению и способности анализировать смеси термически нестабильных и нелетучих соединений, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии активно применяется для контроля качества

китайских лекарственных средств и оценки их содержания [133,148]. Чаще всего применяют детекторы на диодной матрице, например, при совместном определении 17 флавоноидов и сапонинов в корне астрагала [151]. ВЭЖХ с импульсным амперометрическим детектированием использовали при определении гликозидов [152]. Однако все более существенную роль при анализе лекарственных препаратов растительного происхождения играют методы ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием [153]. В обзорах [153-155] подчеркивается, что ВЭЖХ является мощным аналитическим инструментом не только для количественного анализа, но и для определения характеристических «отпечатков пальцев» различных трав.

В последние годы активно востребован для этих целей метод капиллярного электрофореза (КЭ). Это связано с его более высокой эффективностью по сравнению с ВЭЖХ, низким расходом реагентов, возможностью проводить определение аналитов с большим диапазоном полярности и молекулярных масс [156].

Так, алкалоиды, легко диссоциирующие в водной среде и имеющие в составе молекул хромофорные группы, являются удобными аналитами для капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) с УФ-детектированием [157]. Описано применение и других модификацией КЭ при анализе растительных лекарственных средств – мицеллярная электрокинетическая хроматография (МЭКХ) [158], неводный КЭ [156], капиллярный изотахофорез и микрочиповый капиллярный электрофорез [147].

Именно ВЭЖХ и КЭ занимают лидирующие позиции при скрининге, т.е. быстрой оценке качества растительных препаратов. Источником информации при этом являются полученные хроматограммы и/или электрофореграммы соответствующих образцов [147].

Так, в [134] исследованы 15 образцов готовых лекарственных препаратов от различных производителей и зарегистрировано 40 компонентов (рис. 18 а). С помощью специального программного обеспечения сформирован усредненный

вариант «отпечатков пальцев» (рис. 18 б), позволивший выделить 22 характеристических пика.

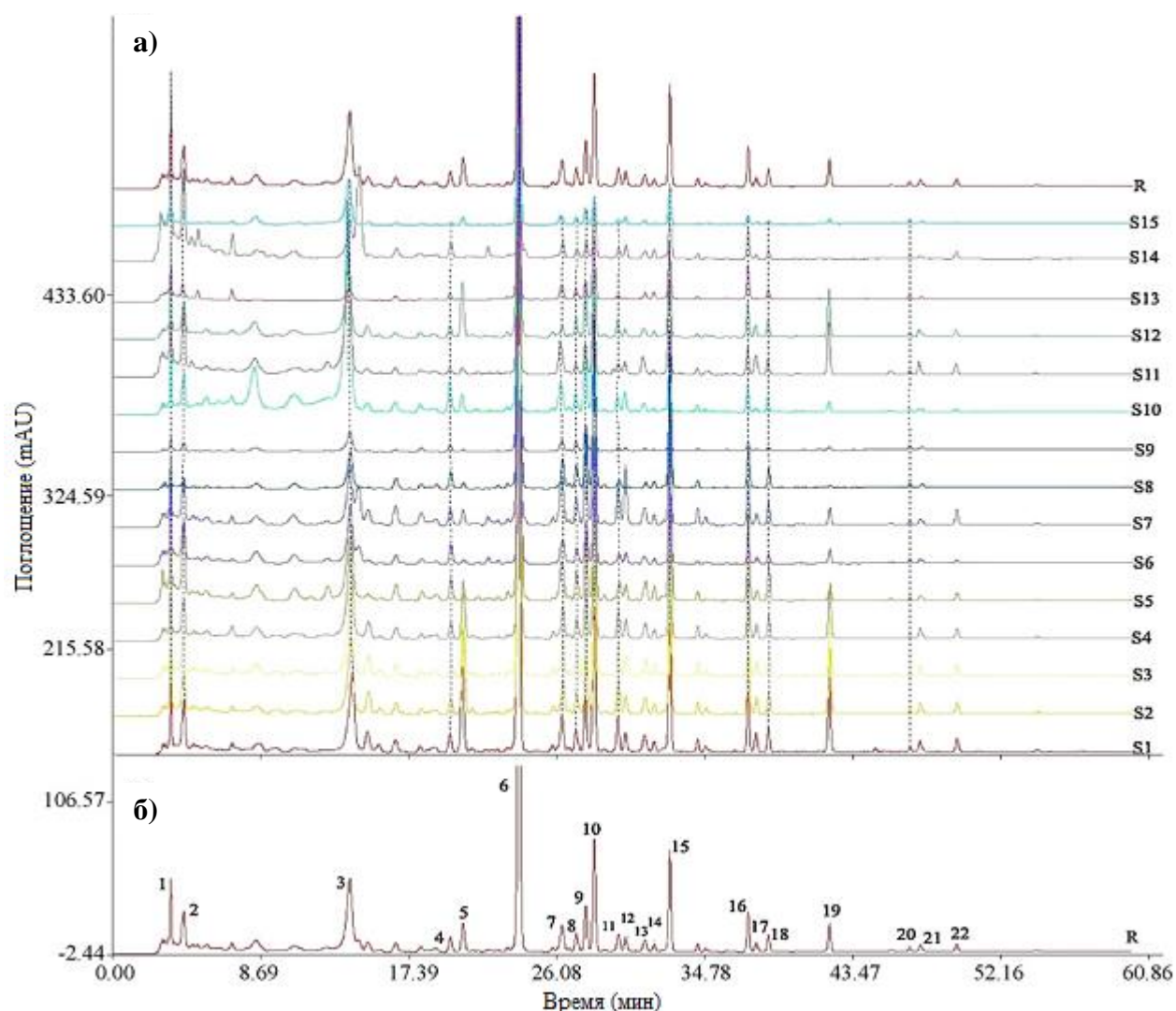


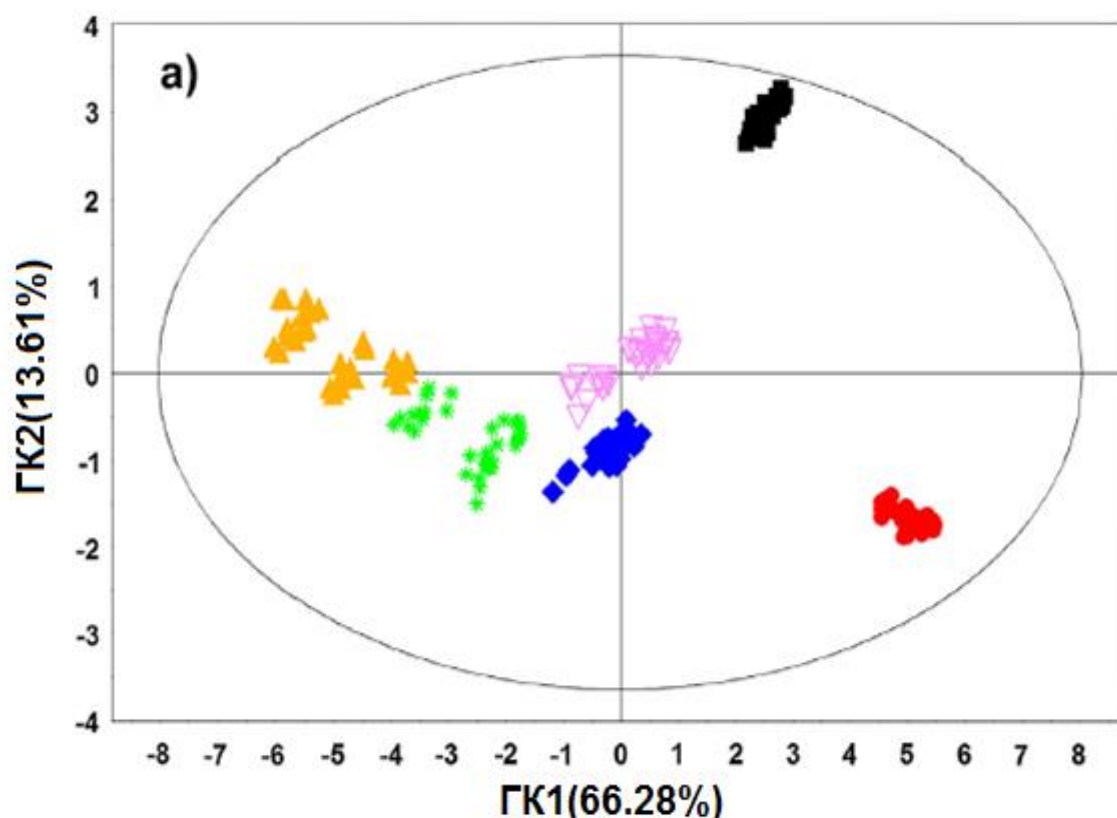
Рис. 18. Характеристические профили для 15 образцов традиционной китайской медицины (а) и усредненный профиль (б) [134].

Так, на представленной хроматограмме пик №6 (рис. 18) имеет существенно большую площадь. Он и выбран в качестве внутреннего стандарта. Другим важным параметром является относительное время удерживания. Хроматографические профили в целом схожи, хотя интенсивность поглощения отдельных компонентов и их количество могут отличаться. В таких случаях получают усредненную хроматограмму. Большинство значений коэффициентов подобия составили 0.992-0.997, что свидетельствует об идентичности лекарственных препаратов от различных производителей. Именно таким образом рекомендуют производить контроль качества готовой продукции [158].

По аналогии с понятием *биоэквивалентности* (степень подобия двух лекарственных средств), введен термин *фитоэквивалентность* [159]. Образцы растительных препаратов считаются фитоэквивалентными при совпадении хроматографических или электрофоретических профилей не менее чем на 90%. Такой анализ важен при сборе одного вида растений из разных регионов происхождения (условия произрастания могут сказаться на химическом составе лекарственного препарата) [159].

Методы хемометрики широко используются при обработке результатов анализа лекарственных растений [147]. Графические зависимости, позволяющие выделить группы образцов, строятся чаще всего методом главных компонент (МГК).

Примеры графиков в координатах первых двух (а) [160] и первых трех (б) [161] главных компонент представлены на рис. 19.



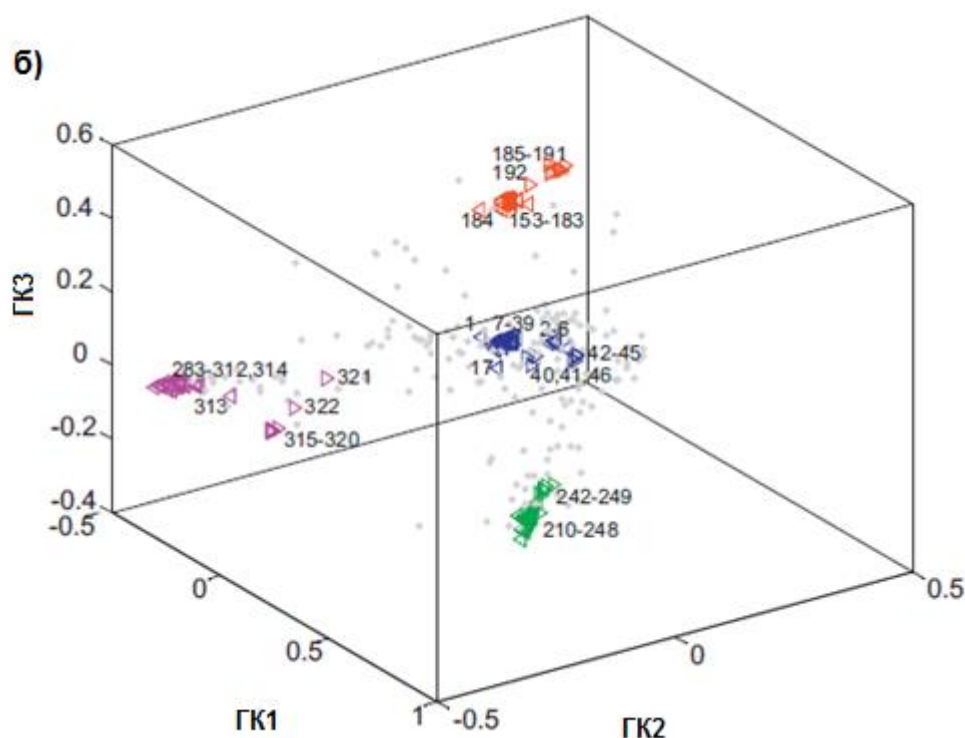


Рис. 19. Примеры графиков счетов при идентификации образцов ТКМ ([160]-а, [161]-б).

Таким образом, применение хроматографических профилей в сочетании с хемометрическими методами расширяют возможности контроля качества лекарственных средств растительного происхождения ТКМ.

1.3. Методы анализа многомерных данных

Анализ многомерных данных, т. е. таких, которые содержат информацию о трех или более признаках для каждого объекта, сформировался первоначально в начале XX в. в психологии. С появлением электронно-вычислительной техники в начале 1970-х гг. он стал востребованным и в других дисциплинах. Позднее появилась хемометрика [162] как самостоятельная дисциплина в аналитической химии. Появление новых задач, развитие методов привело к выделению хемометрики в отдельную науку [163-168].

По ходу этих операций ставится и решается поэтапно ряд последовательных задач: постановка цели эксперимента => выбор метода и методики => отбор пробы => пробоподготовка => измерение аналитического сигнала => обработка информации, оценка и интерпретация результатов. В ходе

анализа происходит одновременно «вскрытие» информации об аналитической системе и ее свойствах. Для ее «извлечения» необходимо привлекать теоретические модели, методы теории информации и распознавания образов, математической статистики, теории планирования и оптимизации эксперимента, которые в совокупности и составляют основу хемометрики.

Выбор того или иного подхода к обработке данных зависит от конкретной задачи.

Так, для *описания* общей картины данных (моделирования их структуры) самым популярным является метод главных компонент (МГК), позволяющий выделить группы образцов, схожих или различных между собой.

Для отождествления неизвестных образцов с одним из известных классов, т.е. при решении *классификационных* задач используют различные подходы: формальное независимое моделирование аналогий классов, логистическую регрессию и др.

Чтобы установить численные корреляции между матрицей откликов мультисенсорной системы и каким-либо численным свойством образцов используют *регрессионный анализ* с линейными и нелинейными методами: проекция на латентные структуры, метод искусственных нейронных сетей и др. Один из наиболее востребованных – метод проекция на латентные структуры. Строится модель, связывающая матричные данные с вектор-столбцом.

Если требуется сравнить между собой аналитические методы, результатом измерений которых являются матрицы, то применяют *корреляционный анализ*: вычисляют коэффициенты матричных корреляций, проводят канонический корреляционный анализ и т.д.

Общая классификация хемометрических подходов в зависимости от решаемой задачи представлена на рис. 20.



Рис. 20. Классификация хемометрических подходов [162].

1.4. Применение мультисенсорных систем при анализе сложных объектов природного происхождения

1.4.1. Мультисенсорный подход при анализе мочи

Одно из первых упоминаний о применении потенциометрической мультисенсорной системы при анализе образцов мочи появилось в 2000 г. [169]. Проведена оценка содержания диагностически важных аналитов (белка, глюкозы, кетонов и др.), а также клеток крови, значение pH и плотности образцов биологических жидкостей. Образцы исследовались *электронным носом* и *электронным языком*. Потенциометрическая система состояла из 7 мембранных электродов, основанных на поливинилхлоридной матрице с металлопорфиринами кобальта, цинка, олова и др. В случае *электронного носа* корреляция наблюдалась лишь с количеством кровяных клеток, а для *электронного языка* – с уровнем pH и плотностью.

Более успешное применение потенциометрической мультисенсорной системы для анализа образцов мочи описано в работах [170-171].

В [170] предложена система сенсоров для определения ионов аммония, калия, натрия, суммарного содержания щелочных ионов, а также биосенсора на мочевины. Отклики от массива, содержащего 37 модельных образцов, были обработаны методами ИНС и ПЛС при совместном определении мочевины, ионов аммония, калия и натрия. Проверка адекватности моделей осуществлялась с использованием 3 реальных образцов мочи и 18 образцов мочи с добавками определяемых компонентов. Погрешность не превысила 8% для моделей ИНС и 13% для ПЛС.

Позднее эти же авторы дополнительно ввели в свою систему биосенсор, чувствительный к креатинину [171]. Модель, построенная с применением метода ИНС на 27 модельных растворах и проверенная на 13 реальных и модельных образцах, обеспечила возможность совместного определения мочевины, креатинина, ионов аммония, калия и натрия с ошибкой 3 - 9%.

В [172] описано применение мультисенсорной системы, состоящей из 8 металлических электродов (Co, двухкомпонентных сплавов – Sn/Pb, Cu/P, Cu/Zn, четырех сплавов серебра – Ag/Cu/Zn/Cd, Ag/Cu/Sn, Ag/Cu/Zn/Sn – в различных соотношениях) и пяти сенсоров с полимерными мембранами. Целью этого исследования явилось выявление дисфункций мочеполовой системы и определение содержания креатинина. Данные от массива потенциометрических сенсоров сравнивались с результатами газохроматографического анализа тех же образцов по 4 классам уровня креатинина методами ПЛС и ИНС. Правильность определения составила 92,5%. Кроме того, установлена возможность дифференциации образцов мочи между людьми с присутствием/отсутствием новообразований в мочеполовой системе.

Таким образом, к моче как к объекту исследования применялись потенциометрические мультисенсорные системы различных типов. Однако, проблема совместного определения диагностически важных неорганических

ионов и органических соединений в образцах мочи до настоящего времени не была решена.

1.4.2. Анализ чая с помощью мультисенсорных систем

Одна из первых работ по анализу различных образцов чая мультисенсорной системой представлена в [173]. Система включала три металлических рабочих электрода (иридиевый, платиновый и родиевый), хлорсеребряный электрод сравнения и вспомогательный стальной электрод (рис. 21).

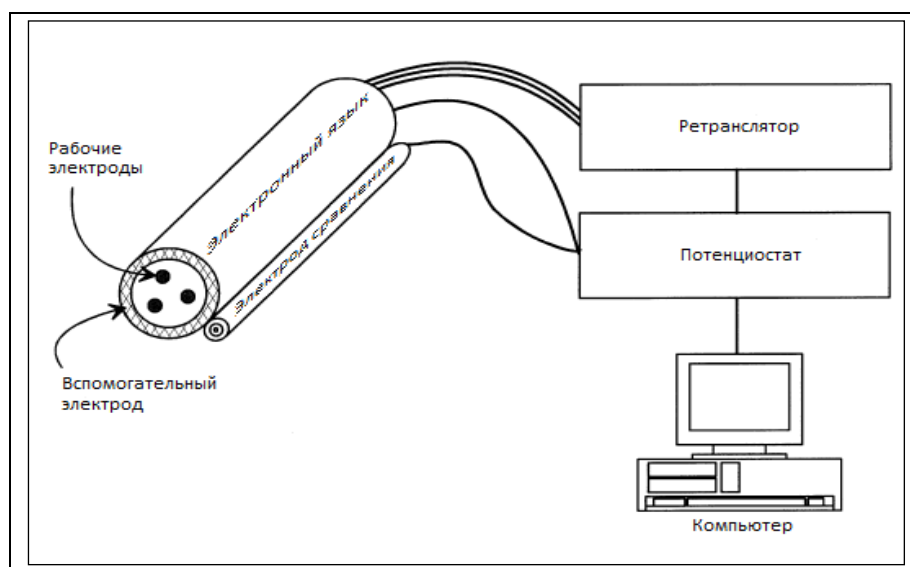


Рис. 21. Измерительная схема мультисенсорной системы [173].

Вольтамперограммы получены при разных условиях: с высоко- и низкоамплитудным импульсом, а также со ступенчатой разверткой потенциала. Методом главных компонент показано, что лучшей дискриминационной способностью для 9 исследованных образцов чая обладает вольтамперометрия с высокоамплитудным импульсом.

Одной из важнейших задач, решаемых с помощью мультисенсорных систем, является инструментальная оценка степени ферментации образцов чая. Для этого в [174] предлагается проточно-инжекционная система, отклик которой основан на суммарной величине потенциала окисления/восстановления: 10 анализируемых образцов помещались в проточную ячейку, где рабочими электродами служили платиновый, золотой и стеклоуглеродный, а в качестве электрода сравнения – хлорсеребряный. Выявлено, что неферментированный

зеленый чай дает значительно меньшие величины аналитического сигнала. Это связывают с большим, по сравнению с черным чаем содержанием полифенольных соединений, что подтверждается данными ВЭЖХ и КЭ для этих же образцов.

В [175] для оценки степени ферментации используют мультиэлектродную импедансную спектроскопию. Измерительная система состояла из рабочих электродов – платинового, золотого, серебряного, стеклоуглеродного, полианилинового и полипиррольного, а также хлорсеребряного электрода сравнения. С помощью данной системы исследованы возможности классификации различных образцов индийского черного чая. В силу достаточной стабильности и высокой скорости отклика предлагается использовать такую же систему для контроля стадии ферментации в чайной промышленности.

Другой важной задачей при анализе чая является инструментальная оценка его вкусовых качеств [176-177]. Предполагается, что на потребителя оказывает влияние не только вкус заваренного чая, но и его аромат. Именно поэтому в работах данного типа используют системы «электронный язык» и «электронный нос». Вольтамперометрический «электронный язык» состоял из 5 металлических рабочих электродов (золотого, иридиевого, палладиевого, платинового и родиевого), хлорсеребряного электрода сравнения и вспомогательного платинового электрода.

Потенциометрические мультисенсорные системы также применялись при анализе чая. Так, в [178] исследованы сорта черного чая из различных регионов произрастания (север-юг Шри-Ланки) и с разных по высоте над уровнем моря плантаций. Для анализа образцов использовались «электронный нос», «электронный язык» и дегустаторы, оценивающие различные оттенки вкуса и запаха (рис. 22).

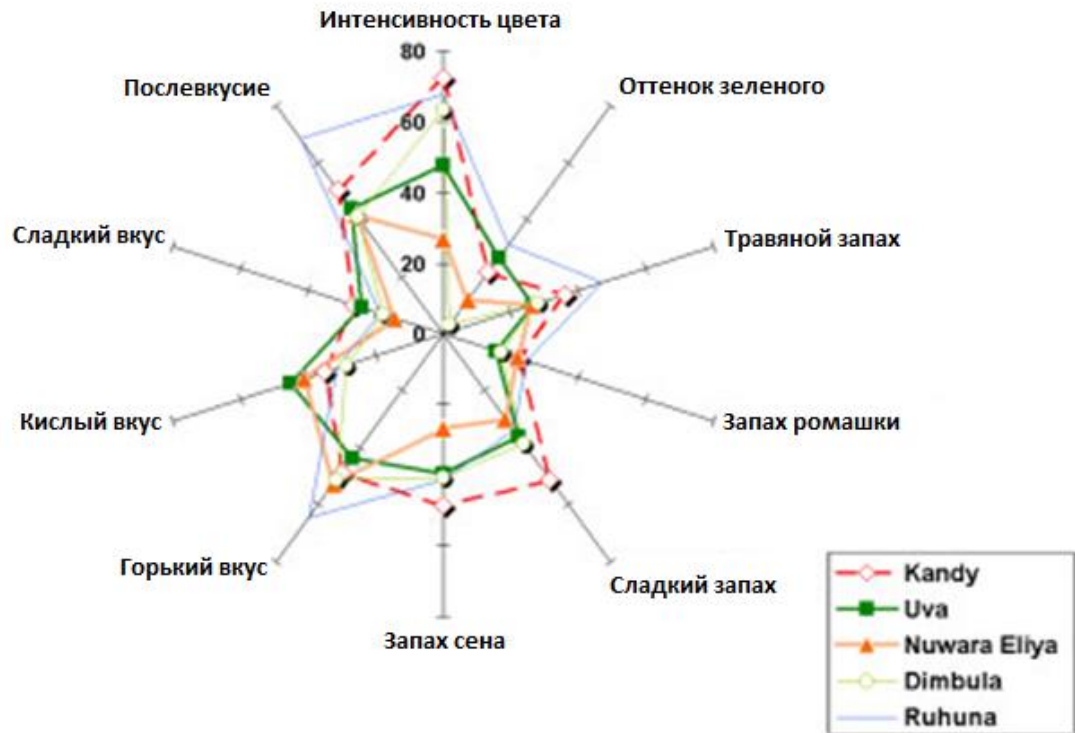


Рис. 22. Профили дегустаторских оценок для 5 образцов чая [178].

Данные «электронного языка», состоящего из 7 потенциметрических сенсоров, обработаны различными хемометрическими методами. Показана способность к классификации сортов чая по географическому положению, а также корреляция с показаниями дегустаторов.

Считается, что на вкус чая влияют конкретные химические соединения, входящие в его состав: кофеин и катехин – *горький*; сахароза и глюкоза – *сладкий*; L-аргинин и теанин – *кислый*. Именно для этих аналитов в [179] обнаружены корреляции между указанными характеристиками и показаниями мультисенсорной микрочиповой системы, принцип работы которой основан на применении 30 сенсоров с поливинилхлоридными или полиуретановыми мембранами с различными добавками. Данные от 36 модельных и 7 реальных образцов чая обрабатывались МГК и ПЛС.

Таким образом, к чаю как к объекту исследования, применялись мультисенсорные системы, в основном, на принципах вольтамперометрии, для решения классификационных задач.

1.4.3. Применение мультисенсорных систем для анализа растительных препаратов традиционной китайской медицины

Среди многочисленных публикаций, посвященных анализу препаратов традиционной китайской медицины (ТКМ), сведения о применении мультисенсорных систем весьма скудные. Обсуждаются возможности инструментального определения вкуса растительных препаратов ТКМ [180-184]. Характерный горький вкус связывают с содержанием берберина (рис. 23).

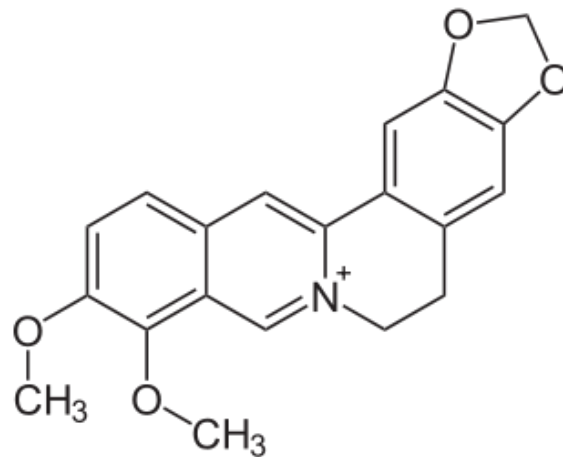


Рис. 23. Химическая структура берберина.

Веществом, отвечающим за вяжущий вкус, является таннин (рис. 24) [180].

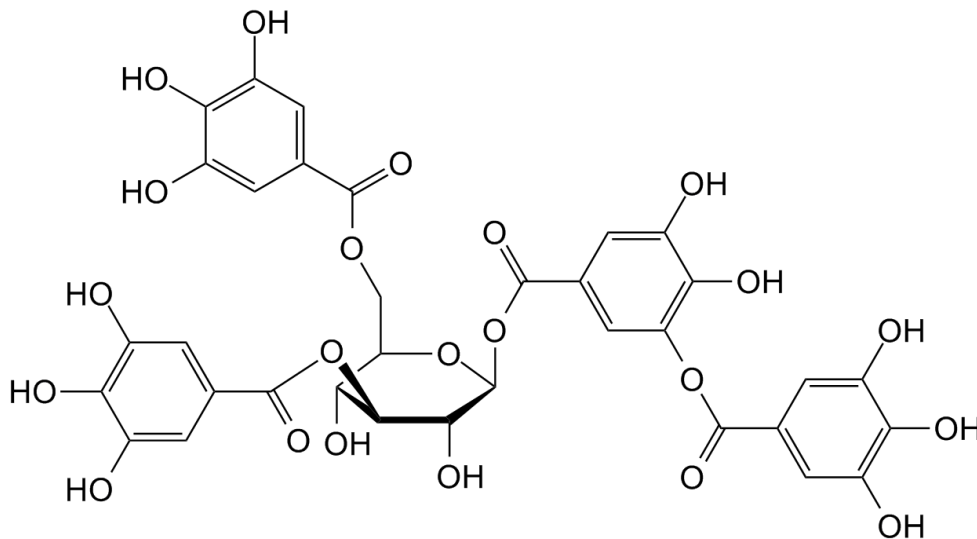


Рис. 24. Химическая структура таннина.

В [180] применена мультисенсорная система для характеристики «вкуса» 21 образца лекарственных препаратов. Предлагаемый массив состоял из 5

полимерных сенсоров; аналитический сигнал представлял собой разницу между значением потенциала в исследуемом и растворе сравнения (винная кислота в растворе хлорида калия). С использованием МГК образцы разделялись на группы, в которых выделялись области наиболее горьких и вязущих препаратов.

В [181] описана мультисенсорная система, откалиброванная по 9 уровням концентраций берберина. Авторы полагают, что подобную градуировку, построенную с помощью ИНС, можно применить и к реальным образцам ТКМ.

В работе [182] выполнен следующий эксперимент: дегустаторы, основываясь на шкале горькости для берберина, оценивали горькость фармпрепаратов. Затем все образцы изучались мультисенсорной системой. Построенная ПЛС-модель показала, что относительная погрешность определения горькости лекарственных средств мультисенсорной системой не превысила 15% по шкале дегустаторов.

В [183] оценивался вкус трех сортов препарата *Perilla frutescens* с применением *электронного носа, электронного языка* и панели дегустаторов.

Мультисенсорная система применена и для оценки различных вкусовых оттенков (кислый, горький, сладкий, соленый) 22-х образцов лекарственных ТКМ [184]. Результаты МГК-обработки показали возможность разделения образцов на 5 классов согласно различиям во вкусах.

Таким образом, к препаратам китайской традиционной медицины как к объекту исследования мультисенсорные системы применялись только с целью определения вкуса.

Применение мультисенсорных систем в сочетании с хемометрической обработкой полученных данных позволяет решать разнообразные задачи, связанные с анализом сложных объектов природного происхождения. Преимуществами мультисенсорного подхода являются удобство в обращении, экспрессность анализа, низкая стоимость оборудования, простота пробоподготовки. Последний аспект является одним из самых важных, поскольку в традиционных методах анализа на подготовку образца сложного состава к определению того или иного компонента расходуется большое количество реагентов (например, при жидкостной экстракции), процедуры длительны по времени и требуют квалифицированного персонала.

Основная задача данного исследования заключается в выявлении возможности мультисенсорных систем при анализе сложных объектов природного происхождения (образцов чая, лекарственных препаратов традиционной китайской медицины, биологических жидкостей).

ГЛАВА 2. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЪЕКТОВ И МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Аппаратура

Для работы с образцами чая использовался массив перекрестно-чувствительных потенциометрических сенсоров, состоящий из 10 анион-, 5 катион-чувствительных сенсоров с жидким контактом и 4-х твердотельных электродов.

Анализ мочи проводился мультисенсорной системой, состоящей из 9 анион- и 9 катион-чувствительных сенсоров.

Для работы с образцами растительных препаратов ТКМ использовали массив сенсоров, состоящий из 5 анион-чувствительных, 7 катион-чувствительных сенсоров с жидким контактом и 4-х твердотельных электродов.

Сенсоры были разработаны и подобраны на основании предыдущего опыта работы с различными образцами в Лаборатории Химических Сенсоров СПбГУ (рис. 25). Каждая мультисенсорная система снабжена стандартным рН-электродом (Гомель, Беларусь) и хлорсеребряным электродом сравнения ЭВЛ 1М 3.1 (Гомель, Беларусь).

Измерения проводились в следующем гальваническом элементе:



Показания снимались на многоканальном электронном цифровом вольтметре с высоким входным сопротивлением, подключенном к персональному компьютеру для сбора и обработки данных, которая проводилась с помощью программного обеспечения «R version 2.13.0» (The R Foundation for Statistical Computing) и «Unscrambler 9.7» (CAMO, Norway).



Рис. 25. Потенциометрическая мультисенсорная система.

Для работы с образцами чая использовался также массив вольтамперметрических электродов (рис. 26). Среди них: 6 рабочих электродов – медный, палладиевый, стальной, стеклоуглеродный, никелевый и золотой; хлорсеребряный электрод сравнения и вспомогательный платиновый электрод.

Для получения откликов использовался метод импульсной вольтамперметрии. Сканирование потенциалов проводилось от $-0,2$ до $+0,8$ В со скоростью сканирования $0,1$ В/с.

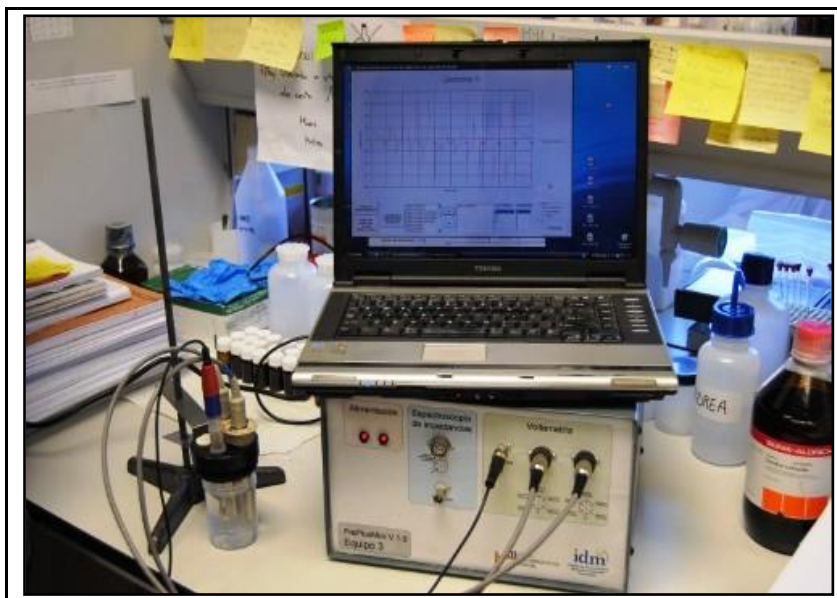


Рис. 26. Вольтамперметрическая мультисенсорная система.

Электрофоретический анализ проводили на системе капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ 105» (рис. 27) со спектрофотометрическим детектором (диапазон длин волн 200-390 нм). Диапазон изменения рабочего напряжения от 1 до 25 кВ. Кварцевый капилляр имеет внутренний диаметр 75 мкм и эффективную длину 50 см (общая длина – 60 см). Термостатирование капилляра осуществляется за счет водного охлаждения (точность 0,01 °С). Обработка результатов проводилась с помощью программного обеспечения «Мультихром для Windows, версия 1.5».

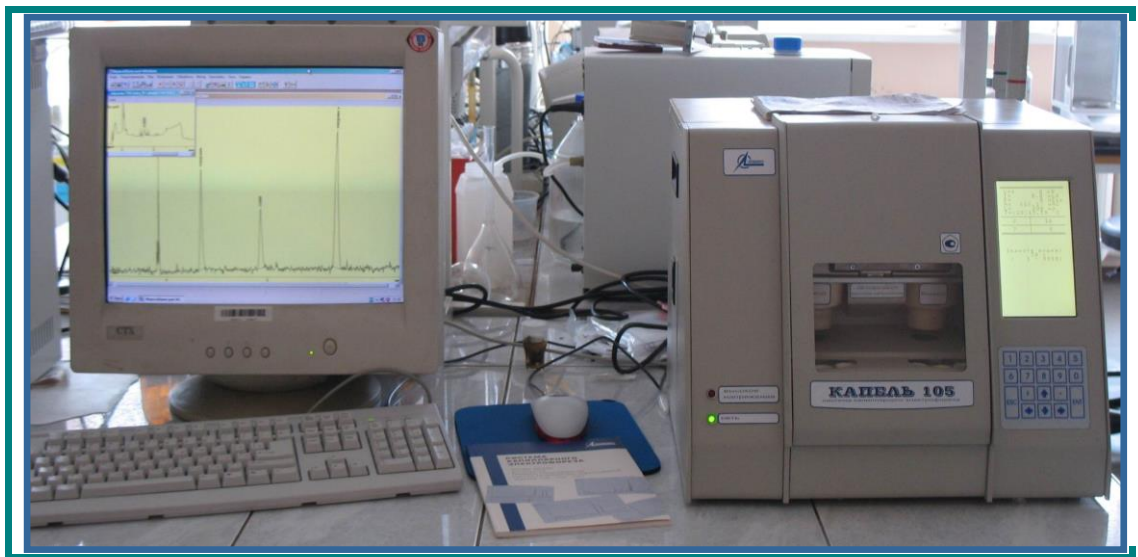


Рис. 27. Система капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ 105».

Анализ образцов мочи выполнен на системе капиллярного электрофореза «Agilent 1100 CE-DAD» (рис. 28). Детектирование на диодной матрице предназначено для регистрации оптического поглощения при 190 - 600 нм. Диапазон изменения рабочего напряжения от 1 до 30 кВ.

Кварцевый капилляр: внутренний диаметр 75 мкм; эффективная длина 40 см (общая длина – 48 см). Термостатирование капилляра осуществлялось за счет воздушного охлаждения (точность 0,01 °С). Обработка результатов проводилась с помощью программного обеспечения «ChemStation».



Рис. 28. Система капиллярного электрофореза «Agilent 1100 CE-DAD».

Работа выполнялась на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1200 (рис. 29), укомплектованным градиентным насосом со спектрофотометрическим детектором; колонка (250×4.6 мм) YMC-Triart C18 (5 мкм).



Рис. 29. Жидкостный хроматограф «Agilent 1200».

Оценка чая по ряду важных параметров качества проведена в специализированной индийской лаборатории (C-DAC, Калькутта): методом ВЭЖХ определялось содержание теафлавина и теарубигина; методом ГХ - интенсивность аромата; колориметрическим методом — цвет.

Профессиональными дегустаторами чая (*ти-тестерами*) выставлены оценки от 1 до 10 баллов всем исследуемым образцам в соответствии с критериями: яркость, резкость и крепость вкуса, общее качество. Горькость препаратов ТКМ оценена специально обученными людьми по шкале от 0 до 6, где 0 – горькость отсутствует, 6 – максимально горько.

Определение показателя кислотности (pH) растворов проводилось методом прямой потенциометрии с использованием рН-метра МУЛЬТИТЕСТ ИЛ-301 и ионоселективного электрода InLab Expert Pro (Mettler Toledo).

Определение плотности образцов мочи проводилось с помощью рефрактометра ИРФ-454 Б2М.

Вспомогательные устройства:

Весы электронные Ohaus Discovery, предел допускаемой погрешности $\pm 0,00001$ г, класс точности (по ГОСТ) – 1.

Центрифуги Centurion Scientific Ltd и Eppendorf.

Ультразвуковая ванна УЗВ (ЗАО «ПКФ Сапфир»), 1,3 л.

Станция очистки воды Millipore Milli Q Synthesis.

Установка для выпаривания Calliper.

Термостат с функцией нагрева и охлаждения (-10°C – 100°C) BIOSAN.

Вортекс BIOSAN.

Морозильник (-20°C ... -30°C), Sanyo.

Микродозаторы переменного объема фирмы «БИОНИТ» вместимостью 0,1 – 2,5; 2 – 20; 20 – 200; 200-1000 мм³ с пределом допускаемой погрешности измерения не более 5%.

Мерный цилиндр (Химлаборприбор), 100 мл, предел допускаемой погрешности ± 1 мл, класс точности (по ГОСТ) – 2.

Шприц медицинский, 5 мл.

Фильтры Chromafil АО 45/3.

Магнитная мешалка «ИКА color squid» (Германия).

Ячейка для потенциометрических измерений, 100 мл, тефлоновая.

2.2. Реагенты

Стандартные образцы полифенолов: катехин (Sigma-Aldrich, 99%), эпикатехин (Sigma-Aldrich, 99%), эпикатехин галлат (Sigma-Aldrich, 99%), эпигаллокатехин (Fluka, $\geq 90\%$), галлокатехин галлат (Sigma-Aldrich, 99%), эпигаллокатехин галлат (Fluka, $\geq 97\%$), галловая кислота (Sigma-Aldrich, $\geq 97,5\%$).

Стандартные образцы алкалоидов: теобромин (Sigma-Aldrich, 99%), теофиллин (Sigma-Aldrich, 99%), кофеин (Sigma-Aldrich, 99%).

Стандартные образцы антрахинонов: реин (LKT Laboratories, 88,7%), 1,8-дигидроксиантрахинон (Sigma-Aldrich, 95,5%).

Реактивы для приготовления стандартов при анализе мочи: хлорид натрия (Вектон, ч.д.а.), хлорид калия (Вектон, ч.), сульфат магния семиводный (Вектон, х.ч.), хлорид кальция (Вектон, ч.), ацетат аммония (Fluka, 99%), ортофосфорная кислота (Sigma-Aldrich, 99%), щавелевая кислота двухводная (ЭКРОС, х.ч.), лимонная кислота (Merck, 99%), мочева кислота (Sigma-Aldrich, 99%), креатинин (Вектон, имп.).

