

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «САРАТОВСКИЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

на правах рукописи

Маркин Алексей Викторович

**РАЗВИТИЕ СПЕКТРОСКОПИИ ГИГАНТСКОГО
КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ В
БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ЧЕЛОВЕКА**

1.4.2. Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
доктора химических наук

Саратов 2026

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений и обозначений	5
Введение	8
Глава 1. Возможности и ограничения ГКР при определении лекарственных веществ в биожидкостях человека: критический анализ литературы	17
1.1. Прямой и косвенный ГКР-анализ	17
1.2. Конкурентные взаимодействия за ГКР-активные центры в случае прямого ГКР-анализа	19
1.3. Уменьшение конкурентных взаимодействий и повышение селективности	21
1.4. Методики ГКР-анализа лекарственных веществ в биожидкостях человека	23
Глава 2. Спектроскопия ГКР структурно родственных антибиотиков	28
2.1. Перспективы использования структурной родственности в ГКР-анализе	28
2.2. ГКР-подложка и проведение ГКР-измерений	31
2.3. ГКР-спектры сульфаниламидных антибиотиков	33
2.4. ГКР-спектры фторхинолоновых антибиотиков	40
2.5. ГКР-спектры цефалоспориновых антибиотиков	46
Глава 3. Маскирование, разделение и концентрирование при ГКР-определении антибиотиков в биожидкостях человека	52
3.1. ГКР-исследование биожидкостей человека: особенности и собственный ГКР-сигнал	52
3.2. Совмещение ГКР-анализа с колоночной неудерживающей ТФЭ на силикагеле для определения цефалоспориновых антибиотиков	60
3.3. Совмещение ГКР-анализа с неудерживающей ТФЭ на геле гидроксида алюминия для определения цефалоспориновых антибиотиков	65

3.4. Совмещение ГКР-анализа с ЖЖЭ для определения сульфаниламидных антибиотиков	75
3.5. Совмещение ГКР-анализа с ТСХ для детектирования фторхинолоновых антибиотиков	81
3.6. Использование полидиаллилдиметиламмоний хлорида для маскирования в ГКР-анализе	85
<hr/>	
Глава 4. ГКР-активные сорбенты для проведения ТФЭ-ГКР-анализа	116
4.1. Общие сведения об особенностях и применении ГКР-активных сорбентов	116
4.2. Силикагель со встроенными серебряными наночастицами	122
4.3. Оксид алюминия со встроенными серебряными наночастицами	134
4.4. Микросферы карбоната кальция со встроенными серебряными наночастицами	140
4.5. Определение лекарственных веществ в моче с использованием ГКР-активных сорбентов	147
<hr/>	
Глава 5. Серебряные наночастицы, модифицированных циклодекстринами, для ГКР-определения лекарственных веществ в биожидкостях человека	164
5.1. Актуальность применения циклодекстринов в ГКР-анализе	164
5.2. Синтез и исследование серебряных наночастиц, модифицированных циклодекстринами	177
5.3. Влияние циклодекстринов на полезный и фоновый аналитический ГКР-сигнал	184
5.4. Методики ГКР-определения лекарственных веществ в биожидкостях человека	192
<hr/>	
Глава 6. Теоретическое изучение и варианты использования в анализе медных ГКР-подложек	207
6.1. Общие сведения о ГКР-подложках на основе меди	207
6.2. Теоретическое изучение поглощения света кластерами меди в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах длин волн	226

6.3. ГКР-анализ с использованием медных наночастиц	250
6.4. Увеличение химической стабильности медных ГКР-подложек путём создания композитных материалов	263
6.5. Спектроэлектрохимический анализ с использованием медных ГКР-активных электродов	278
<hr/>	
Заключение	299
<hr/>	
Выводы	301
<hr/>	
Список литературы	304
<hr/>	

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

c_{lim} – предел определения

c_{min} – предел обнаружения

s_r – относительное стандартное отклонение

Al_2O_3 -СНЧ – Al_2O_3 со встроенными серебряными наночастицами

$CaCO_3@Cu$ – микросферы $CaCO_3$ с покрытием на основе медных наночастиц

$CaCO_3$ -МНЧ / $CaCO_3$ -СНЧ – микросферы $CaCO_3$ со встроенными серебряными или медными наночастицами

SiO_2 -СНЧ – силикагель со встроенными серебряными наночастицами

АК – аскорбиновая кислота

АмТФ – 4-аминотиофенол

АЦН – ацетонитрил

БЖЧ – биологические жидкости человека

БИК – ближний ИК

БРБ – билирубин

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВЗМО – верхняя заполненная молекулярная орбиталь

ВЭ – вспомогательный электрод

ГГА – гель гидроксида алюминия

ГГА-МНЧ – ГГА со встроенными медными наночастицами

ГДД – гидродинамический диаметр

ГКР – гигантское комбинационное рассеяние света

ГП – гидроксипропильный

ДМ – дневная моча

ДОС – диффузное отражение света

ДРС – динамическое рассеяние света

ЗНЧ – золотые наночастицы

ИМ – искусственная моча

ИПС – изопропиловый спирт

КР – комбинационное рассеяние света

КРН – креатинин
КУ – коэффициент усиления
ЛВ – лекарственное вещество
ЛЕВО – левофлоксацин
ЛОМЕ – ломефлоксацин
МВ – микроволновый
МИП – молекулярно импринтированный полимер
МК – мочева кислота
МНЧ – медные наночастицы
МО – молекулярная орбиталь
МОКСИ – моксифлоксацин
МТК – метотрексат
МЭС – микроэлектрод сравнения
НВМО – нижняя вакантная молекулярная орбиталь
НОР – норфлоксацин
НТФП – нестационарная теория функционала плотности
НТФЭ – неударживающая ТФЭ
НЧ – наночастицы
НЭП – напряженность электрического поля
ОВ – окисление-восстановление
ПАУ – полиароматические углеводороды
ПДДА – полидиаллилдиметиламмоний хлорид
ПЕФЛ – пефлоксацин
ППР – поверхностный плазмонный резонанс
Прав. – правильность
ПСС – полистиролсульфонат натрия
ПЭИ – полиэтиленимин
Р6Ж – родамин 6Ж
РЭ – рабочий электрод
САА – сульфаниламидные антибиотики

СГ – сульфагуанидин
СДЗ – сульфадиазин
СДМ – сульфадиметоксин
СМЗ – сульфаметоксазол
СМК – стеклянный мультикапилляр
СНЧ – серебряные наночастицы
СР – структурно родственный
СТЗ – сульфатиазол
СЭМ – сканирующий электронный микроскоп
ТЛМ – терапевтический лекарственный мониторинг
ТЭОС – тетраэтилортосиликат
УБЛ – уробилиноиды
УЗ – ультразвуковой
УМ – утренняя моча
ФК – фолиевая кислота
ФС – Фотосенс
ФХА – фторхинолоновые антибиотики
ЦД – циклодекстрины
ЦД-SH – ЦД с тиольными группами
ЦЗЛ – цефазолин
ЦИПРО – ципрофлоксацин
ЦПР – цефоперазон
ЦРК – цефуроксим
ЦСА – цефалоспориновые антибиотики
ЦТК – цефотаксим
ЦТР – цефтриаксон
ЭДРС – энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия
ЭМ – электромагнитный
ЭХ – электрохимический

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Определение концентрации лекарственных веществ (ЛВ) в биологических жидкостях человека (БЖЧ) (в сыворотке или плазме крови, моче, слюне) является одним из инструментов персонализированной медицины, направленным на улучшение медикаментозной терапии, и в современной литературе носит название «терапевтический лекарственный мониторинг» (ТЛМ). Такой мониторинг необходим для достижения эффективного лечения пациентов и одновременного сведения к минимуму побочных эффектов, возникающих при применении ЛВ с узким терапевтическим диапазоном концентраций, например, противоопухолевых и противосудорожных препаратов. ТЛМ также проводят для некоторых антибиотиков, поскольку их нерациональное использование приводит к проявлению их токсического действия на организм пациентов, а также возникновению новых антибиотикорезистентных штаммов бактерий.

Несмотря на основной приоритет в точности анализа, большое значение для ТЛМ также играют сокращение времени анализа и простота его проведения. Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния света (ГКР) является одним из относительно новых аналитических методов, которые можно рассматривать как перспективный альтернативный метод для ТЛМ по сравнению со стандартными методами (ВЭЖХ-УФ и -МС и иммунохимическими). Спектроскопия ГКР основана на многократном увеличении интенсивности сигнала комбинационного рассеяния света (КР) молекул за счёт использования ГКР-подложек – плазмонных металлических наноструктур (чаще всего на основе серебра и золота), которые выступают в роли усилителей КР-сигнала молекул, адсорбированных на их поверхности.

Условно спектроскопию ГКР можно расположить между ВЭЖХ и иммунохимическими методами, поскольку (1) в сравнении с ВЭЖХ она проще в реализации и позволяет проводить количественный анализ в течение нескольких минут с использованием портативных КР-спектрометров и (2) в

отличие от иммунохимического анализа она более гибкая, поскольку многополосная структура ГКР-сигнала даёт больше информации о составе анализируемого объекта и позволяет устранить ложноположительные результаты, вызванные присутствием компонентов БЖЧ.

Однако, несмотря на то, что в последние годы наблюдается увеличение числа работ, связанных с применением ГКР для анализа БЖЧ, в общем масштабе число таких работ относительно невелико. Во-первых, это связано с низкой селективностью ГКР как метода анализа, поскольку происходит усиление КР-сигнала любых молекул, находящихся вблизи поверхности ГКР-подложки. Это приводит к затруднению или даже невозможности ГКР-определения молекул аналитов, которые слабее взаимодействуют с ГКР-подложкой по сравнению с прочими компонентами БЖЧ (экзо- и эндогенными) и/или имеют слабый ГКР-сигнал.

Во-вторых, в большинстве случаев проводятся экстенсивные работы, целью которых является увеличение чувствительности детектирования какого-либо одного аналита с преимущественным акцентом на разработку всё более сложных ГКР-подложек. В результате возникает большое многообразие ГКР-подложек и методик анализа, пригодных для определения только одного конкретного аналита, которые очень сложно верифицировать и стандартизировать. При этом вопросы селективности и действительной обоснованности высокой чувствительности опускаются, в то время как многие ЛВ необходимо определять при достаточно высоких концентрациях, но в условии присутствия большого числа мешающих веществ.

В-третьих, значительная часть работ по проведению ТЛМ с помощью ГКР имеет существенные методологические недостатки, снижающие ценность полученных результатов: (1) использование упрощённых объектов анализа (искусственные БЖЧ с сильно упрощённым составом) и (2) отсутствие учёта изменчивости состава БЖЧ, например, от человека к человеку или в зависимости от времени сбора образцов (особенно критично в случае слюны и мочи). В итоге, такие методики не обладают достаточной

селективностью и точностью анализа при реальных соотношениях «аналит / эндогенные компоненты», существующих в БЖЧ.

К сожалению, вышеперечисленные недостатки опубликованных работ сильно замедляют темпы внедрения ГКР-спектроскопии в клинический анализ БЖЧ в общем и ТЛМ в частности.

В связи с этим **цель работы** состоит в развитии спектроскопии ГКР как инструмента для определения лекарственных веществ в реальных образцах биологических жидкостей человека путём разработки подходов для улучшения селективности и чувствительности прямого ГКР-анализа.

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

- изучить факторы, влияющие на интенсивность и профиль ГКР-спектров структурно родственных (СР) ЛВ (на примере антибиотиков различных классов), для создания более универсальных методик анализа, пригодных для определения разных представителей СР ЛВ;
- разработать методики ГКР-определения СР антибиотиков в БЖЧ с дополнительным использованием маскирования и методов разделения и концентрирования;
- разработать композитные ГКР-подложки на основе пористых неорганических сорбентов со встроенными наночастицами (НЧ) металлов (ГКР-активные сорбенты) для создания методик определения ЛВ в моче путём совмещения твёрдофазного концентрирования и ГКР-детектирования с использованием одного материала;
- изучить селективность и усиливающие свойства ГКР-подложек, модифицированных циклодекстринами (ЦД), с целью разработки методик определения ЛВ в БЖЧ;

– изучить возможности, ограничения и особенности применения в анализе ГКР-подложек на основе медных наноструктур для снижения себестоимости и увеличения доступности ТЛМ на основе ГКР.

Научная новизна работы

Впервые проведёно сопоставление ГКР-сигнала СР антибиотиков друг с другом и осуществлен анализ сходств и различий спектральных профилей. Показана важность изучения спектральных профилей с использованием химического механизма усиления КР-сигнала, т.е. обязательного учёта свойств именно анализируемых молекул (КР-активности и электроноакцепторных свойств разных фрагментов в молекулах), а не только плазмонных свойств ГКР-подложки. Показано, что (де)протонирование молекул аналитов (рН среды) оказывает ключевое влияние на генерацию спектрально схожего ГКР-сигнала таких аналитов.

Предложен новый подход к увеличению селективности ГКР-определения ЛВ в БЖЧ, основанный на маскировании эндогенных компонентов БЖЧ с помощью катионного полиэлектролита полидиаллилдиметиламмоний хлорида (ПДДА). Согласно проведённым квантовохимическим расчётам данный подход реализуется благодаря способности ПДДА предотвращать адсорбцию мешающих компонентов на ГКР-подложке либо за счёт образования прочных комплексов с данными компонентами (в нейтральной и щелочной среде), либо за счёт стерических ограничений и/или электростатического отталкивания от поверхности подложки, покрытой ПДДА (в кислых средах).

Предложены новые ГКР-активные сорбенты для осуществления концентрирования аналитов на матрицах сорбентов различной природы и регистрации ГКР-спектров непосредственно с ГКР-активного сорбента или после растворения матрицы сорбента. Впервые предложено использовать растворение матрицы сорбента для увеличения чувствительности анализа за счёт высвобождения ГКР-подложки и анализируемых молекул.

Показано значительное улучшение селективности и чувствительности ГКР-определения ЛВ в реальных образцах БЖЧ при модификации поверхности ГКР-подложки (НЧ серебра) с помощью молекул ЦД, что достигнуто благодаря способности ЦД к усилению взаимодействия с электронейтральными слабополярными частями молекул ЛВ (или целыми молекулами) и ингибированию взаимодействия с полярными заряженными молекулами эндогенных компонентов БЖЧ.

Результатами экспериментов по сравнению усиливающей способности медных, серебряных и золотых НЧ, а также квантовохимического изучения оптических свойств медных кластеров опровергнуто широко распространенное утверждение о крайне слабой усиливающей способности медных ГКР-подложек, которое ошибочно возникло из-за особенностей оптических свойств медных наноструктур и их высокой реакционной способности. Дополнительно разработан подход по улучшению химической стабильности ГКР-подложек на основе медных наноструктур за счёт сильного замедления коррозии медных НЧ (МНЧ) при их встраивании в твёрдую матрицу, что впервые позволило получить медную ГКР-подложку, сохраняющую усиливающие свойства более 4 месяцев.

Практическая значимость работы

С использованием разработанных ГКР-подложек (ГКР-активные сорбенты, ЦД-модифицированные и медные подложки) и подходов по увеличению селективности прямого ГКР-анализа (маскирование эндогенных компонентов БЖЧ, совмещение с простыми методами разделения и концентрирования (неудерживающей ТФЭ (НТФЭ), ЖЖЭ, ТСХ)) разработаны методики ГКР-определения ЛВ (антибиотиков различных классов, противоопухолевого препарата метотрексата (МТК)) в БЖЧ (моча, плазма крови, слюна), продолжительность которых составила от 5 до 30 мин.

Путём маскирования мешающих компонентов добавлением к анализируемой пробе катионного полиэлектролита ПДДА впервые удалось

разработать методику поочерёдного ГКР-определения трёх аналитов при их совместном присутствии (в т.ч. избытке) в образце реальной мочи.

Разработаны простые и воспроизводимые методики синтеза нескольких ГКР-активных сорбентов на основе силикагеля, оксида/гидроксида алюминия и карбоната кальция. Использование данных сорбентов в ГКР-анализе ЛВ позволило: (1) увеличить чувствительность анализа за счёт концентрирования молекул аналита; (2) улучшить селективность за счёт подбора материала сорбента и его модификатора, более аффинного к целевому аналиту; (3) повысить химическую стабильность и время хранения ГКР-активного элемента (НЧ металлов), что особенно актуально в случае использования МНЧ; (4) сократить время анализа благодаря исключению этапа элюирования из методики анализа.

Созданы медные ГКР-подложки с увеличенным сроком хранения и усиливающими свойствами, сопоставимы с таковыми для серебряных и золотых подложек, т.е. обеспечивающими сопоставимую чувствительность анализа. Разработана электрохимическая (ЭХ) ячейка для проведения спектроэлектрохимического ГКР-анализа, позволяющая получать и регенерировать ГКР-активную поверхность медного электрода ЭХ методами и проводить многократное ГКР-детектирование антибиотиков в моче при определенном потенциале поляризации медного электрода. В общем, замена ГКР-подложек на основе благородных металлов на медные подложки снижает стоимость и увеличивает доступность ГКР-анализа, а также ускоряет его внедрение в практику.

Наконец, внедрение концепции структурной родственности для некоторых классов антибиотиков позволило существенно улучшить универсальность и производительность большинства разработанных методик ГКР-анализа, делая их пригодными для определения нескольких представителей ЛВ одного класса.

На защиту автор выносит:

- Закономерности формирования схожих и интенсивных ГКР-спектров некоторых СР антибиотиков. Применение концепции структурной родственности для некоторых классов антибиотиков с целью увеличения универсальности и производительности методик ГКР-анализа.
- Способы устранения конкурентных взаимодействий на поверхности ГКР-подложки и увеличения селективности методик прямого ГКР-определения СР антибиотиков в моче: маскирование эндогенных компонентов БЖЧ, а также физическое разделение молекул аналитов и мешающих компонентов экстрагированием или хроматографией. Методика поочерёдного ГКР-определения трёх существенно различающихся по структуре аналитов, одновременно присутствующих в образце мочи.
- Развитие подходов сочетания твёрдофазного концентрирования и ГКР-определения путём синтеза и использования ГКР-активных сорбентов на основе пористых неорганических материалов со встроенными НЧ металлов с целью повышения чувствительности и селективности анализа. Методики детектирования ЛВ в моче с использованием данных сорбентов.
- Закономерности взаимодействия ЦД-модифицированных ГКР-подложек с аналитами и эндогенными компонентами БЖЧ, позволяющие увеличить селективность ГКР-анализа и упростить пробоподготовку образцов БЖЧ. Методики определения некоторых ЛВ в БЖЧ с использованием ГКР-подложки, модифицированной молекулами β -ЦД.
- Способы достижения эффективного усиления КР-сигнала медными ГКР-подложками. Подходы по нивелированию отрицательного влияния низкой химической стабильности медных ГКР-подложек на точность ГКР-анализа: использование свежеприготовленных МНЧ, встраивание МНЧ с твёрдую матрицу, использование спектроэлектрохимического формата ГКР-анализа.

Личный вклад автора заключался в постановке задач, анализе и обобщении литературных данных, выполнении основных теоретических и экспериментальных работ по ключевым направлениям исследования,

обработке, обобщении и систематизации полученных результатов и формулировке выводов. Диссертационная работа представляет собой обобщение результатов исследований, полученных автором лично и совместно с соавторами публикаций.

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 24 статьи в журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов диссертаций.

Грантовая поддержка и апробация работы

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (№17-03-00537 «Синтез и исследование медных наноструктур для использования в химическом анализе», №20-33-70071 «Разработка высокочувствительных мультиплексных тест-систем биомаркеров воспаления на основе нового поколения люминесцентных и плазмонных наночастиц»), РНФ (№18-13-00081 «Системы для анализа биожидкостей на основе спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния света», №23-23-00236 «Создание универсальных подходов определения структурно-родственных антибиотиков методом спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния света»), а также гранта Германской службы академических обменов (DAAD) и Министерства образования и науки Российской Федерации (№16.12789.2018/12.2 «Применение спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния света в качестве метода детектирования в бумажных микрофлюидных системах»). В перечисленных грантах автор диссертации являлся руководителем.

За развитие научного направления автору присуждена молодёжная премия Научного совета РАН по аналитической химии (2019 г.), а также он награждён нагрудным знаком «Молодой ученый» (приказ Минобрнауки России от 7 июля 2023 г. №544 к/н).

Основные результаты диссертационной работы доложены на Международном симпозиуме по оптике и биофотонике (Саратов, 2016, 2018, 2020–2022, 2024, 2025), Школе-конференции с международным участием по

оптоэлектронике, фотонике и наноструктурам «Saint Petersburg OPEN» (Санкт-Петербург, 2018, 2019), Всероссийской научной школе-семинаре «Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине» (Саратов, 2018), IV Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» с международным участием (Краснодар, 2020), Всероссийской научной школе-семинаре «Взаимодействие сверхвысокочастотного, терагерцового и оптического излучения с полупроводниковыми микро- и наноструктурами, метаматериалами и биообъектами» (Саратов, 2020, 2022), XV Всероссийской интерактивной (с международным участием) конференции молодых ученых «Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии» (Саратов, 2021), IV Всероссийской конференции по аналитической спектроскопии с международным участием (Краснодар, 2023).

Структура и объём работы

Диссертация состоит из введения, шести глав, заключения, выводов и списка литературы, включающего 341 источник. Работа изложена на 341 странице текста, содержит 163 рисунка и 18 таблиц.

ГЛАВА 1. ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ ГКР ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ В БИОЖИДКОСТЯХ ЧЕЛОВЕКА: КРИТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Прямой и косвенный ГКР-анализ

Детектирование и количественное ГКР-определение аналитов может быть достигнуто двумя подходами (форматами): прямым и косвенным (рис. 1.1) [1,2]. При прямом детектировании аналитический сигнал представляет собой ГКР-спектр молекул аналита, адсорбированных на ГКР-подложке (рис. 1.1а). При косвенном детектировании регистрируют ГКР-спектр меток, которые селективно взаимодействуют с целевым аналитом посредством элемента распознавания (рис. 1.1б). ГКР-метки состоят из плазмонной наноструктуры (обычно это НЧ серебра или золота), модифицированной молекулами, обладающими интенсивным ГКР-сигналом (КР-маркер; чаще всего это красители или тиолированные ароматические молекулы), и молекулами-рецепторами (антитела, апрамеры и т.п.).

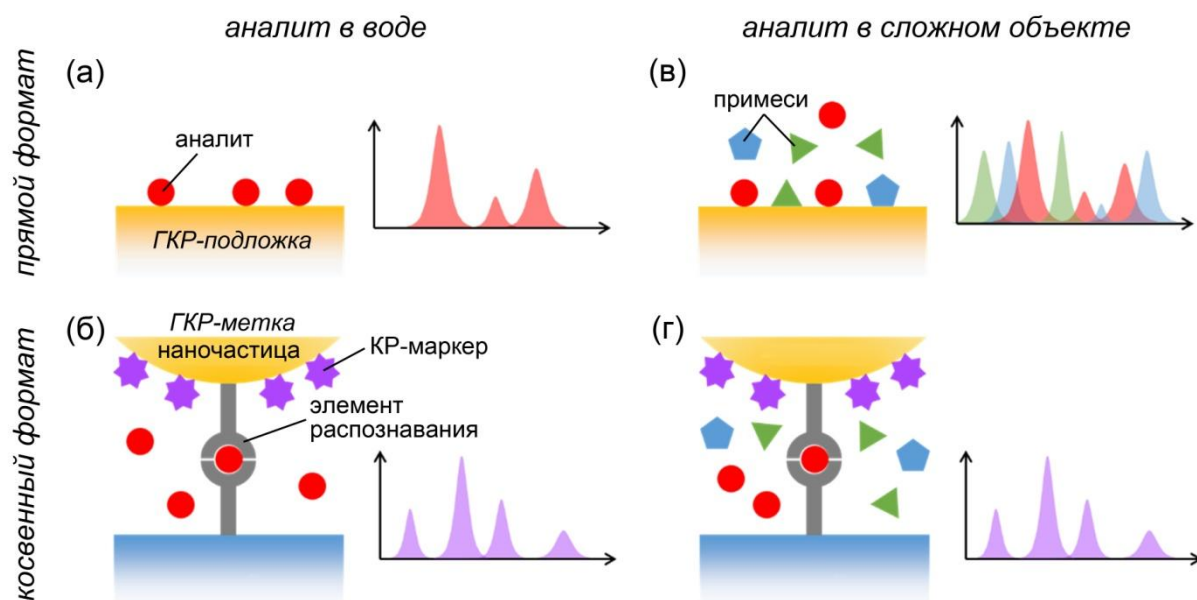


Рис. 1.1. Схематическое изображение подходов ГКР-анализа в объектах с простым и сложным составом.

В случае применения прямого подхода ГКР-анализа при изучении объектов со сложным составом (в т.ч. БЖЧ) на подложке могут

адсорбироваться не только молекулы аналита, но и другие компоненты анализируемого объекта. В итоге прямой формат ГКР-анализа обладает весьма ограниченной селективностью, поскольку ГКР-сигнал может содержать пики не только аналита, но и примесей, молекулы которых имеют высокое сродство к поверхности ГКР-подложки (рис. 1.1в). Тем временем, косвенный формат ГКР-анализа позволяет минимизировать (в идеале – исключить) влияние мешающих компонентов анализируемого объекта благодаря применению элементов распознавания (рис. 1.1г). Однако косвенный формат сохраняет те же недостатки, что и иммунохимические методы анализа, и дополнительно требует синтеза более сложных ГКР-меток. Также при косвенном подходе полностью теряется спектральная информация о целевом аналите. Наконец, чисто с научной точки зрения косвенный ГКР-анализ представляет гораздо меньший интерес для дальнейшего развития ГКР-спектроскопии, поскольку на данный момент это направление очень хорошо изучено и развито [3,4]. Столь сильный прогресс в косвенном ГКР-анализе обусловлен активным использованием наработок иммунохимического анализа, например, с использованием плазмонных и люминесцентных меток, которые имеют структуру очень схожую со структурой ГКР-меток. С другой стороны, такие аспекты прямого формата анализа как конкурентные взаимодействия на ГКР-активной поверхности, влияние рН на профили ГКР-спектров и селективность анализа, реализация механизма усиления на основе переноса заряда (химический механизм) и прочие, до сих пор недостаточно изучены, особенно с точки зрения практического применения в анализе сложных смесей. Именно поэтому в данной диссертационной работе прямой формат ГКР-анализа выбран в качестве основного.

1.2. Конкуренентные взаимодействия за ГКР-активные центры в случае прямого ГКР-анализа

Как показано в предыдущем разделе, ГКР-сигнал и в прямом, и в косвенном форматах отражает состав только молекулярного слоя, адсорбированного непосредственно на поверхности ГКР-активного материала (рис. 1.1). Следовательно, КР-сигнал любой молекулы, адсорбированной на ГКР-активной поверхности, будет усилен (включая нецелевые молекулы). Таким образом, в случае анализа сложных смесей (в т.ч. БЖЧ) всегда существует конкуренция компонентов смеси за адсорбцию на ГКР-активную поверхность, и степень конкуренции зависит от концентрации компонентов смеси и от сродства молекул компонентов к поверхности ГКР-подложки (т.е. силы взаимодействия между адсорбированными молекулами и ГКР-активной поверхностью). Рассмотрим варианты конкурентных взаимодействий на ГКР-активной поверхности при проведении прямого ГКР-анализа и их возможное влияние на аналитический сигнал.

В идеале молекулы целевого аналита должны (i) иметь высокое сродство к ГКР-подложке, (ii) иметь высокую активность колебаний в КР-спектрах (КР-активность) и (iii) находиться в более высокой концентрации относительно прочих компонентов смеси (примесей). В то же время молекулы примесей должны иметь противоположные характеристики. В этом случае не возникнет никаких трудностей в ГКР-детектировании и количественном определении аналита. Например, аналиты с тиольными группами способны к очень прочному связыванию с золотой и серебряной поверхностью ГКР-подложек, что упрощает разработку ГКР-методик для определения таких аналитов в объектах со сложным составом [5].

Если молекулы примесей имеют сродство к ГКР-подложке, которое сравнимо или выше такового для молекул аналита, ситуация начинает усложняться независимо от КР-активности молекул примесей. Возможные изменения аналитического ГКР-сигнала в этом случае обобщены на рис. 1.2;

предполагается, что молекулы аналита имеют высокую КР-активность, а их сродство к поверхности ГКР-подложки может быть как высоким, так и низким.

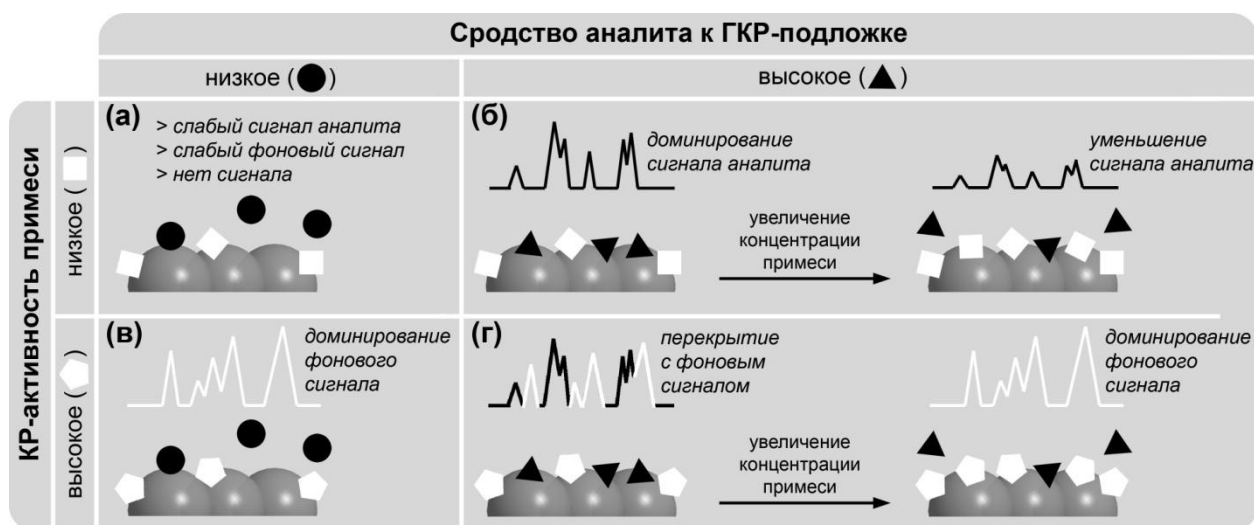


Рис. 1.2. Схематическое изображение возможных вариантов спектрального сигнала при прямом ГКР-анализе смесей, состоящих из (i) молекул аналита с высокой КР-активностью и разным сродством к поверхности ГКР-подложки и (ii) молекул примеси с разной КР-активностью и со сродством к ГКР-подложке, сопоставимым или выше такового для молекул аналита [6].

Если молекулы аналита имеют низкое сродство к ГКР-подложке, то примеси с высоким сродством обычно полностью подавляют сигнал аналита (рис. 1.2в), если только концентрация аналита не значительно выше концентрации примесей (на порядки). В результате, если влияние примесей не учитывать и тщательно не исследовать заранее, то отсутствие пиков аналита в полученном ГКР-сигнале может быть ошибочно интерпретировано как отсутствие или очень низкая концентрация аналита в образце, в то время как реальная концентрация аналита в смеси может быть высокой и значимой в контексте поставленной задачи анализа. Более того, поскольку примеси с низкой КР-активностью не генерируют значимый фоновый сигнал, их присутствие в смеси может привести к ошибочному заключению об отсутствии конкурентной адсорбции (рис. 1.2а), например, в случае неорганических ионов, мочевины и т.д.

Если молекулы примеси имеют сродство к ГКР-подложке, сравнимое или выше сродства молекул аналита, то присутствие примесей может либо (i) только снизить интенсивность аналитического сигнала (в случае примесей со слабым ГКР-сигналом) (рис. 1.2б), либо (ii) и снизить интенсивность аналитического сигнала, и сформировать интенсивный фоновый сигнал (в случае примесей с высокой КР-активностью) (рис. 1.2г). В результате такое влияние примесей на интенсивность аналитического и фонового сигналов часто проявляется в снижении точности и достоверности анализа, особенно при получении градуировочных графиков без учёта конкурентной адсорбции. Например, при ГКР-определении тиабендазола правильность снизилась с 98–102 до 82–87% при переходе от модельного раствора на основе фосфатно-солевого буфера к реальному объекту (яблочный сок) [7].

Важно отметить, что в реальных объектах со сложным составом (например, БЖЧ и продукты питания) обычно присутствует большое разнообразие примесей (включая другие аналиты) с различной КР-активностью и сродством к ГКР-подложке. Более того, концентрации примесей часто намного превышают концентрацию целевого аналита (иногда на порядки). Следовательно, предсказание появления конкурентных взаимодействий и выбор путей их преодоления является крайне сложной задачей, включающей в себя исследование каждой конкретной комбинации «аналит–примесь(и)». Однако конкурентные взаимодействия можно контролировать, влияя (i) на взаимодействие молекул аналита (примеси) с поверхностью ГКР-подложки и (ii) изменяя соотношение концентраций аналита и примесей.

1.3. Уменьшение конкурентных взаимодействий и повышение селективности

Для контроля и уменьшения конкурентных взаимодействий, а также повышения селективности ГКР-анализа сложных смесей (включая БЖЧ) чаще всего используют следующие подходы (в порядке увеличения

сложности осуществления): (1) разбавление [8], (2) корректировка рН [9], (3) удаление примесей путём фильтрации [10] или осаждения [11], (4) разделение аналита и молекул примесей с помощью экстракции или хроматографии [12–14]. Несмотря на то, что разбавление и изменение рН не подразумевают изменения соотношения компонентов смеси и физическое отделение целевого аналита от примесей, их использование способствует увеличению отношения «сигнал/шум». В случае разбавления это обусловлено снижением конкуренции за ГКР-активные центры за счёт (i) снижения абсолютной концентрации компонентов и (ii) увеличения роли разницы в сродстве компонентов к поверхности ГКР-подложки. В свою очередь, варьирование значения рН анализируемой смеси позволяет влиять на силу взаимодействия компонентов с поверхностью ГКР-подложки, что можно использовать как для усиления ГКР-сигнала целевого аналита, так и подавления сигнала примесей. Подробное рассмотрение этапов пробоподготовок и методов разделения, используемых в ГКР, можно найти в недавних обзорах [15,16].

Выбор варианта пробоподготовки образца зависит от сложности состава объекта и сродства компонентов смеси (аналитов и примесей) к ГКР-активной поверхности. Так, для смесей, содержащих аналит с высоким сродством (например, серосодержащие) и высокой концентрацией, чаще всего достаточно простейшей пробоподготовки образца (например, разбавление и корректировка рН). В дополнение к простым вариантам пробоподготовки, детектирование аналитов с умеренным (например, содержащими amino- и карбоксильные группы) или слабым (например, полиароматические углеводороды (ПАУ)) сродством к ГКР-подложке в образцах со сложным составом часто требует предварительного отделения аналита от примесей с использованием более длительных и трудоёмких вариантов пробоподготовки, таких как экстракция и хроматография. Определение подобных аналитов может быть также улучшено с использованием модифицированных ГКР-подложек, которые позволяют

одновременно отделять аналит от компонентов БЖЧ и/или концентрировать его и проводить ГКР-детектирование. В этом случае улучшение селективности анализа достигается за счёт модифицирующего слоя, способствующего разделению аналита и примесей согласно их размеру [17] и/или заряду [18], а также максимально увеличивающего взаимодействие поверхности ГКР-подложки с молекулами аналита и одновременно сводящего к минимуму взаимодействие с молекулами примесей.

1.4. Методики ГКР-анализа лекарственных веществ в биожидкостях человека

Таким образом, помимо важности ТЛМ для обеспечения высокой эффективности лечения, он является прекрасной областью для исследования потенциала (возможностей и ограничений) прямого ГКР-анализа, поскольку определение аналитов осуществляется в объектах сложного состава (БЖЧ), в которых реализуются различные варианты конкурентных взаимодействий между молекулами аналитов и эндо- и экзогенными компонентами БЖЧ за адсорбцию на ГКР-активную поверхность [1,19].

Методики ГКР-анализа для ТЛМ начали активно разрабатывать примерно с 2010х годов [16,19]. Однако число данных работ крайне мало по сравнению с общим числом работ, публикуемых по ГКР (особенно в случае анализа реальных БЖЧ), но и по ним можно сделать некоторые выводы. Во-первых, подавляющее большинство ГКР-методик использовали прямой подход регистрации сигнала с применением в качестве ГКР-подложек стандартных, наиболее простых в приготовлении серебряных или золотых коллоидных НЧ. Во-вторых, методики ГКР-определения ЛВ в БЖЧ разработаны для разных групп соединений, причём наибольшее число работ посвящено определению противоопухолевых ЛВ (42%) и антибиотиков (25%) [16], что полностью соответствует целям ТЛМ.

К достоинствам проанализированных методик ГКР-анализа можно отнести активное использование портативных переносных КР-спектрометров

(примерно в трети работ), что дополнительно демонстрирует возможность проведения экспрессного ГКР-анализа вне специализированных лабораторий.

Однако, к сожалению, значительная часть работ по проведению ТЛМ с помощью ГКР имеет существенные методологические недостатки, снижающие ценность полученных результатов. Так, примерно в 20% работ в качестве образцов для исследования использовали сильно разбавленные образцы БЖЧ чистой водой или буфером перед искусственным добавлением аналита. При этом данное разбавление в дальнейшем не учитывали в аналитических характеристиках методик, что приводило к существенной переоценке чувствительности методик анализа. Также использование такого приема явно свидетельствует о недостаточной селективности предложенных методик при реальных соотношениях «аналит / эндогенные компоненты», существующих в БЖЧ.

Также более чем в половине работ использовали только один образец БЖЧ или вообще не предоставляли данные о числе использованных образцов. Данный факт ставит под сомнение точность полученных результатов, поскольку в этих случаях не учитывалась вариативность состава БЖЧ, например, от человека к человеку или в зависимости от времени сбора образцов (что особенно важно, например, в случае образцов мочи и слюны).

Наконец, часто при проверке селективности методики анализа относительно каких-либо конкретных примесей (например, креатинина (КРН) или мочевой кислоты (МК)) используют некорректные соотношения «аналит/примесь». Так, крайне распространенной ошибкой является использование соотношения 1:1, в то время как реальные соотношения могут быть совершенно другими (например, 1:100).

Другим важным моментом, выявленным при оценке аналитической эффективности методик ГКР-анализа, является не вполне корректная обработка результатов анализа. Этот факт затрудняет сравнение эффективности различных методик, использованных для определения одного

и того же анализа. Например, только в половине исследований построены градуировочные графики и корректно рассчитаны значения пределов обнаружения [16]. Также вместо предела обнаружения, рассчитанного согласно рекомендациям ИЮПАК, часто используются значения минимальной концентрации на градуировочном графике без учёта погрешности измерения сигнала.

Тем не менее, существующие примеры корректных методик ГКР-определения ЛВ (в том числе с учётом вариативности состава БЖЧ) [8,11,20–23] показывают принципиальную возможность нивелирования отрицательного влияния сложного состава БЖЧ на точность и достоверность прямого ГКР-анализа. Более того, несмотря на трудности с селективностью, наличие информации о потребляемых в ходе терапии ЛВ радикально упрощает использование прямого ГКР-подхода в ТЛМ, делая ненужным этап идентификации. Более того, цель ТЛМ состоит в том, чтобы выяснить, находится ли концентрация препарата в БЖЧ в пределах определенного диапазона (терапевтическое окно концентраций) или нет [24]. Причём данные диапазоны терапевтических концентраций известны из фармакокинетических исследований и зависят только от свойств конкретных ЛВ. Это приводит к тому, что зачастую нет необходимости в чрезвычайно высокой чувствительности методики ГКР-анализа (например, уровни нМ или фМ), поскольку концентрации препаратов в терапевтических диапазонах обычно довольно высоки (от мкМ до нескольких мМ). Также, именно терапевтическое окно концентраций определяет границы линейного диапазона градуировочной зависимости методики.

Кроме того эндогенные компоненты БЖЧ (т.е. примеси) и их нормальные диапазоны концентраций обычно хорошо известны, и эту информацию также можно эффективно использовать в ходе предварительных исследований селективности анализа и оптимизации условий детектирования. Так, наилучшей практикой при ГКР-исследовании биообразцов является сбор как можно большего числа контрольных ГКР-

спектров и при различных условиях регистрации: самой ГКР-подложки, целевого аналита, всех доступных компонентов биобразца. Это облегчит спектральную интерпретацию и идентификацию ложных/фоновых ГКР-пиков. К сожалению, концентрации эндогенных компонентов БЖЧ значительно превышают содержание ЛВ (на порядок и более), поэтому влияние компонентов БЖЧ следует изучать при уровнях концентраций, соответствующих таковым в реальных объектах для адекватной проверки селективности методики.

Схематическое изображение этапов ТЛМ на основе ГКР и некоторая ключевая информация представлены на рис. 1.3. Наконец, ключевыми требованиями к ГКР-методикам проведения ТЛМ являются максимальная скорость, простота и надёжность анализа, что будет способствовать внедрению ГКР как аналитического инструмента в клинические лаборатории и повысит эффективность лечения [19,24].

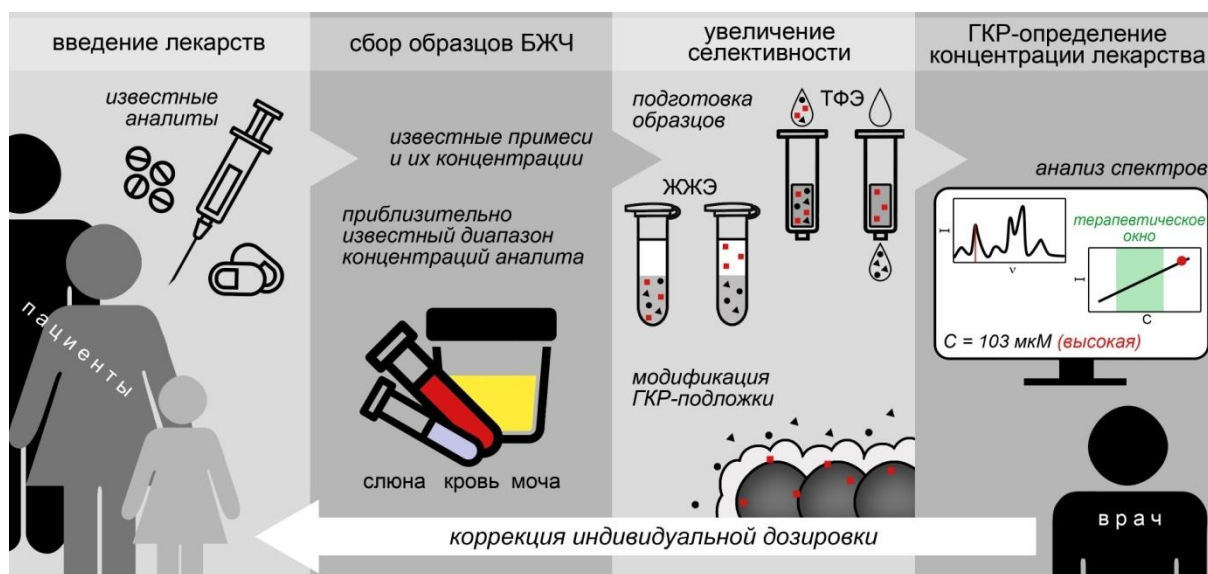


Рис. 1.3. Применение ГКР-анализа в ТЛМ [1].

* * *

Согласно проведённому анализу литературы прямой формат ГКР-анализа является наиболее перспективным с точки зрения дальнейшего развития ГКР-анализа в целом. Также показано, что важно изучать, учитывать и по возможности устранять возникающие конкурентные

взаимодействия за ГКР-активные центры на поверхности ГКР-подложек при определении аналитов в БЖЧ при проведении ТЛМ.

Проведённый обобщающий анализ методик ГКР-анализа, предлагаемых для использования в ТЛМ, (i) позволил выявить основные требования к данным методикам и наиболее частые ошибки, совершаемые при их разработке, и (ii) показал недостаточное число работ, в которых использовали реальные образцы БЖЧ и проводили учёт и устранение влияния эндогенных компонентов БЖЧ на аналитический сигнал.

Данные, представленные в главе, опубликованы в работах [1,2,6,16].

ГЛАВА 2. СПЕКТРОСКОПИЯ ГКР СТРУКТУРНО РОДСТВЕННЫХ АНТИБИОТИКОВ

2.1. Перспективы использования структурной родственности в ГКР-анализе

Согласно анализу литературы, большинство предложенных к настоящему времени методик ГКР-анализа направлены на определение только одного аналита и на оптимизацию условий регистрации только под этот конкретный аналит [16]. Более того, в исследованиях часто уделяют слишком много внимания разработке новых и зачастую необоснованно сложных ГКР-подложек с целью максимизации чувствительности анализа, игнорируя другие важные параметры методик анализа сложных объектов, такие как простота, скорость и селективность. В результате возникло большое многообразие ГКР-подложек и методик анализа (до сих пор продолжающее расти), пригодных для определения только одного конкретного аналита в одном конкретном объекте. Всё это затрудняет стандартизацию и валидацию ГКР-анализа и, как следствие, дополнительно мешает внедрению данного метода в практику [19].

С другой стороны, аналиты с высоким структурным сходством (например, ЛВ одного класса) позволяют упростить методику анализа и максимально увеличить её универсальность, поскольку такое сходство часто приводит к схожим химическим и спектральным свойствам таких аналитов. Очевидно, что универсальную методику пробоподготовки образца легче разработать для структурно родственных (СР) соединений, чем для соединений со значительно различающейся структурой.

Более того, хотя ГКР-спектры больших молекул имеют сложный профиль с множеством пиков разной интенсивности, аналиты с высоким структурным сходством КР-активных фрагментов также могут иметь значительное сходство спектральных профилей (более одного пика) [25,26]. Этот факт может быть полезен для аналитических приложений ГКР,

поскольку он (i) позволяет разрабатывать более универсальные методики анализа, подходящие для определения СР аналитов, и (ii) облегчает идентификацию и классификацию новых аналитов, если они принадлежат к ранее изученным группам СР соединений.

К сожалению, на данный момент ГКР-анализ СР аналитов и аналитов со схожими спектральными профилями является неразвитым направлением. Так, анализ литературы показал, что существует лишь несколько примеров ГКР-методик, обладающих высокой универсальностью и позволяющих обнаруживать и определять СР аналиты (в том числе со схожими спектральными профилями) в БЖЧ [27–29]. Более того, исследователи в области ГКР очень часто рассматривают сходство спектральных профилей скорее как проблему и поэтому сосредотачиваются на поиске путей её решения, например, с помощью поиска уникальных ГКР-пигов (например, для бензодиазепинов [27,29]), обработки спектров с помощью методов хемометрики (например, для фторхинолонов [30] и пенициллинов [25]), а также использования разделения аналитов в процессе пробоподготовки образцов (например, для метаболитов никотина [28]). С другой стороны, иногда точная идентификация аналита не является необходимой, например, анализ БЖЧ на наркотики часто требует только идентификации класса наркотиков, поскольку физиологические эффекты представителей одного класса наркотиков схожи [26]. Помимо биомедицинского анализа, потенциальные преимущества ГКР-определения СР аналитов со схожими спектральными профилями также не были исследованы и в других областях, таких как определение загрязнителей окружающей среды (пестицидов, ПАУ и т.д.) [31,32]. В этом случае генерация одинаковых ГКР-спектров позволила бы проводить более общее, класс-специфичное определение загрязнителей, что было бы более целесообразным для рутинного экспресс-анализа.

Однако структурная родственность далеко не всегда способствует упрощению и повышению универсальности ГКР-анализа, а также возникновению спектрального сходства. Это связано с высокой

вариабельностью строения заместителей у различных представителей одного класса соединений, которые могут сильнее взаимодействовать с ГКР-подложкой, по сравнению со СР частью, а также обладать большей КР-активностью. В итоге изменения в таких функциональных группах могут изменять ориентацию и степень адсорбции СР аналитов на поверхности ГКР-подложки, что, в свою очередь, может повлиять на интенсивность и профиль ГКР-спектра, приводя к необходимости существенной корректировки методики анализа под каждый конкретный аналит.

На данный момент в ГКР выделяют два основных механизма усиления КР-сигнала: электромагнитный (ЭМ) и химический [33]. ЭМ механизм преимущественно связан с оптическими (плазмонными) свойствами ГКР-подложки, зависящими от её материала и формы. Химический же механизм усиления рассматривает комплекс «ГКР-подложка – аналит» как единое целое, в том числе учитывая возможность перехода электронов от подложки к молекулам, адсорбированным на её поверхности, после возбуждения поверхностного плазмонного резонанса (ППР). При этом изучение СР аналитов как правило подразумевает использование одной и той же ГКР-подложки, приводя к тому, что вклад в усиление ЭМ механизма остаётся постоянным для всех СР представителей. Поэтому интерпретацию таких эффектов как возникновение схожести ГКР-спектров и зависимость спектральных профилей от рН логичнее проводить именно с точки зрения химического механизма усиления. Так, согласно данному механизму, структура ГКР-сигнала напрямую зависит от (1) электронного строения (поляризуемости связей) молекул аналита, (2) электронодонорных свойств материала ГКР-подложки и электроноакцепторной способности молекул аналита (определяет вероятность осуществления переноса заряда от подложки к молекуле), (3) способа связывания (через какие функциональные группы аналита и поверхности ГКР-подложки) и силы взаимодействия (т.е. силы адсорбции) ГКР-подложки с молекулой.

Примечательно, что управление всеми перечисленными параметрами может быть в той или иной мере осуществлено путём изменения значения рН, поскольку (де)протонирование приводит и к изменению механизма и силы адсорбции, и к изменению активности КР-пиков, и к уменьшению (увеличению) электроноакцепторных свойств молекул. Поэтому для изменения профилей ГКР-спектров СР антибиотиков и изучения условий формирования сходных спектральных профилей в первую очередь в диссертационной работе использовали корректировку значения рН.

Таким образом, разработка методик ГКР-анализа с учётом структурной родственности аналитов является актуальным и перспективным направлением. Поэтому данный раздел диссертации посвящен поиску и изучению условий, при которых СР антибиотики продуцируют интенсивные и схожие по профилю ГКР-спектры и появляется возможность создавать наиболее универсальные методики ГКР-анализа. Дополнительно, для облегчения интерпретации полученных результатов проводили изучение электронного строения молекул СР аналитов в нейтральном и (де)протонированном состояниях с помощью методов квантовой химии.

В качестве основных объектов выбрали представителей трёх классов антибиотиков: сульфаниламидные (САА), фторхинолоновые (ФХА) и цефалоспориновые (ЦСА). Данные классы выбраны специально, поскольку у ФХА высокой КР-активностью обладает преимущественно СР фрагмент, у ЦСА КР-активны преимущественно заместители, а у САА высокой КР-активностью обладают и СР фрагмент, и заместители. Из всего разнообразия препаратов данных классов выбирали тех представителей, которые активно используются в медицинской практике в настоящее время и которые, соответственно, можно приобрести в аптеках РФ.

2.2. ГКР-подложка и проведение ГКР-измерений

В качестве ГКР-подложки в данной главе использовали раствор коллоидных серебряных НЧ (СНЧ), стабилизированных гидроксиламином

[34]. Методика синтеза проста и включает добавление раствора AgNO_3 (10 мл, 5 мМ) к 40 мл смеси NaOH (19 мМ) и $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (1.9 мМ) при непрерывном перемешивании. Восстановление СНЧ происходит при комнатной температуре сразу после смешивания всех реагентов, поэтому продолжительность синтеза составляет не более 5 минут.

Исследование морфологии СНЧ (и других ГКР-подложек, используемых в диссертационной работе) проводили с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на приборе Mira II LMU (Tescan). Для оценки дзета-потенциала и распределения по размерам нано- и субмикронных частиц непосредственно в растворе использовали метод динамического рассеяния света (ДРС; Zetasizer, Malvern). Согласно полученным данным СНЧ имеют сферическую форму, их средний диаметр составил 44 ± 7 нм (рис. 2.1), а дзета-потенциал имеет отрицательное значение (~ -28 мВ), достаточное для обеспечения долговременной коллоидной стабильности.

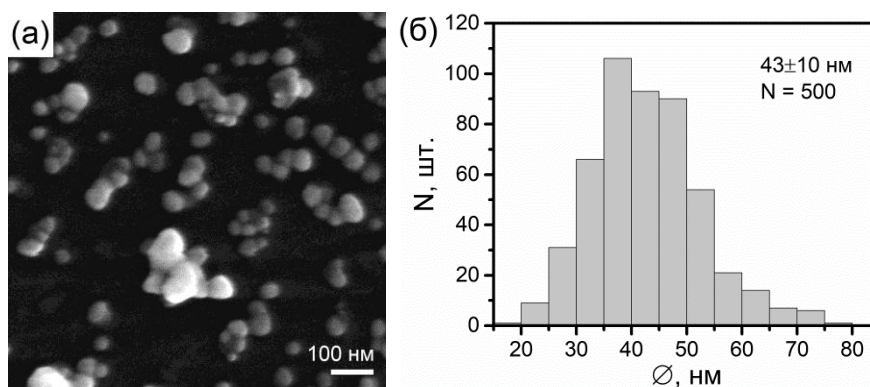


Рис. 2.1. СЭМ-изображение СНЧ, стабилизированных гидроксиламином, (а) и их распределение по размерам (б).

Выбор серебра в качестве материала ГКР-подложки обусловлен меньшей стоимостью прекурсоров и достаточной химической стабильностью СНЧ (по сравнению с подложками на основе золота и меди, соответственно). Кроме того, в отличие от золота и меди, при применении ГКР-подложек на основе серебра возможно использование лазерного излучения в более широком диапазоне длин волн (450–700 нм) и с меньшей потерей интенсивности генерируемого ГКР-спектра [35]. Этот факт делает возможным сравнение между собой результатов, полученных при

использовании КР-спектрометров с различными длинами волн (473, 488, 532, 638 нм).

В данной главе ГКР-измерения проводили с помощью портативного КР-спектрометра (i-Raman, B&WТек) с длиной волны возбуждения 532 нм (мощность лазера на образце – 43 мВт, время регистрации одного спектра – 1 с). Для регистрации ГКР-спектров смешивали раствор аналита, активирующего агента (NaOH, HCl или NaCl) и СНЧ в объёмном соотношении 12:4:1.

2.3. ГКР-спектры сульфаниламидных антибиотиков

Структура аналитов и влияние pH на интенсивность ГКР-сигнала

Для выявления закономерностей формирования ГКР-сигнала САА в исследовании использовали пять представителей ЛВ этого класса (рис. 2.2): сульфагуанидин (СГ), сульфатиазол (СТЗ), сульфаметоксазол (СМЗ), сульфадиазин (СДЗ) и сульфадиметоксин (СДМ). Как упоминалось ранее, важной особенностью структуры данных веществ является высокая КР-активность и СР части всех САА (сульфаниламидный фрагмент), и замещающих фрагментов (R), поскольку обе части имеют ароматическое электронное строение, что определяет их высокую поляризуемость и, как следствие, КР-активность. Поэтому ожидается, что в ГКР-спектрах будут активно проявляться пики и СР, и замещающего фрагментов.

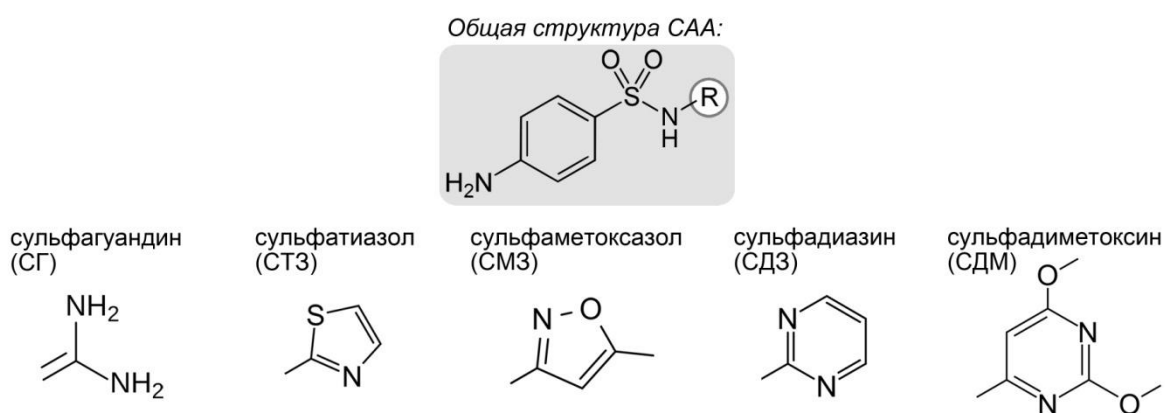


Рис. 2.2. Структурные формулы молекул САА, использованных в исследовании.