Реактивы для приготовления буферов и подготовки капилляра в КЭ: гидроксид натрия (Merck, 99%), соляная кислота - 37% (Sigma-Aldrich, 99%), оксид хрома (Акрос, 99%), диэтанолламин (ДЭА) (Вектон, 95%), цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ) (Sigma-Aldrich, 95%), винная кислота (Sigma-Aldrich, 99%), бензимидазол (БИА) (Sigma-Aldrich, 98%), 18-краун-6 (Sigma-Aldrich, 99%), гидрофосфат натрия 12-водный (Fluka, 98%), дигидрофосфат натрия двухводный (Sigma-Aldrich, 99%), додецилсульфат натрия (РЕАХИМ, ч.д.а.).

Вспомогательные реактивы: дистиллированная вода, очищенная с помощью системы Milli Q Synthesis, диметилсульфоксид (Вектон), метанол (Merck), этилацетат (Вектон), ацетонитрил (Biosolve), муравьиная кислота (Fluka), TWEEN 20 (полиоксиэтилен-20-сорбитан монолаурат) (Геликон, ч.д.а.).

2.3. Анализируемые образцы

Образцы мочи

117 образцов мочи пациентов Лаборатории Мочекаменной Болезни, 19 образцов здоровых доноров. Образцы проанализированы в биохимической лаборатории ЦКП «Аналитическая спектрометрия» (Санкт-Петербург, Россия).

Образцы чая

- «Принцесса Ява», китайский зеленый чай байховый с ароматом жасмина. ООО «Орими Трэйд», СПб
- «Tess LIME», чай зеленый байховый, ароматизированный. ООО «НЭП», СПб
- «Greenfield» китайский зеленый чай, плантационный. ООО «Орими Трэйд», СПб
- «Ahmad», чай черный байховый листовый цейлонский Orange Pekoe. Изготовлен: Ahmad Tea, Шри-Ланка, под контролем: Ahmad Tea, Лондон (Великобритания). Импортер: ООО «СДС-ФУДС», Москва
- «Riston», чай черный байховый цейлонский крупнолистовой, стандарт Pekoe. Изготовлен: Шри-Ланка. Импортер: ООО «В. М. Н. Бизнес Системс», Москва
- «Monarch», черный крупнолистовой чай 100% цейлонский стандарт ОПА, высший сорт. Выращен и собран в Шри-Ланка. Упакован «Монарх Тинт», СПб
- «Индийский, тот самый чай», черный байховый мелкий, сорт первый. Изготовитель не указан. Упакован: ООО «Московская чайная фабрика», Москва

- «Принцесса Нури», цейлонский чай черный байховый крупнолистовой, сорт: БЕСТ. Изготовитель не указан. Под контролем «Орими Трэйд», СПб
- «Лисма», чай цейлонский мелколистовой черный байховый, первый сорт. Изготовитель: ОАО Компания «Май», г. Фрязино Московская обл.
- «Greenfield» ГОЛДЕН ЦЕЙЛОН, цейлонский чай черный байховый. Сорт: БУКЕТ. Специально для Greenfield Tea, Лондон, под контролем ООО «Орими Трэйд», СПб

Образцы индийского черного чая разных сортов от производителя, зашифрованные под номерами: 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 20. Образцы проанализированы в лаборатории С-ДАС (Калькутта, Индия).

Образцы препаратов ТКМ

Гидрохлорид берберина (Berberine Hydrochloride), хризантема китайская (Chinese Chrysanthemum), корень солодки (Licorice Root), ветки кассии (Cassia Twig), хвойник китайский (Chinese Ephedra), семена горького абрикоса (Bitter Apricot Seeds), реманния клейкая (Rehmanniae Adhesive), корень одуванчика (Dandelion Root), коптис китайский (Chinese Coptis).

Образцы проанализированы в лаборатории биосенсоров Чжэцзянского Университета (Ханчжоу, Китай).

2.4. Электрофоретическое определение ионов в моче

Приготовление рабочих буферов

- Раствор рабочего электролита для определения анионов содержал 5 мМ хромата, 20 мМ ДЭА, 1,65 мМ ЦТАБ. Способ приготовления: *1 М раствор диэтанолламин* (965 мкл ДЭА растворяли в 9035 мкл бидистиллированной воды); *0,1 М раствор хромат-иона* (навеска 150,0 мг растворялась в 15 мл бидистиллированной воды); *0,1 М раствор ЦТАБ* (навеску 546,7 мг растворяли в 15 мл бидистиллированной воды).

Раствор рабочего электролита готовили ежедневно в микропробирках однократного применения. В каждую - вносили 50 мкл хромата, 20 мкл ДЭА и

913,5 мкл бидистиллированной воды. Пробирки плотно закрывали, перемешивали содержимое и добавляли 16,5 мкл ЦТАБ; приготовленный раствор дегазировали центрифугированием в течение 10 мин.

- Рабочий электролит для определения катионов содержал 6 мМ бензимидазола (БИА) 30 мМ винной кислоты, 2 мМ 18-краун-6. Для его приготовления необходимы: *0,03 М раствор БИА* (навеску 106,3 мг растворяли в 30 мл бидистиллированной воды); *0,1 М раствор 18-краун-6*, (навеску 396,48 мг растворяли в 15 мл бидистиллированной воды); *0,05 М раствор винной кислоты* (навеску 225,1 мг растворяли в 30 мл бидистиллированной воды).

Раствор рабочего электролита готовили непосредственно в микропробирках однократного применения каждый день. В каждую пробирку вносили 200 мкл БИА, 50 мкл винной кислоты, 20 мкл водного раствора 18-краун-6 и 730 мкл бидистиллированной воды. Пробирку плотно закрывали, тщательно перемешивали и дегазировали центрифугированием в течение 10 мин.

- Раствор ведущего электролита для определения мочевой кислоты и креатинина содержал 50 мМ раствор дигидрофосфата натрия и 2,4 мМ NaOH. Для его приготовления требовались растворы: *0,5 М раствор дигидрофосфата натрия* (навеску 390 мг растворяли в 5 мл бидистиллированной воды); *1 М раствор гидроксида натрия* (навеску твердого гидроксида натрия растворяли в бидистиллированной воде из расчета 2 г гидроксида на 50 мл воды).

Раствор рабочего электролита готовили каждый день в пробирке на 10 мл. В пробирку вносили 1000 мкл дигидрофосфата натрия, 24 мкл 1 М раствора NaOH и 4488 мкл бидистиллированной воды, пробирку плотно закрывали и помещали в ультразвуковую ванну на 5-10 мин. Далее полученным раствором

заполняли 3 полипропиленовых виалы на 0,8 мл и центрифугируют в течение 10 мин.

- Раствор рабочего электролита для определения оксалата и цитрата содержал 200 мМ раствор дигидрофосфата натрия и 8,75 мМ NaOH. Для его приготовления требовались: *0,5 М раствор дигидрофосфата натрия* (навеску 390 мг растворяли в 5 мл бидистиллированной воды); *1 М раствор гидроксида натрия* (навеску твердого гидроксида натрия растворяли в бидистиллированной воде из расчета 2 г гидроксида на 50 мл воды).

Раствор рабочего электролита готовили каждый день из расчета на 10 мл. Во флакон или пробирку вносили по 4000 мкл дигидрофосфата натрия, 86 мкл 1 М раствора NaOH и 5914 мкл бидистиллированной воды. Пробирку плотно закрывали, встряхивали и помещали в УЗ-ванну на 5-10 мин. Затем заполняли полученным раствором 3 полипропиленовых виалы на 0,8 мл и центрифугировали в течение 10 мин.

Условия электрофоретического анализа

Перед проведением анализа кварцевый капилляр подготавливали к работе: промывали 1 М раствором HCl, дистиллированной водой, 1 М раствором NaOH, дистиллированной водой по 10 мин и рабочим буферным электролитом – 15 мин. Между анализами капилляр промывали рабочим буферным электролитом в течение 5 мин.

- Для определения анионов использовали блок отрицательной полярности.

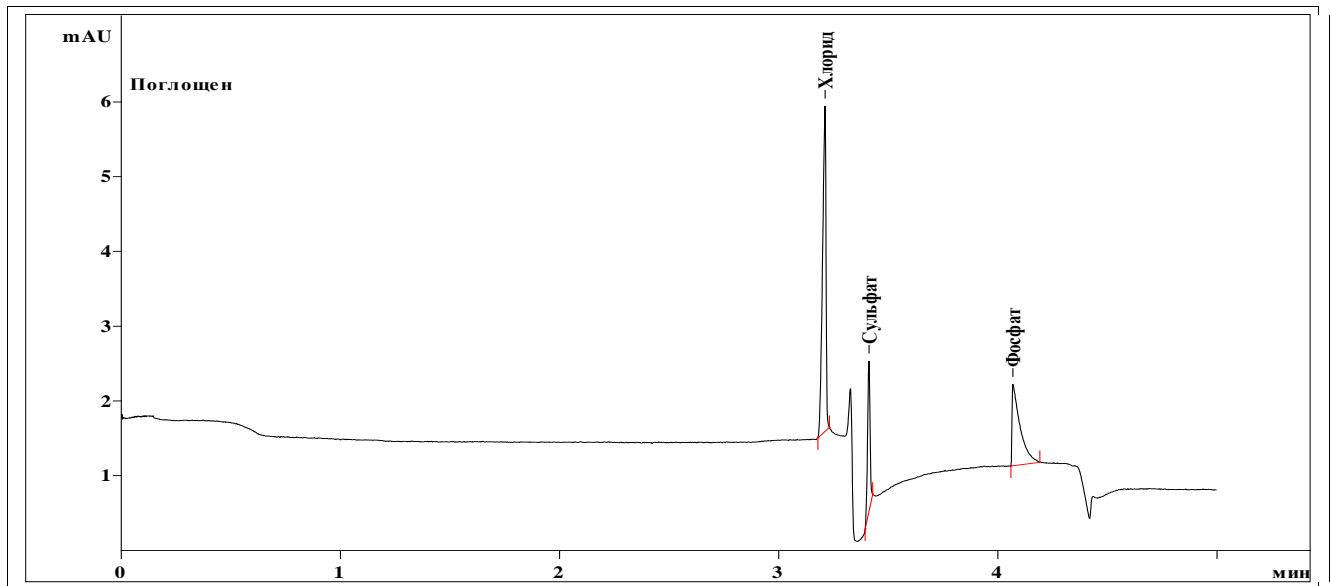


Рис. 30. Электрофореграмма модельной смеси анионов.

Условия: Система капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ 105М»; кварцевый капилляр внутр. диаметр 75 мкм, $L_{эфф}=50$ см, $L_{общ}=60$ см.

Буферный электролит: 5 мМ хромат-иона, 20 мМ ДЭА, 1,65 мМ ЦТАБ.

Проба: смесь анионов: Cl^- - 18 мг/л, SO_4^{2-} - 12 мг/л, PO_4^{3-} - 6 мг/л.

Ввод пробы: 30 мбар, 10 с; -17 кВ. Детектирование: 254 нм.

- Для определения катионов использовали блок положительной полярности.

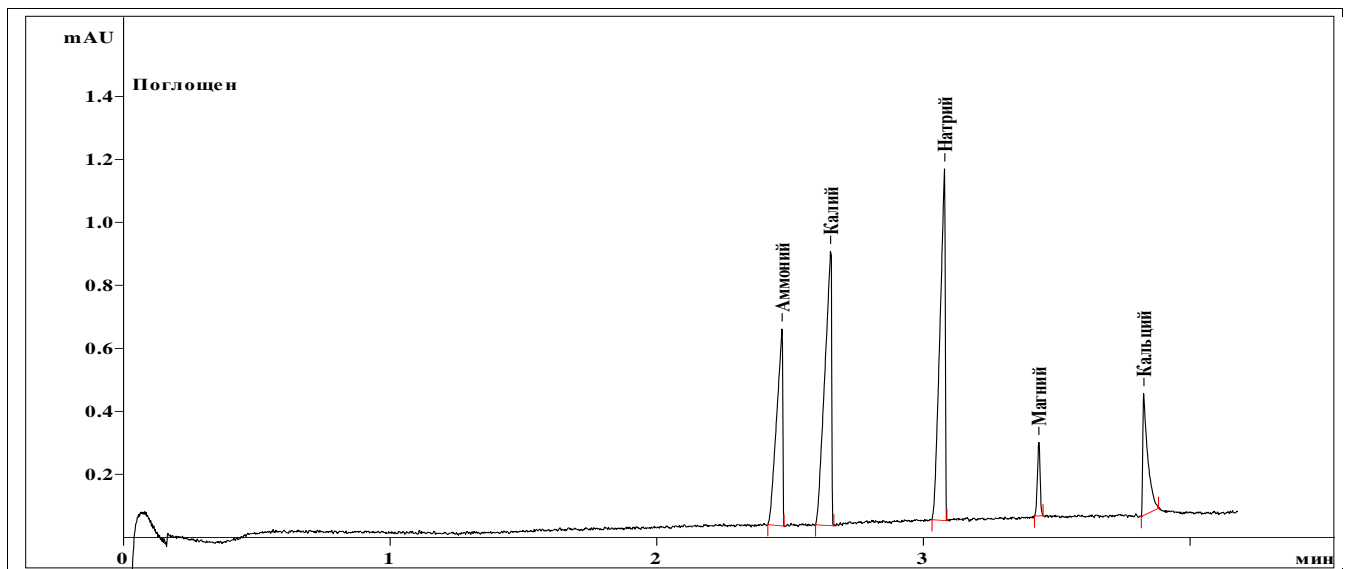


Рис. 31. Электрофореграмма модельной смеси катионов.

Условия: Система капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ 105М»; кварцевый капилляр внутр. диаметр 75 мкм, $L_{эфф}=50$ см, $L_{общ}=60$ см.

Буферный электролит: 6 мМ БИА, 2,5 мМ винной кислоты, 2 мМ 18-краун-6.

Проба: смесь катионов: NH_4^+ - 7 мг/л, K^+ - 9 мг/л, Na^+ - 5 мг/л, Mg^{2+} - 1 мг/л, Ca^{2+} - 1,4 мг/л. Ввод пробы: 30 мбар, 5 с; +20 кВ. Детектирование: 254 нм.

- Электрофоретическое определение мочевой кислоты и креатинина проводили при положительной полярности.

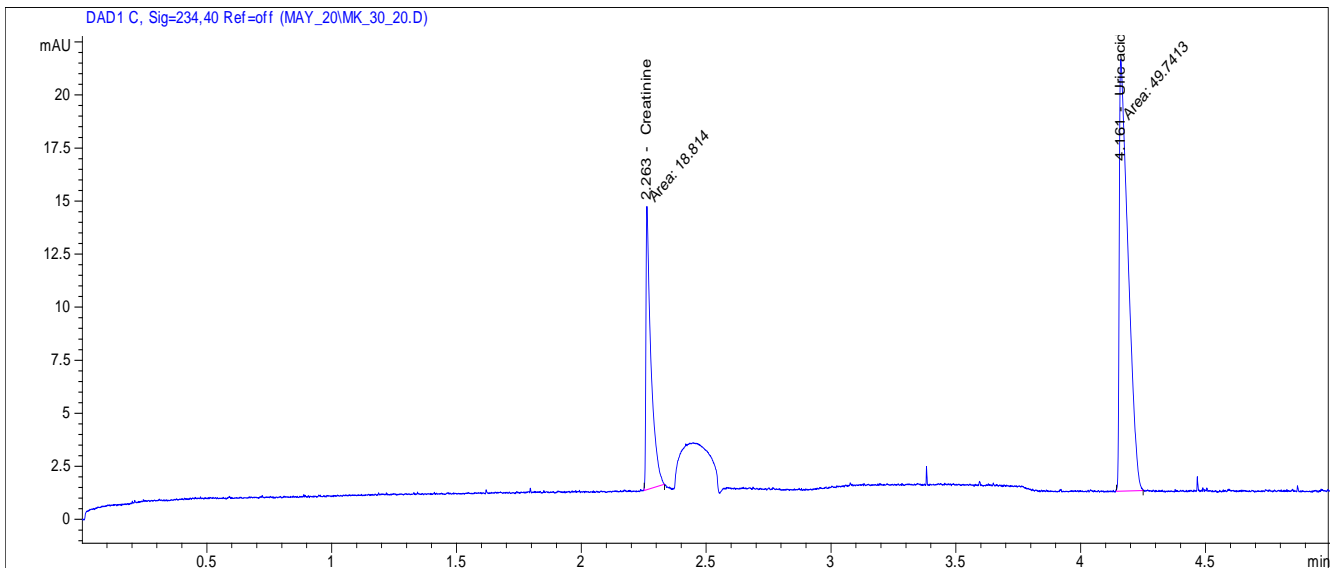


Рис. 32. Электрофореграмма модельной смеси мочевой кислоты и креатинина.

Условия: Система капиллярного электрофореза «Agilent 1100 CE»; кварцевый капилляр внутр. диаметр 50 мкм, $L_{эфф}$ =40 см, $L_{общ}$ =48 см. Буферный электролит: 50 мМ NaH_2PO_4 , 2,4 мМ NaOH . Проба: смесь мочевой кислоты и креатинина – 20 мг/л и 30 мг/л. Ввод пробы: 50 мбар, 20 с; +30 кВ. Детектирование: 234 нм.

- Электрофоретическое определение оксалат и цитрат-ионов проводили при отрицательной полярности

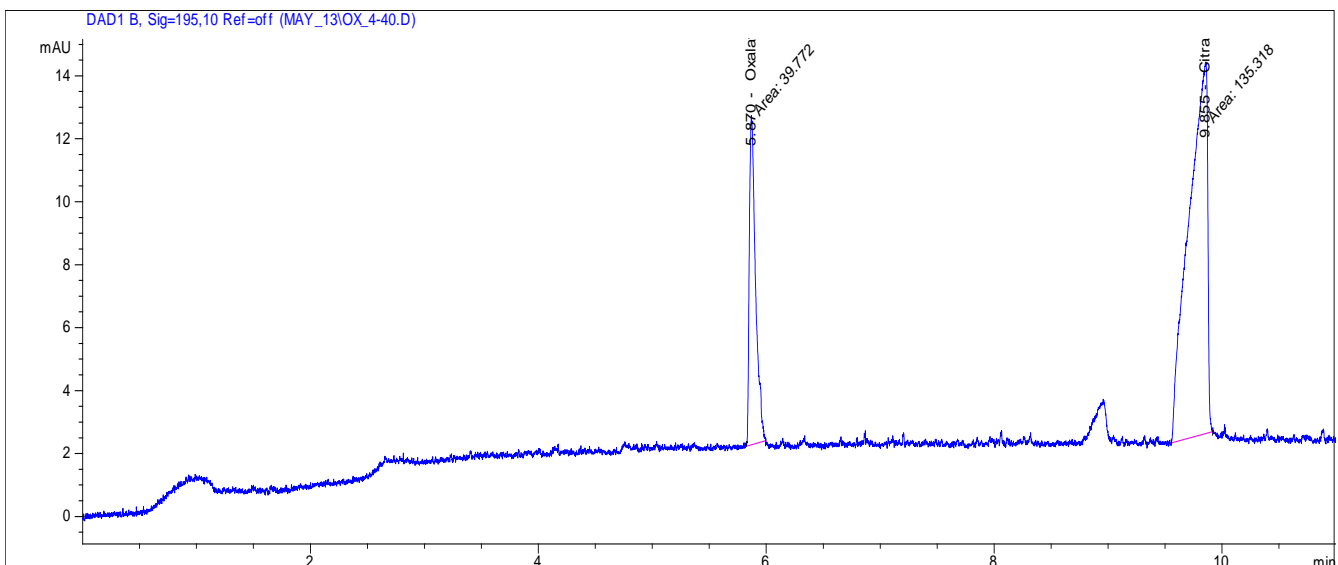


Рис. 33. Электрофореграмма модельной смеси щавелевой и лимонной кислот.

Условия: Система капиллярного электрофореза «Agilent 1100 CE»; кварцевый капилляр: внутр. диаметр 75 мкм, $L_{эфф}$ =40 см, $L_{общ}$ =48 см. Буферный электролит: 200 мМ NaH_2PO_4 , 8,75 мМ NaOH . Проба: смесь оксалата и цитрата – 5 мг/л и 30 мг/л.

Ввод пробы: 50 мбар, 30 с; -12 кВ. Детектирование: 195 нм.

Пробоподготовка образцов мочи заключалась в их разбавлении бидистиллированной водой согласно табл. 9.

Таблица 9. Схема разбавления образцов

Определяемые аналиты	Разбавление образцов
катионы/анионы	в 200-800 раз
мочевая кислота и креатинин	в 20-50 раз
оксалат и цитрат	в 5-10 раз

2.5. Электрофоретическое определение компонентов чая

Оптимальные условия электрофоретического детектирования полифенолов и сама методика для чая была разработана в нашей лаборатории ранее [123].

Перед проведением анализа в режиме капиллярного зонного электрофореза капилляр подготавливался к работе следующим образом: промывался 0,5 М раствором HCl, дистиллированной водой, 0,5 М раствором NaOH, дистиллированной водой по 10 мин и рабочим буферным электролитом – 15 мин. Между анализами капилляр промывался рабочим буферным электролитом в течение 5 мин. Буферный электролит готовился на основе фосфатного буфера с $pH=7,0$ с добавкой додецилсульфата натрия.

Для приготовления 10 мл 0,1 М фосфатного буфера смешивали 3,05 мл 0,2 М раствора Na_2HPO_4 и 1,95 мл 0,2 М раствора NaH_2PO_4 и доводили объем до 10 мл дистиллированной водой. Раствор додецилсульфата натрия (500 мМ) готовился растворением точной навески (1,142 г) в 10 мл дистиллированной воды. 1 мл рабочего буферного электролита состоял из 25 мМ фосфатного буфера (250 мкл 0,1 М), 25 мМ додецилсульфата натрия (50 мкл 500 мМ) и 700 мкл дистиллированной воды.

В качестве оптимального выбрано напряжение 25 кВ. Ввод пробы осуществлялся гидродинамически (30 мбар, 10 с).

Для идентификации компонентов использована стандартная смесь полифенолов и кофеина (рис. 34):

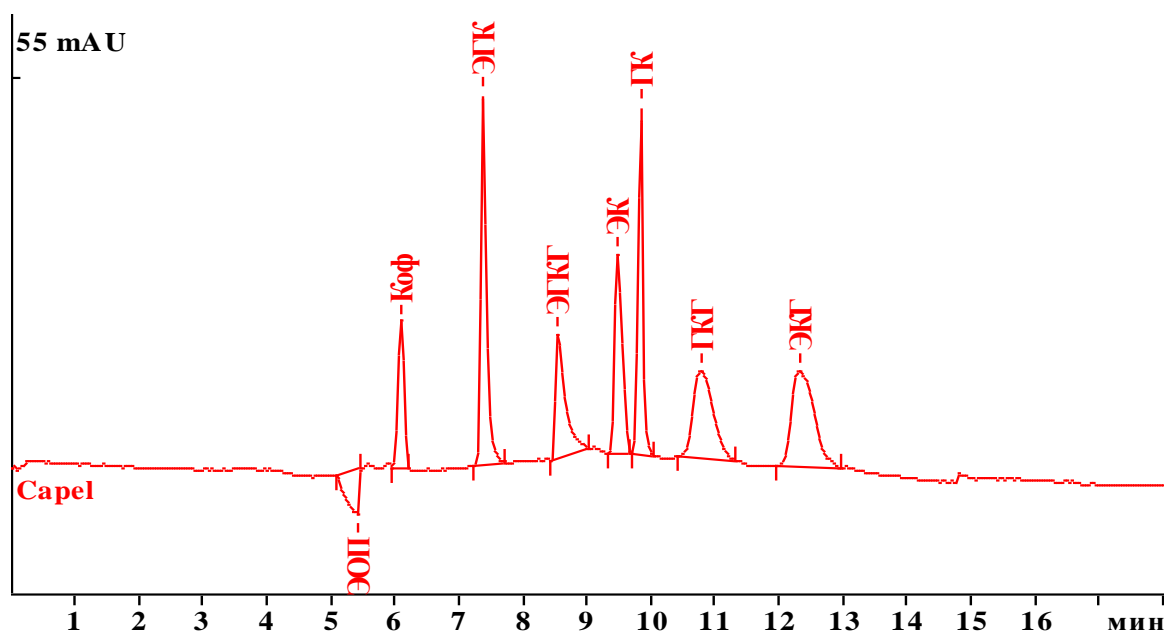


Рис. 34. Электрофореграмма модельной смеси полифенолов и кофеина.

Условия: Система капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ 105»; капилляр: внутренний диаметр 75 мкм, $L_{эфф}$ =60 см, $L_{общ}$ =50 см. Буферный электролит: 25 мМ фосфатный буфер $pH=7.0$ с добавкой 25 мМ ДДСН. Проба: смесь стандартов: Коф, ЭГК, ЭГКГ, ГК, ГКГ, ЭЖ – по 25 мг/л, ЭЖ – 10 мг/л. Ввод пробы: 30 мбар, 10 с. Напряжение: 25 кВ. Детектирование: 200 нм.

Анализ образцов чая проводился следующим образом: 200 мг сухого чая заваривались 20 мл только что вскипевшей дистиллированной воды в течение 5 мин. Для подготовки анализируемой пробы проводилось ее разбавление водой в два раза.

Получены соответствующие характеристические профили и проведена оценка содержания полифенолов во всех сортах чая методом мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ).

2.6. Получение характеристических профилей растительных препаратов традиционной китайской медицины (ТКМ)

Хроматографические профили растительных препаратов ТКМ получены методом ВЭЖХ–УФ, основываясь на условиях, описанных в [185].

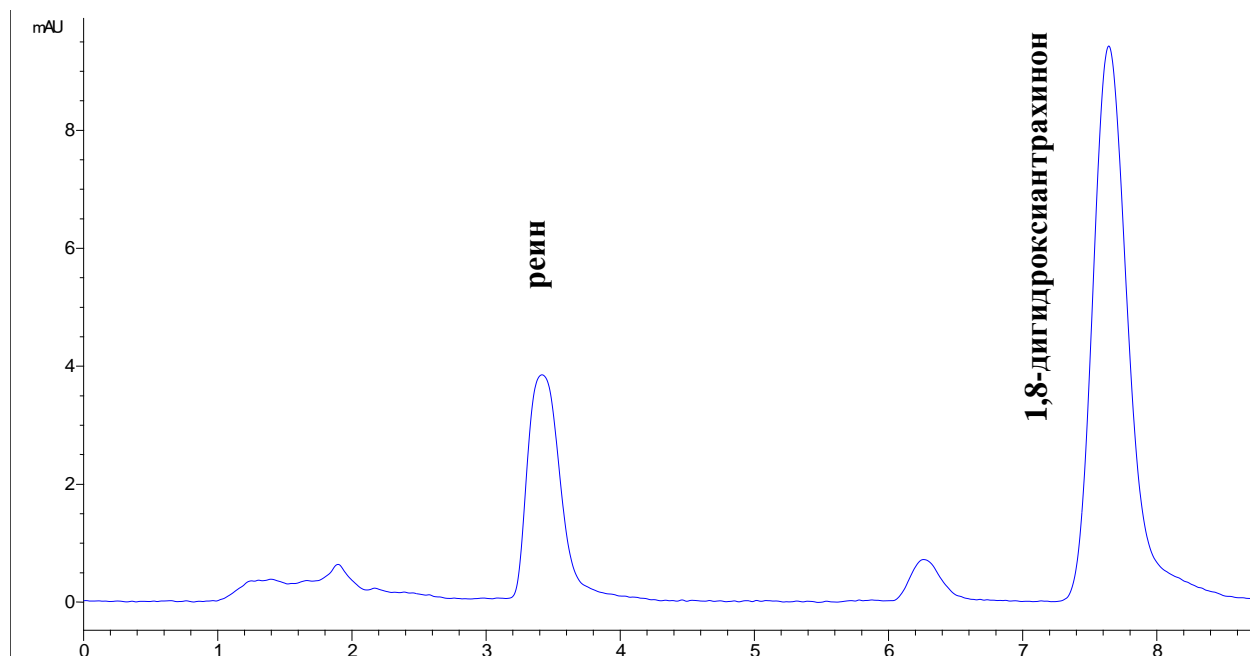


Рис. 35. Хроматограмма модельной смеси реина и 1,8-дигидроксиантрахинона.

Условия: хроматограф «Agilent-1200», колонка (250×4.6 мм) YMC-Triart C18 (5 мкм); подвижная фаза: 60 об.% ацетонитрила, 0,05 М муравьиной кислоты в воде, расход 200 мкл/мин, объем пробы 40 мкл, длина волны 440 нм. Проба: реин – 50 мкг/л, 1,8-дигидроксиантрахинон – 100 мкг/л.

Пробоподготовка: 100 мг измельченного препарата и 1 мл ацетонитрила тщательно перемешивали в вортексе в течение 15 мин. Затем пробы центрифугировали в течение 10 мин, отбирали 500 мкл верхнего слоя в виалу для автосамплера и добавляли 500 мкл воды. Полученные образцы подвергались хроматографическому анализу.

Для получения профилей выбрана длина волны 254 нм. Время анализа – 25 мин.

- *Электрофоретические профили* растительных препаратов ТКМ получены в условиях электрофоретического определения полифенолов.

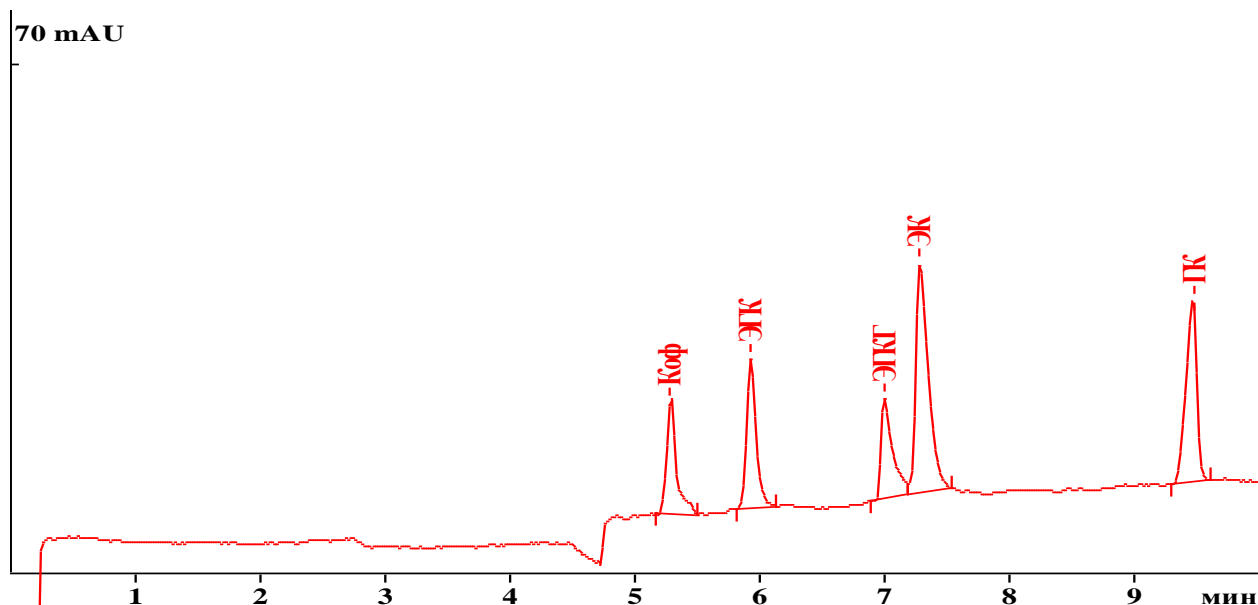


Рис. 36. Электрофореграмма модельной смеси полифенолов и кофеина.

Условия: Система капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ 105»; кварцевый капилляр: внутренний диаметр 50 мкм, $L_{эф}$ =60 см, $L_{общ}$ =50 см. Буферный электролит: 25 мМ фосфатный буфер $pH=7.0$ с добавкой 25 мМ ДДСН. Проба: смесь стандартов: Коф, ЭК, ЭКГ, Г, ГГ, ЭКГ – по 25 мг/л, ЭК – 10 мг/л. Ввод пробы: 30 мбар, 20 с. Напряжение: 25 кВ. Детектирование: 200 нм.

Пробоподготовка заключалась в следующем: 500 мг измельченного препарата и 10 мл свежевскипяченной дистиллированной воды помещали в УЗВ с нагреванием в течение 30 мин. Затем пробы центрифугировали в течение 5 мин, отбирали 5 мл верхнего слоя в пробирку, далее вновь центрифугировали в течение 5 мин, отбирали 2 мл верхнего слоя в медицинский шприц и пропускали раствор через фильтр Chromafil AO 45/3. Полученную пробу разбавляли водой в 2 раза и подвергали электрофоретическому анализу.

Для получения профилей выбрана длина волны 200 нм. Время анализа – 10 мин.

2.7. Анализ мочи с помощью мультисенсорной системы

Анализ мочи проводился мультисенсорной системой, состоящей из 9 анион- и 9 катион-чувствительных полимерных сенсоров, а также pH-сенсора и электрода сравнения.

Полимерная матрица – поливинилхлорид, пластификатором могут быть ди-(2-этилгексил)себацинат (ДОС), о-нитрофенилоктиловый эфир (НФОЭ) или три(2-этилгексил)фосфат (ТОФ) (рис. 37).

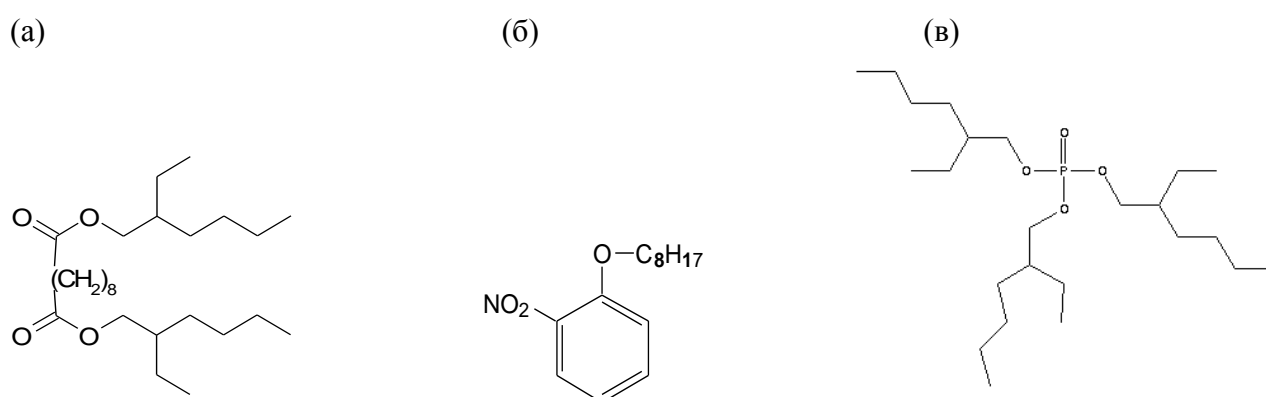


Рис. 37. Структурные формулы пластификаторов: (а) – ди-(2-этилгексил)себацинат, (б) – о-нитрофенилоктиловый эфир, (в) – три(2-этилгексил)фосфат.

Соотношение поливинилхлорида к пластификатору 1:2 по массе мембраны.

Ключевым компонентом мембран является добавка, благодаря которой и переносится ион из анализируемого раствора, вызывая изменение межфазного потенциала. Состав мембран сенсоров массива, используемого для анализа мочи, представлен в табл. 10.

Таблица 10. Состав мембран мультисенсорной системы для анализа мочи.

№	Пластификатор	Активное вещество
1	НФОЭ	фоновая мембрана из ПВХ и пластификатора
2	НФОЭ	тетрадодециламмоний бромид
3	НФОЭ	тетрафенилфосфоний хлорид
4	НФОЭ	тетрафенилпорфирилат кобальта (III) хлорид
5	ДОС	фоновая мембрана из ПВХ и пластификатора

6	ДОС	калиевая соль тетраakis[3,5-бис (трифторметил)фенил]бората
7	ДОС	Триоктилфосфиноксид
8	ТОФ	фоновая мембрана из ПВХ и пластификатора
9	НФОЭ	N,N-дициклогексил- N',N'-диоктадецил-3-оксапентадиамид
10	НФОЭ	N,N,N',N'-трициклогексил-3-оксапентадиамид
11	НФОЭ	N,N-дигептил-N',N'-диметил-1,4-бутандиамид
12	НФОЭ	метилтридодециламмоний хлорид
13	ТОФ	(бис-[(бензо-15-краун-4)-4'-метил]пальметат
14	НФОЭ	1,7,11,17-тетраоксо-2,6,12,16-тетраазациклоэйкозан
15	НФОЭ	N,N,N',N'-тетраоктилдамид дигликолевой кислоты
16	НФОЭ	гексиловый эфир трифторацетил бензойной кислоты
17	НФОЭ	тридодецилметил аммоний хлорид
18	ТОФ	тетрафенилпорфирилат кобальта (III) хлорид

Пробоподготовка. Образец мочи (50 мл) размораживался на водяной бане до комнатной температуры в течение 40 мин.

Проведение измерений. К 10 мл образца мерным цилиндром добавлялось 90 мл дистиллированной воды в ячейку на 100 мл. Массив сенсоров помещался в раствор, измерения проводились в течение 3 мин (интервал – 10 с). Затем сенсоры ополаскивались водой, остатки влаги удалялись фильтровальной бумагой.

Процедура отмывки. После анализа проводились измерения в дистиллированной воде (2 мин три раза) с последовательной ее заменой. Величины потенциалов для последних двух вод отличались в пределах ± 5 мВ.

Кондиционирование проводилось в начале каждого рабочего дня: сенсоры выдерживались в течение 10 мин в образце мочи, затем – процедура отмывки и необходимые измерения.

2.8. Исследование чая мультисенсорной системой

Для работы с образцами чая использовался массив перекрестно-чувствительных потенциометрических сенсоров, состоящий из 10 анион-, 5 катион-чувствительных сенсоров с жидким контактом и 4-х твердотельных

электродов, а также рН-сенсора и электрода сравнения. Состав мембран сенсоров массива, используемого для анализа чая, представлен в табл. 11.

Таблица 11. Состав мембран мультисенсорной системы для анализа чая.

№	Пластификатор	Активное вещество
1	НФОЭ	гексилловый эфир трифторацетилбензойной кислоты
2	ДОС	калиевая соль тетракис[3,5-бис(трифторметил)фенил]бората
3	ТОФ	тетрафенилпорфирин иридия (III) хлорид
4	ТОФ	Триоктилфосфиноксид
5	НФОЭ	фенилоктил-N,N-ди-изобутилкарбамоилметилен фосфин оксид
6	ТОФ	фоновая мембрана из ПВХ и пластификатора
7	НФОЭ	хлорированный дикарболлид кобальта
8	НФОЭ	бис-тридодециламмоний бромид
9	НФОЭ	тетрагексадецил аммоний бромид
10	ДОС	N,N,N',N'-тетраоктилдамид дигликолевой кислоты
11	ТОФ	тетрафенилпорфиринат марганца (III) хлорид
12	НФОЭ	перфторгексилловый эфир трифторацетилбензойной кислоты
13	ДОС	ди-2-этилгексилсульфосукцинат натрия
14	ТОФ	тетрафенилпорфиринат кобальта (III) хлорид
15	ДОС	Тетрафенилметилендифосфиндиоксид
16		поликристаллический электрод на основе спрессованной смеси сульфида и хлорида серебра
17		металлический электрод из сурьмы
18		стеклянный натриевый электрод на основе оксидного стекла
19		платиновый Red/Ox электрод

Пробоподготовка. Навеска чая (2 г) заваривалась в 100 мл свежескипяченной дистиллированной воды в течение 5 мин. Затем чай процеживался через ситечко (предварительно ополоснутое дистиллированной водой и высушенное) для удаления остатков чайных листьев. Полученный отвар остужался на холодной водяной бане до комнатной температуры.

Проведение измерений. К 30 мл остуженного чайного отвара мерным цилиндром добавлялось 70 мл дистиллированной воды в ячейку на 100 мл.

Массив сенсоров опускался в раствор, измерения проводились в течение 3 мин (интервал – 10 с). Затем сенсоры ополаскивались водой из промывалки, фильтровальной бумагой удалялись остатки влаги.

Процедура отмывки. В течение 1 мин сенсоры выдерживались в растворе TWEENa (500 мкл на 1 л дистиллированной воды) при перемешивании, затем тщательно ополаскивались водой. После этого проводились измерения в воде в течение 2 мин три раза, последовательно меняя исследуемую воду. Величины потенциалов для последних двух вод отличались в пределах ± 5 мВ.

Кондиционирование проводилось в начале каждого рабочего дня следующим образом: сенсоры выдерживались в течение 10 мин в образце чая, затем – процедура отмывки и далее выполнялись соответствующие измерения.

2.9. Исследование образцов препаратов традиционной китайской медицины с помощью мультисенсорной системы

Для работы с образцами растительных препаратов ТКМ использовали массив сенсоров, состоящий из 5 анион- и 7 катион-чувствительных полимерных сенсоров с жидким контактом и 4-х твердотельных электродов, а также рН-сенсора и электрода сравнения.

Состав мембран сенсоров массива, используемого для анализа лекарственных препаратов ТКМ, представлен в табл. 12.

Таблица 12. Состав мембран мультисенсорной системы для анализа ТКМ.

№	Пластификатор	Активное вещество
1	НФОЭ	тридодецилметиламмоний хлорид
2	НФОЭ	тетрафенилпорфиринат кобальта (III) хлорид
3	НФОЭ	тетрафенилпорфиринат марганца (III) хлорид
4	НФОЭ	тетрадодециламмоний бромид
5	ДОС	триоктилфосфиноксид
6	НФОЭ	N,N,N',N'-тетраоктилдиамид дигликолевой кислоты
7	ТОФ	перфторгексильный эфир трифторацетилбензойной кислоты
8	НФОЭ	тетрафенилфосфоний хлорид
9	НФОЭ	гексильный эфир трифторацетилбензойной кислоты

10	НФОЭ	тетрафенил метилен дифосфин диоксид
11	НФОЭ	фоновая мембрана из ПВХ и пластификатора
12	ТОФ	фоновая мембрана из ПВХ и пластификатора
13		поликристаллический электрод на основе спрессованной смеси сульфида и хлорида серебра
14		металлический электрод из сурьмы
15		стеклянный натриевый электрод на основе оксидного стекла
16		платиновый Red/Ох электрод

Пробоподготовка. Образец ТКМ (100 г) заваривали горячей водой (1л), выдерживали на водяной бане в течение 1 ч, фильтровали и центрифугировали для удаления твердых частиц. Полученный экстракт концентрировали, используя роторный растворитель. Затем различные объемы концентрированного экстракта добавляли в одинаковое количество воды для получения образцов с различными концентрациями. Горькость полученного продукта оценена независимо специалистами-дегустаторами и мультисенсорной системой (табл. 13).

Таблица 13. Данные по разбавлению и горькости исследованных образцов препаратов традиционной китайской медицины

№ образца	Название	Концентрация образца, количество/объем воды	Значение горькости *
1	Гидрохлорид берберина (Berberine Hydrochloride)	0,005 г / 500 мл	1
2		0,0125 г / 500 мл	2
3		0,025 г / 500 мл	3
4		0,05 г / 500 мл	4
5		0,125 г / 500 мл	5
6		0,25 г / 500 мл	6
7	Хризантема китайская (Chinese Chrysanthemum)	10 мл / 300 мл	0,7
8		50 мл / 300 мл	4,3
9		100 мл / 300 мл	5,5
10	Корень солодки (Liquorice Root)	10 мл / 350 мл	0,8
11		50 мл / 350 мл	2
12		200 мл / 350 мл	2,7
13	Ветки кассии (Cassia Twig)	10 мл / 350 мл	1,1
14		50 мл / 350 мл	2,5
15		200 мл / 350 мл	3,7

16	Хвойник китайский (Chinese Ephedra)	10 мл / 350 мл	1,5
17		25 мл / 300 мл	3,5
18		50 мл / 300 мл	4,7
19	Семена горького абрикоса (Bitter Apricot Seeds)	50 мл / 500 мл	1,3
20		100 мл / 300 мл	2
21	Реманния клейкая (Rehmanniae Adhesive)	20 мл / 300 мл	0,7
22		50 мл / 300 мл	0,8
23		100 мл / 300 мл	1,1
24	Корень одуванчика (Dandelion Root)	20 мл / 350 мл	0,8
25		50 мл / 350 мл	2,5
26		200 мл / 350 мл	4,3
27	Коптис китайский (Chinese Coptis)	20 мкл / 350 мл	0,8
28		100 мкл / 350 мл	2,2
29		200 мкл / 350 мл	4,3
30		1000 мкл / 350 мл	6
31	Смесь четырех трав: • хвойник китайский – 37,5 % • семена горького абрикоса – 25 % • корень солодки – 12,5 % • ветки кассии – 25 %	20 мл / 300 мл	2
32		50 мл / 300 мл	4,2
33		150 мл / 300 мл	5,3

* Оценка горькости осуществлялась по шкале от 0 (совсем негорько) до 6 (максимально горько).

Проведение измерений. К 20 мл образца мерным цилиндром добавлялось 80 мл дистиллированной воды в ячейку на 100 мл. Массив сенсоров помещался в раствор, измерения проводились в течение 3 мин (интервал – 10 с). Затем сенсоры ополаскивались водой и фильтровальной бумагой удалялись остатки влаги.

Процедура отмывки. После анализа проводились измерения в воде в течение 2 мин три раза, последовательно меняя исследуемую воду. Величины потенциалов для последних двух вод отличались в пределах ± 5 мВ.

Полученные для всех образцов данные сводились в матрицы, где число строк – количество исследуемых образцов, число столбцов – количество сенсоров в массиве (табл.14). Затем результаты обрабатывались хемометрическими методами.

Таблица 14. Пример матрицы данных от мультисенсорной системы при анализе растительных препаратов

Образец ТКМ	A7	A12	A15	A22	A23	C2	C4	C5	C6	C7	C13	C15	G2	G3	G5	G8	pH
Коптис китайский_4,3	241,4	135,6	-148,3	120,2	287,8	171,9	232,4	261,2	234,3	210,5	209,5	122,7	-280,6	242,8	50,8	-265,6	14,8
Корень солодки_2	220,0	71,7	-182,6	78,9	132,1	113,2	124,5	184,0	117,5	45,4	144,8	103,3	-259,9	223,4	31,2	-274,1	63,5
Хризантема китайская_4,3	157,4	30,9	-163,0	66,7	139,2	136,6	120,4	118,4	123,8	56,5	155,4	121,1	-247,7	240,4	49,4	-278,0	77,2
Ветки кассии_1,1	230,7	103,7	-165,5	99,6	210,0	142,6	178,4	222,6	175,9	127,9	177,1	113,0	-270,3	233,1	41,0	-269,8	39,2
Корень одуванчика_0,8	174,2	62,0	-174,8	76,1	135,5	143,4	98,6	136,6	104,3	71,0	162,8	127,9	-270,0	255,9	47,7	-299,1	49,0
Гидрохлорид берберина_3	247,5	113,7	-152,0	100,5	280,2	153,5	204,4	197,2	212,8	161,4	167,4	118,9	-282,0	258,1	45,1	-282,5	-18,5
Хвойник китайский_4,7	176,4	62,8	-160,0	89,3	150,8	148,5	222,1	146,9	225,1	56,4	169,2	133,3	-232,7	220,5	76,7	-279,3	81,2
Реманния клейкая_0,7	217,6	105,0	-138,6	123,2	203,8	124,9	130,9	175,9	139,9	81,1	143,0	107,0	-239,2	251,1	58,6	-276,1	82,3
Смесь четырех трав_2	207,6	78,5	-174,6	96,1	139,5	130,4	175,0	131,2	180,1	41,3	148,7	113,7	-245,9	245,9	54,0	-285,5	73,0
Гидрохлорид берберина_1	246,5	107,4	-155,0	104,9	251,8	141,8	179,5	164,3	179,4	70,9	150,8	122,9	-279,2	267,4	54,2	-277,6	-11,5
Хвойник китайский_1,5	213,8	122,7	-107,6	133,8	155,1	136,4	190,6	141,1	186,5	25,0	154,2	124,2	-262,4	242,6	63,4	-285,8	48,1
Коптис китайский_2,2	249,1	122,3	-128,0	120,8	280,6	157,9	244,7	196,8	219,8	133,9	165,5	131,3	-282,9	266,1	60,5	-278,3	15,8
Корень одуванчика_2,5	152,8	28,9	-176,3	55,0	151,2	150,0	155,1	159,0	134,4	81,5	165,6	140,4	-286,6	228,4	37,4	-327,0	48,4
Реманния клейкая_1,1	188,3	66,3	-151,3	94,0	234,4	132,9	200,5	212,1	178,8	113,9	152,5	116,1	-244,1	250,2	54,7	-305,8	94,4
Хризантема китайская_0,7	224,0	102,8	-66,8	128,6	169,5	125,1	116,3	158,5	120,0	41,2	147,0	113,8	-206,2	322,1	81,9	-263,8	113,3
Корень солодки_0,8	242,8	125,4	-87,5	132,5	159,3	122,1	118,1	159,1	126,6	26,3	140,5	107,6	-236,5	291,4	73,6	-271,3	90,0
Коптис китайский_6	242,2	136,2	-88,1	129,8	316,7	181,6	253,3	231,2	258,6	208,6	271,3	125,0	-289,7	258,7	59,8	-271,0	25,1
Ветки кассии_2,5	232,8	82,7	-142,1	95,9	131,5	114,6	78,3	153,9	81,8	35,5	141,3	99,9	-271,0	265,7	50,6	-299,8	38,6
Реманния клейкая_0,8	200,7	83,7	-126,4	109,2	214,1	117,6	151,0	188,8	159,0	96,0	161,2	105,0	-240,5	280,1	61,2	-294,2	88,1
Корень одуванчика_4,3	127,4	5,9	-158,2	44,0	145,4	150,7	149,1	130,9	152,2	78,6	176,3	140,3	-266,5	238,2	45,8	-310,7	65,0
Гидрохлорид берберина_5	241,0	126,1	-68,7	126,2	317,5	183,4	250,5	216,6	255,4	205,3	229,4	124,7	-271,1	260,5	70,4	-264,5	27,6
Ветки кассии_3,7	217,4	30,4	-176,2	46,8	104,0	100,9	81,1	111,2	89,8	27,5	142,7	86,0	-251,6	265,6	66,6	-312,9	61,2
Хвойник китайский_3,5	195,5	79,8	-96,4	104,9	134,1	142,7	203,6	140,8	207,5	33,3	172,1	127,6	-243,2	242,4	70,2	-289,7	78,1
Смесь четырех трав_5,3	164,5	29,7	-164,3	59,1	133,9	133,6	211,0	124,2	214,6	45,9	160,2	120,2	-239,8	230,6	70,9	-305,2	79,4
Семена горького абрикоса_2	201,3	63,1	-119,8	86,8	132,2	110,3	99,9	141,9	108,6	39,7	140,3	95,2	-267,3	102,8	41,3	-291,8	61,6
Корень солодки_2,7	185,7	54,9	-151,5	74,8	152,4	113,7	153,8	173,6	161,8	50,4	147,8	112,2	-262,9	217,3	68,7	-275,1	70,3
Гидрохлорид берберина_4	207,2	124,7	-96,0	120,6	290,4	164,7	220,9	190,7	231,8	171,8	185,8	123,4	-277,9	205,2	74,4	-263,0	26,5
Коптис китайский_0,8	207,1	123,0	-105,4	117,5	230,7	136,7	160,3	146,9	173,2	91,0	164,7	121,2	-278,8	202,9	71,4	-269,5	28,0
Смесь четырех трав_4,2	179,1	81,8	-121,5	104,9	157,1	124,1	194,0	179,8	200,1	48,1	170,1	119,8	-253,7	235,4	86,1	-279,4	67,7
Гидрохлорид берберина_6	202,3	125,7	-76,2	133,1	329,9	200,3	261,1	229,0	273,5	216,7	285,6	135,8	-286,5	225,6	72,0	-262,2	21,7
Хризантема китайская_5,5	166,7	66,7	-86,9	102,7	140,4	127,1	111,5	172,3	117,2	30,6	142,7	113,4	-239,4	273,8	88,8	-275,5	85,7
Гидрохлорид берберина_2	200,6	127,1	-58,3	136,2	267,6	149,4	188,5	145,0	203,4	123,9	154,6	119,1	-273,0	258,1	76,0	-258,7	40,3
Семена горького абрикоса_1,3	211,2	161,0	-41,8	168,9	175,7	117,0	111,9	170,5	124,9	32,6	131,3	101,6	-223,4	232,2	100,2	-251,3	99,8

2.10. Применение хемометрических методов к обработке данных от мультисенсорных систем

2.10.1. Метод главных компонент

Метод главных компонент (МГК) (РСА - *principal component analysis*) – РСА) - один из самых востребованных в хемометрике. Суть его в следующем: отклик массива сенсоров представляется в виде матрицы, в которой число строк – это число измеренных системой образцов, а число столбцов – число сенсоров в массиве. Каждый элемент матрицы представляет собой отклик данного сенсора в данном образце. Кроме того, каждый элемент матрицы может быть представлен точкой в многомерном пространстве с числом координатных осей равным числу сенсоров в массиве. Вся матрица при таком рассмотрении представляется облаком точек в многомерном пространстве. МГК отыскивает в таком облаке направление наибольшей дисперсии данных и последовательно уменьшает размерность пространства, проецируя точки на это направление (рис. 38).

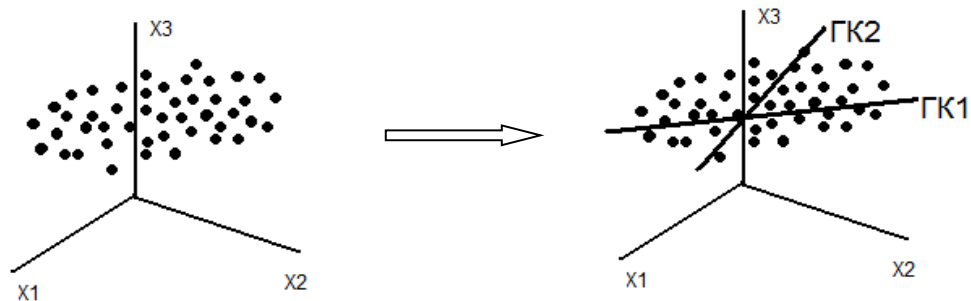


Рис. 38. Выделение в облаке данных двух главных компонент.

В результате уменьшения размерности исходную матрицу можно представить в виде графика счетов в двумерном пространстве, в координатах направлений с наибольшей дисперсией в матрице данных. Такое проецирование позволяет выявить наличие скрытой внутренней структуры данных и, например, установить наличие групп образцов схожих/различных между собой (рис.39).

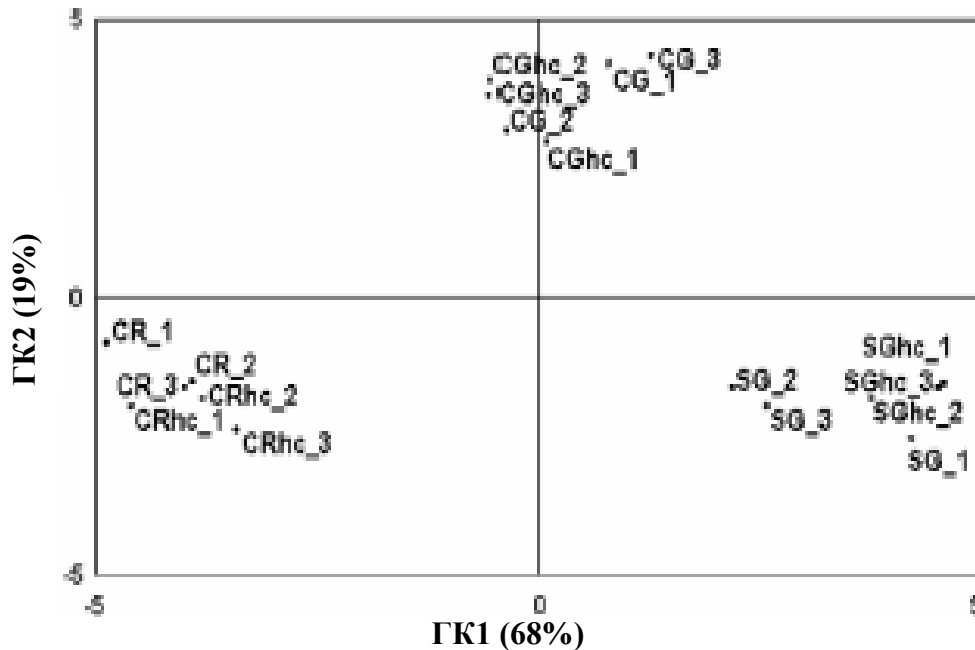


Рис. 39. Пример графика счетов.

С математической точки зрения, метод главных компонент – это декомпозиция исходной матрицы X , то есть представление ее в виде произведения двух матриц T и P [16].

$$X = T * P^t + E = \text{структура} + \text{шум}, \quad (1)$$

где T – матрица счетов, P – матрица нагрузок, E – матрица остатков.

Задача МГК – найти матрицы T и P для того, чтобы использовать их произведение вместо матрицы X . Матрица E – ошибка моделирования, выражается в % остаточной дисперсии.

$$\% \text{ объясненной дисперсии} + \% \text{ остаточной дисперсии} = 100 \%$$

Объясненная дисперсия по каждой из главных компонент указывается под графиком счетов. Применяют МГК для оценки возможности мультисенсорных систем к распознаванию (разделению) различных классов внутри единой группы образцов [16].

2.10.2. Применение логистической регрессии для классификации образцов

Логистическая регрессия применяется для предсказания вероятности возникновения некоторого события по значениям множества признаков [164].

Например, для решения вопроса о том, отнести неизвестный образец биологической жидкости к классу «*патология*» или «*норма*» по результатам измерений каких-либо параметров. Для решения подобных задач часто используют и линейный дискриминантный анализ (ЛДА) [164]. Следует отметить, что в основе последнего для построения моделей использует наименьший квадрат отклонения от наилучшего результата. Кроме того, для применения ЛДА требуется ряд допущений, например, нормального распределения параметров. Медицинская статистика в большинстве случаев не гарантирует нормального распределения, данные независимы и дискретны. Именно поэтому логистическая регрессия считается более достоверной. В настоящем исследовании этот метод впервые использован не только для анализа референтных данных, но и для данных, полученных с использованием мультисенсорной системы.

Вначале строится модель по имеющимся достоверным значениям о принадлежности образцов к тому или иному классу. Затем с помощью независимого тестового набора образцов проверяется вероятность отнесения конкретного образца к классу больных или здоровых.

$$p(X) = \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_n X_n}}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_n X_n}} \quad (2)$$

где n – число предикторов (исследованных параметров);

$\beta_0, \beta_1 \dots \beta_n$ – коэффициенты модели;

$X_1 \dots X_n$ – предикторы;

$p(X)$ – вероятность отнесения образца X к классу больных (1) или здоровых (0).

В [164] рекомендуют при статистической обработке медицинских данных учитывать общую заболеваемость населения рассматриваемой патологией, выраженную в процентах. При этом вместо β_0 используют β_0^* :

$$\beta_0^* = \beta_0 + \ln \frac{\pi}{1-\pi} - \ln \frac{\pi^*}{1-\pi^*}, \quad (3)$$

где π – заболеваемость населения МКБ в данной местности в долях ($\pi=0,15$) [39];

π^* – количество случаев заболевания МКБ, отнесенное к общему числу случаев в данном исследовании (117 больных из 136 анализируемых в нашей работе образцов. $\pi^*=0,86$).

2.10.3. Регрессионный анализ, применяемый для данных, полученных от мультисенсорных систем

Регрессионный анализ подразумевает исследование двух наборов данных, его также называют *многомерной калибровкой*, или *многомерным моделированием*. Многомерное моделирование включает два этапа. Первый – стадия калибровки: строится модель в виде регрессионной зависимости экспериментальных значений X и Y , которая применяется для предсказания значений Y на основе значений X , полученных при новых измерениях. Смысл этой операции в том, чтобы получить возможность в дальнейшем не измерять значения Y , а определять их исключительно по значениям X .

Простейший случай регрессии – одномерная линейная. Она задается линейным уравнением вида: $y=kx+b$, и устанавливает связь между переменными x и y . (X и Y употребляют в общем смысле, а x и y – для одномерной регрессии). Применительно к химическому анализу под y обычно понимают концентрацию интересующего соединения, а под x – величину аналитического сигнала. Построение калибровки позволяет найти вид зависимости y от x , т.е. концентрации от аналитического сигнала. В случае традиционной одномерной калибровки, например, в потенциометрии, эта задача обычно сводится к

нахождению углового коэффициента k и свободного члена b по методу наименьших квадратов.

В случаях, когда имеются взаимные влияния компонентов в образце, наложение, перекрывание пиков и т.п., аналитический сигнал может стать менее информативным, а использование одномерной калибровочной зависимости будет приводить к неточным определениям интересующей концентрации в образцах неизвестного состава. В такой ситуации для того, чтобы повысить точность аналитического определения, можно использовать не одиночный аналитический сигнал x , а набор соответствующих аналитических сигналов x_1, x_2, \dots, x_i . Например, в случае мультисенсорных систем – значение отклика не одного сенсора, а всего массива.

2.10.3.1. Проекция на латентные структуры (ПЛС1 и ПЛС2)

Для построения калибровочной зависимости в случае множества переменных x используют метод ПЛС-регрессии, широко применяемый для целей многомерной калибровки и последующего определения концентраций различных компонентов в сложных образцах [163].

ПЛС-регрессия является обобщением обычной одномерной линейной регрессии на случай множества независимых переменных x .

ПЛС регрессию обычно представляют в виде матричных уравнений:

$$\mathbf{Y} = \mathbf{XB} + \mathbf{F} \quad , \quad (4)$$

где $\mathbf{X}(I \times J1)$ и $\mathbf{Y}(I \times J2)$ – матрицы данных, в которых – I (число строк) – число образцов, а J (число столбцов) – число измеренных параметров системы.

Каждая строка этой матрицы – набор переменных (например, откликов сенсоров), характеризующий один образец, а каждый столбец – набор значений переменной (например, показаний одного сенсора) во всех образцах. Если калибровка (ПЛС регрессия) строится по определенному параметру, то и полученная регрессионная модель будет предназначена для определения этого параметра в новых образцах, для которых эта величина неизвестна. Результаты построения калибровочной модели представляются обычно в виде прямых для

калибровки и проверки в координатах «введено-найденно». Основными параметрами калибровочной PLS1-модели являются наклон, оффсет, квадрат коэффициента корреляции и остаточная среднеквадратичная ошибка калибровки и предсказания.

Наклон (*slope*) и квадрат коэффициента корреляции (R^2) описывают насколько хорошо точки в калибровке и проверке ложатся на прямую. Чем ближе эти величины к единице, тем адекватнее данные описываются моделью. Параметр «оффсет» (*offset*) описывает смещение прямой относительно начала координат и должен быть максимально близок к нулю. Среднеквадратическое отклонение (*RMSE, residual root mean square error*) характеризует предсказательную силу модели. Она имеет размерность величины Y , по которой проводилась калибровка и для хорошей модели должна быть минимальна.

Если матрица Y имеет одну переменную, используют частный вариант – ПЛС1 (PLS1). Если Y многопараметрична, используют алгоритм ПЛС2 (PLS2).

2.10.3.2. Такер1-ПЛС регрессия (3wayPLS)

В последние годы для математической обработки результатов химического анализа стали использоваться мультилинейные методы [165]. Калибровочные модели более просты, устойчивы к наличию шума и к переобучению. Это объясняется меньшим числом оцениваемых параметров калибровочной модели при использовании неразвернутых данных и мультилинейных методов обработки.

В настоящей работе применен мультилинейный ПЛС, а именно Такер1-ПЛС регрессия (3wayPLS). Применение такого алгоритма подразумевает наличие не матричной, а трехмерной тензорной структуры данных. В качестве третьего измерения в данных используют развертку потенциалов сенсоров при измерении образцов во времени. Полученный тензор имел размерность сенсоры×образцы×время (20×10×19). Поскольку различные вещества в образцах имеют различную кинетику взаимодействия с материалом сенсорных мембран, то использование данных о форме кривой выхода потенциала сенсора на

стабильные значения позволяет получать и использовать дополнительную информацию. Аналогично билинейному ПЛС, цель алгоритма трилинейного ПЛС – разложить исходную трехмерную матрицу данных X на «триады», являющиеся аналогом билинейных факторов в обычном ПЛС. Получение двумерных и трехмерных данных схематично представлено на рис. 40.

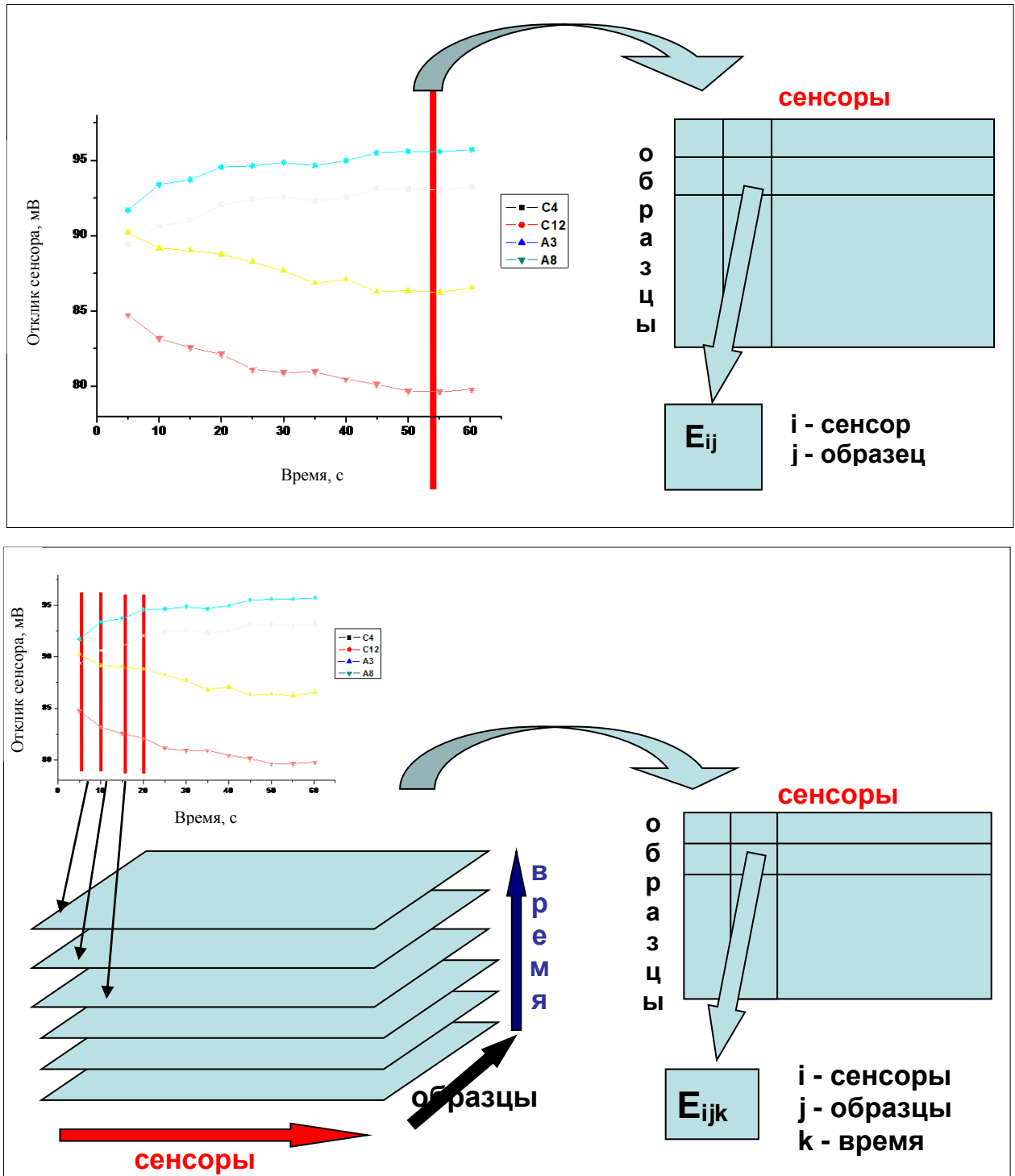


Рис. 40. Получение двумерных и трехмерных данных.

Более подробное описание алгоритма мультилинейного ПЛС изложено в [165].

2.10.4. Матричный корреляционный анализ

2.10.4.1. Вычисление коэффициентов матричных корреляций

Матричные корреляции имеют длительную историю в многомерном анализе, начиная с 1974 г. Обширный обзор методов был дан уже в 1984 г. [166]. Коэффициенты матричных корреляций могут быть интерпретированы как коэффициенты корреляции Пирсона для одномерного анализа, расширенные на матрицы.

Идея матричной корреляции – найти сходство матриц, т.е. выявить общие закономерности в структурах данных. Допустим: мы имеем 2 матрицы данных $\mathbf{X}(I \times J1)$ и $\mathbf{Y}(I \times J2)$, в которых – I (число строк) – число образцов, а J (число столбцов) – число измеренных параметров системы.

Обычно используют матричный RV -коэффициент, значения которого находятся в пределах $[0,1]$, вычисляемый по формуле:

$$RV(\mathbf{X}, \mathbf{Y}) = \frac{tr(\mathbf{X}\mathbf{X}'\mathbf{Y}\mathbf{Y}')}{\sqrt{tr[(\mathbf{X}\mathbf{X}')^2]tr[(\mathbf{Y}\mathbf{Y}')^2]}}, \quad (5)$$

где tr – сумма диагональных элементов матрицы.

Однако, как отмечается в [167], при большом числе измеренных параметров системы коэффициент RV обычно довольно высок, т.е. корреляции обнаруживаются там, где их в действительности может и не быть. Для решения этой проблемы предлагается [167] использовать модифицированный RV' -коэффициент, который может принимать и отрицательные значения $[-1,1]$:

$$RV'(\mathbf{X}, \mathbf{Y}) = \frac{tr(\overline{\mathbf{X}\mathbf{X}'}\overline{\mathbf{Y}\mathbf{Y}'})}{\sqrt{tr[(\mathbf{X}\mathbf{X}')^2]tr[(\mathbf{Y}\mathbf{Y}')^2]}}, \quad (6)$$

где $\overline{\mathbf{X}\mathbf{X}'} = [\mathbf{X}\mathbf{X}' - \text{diag}(\mathbf{X}\mathbf{X}')]$

Считается, что модифицированный RV -коэффициент дает более надежную информацию о величине корреляции между двумя матрицами переменных для одного набора образцов [167-168].

Еще один пример матричного коэффициента корреляции – *коэффициент конгруэнтности Такера*, изменяемый в пределах $[-1,1]$, который вычисляется по формуле[168]:

$$\varphi = \frac{\text{tr}(\mathbf{T}_1 \mathbf{T}_2')}{\sqrt{\text{tr}(\mathbf{T}_1 \mathbf{T}_1') \text{tr}(\mathbf{T}_2 \mathbf{T}_2')}} \quad (7)$$

где \mathbf{T}_1 и \mathbf{T}_2 – матрицы счетов, полученные при МГК-анализе, \mathbf{T}_1' и \mathbf{T}_2' – соответствующие транспонированные матрицы.

Поскольку коэффициент конгруэнтности Такера рассчитывается для матриц счетов при разложении на главные компоненты, утверждают, что он глубже описывает схожесть наборов данных, чем RV и RV' -коэффициенты.

Получение матрицы счетов происходит следующим образом: выберем образец i и опустим проекцию на первую главную компоненту (рис. 41). Полученная величина — это расстояние до начала системы ГК-координат (отрицательное или положительное).

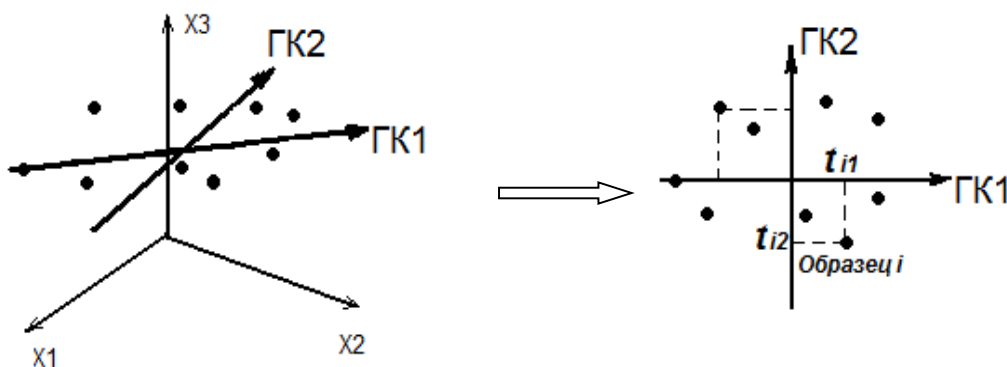


Рис. 41. Счета в ГК-координатах.

Эта координата называется *счетом образца i* , который обозначается как t_{i1} . Проекция объекта i на вторую главную компоненту даст счет t_{i2} , на третью – t_{i3} и т.д. Количество счетов, т.е. количество координат каждого объекта в этом

подпространстве, будет равно количеству главных компонент. Собирав все счета для всех образцов, получаем *матрицу счетов* T .

В силу снижения размерности пространства при МГК-анализе число главных компонент будет на единицу меньше числа столбцов исследуемой матрицы.

Так, в нашем случае приходится ограничиваться 3 ГК (две матрицы имеют лишь по 4 измеренных параметра). И при этом нельзя утверждать, что сокращение до 3 ГК для остальных матриц не внесет существенных погрешностей.

2.10.4.2. Канонический корреляционный анализ

Для нахождения взаимосвязи между наборами переменных используется *канонический корреляционный анализ*. Это - метод выявления канонической корреляции, основанный на построении таких линейных комбинаций признаков (в двух заданных группах признаков); коэффициент парной корреляции между этими комбинациями достигает максимального значения.

Таким образом, каноническая корреляция - обобщение парной корреляции; используется для определения взаимосвязи между двумя группами признаков.

Пусть имеются 2 матрицы данных $X(I \times J_1)$ и $Y(I \times J_2)$, в которых I (*число строк*) – число образцов, а J (*число столбцов*) – число измеренных параметров системы. Матрицы изначально рассматриваются как независимые.

На первом этапе находим два вектора $a^1 = (a_1^1, \dots, a_{J_1}^1)'$ и $b^1 = (b_1^1, \dots, b_{J_2}^1)'$ которые максимизируют корреляцию между линейными комбинациями:

$$U^1 = Xa^1 = a_1^1 X^1 + a_2^1 X^2 + \dots + a_{J_1}^1 X^{J_1} \quad \text{и} \quad V^1 = Yb^1 = b_1^1 Y^1 + b_2^1 Y^2 + \dots + b_{J_2}^1 Y^{J_2}$$

$$\text{а} \quad \rho_1 = \text{cor}(U^1, V^1)$$

Таким образом, U^1 и V^1 – первые канонические переменные, а ρ_1 – первая каноническая корреляция. Затем находятся следующие переменные.

При этом $\rho_s = \sqrt{\lambda_s}$.

В итоге строится вектор для каждого значения $\lambda = (\lambda_1, \lambda_2)$

Получаемые решения называются *каноническими корнями*, каждое из которых объясняет разницу между двумя наборами переменных. Алгоритм находит новые собственные значения по шагам, на каждом из которых максимизируется корреляция между каноническими переменными. Первые несколько пар канонических переменных объясняют наибольшую долю различия между двумя множествами переменных. Согласно грубому эмпирическому правилу канонические корреляции, меньшие 0.3, вряд ли окажутся значимыми, но обычно стоит рассматривать и корреляции, близкие к этому порогу, чтобы выяснить, не поддаются ли они содержательной интерпретации.

Таким образом, в каждом множестве признаков отыскиваются линейные комбинации величин, имеющих максимальную корреляцию. Эти линейные комбинации и являются первыми координатами новых систем.

В каждом множестве рассматриваются следующие линейные комбинации, корреляция между которыми больше, чем корреляция между любыми другими линейными комбинациями, некоррелированными с первыми. И так продолжается до тех пор, пока не будут построены две новые координатные системы, оси которых определяются как CV1 и CV2, вычисляются по формуле:

$$CV(\lambda_1, \lambda_2) = cor(\{X_i a_{\lambda}^{(-i)}\}_{i=1}^I, \{Y_i b_{\lambda}^{(-i)}\}_{i=1}^I) \quad (8)$$

Такие координатные системы называют также картами образцов (рис. 42).

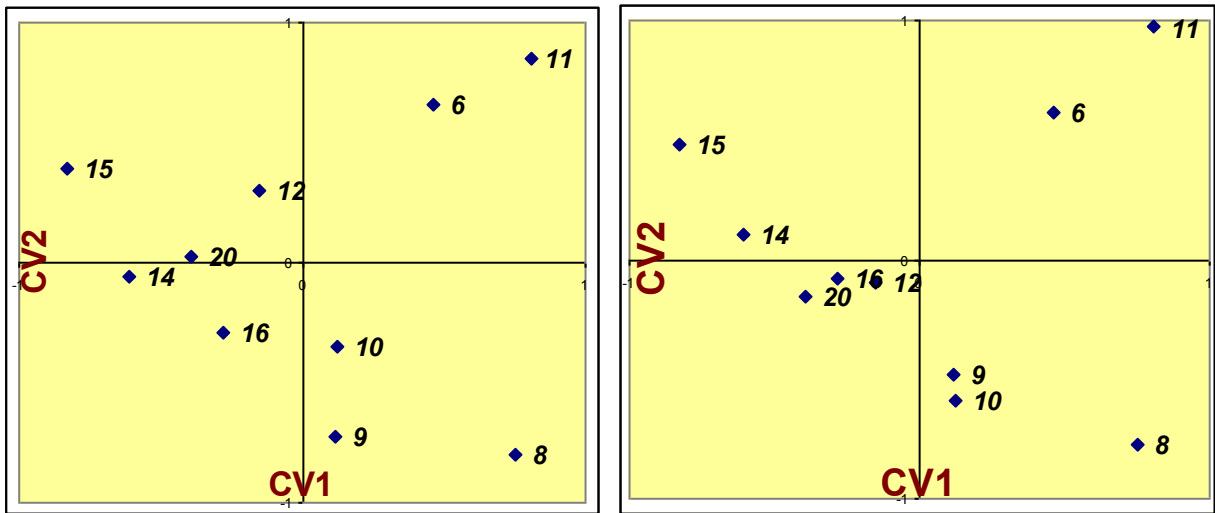


Рис. 42. Пример карт образцов для индийского черного чая. Канонические корни: 0,9999; 0,9291

Наличие общей схожести картин по расположению образцов относительно друг друга свидетельствует о высокой канонической корреляции исследуемых матриц, что подтверждается и значениями соответствующих коэффициентов.

Многомерная модель канонических корреляций представляет собой мощный инструмент исследования и обобщения сложных взаимосвязей между двумя множествами переменных. Данной моделью редко пользуются в основном из-за трудностей вычислений, однако сейчас, когда для проведения этих вычислений составлены эффективные алгоритмы, нет каких-либо особых оснований пренебрегать этим методом, поскольку он является одним из самых наглядных и удобных для восприятия.

ГЛАВА 3. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ И ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СЛОЖНЫХ ОБЪЕКТОВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

3.1. Определение полифенолов и кофеина в образцах чая

Специальный блок экспериментальных исследований был посвящен электрофоретическому определению компонентов, входящих в состав зеленого и черного чая. В этом отношении оказался полезным уже имевшийся опыт в нашей исследовательской группе [122-123].

Мы обратились к методу мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ), где наряду с электрофоретическим, реализуется и хроматографический механизм разделения за счет распределения аналитов между буферным электролитом и мицеллами, представляющими собой *псевдостационарную* фазу.

Таким образом, разделение компонентов модельных смеси и анализ реальных объектов проводился методом МЭКХ. В качестве примера приведена электрофореграмма для образца чая «Monarch» (рис. 43):

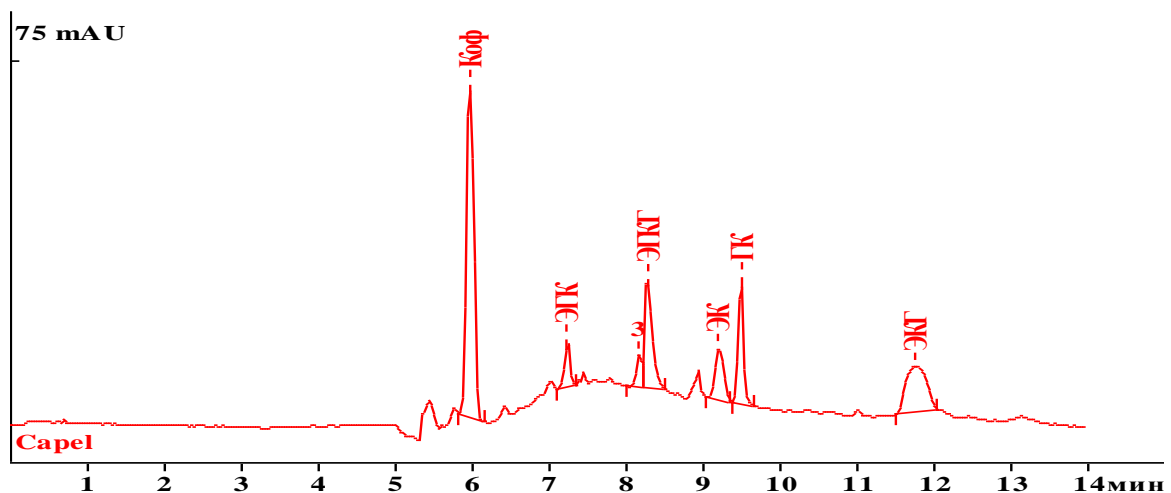
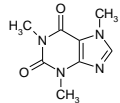
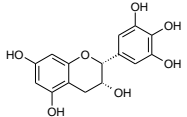
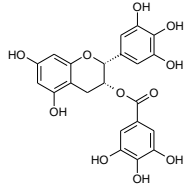
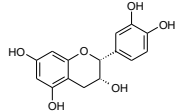



Рис. 43. Электрофореграмма образца чая «Монарх».