В первую очередь отметим, что и СР фрагмент, и заместитель в каждом представителе САА имеют в своём составе функциональные группы с атомами с неподелёнными электронными парами ($-\text{NH}_2$, $-\text{SO}_2\text{NH}-$, $=\text{N}-$, $-\text{S}-$, $-\text{O}-$), которые могут способствовать взаимодействию с ГКР-активной поверхностью СНЧ посредством донорно-акцепторных взаимодействий с атомами серебра. Некоторые из этих функциональных групп могут подвергаться (де)протонированию в зависимости от уровня рН (вставка на рис. 2.3а), и это будет влиять как (i) на электронную структуру и, следовательно, структуру ГКР-спектров молекул САА, так и (ii) на силу их взаимодействия с ГКР-активной поверхностью (интенсивность сигнала). Так, изучение зависимости ГКР-сигнала от величины рН растворов САА (рис. 2.3а) показало, что все исследованные САА имеют очень слабый ГКР-сигнал в диапазоне рН от 2.5 до 11.5, а наиболее интенсивный ГКР-сигнал в кислой и щелочной средах достигается при значениях рН равных 1.25 и 12.5, соответственно. Спектральные профили в средах с разным рН также существенно отличаются (рис. 2.3б,в), что будет детально обсуждено в следующем подразделе.

Анализ литературной информации о константах ионизации показал, что молекулы САА обычно полностью протонированы при $\text{pH} < 2$ и депротонированы при $\text{pH} > 7$ [36]. Следовательно, отсутствие ГКР-сигнала в нейтральной среде объясняется тем, что одних только донорно-акцепторных взаимодействий между атомами серебра на поверхности СНЧ и неподелёнными электронными парами атомов азота и кислорода электронейтральных молекул САА недостаточно для вытеснения стабилизатора с поверхности и получения интенсивного ГКР-сигнала.

С другой стороны, значительные изменения в распределении электростатического потенциала в молекулах при (де)протонировании и переходе в состояние ионов (рис. 2.4а) открывают возможность осуществления более прочных электростатических взаимодействий. Так, достижение максимальной интенсивности сигнала при рН 1.25 (рис. 2.3а) мы

связываем с сильным электростатическим притяжением между протонированным, положительно заряженным, анилиновым фрагментом молекул САА и отрицательно заряженной поверхностью СНЧ (рис. 2.4б). Отрицательный заряд поверхности в данном случае обусловлен адсорбцией хлорид-ионов от HCl, используемой для подкисления. Таким образом, хлорид-ионы действуют как линкеры между молекулами аналита и ГКР-активной поверхностью и улучшают их взаимодействие, а использование HCl в качестве активирующего агента при пробоподготовке образца позволяет как протонировать молекулы САА, так и модифицировать поверхность ГКР-подложки линкером.

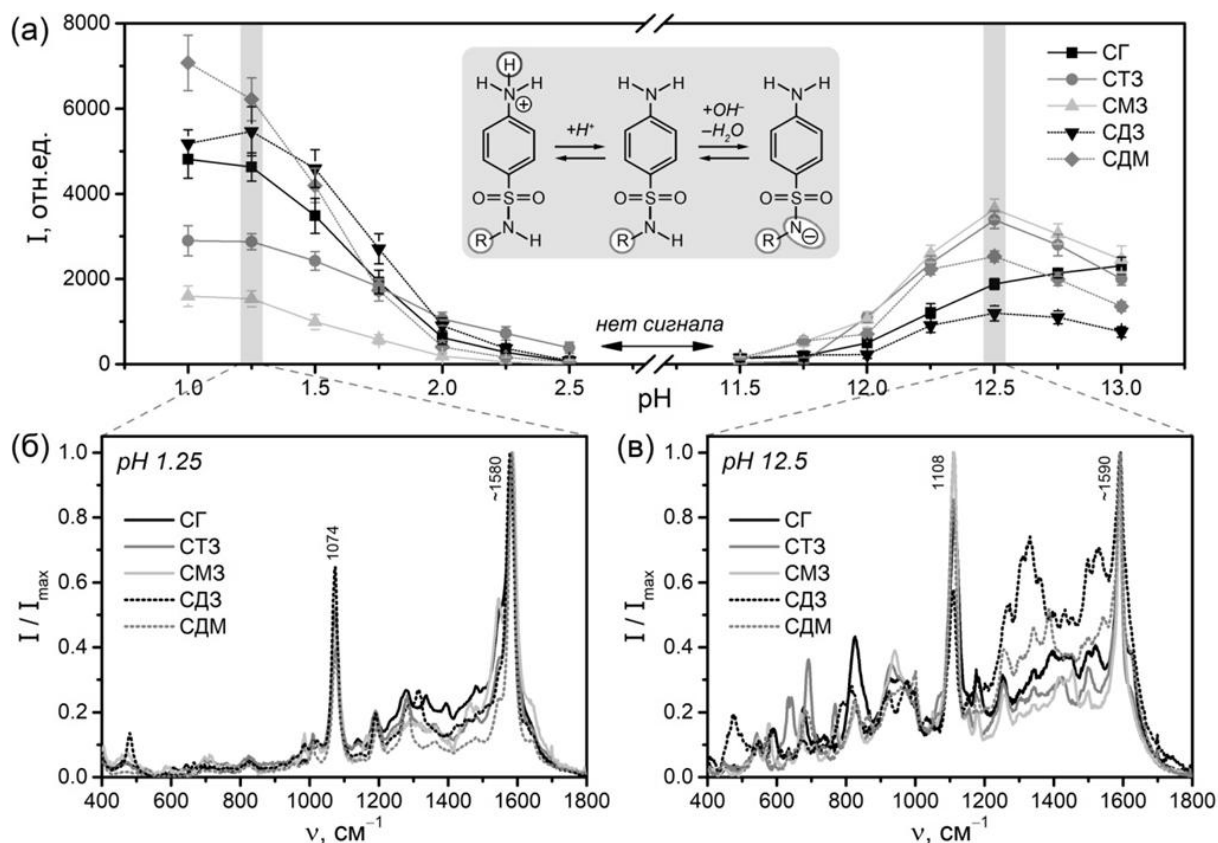


Рис. 2.3. (а) Зависимость интенсивности ГКР-сигнала от значения pH растворов САА (20 мкМ); для построения графиков в кислой и щелочной средах использовали ГКР-пики при 1074 и 1108 см⁻¹, соответственно. Вставка: схема перехода нейтральной сульфаниламидной части САА в (де)протонированное состояние. (б,в) Нормированные ГКР-спектры разных представителей САА (20 мкМ) в (б) кислой и (в) щелочной средах.

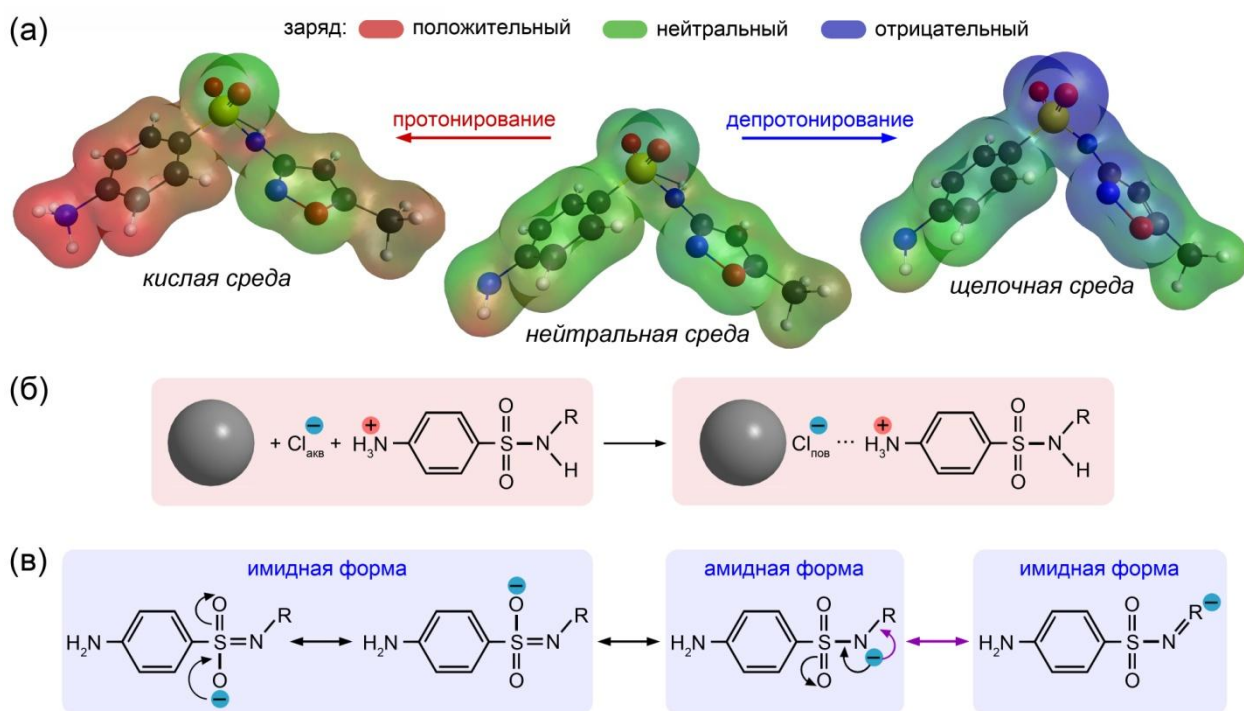


Рис. 2.4. (а) Модели молекул СМЗ в различных степенях протонирования (симуляция нахождения молекул в растворах с различным рН), дополненные изоповерхностями общей электронной плотности, окрашенными с использованием значений молекулярного электростатического потенциала. (б) Схематическая модель взаимодействия между ГКР-подложкой (СНЧ) и протонированными молекулами САА в растворе, подкисленном НСl. (в) Делокализация отрицательного заряда депротонированной сульфонамидной группы ($-\text{SO}_2-\text{N}^-$) молекул САА в щелочной среде за счёт равновесий между канонической (амидной) формой и резонансными (имидными) формами.

В случае депротонирования сульфонамидной группы САА (вставка на рис. 2.3а) происходит значительное увеличение отрицательного заряда не только на атоме азота, но и на атомах кислорода данной группы, а также на атомах замещающего фрагмента (рис. 2.4а). Данный эффект обусловлен делокализацией избыточного отрицательного заряда за счёт образования нескольких устойчивых резонансных форм (рис. 2.4в) [37]. В свою очередь, увеличение электронной плотности на атомах кислорода группы $-\text{SO}_2-$ усиливает её электронодонорные свойства и способствует взаимодействию молекул САА с ГКР-активными центрами на серебряной поверхности.

Примечательно, что у каких-то молекул ГКР-сигнал интенсивнее в кислой среде (СГ, СДМ, СДЗ), а у каких-то в щелочной (СМЗ, СТЗ) (рис.

2.3а). Данный факт связан со сложностью процесса формирования ГКР-сигнала и вовлечением сразу нескольких эффектов. Так, например, рост и перераспределение отрицательного заряда в депротонированных молекулах САА должно приводить к увеличению интенсивности ГКР-сигнала в щелочных средах за счёт увеличения поляризуемости электронной системы молекул и роста КР-активности молекул. И наоборот: протонирование должно уменьшать интенсивность ГКР-сигнала из-за снижения поляризуемости и КР-активности молекул. С другой стороны, положительно заряженные молекулы могут испытывать дополнительное усиление согласно механизму, основанному на переносе электронов от возбужденной ГКР-подложки на адсорбированную молекулу. Также важно, что молекулы с разным зарядом с разной силой взаимодействуют с ГКР-подложкой, что напрямую определяет степень адсорбции молекул и интенсивность их ГКР-сигнала.

Помимо адсорбции аналита на ГКР-активной поверхности, интенсивность сигнала также зависит и от усиливающих свойств самой ГКР-подложки, которые, в свою очередь, зависят от степени агрегации НЧ металлов в случае коллоидных подложек. Это обусловлено тем, что при агрегации НЧ происходит образование так называемых «горячих точек» – участков между близкорасположенными НЧ в агрегатах, в которых создается очень высокая напряженность электрического поля (НЭП) при резонансном взаимодействии агрегатов с фотонами возбуждающего света [38]. Дополнительное изучение влияния рН на гидродинамический диаметр частиц ГКР-подложки (ГДД, рис. 2.5) показало, что в диапазоне рН 2.25–12 агрегации СНЧ не происходит. В кислой среде процесс агрегации проходит более плавно, а размер самих агрегатов СНЧ меньше, чем в щелочной среде.

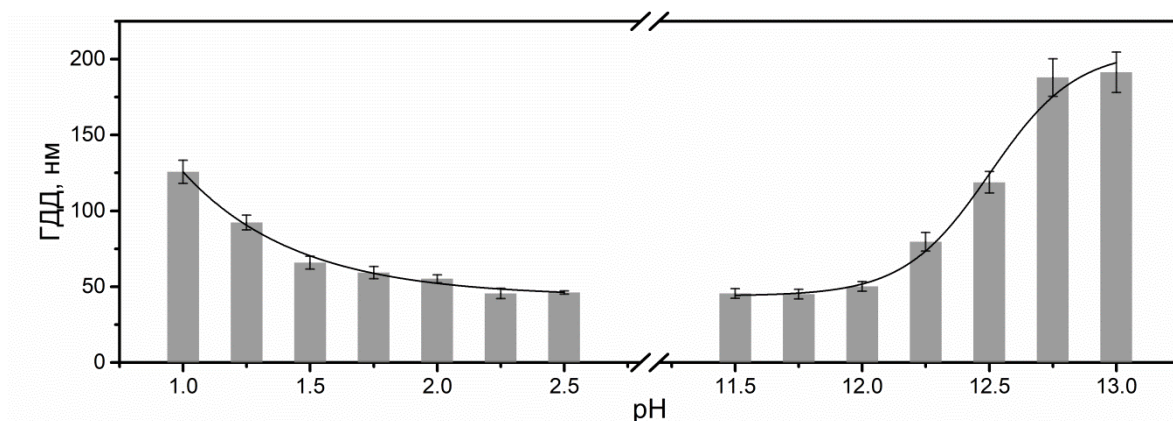


Рис. 2.5. Влияние pH на ГДД СНЧ.

Сравнение влияния величины pH на интенсивность ГКР-спектров САА (рис. 2.3а) и на изменение ГДД СНЧ показало, что рост интенсивности ГКР-сигнала САА коррелирует с началом агрегации СНЧ. При этом осуществление агрегации СНЧ с помощью NaCl (стандартный активатор с нейтральным значением pH) не приводит к дополнительному усилению сигнала в нейтральной среде. Данный факт наглядно свидетельствует о том, что перевод молекул САА в заряженное состояние имеет большее значение для усиления сигнала по сравнению с агрегацией, что связано с возникновением достаточно сильных электростатических взаимодействий между заряженными молекулами и ГКР-подложкой. Следовательно, интенсивный ГКР-сигнал при низких (1–1.5) и высоких (12.25–13) значениях pH возникает благодаря сочетанию (i) улучшенного взаимодействия молекул с ГКР-подложкой и (ii) образования многочисленных «горячих точек» между агрегированными СНЧ.

Влияние pH на профиль ГКР-спектра

Помимо влияния на интенсивность сигнала, изменение pH также приводит к заметному изменению спектральных профилей (изменению положения пиков и соотношения их интенсивностей) (рис. 2.3б,в). Мы связываем это с (i) различиями в ориентации протонированных и депротонированных молекул аналита на ГКР-активной поверхности и (ii) значительным изменением электронной структуры молекул аналитов в результате (де)протонирования.

Так, исследование чистых растворов САА показало, что профили их ГКР-спектров в кислых средах обладают значительным сходством, демонстрируя отличия только в низкоинтенсивных пиках (рис. 2.3б). Спектры в щелочных средах сохраняют сходство лишь отчасти, в наибольшей степени для пиков при 1108 и $\sim 1590 \text{ см}^{-1}$ (рис. 2.3в). Такое необычно высокое сходство ГКР-спектров в кислых средах мы объясняем в соответствии с моделью адсорбции САА на ГКР-активных центрах, предложенной и описанной нами в предыдущем подразделе (рис. 2.4б). В данной модели протонированные молекулы всех представителей САА имеют тенденцию адсорбироваться одинаково, образуя адсорбционный комплекс со схожей структурой: $\text{R-NH-C}_6\text{H}_4\text{-NH}_3^+ \cdots \text{Cl}_{\text{пов}}^- \cdots \text{СНЧ}$. При этом сульфаниламидный фрагмент всегда располагается ближе к ГКР-активной поверхности, что и приводит к наибольшему усилению его колебаний.

Отметим также, что благодаря делокализации положительного заряда по анилиновому фрагменту он может выступать в качестве акцептора электронов, возникающих при возбуждении светом ППР комплекса «подложка–аналит». Таким образом, открывается возможность реализации химического механизма усиления КР-сигнала (перенос электронов от ГКР-подложки к молекуле аналита), благодаря чему происходит дополнительное увеличение поляризуемости и КР-активности преимущественно анилинового фрагмента молекул САА.

Увеличение различий спектральных профилей между разными представителями САА в щелочных средах мы связываем с увеличением вклада в результирующий ГКР-спектр пиков колебаний замещающих фрагментов (R), отличающихся по составу для разных САА (рис. 2.2). Так, делокализация отрицательного заряда в депротонированных молекулах САА (рис. 2.4в) приводит к частичному переносу заряда на группу $-\text{SO}_2-$ и замещающий фрагмент, что приводит к (i) увеличению поляризуемости электронной системы замещающего фрагмента и его КР-активности, а также (ii) улучшению взаимодействия САА с ГКР-активной поверхностью именно

через эти части молекул. В ходе анализа литературы установлено, что теоретические исследования адсорбции САА на ГКР-подложках для СТЗ [39,40], СДЗ [41] и СМЗ [42] также показали, что взаимодействие нейтральных и депротонированных молекул САА с ГКР-активной поверхностью происходит с большим вкладом именно группы $-SO_2-$ и замещающих фрагментов. Как следствие, замещающие фрагменты (R) начинают располагаться близко к ГКР-активной поверхности и испытывать усиление, сопоставимое с таковым для сульфаниламидного фрагмента, приводя к увеличению различий спектральных профилей разных представителей САА.

Таким образом, экспериментально показано и теоретически обосновано, что использование кислой среды позволяет достигать максимально схожих и интенсивных ГКР-спектров САА, что может быть полезно для разработки более универсальных методик их определения.

2.4. ГКР-спектры фторхинолоновых антибиотиков

Структура аналитов и влияние pH на интенсивность ГКР-сигнала

Для изучения выбрано шесть представителей ФХА (рис. 2.6а): ципрофлоксацин (ЦИПРО), норфлоксацин (НОР), пефлоксацин (ПЕФЛ), ломефлоксацин (ЛОМЕ), левофлоксацин (ЛЕВО), моксифлоксацин (МОКСИ). Молекулы ФХА имеют как кислотные, так и основные группы, поэтому активно участвуют в процессах (де)протонирования (рис. 2.6б), которые (как и в случае САА) существенно изменяют их электронную структуру и, как следствие, интенсивность и структуру ГКР-спектров.

Регистрация ГКР-спектров при ступенчатом изменении pH растворов аналитов показала, что максимальный сигнал ФХА достигается в кислой и щелочной средах при значениях pH 1.25–1.5 и 12.5–12.75, соответственно (рис. 2.7а). При этом наиболее интенсивный ГКР-сигнал для большинства ФХА (кроме МОКСИ) достигается в щелочной среде. Данный результат обусловлен двумя факторами. Во-первых, депротонирование способствует

сорбции молекул ФХА на ГКР-подложке за счёт усиления донорно-акцепторных взаимодействий между материалом подложки (серебром) и неподелёнными электронными парами атома азота заместителя R^1 , атома кислорода хинолонового фрагмента и атомов кислорода карбоксильной группы. Во-вторых, благодаря наличию π -сопряжения, депротонирование карбоксильной группы увеличивает отрицательный заряд (рис. 2.6б) и, как следствие, поляризуемость хинолового фрагмента, что приводит к увеличению его КР-активности и интенсивности ГКР-сигнала.

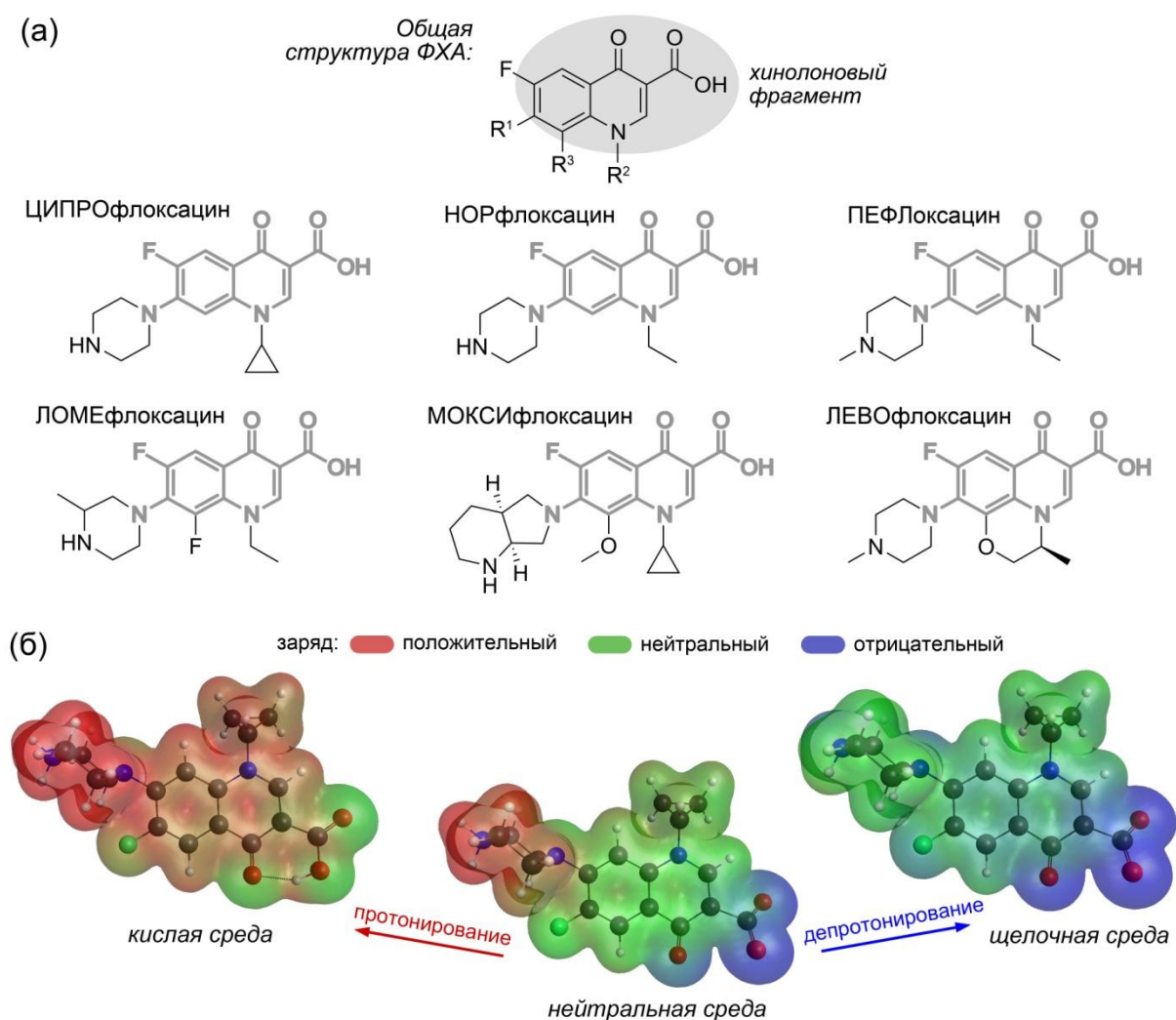


Рис. 2.6. (а) Структурные формулы представителей ФХА, использованных в исследовании. (б) Модели молекул ЦИПРО в различных степенях протонирования (симуляция нахождения молекул в растворах с различным рН), дополненные изоповерхностями общей электронной плотности, окрашенными с использованием значений молекулярного электростатического потенциала.

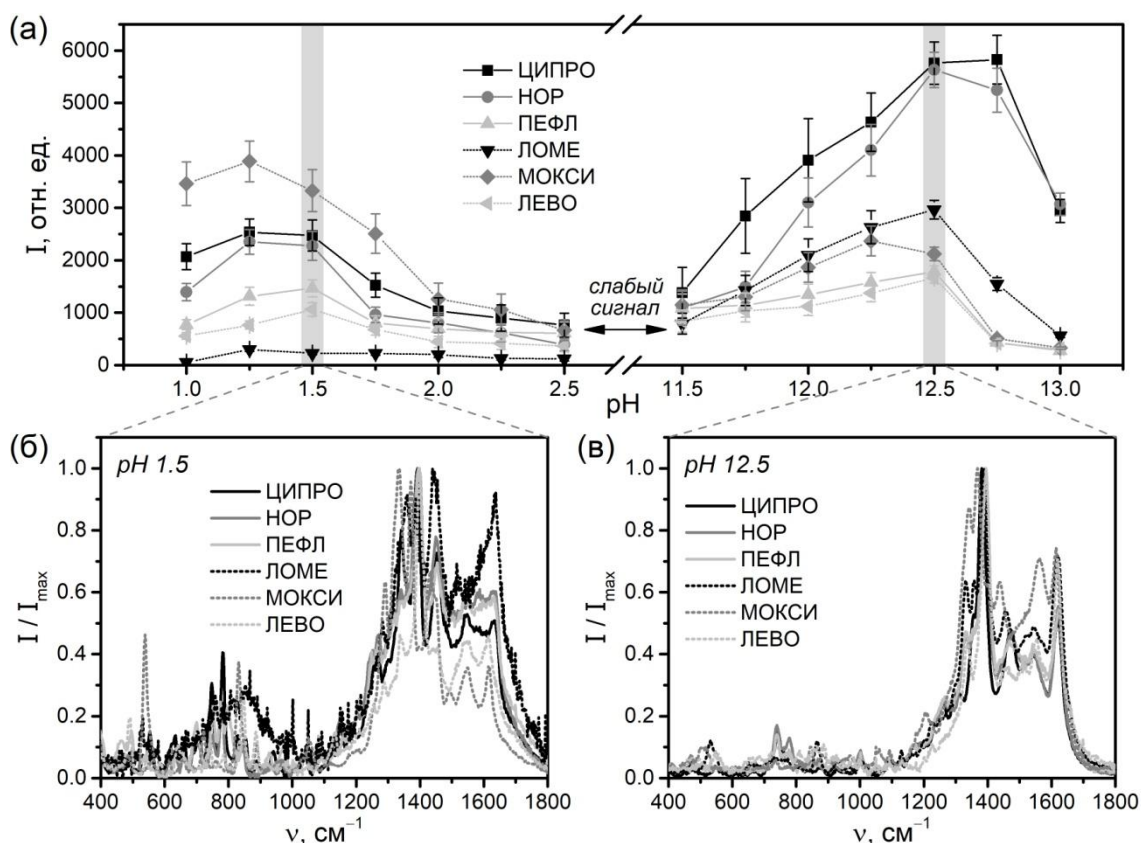


Рис. 2.7. (а) Зависимость интенсивности ГКР-сигнала от значения pH растворов разных представителей ФХА (10 мкМ); для построения графиков использовали наиболее интенсивные ГКР-пики в кислой и щелочной средах. (б,в) Нормированные ГКР-спектры ФХА (10 мкМ) в (б) кислой и (в) щелочной средах.

В случае кислой среды наличие ГКР-сигнала ФХА возможно при реализации механизма адсорбции на поверхность ГКР-подложки, аналогичному для молекул САА, т.е. посредством отрицательно заряженных ионов хлора, выступающих связующим элементом молекул ФХА с поверхностью СНЧ (рис. 2.4б). При этом взаимодействие ФХА с хлорид-ионами наиболее вероятно через протонированный замещающий фрагмент R^1 благодаря избыточному положительному заряду. Данный способ адсорбции также объясняет менее интенсивный ГКР-сигнал в кислой среде (по сравнению с щелочной), поскольку при этом часть молекулы ФХА с наиболее КР-активными колебаниями (хинолоновый фрагмент) располагается дальше от поверхности ГКР-подложки.