Условия: Система капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ 105»; кварцевый капилляр: внутренний диаметр 75 мкм, $L_{эф}$ =60 см, $L_{общ}$ =50 см. Буферный электролит: 25 мМ фосфатный буфер рН=7.0 с добавкой 25 мМ ДДСН. Проба: образец «Монарх». 200 мг чая на 20 мл кипятка, 5 минут. Разбавление в 2 раза. Ввод пробы: 30 мбар, 10 с. Напряжение: 25 кВ. Детектирование: 200 нм.

Проведена количественная оценка содержания полифенолов и кофеина в исследуемых образцах (табл. 15).

Таблица 15. Результаты количественного анализа различных сортов чая, % масс. (P=0.95, n=3)

Формула аналита	Название (принятое сокр.)	«Лисма»	«Ристон»	«Индийский со слоном»	«Монарх»	«Гринфилд»	«Ахмад»	«Принцесса Нури»
	Кофеин (Коф)	2,09 ±0,11	2,06 ±0,09	1,60 ±0,07	1,59 ±0,09	1,79 ±0,10	2,77 ±0,13	2,23 ±0,11
	Эпигаллокатехин (ЭГК)	0,03 ±0,01	0,18 ±0,01	0,07 ±0,01	0,09 ±0,01	0,07 ±0,01	0,08 ±0,01	0,06 ±0,01
	Эпигаллокатехин галлат (ЭГКГ)	0,10 ±0,01	1,64 ±0,09	0,28 ±0,03	0,49 ±0,04	0,24 ±0,02	0,31 ±0,02	0,22 ±0,02
	Эпикатехин (ЭК)	0,03 ±0,01	0,14 ±0,01	0,14 ±0,01	0,08 ±0,01	0,06 ±0,01	0,06 ±0,01	0,05 ±0,01
	Галловая кислота (ГК)	0,18 ±0,02	0,45 ±0,04	0,21 ±0,02	0,27 ±0,03	0,34 ±0,02	0,31 ±0,02	0,21 ±0,01

3.2. Получение хроматографических профилей препаратов традиционной китайской медицины (ТКМ)

Хроматографические профили растительных препаратов ТКМ получают с целью контроля качества, а также для идентификации групп соединений, ответственных за те или иные свойства препаратов. Метод ВЭЖХ–УФ был использован для получения хроматографических профилей препаратов ТКМ.

Для извлечения компонентов из сухого материала ТКМ выявлены возможности трех вариантов жидкостно-жидкостной экстракции: использование органических экстрагентов, водно-органических и водных.

Органическая экстракция заключалась в экстракции компонентов ацетонитрилом: 100 мг измельченного препарата и 1 мл ацетонитрила тщательно перемешивали в вортексе в течение 15 мин. Затем пробы центрифугировали в течение 10 мин, отбирают 500 мкл верхнего слоя в виалу для автосамплера и добавляли 500 мкл воды. Полученные образцы подвергали хроматографическому анализу.

Водно-органическая экстракция основана на экстракции компонентов в 80%-й водный раствор метанола: 100 мг измельченного препарата и 2,5 мл 80%-го метанола помещали в УЗВ при нагревании в течение 30 мин. Затем тщательно перемешивали в вортексе в течение 10 мин. Пробы центрифугировали в течение 10 мин, отбирали 2 мл верхнего слоя в виалу и выпаривали досуха в токе азота. Сухой остаток растворяли в 500 мкл 60% ацетонитрила и подвергали хроматографическому анализу.

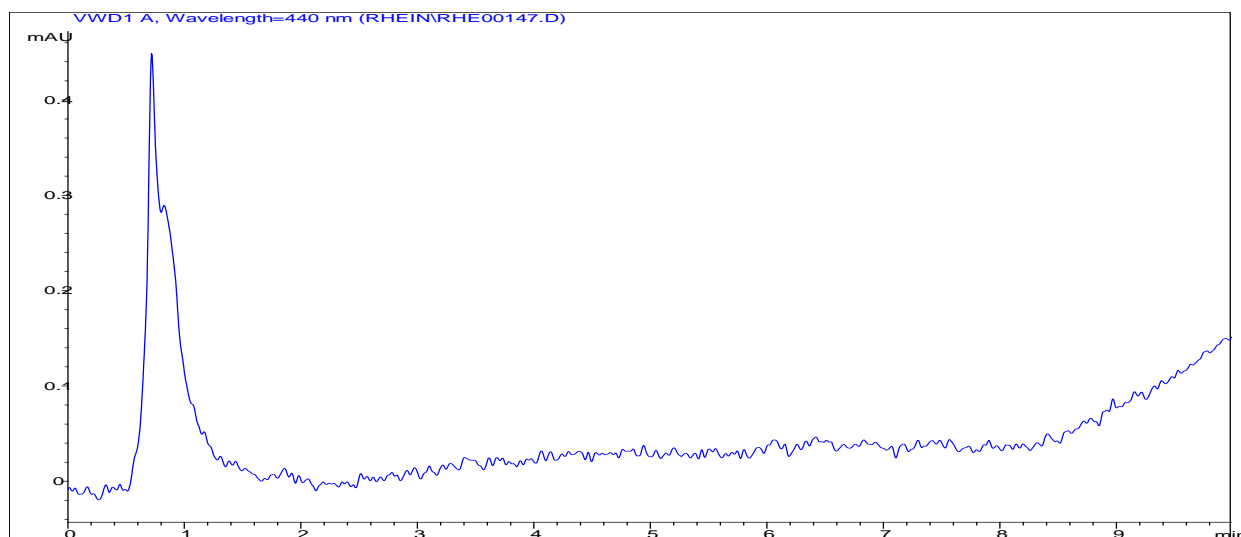
Водная экстракция заключалась в экстракции компонентов в 0,2%-й раствор уксусной кислоты: 100 мг измельченного препарата и 1,5 мл 0,2%-го раствора уксусной кислоты помещают в УЗВ при нагревании в течение 30 мин. Затем тщательно перемешивали в вортексе в течение 10 мин. Пробы центрифугировали в течение 10 мин, отбирали 1 мл верхнего слоя, к которому добавляли 2 мл этилацетата. Затем тщательно перемешивали в вортексе в течение 10 мин,

отбирают 1,6 мл верхнего слоя в виалу и выпаривали досуха в токе азота. Сухой остаток растворяли в 500 мкл 60% ацетонитрила и подвергали анализу.

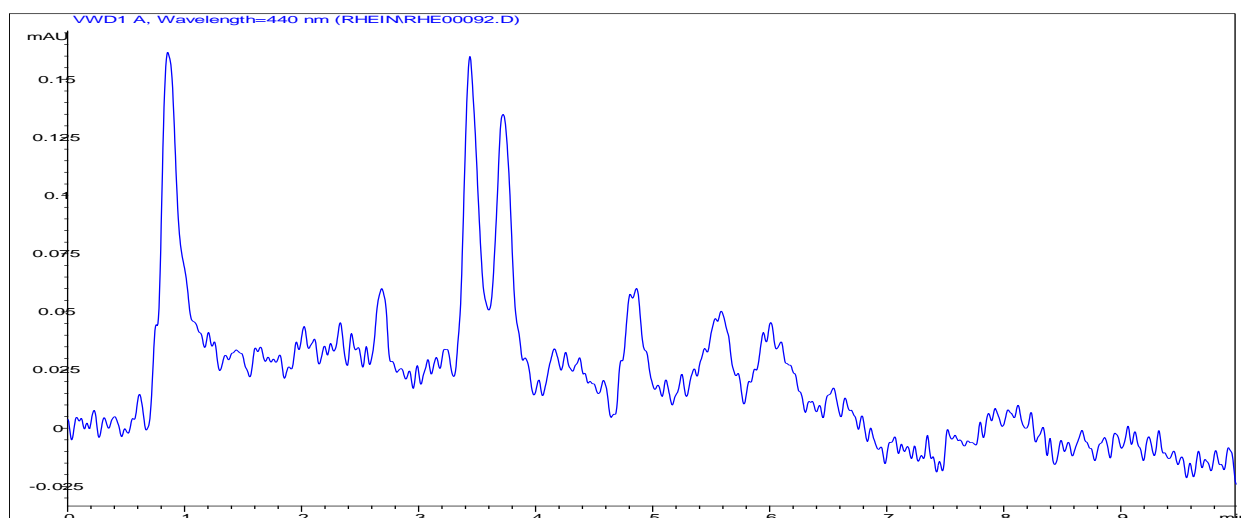
Существуют сведения [166], что препараты ТКМ могут содержать антрахиноны. Чтобы проверить этот факт, все образцы были проанализированы в условиях определения антрахинонов, предложенных в [166]. Однако, искомые аналиты в образцах обнаружены не были ни при одном из способов пробоподготовки.

Для получения хроматографических профилей без идентификации пиков, а лишь в форме «отпечаток образца» было решено использовать экстракцию в ацетонитрил, поскольку в этом случае профиль большинства образцов максимально «насыщен» пиками (рис. 44).

а)



б)



в)

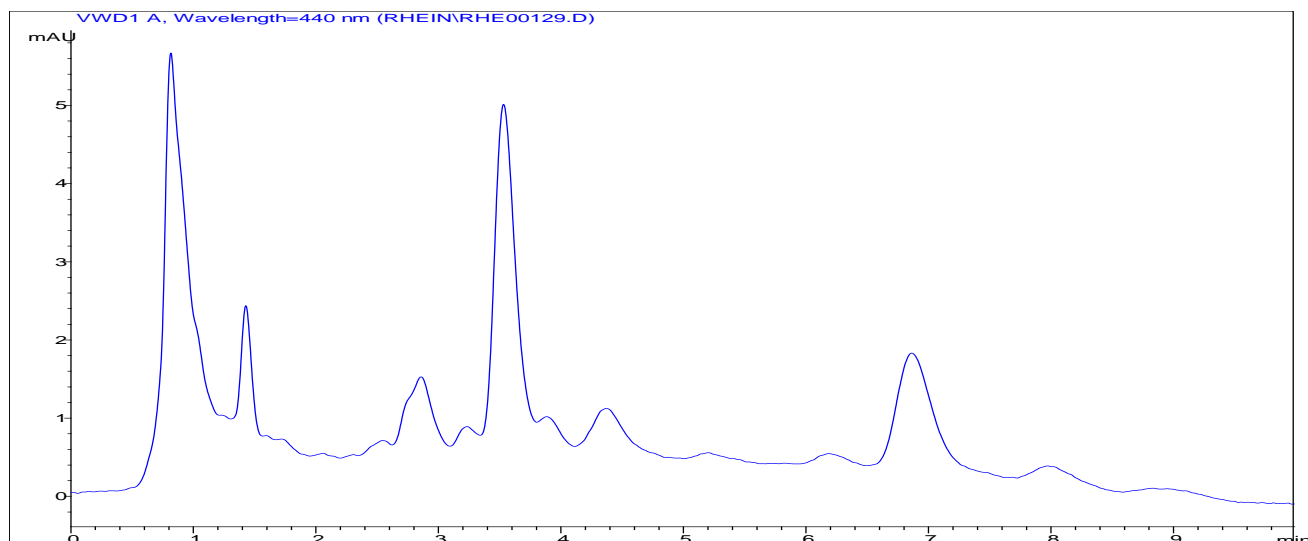


Рис. 44. Хроматограммы образца Реманния клейкая (*Rehmanniae Adhesive*) с различными видами экстракции: а) – водная, б) – водно-органическая, в) – органическая.

Условия: хроматограф «Agilent-1200», колонка (250×4.6 мм) YMC-Triart C18 (5 мкм); подвижная фаза – 60 об.% ацетонитрила, 0,05 М муравьиной кислоты в воде, расход 200 мкл/мин, объем пробы 40 мкл, длина волны 440 нм.

Для получения еще более насыщенных пиками профилей выбрана длина волны 254 нм, поскольку многие органические соединения поглощают именно на ней. Получены хроматографические профили для всех исследуемых лекарственных препаратов ТКМ (Приложение 3).

На рис. 45 в качестве примера приведен профиль образца Коптис китайский (*Chinese Coptis*).

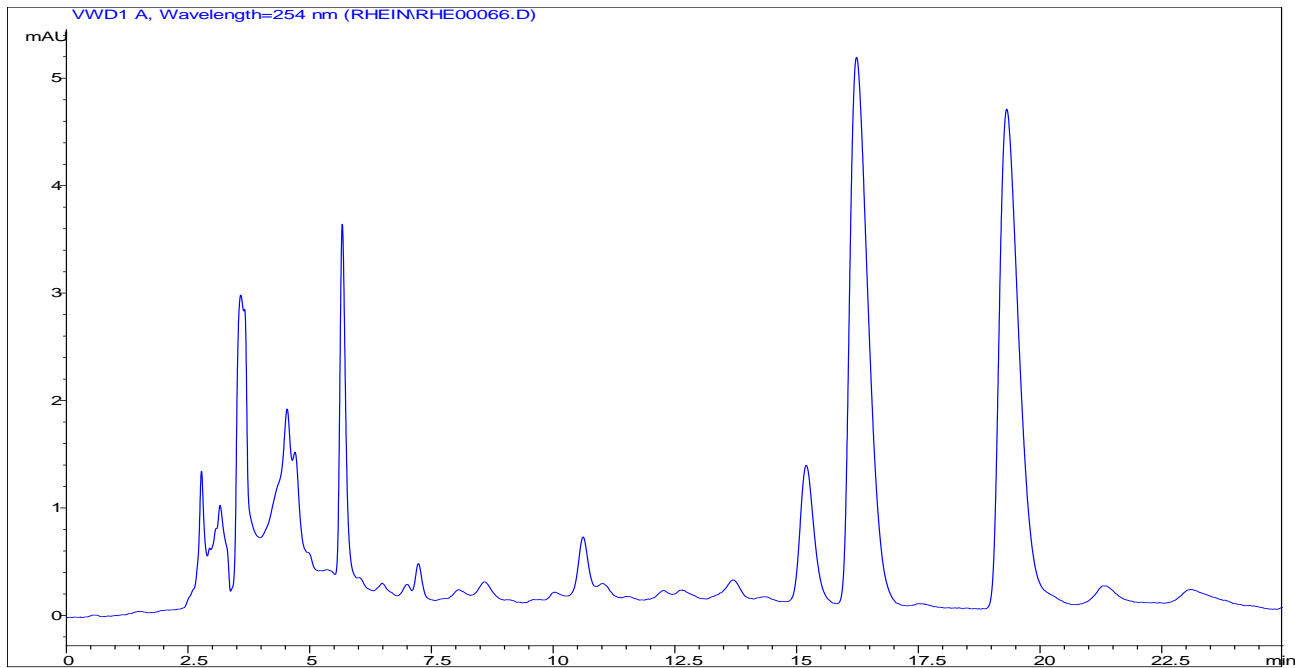


Рис. 45. Хроматограмма образца растительного препарата Коптис китайский (Chinese Coptis).

Условия: хроматограф «Agilent-1200», колонка (250×4.6 мм) YMC-Triart C18 (5 мкм); подвижная фаза – 60 об.% ацетонитрила, 0,05 М муравьиной кислоты в воде, расход 200 мкл/мин, объем пробы 40 мкл, длина волны 254 нм.

3.3. Получение электрофоретических профилей препаратов традиционной китайской медицины

Электрофоретические профили растительных препаратов ТКМ гораздо реже используются, чем хроматографические. Однако и в них может быть скрыта полезная информация.

В процессе пробоподготовки пробы тщательно фильтровались, поскольку в отваре могли находиться достаточно крупные частицы образца, способные засорить кварцевый капилляр. Все образцы готовились к анализу по следующей схеме: 500 мг измельченного препарата и 10 мл свежевскипяченной дистиллированной воды помещали в УЗВ с нагреванием в течение 30 мин. Затем пробы центрифугировали в течение 5 мин, отбирали 5 мл верхнего слоя в пробирку, вновь центрифугировали в течение 5 мин, отбирали 2 мл верхнего слоя в медицинский шприц. Затем пропускали раствор через фильтр Chromafil AO 45/3. Полученную пробу разбавляли водой в 2 раза и подвергали анализу.

Получены электрофоретические профили для всех исследуемых лекарственных препаратов ТКМ (Приложение 4). На рис. 46 в качестве примера приведен профиль образца Коптис китайский (Chinese Coptis).

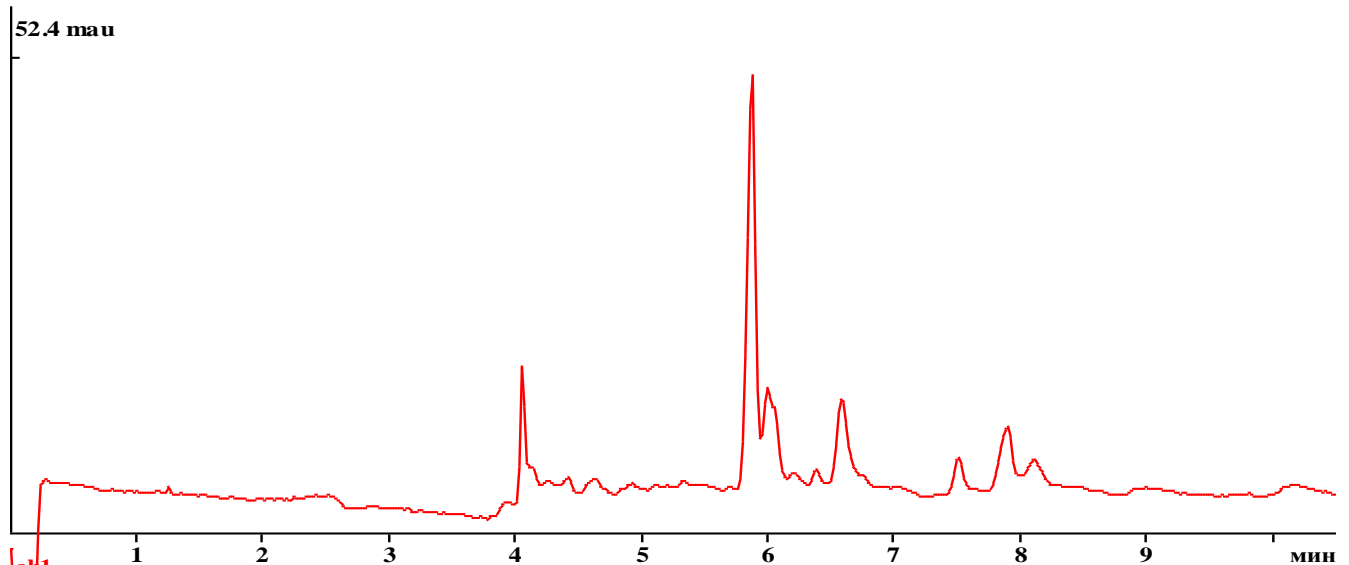


Рис. 46. Электрофореграмма образца растительного препарата Коптис китайский (Chinese Coptis).

Условия: КАПЕЛЬ 105; капилляр: внутренний диаметр 50 мкм, $L_{эф}$ =60 см, $L_{общ}$ =50 см. Буферный электролит: 25 мМ фосфатный буфер рН=7.0 с добавкой 25 мМ ДДСН. Ввод пробы: 30 мбар, 20 с. Напряжение: 25 кВ. Детектирование: 200 нм.

3.4. Оценка содержания компонентов в растительных препаратах традиционной китайской медицины методом капиллярного электрофореза

На основании полученных электрофореграмм для всех образцов проведена количественная оценка содержания полифенолов и кофеина (табл.13).

Для этой цели построены калибровочные зависимости по стандартным веществам – кофеин, эпигаллокатехин, эпигаллокатехин галлат, эпикатехин, галловая кислота. На рис. 47 приведена градуировочная зависимость для эпикатехина.

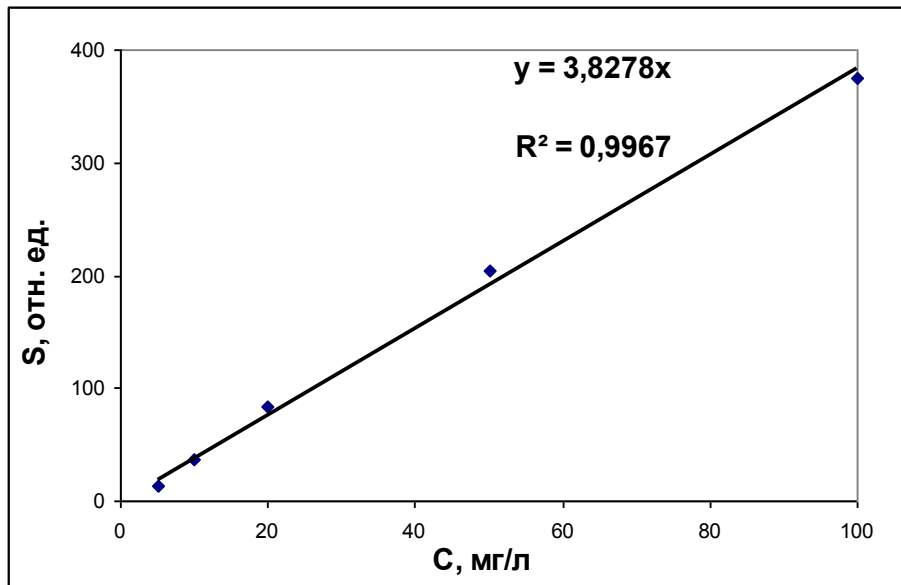


Рис. 47. Зависимость площади пика эпикатехина от его концентрации в анализируемой пробе.


Затем площади пиков в электрофореграммах образцов соотносились с калибровочными зависимостями и, согласно уравнениям, вычислены содержания компонентов (табл. 16).

Таблица 16. Результаты количественного анализа образцов растительных препаратов традиционной китайской медицины, % масс. ($P=0.95$, $n=3$)

Образцы	<i>кофеин</i>	<i>эпигалло катехин</i>	<i>эпигалло катехин галлат</i>	<i>эпикатехин</i>	<i>галловая кислота</i>
Хризантема китайская (Chinese Chrysanthemum)	0,000	0,327±0,014	0,526±0,009	0,156±0,009	0,000
Корень солодки (Licorice Root)	0,073±0,004	0,000	0,098±0,003	0,257±0,008	0,000
Ветки кассии (Cassia Twig)	0,000	0,046±0,005	0,000	0,045±0,002	0,300±0,005
Хвойник китайский (Chinese Ephedra)	0,199±0,009	0,000	0,000	0,000	0,000
Семена горького абрикоса (Bitter Apricot Seeds)	0,108±0,008	0,334±0,009	0,000	0,000	0,000
Реманния клейкая (Rehmanniae Adhesive)	0,044±0,004	0,016±0,002	0,034±0,001	0,000	0,000
Корень одуванчика (Dandelion Root)	0,022±0,001	0,000	0,058±0,002	0,000	0,221±0,007
Коптис китайский (Chinese Coptis)	0,000	0,466±0,011	0,000	0,019±0,001	0,000

3.5. Получение референтных данных для образцов мочи

Все образцы мочи были проанализированы методом капиллярного электрофореза, согласно п. 2. 4. Для каждого пациента составлен протокол с результатами биохимического анализа мочи (рис. 48).

 ЛАБОРАТОРИЯ МОЧЕКАМЕННОЙ БОЛЕЗНИ		190103, г. Санкт-Петербург, пр. Рижский, д.22 www.mkb-lab.ru, e-mail: info@mkb-lab.ru тел. 702-77-47, факс 251-26-73	
Биохимический анализ суточной мочи (заключение № 1196/1238)			
Шифр пациента	КДА		
Возраст	30 лет		
Пол	Мужской		
Диагноз	Обследование		
Лечение			
Материал	Суточная моча, диурез – 2500 мл		
Ф.И.О. врача	Паронников М. В.		
№	Показатель	Значение	Норма
		ммоль/сут	ммоль/сут
1	Щавелевая кислота (оксалат)	0,1	0,2 – 0,5
2	Лимонная кислота (цитрат)	0,7	2,5 – 5,7
3	Мочевая кислота (урат)	3,7	0,9 – 4,0
4	Калий	43,5	23,1 – 105,0
5	Натрий	154,5	165,2 – 270,0
6	Кальций	6,3	2,7 – 5,0
7	Магний	3,7	3,3 – 6,6
8	Аммоний	23,7	9,4 – 50,0
9	Сульфат	12,3	14,6 – 35,4
10	Фосфат	32,3	16,7 – 35,0
11	Хлорид	170,8	112,7 – 253,5
12	Креатинин	15,6	муж: 13 – 18 жен: 7 – 13
13	pH	6,0	5,5 – 6,5
14	Плотность	1009	>1010 г/л

Заключение: гипоцитратурия, гиперкальциурия.

Дата выполнения исследования: 15.02.2013

Рис. 48. Пример протокола с результатами анализа мочи.

Для каждого образца проведена оценка 14 параметров: содержание ионов аммония, калия, натрия, кальция, магния, оксалата, цитрата, урата, хлорида, сульфата, фосфата. Кроме того, оценивались плотность мочи и значение pH.

ГЛАВА 4. АНАЛИЗ СЛОЖНЫХ ОБЪЕКТОВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИСЕНСОРНЫХ СИСТЕМ

4.1. Стратегия выбора сенсоров в состав мультисенсорной системы

Мультисенсорная система представляет собой набор (массив) электрохимических, потенциометрических в данной работе, сенсоров. Каждый сенсор дает отклик на содержание сразу нескольких компонентов в исследуемом растворе, то есть обладает перекрестной чувствительностью. Для успешного функционирования такие сенсоры должны обладать высокой стабильностью и воспроизводимостью в реальных сложных многокомпонентных средах.

Минимальное количество сенсоров – 2, максимальное число сенсоров ограничено лишь числом каналов многоканального вольтметра (32 в данном исследовании).

Ключевым элементом сенсора является чувствительная мембрана. Она состоит из полимерной матрицы (чаще всего поливинилхлоридной), пластификатора, например, орто-нитрофенилоктилового эфира и небольшого процента (2-7%) различных добавок. Именно составом мембран (рис. 49) все сенсоры отличаются друг от друга, проявляя перекрестную чувствительность, т. е. отклик ко многим компонентам анализируемой среды сразу.

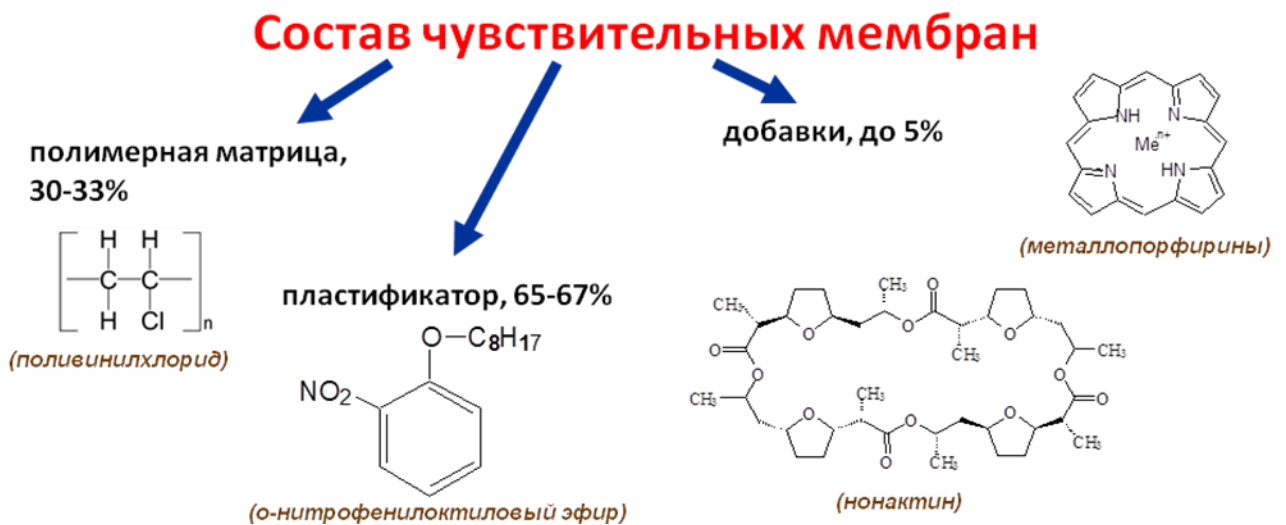


Рис. 49. Состав чувствительных мембран.

При выборе сенсоров в состав системы руководствуются литературными данными либо предыдущим опытом. Так, при подборе сенсоров в состав системы, с помощью которой требовалось определять полифенолы в чае, руководствовались данными о наборе сенсоров, который применялся ранее при анализе полифенолов в вине [19].

После проведения потенциометрических измерений и обработки полученных данных выявлялись те сенсоры, которые практически не изменяли своих потенциалов. Такие сенсоры удаляли из массива, оптимизируя тем самым его состав.

Сама методика проведения измерений мультисенсорной системой достаточно проста. Она включает выявление необходимости в разбавлении образца, выбор времени измерения и процедуры отмывки сенсоров при переходе к анализу очередного образца.

4.2. Разработка методик проведения анализа биологических сред с помощью мультисенсорной системы

Для получения воспроизводимых значений сигналов сенсоров необходимо было установить оптимальное соотношение между разбавлением образца и процедурой отмывки сенсоров. Обычно более концентрированный образец дает более воспроизводимые отклики, но при этом возникает проблема «памяти».

Была доказана необходимость кондиционирования сенсоров в образце перед серией анализов. Для этого мультисенсорная система выдерживалась в 10%-ном растворе образца в течение 30 мин, при этом каждые 10 мин снимались показания сенсоров.

На рис. 50 представлены типичные зависимости отклика от времени для 4-х сенсоров при кондиционировании. Зависимости для остальных сенсоров выглядят аналогично.

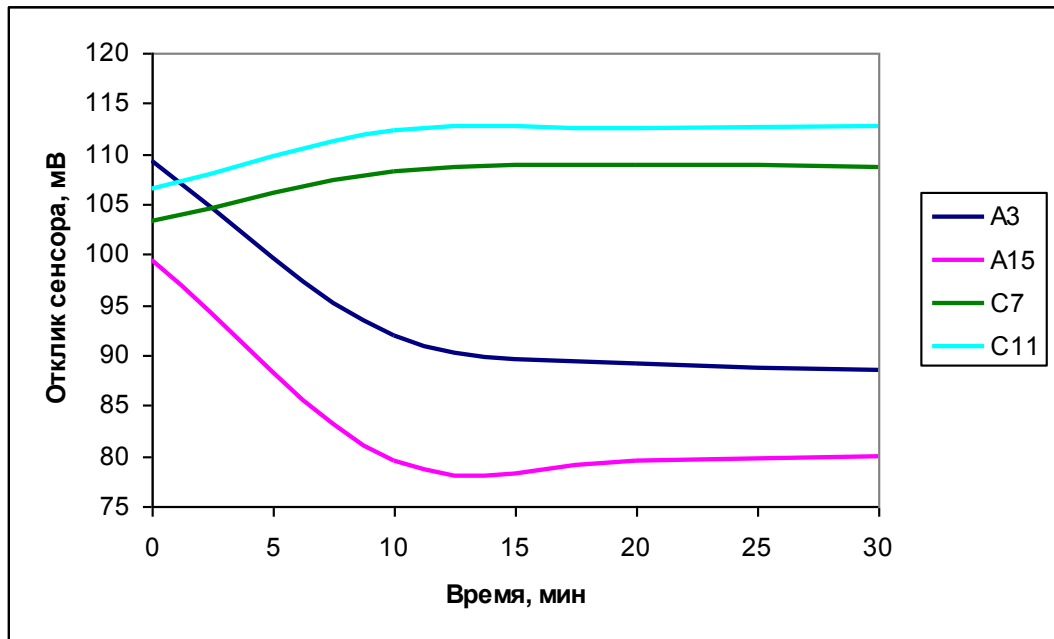


Рис. 50. Зависимость отклика сенсора от времени при кондиционировании (выдерживании сенсоров в образцах мочи).

После этого проводилась процедура отмывки сенсоров дистиллированной водой до постоянных значений потенциалов. После трехкратного повторения эксперимента выяснилось, что получасового кондиционирования вполне достаточно, сенсоры отмываются до постоянного значения потенциалов в воде (показания отличаются на ± 5 мВ).

Для оценки необходимого времени анализа мультисенсорная система в течение 5 мин выдерживалась в 10%-ном растворе образца (с интервалом 7 с записывался отклик для каждого сенсора).

На рис. 51 представлены типичные зависимости отклика тех же 4 сенсоров от времени. Соответствующие зависимости для остальных сенсоров аналогичны.

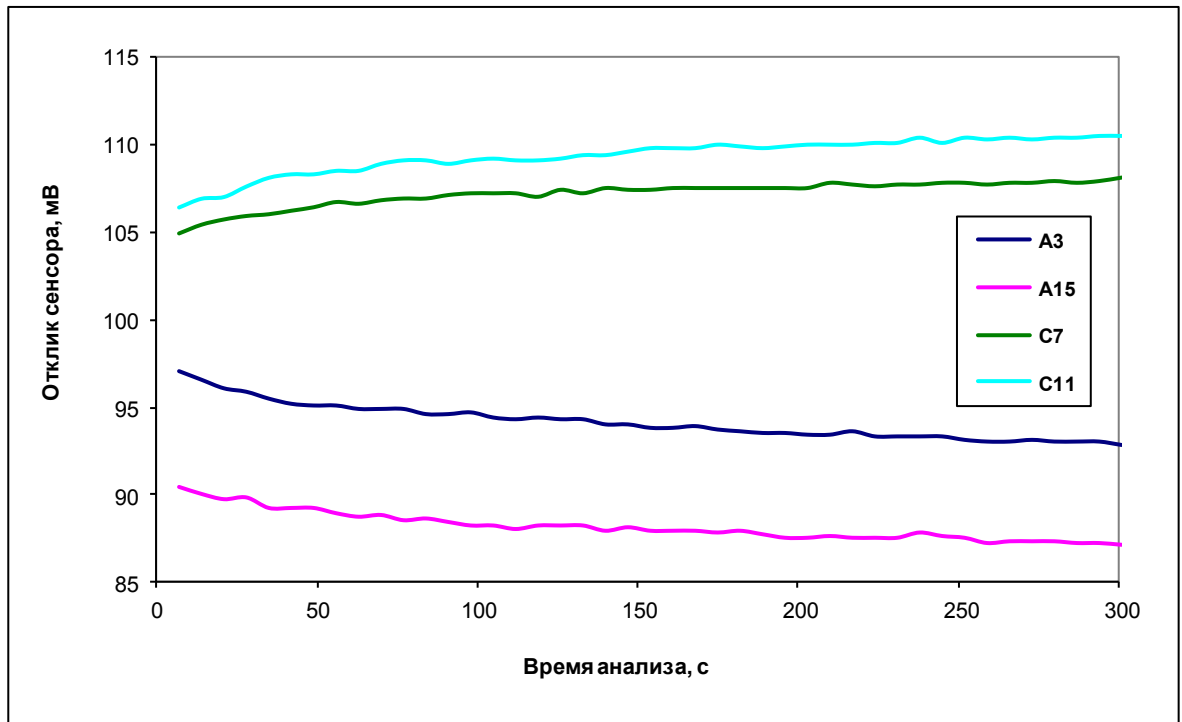


Рис. 51. Зависимость отклика сенсора от времени при определении необходимого времени анализа.

После двух минут анализа значения потенциалов практически не изменяются. Поэтому именно это время выбрано для анализа.

Для оптимизации процедуры регенерации (отмывки) сенсоров сопоставлены результаты с использованием 0,05%-ного раствора Tween-20 и дистиллированной воды. Первый - является поверхностно-активным веществом, способен вымывать из мембран возможные органические соединения, извлеченные из мочи [16].

Однако, оказалось, что использование 0,05%-ного раствора Tween-20 не оправдано – сенсоры отмываются дольше. В итоге электроды промывали водой (3 раза по 2 мин).

Проведена оценка содержания аналитов в моче и соотнесена с концентрацией, на которую способны откликаться сенсоры (табл. 17).

Таблица 17. Содержание определяемых аналитов в моче и диапазон концентраций, определяемых массивом сенсоров

	Норма содержания в моче·10 ⁻³ , моль/л	Диапазон концентраций, определяемых единичными сенсорами, моль/л
Оксалат	0,1-0,25	10 ⁻⁴ -10 ⁻²
Цитрат	1,25-2,85	10 ⁻⁴ -10 ⁻²
Урат	0,45-2	не опр.
Калий	11,55-52,5	5*10 ⁻⁵ – 0,5
Натрий	82,6-135	5*10 ⁻⁵ – 0,5
Кальций	1,35-2,5	5*10 ⁻⁵ – 0,1
Магний	1,65-3,3	5*10 ⁻⁵ – 0,1
Аммоний	4,7-25	5*10 ⁻⁵ – 0,5
Сульфат	7,3-17,7	10 ⁻⁴ – 0,1
Фосфат	8,35-17,5	не опр.
Хлорид	56,35-126,75	10 ⁻⁵ – 1
Креатинин	3,5-9,0	не опр.

Выяснилось, что для определения различных компонентов мочи при исследовании ее мультисенсорной системой необходимо осуществлять разбавление в 5-20 раз. Проведена серия соответствующих экспериментов при содержании образца 5, 10 и 20%. Один и тот же образец последовательно измерялся 5 раз, и при выбранной процедуре отмывки измерялись показания в воде.

Для каждого сенсора вычислялось относительное отклонение результатов в образце и в воде для пяти измерений. В табл. 18 приведено суммарное отклонение потенциалов сенсоров в образце и при отмывке водой для 5, 10 и 20 % растворов.

Таблица 18. Суммарное отклонение потенциалов сенсоров (n=5)

	разбавление		
	5%	10%	20%
образец	154.6	80.5	27.9
вода	29.2	40.1	132.2

Результаты, приведенные в табл. 15 подтверждают, что при увеличении содержания мочи в растворе при исследовании ее мультисенсорной системой суммарное относительное отклонение потенциалов сенсоров в образце падает, а в воде при отмывке сенсоров растет. Оптимальным вариантом для данного случая является десятикратное разбавление образцов мочи.

Согласно разработанной методике (п.2.7) каждый образец был проанализирован 4 раза наряду с другими образцами в произвольном порядке. Затем вычислялось среднее значение потенциала каждого сенсора в каждом образце.

В специальной серии экспериментов контролировалась стабильность показаний сенсоров на контрольном образце биологической жидкости. Для этого подготовленные 70 аликвот по 10 мл одного и того же образца замораживали, а затем подвергали ежедневному анализу мультисенсорной системой 3-4 раза в произвольном порядке.

На рис. 52 в качестве примера приведены зависимости значений потенциалов от дня эксперимента для 4 сенсоров.

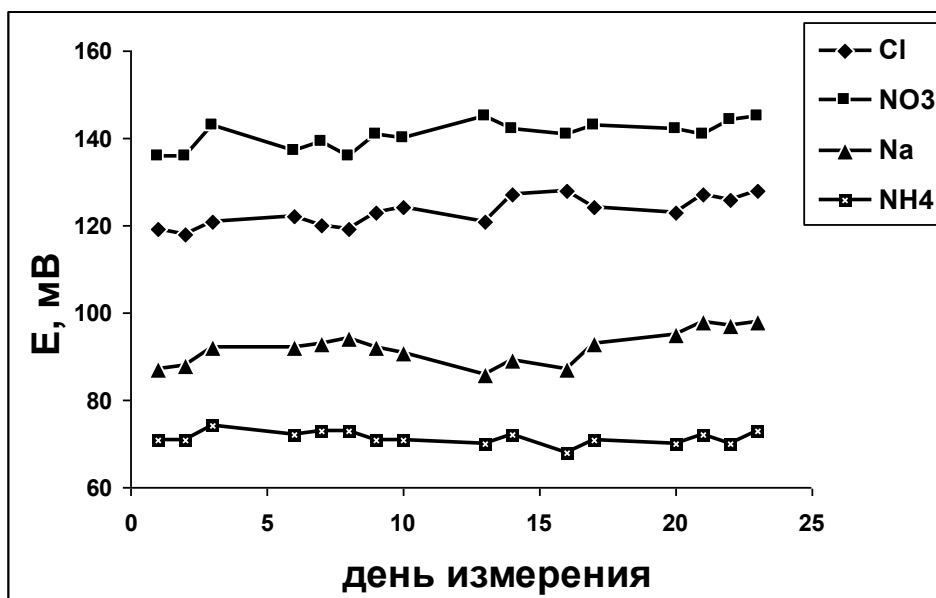


Рис. 52. Проверка стабильности показаний сенсоров на протяжении эксперимента

Отклонение в значениях потенциалов для всех 19 сенсоров используемого в этом эксперименте массива составило 2-10 мВ (3-7%), что является приемлемым при проведении измерений такого характера.

Для того чтобы убедиться в наличии чувствительности сенсоров массива к различным полифенолам, которые планировалось количественно определять в образцах чая, проведены измерения в индивидуальных растворах галловой кислоты и катехина в расширенном диапазоне концентраций ($10^{-3} - 10^{-6}$ моль/л).

Эксперимент проводился по схеме: в ячейке на 100 мл последовательно увеличивали концентрацию водного раствора определяемого аналита в заданном диапазоне. Отклики массива сенсоров - значения потенциалов - для каждой концентрации стабилизировались в течение 3 мин.

На рис. 53 приведен вид зависимости потенциалов сенсоров от логарифма концентрации галловой кислоты. Данные сенсоры обладают чувствительностью к галлат-аниону. Измерения проводились при фиксированном значении pH = 6.7, поэтому наблюдаемая разница в величинах потенциалов связана с изменением концентрации галлата, а не с различными значениями pH.

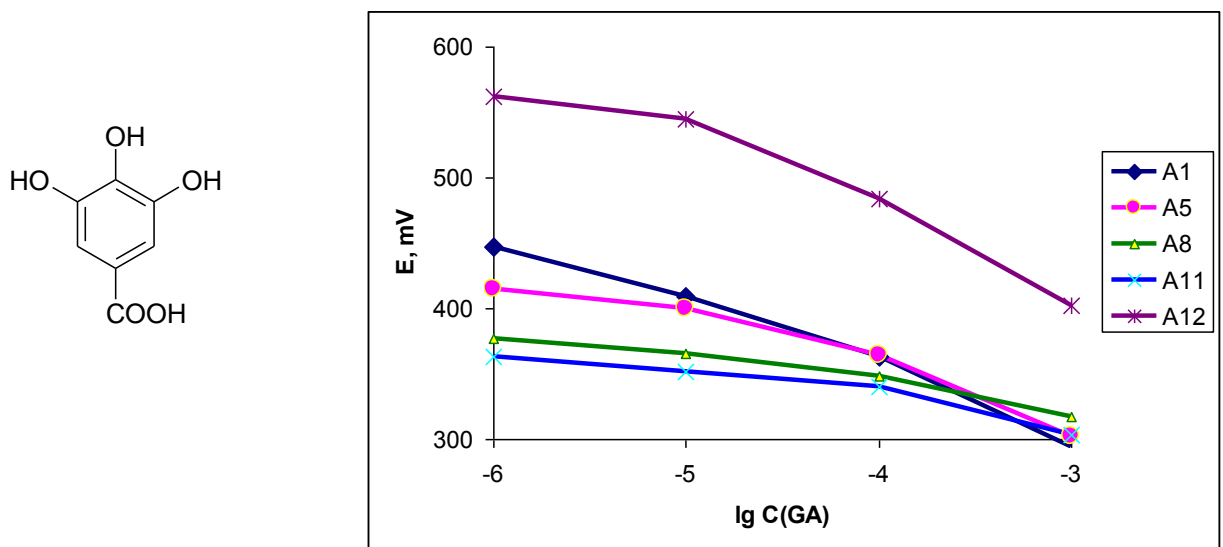


Рис. 53. Зависимость потенциалов сенсоров от концентрации галловой кислоты.

Зависимость потенциала от концентрации катехина приведена на рис. 54. Абсолютные величины наклонов линейных участков калибровочных зависимостей сенсоров в растворах катехина несколько ниже по сравнению с галловой кислотой, что может быть обусловлено меньшей ионизацией катехина в нейтральной среде (для галловой кислоты значения pK_a составляют 4.27; 8.68; 11.45; для катехина $pK_a=8.64$; 9.41; 11.26; 13.26).

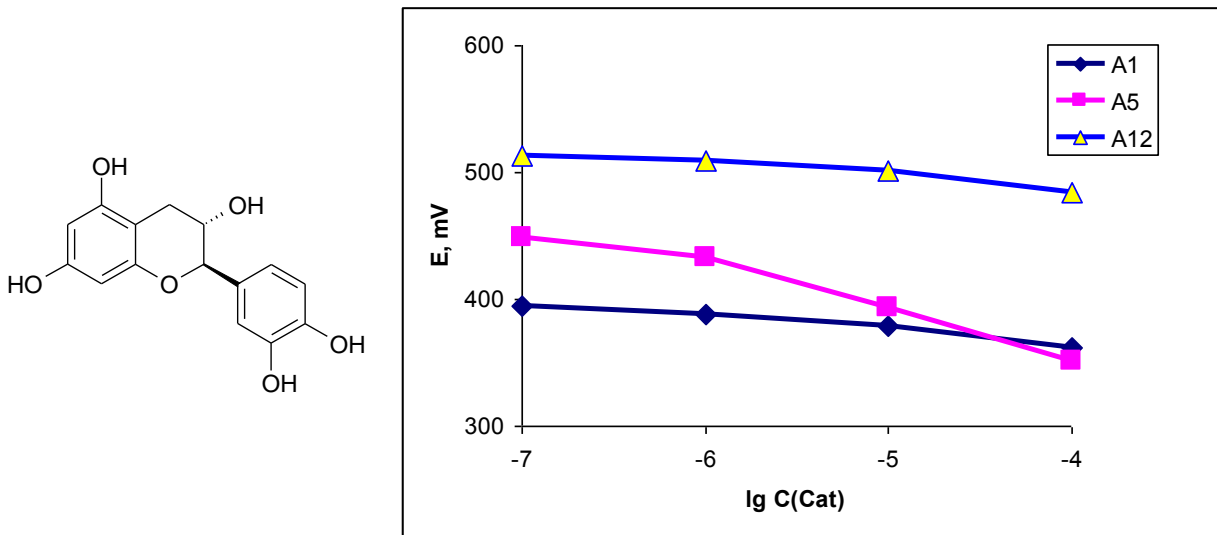


Рис. 54. Зависимости потенциалов сенсоров от концентрации катехина.

Подобные измерения в индивидуальных растворах проведены и для алкалоида кофеина, присутствующего в образцах чая наряду с полифенолами. В нейтральной среде чувствительность сенсоров к неионизированной форме кофеина практически отсутствует, в кислой – катион-чувствительные сенсоры дают отклик на изменение концентрации протонированной формы кофеина (рис. 55).

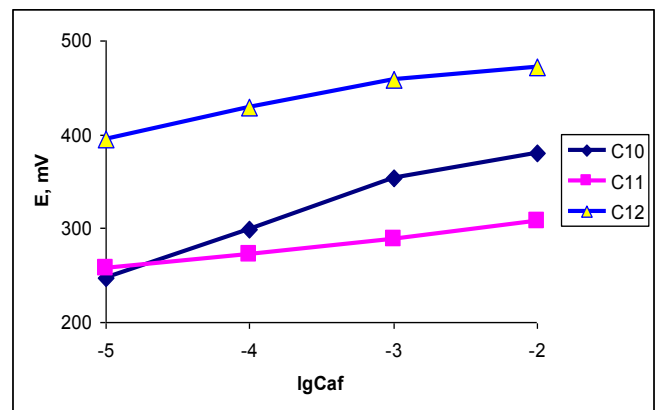
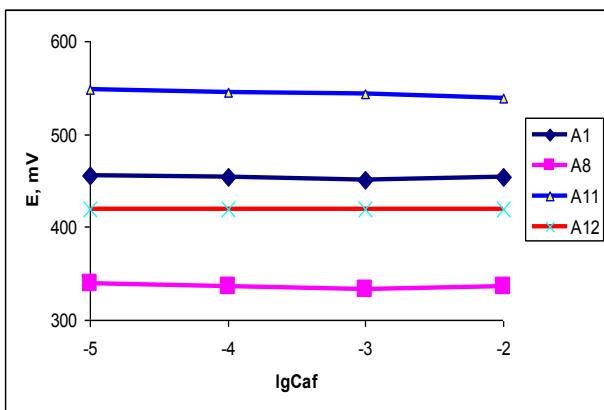
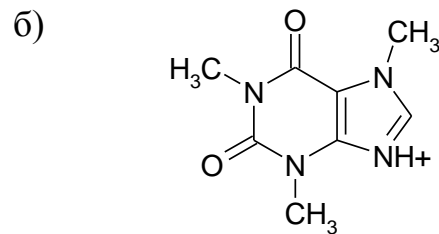
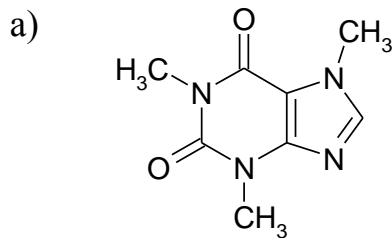


Рис. 55. Зависимости потенциалов сенсоров от концентрации кофеина: а) pH=7; б) pH=3

Чтобы проверить, сохраняется ли чувствительность сенсоров в массиве к галловой кислоте в сложной многокомпонентной системе, изучена зависимость потенциала сенсоров в реальном образце черного чая от концентрации добавляемой к образцу галловой кислоты в диапазоне концентраций 10^{-5} до 10^{-4} моль/л. Согласно рис. 56, чувствительность сенсоров к галлату сохраняется и в сложной многокомпонентной системе.

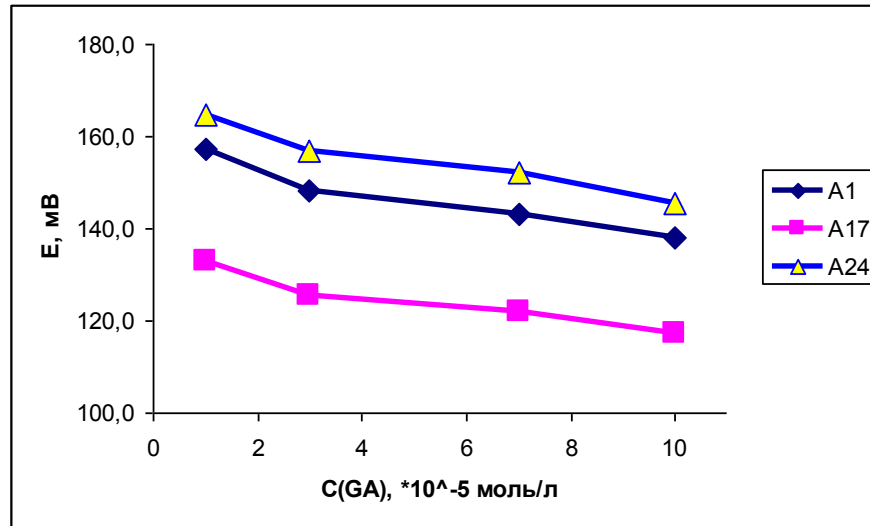


Рис. 56. Зависимости потенциалов сенсоров от концентрации добавки галловой кислоты в образец чая.

Схемы разработанных методик представлены в табл. 19.

Таблица 19. Схемы проведения измерений с помощью мультисенсорных систем

Объект	Подготовка образца	Разбавление, %	Время измерения, мин	Процедура отмывки водой, мин
Чай	заваривание	30	3	1 + 3 + 3
Китайские травы	заваривание	20	3	1 + 2 + 3
Моча	размораживание	10	2	2 + 2 + 2

Согласно разработанным методикам все образцы проанализированы 4 раза в произвольном порядке, после чего вычислялось среднее значение потенциала каждого сенсора для каждого образца. Результаты анализа мультисенсорной

системой каждого из объектов представляются в виде матриц, где число строк – это количество исследуемых образцов, а число столбцов – количество сенсоров в массиве.

Обработку данных проводили с помощью программного обеспечения «Unscrambler 9.7» (CAMO, Norway), а также RStudio (Version 0.98.501) и R (Version 3.0.2).

Общую логику работы мультисенсорных систем можно представить в виде схемы (рис.57).

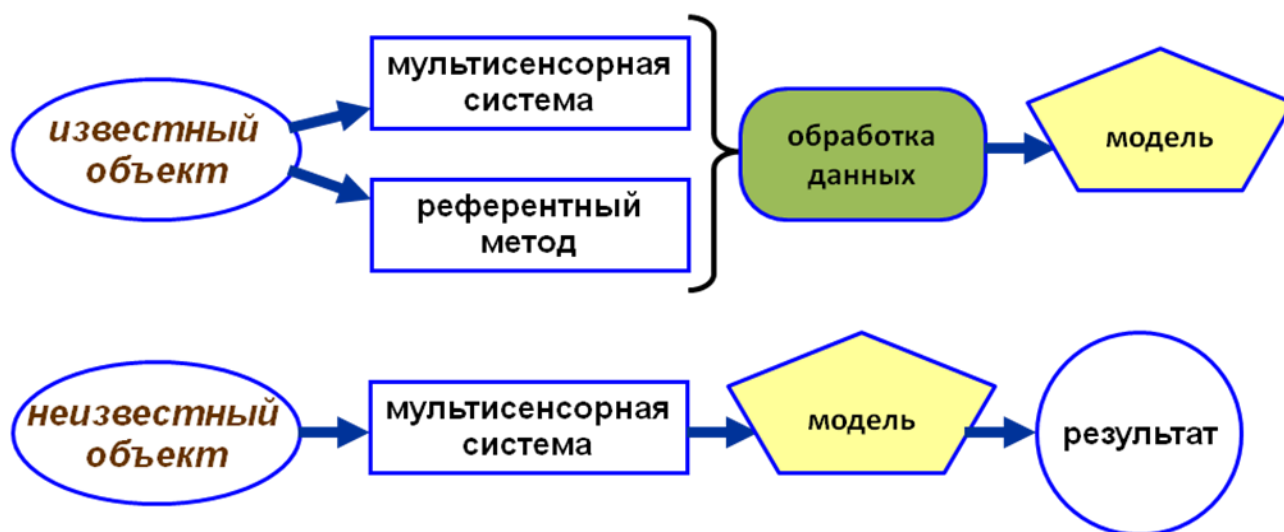


Рис. 57. Общая логика работы мультисенсорных систем.

Объект исследуют данной системой и референтным методом (*хроматография, электрофорез, оценка дегустаторов*). Далее – обработка, результат которой - модель, связывающая данные от мультисенсорной системы и референтного метода. Такую процедуру называют обучением.

Затем – мультисенсорной системой исследуется неизвестный объект. Полученные данные подставляют в модель и, наконец, результат! Таким образом, при исследовании неизвестного объекта от референтного метода можно отказаться.

ГЛАВА 5. РЕШЕНИЕ ЗАДАЧ НА РАСПОЗНАВАНИЕ ПРИ АНАЛИЗЕ ОБЪЕКТОВ СО СЛОЖНОЙ МАТРИЦЕЙ

На первом этапе исследования проведён анализ 3-х различных образцов зеленого чая с использованием мультисенсорной системы по схеме, описанной в п. 2.8; для каждого образца получено 5 реплик. Для интерпретации результатов – значений потенциалов от мультисенсорной системы – использовали метод главных компонент (МГК) (рис. 58).

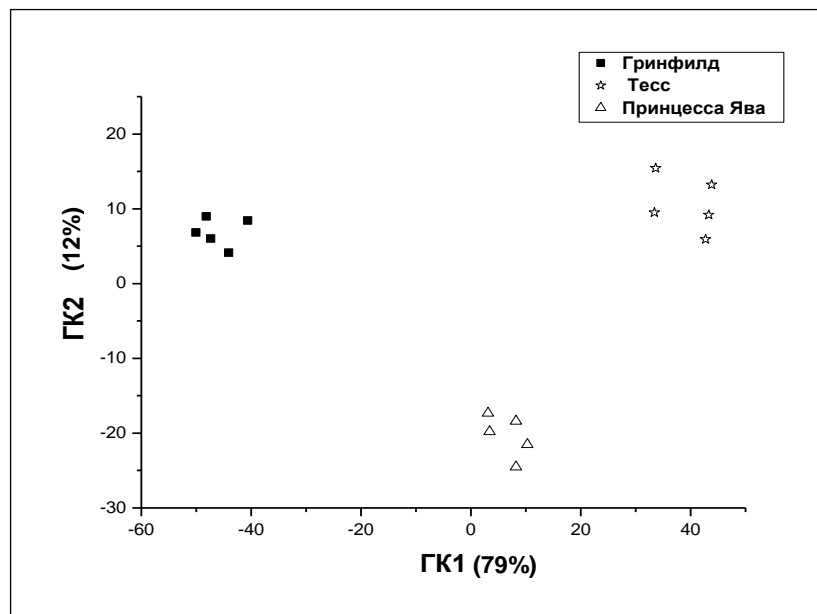


Рис. 58. График счетов МГК для 3 сортов зеленого чая. Объясненная дисперсия: 79%, 12%.

Из рис. 58 видно, что мультисенсорная система позволяет четко различать исследуемые три сорта зеленого чая: все реплики в одном образце образуют отчетливые неперекрывающиеся кластеры на графике счетов МГК.

Затем аналогичным образом изучались и 3 образца черного чая.

Соответствующий график счетов МГК представлен на рис. 59:

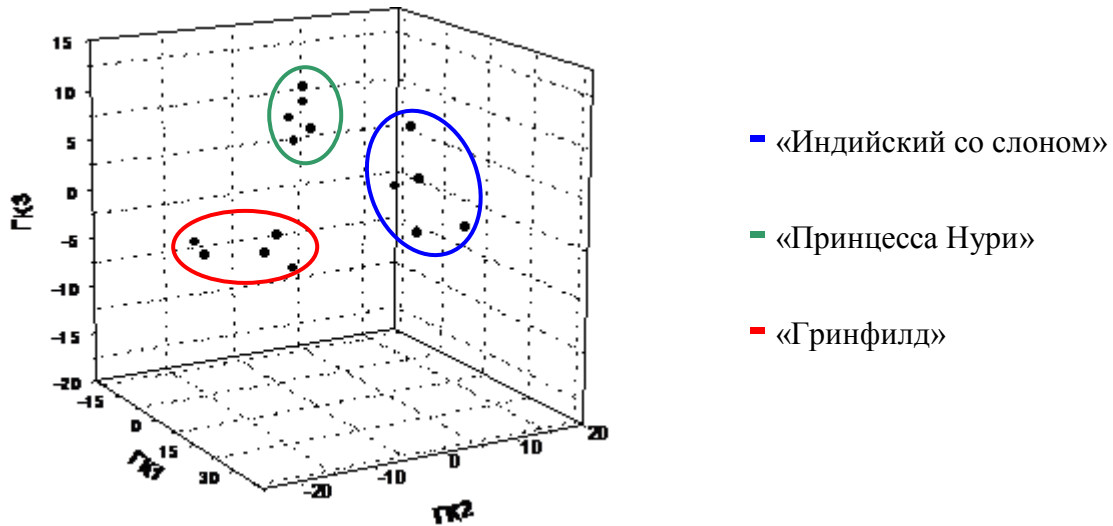


Рис. 59. График счетов МГК для 3 сортов черного чая. Объясненная дисперсия: 58%, 25%, 9%.

Как и в случае образцов зеленого чая, видно формирование отчетливых кластеров по репликам в одном образце. Для наглядности график МГК приведен в координатах 3-х первых главных компонент [186].

Построен график счетов и для 8 образцов растительных препаратов традиционной китайской медицины (рис. 60).

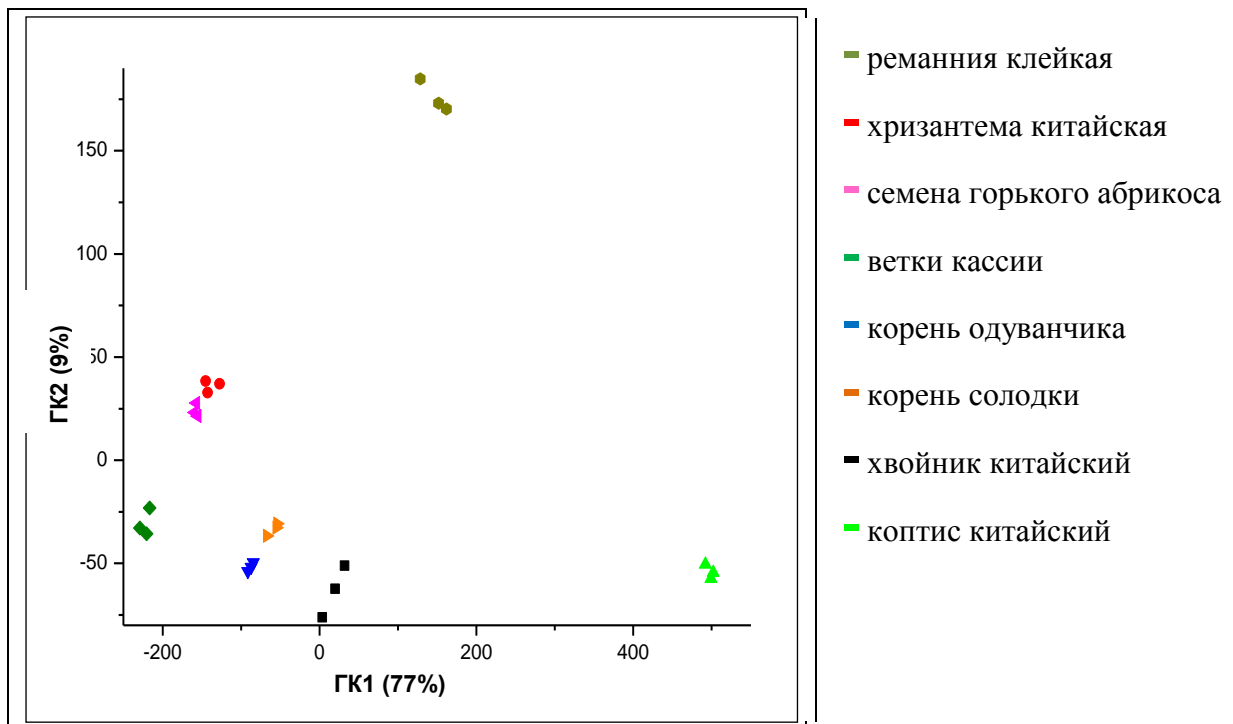


Рис. 60. График счетов МГК для 8 образцов растительных препаратов ТКМ. Объясненная дисперсия: 77%, 9%.

Однако четкое разделение на соответствующие кластеры наблюдается не всегда. Так, при построении графиков счетов МГК для образцов мочи пациентов с патологией мочекаменной болезни и здоровых доноров выяснилось, что разделения между классами не наблюдается (рис. 61).

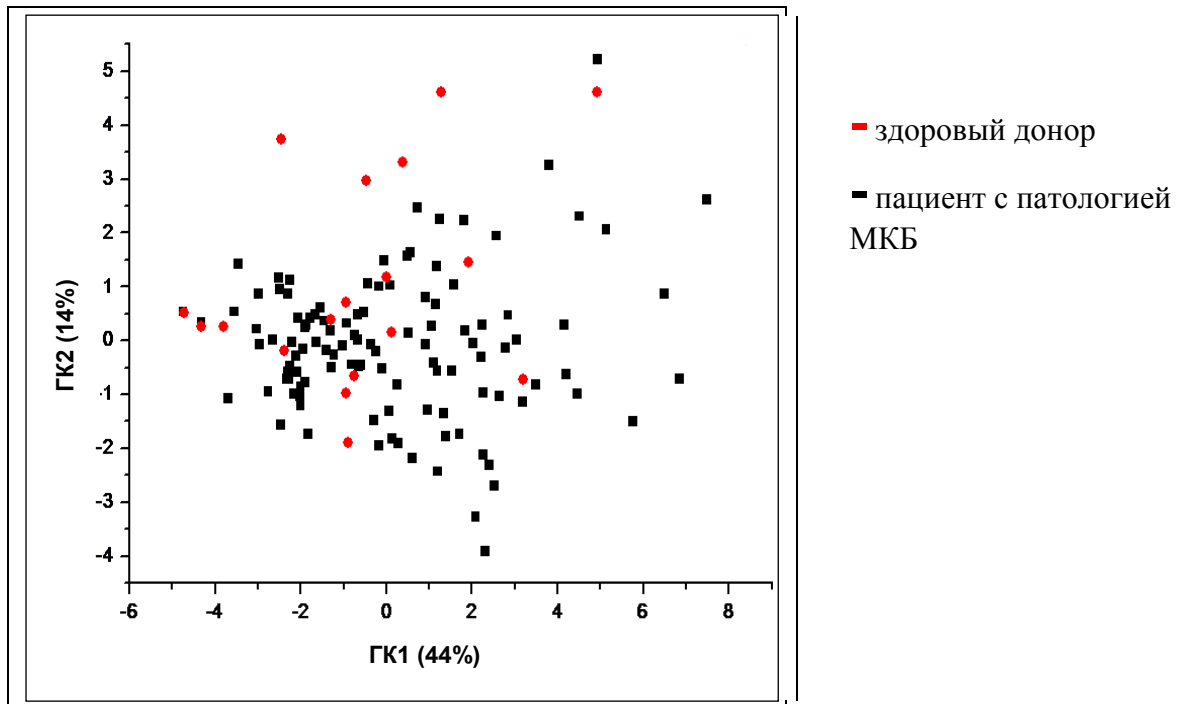


Рис. 61. График счетов МГК для 136 образцов мочи. Объясненная дисперсия: 43%, 14%.

Для решения классификационной задачи применена логистическая регрессия. Такой подход для обработки данных от мультисенсорных систем применен впервые. Последовательность процедур следующая: строится модель по имеющимся достоверным значениям о принадлежности образцов к тому или иному классу, затем с помощью независимого тестового набора образцов проверяется вероятность отнесения конкретного образца к классу больных или здоровых. При этом необходимо правильно установить границу решений – значение вероятности $p(X)$, при котором ошибка в определении класса будет минимальной.

Графики зависимости суммы ошибок от выбранной границы решений представлены на рис. 62.

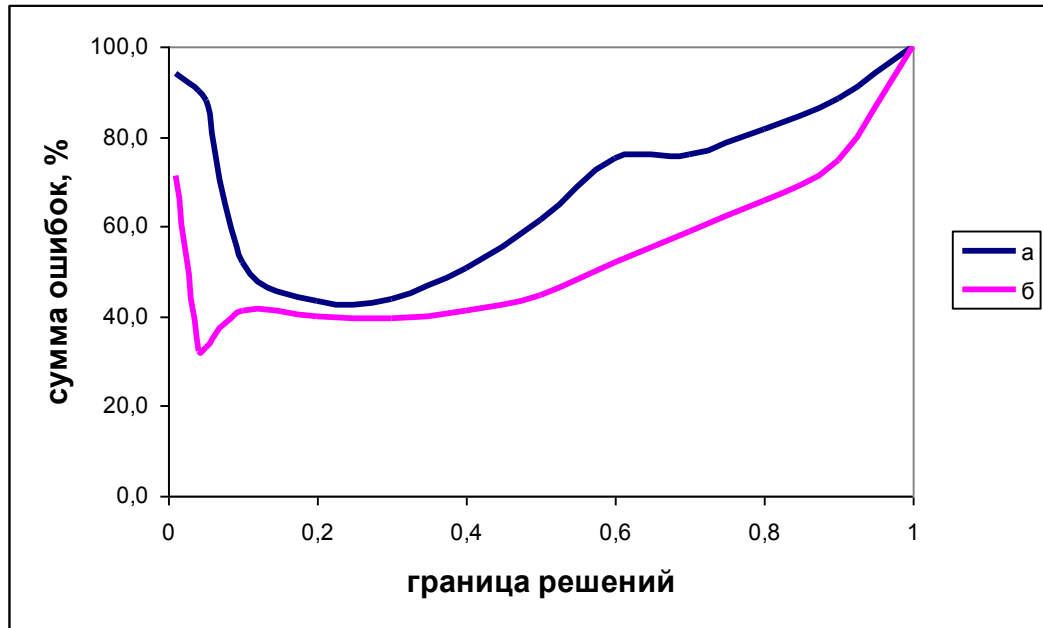


Рис. 62. Зависимость суммы ошибок от выбранной границы решений согласно референтным данным (а) и данным от мультисенсорной системы (б)

Граница решений (минимум на кривой) для референтных данных составила 0,2, для данных от мультисенсорной системы – 0,04.

При выбранных границах вычислены ошибки определения класса 35 независимо выбранных образцов («норма» или «патология»). Показано, что логистическая модель, построенная на основании референтных данных, не выдала ни одной ошибки. Модель для данных от мультисенсорной системы показала ошибку в 5%.

Важно отметить, что для решения классификационных задач в подобных исследованиях необходимо учитывать диурез – объем суточной мочи, выражаемый в л/сут. Именно на основании количества аналита, выделяемого в сутки (ммоль/сут) делают вывод о том, попадает ли данный параметр в норму. Для количественных задач, соответственно, нет необходимости в учете диуреза. Концентрации выражают в моль/л.

ГЛАВА 6. ПРИМЕНЕНИЕ РЕГРЕССИОННОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОБЪЕКТОВ СО СЛОЖНОЙ МАТРИЦЕЙ

Регрессионный анализ заключается в поиске корреляций между результатами анализа изучаемых объектов мультисенсорной системой и количественными референтными данными.

Обработка данных проводилась методом проекция на латентные структуры (ПЛС). ПЛС-модель представляет собой зависимость в координатах «введено/найдено» или «измеренная/прогнозируемая величина». Параметры, характеризующие эту зависимость, определяют наличие корреляции между откликом массива сенсоров и каким-либо количественным критерием, в качестве которого могут выступать концентрации веществ, оценки дегустаторов и т.д.

Таким образом, метод позволяет откалибровать систему по интересующему свойству.

Построены ПЛС-модели с полифенолами и кофеином, количество которых независимо определено методом капиллярного электрофореза. На рис. 63 в качестве примера представлена ПЛС-модель для эпикатехина, ее параметры указаны в табл. 20.

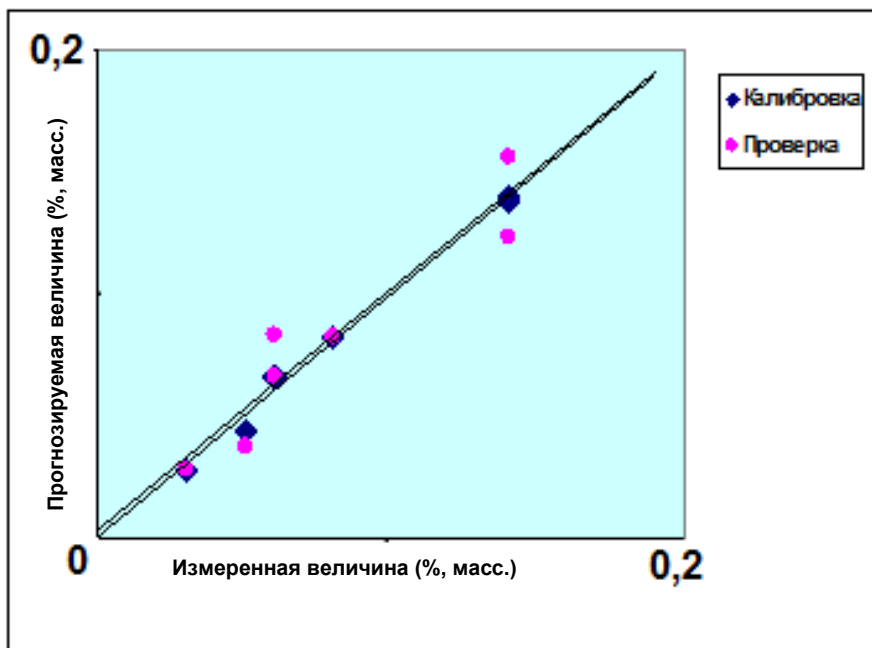


Рис. 63. ПЛС-модель для определения эпикатехина с помощью мультисенсорной системы

Таблица 20. Параметры ПЛС-модели для эпикатехина

Процедура	Наклон	Оффсет	СКО	R ²
Калибровка	0.99	0.001	0.003	0.99
Проверка	0.94	0.028	0.023	0.90

Наклон характеризует правильность модели (чем ближе значение к единице, тем модель лучше); оффсет – величина, отсекаемая графиком по оси ординат (чем ближе к нулю значение оффсета, тем исследуемая модель правильней); СКО (среднеквадратическое отклонение) – величина абсолютной ошибки, выражается в тех же единицах, что и референтные данные; R² – квадрат коэффициента корреляции.

Относительная ошибка вычисляется по формуле:

$$\delta = \text{СКО}_{\text{пр.}} / x_{\text{ср.}} * 100\%, \quad (9)$$

где СКО_{пр} – СКО при проверке, x_{ср.} – среднее значение определяемой величины референтным методом.

Установлено, что разработанная мультисенсорная система позволяет с ошибкой не более 8-10% определять содержание эпикатехина и кофеина в образцах черного чая.

Чтобы предварительно оценить, с какими параметрами имеет смысл искать корреляции, использовался предварительный алгоритм ПЛС2-регрессии. Лучшие результаты получены для матриц В (содержанием компонентов чая) и Е (данные от потенциометрической мультисенсорной системы).

Из рис. 64 следует, что возможна корреляция между откликами сенсоров и содержанием теафлавина и теарубигина в образцах чая, а также яркостью аромата. Значимых корреляций с цветом не обнаружено. Последнее подтверждается и значениями величин наклона и R² в табл. 21.

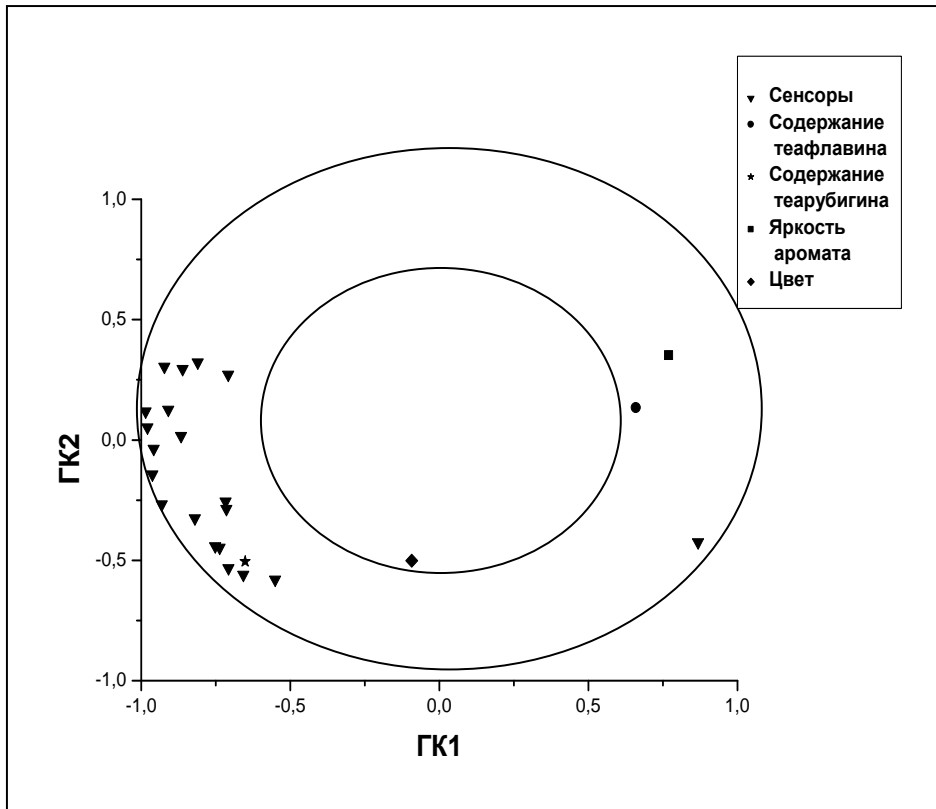


Рис. 64. График коррелированных нагрузок для ПЛС2 модели по матрицам E и B.

Таблица 21. Параметры графиков «введено-найдено» для ПЛС2-регрессии на примере матриц E и B. Метод полной перекрестной проверки

<i>Теафлавин</i>	Наклон	Офсет	СКО	R^2
Калибровка	0,43	0,88	0,36	0,43
Проверка	0,28	1,12	0,46	0,26

<i>Теарубигин</i>	Наклон	Офсет	СКО	R^2
Калибровка	0,42	9,91	1,61	0,42
Проверка	0,19	13,84	2,09	0,21

<i>Яркость аромата</i>	Наклон	Офсет	СКО	R^2
Калибровка	0,59	7,16	3,02	0,59
Проверка	0,46	9,49	3,78	0,48

<i>Цвет</i>	Наклон	Офсет	СКО	R^2
Калибровка	0,01	7,42	1,07	0,01
Проверка	-0,25	9,33	1,34	-0,27

Для установления возможности количественного определения интересующих параметров матрицы исследовались по алгоритму ПЛС1-регрессии, т.к. используемый для ПЛС2 массив сенсоров может быть избыточен/неоптимален для каждого конкретного параметра, и есть необходимость проводить отдельный выбор переменных. Результаты представляются в виде таблиц с соответствующими коэффициентами.

Таблица 22. Параметры графиков «введено-найдено» для ПЛС1-регрессии на примере матриц Е и В. Метод полной перекрестной проверки

<i>Теафлавин</i>	Наклон	Офсет	СКО	R ²
Калибровка	0,44	0,88	0,36	0,44
Проверка	0,27	1,14	0,47	0,25

<i>Теарубигин</i>	Наклон	Офсет	СКО	R ²
Калибровка	0,99	0,22	0,24	0,99
Проверка	0,62	6,43	1,63	0,52

<i>Яркость аромата</i>	Наклон	Офсет	СКО	R ²
Калибровка	0,60	7,18	3,02	0,59
Проверка	0,45	9,56	3,81	0,47

<i>Цвет</i>	Наклон	Офсет	СКО	R ²
Калибровка	0,30	5,27	0,90	0,30
Проверка	-0,49	10,60	1,56	-0,71

Таким образом, подтверждена возможность количественного определения теарубигина в исследуемых образцах чая с ошибкой $\pm 8\%$.

Для выявления корреляций между откликом мультисенсорной системы и оценками панели дегустаторов по 4 дескрипторам (яркость вкуса, резкость вкуса, крепость вкуса и общее качество) в настоящей работе применен мультилинейный ПЛС, а именно Такер1-ПЛС регрессия (3wayPLS). В качестве третьего измерения в данных использовалась динамическая развертка потенциалов сенсоров при измерении образцов. Полученный тензор имел размерность

сенсоры × образцы × время (20 × 10 × 19). Поскольку различные вещества в образцах чая имеют различную кинетику взаимодействия с материалом сенсорных мембран, то использование дополнительных данных позволяет получать новую информацию.

Для сравнения параметров построены ПЛС-модели (для данных размерности сенсоры × образцы, 20 × 10) и Такер1-ПЛС-модели (сенсоры × образцы × время, 20 × 10 × 19).

Таблица 23. Сравнение параметров ПЛС-моделей для двумерных и трехмерных данных

Яркость вкуса	Двумерные данные			
	Наклон	Офсет	СКО	R ²
Калибровка	0,81	1,19	0,32	0,81
Проверка	0,61	2,51	0,52	0,51
Трехмерные данные				
Калибровка	0,90	0,64	0,24	0,90
Проверка	0,63	2,31	0,46	0,71

Резкость вкуса	Двумерные данные			
	Наклон	Офсет	СКО	R ²
Калибровка	0,90	0,70	0,28	0,90
Проверка	0,75	1,70	0,54	0,63
Трехмерные данные				
Калибровка	0,99	0,08	0,09	0,99
Проверка	0,70	1,93	0,43	0,80

Крепость вкуса	Двумерные данные			
	Наклон	Офсет	СКО	R ²
Калибровка	0,23	5,03	0,73	0,23
Проверка	0,07	6,09	0,85	0,09
Трехмерные данные				
Калибровка	0,98	0,09	0,09	0,98
Проверка	0,85	1,13	0,36	0,82

Качество	Двумерные данные			
	Наклон	Офсет	СКО	R ²
Калибровка	0,21	5,31	0,71	0,21
Проверка	-0,27	8,59	1,09	-0,61
Трехмерные данные				
Калибровка	0,98	0,04	0,06	0,98
Проверка	0,75	1,71	0,31	0,82

Показано, что применение данных об отклике каждого сенсора с течением времени позволяет получать высокую корреляцию с такими дескрипторами как крепость вкуса и общее качество, что невозможно при использовании традиционной двумерной структуры данных. Такер1-ПЛС регрессия является более информативным подходом.

Для образцов растительных препаратов традиционной китайской медицины обнаружена корреляция и с другим органолептическим параметром – горькостью, что оказалось важным для лекарственной терапии. Исследуемые образцы оценены профессиональными дегустаторами по упоминаемой ранее шкале: 0 – отсутствие горькости; 6 – максимально горько.

Усредненные результаты анализа образцов ТКМ, полученные с помощью мультисенсорной системы, представляют собой матрицу 33*17, где 33 – число образцов, 17 – число сенсоров.

По результатам построена ПЛС-модель (рис. 65).

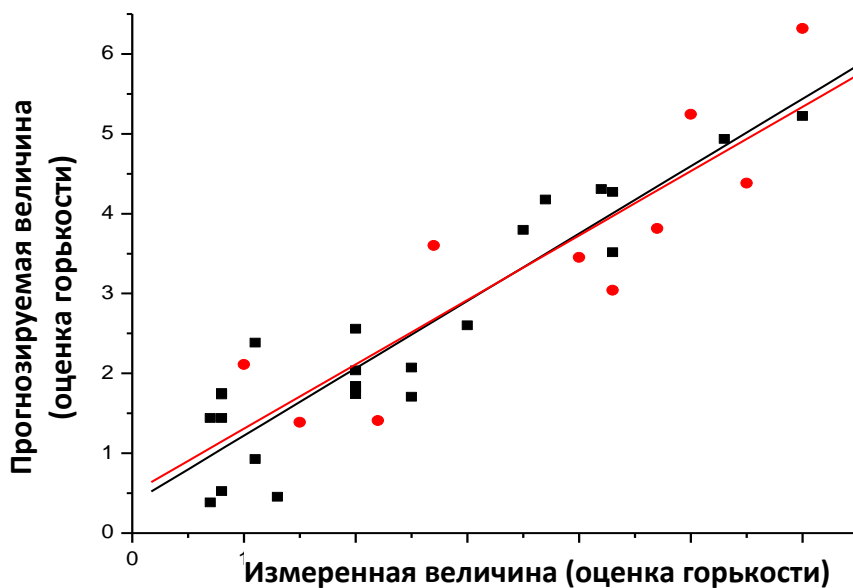


Рис. 65. ПЛС-модель при определении горькости препаратов ТКМ.