Примечательно также, что полученные зависимости интенсивности ГКР-сигнала от pH в диапазоне 11.5–13 довольно хорошо группируются в

зависимости от структуры замещающего фрагмента некоторых ФХА. Так, наиболее интенсивный сигнал достигается, когда кольцо пиперазинового фрагмента (R^1) не содержит каких-либо заместителей (ЦИПРО и НОР), и наименее интенсивный – когда атом азота данного фрагмента имеет в качестве заместителя метильную группу (ПЕФЛ и ЛЕВО). Для пар ЦИПРО+НОР и ПЕФЛ+ЛЕВО подобное группирование также прослеживается и для растворов с кислой средой. Таким образом, несмотря на более низкую КР-активность R^1 и ожидаемо низкий вклад в ГКР-сигнал, его структура существенно влияет на интенсивность сигнала ФХА, что мы связываем с изменением адсорбции молекул на поверхности подложки.

В нейтральной среде ФХА имеют очень слабый ГКР-сигнал, однако добавление активирующего агента (NaCl) для запуска искусственной агрегации СНЧ приводит к значительному увеличению интенсивности сигнала (3–6 раз, рис. 2.8а,б). Отметим, что концентрация NaCl оказывает нелинейное влияние на усиление КР-спектров ФХА с максимальным эффектом при 30 мМ (рис. 2.8а). Данное усиление связано преимущественно с воздействием на ГКР-подложку (искусственная агрегация СНЧ), поскольку максимум сигнала достигается при концентрации NaCl, одинаковой для всех ФХА.

Тем не менее, тот факт, что в принципе можно получить интенсивный сигнал ФХА в нейтральной среде (в отличие от САА; раздел 2.3) мы в первую очередь связываем с особенностью строения ФХА, а именно способностью образовывать цвиттер-ионы [43–45]. Благодаря этому даже в нейтральной среде молекулы ФХА способны к достаточно сильному электростатическому взаимодействию с поверхностью ГКР-подложки. Однако при концентрациях ФХА, необходимых для решения практических задач, силы данных взаимодействий недостаточно для получения интенсивного сигнала, поэтому проведение дополнительной активации подложки становится необходимым этапом. Наконец, снижение интенсивности ГКР-сигнала ФХА при дальнейшем увеличении

концентрации активирующего агента (>50 мМ, рис. 2.8а) мы связываем с вытеснением хлорид-ионами молекул ФХА с ГКР-активных центров на поверхности СНЧ.

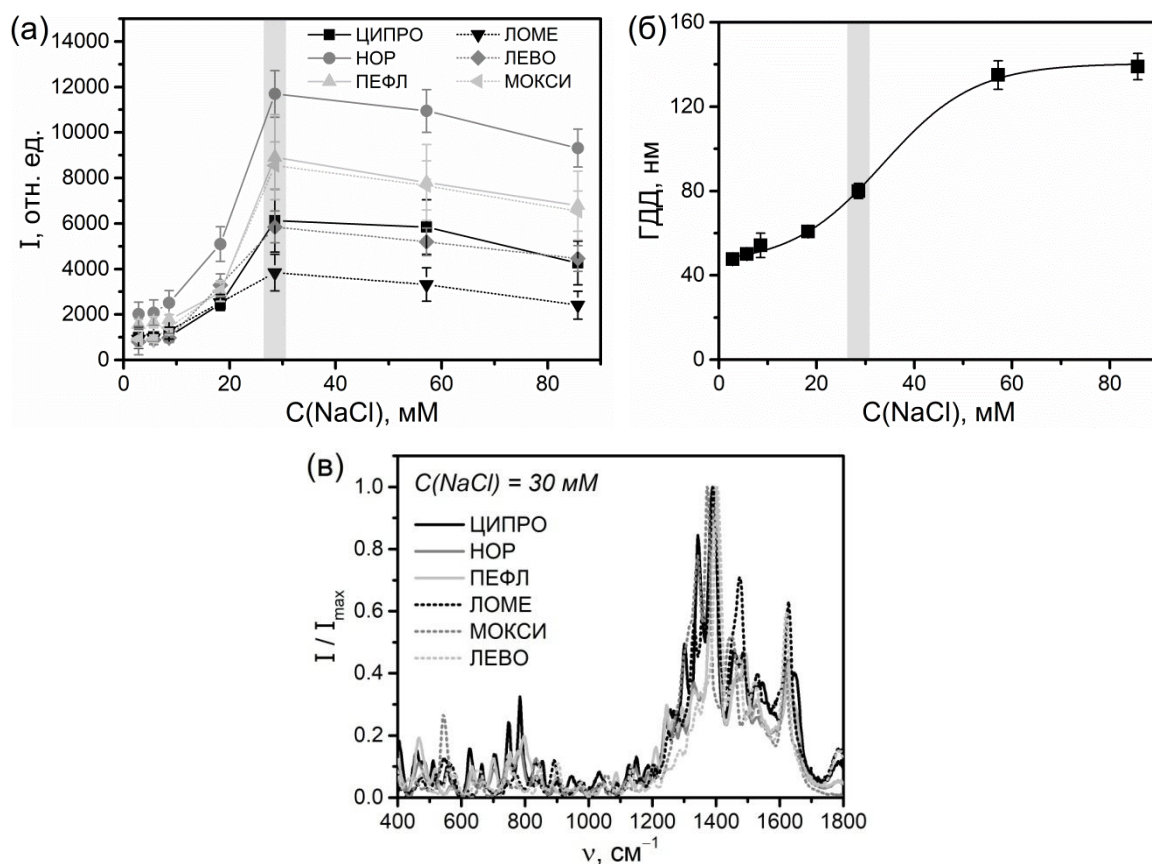


Рис. 2.8. (а,б) Зависимость интенсивности ГКР-сигнала разных представителей ФХА (10 мкМ) (а) и ГДД СНЧ (б) от концентрации стандартного активирующего агента (NaCl) в нейтральной среде; для построения графика использовали наиболее интенсивные ГКР-пики ФХА. (в) Нормированные ГКР-спектры ФХА (10 мкМ) в растворе активирующего агента (NaCl, 30 мМ) в нейтральной среде (рН 5.5).

Влияние рН на профиль ГКР-спектра

Особенностью строения ФХА с точки зрения ГКР-анализа является высокая КР-активность именно СР части всех ФХА (т.е. хинолонового фрагмента) благодаря высокой поляризуемости достаточно большой π-сопряженной (ароматической) электронной системы. При этом замещающие фрагменты R¹ и R² имеют алифатическое строение и их КР-активность значительно ниже, чем у ароматической части. Таким образом, в ГКР-спектрах ФХА активно проявляются пики преимущественно СР фрагмента и

ождается, что это должно привести к высокой степени схожести спектральных профилей изученных ФХА.

Установлено, что наибольшей схожестью профилей обладают спектры ФХА (особенно в диапазоне 1300–1600 см⁻¹), полученные в щелочной среде. Это связано со взаимодействием всех аналитов с поверхностью СНЧ преимущественно через карбонильную и депротонированную карбоксильную группу, что обеспечивает максимальную близость к ГКР-активным центрам именно СР части молекул ФХА. К аналогичным выводам о преимущественном взаимодействии ФХА с поверхностью ГКР-подложек посредством электронодонорных групп (карбонильной и карбоксильной) пришли авторы и других работ, проводивших теоретические и экспериментальные исследования особенностей генерации ГКР-сигнала ЛЕВО и ПЕФЛ в различных условиях [46,47]. Тем не менее, заметные отличия в профилях наблюдаются в случае МОКСИ и ЛОМЕ, что мы связываем с наличием дополнительных замещающих фрагментов (R³) у СР части: атома фтора у ЛОМЕ и –ОСН₃ группы у МОКСИ (рис. 2.6а). Обе функциональные группы имеют неподелённые электронные пары, ориентированные таким образом, что могут участвовать в π-сопряжении хинолонового фрагмента, изменяя его КР-активность. Примечательно, что ЛЕВО тоже имеет подобный заместитель, однако это не приводит к столь заметным отличиям в профиле спектра. Данный факт мы связываем с тем, что по сравнению с другими заместителями, неподелённые электронные пары кислорода этого заместителя вносят меньший вклад в π-сопряжение хинолонового фрагмента из-за стерических ограничений.

При переходе к нейтральной и кислой средам отличия в профилях спектров разных ФХА значительно увеличиваются (рис. 2.7б,в, 2.8в). Этот результат мы связываем с тем, что протонирование атомов азота замещающего фрагмента R¹, а также поляризация в кислой среде других электронодонорных групп (содержащих атомы О и F) с одной стороны уменьшают поляризуемость (и, следовательно, КР-активность) связей внутри

них, а с другой – усиливают их электроноакцепторные свойства. В свою очередь, второй эффект увеличивает вероятность перехода электронов, возбужденных при генерации ППР, от ГКР-подложки к молекулам ФХА, что существенно увеличивает КР-активность данных групп, т.е. реализуется химический механизм усиления. Таким образом, протонирование приводит к увеличению ГКР-сигнала заместителей и уменьшению схожести профилей ГКР-спектров в нейтральной и кислой средах.

Следовательно, детектирование ФХА именно в щелочной среде позволяет использовать СР молекул для создания более универсальных методик ГКР-определения.

2.5. ГКР-спектры цефалоспориновых антибиотиков

В работе изучено пять представителей ЦСА (рис. 2.9): цефазолин (ЦЗЛ), цефуроксим (ЦРК), цефотаксим (ЦТК), цефтриаксон (ЦТР) и цефоперазон (ЦПР). Общий СР фрагмент представлен β -лактамым циклом, сопряженным с шестичленным гетероатомным кольцом.

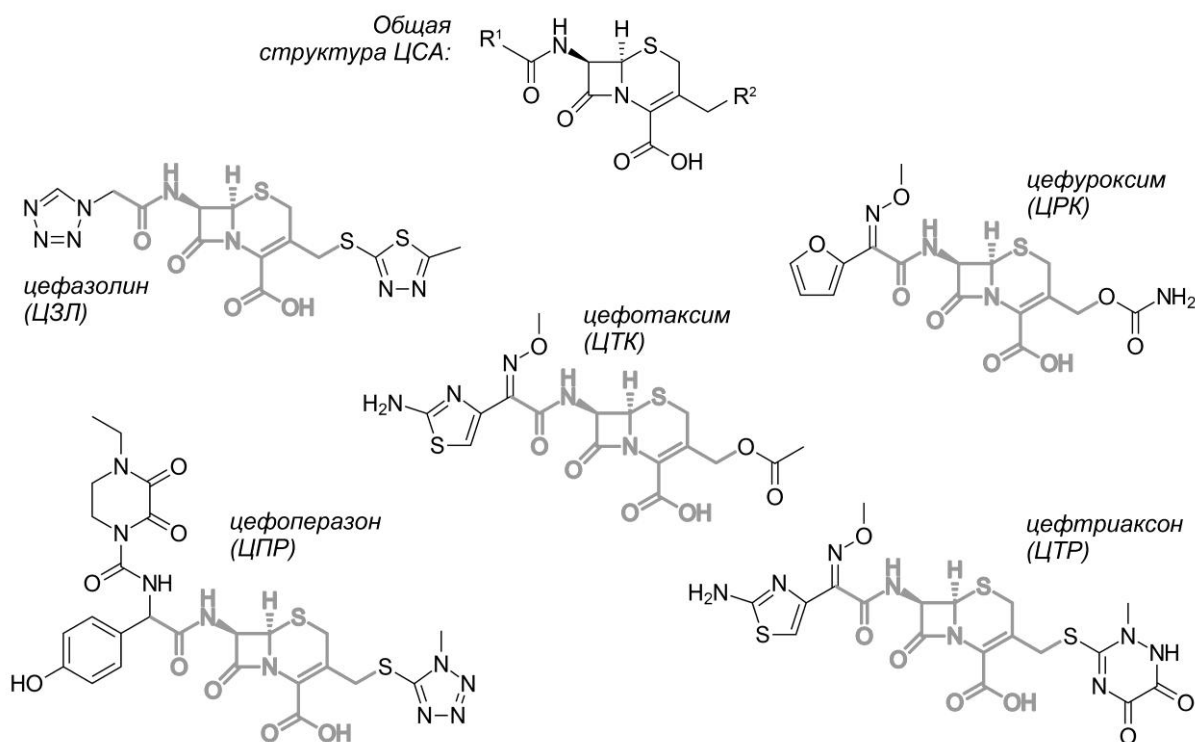


Рис. 2.9. Структурные формулы молекул ЦСА, использованных в исследовании.

Изучение влияния величины рН и концентрации активирующего агента (NaCl) на интенсивность ГКР-сигнала (рис. 2.10а, 2.11а) показало, что наиболее оптимальные значения этих величин, обеспечивающие максимальные интенсивности, совпадают для всех ЦСА во всех средах. При этом интенсивность сигнала в щелочной среде выше, чем в кислой среде. Это связано с большим числом фрагментов с электронодонорными атомами с неподелёнными электронными парами (O, N, S), которые в щелочной среде обеспечивают наиболее прочное связывание молекул ЦСА с атомами серебра на поверхности СНЧ за счёт образования донорно-акцепторных связей. Особенно это касается карбоксильной группы СР фрагмента (как и для ФХА), переходящей в щелочной среде в анионную форму, имеющую максимальные электронодонорные свойства.

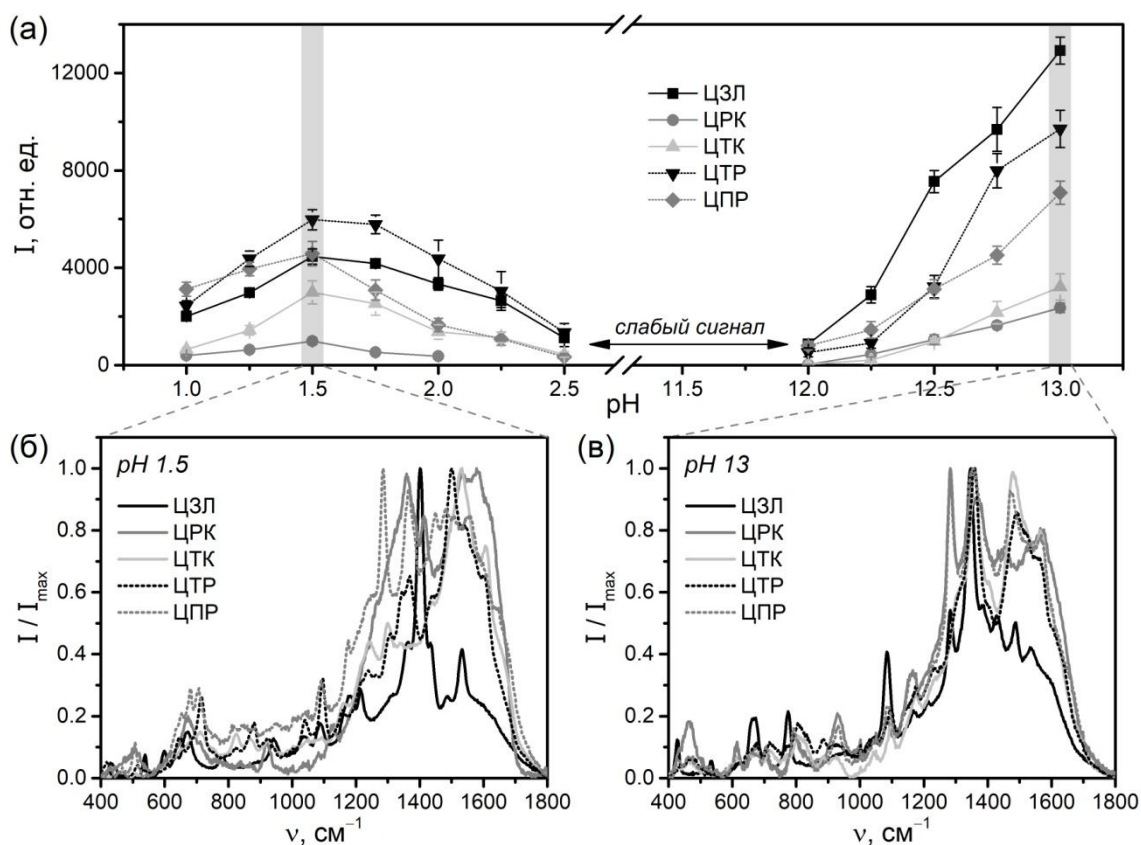


Рис. 2.10. (а) Зависимость интенсивности ГКР-сигнала от значения рН растворов ЦСА (5 мкМ); для построения графиков использовали наиболее интенсивные ГКР-пики в кислой и щелочной средах. (б,в) Нормированные ГКР-спектры ЦСА (5 мкМ) в (б) кислой и (в) щелочной средах.

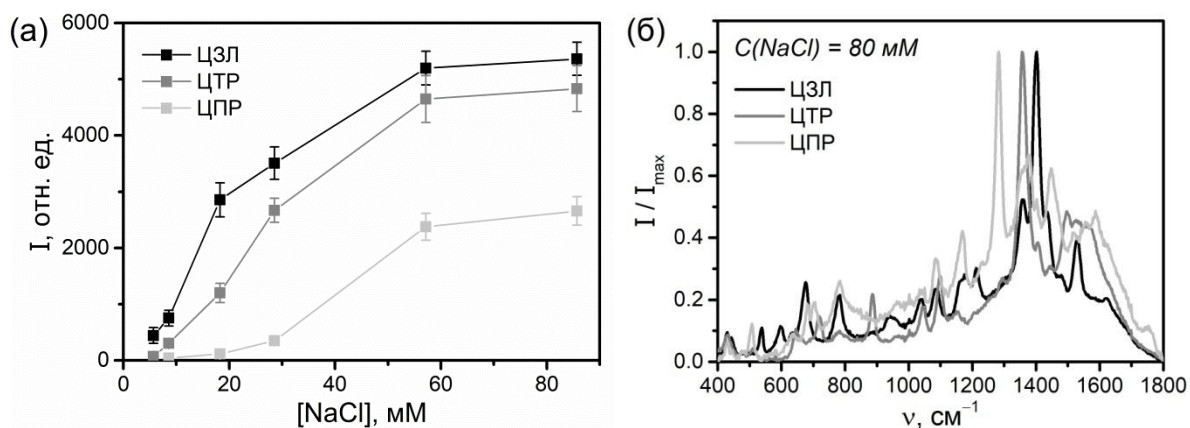


Рис. 2.11. (а) Зависимость интенсивности ГКР-сигнала растворов ЦСА (5 мкМ) от концентрации активирующего агента (NaCl) в нейтральной среде; для построения графика использовали наиболее интенсивные ГКР-пики. (б) Нормированные ГКР-спектры ЦСА (5 мкМ) в растворе NaCl (80 мМ) в нейтральной среде (рН 5.5).

Как и в случае ФХА, при концентрациях ЦСА, необходимых для решения практических задач, ГКР-сигнал в нейтральной среде очень слабый. Тем не менее, по аналогии с ФХА, активация ГКР-подложки с помощью активирующего агента позволяет получить ГКР-сигнал необходимой интенсивности (рис. 2.11а). Однако для некоторых ЦСА (ЦТР и ЦТК) результаты для нейтральной среды не приведены, поскольку их ГКР-спектры при данных условиях не имеют выраженных узких пиков, пригодных для использования в анализе и однозначной идентификации данных ЛВ. Примечательно, что в отличие от ФХА, присутствие высоких концентраций хлорид-ионов в нейтральной среде не приводит к подавлению ГКР-сигнала ЦСА, что свидетельствует о более сильном взаимодействии ЦСА с поверхностью СНЧ по сравнению с хлорид-ионами. Данный факт обусловлен тем, что благодаря наличию большого числа атомов с неподелёнными электронными парами молекулы ЦСА могут образовывать сразу несколько донорно-акцепторных связей с поверхностью ГКР-подложки.

Касательно различий в профилях ГКР-спектров разных ЦСА, в первую очередь важно отметить, что СР фрагмент молекул ЦСА имеет алифатическое строение и низкую КР-активность. В то же время заместители при СР фрагменте существенно различаются по составу и структуре и в большинстве случаев имеют ароматическое электронное строение, что

обеспечивает высокую КР-активность и склонность к генерации интенсивных ГКР-спектров. Поэтому, как и ожидалось, в отличие от САА и ФХА, в спектрах ЦСА отсутствует ярко выраженная схожесть спектральных профилей независимо от рН и присутствия активирующего агента (рис. 2.10б,в, 2.11б), поскольку именно заместители ответственны за формирование основного спектрального сигнала. Однако некоторая степень схожести спектров всё же наблюдается для ЦСА в щелочной среде. Предположительно это связано с гидролизом и раскрытием β -лактамного цикла [48,49], что приводит к образованию второй карбоксильной группы, усиливающей адсорбцию ЦСА на поверхности ГКР-подложки непосредственно через гидролизованный СР фрагмент. Как следствие, увеличивается и вклад колебаний СР фрагмента в результирующий ГКР-спектр ЦСА за счёт улучшения его взаимодействия с ГКР-активными центрами.

Наконец, во всех спектрах ЦСА можно наблюдать присутствие интенсивной непрерывной составляющей сигнала в диапазоне от 1200 до 1700 см^{-1} , дополнительно затрудняющей использование спектров в анализе. Присутствие данной составляющей обусловлено большим разнообразием химических связей, составляющих молекулы ЦСА, и сильным перекрыванием соответствующих им ГКР-пикув. Данный эффект характерен не только для ЦСА, но и других ЛВ с большим размером молекул, например, ФХА (рис. 2.7б,в).

Таким образом, использование структурной родственности для разработки универсальных методик ГКР-определения в случае ЦСА довольно ограничено (по сравнению с САА и ФХА). Например, отсутствует возможность получения спектров с высоким сходством профилей. Также, поскольку ЦСА могут иметь интенсивный ГКР-сигнал как в кислой и щелочной средах, так и в нейтральной при использовании активирующего агента, выбор оптимальной величины рН и концентрации активирующего агента для ГКР-определения ЦСА должен быть в первую очередь обусловлен

особенностями анализируемой матрицы и направлен на подавление фонового сигнала мешающих компонентов.

* * *

Проанализированы ГКР-спектры представителей трёх классов антибиотиков (САА, ФХА и ЦСА), которые имеют разную степень КР-активности фрагментов молекул. Показано, что в случае, когда КР-активны и СР фрагмент, и заместитель (САА), либо только СР фрагмент (ФХА), то возможна генерация схожих по профилю ГКР-спектров таких аналитов. Если же КР-активны преимущественно заместители при СР фрагменте (ЦСА), то возможность получения спектров с высоким сходством профилей отсутствует.

На примере указанных антибиотиков также показана высокая значимость контроля рН анализируемого раствора, поскольку (де)протонирование приводит и к изменению механизма и силы адсорбции, и к изменению активности КР-пиков, и к уменьшению (увеличению) электроноакцепторных свойств молекул (важно для реализации химического механизма усиления). Установлено, что для всех изученных классов антибиотиков интенсивный ГКР-сигнал достигается при низких (1–1.5) и высоких (12.25–13) значениях рН. Это обусловлено не только полным переходом молекул в (де)протонированное состояние, способствующим более прочному электростатическому взаимодействию с подложкой, но и дополнительным увеличением усиливающих свойств СНЧ из-за агрегирования в растворах с высокой ионной силой и образованием многочисленных усиливающих центров («горячих точек») в пространстве между агрегированными НЧ.

Таким образом, возможность изменения профиля ГКР-спектра с помощью рН и зависимость степени спектральной схожести от величины КР-активности СР фрагментов свидетельствуют о важности химического механизма усиления КР-сигнала, т.е. учёта свойств именно молекул,

адсорбированных на поверхности ГКР-подложки, а не только плазмонных свойств ГКР-подложки.

Также информация о структурной родственности аналитов открывает возможность создания универсальных методик обработки аналитического сигнала для СР аналитов, обладающих схожими профилями ГКР-спектров при одинаковых условиях регистрации сигнала.

Представленные в главе результаты опубликованы в работах [6,50–52].

ГЛАВА 3. МАСКИРОВАНИЕ, РАЗДЕЛЕНИЕ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ ПРИ ГКР-ОПРЕДЕЛЕНИИ АНТИБИОТИКОВ В БИОЖИДКОСТЯХ ЧЕЛОВЕКА

3.1. ГКР-исследование биожидкостей человека: особенности и собственный ГКР-сигнал

Для проведения ТЛМ (независимо от метода анализа) в качестве БЖЧ чаще всего используют плазму или сыворотку крови, мочу и слюну. Так в случае ГКР-анализа примерно 48% статей по проведению ТЛМ использовали плазму/сыворотку крови, 45% – мочу и 7% – слюну. Преимущества и ограничения использования данных БЖЧ обобщены в табл. 3.1.

Табл. 3.1. Преимущества и ограничения БЖЧ, наиболее часто используемых при ТЛМ.

БЖЧ	Преимущества	Ограничения
Плазма/сыворотка крови	– Прямая корреляция между концентрацией ЛВ и терапевтическим эффектом – Качественное и количественное содержание эндогенных компонентов относительно постоянно	– Очень высокая концентрация белков – Возможно присутствие антикоагулянта (в случае плазмы крови) – Инвазивный сбор
Моча	– Неинвазивный сбор	– Сильно изменяющееся содержание эндо- и экзогенных компонентов
Слюна	– Неинвазивный сбор – Концентрация ЛВ в слюне часто коррелирует с концентрацией в крови	– Наличие муцина усложняет манипуляции со слюной – Очень низкие концентрации ЛВ

Популярность плазмы/сыворотки крови в первую очередь обусловлена прямой взаимосвязью между терапевтическим эффектом конкретного ЛВ и его концентрацией в крови пациента, а мочи – простотой и неинвазивностью её сбора. Также, благодаря гомеостазу, качественный и количественный состав цельной крови (число и концентрация эндогенных компонентов) и, как следствие, плазмы и сыворотки крови поддерживается на постоянном

уровне в хорошо определенных диапазонах концентраций [53]. И наоборот, несмотря на простоту сбора, состав образцов мочи (и слюны), полученных от одного пациента, может сильно меняться в течение дня в зависимости от метаболизма организма конкретного человека, объема потребляемой жидкости и условий окружающей среды (например, температуры и влажности).

Однако довольно значимым негативным отличием состава плазмы/сыворотки крови и слюны от состава мочи является наличие высокомолекулярных компонентов (белка и муцина, соответственно). В случае ГКР-анализа данные компоненты способны прочно адсорбироваться на поверхности ГКР-подложки, препятствуя адсорбции молекул целевого аналита и получению полезного ГКР-сигнала. Поэтому для ГКР-определения ЛВ в данных БЖЧ обязательно применяют удаление высокомолекулярных компонентов осаждением или фильтрацией [10,11]. Особенно это актуально для плазмы/сыворотки крови, поскольку содержат 6–9% белка. Таким образом, методики определения ЛВ в моче заведомо отличаются отсутствием необходимости в этом дополнительном этапе пробоподготовки.

Другими важными компонентами БЖЧ, влияющими на точность анализа, являются низкомолекулярные органические соединения, такие как мочевины, КРН, МК. В моче и плазме/сыворотке крови также содержатся продукты расщепления гемовых белков (в основном гемоглобина): уробилиноиды (уробилин, уробилиноген) (УБЛ) в случае мочи и билирубин (БРБ) в случае плазмы/сыворотки крови. Все перечисленные выше компоненты важны не только из-за относительно высоких концентраций, но также и из-за способности генерировать интенсивный ГКР-сигнал (т.е. фоновый сигнал) и влиять на адсорбцию целевых молекул на ГКР-активные центры.

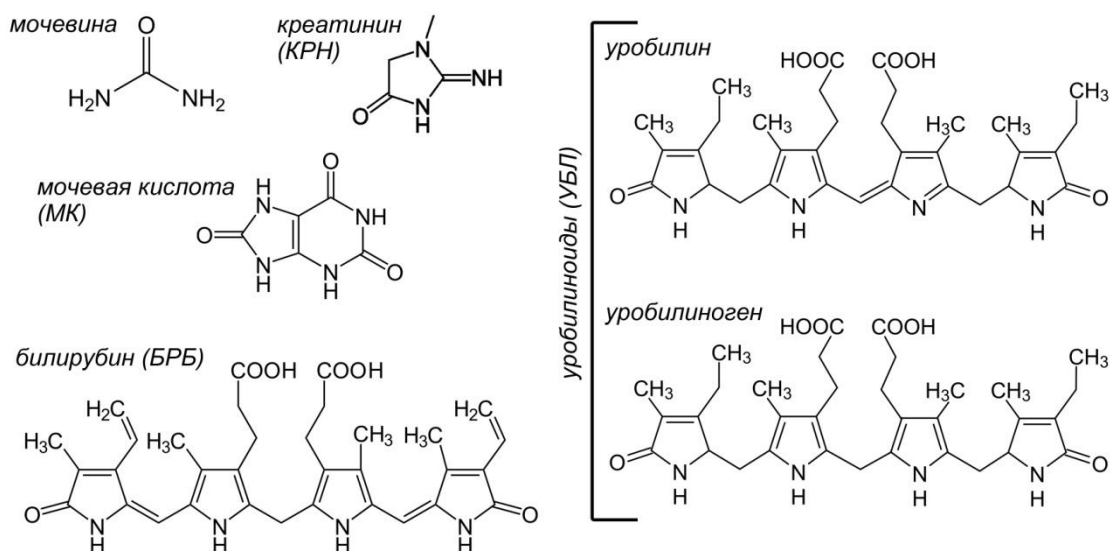


Рис. 3.1. Структурные формулы основных низкомолекулярных органических компонентов БЖЧ.