Проверка модели проводилась на 10 независимо выбранных образцах (красный цвет на графике). Полученная модель свидетельствует о том, что мультисенсорная система способна оценить горькость препаратов ТКМ со средней относительной погрешностью 14 %, что является приемлемым результатом для измерений такого типа [187].

Основными компонентами, определяющими горький вкус отваров растений, являются полифенолы и алкалоиды [139]. В рамках данного исследования было решено подтвердить этот факт, а также выявить возможности мультисенсорной системы в оценке суммарного содержания полифенолов и кофеина. Для каждого образца ТКМ согласно результатам, полученных методом КЭ вычислено суммарное содержание полифенолов и кофеина и построена ПЛС-регрессионная модель как соответствие откликов мультисенсорной системы и значений суммарного содержания полифенолов и кофеина для этих же образцов ТКМ (рис. 66).

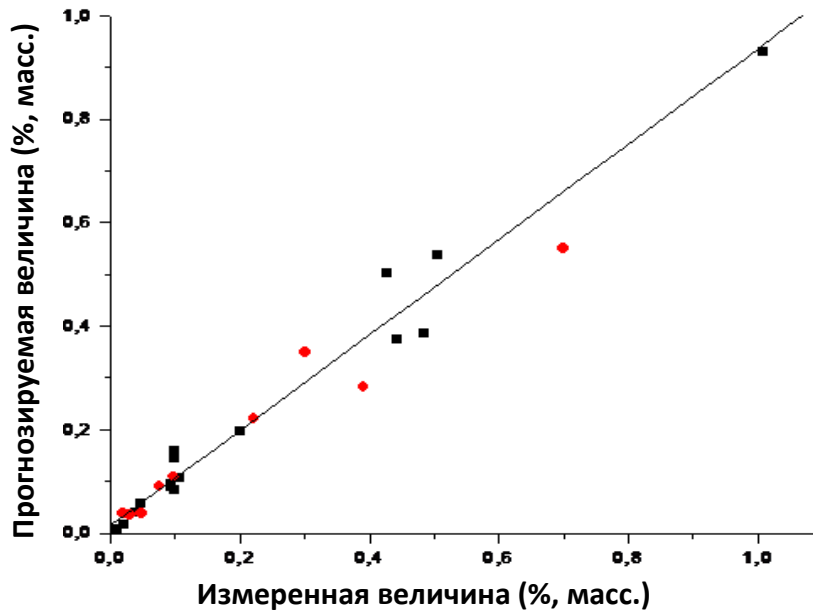


Рис. 66. ПЛС-модель для определения суммарного содержания полифенолов и кофеина.

Построенная модель позволила установить, что мультисенсорная система способна оценить суммарное содержание полифенолов и кофеина в препаратах китайской народной медицины со средней относительной ошибкой 12 %.

Оценка содержания компонентов в моче, влияющих на камнеобразование (аммоний, калий, натрий, кальций, магний, оксалат, цитрат, урат, хлорид, сульфат, фосфат), также проводилась с помощью построения ПЛС-моделей. В случае потенциометрических измерений интенсивность аналитического сигнала линейна от логарифма концентрации компонента. Именно по этой причине концентрации компонентов, полученные методом капиллярного электрофореза, преобразованы в логарифмические.

На основании данных мультисенсорной системы для всех параметров, определяемых в моче (рис. 50), построены ПЛС-модели. Проверка на правильность полученных моделей проводилась на 40 независимо выбранных образцах мочи. Пример такой модели для ионов аммония представлен на рис. 67.

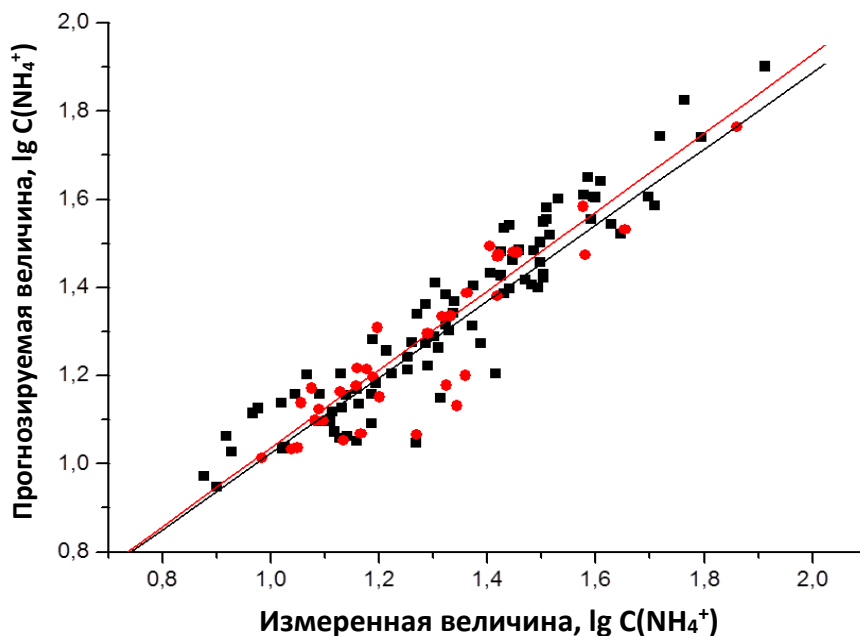


Рис. 67. ПЛС-модель для определения содержания ионов аммония в моче.

Исходя из построенных ПЛС-моделей для всех параметров мочи, определяемых при диагностике мочекаменной болезни, вычислена относительная ошибка определения концентраций ионов в моче (табл. 24).

Таблица 24. Результаты количественного анализа при определении содержания ионов в моче мультисенсорной системой

Аналит	Относительная ошибка, %	Калибровочный диапазон, ммоль/л
натрий	2.7	3.8-255.5
калий	8.6	4.2-100.0
аммоний	7.2	4.0-81.8
кальций	11.6	0.6-10.7
магний	12.3	0.7-8.7
хлорид	3.1	11.1-222.3
сульфат	10.9	1.5-25.9
фосфат	8.2	3.1-48.4
оксалат	17.0	0.1-0.4
цитрат	21.5	0.2-5.5
урат	11.5	0.5-7.0
креатинин	11.6	2.1-26.7

Установлено, что потенциометрическая мультисенсорная система может определять содержание компонентов мочи с ошибкой 3-13%. При этом точность в определении ионов оксалата и цитрата оказалась довольно низкой, что может быть связано как с узким диапазоном калибровочного набора, так и с присутствием больших концентраций хлорид-ионов, на фоне которых довольно сложно вычленить вклад в сигнал малого количества таких анионов.

Важно отметить, что в ряде случаев мультисенсорная система способна оценить не только химические параметры, такие как концентрации отдельных компонентов, но и физические. Так, при анализе мочи оказалось возможным прогнозировать ее плотность, что подтверждается ПЛС-моделями, построенными на основе референтных данных и данных мультисенсорной системы. Относительная ошибка составила 5 и 8 % , соответственно.

ГЛАВА 7. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАТРИЧНОГО КОРРЕЛЯЦИОННОГО АНАЛИЗА ДЛЯ СЛОЖНЫХ ОБЪЕКТОВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Для оценки корреляций между имеющимися массивами данных используются различные критерии: вычисление коэффициентов матричных корреляций (RV , RV' и коэффициент конгруэнтности Такера – ϕ), а также канонический корреляционный анализ. Так, для образцов индийского черного чая (С-DAC, Калькутта) имеются четыре набора данных, построенные по результатам различных измерений, среди которых: данные от потенциметрической мультисенсорной системы (E), вольтамперометрической мультисенсорной системы (V), профессиональная оценка дегустаторов (S), содержание компонентов чая, определенное традиционными аналитическими подходами – ВЭЖХ и спектрофотометрия (B).

Профессиональными дегустаторами чая (*ти-тестерами*) были выставлены оценки в баллах исследуемым образцам в соответствии с критериями: *яркость*, *резкость*, *крепость вкуса* и *общее качество*. Оценка чая по некоторым важным параметрам качества была проведена нами в специализированной индийской лаборатории (С-DAC, Калькутта). Содержание теафлавина и теорубигина в образцах определено методом ВЭЖХ, интенсивность аромата – ГХ, цвет – колориметрическим методом. Соответствующие данные представлены в табл. 25.

Таблица 25. Оценки дегустаторов (S) и данные из чайной лаборатории (B)

№ обр.	Яркость	Резкость	Крепость	Качество	%ТФ	%ТР	Аромат	Цвет
6	8	8	8	8	1,72	16,53	18,64	8,36
8	8	8	8	8	2,37	17,12	25,89	8,45
9	6	6	5,5	6	2,17	15,66	21,6	6,59
10	6	6	5,5	6	1,55	14,05	20,97	6,07
11	6	7	7	7	2,05	16,15	20,56	8,91
12	6	7	7	7	1,28	18,1	14,95	7,78
14	7	8	8	8	1,15	21,76	11,53	8,48
15	6	6	5,5	6	0,77	17,54	10,02	6,31
16	6	6	5,5	6	1,27	15,38	17,33	5,97
20	6	6	7	6,5	1,26	19,67	13,63	7,94

Для вычисления коэффициентов матричных корреляций применяются следующие процедуры. Мы имеем 2 матрицы данных $X(I*J1)$ и $Y(I*J2)$, в которых – I (число строк) – число образцов, а J (число столбцов) – число измеренных параметров системы. Коэффициент RV вычислялся по формуле:

$$RV(\mathbf{X}, \mathbf{Y}) = \frac{tr(\mathbf{X}\mathbf{X}'\mathbf{Y}\mathbf{Y}')}{\sqrt{tr[(\mathbf{X}\mathbf{X}')^2]tr[(\mathbf{Y}\mathbf{Y}')^2]}}$$

Как видно из табл. 26 коэффициенты матричной корреляции для всех пар видов данных близки к единице, что означает высокую степень схожести в структуре данных (то есть выявлены общие закономерности). Это несколько неожиданный результат, если принять во внимание совершенно различную природу этих данных.

Таблица 26. Значения RV -коэффициентов

RV	E	V	B	S
E	1			
V	0,99	1		
B	0,98	0,98	1	
S	0,98	0,97	0,98	1

Известно [171], что высокие значения RV -коэффициента, могут быть связаны с большим количеством переменных (в нашем случае это характерно для матриц E и V , то есть данных от мультисенсорных систем) при относительно небольшом числе образцов, при этом, корреляция между матрицами обнаруживаются там, где ее может не быть в действительности, поскольку число коррелируемых параметров огромно. К тому же, если какой-либо элемент матрицы равен нулю, учесть его не удастся. Для решения этих проблем предлагается использовать модифицированный RV -коэффициент, который может принимать и отрицательные значения $[-1,1]$:

Таблица 27. Значения RV' -коэффициентов

$$RV'(X, Y) = \frac{tr(\overline{XX'}\overline{YY'})}{\sqrt{tr[(\overline{XX'})^2]tr[(\overline{YY'})^2]}}$$

$$\overline{XX'} = [XX' - diag(XX')]$$

RV'	E	V	B	S
E	1			
V	-0,37	1		
B	0,67	0,27	1	
S	-0,25	0,19	-0,59	1

Показано, что значимые коэффициенты корреляции (>0.5) сохранились лишь для пар матриц **B** и **E**, **B** и **S** (содержанием компонентов чая и потенциометрической мультисенсорной системой; содержанием компонентов чая и профессиональной оценкой дегустаторов). Это может свидетельствовать о наличии взаимосвязи между данными матрицами и косвенно указывать на возможность предсказания структуры одной матрицы по структуре другой на основании имеющихся корреляций. Таким образом, можно прогнозировать результат компонентного состава чая с помощью мультисенсорной системы.

Еще одним методом исследования матричных данных является вычисление коэффициента конгруэнтности Такера, построенного на матрицах счетов **T**.

В силу снижения размерности пространства при МГК-анализе число главных компонент будет на единицу меньше числа столбцов исследуемой матрицы. Так, в нашем случае приходится ограничиваться 3 ГК (две матрицы имеют лишь по 4 измеренных параметра). И при этом нельзя утверждать, что сокращение до 3 ГК для остальных матриц не внесет существенных погрешностей. Возможно, именно по этой причине значения коэффициентов Такера оказались довольно низкими.

Таблица 28. Значения коэффициентов Такера

$$\varphi = \frac{tr(\mathbf{T}_1\mathbf{T}_2')}{\sqrt{tr(\mathbf{T}_1\mathbf{T}_1')tr(\mathbf{T}_2\mathbf{T}_2')}}}$$

φ	E	V	B	S
E	1			
V	0,19	1		
B	-0,59	-0,14	1	
S	0,07	-0,21	0,06	1

Показано, что наибольшее значение вышеуказанных коэффициентов (0,9860; 0,6721; -0,5987) наблюдается между матрицами данных от потенциометрической мультисенсорной системы и биохимическими параметрами черного чая, как и ранее, что свидетельствует о потенциальной возможности замены сложного исследования биохимии чая на более простые и удобные измерения потенциометрической системой.

Результаты хроматографического, электрофоретического и потенциометрического анализов растительных препаратов ТКМ обработаны для выявления корреляций между ними.

В силу огромного числа переменных в матрицах данных (5150 для хроматографии и 6800 для капиллярного электрофореза) коэффициенты RV и модифицированный RV могут оказаться завышенными. Вычислены коэффициенты Такера (табл. 29).

Таблица 29. Значения коэффициентов Такера

	мультисенсорная система & хроматография	мультисенсорная система & капиллярный электрофорез	хроматография & капиллярный электрофорез
φ	0,0449	0,0406	0,4667

Из значений полученных коэффициентов Такера следует, что максимальное сходство в полученных результатах наблюдается при использовании методов хроматографии и капиллярного электрофореза. Этот факт вполне объясним: в рассматриваемых методах одинаковый тип детектирования - ультрафиолетовое , в то время как мультисенсорная система регистрирует электрохимические процессы.

Для нахождения взаимосвязи между наборами переменных используется также *канонический корреляционный анализ*. Его результаты обычно представляют в виде карт образцов:

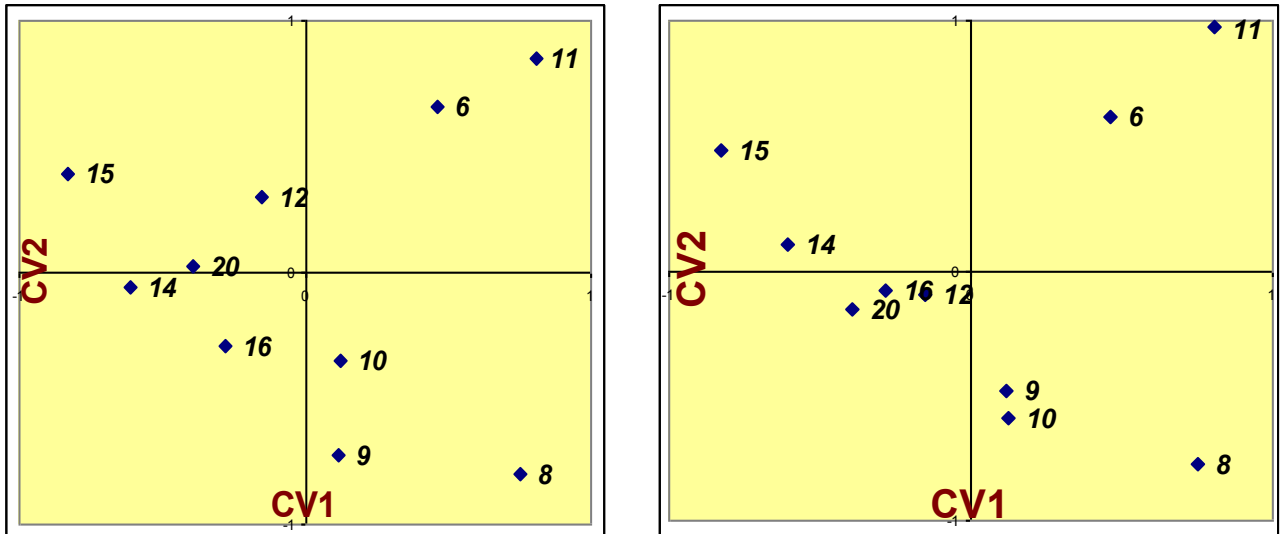


Рис. 68. Пример карт образцов, полученных для матриц В и Е (содержание компонентов чая (ВЭЖХ) и данные потенциометрической мультисенсорной системы) при анализе индийского черного чая.

Наличие общей схожести картин по расположению образцов относительно друг друга в координатах двух первых главных канонических переменных свидетельствует и о высокой канонической корреляции исследуемых матриц, что подтверждается и значением соответствующих корреляционных коэффициентов (в данном случае 0,9999; 0,9291). Получены карты образцов и коэффициенты для пар матриц изучаемых параметров как для всех главных компонент матриц счетов исходных данных, так и для сокращенных до трех первых главных компонент (Приложение 5).

Выявлено, что данная процедура снижения размерности уменьшает коэффициенты корреляции для всех пар исследуемых матриц. Это может быть связано с тем, что большая часть скоррелированной в исходных данных информации являлась шумом.

Подобие в структурах данных гибридных методов анализа в случае исследования растительных препаратов ТКМ также подтверждается каноническим корреляционным анализом. В связи с тем, что значения

канонических корней значительно отличаются только в 6 степени, было решено построить карты образцов в координатах 5 и 6 канонических переменных (рис. 69).

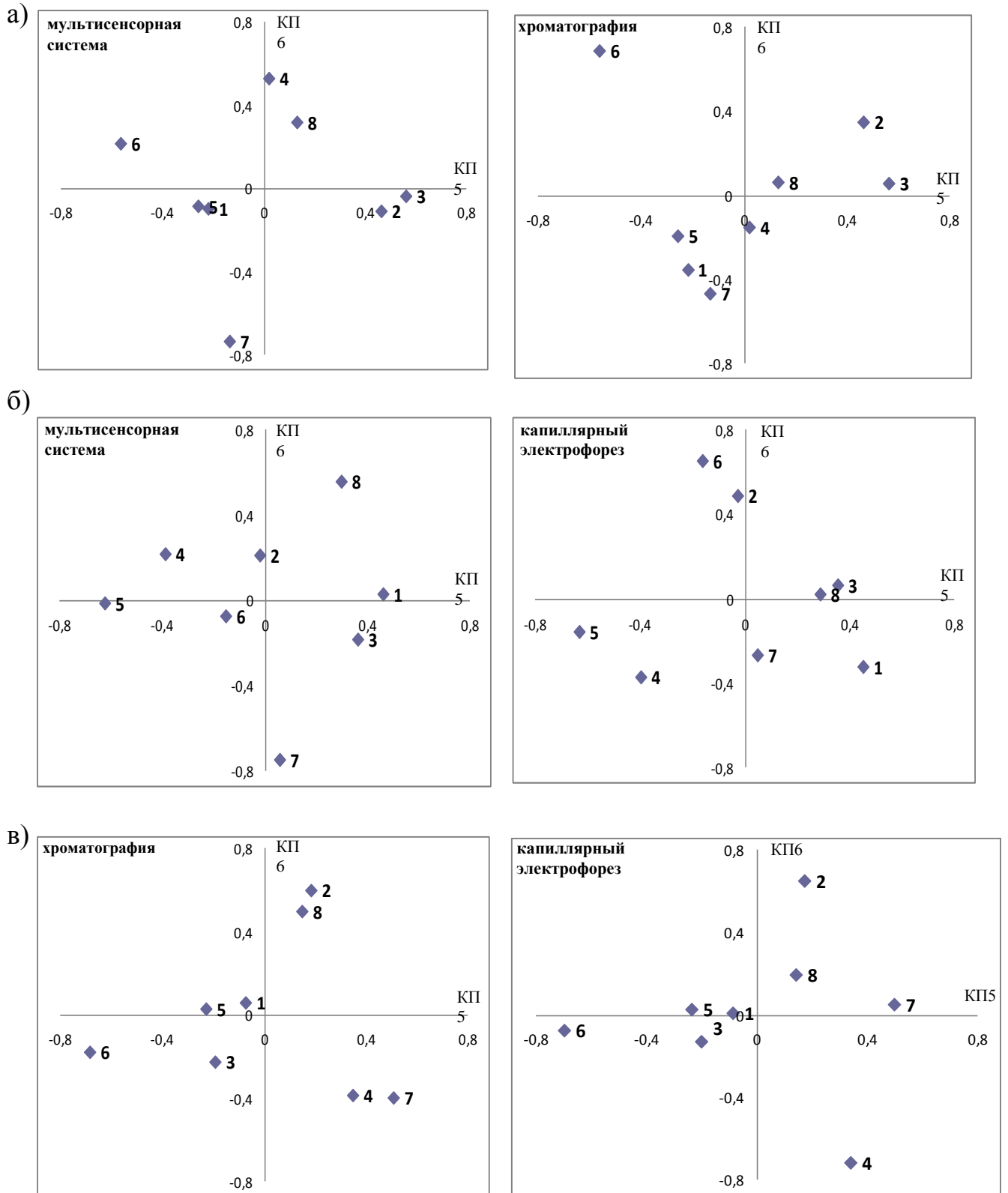


Рис. 69. Карты образцов при рассмотрении пар различных методов.

Наличие схожести картин по расположению образцов относительно друг друга косвенно свидетельствует о схожести в структурах данных от капиллярного электрофореза и хроматографии.

Результаты, полученные в рамках данного исследования, сопоставлены с литературными (табл. 30).

Таблица 30. Применение мультисенсорных систем при анализе сложных объектов природного происхождения (левый столбец – литературные данные, правый – результаты представленного диссертационного исследования)

биологические жидкости		пищевые продукты		растительные препараты	
<i>моча</i>		<i>чай</i>		<i>ТКМ</i>	
число одновременно определяемых ионов		относительная погрешность определения полифенолов		относительная погрешность определения горькости	
5 ^[171]	12	10% ^[188]	8%	15% ^[182]	14%
определение плотности		относительная погрешность определения кофеина		определение суммарного содержания полифенолов и кофеина	
-	+	12% ^[188]	10%	-	+

В [171] при многокомпонентном анализе образцов мочи рассматривались только 5 ионов в отличие от 12 в нашем исследовании. Данные по определению плотности биологических жидкостей с помощью мультисенсорной системы в литературе отсутствуют.

При оценке содержания полифенолов и кофеина в образцах чая и инструментальной оценке горькости препаратов ТКМ достигнуты меньшие значения относительных погрешностей, чем в [188, 182]. Это может быть связано как с другим набором сенсоров в составе массива, так и с применением других методов обработки данных.

При этом в литературе отсутствует описание регрессионных моделей, связывающих сумму полифенолов и кофеина с откликами мультисенсорной системы. Кроме того, ранее не было описано применение логистической регрессии к анализу данных, полученных с помощью мультисенсорных систем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках диссертационной работы поставленные задачи решены и цель достигнута. На основании полученных результатов можно сделать ряд выводов:

1. Установлено, что анализ образцов мочи мультисенсорной системой с последующей обработкой результатов методом логистической регрессии позволяет проводить классификацию по принципу «норма»/«патология». Подобный подход может быть рекомендован в качестве независимого диагностического критерия мочекаменной болезни на ранней стадии.

2. Показано, что мультисенсорная система обеспечивает определение ионного состава образцов мочи при использовании данных капиллярного электрофореза в качестве референтных (погрешность 3-13%; время анализа 10-15 мин.).

3. На примерах анализа мультисенсорной системой образцов лекарственных препаратов ТКМ и чая установлена возможность определения суммарного и индивидуального содержания полифенолов (погрешность до 12%).

4. Обнаружено, что мультисенсорная система позволяет количественно оценить параметр горькости в препаратах ТКМ и органолептические характеристики в образцах чая с использованием в качестве референтных показаний дегустаторов.

5. Методом канонического корреляционного анализа установлено наличие корреляций между откликами мультисенсорной системы и характеристическими (хроматографические и электрофоретические) профилями образцов препаратов ТКМ.

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ И ТЕРМИНЫ

ААС – атомно-абсорбционная спектроскопия

БИА – бензимидазол

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГХ – газовая хроматография

ДДМ – детектор на диодной матрице

ДОС – ди-(2-этилгексил)себацанат

ДЭА – диэтаноламин

ЖЭ – жидкостная экстракция

ИНС – искусственные нейронные сети

ИСП – индукционно-связная плазма

ИСЭ – ионоселективный электрод

КЗЭ – капиллярный зонный электрофорез

КЭ – капиллярный электрофорез

МГК – метод главных компонент

МКБ – мочекаменная болезнь

МС – масс-спектрометрический

МЭКХ – мицеллярная электрокинетическая хроматография

н.ф. – неподвижная фаза

НФОЭ – о-нитрофенилоктиловый эфир

ПВХ – поливинилхлорид

ПИД – пламенно-ионизационный детектор

ПЛС – проекция на латентные структуры

п.ф. – подвижная фаза

ТКМ – традиционная китайская медицина

ТОФ – три(2-этилгексил)фосфат

ТСХ – тонкослойная хроматография

ТФМЭ – твердофазная микроэкстракция

ТФЭ – твердофазная экстракция

УФ – ультрафиолетовый

ЦТАБ – цетилтриметиламмоний бромид

ЭН – электронный нос

ЭОП – электроосмотический поток

ЭХ – электрохимический

ЭЯ – электронный язык

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mitra S. Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry / S. Mitra. – USA: John Wiley & Sons, Ltd., 2003. – 458 p.
2. Wen Y., Chen L., Li J., Liu D., Chen L. Recent advances in solid-phase sorbents for sample preparation prior to chromatographic analysis // Trends Anal. Chem. 2014. V. 59. P. 26–41.
3. Hill V., Cairns T., Schaffer M. Hair analysis for cocaine: Factors in laboratory contamination studies and their relevance to proficiency sample preparation and hair testing practices // Forensic Sci. Int. 2008. V. 176. P. 23–33.
4. Wan H., Blomberg L.G. Enantiometric separation of small chiral peptides by capillary electrophoresis // J. Chromatogr. A. 1997. V. 792. P. 393–400.
5. Koros A., Hanczko R., Jambor A., Qian Y., Perl A., Molnar-Perl I.O. Analysis of amino acids and biogenic amines in biological tissues as their *o*-phthalaldehyde/ethanethiol/fluorenylmethyl chloroformate derivatives by high-performance liquid chromatography. A deproteinization study // J. Chromatogr. A. 2007. V. 1149. P. 46–55.
6. Custodio F.B., Tavares E., Gloria M. B. A. Extraction of bioactive amines from grated Parmesan cheese using acid, alkaline and organic solvents // J. Food Comp. and Anal. 2007. V. 20. P. 280–288.
7. Shi T., Tang T., Qian K., Wang F. High-performance liquid chromatographic method for determination of amino acids by precolumn derivatization with 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride // Anal. Chim. Acta. 2009. V. 654. P. 154–161.
8. Shen Z., Sun Z., Wu L., Wu K., Sun S., Huang Z. Rapid method for the determination of amino acids in serum by capillary electrophoresis // J. Chrom. A. 2002. V. 979. P. 227–232.
9. Koros A., Varga Zs., Molnar-Perl I. Simultaneous analysis of amino acids and amines as their *o*-phthalaldehyde-ethanethiol-9-fluorenylmethyl chloroformate

derivatives in cheese by high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2008. V. 1203. P. 146–152.

10. Карцова Л.А., Бессонова Е.А. Методы концентрирования в капиллярном электрофорезе // *Журнал Аналит. Химии.* 2009. Т. 64. № 4. С. 340 – 351.

11. Карцова Л.А., Бессонова Е.А. Методы on-line концентрирования в капиллярном электрофорезе (учебное пособие). – СПб: СПбГУ. Институт химии, 2014. – 38 с.

12. Kataoka H., Saito K. Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011. V. 54. P. 926–950.

13. IUPAC. Chemical sensors definition and classification // *Pure and Appl. Chem.* 1991. V. 63 (9). P. 1247-1250.

14. Научный совет по аналитической химии ОХНМ РАН. Проблемы аналитической химии. Т.14. Химические сенсоры / под ред. Ю.Г.Власова. – М.: Наука, 2010. – 399 с.

15. Otto M., Thomas J. Model studies on multiple channel analysis of free magnesium, calcium, sodium and potassium at physiological concentration levels with ion-selective electrodes // *Anal. Chem.* 1985. V. 57. P. 2647-2651.

16. Esbensen, K.H. *Multivariate Analysis – in Practice.* / K.H.Esbensen. – 5th edition – Norway – Ålborg University, Esbjerg: CAMO Process AS, 2001. – 594 p.

17. *Multisensor Systems for Chemical Analysis: Materials and Sensors* / L. Lvova, D.Kirsanov, C.D.Natale, A.Legin. – USA: Pan Stanford Publishing, 2014. – 350 p.

18. Legin A., Rudnitskaya A., Vlasov Yu., Di Natale C., Davide F., D’Amico A. Tasting of beverages using an electronic tongue // *Sens. and Actuat. B.* 1997. V. 44(1-3). P. 291-296.

19. Legin A., Rudnitskaya A., Lvova L., Vlasov Yu., Di Natale C., D’Amico A. Evaluation of Italian wine by the electronic tongue: recognition, quantitative analysis and correlation with human sensory perception // *Anal. Chim. Acta.* 2003. V. 484. P. 33-44.

20. Rudnitskaya A., Nieuwoudt H., Muller N., Legin A., du Toit M., Bauer F. Instrumental measurement of bitter taste in red wine using an electronic tongue // *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. V. 397(7). P. 3051-3060.
21. Rudnitskaya A., Schmidtke L., Delgadillo I., Legin A., Scollary G. Study of the influence of micro-oxygenation and oak chip maceration on wine composition using an electronic tongue and chemical analysis // *Anal. Chim. Acta.* 2009. V. 642. P. 235-245.
22. Schmidtke L., Rudnitskaya A., Saliba A., Blackman J., Scollary G., Clark A., Rutledge D., Delgadillo I., Legin A. Sensory, Chemical, and Electronic Tongue Assessment of Micro-oxygenated Wines and Oak Chip Maceration: Assessing the Commonality of Analytical Techniques // *J. Agric. Food Chem.* 2010. V. 58(8). P. 5026-5033.
23. Kirsanov D., Mednova O., Vietoris V., Kilmartin P., Legin A. Towards reliable estimation of an “electronic tongue” predictive ability from PLS regression models in wine analysis // *Talanta.* 2012. V. 90. P. 109-116.
24. Rudnitskaya A., Polshin E., Kirsanov D., Lammertyn J., Nicolai B., Saison D., Delvaux F., Delvaux F., Legin A. Instrumental measurement of beer taste attributes using an electronic tongue // *Anal. Chim. Acta.* 2009. V. 646. P. 111-118.
25. Polshin E., Rudnitskaya A., Kirsanov D., Legin A., Saison D., Delvaux F., Delvaux F., Nicolai B., Lammertyn J. Electronic tongue as a screening tool for rapid analysis of the quality parameters of beer // *Talanta.* 2010. V. 81(1-2). P. 88-94.
26. Mottram T., Rudnitskaya A., Legin A., Fitzpatrick J., Eckersall P. Evaluation of a novel chemical sensor system to detect clinical mastitis in bovine milk // *Biosens. Bioelectron.* 2007. V.22. P. 2689–2693.
27. Rudnitskaya A., Legin A. Sensor systems - electronic tongues and electronic noses for the monitoring of biotechnological processes // *Jour. of Ind. Microbiol. Biotech.* 2008. V. 35(5). P. 443-451.
28. Legin A., Kirsanov D., Rudnitskaya A., Iversen J., Seleznev B., Esbensen K., Mortensen J., Houmøller L., Vlasov Yu. Multicomponent analysis of fermentation growth media using the electronic tongue (ET) // *Talanta.* 2004. V. 64. P. 766-772.

29. Rudnitskaya A., Ehlert A., Legin A., Vlasov Yu., Buttgenbach S. Multisensor system on the basis of an array of non-specific chemical sensors and artificial neural networks for determination of inorganic pollutants in model groundwater // *Talanta*. 2001. V. 55(2). P. 425-431.
30. Kirsanov D., Khaydukova M., Tkachenko L., Legin A., Babain V. Potentiometric Sensor Array for Analysis of Complex Rare Earth Mixtures // *Electroanal.* 2012. V. 24(1). P. 121-130.
31. Legin A., Babain V., Kirsanov D., Mednova O. Cross-sensitive rare earth metal sensors based on extraction systems // *Sens. and Actuat. B.* 2008. V. 131. P. 29-36.
32. Legin A., Kirsanov D., Babain V., Gall L., Gall N. Promising analytical techniques for HLW analysis in “Radioactive Waste: Sources, Types and Management” / Editors: Satoshi Yuan and Wenxu Hidaka. – Hauppauge NY, USA: NOVA Science Publishers Inc, 2012. – 234 p.
33. Kirsanov D., Zadorozhnaya O., Krashennnikov A., Komarova N., Popov A., Legin A. Water toxicity evaluation in terms of bioassay with an Electronic Tongue // *Sens. and Actuat. B.* 2013. V. 179. P. 282-286.
34. Legin A., Rudnitskaya A., Clapham D., Seleznev B., Lord K., Vlasov Yu. Electronic tongue for pharmaceutical analytics – quantification of tastes and masking effects // *Anal. Bioanal. Chem.* 2004. V. 380. P. 36-45.
35. Rudnitskaya A., Kirsanov D., Blinova Y., Legin E., Seleznev B., Clapham D., Ives R., Saunders K., Legin A. Assessment of bitter taste of pharmaceuticals with multisensor system employing 3 way PLS regression // *Anal. Chim. Acta.* 2013. V. 770. P. 45-52.
36. Legin A., Rudnitskaya A., Vlasov Yu. Electronic tongues: new analytical perspective for chemical sensors // In S. Alegret Ed. *Integrated Analytical Systems, Comprehensive Analytical Chemistry XXXIX*, Elsevier. 2003. P. 437-486.
37. Kirsanov D., Legin A., Babain V., Agafonova-Moroz M., Lumpov A. Combination of optical spectroscopy and chemometric techniques – a possible way for

on-line monitoring of SNF reprocessing // *Radiochim. Acta*. 2012. V. 100(3). P. 185-188.

38. Yaroshenko I., Kirsanov D., Kartsova L., Bhattacharyya N., Sarkar S., Legin A. On the application of simple matrix methods for electronic tongue data processing: Case study with black tea samples // *Sens. and Actuat. B*. 2014. V. 191. P. 67-74.

39. Kirsanov D., Cetó X., Khaydukova M., Blinova Y., Del Valle M., Babain V., Legin A. A combination of dynamic measurement protocol and advanced data treatment to resolve the mixtures of chemically similar analytes with potentiometric multisensor system // *Talanta*. 2014. V. 119. P. 226-231.

40. Smyth H., Cozzolino D. Instrumental Methods (Spectroscopy, Electronic Nose, and Tongue) As Tools To Predict Taste and Aroma in Beverages: Advantages and Limitations // *Chem. Rev.* 2013. V.113. P. 1429-1440.

41. Привес, М.Г. Анатомия человека / М.Г.Привес, Н.К.Лысенков, В.И.Бушкович. – 9-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 1985. – 672 с.

42. Исследование мочи: учебное пособие / В.Т.Морозова, И.И.Миронова, Р.Л.Марцишевская. – М.: РМАПО, 1996. – 84 с.

43. Лопаткин, Н.А. Урология: Учебник / Н.А.Лопаткин, А.Г.Пугачев, О.И.Аполихин и др.; Под ред. Н.А. Лопаткина. – 5-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. – 520 с.

44. Gambaro G., Reis-Santos J.M., Rao N. Nephrolithiasis: Why Doesn't Our "Learning" Progress? // *Europ. Urology*. 2004. V.45. P. 547-556.

45. Sellaturay S. The metabolic basis for urolithiasis // *Renal and urology*. 2008. V.26:4. P.136-140.

46. Tiselius H. Who Forms Stones and Why? // *Europ. Urology Suppl.* 2011. V. 10. P. 408-414.

47. Barbas C., Garcia A., Saavedra L., Muros M. Urinary analysis of nephrolithiasis markers // *J. Chromatogr. B*. 2002. V.781. P. 433-455.

48. Wilkinson B., Hall J. Management of stone disease // *Renal and urology*. 2010. V. 28(7). P. 338-344.

49. Сидорова А. А., Григорьев А. В. Определение диагностических маркеров мочекаменной болезни с использованием метода капиллярного электрофореза // Журнал Аналит. Химии. 2012. Т.67. №5. С.1-8.
50. Robertson W.G. Methods for diagnosing the risk factors of stone formation // Arab. J. Urology. 2012. V.10. P. 250-257.
51. Heaton F. W., Hodgkinson A. External factors affecting diurnal variation in electrolyte excretion with particular reference to calcium and magnesium // Clin. Chim. Acta. 1963. V.8. P. 246-254.
52. Robertson W.G. Measurement of ionized calcium in biological fluids // Clin. Chim. Acta. 1969. V.24. P. 149-157.
53. Tiselius H. An improved method for the routine biochemical evaluation of patients with recurrent calcium oxalate stone disease. Clin. Chim. Acta. 1982. V.122. P. 409-418.
54. Robertson W.G., Scurr D.S., Bridge M. Factors influencing the crystallisation of calcium oxalate in urine — critique // J.Crystal Growth. 1981. V.53. P. 182-194.
55. J.W.M. Yuen, Gohel M.I., Poon N., Shum D.K.Y., Tam P., Au D.W.T. The initial and subsequent inflammatory events during calcium oxalate lithiasis. // Clin. Chim. Acta. 2010. V.411. P. 1018-1026.
56. Romero M.C., Zanaro N., Gonzalez L., Trigo P., Imventarza O., Nesse A. Tamm-Horsfall protein excretion to predict the onset of renal insufficiency // Clin. Biochem. 2002. V.35. P. 65-68.
57. Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство: в 2 т. / под. ред. В.В.Долгова, В.В.Меньшикова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 928 с.
58. Feres M.C., Bini R., Martino M.C., Biagini S. P., Sousa A.L., Campana P.G., Tufik S. Implications for the use of acid preservatives in 24-hour urine for measurements of high demand biochemical analytes in clinical laboratories // Clin. Chim. Acta. 2011. V. 412. P. 2322-2325.

59. Fenton T.R., Eliasziw M., Lyon A.W., Tough S.C., Browne J. P., Hanley D.A. Low 5-year stability of within-patient ion excretion and urine pH in fasting-morning-urine specimens // *Nutrition Res.* 2009. V. 29. P. 320-326.
60. Шатохина С. Н., Шабалин В. Н. Диагностика различных патологических состояний по морфологической картине биологических жидкостей (Литос-система) // *Медицинская технология.* 2009. С. 11–32.
61. Yim H., Kibbey C.E., Ma S., Kliza D.M., Liu D., Park S., C.E.Torre, Meyerhoff M.E. Polymer membrane-based ion-, gas- and bio-selective potentiometric sensors // *Biosens. Bioelectron.* 1993. V.8. P. 1-38.
62. Beging S., Mlynek D., Hataihimakul S., Poghossian A., Baldsiefen G., Busch H., Laube N., Kleinen L., Schöning M. J. Field-effect calcium sensor for the determination of the risk of urinary stone formation // *Sens. And Actuat.* 2010. V. 144. P. 374-379.
63. Phillips F., Kaczor K., Gandhi N., Pendley B.D., Danish R.K., Neuman M. R., Toth B., Horvath V., Lindner E. Measurement of sodium ion concentration in undiluted urine with cation-selective polymeric membrane electrodes after the removal of interfering compounds // *Talanta.* 2007. V. 74. P. 255-264.
64. Machini W.B.S., Martin C.S., Martinez M.T., Teixeira S.R., Gomes H.M., Teixeira M.F.S. Development of an electrochemical sensor based on nanostructured hausmannite-type manganese oxide for detection of sodium ions // *Sens. and Actuat. B.* 2013. V. 181. P. 674-680.
65. Gilbert L., Jenkins A T.A., Browning S., Hart J.P. Development of an amperometric assay for phosphate ions in urine based on a chemically modified screen-printed carbon electrode // *Anal. Biochem.* 2009. V. 393. P. 242-247.
66. Chen C., Lin M.S. A novel structural specific creatinine sensing scheme for the determination of the urine creatinine // *Biosens. Bioelectron.* 2012. V. 31. P. 90-94.
67. Hudari F.F., Duarte E.H., Pereira A.C., Dall'Antonia L.H., Kubota L.T., Tarley C.R.T. Voltammetric method optimized by multi-response assays for the simultaneous measurements of uric acid and acetaminophen in urine in the presence of

surfactant using MWCNT paste electrode // *J. Electroanal. Chem.* 2013. V. 696. P. 52-58.