Наконец, все БЖЧ содержат неорганические соли, которые не продуцируют сколь-нибудь существенный ГКР-сигнал. Однако в случае мочи изменение их концентрации от образца к образцу происходит в широких пределах и вызывает значимое варьирование ионной силы анализируемого раствора, что влияет на адсорбцию и аналитов, и мешающих компонентов, а также приводит к неконтролируемой агрегации коллоидных ГКР-подложек.

3.1.1. Биожидкости, использованные в диссертационной работе

По мере необходимости и возможности, в диссертационной работе использовали все три вида БЖЧ, перечисленные в предыдущем подразделе. Однако по совокупности обсужденных выше характеристик (сложности и изменчивости состава, а также простоте сбора), в качестве основного объекта анализа выбрана моча.

Для проведения исследований проводили сбор БЖЧ у здоровых добровольцев. Поскольку собранные образцы БЖЧ использовали только как матрицу при проведении ГКР-исследований, целью которых не было исследование функций/заболеваний человеческого организма или связанного с ними медицинского лечения, то для работы с БЖЧ одобрение этического комитета не требовалось. Все образцы БЖЧ анонимизировали и только в

случае образцов мочи сохраняли информацию о времени её сбора (утро или день).

Моча

В случае мочи очень распространенной практикой является использование искусственной мочой (ИМ) – смеси, имитирующей состав реальной мочи [54–56]. Однако предварительные эксперименты с наиболее часто используемыми составами ИМ показали, что они не могут удовлетворительно воспроизводить влияние состава реальных образцов мочи на ГКР-сигнал ЛВ, а также не отражают действительную сложность и изменчивость собственного ГКР-сигнала мочи. Поэтому для разработки и проверки методик анализа в работе использовали только реальные образцы мочи и других БЖЧ.

Для учёта изменчивости состава мочи каждый доброволец предоставлял два образца мочи: (i) образец утренней мочи (УМ), собранный во время первого мочеиспускания после пробуждения, (ii) образец дневной мочи (ДМ), собранный в течение дня (третье или четвертое мочеиспускание за день). Образцы мочи (объёмом 10–40 мл) хранили при 4°C и использовали для анализа в течение двух дней после сбора. С помощью тест-полосок (ООО «Биоскан», Россия) дополнительно проверяли, что концентрации белков, кетонов и глюкозы в моче находятся в пределах нормы для здоровых людей. Измерение pH всех образцов мочи показало, что его значения лежат в диапазоне 5.2–6.7, что также соответствует показателям для здоровых людей.

УМ обычно содержит больше метаболитов и в более высоких концентрациях (по сравнению с ДМ), поэтому её анализ представляет собой более сложную задачу и именно образцы УМ использовали для предварительной оптимизации методик анализа с целью достижения максимальной точности и достоверности окончательной методики анализа.

Слюна

Порции образцов слюны (~1 мл/порция) собирали у добровольцев не ранее, чем через 1 ч после еды и очистки полости рта от остатков пищи.

Образцы хранили при температуре 4°C и использовали для анализа в течение 2 дней с момента сбора.

Плазма крови

Порции образцов венозной крови (~2.7 мл/порция) собирали у добровольцев утром натощак. Сбор осуществляли в вакутейнеры с цитратом натрия в качестве антикоагулянта. Плазму крови готовили центрифугированием (2000×g, 15 мин), затем разделяли на порции по 0.5 мл и хранили в замороженном виде при –20°C. Замороженные порции перед экспериментами оттаивали при комнатной температуре в течение 15 мин.

Приготовление образцов БЖЧ с искусственной добавкой ЛВ

В данной работе использовали образцы БЖЧ здоровых добровольцев, не проходящих медикаментозное лечение, поэтому в них искусственно добавляли интересующие ЛВ, под определение которых разрабатывали методики анализа. Отметим, что добавление осуществляли путём смешивания БЖЧ с раствором ЛВ в отношении 9:1 по объёму, чтобы избежать сильного разбавления образца, уменьшения концентрации эндогенных компонентов и искусственного упрощения анализируемой матрицы. Образцы БЖЧ без добавок ЛВ использовали в качестве контрольных.

Концентрации ЛВ, необходимые для определения в БЖЧ, выбирали строго согласно данным фармакокинетических исследований, описанных ранее в литературе. Также дополнительно ориентировались на данные по выведению ЛВ из организма людей с нарушениями функции почек (например, почечной недостаточностью), поскольку лечение таких пациентов с использованием стандартных схем дозирования может привести к возникновению побочных эффектов из-за плохого выведения препаратов из организма. Например, для людей с нормальной функцией почек характерно быстрое снижение концентрации ЛВ в моче после приема разовой дозы, в то время как концентрация ЛВ в моче людей с почечной недостаточностью

меньше примерно в 2 раза и остаётся на неизменном уровне в течение длительного времени [57–59].

В итоге для ЛВ, использованных в работе, применяли следующие приблизительные диапазоны концентраций в моче: 10–150 мкг/мл (~40–600 мкМ) для САА [57,60,61], 50–500 мкг/мл для ЦСА [58,62–65], 50–500 мкг/мл для ФХА [59,66–68], 20–200 мкг/мл для МТК [69]. Самое главное, что данные диапазоны охватывают самые низкие, практически значимые концентрации ЛВ в БЖЧ, что позволяет обеспечить необходимую чувствительность анализа. В случае определения более высоких концентраций ЛВ всегда есть возможность провести дополнительное разбавление образца мочи перед применением основной методики ГКР-анализа.

Некоторые методики ГКР-определения антибиотиков в моче также экстраполированы для определения антибиотиков в других БЖЧ (слюне и плазме крови). Добавление ЛВ в эти БЖЧ также проводили с учётом фармакокинетических данных. Так, САА в слюне определяли в диапазоне 10–30 мкМ [70] (подраздел 3.6.3), а ФХА в плазме крови определяли в диапазоне 1–6 мкг/мл [59,66] (раздел 5.4).

Искусственные растворы эндогенных компонентов

В некоторых разделах для изучения индивидуального влияния компонентов мочи или совокупного влияния компонентов в смеси на ГКР-сигнал аналита использовали растворы мочевины (20 мг/мл), КРН (2 мг/мл), МК (1 мг/мл) и неорганических солей. Для приготовления раствора неорганических солей в 100 мл воды растворяли 1.36 г NaCl, 1.21 г KCl, 1.1 г Na₂SO₄·10H₂O, 0.46 г NH₄Cl, 0.27 г NaH₂PO₄·2H₂O, 0.2 г CaCl₂·2H₂O, 0.15 г MgSO₄·7H₂O, 0.09 г Na₂HPO₄ и доводили до pH 5.0±0.2 с помощью HCl (1 М). Смесь всех перечисленных органических и неорганических веществ в тех же концентрациях использовали в качестве ИМ [55]. Данные концентрации соответствуют средним значениям содержания компонентов в реальной моче [71].

3.1.2. Основные фонообразующие компоненты биожидкостей

Как и в предыдущей главе, в качестве ГКР-подложки во всех экспериментах и методиках ГКР-анализа текущей главы использовали коллоидные СНЧ, стабилизированные гидроксиламином. Подробная информация о данной ГКР-подложке представлена в разделе 2.2.

Из компонентов БЖЧ только низкомолекулярные органические соединения (рис. 3.1) являются основным источником ГКР-сигнала (фонового сигнала при анализе) в спектральном диапазоне, используемом для определения ЛВ ($400\text{--}2000\text{ см}^{-1}$) [72]. Данные соединения способны к генерации интенсивного (Г)КР-сигнала благодаря высокой КР-активности и способности к сильному донорно-акцепторному взаимодействию с серебряной поверхностью ГКР-подложки.

Регистрация ГКР-спектров мочи при значениях рН, обеспечивающих максимальный сигнал антибиотиков (разделы 2.3–2.5), показала, что УБЛ и КРН являются основными фонообразующими компонентами мочи в кислой и щелочной средах, соответственно (рис. 3.2). Отметим, что вместо УБЛ в контрольных экспериментах использовали БРБ, поскольку последний имеет достаточно схожую структуру (рис. 3.1) и свойства, и при этом доступен коммерчески в чистом виде. Дополнительное изучение влияния энергии фотонов возбуждающего излучения на ГКР-сигнал показало, что использование лазеров с различной длиной волны в первую очередь влияет на профиль спектра, однако не приводит к его устранению.

Профиль ГКР-спектра мочи в нейтральной среде (с добавкой активирующего агента (NaCl), 60 мМ) преимущественно сформирован МК, ксантином и гипоксантином, которые относятся к пуриновым основаниям и являются структурными аналогами (рис. 3.3).

Наконец, относительно мочевины отметим, что её спектры никак не проявляются в ГКР-спектре мочи при любых значениях рН и даже в присутствии активирующего агента, несмотря на её высокую концентрацию в моче ($9.3\text{--}23.3\text{ мг/мл}$ / $155\text{--}388\text{ мМ}$ [71]). Данный факт связан со слабыми

электронодонорными свойствами атомов мочевины, что не позволяет образовывать прочные связи с поверхностью ГКР-подложки.

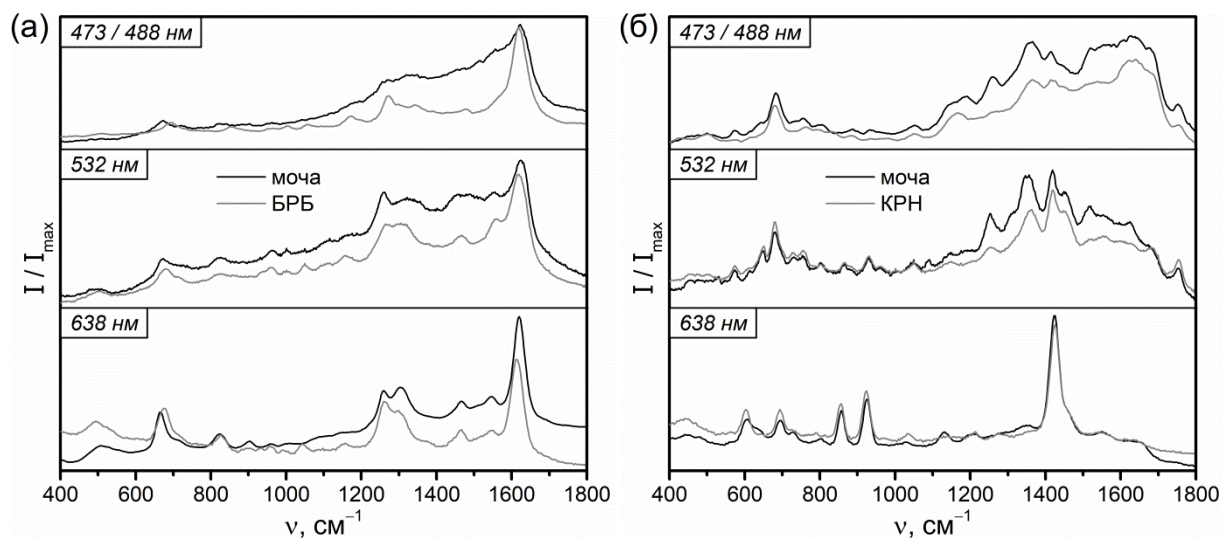


Рис. 3.2. Профили ГКР-спектров мочи и фонообразующих компонентов БЖЧ в (а) кислой (рН 1.5) и (б) щелочной (рН 12.5) средах при различных длинах волн возбуждающего излучения.

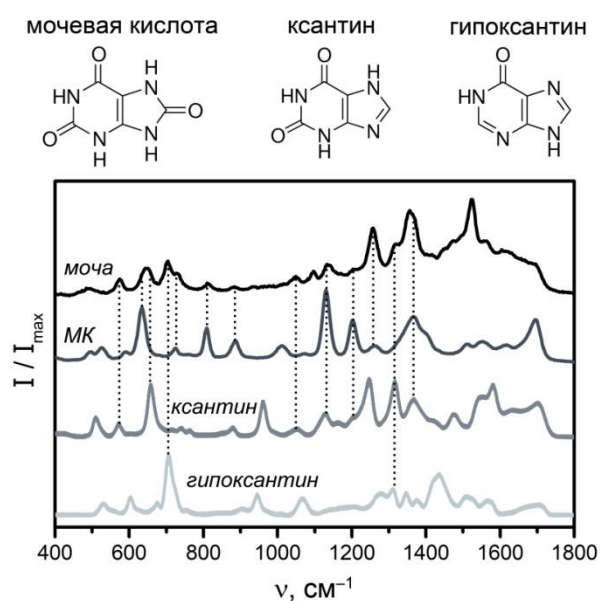


Рис. 3.3. Сравнение ГКР-спектров мочи и пуриновых оснований (МК, ксантина и гипоксантина). Спектры ксантина и гипоксантина взяты из работы [73].

Приведённые выше обсуждения о ГКР-сигнале основных фонообразующих эндогенных компонентов мочи в полной мере относятся и к другим БЖЧ с той лишь разницей, что данные компоненты находятся в плазме крови и слюне в иных соотношениях и концентрациях. Однако, как ранее обсуждалось, в плазме крови и слюне присутствуют значительные

концентрации высокомолекулярных соединений, которые хоть и не продуцируют значимый ГКР-сигнал, но мешают адсорбции молекул аналитов. Наконец, при использовании длин волн возбуждения сине-зеленого диапазона (400–550 нм) в ГКР-спектрах плазмы крови возможно появление пиков резонансного КР каротиноидов (β -каротина, ликопина и лютеина) [74].

Таким образом, представленные выше результаты наглядно показывают, что эндогенные компоненты БЖЧ способны к генерации интенсивного ГКР-сигнала во всех диапазонах рН. Причём изучение возможности прямого ГКР-определения ЛВ (САА, ЦСА, ФХА) в моче показало, что при использовании простых этапов пробоподготовки (разбавление и варьирование рН образца перед ГКР-анализом) профили ГКР-сигнала мочи без и с добавлением молекул аналитов практически полностью совпадают независимо от величины разбавления и рН образцов. Таким образом, происходит подавление сигнала ЛВ сигналом эндогенных компонентов мочи, что свидетельствует о существенно более сильном взаимодействии поверхности ГКР-подложки с компонентами мочи нежели с молекулами ЛВ. Поэтому для устранения негативного влияния основных фонообразующих компонентов БЖЧ в последующих разделах данной главы описано предложенное нами совмещение ГКР с некоторыми методами разделения и концентрирования (НТФЭ, ЖЖЭ, ТСХ), а также маскированием. Причём в качестве ГКР-подложки везде применяли стандартные и простые в приготовлении СНЧ, стабилизированные гидроксиламином.

3.2. Совмещение ГКР-анализа с колоночной неудерживающей ТФЭ на силикагеле для определения цефалоспориновых антибиотиков

Формат НТФЭ-ГКР-анализа

Как было показано в разделе 2.5, ЦСА могут иметь интенсивный ГКР-сигнал как в кислой и щелочной средах, так и в нейтральной при использовании активирующего агента. Поэтому выбор оптимальных условий регистрации ГКР-сигнала аналита должен быть в первую очередь обусловлен

особенностями анализируемой матрицы и направлен на подавление фонового сигнала мешающих компонентов. Поэтому для разделения молекул ЦСА и фонообразующих компонентов мочи перед ГКР-измерениями предложены две методики пробоподготовки образцов мочи, основанные на проведении НТФЭ с использованием (1) силикагеля (текущий раздел) и (2) геля гидроксида алюминия (ГГА) (раздел 3.3). Каждая из методик удаляет разные мешающие компоненты, а фоновый сигнал оставшихся компонентов устраняется варьированием рН. В методике с использованием силикагеля разделение проводили путём пропускания порции мочи через колонку, заполненную порошком силикагеля (4–50 мкм, ООО «ХромЛаб»), после чего раствор, полученный на выходе из колонки, помещали на предметно стекло (рис. 3.4а) и использовали для ГКР-измерений с помощью КР-спектрометра, совмещенного с конфокальным оптическим микроскопом.

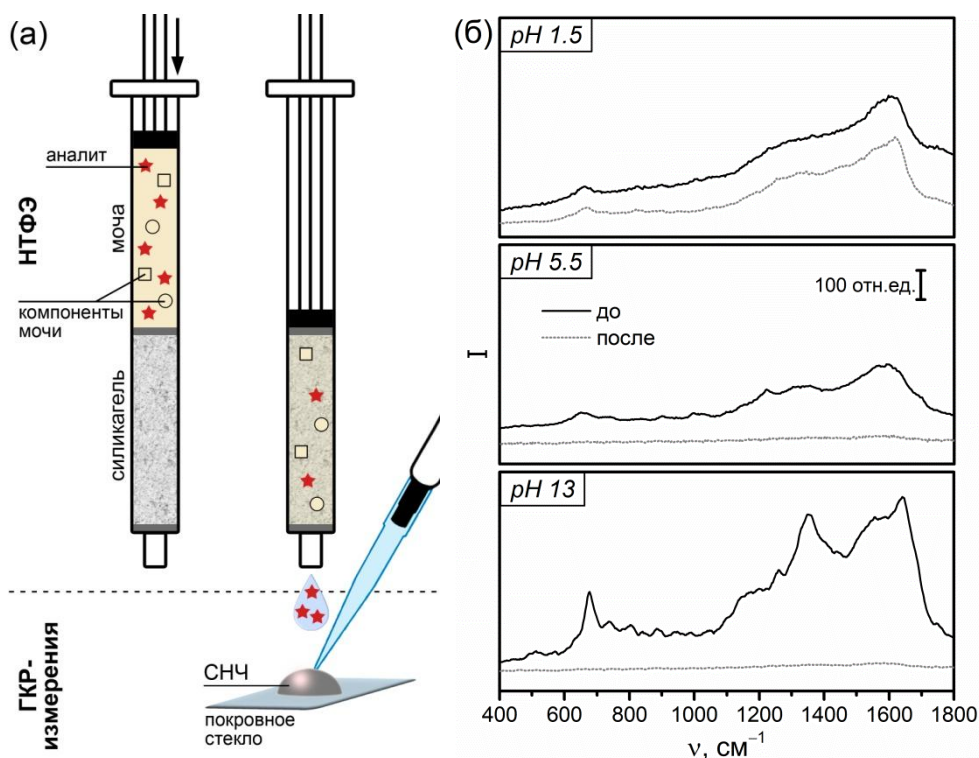


Рис. 3.4. (а) Схема проведения НТФЭ в колоночном формате. (б) Влияние величины рН образца УМ (до и после пропускания через колонку с силикагелем) на ГКР-сигнал образца.

Влияние pH мочи на эффективность разделения

Предварительные эксперименты по измерению собственного ГКР-сигнала образцов мочи, пропущенных через силикагель, показали, что использование подкисленной мочи не позволяет снизить фоновый ГКР-сигнал (рис. 3.4б), обусловленный присутствием УБЛ (рис. 3.2а). Данный результат обусловлен протонированием молекул УБЛ, что ухудшает их сорбцию силикагелем. С другой стороны, пропускание через колонку мочи с нейтральным и щелочным значением pH (рис. 3.4б) показало практически полное отсутствие фонового ГКР-сигнала компонентов мочи. Это свидетельствует об эффективной сорбции силикагелем основных фонообразующих компонентов мочи при данных условиях, а именно пуриновых оснований (МК, ксантина и гипоксантина; рис. 3.3) и КРН (рис. 3.2б), находящихся в нейтральном или депротонированном состояниях при данных условиях [75]. Отметим, что для экспериментов в кислой и щелочной средах использовали значения pH, позволяющие достигать максимально интенсивных ГКР-спектров ЦСА (1.5 и 13, соответственно).

Поскольку силикагель является неселективным сорбентом, в ходе НТФЭ происходит частичная потеря молекул аналита в связи с их сорбцией силикагелем. Спектрофотометрическое исследование изменения концентрации ЦСА после пропускания их растворов через колонку показало, что сорбция аналитов на силикагеле в нейтральной среде выше, чем в щелочной (рис. 3.5а). Таким образом, в нейтральной среде (pH 5.5) потери молекул аналита в ходе НТФЭ выше и, несмотря на не очень большую разницу в потерях, оставшихся молекул недостаточно для генерации ГКР-сигнала необходимой интенсивности (рис. 3.5б).

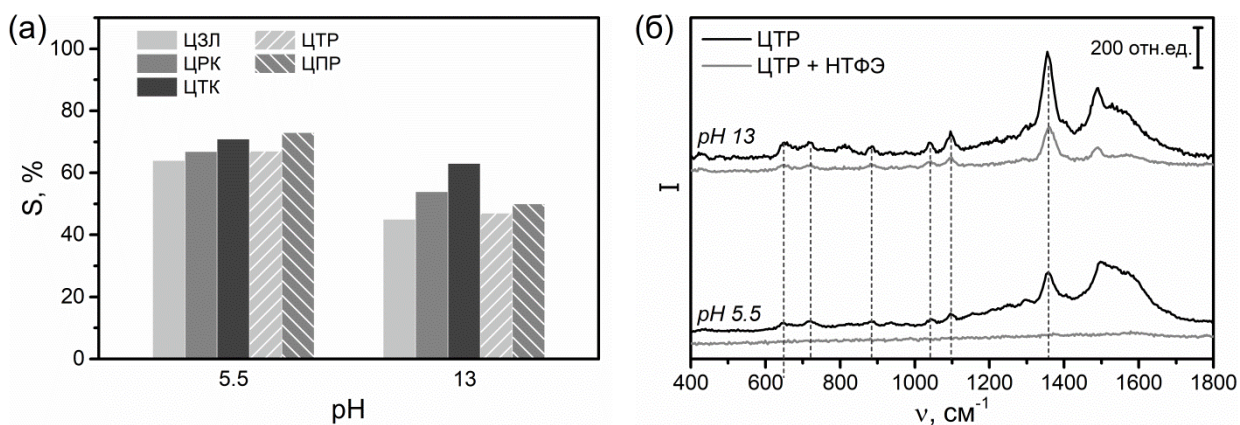


Рис. 3.5. (а) Влияние рН среды на степень сорбции (S) ЦСА на силикагеле. Данные получены с помощью спектрофотометрии. **(б)** Влияние рН на ГКР-сигнал водного раствора ЦТР (50 мкг/мл) до (ЦТР) и после (ЦТР + НТФЭ) пропускания через силикагель; вертикальные линии отражают положение наиболее интенсивных пиков ЦТР.

Таким образом, корректировка уровня рН анализируемой мочи до ~ 13 позволяет достичь наиболее эффективного отделения ЦСА от компонентов мочи в ходе НТФЭ перед их ГКР-детектированием. Поэтому данное значение использовали в конечной методике НТФЭ-ГКР-определения ЦСА при использовании силикагеля в качестве сорбента. Дополнительно определена оптимальная масса силикагеля, необходимая для достижения максимального ГКР-сигнала аналитов после проведения НТФЭ (рис. 3.6).

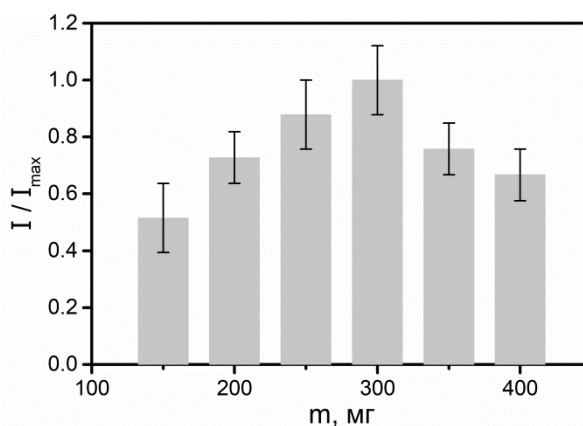


Рис. 3.6. Влияние массы силикагеля в колонке на интенсивность ГКР-сигнала ЦТР после пропускания мочи с добавкой ЦТР (10 мкг/мл) через колонку.

Методика анализа и её метрологические характеристики

Таким образом, итоговая методика НТФЭ-ГКР-детектирования ЦСА в моче включает следующие шаги:

- (1) корректировку рН мочи до значения 13 для максимизации интенсивности ГКР-сигнала ЦСА и эффективной очистки от фонообразующих компонентов мочи;
- (2) очистку аналитов от компонентов мочи путём проведения НТФЭ: пропускание порции подщелоченной мочи (0.6 мл) через колонку с силикагелем (300 мг);
- (3) проведение регистрации ГКР-спектров смеси мочи (10 мкл), прошедшей через колонку, и СНЧ (10 мкл), заранее сконцентрированных в 10 раз путём центрифугирования, и анализ результатов.

Общая продолжительность методики анализа составляет менее 10 мин. ГКР-измерения проводили с использованием КР-спектрометра Solar ТП, совмещенного с инвертированным микроскопом (объектив 100x/0.9 NA) с конфокальной оптической системой; длина волны лазера – 473 нм, мощность лазера на образце – 9 мВт, время накопления сигнала – 1 с.

Сравнение ГКР-спектров мочи с добавкой некоторых ЦСА (ЦТР, ЦЗЛ, ЦПР) до и после этапа очистки (рис. 3.7) наглядно демонстрирует значительное улучшение отношения «сигнал/шум». Так, в случае определения ЦТР в моче НТФЭ-ГКР-методика имеет следующие метрологические характеристики: s_r 15–21%, правильность 87–112%, значения c_{min} и c_{lim} составили 0.2 и 2.0 мкг/мл, соответственно (градуировочная зависимость, полученная с применением 5 образцов мочи, представлена на рис. 3.8). Достаточно высокие значения s_r обусловлены как изменчивостью матрицы мочи от образца к образцу, так и погрешностями, внесенными этапом НТФЭ. Однако для ЦТК и ЦРК использование предложенной методики не позволило получить их ГКР-сигнал приемлемой интенсивности, что обусловлено их собственной низкой интенсивностью ГКР-сигнала в щелочной среде (рис. 2.10а). Таким образом, разработанная методика универсальна для определения трёх представителей ЦСА (ЦТР, ЦЗЛ, ЦПР).

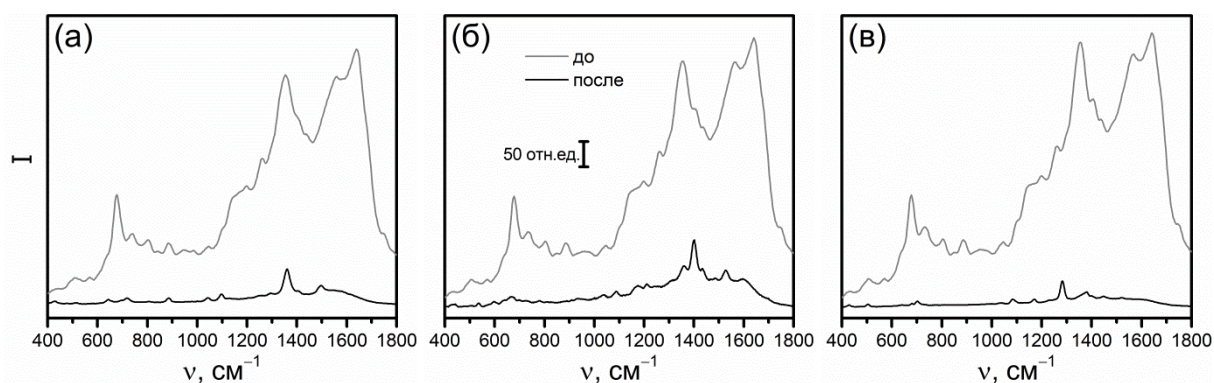


Рис. 3.7. ГКР-спектры образцов мочи с добавкой (а) ЦТР, (б) ЦЗЛ и (в) ЦПР (10 мкг/мл) до и после пропускания через колонку с силикагелем.

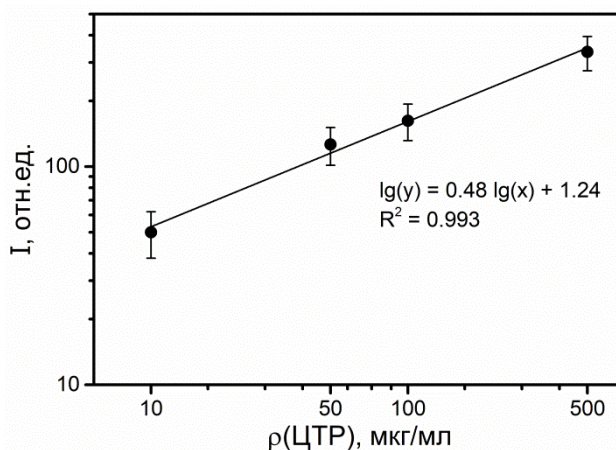


Рис. 3.8. Градуировочная зависимость для НТФЭ-ГКР-определения ЦТР в моче (по пику при 1358 см^{-1}).

3.3. Совмещение ГКР-анализа с неудерживающей ТФЭ на геле гидроксида алюминия для определения цефалоспориновых антибиотиков

Формат НТФЭ-ГКР-анализа и приготовление сорбента

Поскольку НТФЭ не подразумевает экстракцию аналита, то больших соотношений «образец/сорбент» и использование больших объёмов образца не требуется. Поэтому решено отказаться от колоночного формата проведения НТФЭ и перейти к более простому формату, включающему следующие шаги (рис. 3.9): смешивание порции сорбента и анализируемого образца, находящихся в микропробирке для центрифугирования; тщательное встряхивание смеси для ускорения сорбции компонентов мочи на сорбенте; осаждение сорбента центрифугированием и отбор надосадочной жидкости

для последующего ГКР-анализа. В текущей методике ГКР-анализ проводили с помощью портативного КР-спектрометра со стандартным оптическим зондом, соединенным со спектрометром с помощью оптоволоконна, регистрируя сигнал через стенку стандартной кварцевой кюветы для спектрофотометрии, содержащей смесь надосадочной жидкости, СНЧ и активирующего агента.



Рис. 3.9. Схема процедуры пробоподготовки образца мочи с использованием ГГА и приготовления смеси для ГКР-измерений.

В данном разделе изучена возможность проведения НТФЭ с использованием сорбента, обладающего основными свойствами. Наиболее простым и распространенным сорбентом такого типа является оксид алюминия, однако тестовые эксперименты с сухим оксидом алюминия (0.04–0.20 мм, ООО «ХромЛаб») показали, что он недостаточно эффективно связывает основные фонообразующие эндогенные компоненты мочи. С другой стороны свежесинтезированный гель ГГА, показал большую сорбционную эффективность. Образцы ГГА синтезировали, используя простую и быструю методику, состоящую в одновременном добавлении растворов сульфата алюминия (2.5 мл, 200 мг/мл) и карбоната натрия (2 мл, 120 мг/мл) в воду (9.5 мл) при интенсивном перемешивании смеси с помощью магнитной мешалки (500 об./мин.), которое прекращали через 5 минут после начала синтеза. Затем смесь порциями по 1.75 мл помещали в пластиковые микропробирки для центрифугирования объемом 2 мл, центрифугировали (1700×g, 2 мин.) и промывали 2 раза, повторяя

ресуспензирование в воде (до объёма 2 мл) и последующее центрифугирование. После последнего центрифугирования и завершения промывки из каждой пробирки с сорбентом удаляли 1.5 мл воды, и оставшиеся порции осадка ГГА (~ 0.5 мл) хранили в закрытых пробирках при комнатной температуре и затем использовали для проведения НТФЭ.

Эффективность НТФЭ-разделения и влияние состава активирующего агента на ГКР-сигнал анализируемой смеси после разделения

Поскольку ГГА растворяется и в кислых, и в щелочных средах, то изучение влияния рН на эффективность разделения мешающих компонентов и молекул ЦСА не проводили, и процедуру НТФЭ осуществляли только в нейтральной среде. Однако для достижения максимально интенсивного сигнала аналита, а также дополнительного исследования эффективности очистки аналита от примесей, изучена зависимость ГКР-сигнала анализируемого раствора после НТФЭ от состава активирующего агента (HCl, NaCl или NaOH).

Спектрофотометрическое изучение эффективности НТФЭ с использованием растворов чистых фонообразующих компонентов БЖЧ показало, что наиболее эффективно НТФЭ удаляет КРН, которого остаётся только ~7% от исходной концентрации (рис. 3.10а). Однако ГКР-анализ образцов мочи после НТФЭ с использованием NaOH в качестве активатора показал, что даже снижение концентрации КРН более чем на порядок не приводит к заметному снижению фонового ГКР-сигнала, обусловленного присутствием КРН (рис. 3.11, рН 12.5).

В случае МК использование НТФЭ приводит к снижению концентрации только до 25–30% от исходной (рис. 3.10а), а ГКР-измерения мочи после НТФЭ (рис. 3.11, рН 5.5) показали, что фоновый сигнал, обусловленный присутствием пуриновых оснований (рис. 3.3), изменился незначительно.

Наконец, в случае УБЛ использование НТФЭ позволяет снизить концентрацию до ~13% от исходной (изучено на примере БРБ, рис. 3.10а–правая ось у), а ГКР-анализ образцов мочи после НТФЭ с использованием

НСI в качестве активатора показал значительное снижение собственного ГКР-сигнала мочи (рис. 3.11, рН 1.5). Этот результат свидетельствует об эффективном удалении молекул УБЛ, имеющих интенсивный ГКР-сигнал в кислой среде (рис. 3.2а), чему также способствует то, что концентрация УБЛ в моче изначально значительно ниже по сравнению с МК и КРН (в ~10 и ~40 раз, соответственно). Таким образом, только использование НСI в качестве активатора СНЧ при регистрации ГКР-спектров растворов мочи после НТФЭ с использованием ГГА позволяет полностью подавить фоновый сигнал (рис. 3.11).

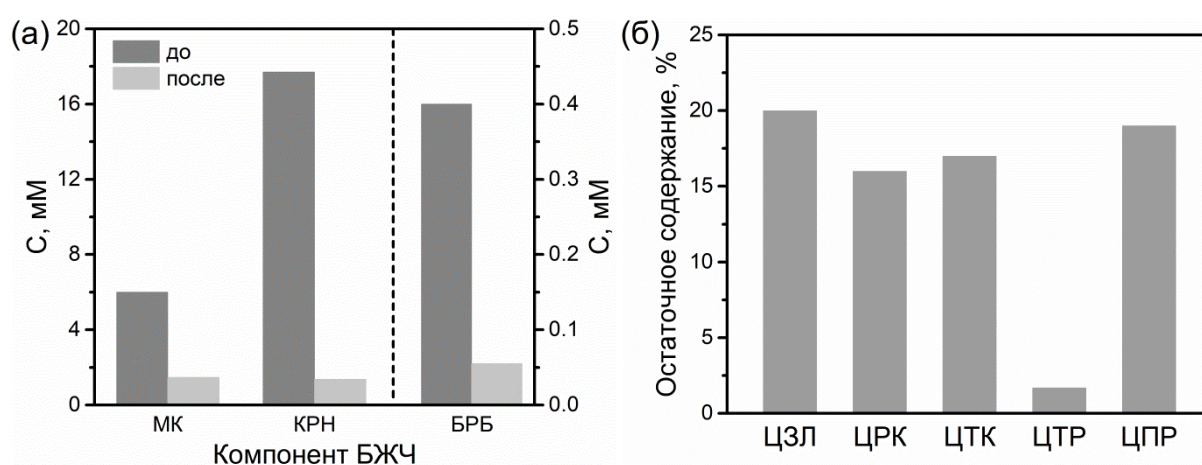


Рис. 3.10. Содержание основных фонообразующих компонентов БЖЧ (а) и ЦСА (б) в образце до и после проведения НТФЭ с использованием ГГА (согласно спектрофотометрическим измерениям). Для компонентов БЖЧ использовали их усредненные физиологические концентрации в моче, а для всех ЦСА использовали 100 мкг/мл.

Оценка влияния этапа НТФЭ на концентрацию молекул аналита показала, что почти все ЦСА (кроме ЦТР) демонстрируют примерно одинаково высокое снижение концентрации после проведения пробоподготовки (~80%, рис. 3.10б). Максимальное снижение наблюдали для ЦТР, в случае которого только ~2% от исходной концентрации аналита остаётся в надосадочной жидкости после взаимодействия с ГГА. При этом можно выделить два процесса, приводящих к снижению концентрации аналитов: (1) частичная сорбция молекул аналита на ГГА (как и в случае НТФЭ с силикагелем) и (2) разбавление образца. Первый процесс приводит к

полной потере молекул аналита, делая их недоступными для дальнейшего ГКР-детектирования. Второй процесс также нельзя избежать при НТФЭ с использованием ГГА, поскольку он обусловлен приготовлением и использованием ГГА в виде суспензии с некоторым избытком содержания воды. Точное определение вклада каждого из процессов затруднительно, поэтому и проведена оценка общего эффекта, измеряя конечные концентрации ЦСА по спектрам поглощения их водных растворов до и после взаимодействия с ГГА. К счастью, несмотря на значительность снижения концентраций ЦСА, чувствительность ГКР всё же позволяет проводить детектирование ГКР-спектров, пригодных для количественного анализа.

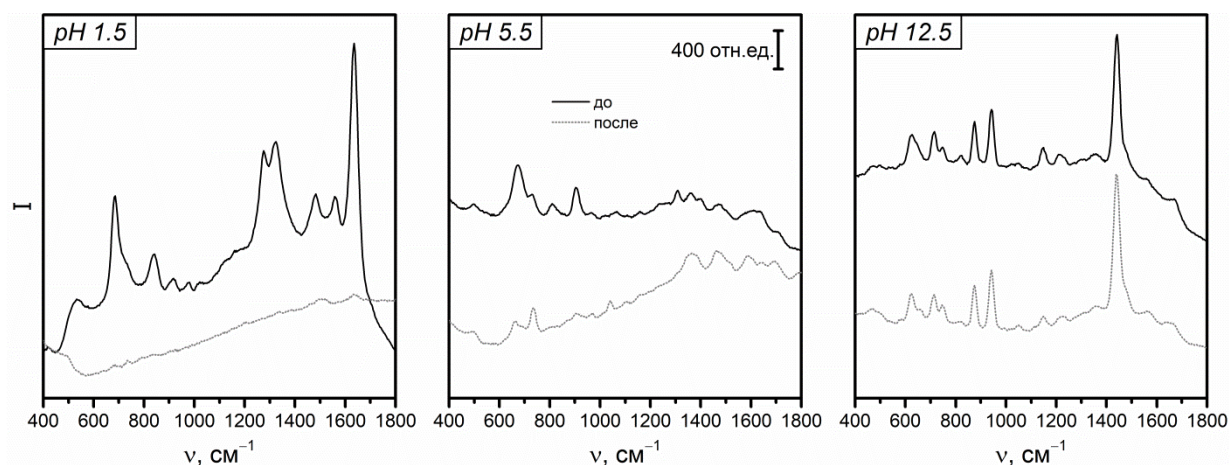


Рис. 3.11. Влияние добавки активирующего агента (pH 1.5 – HCl; pH 5.5 – NaCl; pH 12.5 – NaOH) на ГКР-спектры УМ после её пробоподготовки с помощью НТФЭ с использованием ГГА.

Воспроизводимость синтеза ГГА и влияние срока его хранения на ГКР-сигнал

Несмотря на значительное уменьшение фонового сигнала после НТФЭ, использование ГГА может увеличивать погрешность анализа, поскольку состав ГГА может изменяться со временем вследствие перехода из гидроксида в оксид алюминия. Поэтому изучено влияние воспроизводимости синтеза и времени хранения ГГА на интенсивность ГКР-спектров и спектров поглощения раствора ЦСА (на примере ЦЗЛ) после проведения НТФЭ. Установлено, что разработанная методика синтеза ГГА является воспроизводимой, поскольку погрешность аналитического сигнала при

использовании разных партий ГГА менее 6% (рис. 3.12а). Также оптическая плотность ЦЗЛ после контакта с образцами ГГА, хранившимися разное время, не претерпевала снижения интенсивности (рис. 3.12б). Таким образом, сорбционные свойства ГГА хорошо воспроизводятся и стабильны в течение минимум 3.5 дней.

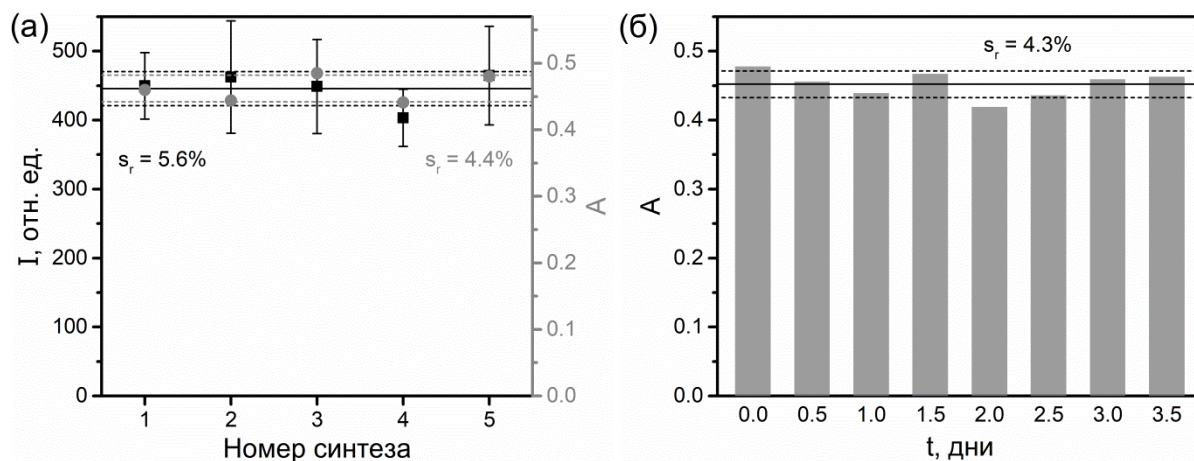


Рис. 3.12. (а) Результаты изучения воспроизводимости синтеза ГГА, полученные путём измерения ГКР-сигнала (по пику при 1371 см^{-1}) и оптической плотности раствора ЦЗЛ (50 мкг/мл) после взаимодействия с ГГА. **(б)** Зависимость оптической плотности раствора ЦЗЛ (50 мкг/мл) после взаимодействия с образцами ГГА, хранившимися в течение разного времени.

Методика анализа и её метрологические характеристики

Итоговая методика НТФЭ-ГКР-анализа с использованием ГГА в качестве сорбента включает следующие шаги (рис. 3.9):

- (1) смешивание ГГА и порции мочи (100 мкл), содержащей ЦСА, встряхивание (5 мин) и центрифугирование смеси ($1700\times g$, 2 мин), отбор порции надосадочной жидкости (100 мкл для ЦЗЛ, ЦПР и ЦТК, 175 мкл для ЦТР и ЦРК);
- (2) добавление активирующего агента (НС1, 1 М, 25 мкл) и СНЧ (450 мкл) к отобранной порции надосадочной жидкости;
- (3) помещение анализируемой жидкости в кварцевую кювету, проведение ГКР-измерений и анализ результатов.

Продолжительность анализа составляет примерно 15 мин. ГКР-анализ проводили с использованием портативного КР-спектрометра QEPro (Ocean

Optics): длина волны лазера – 638 нм, мощность лазера на образце – 18 мВт, числовая апертура зонда – 0.22, время накопления сигнала – 1 с.

Важно отметить, что для разных ЦСА осуществляли отбор разных объёмов надосадочной жидкости после НТФЭ: 100 мкл для ЦЗЛ, ЦПР и ЦТК и 175 мкл для ЦТР и ЦРК. Увеличение объёма растворов в случае ЦТР и ЦРК необходимо для детектирования этих антибиотиков в требуемом для ТЛМ диапазоне концентраций. Хотя этот момент несколько снижает универсальность конечной методики, он не является проблемой для практической реализации, поскольку ТЛМ предполагает наличие информации о принимаемых пациентом антибиотиках.

Согласно градуировочным графикам, полученным для образцов мочи с добавлением аналитов (рис. 3.13), почти все исследуемые ЦСА могут быть обнаружены в концентрациях, необходимых для осуществления ТЛМ. Исключение составляет ЦРК, ГКР-сигнал которого обнаружен лишь при более высоких концентрациях в моче (>200 мкг/мл) из-за его собственной низкой интенсивностью ГКР-сигнала в кислой среде (рис. 2.10а), что делает методику пригодной только для качественного определения данного антибиотика в ходе ТЛМ. Так, наличие ГКР-сигнала ЦРК любой интенсивности свидетельствует о его нормальном выведении, в то время как отсутствие сигнала будет указывать на его задержку в организме.

Для большинства ЦСА полученные градуировочные графики имеют нелинейный вид, аппроксимируемый полиномиальными функциями (табл. 3.2), в то время как градуировочная зависимость для ЦРК является линейной. В данном случае сложный вид зависимости интенсивности сигнала от концентрации аналита мы связываем с реализацией в ходе анализа сразу нескольких процессов, а именно (1) адсорбции аналита на поверхности ГКР-подложки и (2) побочных процессов, происходящих во время НТФЭ (разбавление и удержание молекул аналита). Тем не менее, все градуировочные зависимости воспроизводимы, что свидетельствует о

применимости НТФЭ-ГКР-методики для определения ЦСА в моче в требуемых диапазонах концентраций.

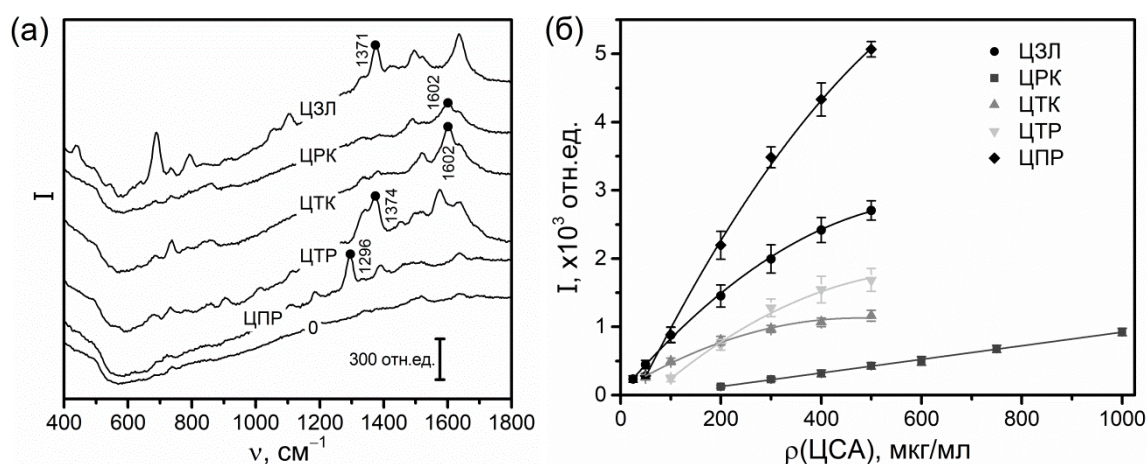


Рис. 3.13. (а) ГКР-спектры УМ без (0) и с добавкой ЦСА после проведения НТФЭ с использованием ГГА. Концентрации ЦСА в моче: 25 мкг/мл для ЦЗЛ, 50 мкг/мл для ЦТК и ЦПР, 100 мкг/мл для ЦТР, 200 мкг/мл для ЦПР. Выделенные пики использовали для построения градуировочных зависимостей. (б) Градуировочные зависимости для НТФЭ-ГКР-определения ЦСА в моче.

Табл. 3.2. Метрологические характеристики НТФЭ-ГКР-методики определения ЦСА в моче (данные получены с использованием 5 образцов мочи).

Аналит	Диапазон концентраций, мкг/мл	Уравнение градуировочной зависимости	$s_r, \%$	Прав., %	$C_{min},$ мкг/мл	$C_{lim},$ мкг/мл
ЦЗЛ	25–500	$y = -0.007x^2 + 8.6x + 30$ $R^2 = 0.999$	5–20	96–107	3.5	19
ЦРК	200–1000	$y = 1.0x - 74$ $R^2 = 0.999$	6–18	96–102	135	280
ЦТК	50–500	$y = -0.005x^2 + 4.4x + 68$ $R^2 = 0.994$	6–15	90–108	22	34
ЦТР	100–500	$y = -0.006x^2 + 7.0x - 409$ $R^2 = 0.995$	8–17	96–107	71	92
ЦПР	50–500	$y = -0.009x^2 + 15x - 479$ $R^2 = 0.999$	3–13	93–103	35	45

Наравне с усиливающими свойствами ГКР-подложки, взаимодействие между аналитом и поверхностью подложки относится к наиболее значимым факторам, обуславливающим разницу интенсивности ГКР-сигнала между различными аналитами и определяющим чувствительность и селективность прямого ГКР-анализа (раздел 1.2). Это взаимодействие напрямую связано с

константой адсорбции и может быть косвенно оценено путём анализа коэффициента чувствительности градуировочной зависимости. Согласно уравнениям градуировочных зависимостей НТФЭ-ГКР-определения ЦСА в моче, построенным в диапазоне концентраций, в котором наблюдается линейная зависимость сигнала от концентрации (табл. 3.3), ЦПР и ЦРК обладают самым сильным и самым слабым взаимодействиями с ГКР-подложкой, соответственно. ЦЗЛ и ЦТР обладают довольно схожей силой взаимодействия, а ЦТК находится где-то между ЦЗЛ/ЦТР и ЦРК. Поэтому мы ожидаем, что другие ЛВ или высокие концентрации эндогенных компонентов мочи будут оказывать минимальное влияние на определение ЦЗЛ, ЦПР и ЦТР и максимальное – на определение ЦРК.

Табл. 3.3. Уравнения градуировочных зависимостей для НТФЭ-ГКР-определения ЦСА в моче в диапазоне концентраций, в котором наблюдается линейная зависимость сигнала от концентрации.

Аналит	Диапазон концентраций, мкг/мл	Уравнение градуировочной зависимости
ЦЗЛ	25–200	$y = 7.4x + 56$ $R^2 = 0.994$
ЦРК	200–1000	$y = 1.0x - 74$ $R^2 = 0.999$
ЦТК	50–200	$y = 3.6x + 97$ $R^2 = 0.991$
ЦТР	100–300	$y = 5.0x - 261$ $R^2 = 0.999$
ЦПР	50–300	$y = 13x - 362$ $R^2 = 0.999$

Дополнительно следует отметить, что в случае проведения НТФЭ с использованием ГГА значения s_t ниже, чем при использовании силикагеля (8–17 против 15–21% в случае ЦТР). Это обусловлено применением разных схем регистрации ГКР-сигнала. Так, в случае НТФЭ с использованием силикагеля применяли КР-спектрометр, совмещенный с конфокальным микроскопом, позволяющим регистрировать ГКР-сигнал с крайне маленького участка образца (~1 мкм²). В результате это привело к высокой чувствительности детектирующей системы к локальным (на микроуровне)

неоднородностям исследуемого образца, и, в первую очередь, к неоднородному распределению частиц ГКР-подложки (агломератов СНЧ).

В методике же НТФЭ с использованием ГГА регистрацию спектров осуществляли с использованием портативного КР-спектрометра, совмещенного с оптическим зондом с низкой числовой апертурой (0.22) и значительно уменьшенным пространственным разрешением оптической системы (площадь регистрации >10 мкм²). Таким образом, снижение s_r методики анализа с использованием ГГА мы связываем не с различием в сорбентах, а с уменьшением чувствительности детектирующей системы к локальным неоднородностям ГКР-подложки, что обеспечивает получение усредненного ГКР-сигнала. Установленное влияние оптической системы на точность ГКР-анализа показывает дополнительное преимущество портативных КР-спектрометров (помимо компактности и мобильности) для рутинного ГКР-анализа по сравнению со сложными стационарными КР-спектрометрами.

3.4. Совмещение ГКР-анализа с ЖЖЭ для определения сульфаниламидных антибиотиков

Оптимизация методики ЖЖЭ-ГКР-анализа

Поскольку САА имеют интенсивный ГКР-сигнал в сильноокислых (рН 1.25) и сильнощелочных (рН 12.5) средах (раздел 2.3, рис. 2.3), то регистрацию спектров мочи с добавкой САА проводили при данных условиях (рис. 3.14). Установлено, что в щелочной среде ГКР-сигнал САА полностью перекрывается интенсивным фоновым сигналом мочи, делая невозможным определение концентрации ЛВ. Разбавление образца и корректировка рН до 1.25 перед ГКР-измерениями позволяют зарегистрировать сигнал САА (пример для СМЗ на рис. 3.14а), отличный от фонового сигнала, однако его интенсивность недостаточна для проведения точного и достоверного определения концентрации. Поэтому для устранения фонового сигнала и нивелирования влияния компонентов мочи на сигнал

САА предложено использовать ЖЖЭ в качестве дополнительного этапа пробоподготовки перед проведением ГКР-анализа. В общих чертах данная методика состояла в перемешивании порции несмешивающегося с водой растворителя с порцией мочи, содержащей САА, после чего растворитель с экстрагированными молекулами отделяли, растворитель выпаривали, сухой остаток перерастворяли в воде и использовали для ГКР-анализа.

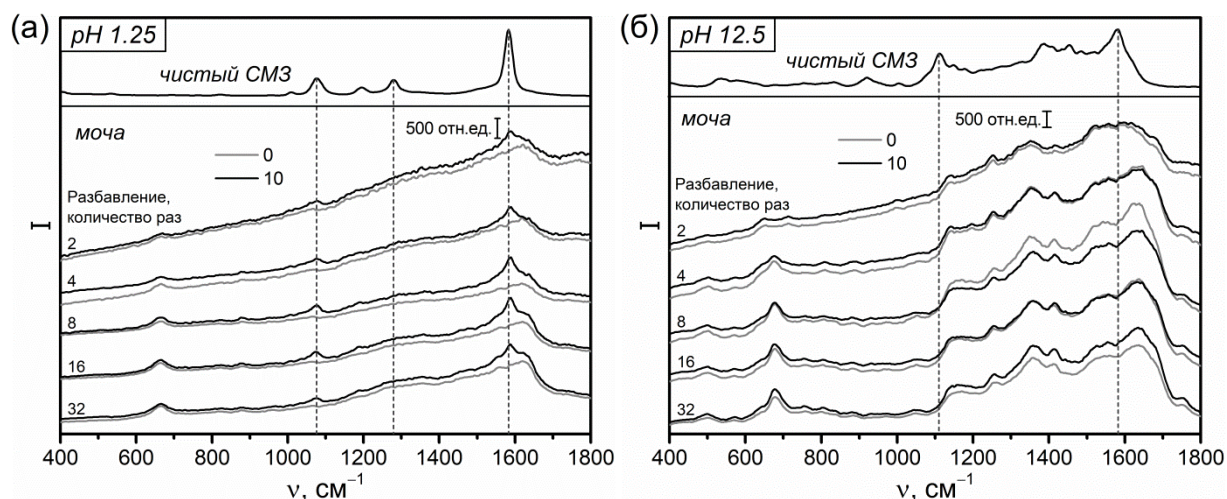


Рис. 3.14. Влияние разбавления и pH на ГКР-спектры УМ без (0) и с (10) добавкой СМЗ (10 мкг/мл). ГКР-спектр чистого СМЗ использовали в качестве контроля.

Предварительное спектрофотометрическое изучение влияния состава растворителя и pH раствора САА на эффективность ЖЖЭ показало, что оптимальным растворителем является хлороформ (на примере СМЗ, рис. 3.15а), а использование растворов с pH 4 позволяет достичь максимальной эффективности экстракции САА (рис. 3.15б). Контроль уровня pH особенно важен в случае экстракции аналитов из мочи, поскольку pH мочи даже здорового человека варьируется в достаточно широком диапазоне (5–7) и требует корректировки перед проведением ЖЖЭ. Согласно информации о константах ионизации САА [36], при $\text{pH} < 2$ и $\text{pH} > 6$ происходит полное протонирование и депротонирование молекул САА, соответственно, что и приводит к снижению эффективности экстракции вне диапазона pH 2–6. Наконец, установлено, что перемешивание растворителя с раствором САА в течение 5 мин является достаточным для достижения равновесия и завершения экстракции.