68. Miah Md.R., Alam M.T., Ohsaka T. Sulfur-adlayer-coated gold electrode for the in vitro electrochemical detection of uric acid in urine // *Anal. Clin. Acta.* 2010. V. 669. P. 75-80.

69. Özcan A., Sahin Y. Preparation of selective and sensitive electrochemically treated pencil graphite electrodes for the determination of uric acid in urine and blood serum // *Biosens. Bioelectron.* 2010. V. 25. P. 2497-2502.

70. Pundir C.S., Yadav S., Kumar A. Creatinine sensors // *Trends Anal. Chem.* 2013. V. 50. P. 42-52.

71. Araújo W.R., Salles M.O., Paixão T.R.L.C. Development of an enzymeless electroanalytical method for the indirect detection of creatinine in urine samples // *Sens. and Actuat. B.* 2012. V.173. P. 847-851.

72. Chen J.-C., Kumar A.S., Chung H.-H., Chien S.-H., Kuo M.-C., Zen J.-M. An enzymeless electrochemical sensor for the selective determination of creatinine in human urine // *Sens. and Actuat. B.* 2006. V.115. P. 473-480.

73. Tsikas D., Wolf A., Mitschke A., Gutzki F., Will W., Bader M. GC–MS determination of creatinine in human biological fluids as pentafluorobenzyl derivative in clinical studies and biomonitoring: Inter-laboratory comparison in urine with Jaffé, HPLC and enzymatic assays // *J. Chromatogr. B.* 2010. V. 878. P. 2582-2592.

74. Ballesta-Claver J., Díaz Ortega I.F., Valencia-Mirón M.C., Capitán-Vallvey L.F. Disposable luminol copolymer-based biosensor for uric acid in urine // *Anal. Chem. Acta.* 2011. V. 702. P. 254-261.

75. Kanyong P., Pemberton R.M., Jackson S.K., Hart J.P. Development of a sandwich format, amperometric screen-printed uric acid biosensor for urine analysis // *Anal. Biochem.* 2012. V. 428. P. 39-43.

76. Chauhan N., Narang J., Shweta, Pundir C.S. Immobilization of barley oxalate oxidase onto gold–nanoparticle-porous CaCO₃ microsphere hybrid for amperometric determination of oxalate in biological materials // *Clin. Biochem.* 2012. V. 45. P. 253-258.

77. Pundir C.S., Chauhan N., Rajneesh, Verma M., Ravi. A novel amperometric biosensor for oxalate determination using multi-walled carbon nanotube-gold nanoparticle composite // *Sens. and Actuat. B.* 2011. V. 155. P. 796-803.
78. Yadav S., Devi R., Kumari S., Yadav S., Pundir C.S. An amperometric oxalate biosensor based on sorghum oxalate oxidase bound carboxylated multiwalled carbon nanotubes–polyaniline composite film // *J. Biotech.* 2011. V. 151. P. 212-217.
79. Yu B., Yuan Q., Nie L, Yao S. Ion chromatographic determination of calcium and magnesium cations in human saliva and urine with a piezoelectric detector // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001. V. 25. P. 1027-1032.
80. Zhao F.Y., Wang Z.H., Wang H., Zhao R., Ding M.Y. Determination of uric acid in human urine by ion chromatography with conductivity detector // *Chin.Chem. Lett.* 2011. V. 22. P. 342-345.
81. Kwon W., Kim J.Y., Suh S., In M.K. Simultaneous determination of creatinine and uric acid in urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with polarity switching electrospray ionization // *Forensic Sci. Int.* 2012. V. 221. P. 57-64.
82. Zuo Y., Yang Y., Zhu Z., He W., Aydin Z. Determination of uric acid and creatinine in human urine using hydrophilic interaction chromatography // *Talanta.* 2011. V. 83. P. 1707-1710.
83. Wan Q.J., Kuban P., Tanyanyiwa J., Rainelli A., Hauser P.C. Determination of major inorganic ions in blood serum and urine by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection // *Anal. Chim. Acta.* 2004. V. 525. P. 11-16.
84. Galli V., Garcia A., Saavedra L., Barbas C. Capillary electrophoresis for short-chain organic acids and inorganic anions in different samples // *Electrophoresis.* 2003. V. 24. P. 1951-1981.
85. Munoz J.A., López-Mesas M., Valiente M. Development and validation of a simple determination of urine metabolites (oxalate, citrate, uric acid and creatinine) by capillary zone electrophoresis // *Talanta.* 2010. V. 81. P. 302-397.

86. Garcia A., Muros M., Barbas C. Measurement of nephrolithiasis urinary markers by capillary electrophoresis // *J.Chromatogr. B.* 2001. V. 755. P. 287-295.
87. Guo W.P., Lau K.M., Fung Y.S. Microfluidic chip-capillary electrophoresis for two orders extension of adjustable upperworking range for profiling of inorganic and organic anions in urine // *Electrophoresis.* 2010. V. 31. P. 3044-3052.
88. Jarolimova Z., Lubal P., Kanicky V. Analysis of renal stones by capillary isotachophoresis // *Talanta.* 2012. V. 98. P. 49-53.
89. Al-Shukri S., Gorbachev M., Landa S., Kovalenko M., Napalkova O., Emanuel Y. Studies of molecular factors predisposing for kidney stone disease and identification of molecular targets for its therapy and prophylaxis // *Chem. Biochem.* 2011. V. 44. P. 520-549.
90. Argade S., Shaw T., Chen T., Zupkas P., Lagares E., Parsons C. L., Sur R. The role of Tamm-Horsfall protein in urinary stone disease // *J. Urology.* 2013. V. 189. P. 945.
91. Shihabi Z.K., Hinsdale M.E., Bleyer A.J. Analysis of Tamm–Horsfall protein by high-performance liquid chromatography with native fluorescence // *J. Chromatogr. A.* 2004. V. 1027. P. 161-166.
92. Яшин Я. И., Яшин А. Я. Чай. Химический состав чая и его влияние на здоровье человека / М.: ТрансЛит, 2010. – 160 стр.
93. Bondarovich H.A., Giammarino A.S., Renner J.A. The volatile constituents of tea // *J. Agric. Food Chem.* 1967. V. 15, P. 36-47.
94. Pierce A.R., Graham H.N., Glassner S. The analysis flavonols of tea by gas chromatography in the form of their trimetilsililny derivatives // *Anal. Chem.* 1969. V. 41, P. 298-302.
95. Bokuchava M.A., Skobeleva N.I. The chemistry and biochemistry of tea and tea manufacture // *Advance Food Research* 1969. V. 17. P. 215.
96. Dalluge J. J., Nelson B. C.. Determination of tea catechins // *J. Chromatogr. A.* 2000. V. 881. P. 411-424.
97. Sharma O. P., Bhat T. K., Singh B. TLC of gallic acid, methyl gallat, pyrogallol, phloroglucinol, catechol, resorcinol, hydroquinone, catechin, epicatechin,

cinnamic acid, p-cummaric acid, ferulic acid and tannic acid // J. Chromatogr. A. 1998. V. 822. P. 167-171.

98. Карцова Л.А., Алексеева А.В. Использование селективного комплексообразования катехинов с ионами Fe^{3+} при определении кофеина в чае методом ВЭТСХ // Журнал Аналит. Химии. 2009. Т. 64. № 9. С. 954 – 958.

99. Vovk I., Simonovska B., Vuorela H. Separation of eight selected flavan-3-ols on cellulose thin-layer chromatographic plates // J. Chromatogr. A. 2005. V. 1077. P. 180-194.

100. Blahova E., Lehotay J. Sample preparation and HPLC determination of catechins in green tea // Chem. Anal. 2006. V. 51. P. 795-807.

101. Tsuchiya H. HPLC analysis of polyhydroxyflavones using solid-phase borate complex extraction // J. Chromatogr. B. 1998. V. 720. P. 225-230.

102. Fernandez P. L., Martin M. J., Gonzalez A. G., Pablos F.. HPLC determination of catechins and caffeine in tea. // The Analyst. 2000. V. 125. P. 421-425.

103. Sano M., Tabata M., Suzuki M., Degawa M., Miyase T., Maeda-Yamamoto M.. Simultaneous determination of twelve tea catechins by HPLC with electrochemical detection // The Analyst. 2001. V. 126. P. 816-820.

104. Guth H., Grosch W. Detection of potent odorants in foods by aroma extract dilution analysis // Flavour Fragrance J. 1993. V. 8. P. 173-178.

105. Mick W., Schrerer P. Differentiation of green, black and instant teas // J. Agric. Food Chem. 1984. V. 32. P. 924.

106. Ding Y., Yu H., Mou S. Direct determination of free amino acids and sugars in green tea by anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection // J.Chromatogr. A. 2002. V.982. P. 237-244.

107. Donovan J.L., Luthria D.L., Stremple P. and Waterhouse A.L. The analysis (+) - catechin, (-) - epicatechin and its 3' and 4' - O-metil analogs // J. Chromatogr. B. 1999. V. 726. P. 277-283.

108. Singh H.P., Ravindranath S.D., Singh C. The analysis tea catechins a two-dimensional paper chromatography with SPF visualization // J. Agric. Food Chem. 1999. V. 47. P. 1041-1045.

109. Rechner A.R., Wagner E. et al. Black tea - the main source of food polyphenols among regularly drinking tea // *Free Radic. Res.* 2002. V. 36. P. 1127-1235.
110. Chen C.W., Chang Y.W., Hwang L.C. The fast analysis teaflavins HPLC-MS (chemical ionization at atmospheric pressure) // *J. Food Drug Anal.* 1998. V. 6. P. 713-718.
111. Cao X.L., Lewis J.R., Ito Y. Application of a high-speed counterflow chromatography for division teaflavins of black tea // *J. Liq. Chromatogr. Technol.* 2004. V. 27. P. 1893-1902.
112. Kim J.I., Hong S.B., Row K.H. Effect of particle size in preparative reversed-phase high-performance liquid chromatography on the isolation of epigallocatechin gallate from Korean green tea // *J. Chromatogr. A.* 2002. V. 949. P. 275-280.
113. Kofink M., Paragiannopoulos M., Galensa R. Enantiomeric separation of catechin and epicatechin // *Eur. Foods Res. Technol.* 2007. V. 225.P. 569-579.
114. Ding M.Y., Chen P.R., Luo G.A. Simultaneous determination of organic acids and inorganic anions in tea by ion chromatography // *J.Chromatogr. A.* 1997. V.764. P. 341-345.
115. Flaten A.K., Lund W. Speciation of aluminium in tea infusions studied by size exclusion chromatography with detection by post-column reaction // *Sci.Total Environ.* 1997. V.207. P. 21.
116. Horie H., Mukai T., Kohata K. Simultaneous determination of qualitatively important components in green tea infusions using capillary electrophoresis // *J. Chromatogr.A.* 1997. V. 758. P. 332-335.
117. Vaher M., Koel M. Separation of polyphenolic compounds extracted from plant matrices using capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. A.* 2003. V. 990. P. 225-230.
118. Yanes E. G., Gratz S. R., Stalcup A. M.. Tetraethylammonium tetrafluoroborate: a novel electrolyte with a unique role in the capillary electrophoretic

separation of polyphenols found in grape seed extracts // *Analyst*. 2000. V. 125. P. 1919-1923.

119. Horie H., Kohata K. Application of capillary electrophoresis to tea quality estimation // *J. Chromatogr.A*. 1998. V. 802. P. 219-223.

120. Kartsova L.A., Alekseeva A.V. Chromatographic and Electrophoretic Methods for Determining Polyphenol Compounds // *J. of Anal. Chem.* 2008. V.63. P. 1024-1033.

121. Карцова Л.А., Ганжа О.В. Электрофоретическое разделение чайных флаваноидов в режиме капиллярного зонного электрофореза и мицеллярной электрокинетической хроматографии // *Журнал прикладной химии*. 2006. Т.79. Вып.7. С.1120 – 1124.

122. Карцова Л.А., Ганжа О.В., Алексеева А.В. Возможности и ограничения различных режимов капиллярного электрофореза для количественного определения катехинов в черном и зеленом чае // *Журнал Аналит. Химии*. 2010. Т.65. №2. С. 212-217.

123. Карцова Л.А., Ганжа О.В. Мицеллярная электрокинетическая хроматография с обращенной полярностью при разделении полифенольных соединений и кофеина // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2007. Т. 7. Вып. 6. С. 902-908.

124. Szymczycha-Madeja A., Welna M., Pohl P. Elemental analysis of teas and their infusions by spectrometric methods // *Trends Anal. Chem.* 2012. V. 35. P. 165-181.

125. Deng C., Liu N., Gao M., Zhang X. Recent developments in sample preparation techniques for chromatography analysis of traditional Chinese medicines // *J. Chromatogr. A*. 2007. V. 1153. P. 90-96.

126. Hai H. Kuhn and the Two Cultures of Western and Chinese Medicine // *J. Cambridge Studies*. 2009. V. 4. № 3. P. 10-36.

127. Цзинь Синь-Чжун. Китайская народная медицина (дополненная стенограмма публичной лекции, прочитанной в центральной лектории Общества 20 ноября 1957 г.) / под. ред. В.Г.Вогралика. – Изд. 2-е. – М.: Знание, 1959. – 65 с.

128. J. S. Witkoppen. Use of animal products in traditional Chinese medicine: environmental impact and health hazards // *Complem. Therapies in Med.* 2003. V. 11(2). P. 118–122.
129. Henry L.A. A tale of two cities. A Comparative Study of Traditional Chinese Medicine Markets in San Francisco and New York City / *TRAFFIC North America*, WWF, 2004. – 21 p.
130. Alves R.R.N., Rosa I.M.L. Biodiversity, traditional medicine and public health: where do they meet? // *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 2007. V. 3:14.
131. Haiyan L., Zhen G., York P., Shao Q., Jingkai G., Jiwen Z. Research of Traditional Chinese Medicine in Terms of Herbalomics // *Mode Tradit Chin Med Mater Med.* 2010. V. 12(2). P. 160-164.
132. Liang X., Jin Y., Wang Y., Jin G., Fu Q., Xiao Y. Qualitative and quantitative analysis in quality control of traditional Chinese medicines // *J. Chromatogr. A.* 2009. V.1216. P. 2033-2044.
133. Sutherland I. A., Fisher D. Role of counter-current chromatography in the modernization of Chinese herbal medicines // *J. Chromatogr. A.* 2009. V. 1216. P. 740-753.
134. Li Y., Wu T., Zhu J., Wan L., Yu Q., Li X., Cheng Z., Guo C. Combinative method using HPLC fingerprint and quantitative analyses for quality consistency evaluation of an herbal medicinal preparation produced by different manufacturers // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010. V. 52. P. 597-602.
135. Li S., Song J., Qiao C., Zhou Y., Xu H. UPLC–PDA–TOFMS based chemical profiling approach to rapidly evaluate chemical consistency between traditional and dispensing granule decoctions of traditional medicine combinatorial formulae // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010. V. 52. P. 468-478.
136. Wang S., Hu Y., Tan W., Wu X., Chen R., Cao J., Chen M., Wang Y. Compatibility art of traditional Chinese medicine: From the perspective of herb pairs // *J. Ethnopharm.* 2012. V. 143. P. 412-423.
137. Yang Y., Zhang Z., Li S., Ye X., Li X., He K. Synergy effects of herb extracts: Pharmacokinetics and pharmacodynamic basis // 2014. V. 92. P. 133-147.

138. Phillipson J.D. Phytochemistry and pharmacognosy // *Phytochem.* 2007. V. 68. P. 2960-2972.
139. Hurtado-Fernández E., Gómez-Romero M., Carrasco-Pancorbo A., Fernández-Gutiérrez A. Application and potential of capillary electroseparation methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010. V. 53. P. 1130-1160.
140. Drasar P., Moravcova J. Recent advances in analysis of Chinese medical plants and traditional medicines // *J. Chromatogr. B.* 2004. V. 812. P. 3-21.
141. Hahn-Deinstrop E. *Applied Thin-Layer Chromatography: Best practice and avoidance of mistakes.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 2007. Online ISBN: 9783527610259.
142. Marchand E., Atemnkeng M.A., Vanermen S. Development and validation of a simple thin layer chromatographic method for the analysis of artemisinin in *Artemisia annua L.* plant extracts // *Biomed. Chromatogr.* 2008. V. 22. P. 454-459.
143. Zarzycki P.K. Simple horizontal chamber for thermostatic micro-thin-layer chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2008. V. 1187. P. 250-259.
144. Morlock G., Ueda Y. New coupling of planar chromatography with direct analysis in real time mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2007. V. 1143. P. 243-251.
145. Tate P.A., Dorsey J.G. Linear voltage profiles and flow homogeneity in pressurized planar electro-chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2006. V. 1103. P. 150-157.
146. Berezkin V.G., Balushkin A.O., Tyaglov B.V. Use of low volatility mobile phases in electroosmotic thin-layer chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2005. V. 1084. P. 13-17.
147. Razmovski-Naumovski V., Tongkao-on W., Kimble B., Qiao V.L., Beilun L., Li K.M., Roufogalis B., Depo Y., Meicun Y., Li G.Q. Multiple Chromatographic and Chemometric Methods for Quality Standardisation of Chinese Herbal Medicines // *Mode Tradit Chin Med Mater Med.* 2010. V. 12(1). P. 99-106.

148. Jiang Y., David B., Tu P., Barbin Y. Recent analytical approaches in quality control of traditional Chinese medicines – A review // *Anal. Chim. Acta*. 2010. V. 657. P. 9-18.
149. Dalluge J., Beens J., Brinkman U.A.T. Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a powerful and versatile analytical tool // *J. Chromatogr. A*. 2003. V. 1000. P. 69-108.
150. Qiu Y.Q., Lu X., Pang T., Zhu S.K., Kong H.W., Xu G.W. Study of traditional Chinese medicine volatile oils from different geographical origins by comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (GC×GC-TOF-MS) in combination with multivariate analysis // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007. V. 43. P. 1721–1727.
151. Yu Q.T., Qui L.W., Li P. Determination of seventeen main flavonoids and saponins in the medicinal plant Huang-qi (*Radix astragali*) by HPLC-DAD-ELSD // *J. Separation Sci.* 2007. V. 30. P. 1292-1299.
152. Kwon H.J., Jeong J.S., Lee Y.M. A reversed-phase high-performance liquid chromatography method with pulsed amperometric detection for the determination of glycosides // *J. Chromatogr. A*. 2008. V. 1185. P. 251-257.
153. Yang M., Sun J., Lu Z., Chen G., Guan S., Liu X., Jiang B., Ye M., Guo D. Phytochemical analysis of traditional Chinese medicine using liquid chromatography coupled with mass spectrometry // *J. Chromatogr. A*. 2009. V. 1216. P. 2045-2062.
154. Wu H., Guo J., Chen S., Liu X., Zhou Y., Zhang X., Xu X. Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and their metabolites using liquid chromatography–mass spectrometry // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2013. V. 72. P. 267-291.
155. Zhou J., Qi L., Li P. Herbal medicine analysis by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry // *J. Chromatogr. A*. 2009. V. 1216. P. 7582-7594.
156. Gotti R. Capillary electrophoresis of phytochemical substances in herbal drugs and medicinal plants // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011. V. 55. P. 775-801.

157. Jiang T.-F., Lu Z.-H., Wang Y.-H., Chiral separation of ephedrine alkaloids from *Ephedra sinica* extract and its medicinal preparation using cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis // J. Anal. Chem. 2007. V. 62. P. 85–89.
158. Wang L., Li D., Bao C., You J., Wang Z., Shi Y., Zhang H. Ultrasonic extraction and separation of anthraquinones from *Rheum palmatum* L. // Ultrasonics Sonochem. 2008. V. 15. P. 738-746.
159. Liang Y., Xie P., Chan K. Quality control of herbal medicines // J. Chromatogr. B. 2004. V. 812. P. 53-70.
160. Fan Q., Chen C., Lin Y., Zhang C., Liu B., Zhao S. Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy for discrimination of *Rhizoma gastrodiae* (Tianma) from different producing areas // J. Molecul. Struct. 2013. V. 1051. P. 66-71.
161. Alaerts G., Pieters S., Logie H., Van Erps J., Merino-Arévalo M., Dejaegher B., Smeyers-Verbeke J., Van der Heyden Y. Exploration and classification of chromatographic fingerprints as additional tool for identification and quality control of several *Artemisia* species // J. Pharm. Biomed. Anal. 2014. V. 95. P. 34-46.
162. Шараф М.А. Хемометрика. / М.А. Шараф, Д.Л. Иллман, Б.Р. Ковальски. Перевод с англ. – Л.: Химия, 1989. – 272 с.
163. Родионова О.Е. Хемометрика в аналитической химии. / О.Е. Родионова, А.Л. Померанцев. – М.: Институт химической физики РАН, 2006. – 61 с.
164. James G., Witten D., Hastie T., Tibshirani R. An Introduction to Statistical Learning with Applications in R // New York, Springer Science+Business Media. 2013. – 426 p.
165. Bro R. Multiway calibration. Multilinear PLS // J. Chemometr. 1996. V. 10. P. 47-61.
166. Ramsay J.O. et al. Matrix correlation // Psychometrika. 1984. V.49. P. 403–423.
167. Smilde A.K., Kiers H.A.L., Bijlsma S., Rubingh C.M., van Erk M.J. Matrix correlations for high-dimensional data: the modified RV-coefficient // Bioinform. 2009. V. 25. № 3. P. 401–405.

168. Stanimirova I., Boucon C., Walczak B. Relating gas chromatographic profiles to sensory measurements describing the end products of the Maillard reaction // *Talanta*. 2011. V. 83. P. 1239–1246.
169. Natale C.D., Paolesse R., Macagnano A., Mantini A., D'Amico A., Legin A., Lvova L., Rudnitskaya A., Vlasov Yu. Electronic nose and electronic tongue integration for improved classification of clinical and food samples // *Sens. and Actuat. B*. 2000. V. 64. P. 15-21.
170. Gutierrez M., Alegret S., del Valle M. Potentiometric bioelectronic tongue for the analysis of urea and alkaline ions in clinical samples // *Biosens. and Bioelectron*. 2007. V. 22. P. 2171-2178.
171. Gutierrez M., Alegret S., del Valle M. Bioelectronic tongue for the simultaneous determination of urea, creatinine and alkaline ions in clinical samples // *Biosens. and Bioelectron*. 2008. V. 23. P. 795-802.
172. Lvova L., Martinelli E., Dini F., Bergamini A., Paolesse R., Di Natale C., D'Amico A. Clinical analysis of human urine by means of potentiometric Electronic tongue // *Talanta*. 2009. V. 77. P. 1097-1104.
173. Ivarsson P., Holmin S., Hojer N., Krantz-Rulcker C., Winquist F. Discrimination of tea by means of a voltammetric electronic tongue and different applied waveforms // *Sens. And Actuat. B*. 2001. V. 76. P. 449-454.
174. Nieh C., Hsieh B., Chen P., Hsiao H., Cheng T., Chen. R.L.C. Potentiometric flow-injection estimation of tea fermentation degree // *Sens. and Actuat. B*. 2009. V.136. P. 541-545.
175. Bhondekar A.P., Dhiman M., Sharma A., Bhakta A., Ganguli A., Baric S.S., Vig R., Kapur P., Singla M.L. A novel iTongue for Indian black tea discrimination // *Sens. and Actuat. B*. 2010. V. 148. P. 601-609.
176. Banerjee(Roy) R., Tudu B., Shaw L., Jana A., Bhattacharyya N., Bandyopadhyay R. Instrumental testing of tea by combining the responses of electronic nose and tongue // *J. Food Engineering*. 2012. V. 110. P. 356-363.
177. Banerjee(Roy) R., Chattopadhyay P., Tudu B., Bhattacharyya N., Bandyopadhyay R. Artificial flavor perception of black tea using fusion of electronic

nose and tongue response: A Bayesian statistical approach // J. Food Engineering. 2014. V. 142. P. 87-93.

178. Kovacs Z., Dalmadi I., Lukacs L., Sipos L., Szantai-Kohegyie K., Kokaid Z., Fekete A. Geographical origin identification of pure Sri Lanka tea infusions with electronic nose, electronic tongue and sensory profile analysis // J. Chemometr. 2010. Special Issue Article.

179. Lvova L., Legin A., Vlasov Yu., Cha G.S., Nam H. Multicomponent analysis of Korean green tea by means of disposable all-solid-state potentiometric electronic tongue microsystem // Sens. and Actuat. B. 2003. V. 95. P. 391-399.

180. Kataoka M., Tokuyama E., Miyanaga Y., Uchida T. The taste sensory evaluation of medicinal plants and Chinese medicines // Internat. J. Pharm. 2008. V. 351. P. 36-44.

181. Liu R., Zhang X., Zhang L., Gao X., Li H., Shi J., Li X. Bitterness intensity prediction of berberine hydrochloride using an electronic tongue and a GA-BP neural network // Experim. Therap. Med. 2014. V. 7. P. 1696-1702.

182. Wang Y., Feng Y., Wu Y., Liang S., Xu D. Sensory evaluation of the taste of *berberine hydrochloride* using an Electronic Tongue // Fitoterpia. 2013. V. 86. P. 137-143.

183. Laureati M., Buratti S., Bassoli A., Borgonovo G., Pagliarini E. Discrimination and characterisation of three cultivars of *Perilla frutescens* by means of sensory descriptors and electronic nose and tongue analysis // Food Res. Internat. 2010. V. 43. P. 959-964.

184. Du R., Wang Y., Wu F., Feng Y., Xu D., Hong Y., Ruan K. Discrimination of traditional Chinese medicinal materials with different tastes based on electronic tongue // China J. Chinese Materia Medica. 2013. V. 38(2). P. 154-160.

185. Ярошенко И.С., Хайменов А.Я., Григорьев А.В, Сидорова А.А. Определение реина в плазме крови методом ВЭЖХ с ультрафиолетовым детектированием и применение к исследованию биоэквивалентности // Журнал Аналит. Химии. 2014. Т. 69. № 8. С. 868-874.

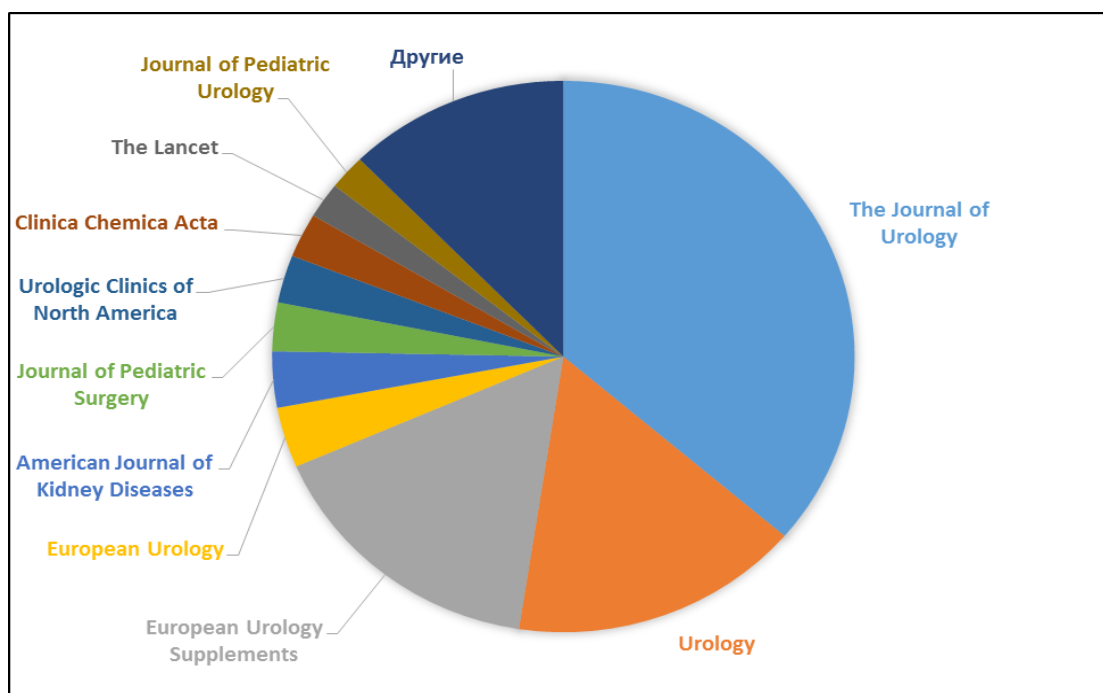
186. Papieva I.S., Kirsanov D.O., Legin A.V., Kartsova L.A., Alekseeva A.V., Vlasov Yu.G., Bhattacharyya N., Sarkar S., Bandyopadkhyay R. Analysis of Tea Samples with a Multisensor System and Capillary Electrophoresis // *Rus. J. App. Chem.* 2011. V. 84. № 6. P. 964-971.

187. Ярошенко И.С., Кирсанов Д.О., Легин А.В., Ванг П., Ха Д., Ван Х., Ван Х., Хе Ю. Применение мультисенсорной системы для анализа горькости препаратов китайской народной медицины // *Научно-технический вестник ИТМО.* 2014. № 4 (92). С. 132-139.

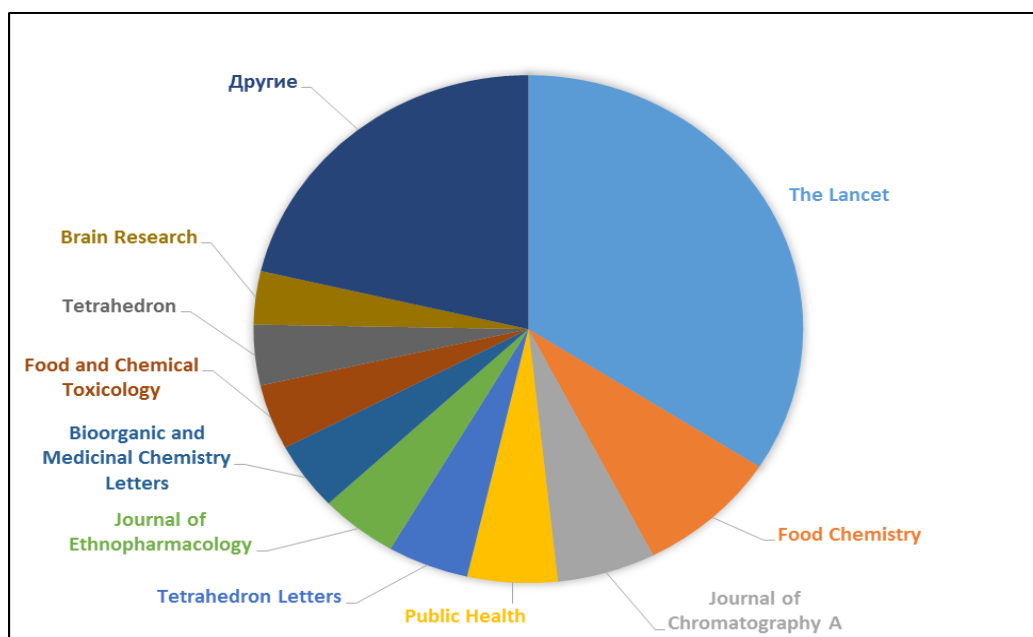
188. Chen Q., Zhao J., Guo Z., Wang X. Determination of caffeine content and main catechins contents in green tea (*Camellia sinensis* L.) using taste sensor technique and multivariate calibration // *J. of Food Composition and Analysis.* 2010. V. 23. P. 353–358.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

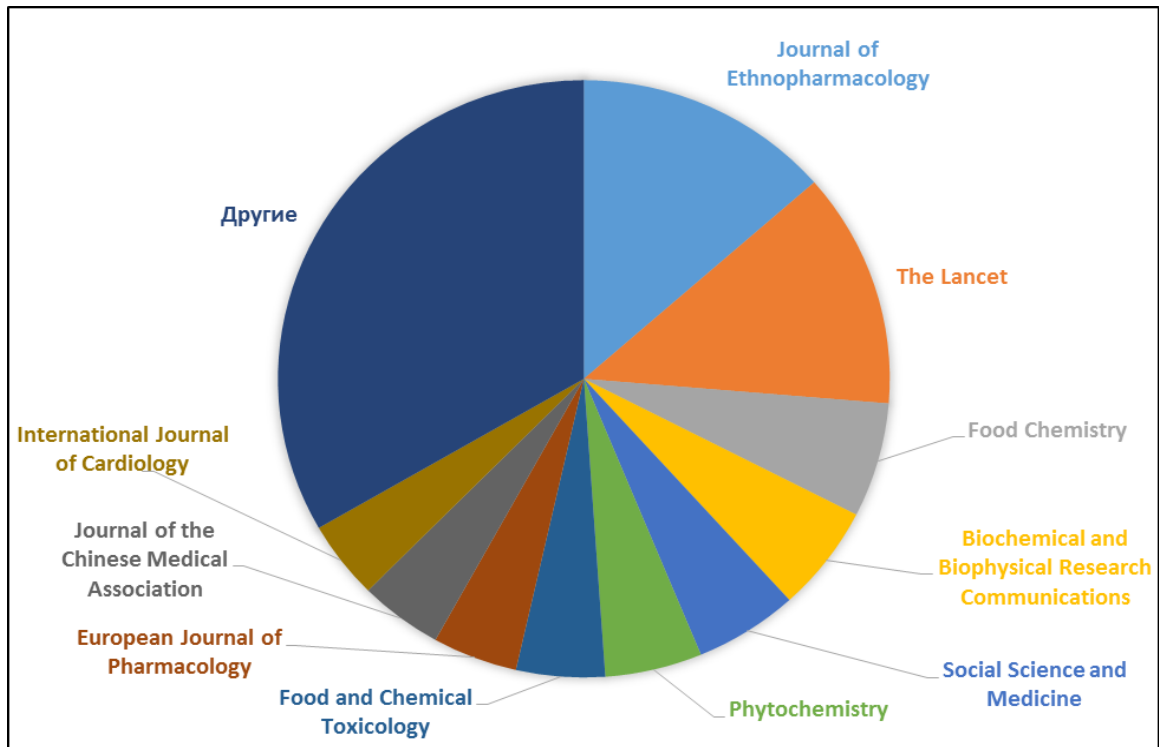
Основная доля публикаций, посвященных различным аспектам мочекаменной болезни, приходится на узкоспециализированные медицинские журналы. Разнообразие научных изданий по данной проблеме подчеркивает ее актуальность.



Десять основных научных изданий, публикующих статьи, посвященные анализу чая.

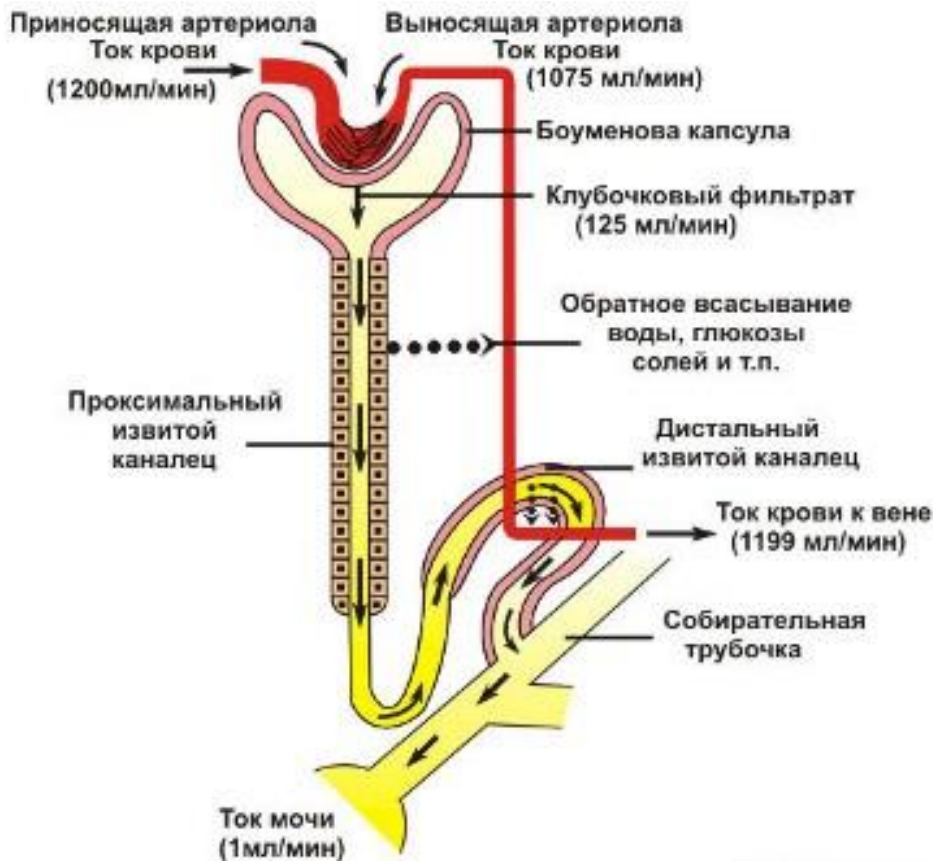


Изучением растительных препаратов традиционной китайской медицины занимается множество лабораторий. При этом огромная доля публикаций приходится на китайские непереводные журналы. На рисунке представлены англоязычные издания, в которых рассматриваются вопросы, связанные с ТКМ:



ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Схема процесса образования мочи в организме [41].

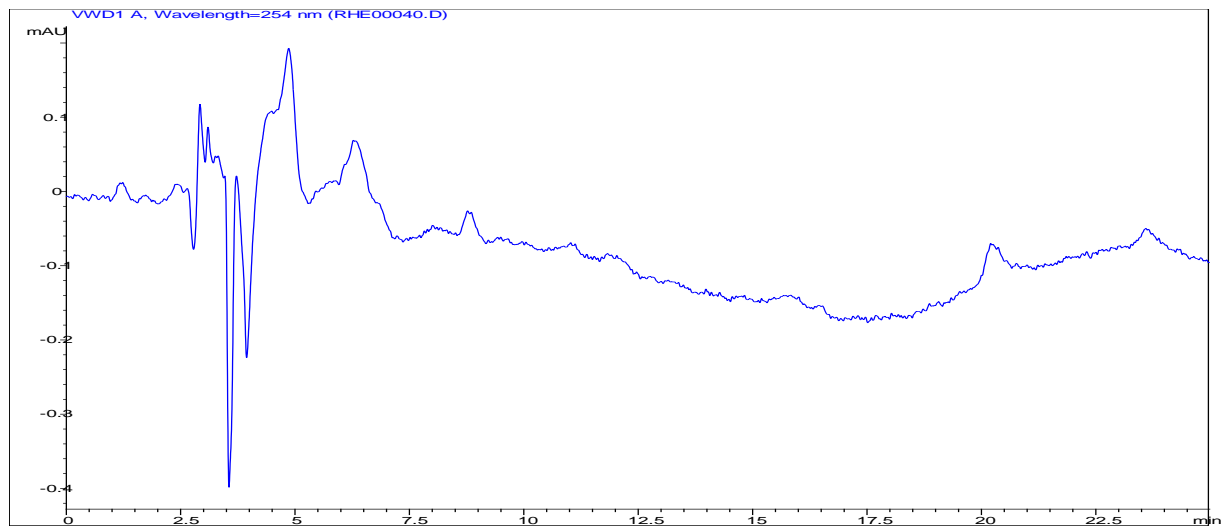


По артериям в почки поступает кровь, которую нужно очистить от продуктов жизнедеятельности. Через стенки капилляров почечных клубочков фильтруется плазма крови, образуя первичную мочу (при этом не фильтруются клетки крови и большинство крупных молекул, например, белки). При прохождении первичной мочи по почечным канальцам большая часть воды и часть растворенных в ней веществ всасываются обратно в кровь (процесс реабсорбции), в результате чего образуется конечная моча, выводимая из организма. За сутки через почечные клубочки проходит до 2000 литров крови, из которой выделяется до 170 литров первичной мочи. Затем из нее образуется около 1,5-2 литров концентрированной мочи, которая и выводится из организма. Количество образуемой в течение суток мочи зависит от количества выпитой жидкости и съеденной пищи, а также времени суток и физической активности [34].