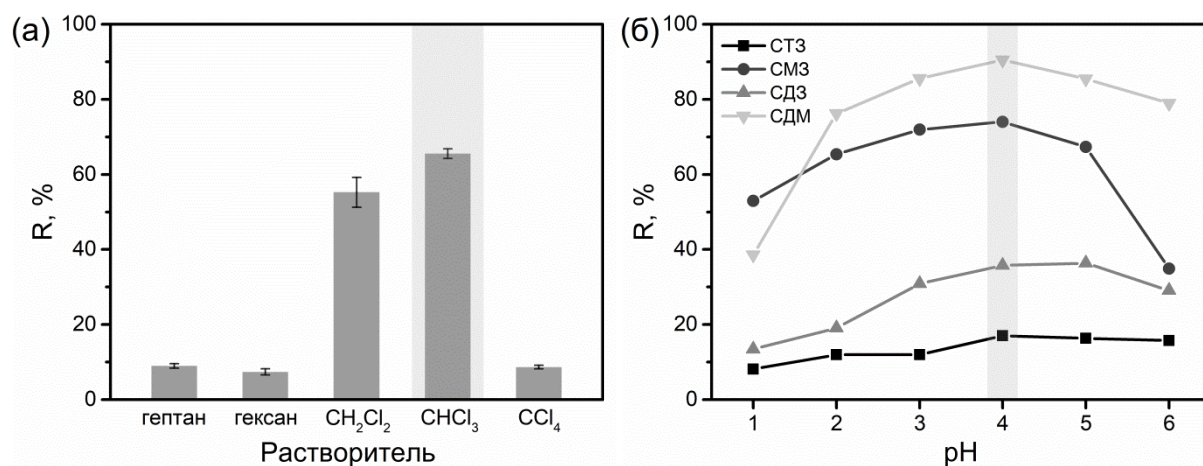


Рис. 3.15. (а) Эффективность экстракции СМЗ из его водного раствора (50 мкг/мл; рН 5.5) различными органическими растворителями; R – степень извлечения. **(б)** Влияние значения рН водных растворов САА (50 мкг/мл) на степень извлечения с использованием хлороформа в качестве экстрагирующего растворителя.

Поскольку молекулы органических растворителей имеют высокую КР-активность, их присутствие мешает проведению ГКР-анализа. Поэтому обязательным финальным шагом этапа ЖЖЭ стало удаление хлороформа из его смеси с экстрагированными молекулами САА, и перерастворение последних в порции воды. Следовательно, далее под «экстрактом для ГКР-анализа» мы будем подразумевать именно водный раствор САА, полученный после удаления хлороформа и перерастворения САА в воде. ГКР-измерения экстрактов образцов мочи, полученных после проведения оптимизированного этапа ЖЖЭ, показали, что ЖЖЭ всё же не обеспечивает полного отделения молекул аналитов от всех фонообразующих компонентов мочи. Так, при регистрации спектров экстрактов в щелочной среде (рН 12.5) сохраняется интенсивный фоновый сигнал, обусловленный присутствием молекул КРН (пример для СЗМ на рис. 3.16а). Однако измерение ГКР-спектров экстрактов с рН равным 1.25 продемонстрировало значительное снижение уровня фонового сигнала и появление отчётливых и интенсивных спектров аналита, пригодных для определения концентрации САА (рис. 3.16б).

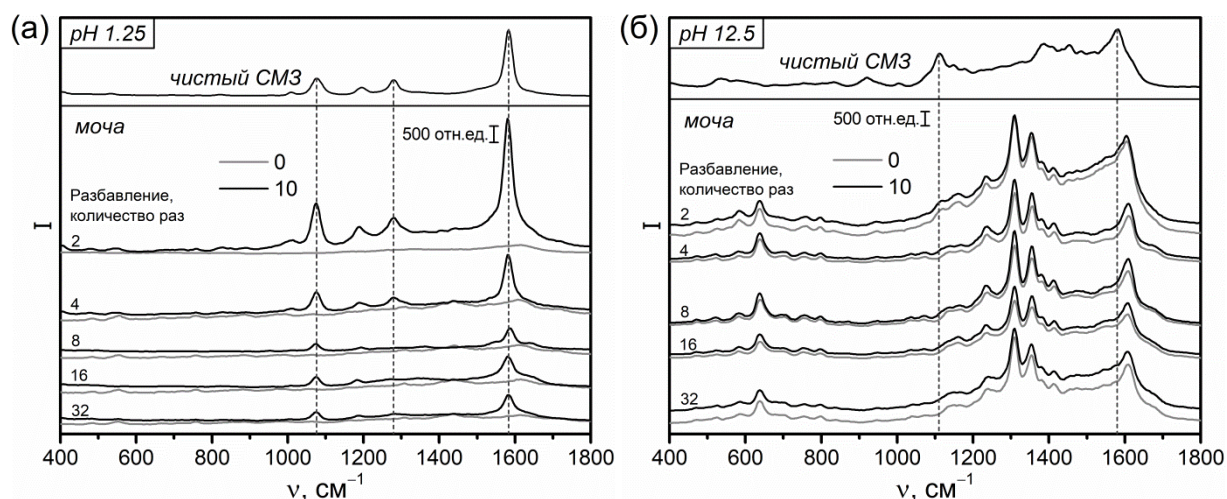


Рис. 3.16. ГКР-спектры экстрактов, полученных с помощью ЖЖЭ из образцов УМ без (0) и с (10) добавкой СМЗ (10 мкг/мл), и влияние на них значения рН во время ГКР-анализа, а также степени разбавления образцов мочи перед экстракцией.

Хотя одно только разбавление мочи не позволяет улучшить ГКР-детектирование САА (рис. 3.14а), проведение ЖЖЭ разбавленных образцов мочи, содержащих САА, позволило существенно повысить точность анализа. Во-первых, при разбавлении мочи в 16–32 раза устраняется разница между интенсивностями САА в образцах УМ и ДМ (рис. 3.17). Во-вторых, разбавление сводит к минимуму собственную буферную ёмкость мочи, облегчая корректировку её уровня рН. Так, в случае исходной и умеренно разбавленной (в 2–8 раз) мочи (и УМ, и ДМ) корректировка до рН 4 требует применения HCl различной концентрации. Разбавление же в 16 и более раз значительно снижает буферную ёмкость мочи, что позволяет использовать HCl фиксированного объёма и концентрации для корректировки до рН 4 независимо от времени сбора мочи. Однако разбавление мочи в 16–32 раза значимо снижает концентрацию аналита, что в данном случае не компенсируется чувствительностью ГКР-спектроскопии. Для минимизации этого недостатка использовали добавление меньшего объёма воды при приготовлении экстракта САА после испарения хлороформа. В итоге, разбавление мочи перед ЖЖЭ в 16 раз является оптимальным, поскольку большее разбавление не приводит к дальнейшему улучшению отношения

«сигнал/шум» и значительно уменьшает объём экстракта, доступного для ГКР-анализа.

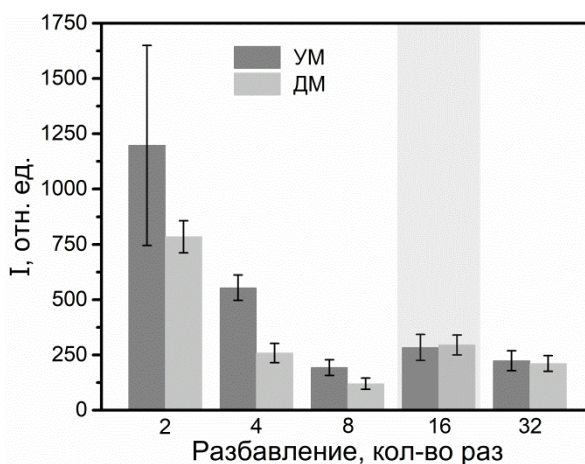


Рис 3.17. Зависимость интенсивности ГКР-сигнала СМЗ (по пику при 1074 см^{-1}) от степени разбавления образцов УМ и ДМ с добавкой СМЗ (10 мкг/мл) перед проведением ЖЖЭ. При разбавлении в 16 и 32 раза перерастворение СМЗ после удаления хлороформа осуществляли, используя в 2 и 4 раза меньшие объёмы воды, соответственно. Перед ГКР-измерениями значение рН всех экстрактов доводили до 1.25 с помощью HCl.

Методика анализа и её метрологические характеристики

Суммируя оптимальные условия, установленные выше, конечная методика ЖЖЭ-ГКР-детектирования САА в моче включает (рис. 3.18):

- (1) разбавление образца мочи в 16 раз и корректировку его рН до 4;
- (2) смешивание порции разбавленного образца (0.3 мл) с хлороформом (0.5 мл), перемешивание в течение 5 мин;
- (3) отбор экстрагированного анализита в хлороформе и испарение растворителя;
- (4) перевод экстрагированного анализита в водную фазу с использованием 150 мкл дистиллированной воды;
- (5) смешивание экстракта, раствора HCl (0.6 M) и ГКР-подложки (СНЧ) в объёмном отношении 1:5:6, детектирование ГКР-спектров и анализ результатов.

Все манипуляции, включая регистрацию ГКР-сигнала и обработку результатов, требуют в общей сложности примерно 30 мин. ГКР-измерения проводили с использованием КР-спектрометра Alpha300 RS (WITec),

совмещенного с оптическим микроскопом (объектив 20x/0.4 NA); длина волны лазера – 488 нм, мощность лазера на образце – 13 мВт, время накопления сигнала – 0.5 с.

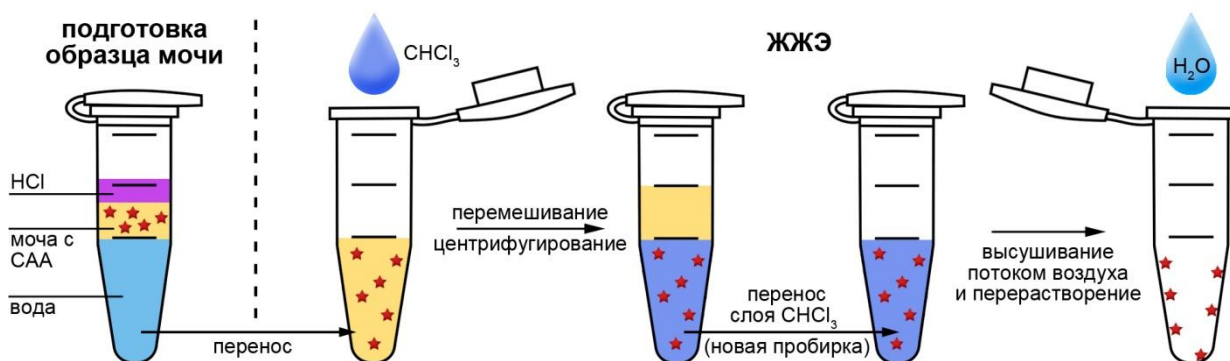


Рис. 3.18. Схема проведения процедуры ЖЖЭ молекул САА из образцов мочи перед ГКР-измерениями.

С использованием разработанной ЖЖЭ-ГКР-методики и 8 образцов мочи с искусственной добавкой СМЗ получен градуировочный график для определения СМЗ в моче (рис. 3.19а). Метрологические характеристики разработанной методики наглядно показывают её пригодность для использования на практике и осуществления ТЛМ: правильность 91–109%, s_r 11–18%, c_{\min} 1.7 мкг/мл, c_{\lim} 7.3 мкг/мл. Проверка эффективности разработанной методики для определения в моче других представителей САА также показала возможность устранения фонового сигнала и получения ГКР-спектров аналитов (рис. 3.19б), пригодных для осуществления количественного анализа. Наблюдаемые различия в интенсивности аналитического сигнала в данном случае обусловлены как различной степенью извлечения из мочи каждого конкретного САА (рис. 3.15б), так и различной интенсивностью их ГКР-спектров в кислой среде (рис. 2.3а). При этом для всех четырёх САА использовали концентрации, соответствующие минимально необходимыми для определения в моче при проведении ТЛМ.

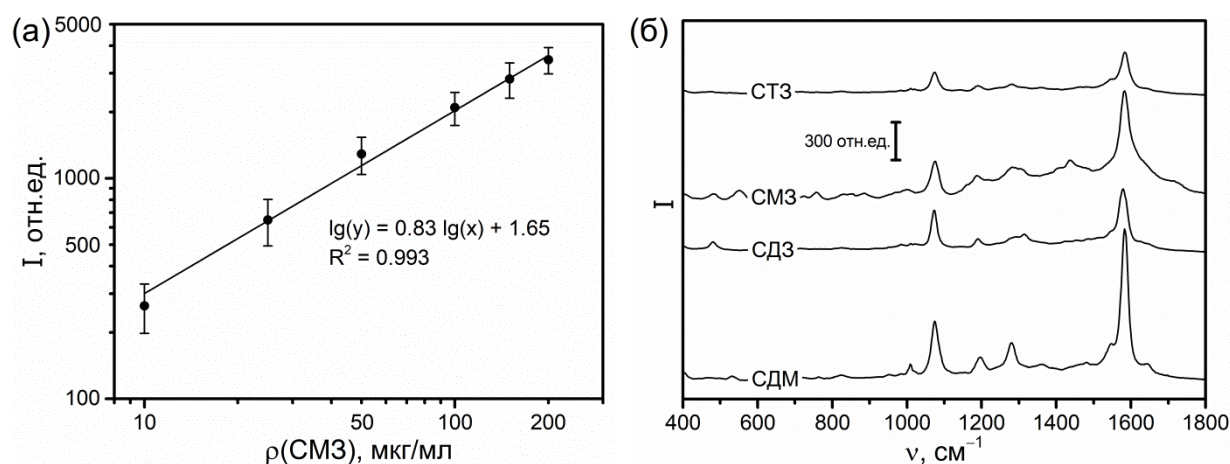


Рис. 3.19. (а) Градуировочный график для ЖЖЭ-ГКР-определения СМЗ в моче (по пику при 1074 см^{-1}). (б) ГКР-спектры экстрактов различных САА (10 мкг/мл), полученных с использованием оптимизированной ЖЖЭ-ГКР-методики и образцов УМ.

В заключение отметим некоторые ограничения разработанной методики анализа. В отличие от НТФЭ-ГКР-методик ЖЖЭ-ГКР-методика содержит больше этапов и включает необходимость удаления органического растворителя с помощью испарения. Основным способом испарения служило высушивание потоком воздуха, что достаточно времязатратно (~10 мин на образец), крайне сложно автоматизировать и повышает s_r . Попытки ускорить испарение с помощью нагрева показали, что происходит снижение интенсивности ГКР-сигнала, поскольку растворы некоторых САА нестабильны при повышенных температурах в кислой среде [76–78]. Однако тестирование испарения с помощью вакуума (при давлении 2–4 кПа) показало, что можно существенно улучшить производительность этапа испарения, поскольку за те же 10 мин можно высушить сразу несколько образцов.

Важным общим недостатком разработанной нами, а также ранее реализованных ЖЖЭ-ГКР-методик анализа является использование органических растворителей, не отвечающих требованиям «зеленой химии». И данное ограничение, к сожалению, преодолеть довольно трудно. Так, адаптация методик экстракции с использованием, например, ПАВов или глубоких эвтектических растворителей, приведёт к возникновению сильных конкурентных взаимодействий за ГКР-активные центры, что приведёт к

появлению сигнала экстрагентов и/или уменьшению интенсивности аналитического сигнала. В итоге возникает необходимость обязательной дополнительной очистки экстрактов от ПАВа или компонента(ов) эвтектических растворителей перед ГКР-анализом, что значительно сложнее, чем удаление из пробы легколетучего органического растворителя с использованием испарения.

3.5. Совмещение ГКР-анализа с ТСХ для детектирования фторхинолоновых антибиотиков

Тестирование НТФЭ-ГКР-методик, предложенных в предыдущих разделах, показало, что в случае ФХА данные методики не позволяют осуществить отделение ФХА от компонентов мочи. Поэтому для осуществления прямого ГКР-определения ФХА предложено совмещение ТСХ-разделения и ГКР-анализа. Для этого проводили разделение молекул ФХА и компонентов мочи на ТСХ-пластинах с силикагелем с последующим добавлением ГКР-подложки в зону очищенного аналита и регистрацией ГКР-сигнала непосредственно в матрице сорбента.

ТСХ-разделение ФХА и компонентов мочи

Предварительные эксперименты по разделению ФХА и компонентов мочи проводили на ТСХ-пластине с УФ индикатором (ПТСХ-АФ-А-УФ; Сорбфил, Россия). Помимо коэффициента удерживания (R_f), для идентификации ФХА также использовали сигнал их собственной флуоресценции ($\lambda_{ex} - 254$ нм). Поскольку визуальное детектирование результатов ТСХ-разделения невозможно при концентрациях ФХА, необходимых для их определения в БЖЧ в ходе ТЛМ, в экспериментах по оптимизации ТСХ разделения использовали концентрацию ФХА равную 2 мг/мл.

Опираясь на литературные данные [79] в качестве подвижной фазы выбран водный раствор уксусной кислоты. Оптимизация состава подвижной фазы показала, что 2%-ый раствор кислоты позволяет проводить наиболее

эффективное отделение ФХА от компонентов мочи (рис. 3.20). При этом молекулы ФХА задерживаются вблизи стартовой линии ($R_f = 0.042-0.052$), а компоненты мочи проходят значительно ближе к линии финиша ($R_f > 0.6$) (время разделения – 4 мин). Отметим также, что благодаря структурной родственности, условия ТСХ-разделения одинаковы для всех изученных представителей ФХА.

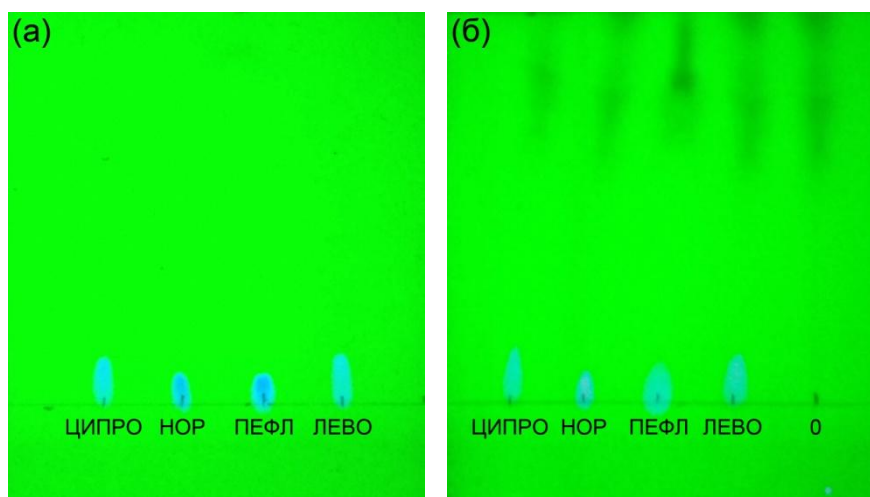


Рис. 3.20. Результаты ТСХ-разделения (а) чистых водных растворов ФХА (2 мг/мл) и (б) мочи с добавкой ФХА (2 мг/мл).

Измерение ГКР-сигнала на ТСХ-пластине

Для последующего проведения ТСХ-ГКР-детектирования ФХА использовали ТСХ-пластины с сорбентом без УФ индикатора (ПТСХ-АФ-А; Сорбфил, Россия), поскольку в случае пластин с индикатором лазерное излучение сине-зеленого диапазона (400–550 нм) также способно возбуждать интенсивный фоновый сигнал флуоресценции, препятствующий определению ФХА. Также важно отметить, что после завершения разделения и перед ГКР-анализом необходимо высушивать ТСХ-пластину для максимально полного удаления молекул подвижной фазы. Это позволяет устранить конкурентные взаимодействия между молекулами аналита и уксусной кислоты на поверхности ГКР-подложки и минимизировать зашумление сигнала аналита.

СНЧ наносили после разделения непосредственно в зону аналита на ТСХ-пластине. В данном случае СНЧ располагаются именно на поверхности

сорбента (рис. 3.21а) и значимым ограничением является регистрация только тех молекул аналита, что которые не сорбировались глубоко внутрь сорбента и могут взаимодействовать с поверхностью ГКР-подложки.

Поскольку в щелочной среде ГКР-спектры ФХА как правило имеют большую интенсивность и сходство спектральных профилей (раздел 2.4, рис. 2.7а,в), регистрацию ГКР-сигнала отделенных ФХА проводили сперва добавляя к зоне аналита раствор NaOH и затем раствор СНЧ. В результате ГКР-спектры до и после разделения (на примере ЦИПРО, рис. 3.21б) демонстрируют, что ТСХ позволяет эффективно отделять целевой аналит и полностью устранять фоновый сигнал, характерный для образцов мочи с высоким значением рН (т.е. сигнал молекул КРН; рис. 3.2б).

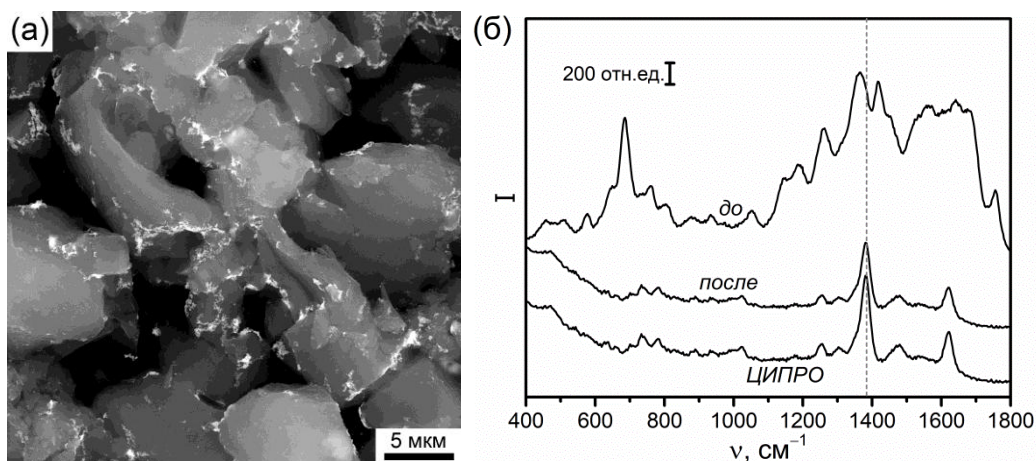


Рис. 3.21. (а) СЭМ-изображение поверхности сорбента ТСХ-пластины, покрытой предварительно синтезированными СНЧ. (б) ГКР-спектры мочи с добавкой ЦИПРО (50 мкг/мл) до и после ТСХ-разделения; спектр водного раствора чистого ЦИПРО (50 мкг/мл) после проведения ТСХ добавлен в качестве контроля.

Методика анализа

Таким образом, оптимизированная методика ТСХ-ГКР-детектирования ФХА в моче включает:

- (1) нанесение пробы мочи (10 мкл), содержащей ФХА, на стартовую линию ТСХ-пластины и проведение хроматографирования (4 мин) с помощью раствора уксусной кислоты (2%);
- (2) тщательное высушивание хроматограммы при 50°C в течение 10 мин;

- (3) нанесение к зоне анализа рН-корректирующего реагента (раствор NaOH, 0.6 М, 10 мкл) и ГКР-подложки (СНЧ, 10 мкл);
- (4) регистрацию и обработку ГКР-сигнала.

Вся методика анализа в общей сложности занимает не более 20 мин. ГКР-измерения проводили с использованием КР-спектрометра Alpha300 RS (WITec), совмещенного с оптическим микроскопом (объектив 20х, NA 0.4); длина волны лазера – 638 нм, мощность лазера на образце – 9 мВт, время накопления сигнала – 0.5 с.

Анализ метрологических характеристик методики показал, что, несмотря на устранение фонового сигнала и возможность детектирования сигнала аналитов в диагностически значимом диапазоне концентраций ФХА, обнаружено наличие очень большой случайной погрешности аналитического сигнала (s_r), неприемлемой для проведения точного определения ЛВ. Так, даже для средних и высоких концентраций ФХА значения s_r находятся на уровне 25–35%, что примерно на 10–20% выше значений для коллоидных растворов СНЧ. Мы связываем данный факт со спецификой регистрации сигнала в случае совмещения ТСХ и ГКР, а именно регистрацией ГКР-сигнала с поверхности сорбента с неоднородно распределенными СНЧ. Ранее в заключительной части раздела 3.3, мы обсуждали негативное влияние чрезмерно высокой чувствительности регистрирующей оптической системы к локальной неоднородности образцов на s_r аналитического сигнала. В данном случае неоднородность распределения СНЧ, зафиксированных в сорбенте, имеет гораздо большее значение, делая необходимым усреднение сигнала по большой площади. С другой стороны, при регистрации спектров с использованием коллоидных СНЧ и растворенного аналита броуновское движение позволяет сразу получить усредненный ГКР-сигнал с минимальным значением s_r . Наконец, при детектировании непосредственно с ТСХ-пластины происходит постепенное испарение воды, что также приводит к изменению соотношения «аналит/СНЧ» и, как следствие, интенсивности ГКР-сигнала. Поэтому разработанная ТСХ-ГКР-методика (как и совмещение

ТСХ и ГКР в целом) отнесена к малоперспективным, поскольку на данный момент её можно использовать только для полуколичественного определения ФХА в моче.

3.6. Использование полидиаллилдиметиламмоний хлорида для маскирования в ГКР-анализе

Молекулы полиэлектролитов иногда используются для модификации ГКР-подложек для придания нужного заряда их поверхности и увеличения силы адсорбции аналитов с противоположным зарядом, тем самым несколько увеличивая селективность адсорбции [80,81]. В текущей работе для усиления адсорбции ЛВ (и/или уменьшения адсорбции компонентов БЖЧ) на поверхности ГКР-подложки было протестировано простое добавление раствора полиэлектролита к анализируемой смеси (т.е. не отдельная модификация поверхности СНЧ).

3.6.1. ГКР-сигнал фонообразующих компонентов биожидкостей в присутствии полиэлектролитов

На рисунке 3.22 представлены структурные формулы полиэлектролитов, использованных для изучения возможности устранения влияния эндогенных компонентов БЖЧ на ГКР-сигнал ЛВ. ГКР-измерения проводили с использованием смеси анализируемого раствора, раствора полиэлектролита (5 мг/мл), активирующего агента (1 М раствор NaCl, HCl или NaOH) и СНЧ, которые смешивали в объёмном отношении 4:4:1:2.7. Для регистрации спектров в данном и следующих подразделах главы использовали портативный КР-спектрометр (i-Raman, B&WТек), совмещенный с оптическим микроскопом (объектив 20х, NA 0.4); длина волны лазера – 532 нм, мощность лазера на образце – 43 мВт, время накопления сигнала – 1 с.

Влияние полиэлектролитов оценивали с двух сторон: (1) влияние на ГКР-сигнал фонообразующих веществ (эндогенные компоненты БЖЧ) и (2) влияние на сигнал ЛВ. Тестовые эксперименты показали, что присутствие большинства из указанных полиэлектролитов приводит к снижению или

полному подавлению как фонового сигнала реальной мочи, так и сигнала протестированных ЛВ (САА, ФХА, ЦСА). Исключением является катионный полиэлектролит ПДДА, присутствие которого приводит с одной стороны к подавлению ГКР-сигнала основных компонентов БЖЧ при всех изученных значениях рН (рис 3.23), а с другой стороны при определенных условиях сохраняет возможность регистрации ГКР-сигнала некоторых ЛВ, например, САА (в кислой среде), МТК (в щелочной) и ЦСА (в нейтральной) (подробнее в подразделах 3.6.2 и 3.6.3).

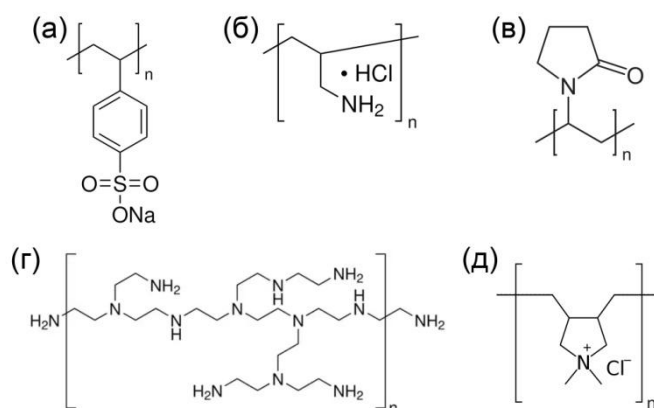


Рис. 3.22. Структурные формулы полиэлектролитов, использованных для изучения возможности маскирования компонентов БЖЧ: (а) полистиролсульфонат натрия (70 кДа); (б) полиаллиламин гидрохлорид (70 кДа); (в) поливинилпирролидон (360 кДа); (г) полиэтиленимин (разветвленный, 1000 кДа); (д) ПДДА (500 кДа).