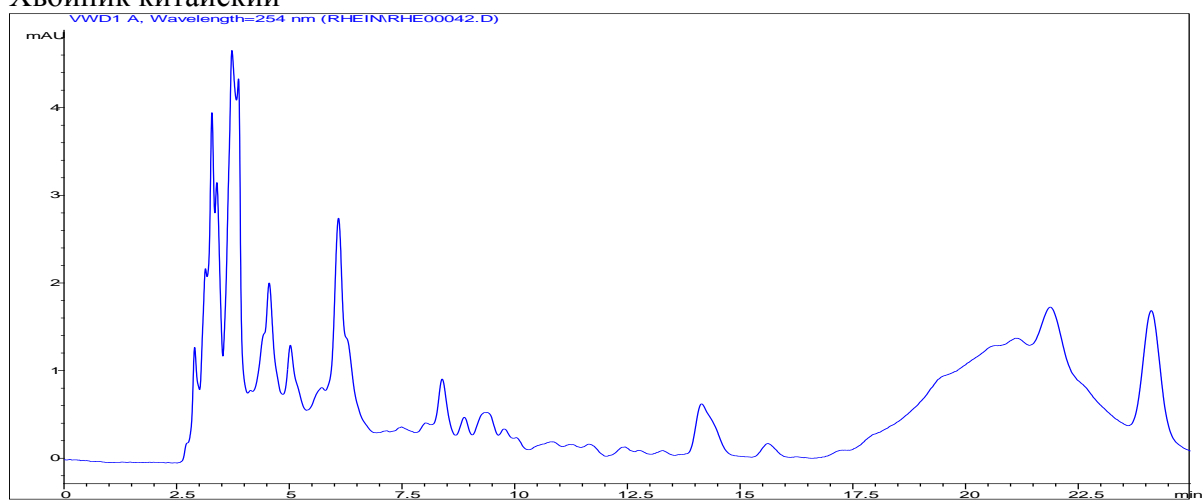
ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Хроматографические профили лекарственных препаратов ТКМ

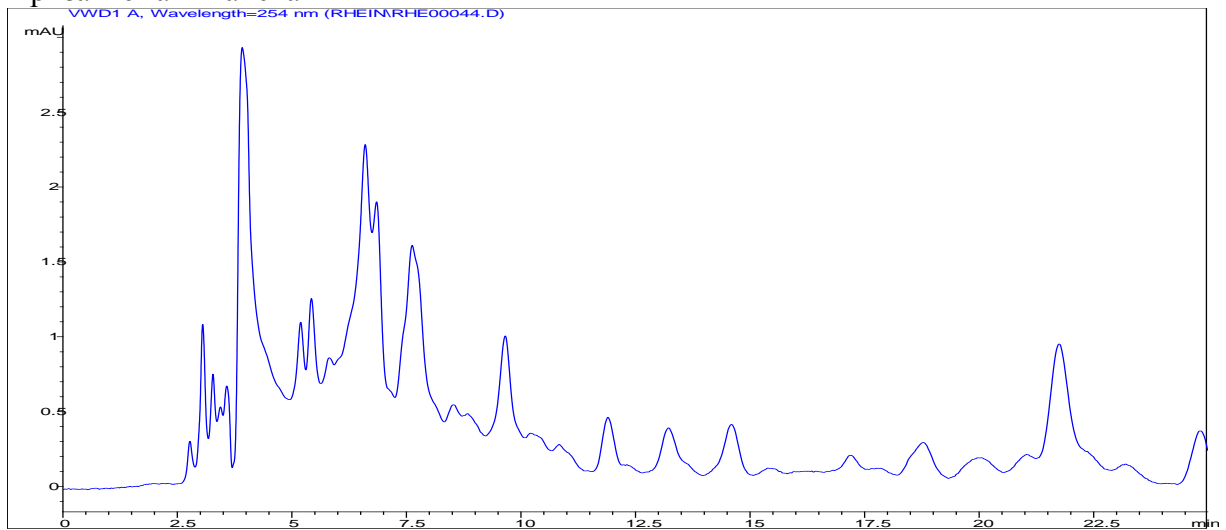
Реманния клейкая



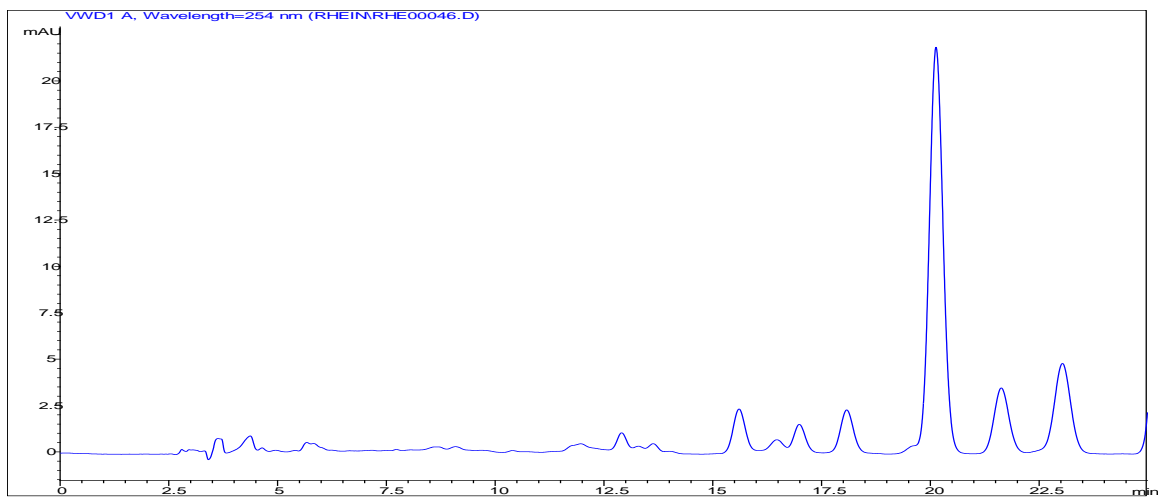
Хвойник китайский



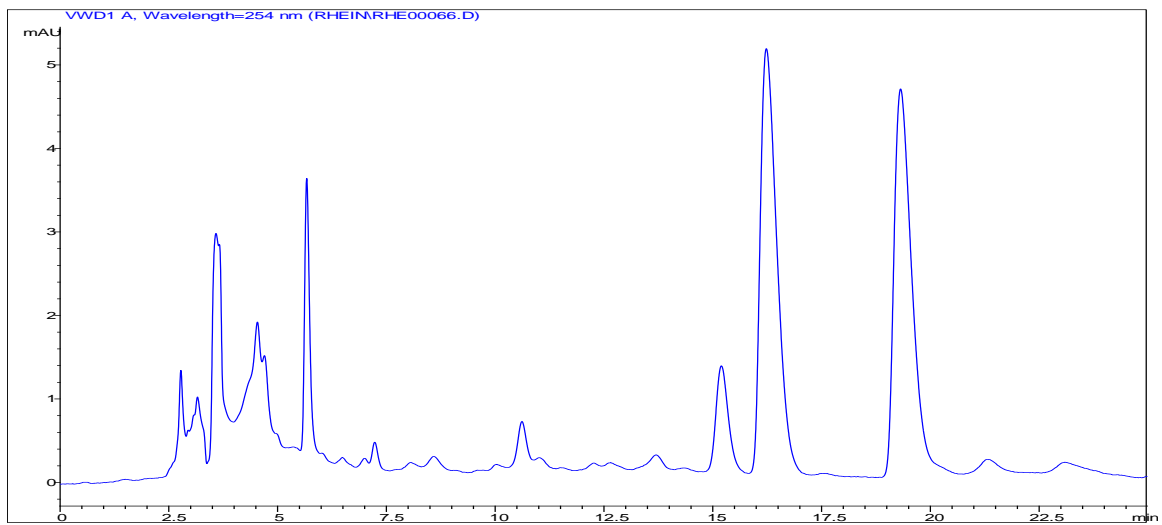
Хризантема китайская



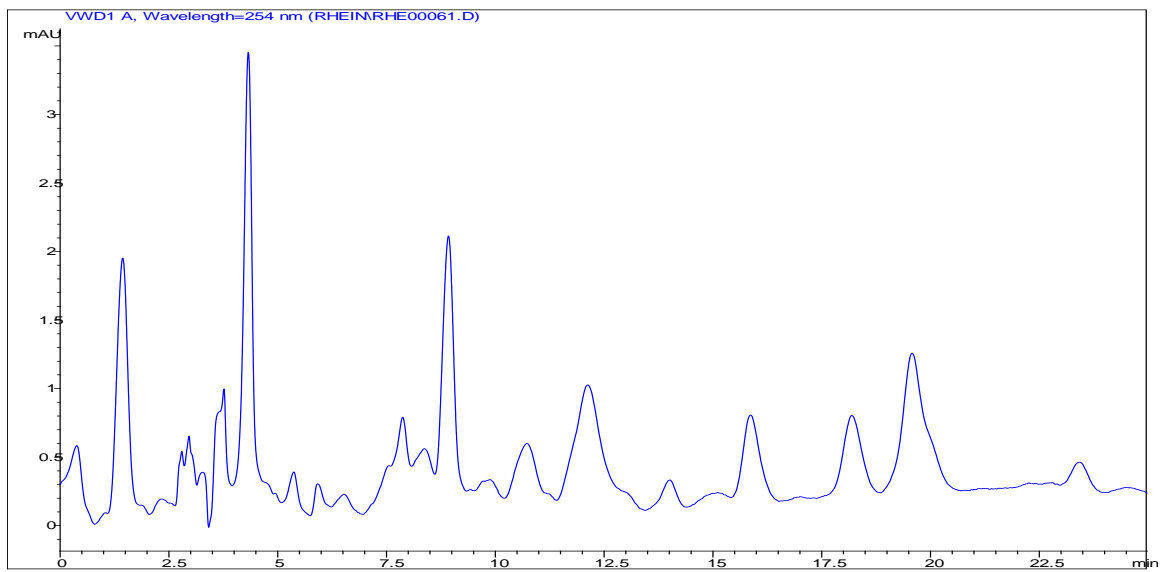
Ветки кассии



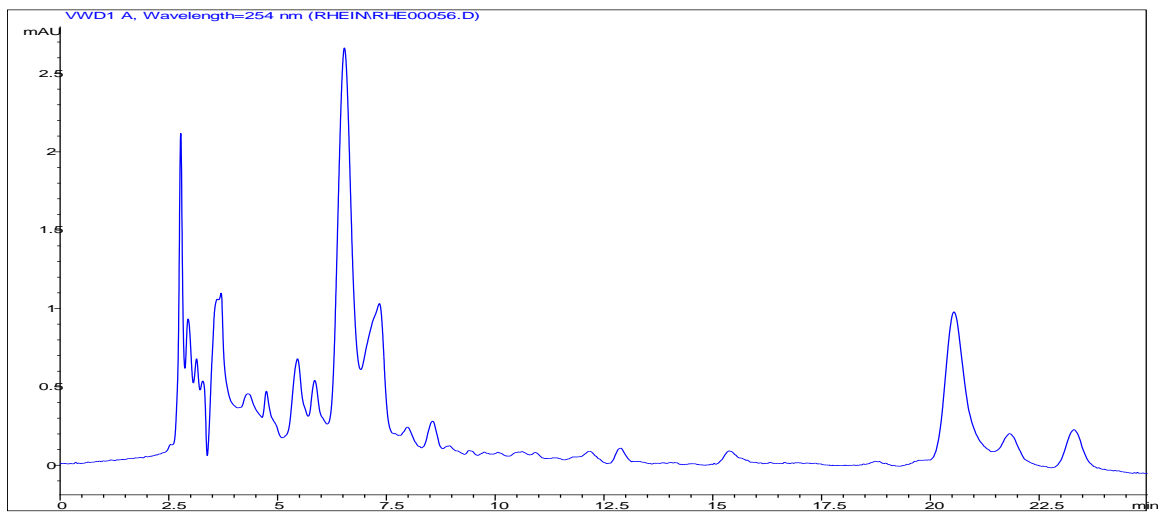
Коптис китайский



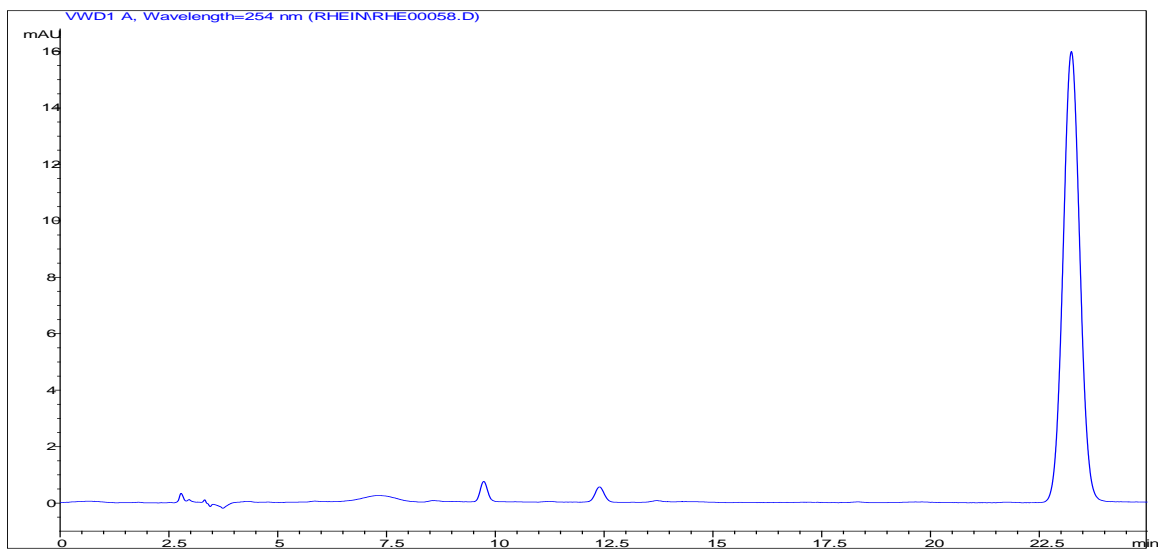
Корень солодки



Корень одуванчика

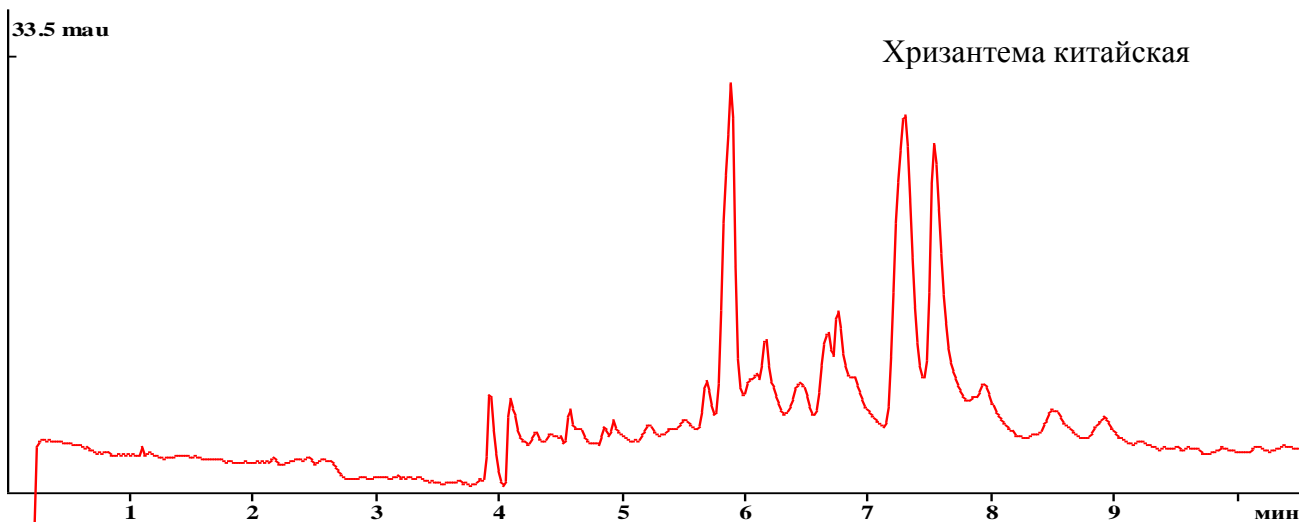
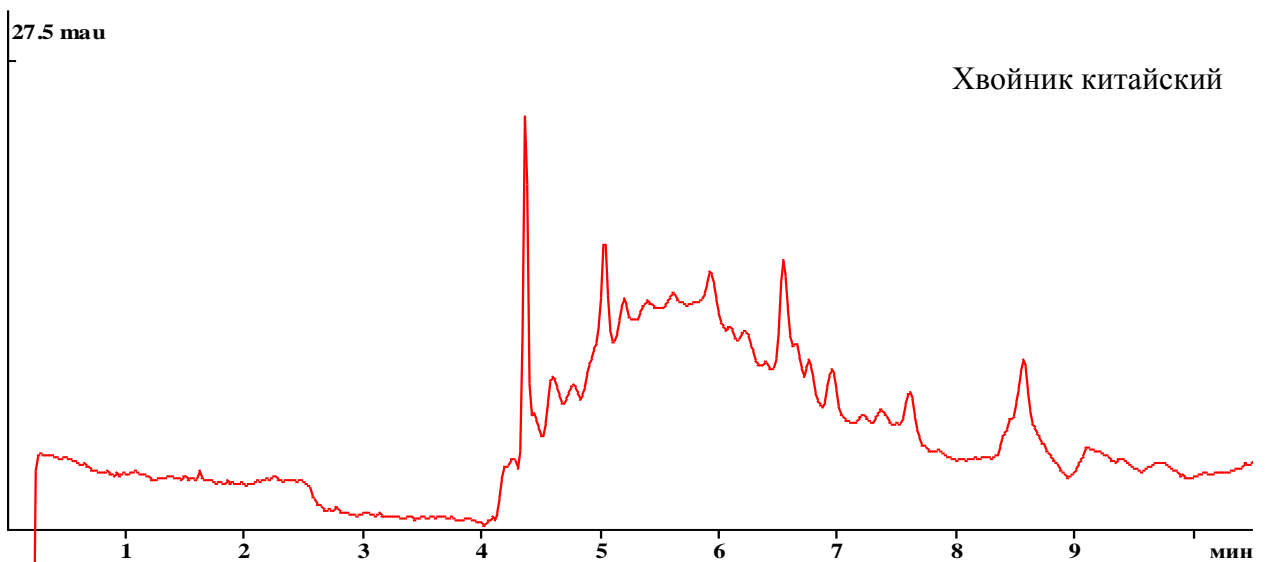
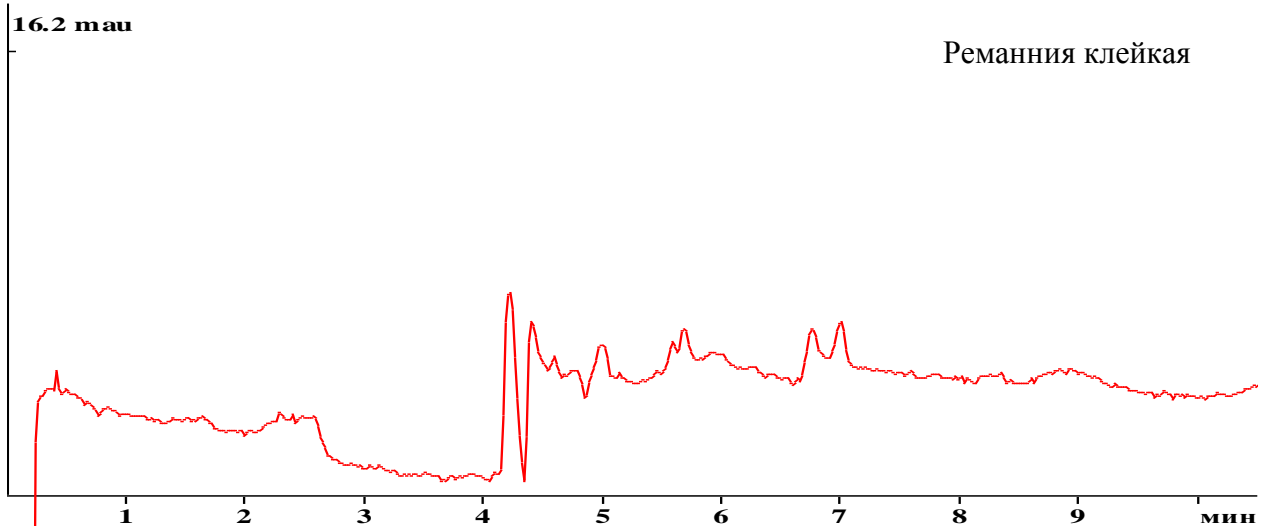


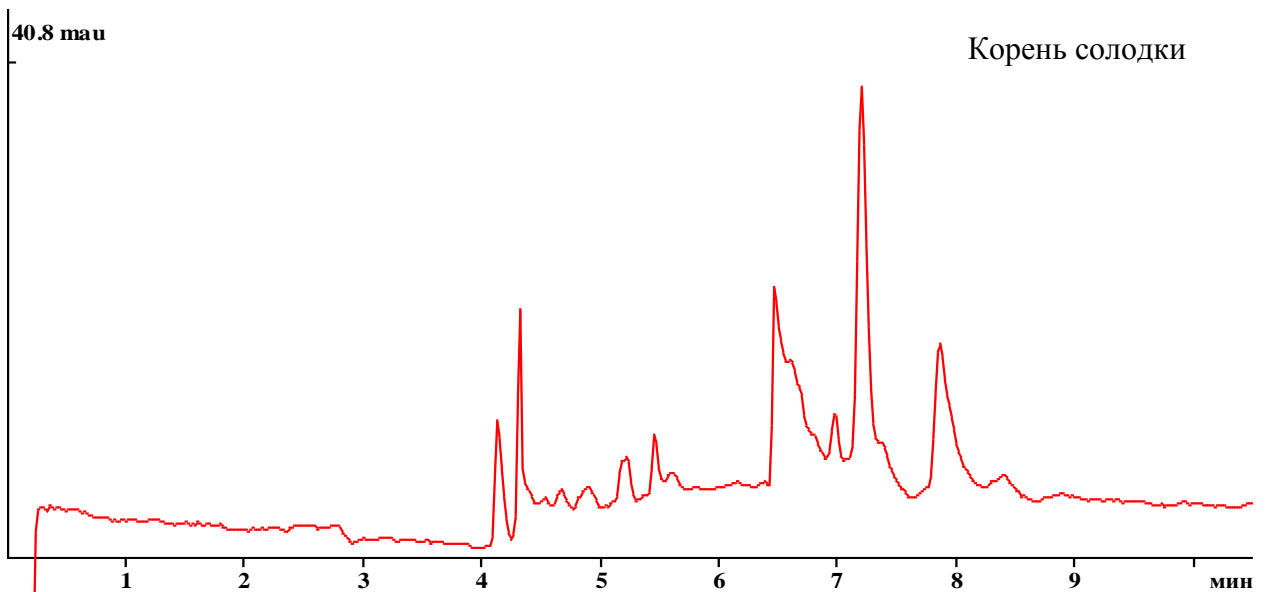
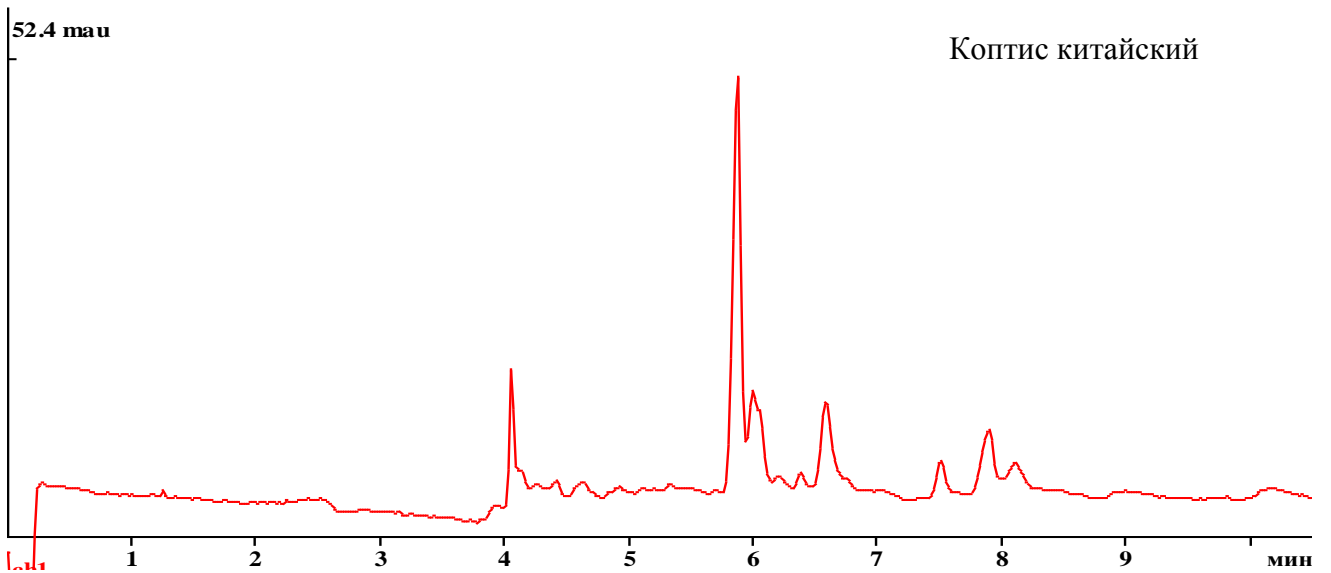
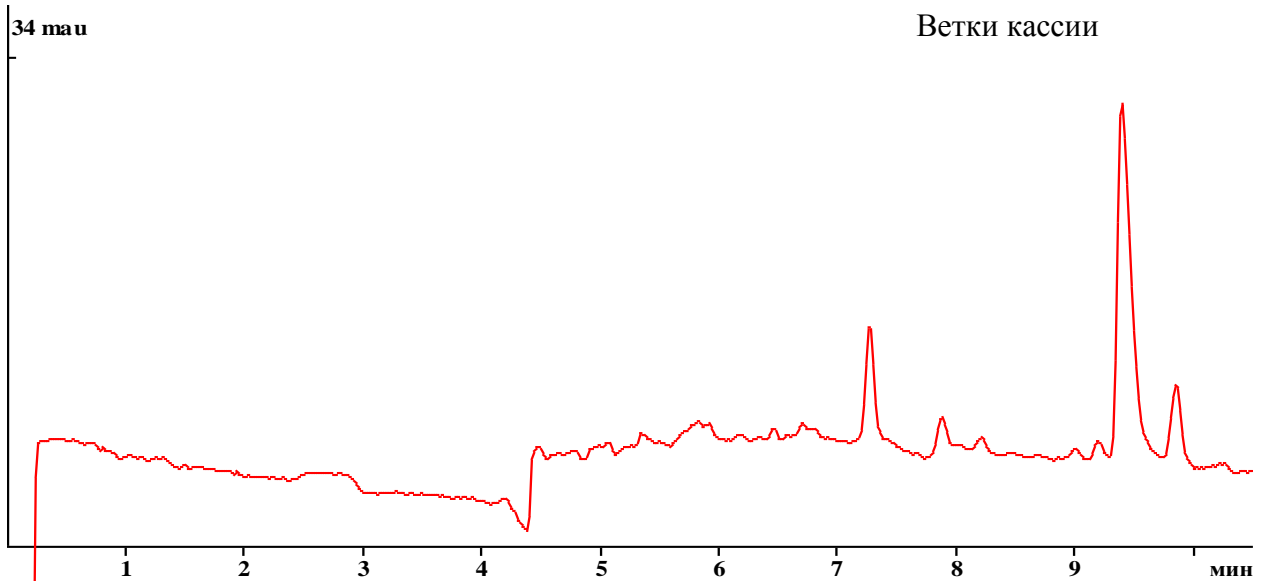
Семена горького абрикоса



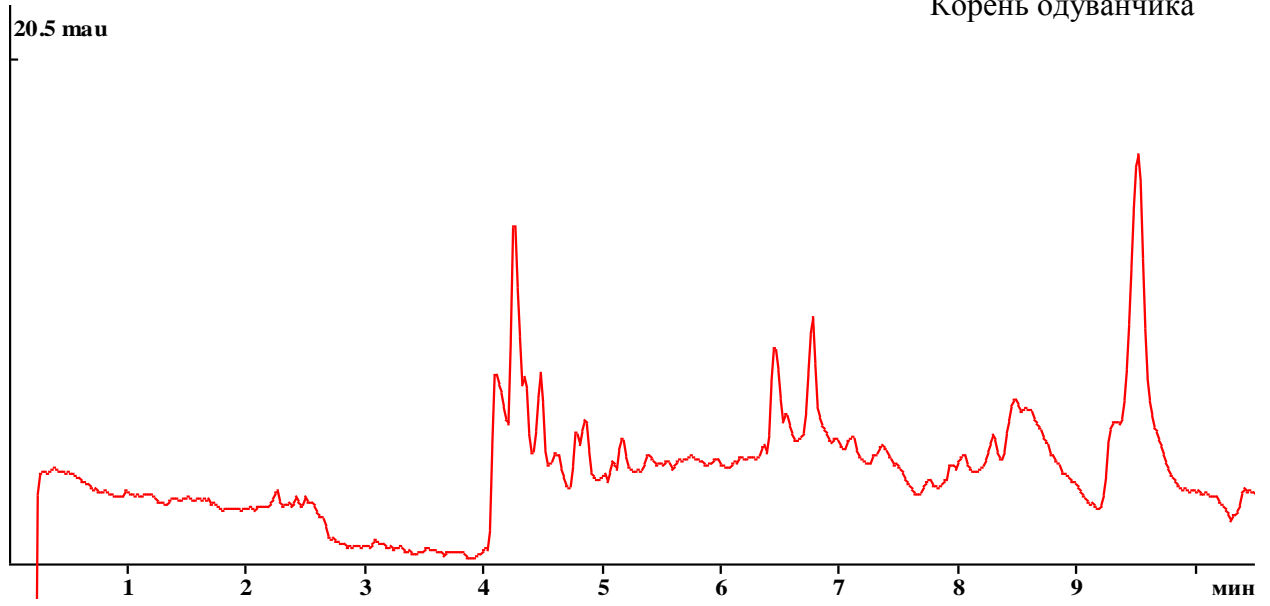
ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Электрофоретические профили лекарственных препаратов ТКМ

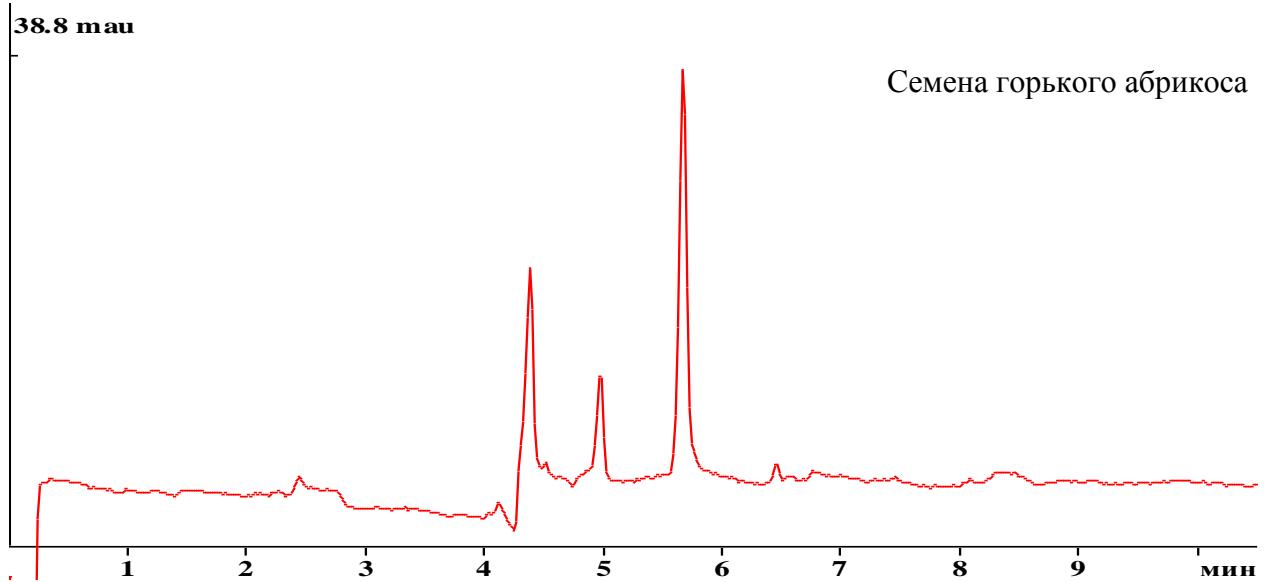




Корень одуванчика



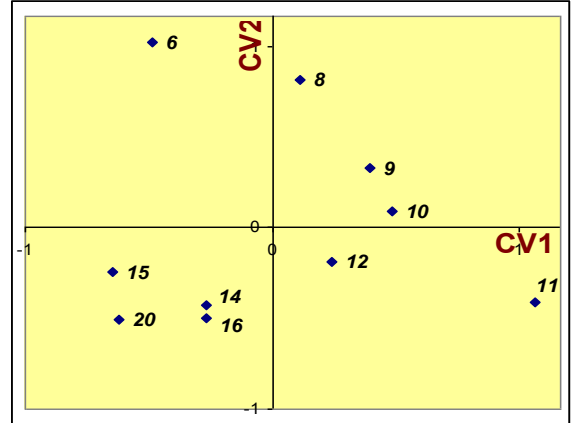
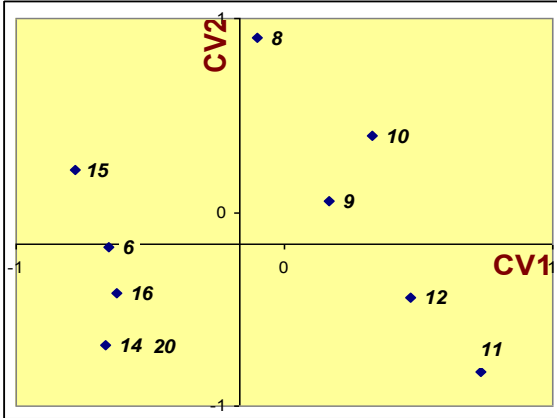
Семена горького абрикоса



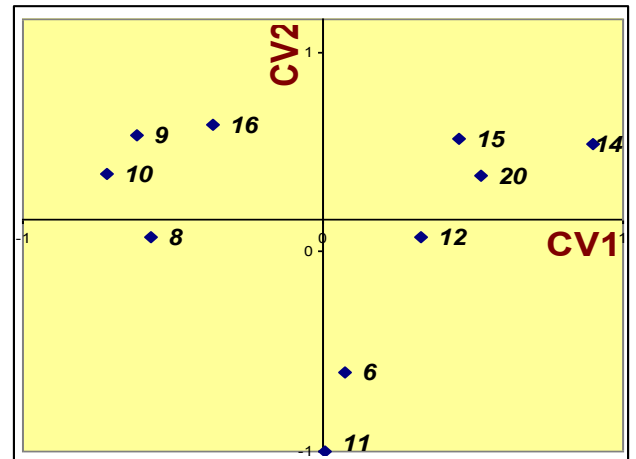
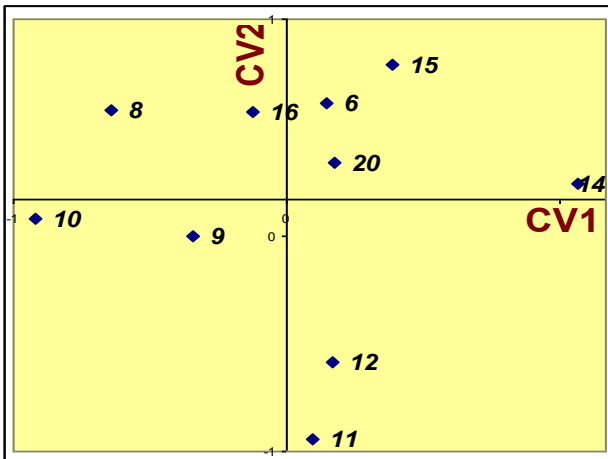
ПРИЛОЖЕНИЕ 5

Карты образцов, полученные при каноническом корреляционном анализе для образцов чая по матрицам счетов до 3 ГК:

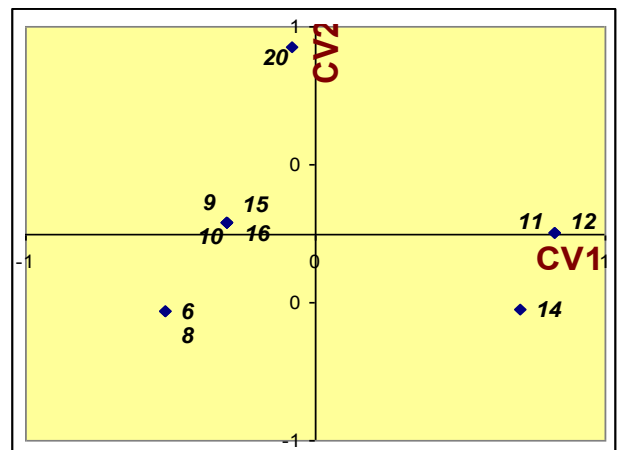
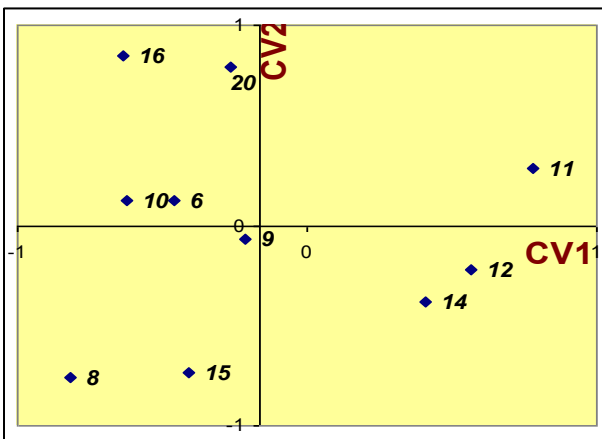
V и E (0.9382, 0.6568, 0.3223)



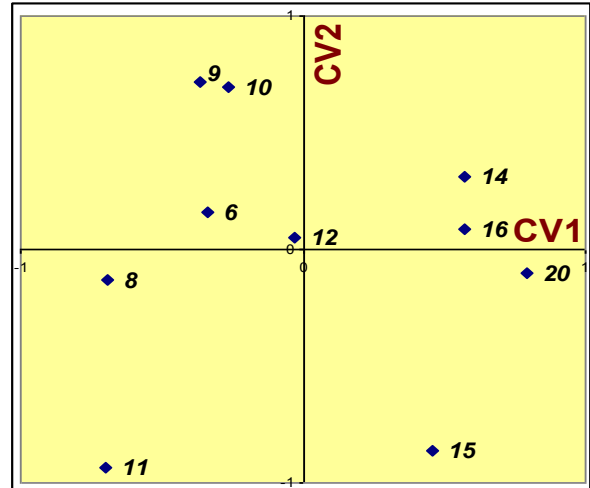
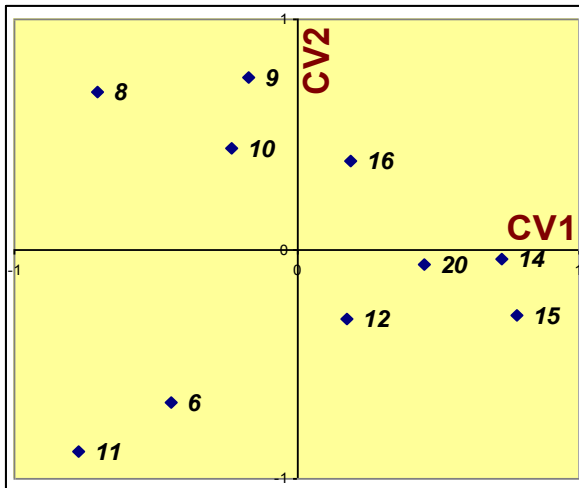
B и E (0.9317, 0.5016, 0.2774)



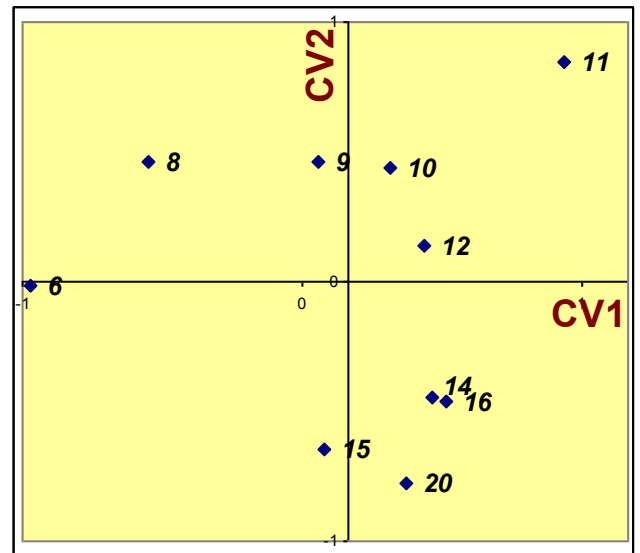
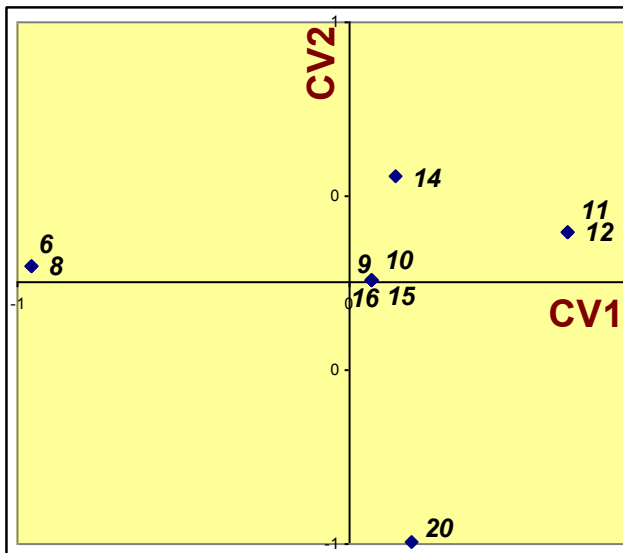
S и E (0.9579, 0.5939, 0.2853)



В и V (0.9116, 0.6219, 0.1252)



S и V (0.9240, 0.4349, 0.2165)



S и B (1.0000, 0.9819, 0.6695)