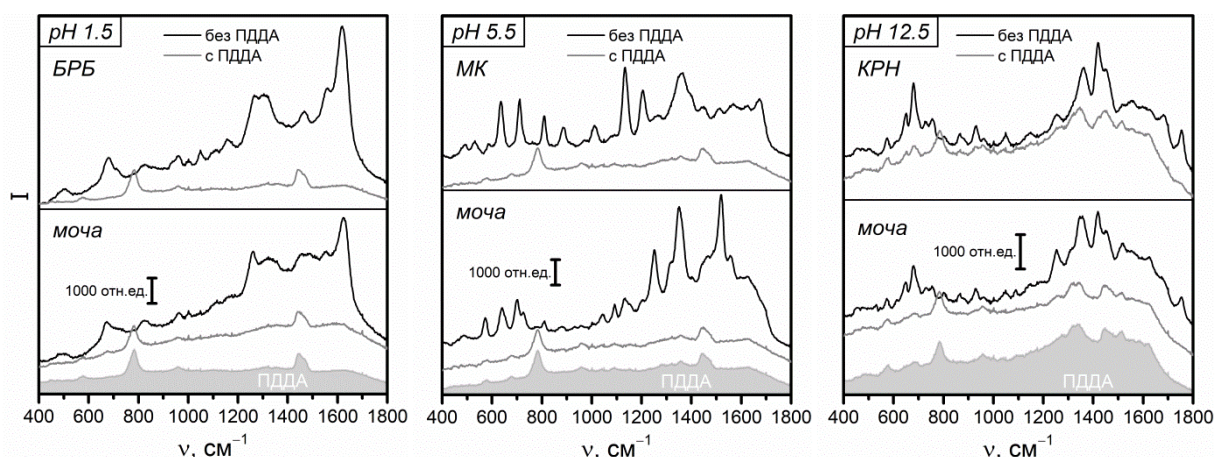


Рис. 3.23. Влияние присутствия ПДДА при разных значения рН на ГКР-спектры как отдельных основных фонообразующих компонентов БЖЧ (БРБ, МК, КРН), так и их реальной смеси в виде УМ. Для активации СНЧ при рН 5.5 использовали NaCl (1 М).

Чтобы объяснить эффект подавления сигнала фонообразующих компонентов БЖЧ в присутствии ПДДА, проведено теоретическое

исследование энергии комплексообразования молекул этих компонентов (рис. 3.1) с фрагментом ПДДА. Исследование проводили с применением полуэмпирических квантовохимических расчётов в программе MORAC2016 [82] с использованием метода PM6-D3H4 [83], который параметризован с целью учёта влияния межмолекулярных взаимодействий (в первую очередь водородных связей и дисперсионных сил) на энергию изучаемых систем. Влияние растворителя (воды) на силу взаимодействия учитывали в неявном виде в рамках модели COSMO. Силу взаимодействия между ПДДА и молекулами компонентов БЖЧ оценивали через энергию комплексообразования, рассчитанную как разницу теоретических значений энтальпий образования комплекса и компонентов БЖЧ:

$$E_{\text{комплексообразования}} = \Delta_f H_{\text{ПДДА+молекула}} - \Delta_f H_{\text{ПДДА}} - \Delta_f H_{\text{молекула}}$$

Для изучения влияния pH на энергию комплексообразования использовали как нейтральные, так и протонированные модели молекул. Молекулы мочевины, МК и БРБ моделировали только в нейтральном состоянии из-за отсутствия функциональных групп, подходящих для протонирования при использованных экспериментальных условиях (pH 1.25); КРН и УБЛ исследовали как в нейтральном, так и в протонированном состояниях. В качестве модели ПДДА для расчётов использовали фрагмент, состоящий из трёх мономеров и имеющий угловую форму (рис. 3.24а). Поскольку цепь ПДДА всегда положительно заряжена независимо от pH раствора, во всех моделях комплексов использовали фрагмент ПДДА без противоиона (в реальном ПДДА – это ионы хлора) и, соответственно, с зарядом +3.

Результаты расчётов показывают, что в нейтральном состоянии (в растворах с нейтральным значением pH) большинство изученных компонентов БЖЧ (за исключением мочевины) имеют отрицательные значения энергии комплексообразования, свидетельствуя о связывании этих компонентов с ПДДА (рис. 3.24б). Логично, что перевод данных компонентов в отрицательно заряженное состояние (депротонированная

форма в щелочных растворах) приведёт к ещё большему усилению их взаимодействия с положительно заряженными молекулами ПДДА. И наоборот, перевод некоторых компонентов (КРН и УБЛ) в положительно заряженное состояние (протонированная форма в кислых растворах) приводит к положительным значениям энергии комплексообразования, означая отсутствие связывания в комплекс с ПДДА.

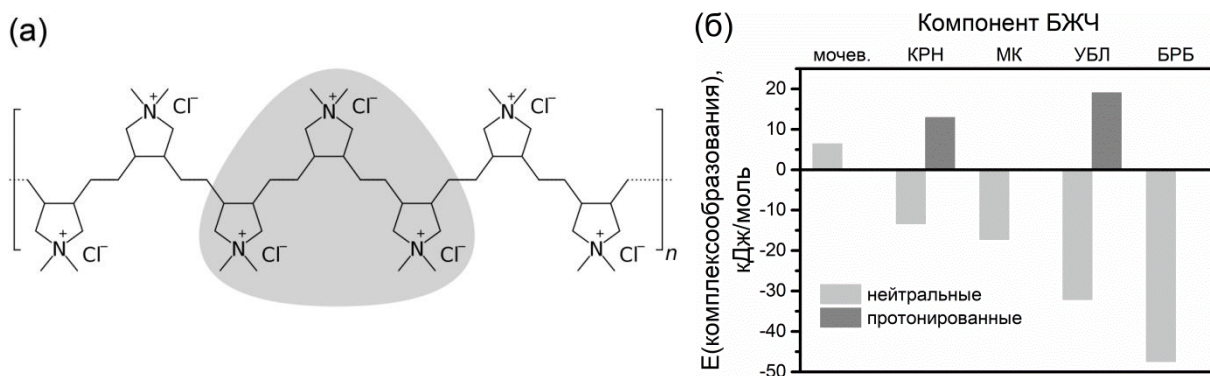


Рис. 3.24. (а) Схематическое строение фрагмента ПДДА, состоящего из трёх мономеров (выделен серым цветом), который использовали для моделирования комплексов ПДДА с молекулами ЛВ и основными компонентами БЖЧ. (б) Результаты расчёта энтальпии реакции комплексообразования ПДДА с основными компонентами БЖЧ в нейтральном и протонированном состоянии.

Обобщая полученные теоретические и экспериментальные данные, предложено объяснение механизмов полного подавления сигнала эндогенных фонообразующих компонентов БЖЧ в присутствии ПДДА в растворах с различным рН. Для начала нужно учесть, что для подавления фонового сигнала необходимо использовать достаточно высокую концентрацию ПДДА. Это приводит к тому, что в нейтральной и щелочной средах избыток положительно заряженных молекул ПДДА, находящихся в растворе, прочно связывает нейтрально и отрицательно заряженные компоненты непосредственно в растворе, приводя к снижению адсорбции данных компонентов на поверхности СНЧ и уменьшению ГКР-сигнала. В первую очередь это касается МК и КРН, являющихся основными фонообразующими компонентами в нейтральной и щелочной средах, соответственно.

Описанный выше механизм подавления фонового сигнала применим и для МК и БРБ в кислых средах, поскольку они остаются нейтрально заряженными при использованных экспериментальных условиях (рН 1.25) и могут связываться с ПДДА. С другой стороны, подавление фонового сигнала от КРН и УБЛ в кислой среде в присутствии ПДДА обусловлено тем, что протонированные молекулы данных компонентов не могут взаимодействовать с поверхностью СНЧ с адсорбированными молекулами ПДДА. Наконец, предполагается, что наличие слоя ПДДА на поверхности СНЧ приводит к дополнительным стерическим ограничениям, мешающим проникновению молекул крупных эндогенных компонентов (например, УБЛ и БРБ) к ГКР-активным центрам через полиэлектролитный слой.

Таким образом, методику ГКР-определения ЛВ можно сделать более селективной, устранив влияние компонентов БЖЧ маскированием с помощью ПДДА и переводением их в форму, не способную к адсорбции на ГКР-подложке и генерации фонового сигнала.

3.6.2. Определение сульфаниламидных антибиотиков в моче и слюне

ГКР-сигнал САА в присутствии ПДДА

Как показано в предыдущем подразделе, из всех изученных полиэлектролитов только ПДДА позволяет нивелировать влияние компонентов БЖЧ и полностью устранить фоновый ГКР-сигнал генерируемый ими, при этом оставляя возможность для регистрации сигнала некоторых ЛВ. Так, присутствие ПДДА позволяет регистрировать ГКР-сигнал САА в кислой среде (рН 1.25) (рис. 3.25а). При этом наиболее интенсивные пики ПДДА (~ 780 и ~ 1450 cm^{-1}) незначительно перекрываются с пиками САА, не мешая идентификации и определению содержания ЛВ. Данный результат является действительно значимым, поскольку позволяет существенно упростить методику ГКР-определения САА в БЖЧ, по сравнению с методикой, основанной на совмещении ГКР и ЖЖЭ (раздел 3.4). Тем не менее, данный эффект работает только в кислой среде, в то время

как присутствие ПДДА в щелочной среде приводит к полному подавлению сигнала САА и формированию интенсивного сигнала одного только ПДДА (как и в случае с другими изученными полиэлектролитами, указанными на рис. 3.22).

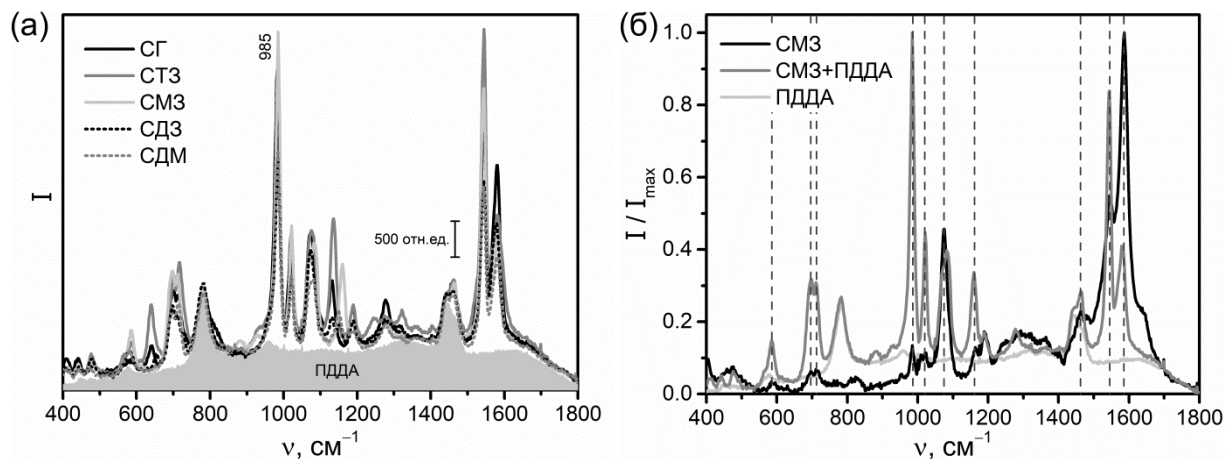


Рис. 3.25. (а) ГКР-спектры САА (10 мкМ; рН 1.25, НСl) в присутствии ПДДА. (б) Влияние добавления ПДДА (400–500 кДа, 5 мг/мл) на спектральные профили СМЗ (рН 1.25, НСl).

Примечательно, что в присутствии ПДДА сохраняется сходство спектральных профилей разных САА, обнаруженное ранее в случае водных растворов чистых САА с низким значением рН (рис. 2.3б). Так, до восьми пиков САА совпадают по положению, что может быть полезно для разработки более универсальной методики определения САА. Тем не менее, спектры САА без и с добавлением ПДДА (рис. 3.25б) всё же заметно различаются тем, что в присутствии ПДДА изменяются относительные интенсивности ГКР-пиков, тогда как их положение остаётся прежним. Данные результаты свидетельствуют о реализации схожего механизма взаимодействия ПДДА с различными САА и об усилении колебаний преимущественно СР фрагмента.

Изучение зависимости интенсивности ГКР-сигнала от концентрации добавки ПДДА к раствору чистого анализата или его смеси с реальной мочой (рис. 3.26а) показало, что в интервале от 0.005 до 5 мг/мл происходит увеличение интенсивности аналитического сигнала. Использование концентраций ПДДА выше 5 мг/мл нецелесообразно, поскольку сильно затрудняет работу с таким раствором из-за повышенной вязкости.

Увеличение молекулярной массы также позволяет несколько увеличить интенсивность аналитического сигнала. Таким образом, для дальнейших исследований выбран ПДДА с высокой молекулярной массой (400–500 кДа) и концентрацией в добавке к анализируемому раствору равной 5 мг/мл.

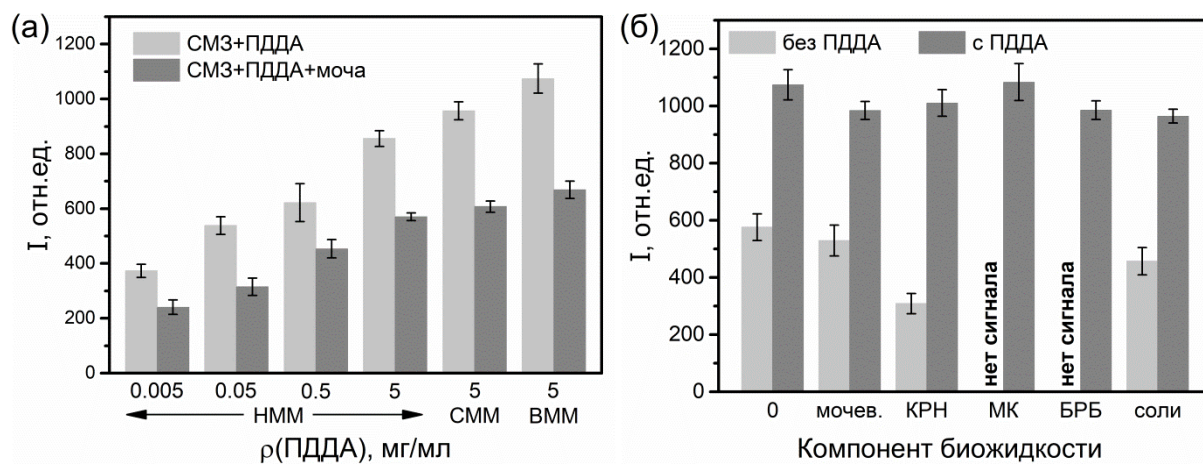


Рис. 3.26. (а) Влияние концентрации ПДДА (в добавке) и его молекулярной массы на интенсивность ГКР-сигнала (i) чистого водного раствора СМЗ (2 мкМ) и (ii) образца УМ, содержащего СМЗ (40 мкМ) и разбавленного в 20 раз. Значения рН анализируемых растворов доводили до значения 1.25 с помощью НСl. «НММ», «СММ» и «ВММ» соответствуют ПДДА с молекулярными массами 100–200, 200–350 и 400–500 кДа, соответственно. **(б)** Влияние добавки ПДДА (400–500 кДа, 5 мг/мл) на интенсивность ГКР-сигнала водных растворов СМЗ (40 мкМ) в смеси с наиболее распространенными компонентами БЖЧ: мочевиной (30 мг/мл), КРН (2 мг/мл), МК (1 мг/мл), БРБ (10 мкг/мл), смесью неорганических солей (NaCl, KCl, Na₂SO₄, NH₄Cl, КН₂РО₄, CaCl₂, MgSO₄, Na₂НРО₄). Перед ГКР-измерениями смеси СМЗ с данными компонентами разбавляли в 20 раз и доводили до рН 1.25 с помощью НСl. Пики СМЗ при 1586 и 985 см⁻¹ использовали для построения графиков для смесей без и с добавлением ПДДА, соответственно.

При изучении влияния концентрации добавки ПДДА на интенсивность ГКР-сигнала СМЗ (рис. 3.26а) установлено, что сигнал чистого раствора СМЗ и сигнал образца мочи, содержащего такую же концентрацию СМЗ, имеют значительно различающиеся интенсивности. Этот факт наглядно демонстрирует, что в случае реальных образцов ПДДА не полностью устраняет влияние компонентов мочи, приводя к снижению сигнала аналита. Поэтому было проведено дополнительное исследование влияния ПДДА на селективность детектирования САА (на примере СМЗ, рис. 3.26б) в смеси с наиболее

распространенными эндогенными компонентами БЖЧ. Результаты исследования показали, что ПДДА значительно улучшает селективность обнаружения СМЗ в присутствии отдельных компонентов, особенно в случаях КРН, МК и БРБ. Однако в случае реального образца, представляющего собой смесь метаболитов (которых в действительности значительно больше, чем исследовано на рис. 3.26б), ПДДА уже не может полностью маскировать мешающие компоненты. Тем не менее, важно учесть, что описанные исследования проводили с использованием минимальной концентрации СМЗ, представляющей интерес для определения в моче в ходе ТЛМ. Поэтому наблюдаемое снижение интенсивности сигнала аналита в реальной моче является наибольшим и будет уменьшаться по мере увеличения концентрации аналита.

Наконец, помимо влияния на спектральные профили и селективность анализа, присутствие ПДДА также значительно увеличивает интенсивность ГКР-сигнала САА, что связано с усилением адсорбции САА на ГКР-активных участках. Так, в ходе изучения влияния ПДДА на селективность установлено, что в случае чистого СМЗ присутствие ПДДА увеличивает интенсивность его сигнала почти в два раза (рис. 3.26б). Дополнительное изучение влияния ПДДА на зависимость интенсивности ГКР-сигнала от концентрации аналита (т.е. градуировочную зависимость) показало, что присутствие ПДДА может снижать предел обнаружения почти в 10 раз. Так, например, в случае СМЗ происходит снижение предела обнаружения с 19 до 1.6 нМ (рис. 3.27).

Таким образом, использование ПДДА в качестве коактивирующего агента в растворах аналитов с низким рН приводит к значительному улучшению селективности и чувствительности ГКР-определения САА в образцах реальных БЖЧ.

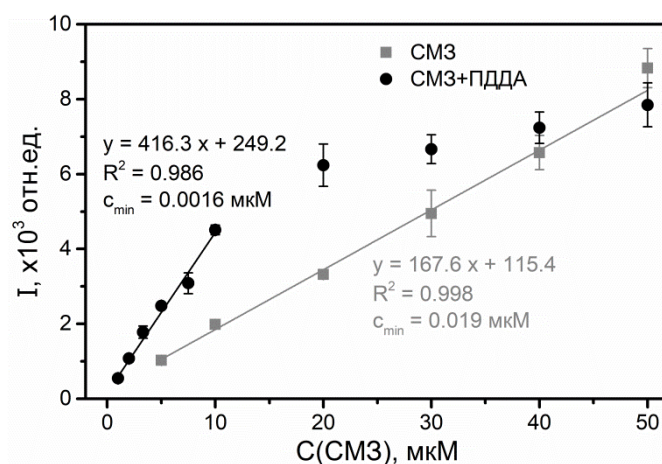


Рис. 3.27. Влияние присутствия ПДДА (400–500 кДа) на зависимость интенсивности ГКР-сигнала СМЗ от его концентрации. Регистрацию спектров проводили при рН 1.25; пики при 1586 и 985 см^{-1} использовали для построения графиков для чистого СМЗ и его смеси с ПДДА, соответственно.

Теоретическое изучение взаимодействия ПДДА с молекулами САА

Однако стоит отметить, что увеличение интенсивности сигнала САА в присутствии ПДДА в кислых средах является нетривиальным эффектом. Это связано с тем, что молекулы САА переходят в положительно заряженное состояние в растворах с низким рН и должны отталкиваться от молекул ПДДА, адсорбированных на поверхности СНЧ, приводя к снижению интенсивности сигнала САА. Поэтому для лучшего понимания механизма генерации ГКР-сигнала САА в присутствии ПДДА проведено теоретическое исследование энергии образования комплексов ПДДА-САА. Расчёты проведены аналогично таковым для комплексов ПДДА с фонообразующими компонентами БЖЧ, изученными ранее в подразделе 3.6.1. Для изучения влияния рН раствора на энергию комплексообразования использовали модели нейтральных, протонированных (по фрагменту $-\text{C}_6\text{H}_5-\text{NH}_2$) и депротонированных (по фрагменту $-\text{SO}_2-\text{NH}-$) молекул САА (вставка на рис. 2.3а).

Проведено две серии расчётов с различной первоначальной ориентацией молекул САА относительно фрагмента ПДДА (до оптимизации геометрии комплекса). Первая серия расчётов выполнена для комплексов, в которых вглубь фрагмента ПДДА помещена структурно схожая часть молекул САА,

т.е. сульфаниламидный фрагмент; пример геометрии комплекса в случае СМЗ-ПДДА приведён на рис. 3.28а. Полученные значения энергии комплексообразования (гистограмма на рис. 3.28а) показывают, что депротонированные и нейтральные молекулы САА (т.е. молекулы в растворах с щелочной и нейтральной средами, соответственно) имеют сопоставимую силу взаимодействия с ПДДА, которая выше, чем у протонированных молекул САА (т.е. в кислых средах). Анализ оптимизированной геометрии комплексов с протонированными САА показал, что протонированный анилиновый фрагмент САА ($-C_6H_4-NH_3^+$) всегда выталкивается из фрагмента ПДДА из-за электростатического отталкивания, которое также является причиной меньших (по модулю) величин энергии комплексообразования по сравнению с нейтральными и депротонированными САА. Таким образом, отрицательная энергия комплексообразования (т.е. связывающее взаимодействие) для ПДДА с протонированным сульфаниламидным фрагментом объясняется только сильным электростатическим взаимодействием между атомами кислорода $-SO_2-$ группы молекул САА и атомами водорода ПДДА (преимущественно теми, что расположены вблизи четвертичной аминогруппы).

Во второй серии расчётов вглубь фрагмента ПДДА помещали часть молекулы САА, содержащую замещающий фрагмент ($-NH-R$) (пример на рис. 3.28б). Как и в случае первой серии расчётов, полученные значения энергии комплексообразования (гистограмма на рис. 3.28б) демонстрируют постепенное увеличение силы взаимодействия при переходе от протонированных к депротонированным молекулам САА (от кислых к щелочным растворам САА). Большую разницу в энергиях комплексообразования для депротонированных и нейтральных молекул САА в этой серии расчётов мы связываем с делокализацией отрицательного заряда после депротонирования сульфонамидной группы. Это приводит к распределению существенной части заряда на замещающем фрагменте (рис. 2.4а), что позволяет данному фрагменту взаимодействовать с большим

числом атомов водорода ПДДА. Наконец, по сравнению с комплексами с СР фрагментом внутри фрагмента ПДДА (рис. 3.28а), замещающие фрагменты протонированных молекул САА могут напрямую довольно хорошо взаимодействовать с ПДДА с минимальным участием $-\text{SO}_2-$ группы.

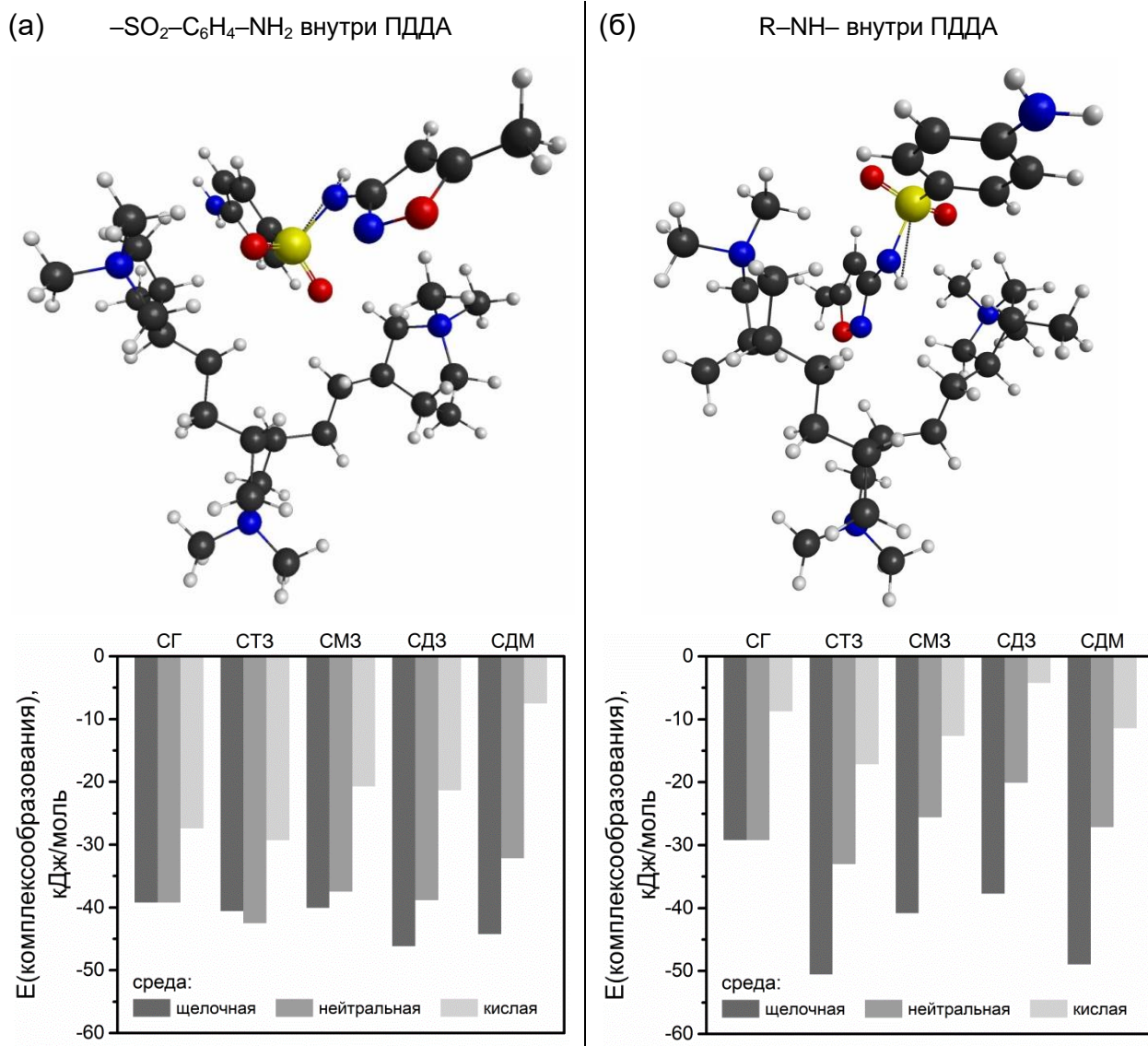


Рис. 3.28. Примеры 3D-строения моделей комплексов между молекулой СМЗ и фрагментом ПДДА, а также значения теоретических энергий комплексообразования комплексов САА-ПДДА, полученные путём размещения вглубь фрагмента ПДДА сульфаниламидного (а) или замещающего фрагмента (б) молекулы САА.

Обобщая результаты обеих серий расчётов видно, что увеличение рН среды значительно усиливает взаимодействие между САА и ПДДА. Следовательно, исчезновение сигнала аналита в щелочной среде в присутствии ПДДА можно объяснить слишком сильным взаимодействием между молекулами полиэлектролита и САА, которое блокирует

взаимодействие САА с ГКР-подложкой. С другой стороны, хотя взаимодействие САА с ПДДА в кислых средах является самым слабым, именно этот эффект позволяет сохранить протонированный анилиновый фрагмент свободным для связывания с ГКР-активными участками. Например, и добавление ПДДА, и подкисление с помощью HCl увеличивают концентрацию хлорид-ионов, которые сильно взаимодействуют с поверхностью СНЧ [84] и могут способствовать адсорбции молекул САА на поверхности ГКР-подложки согласно механизму, ранее описанному в разделе 2.3 (рис. 2.4б). Данная модель взаимодействия САА с ПДДА и ГКР-подложкой наилучшим образом объясняет сохранение сходства спектральных профилей подкисленных растворов САА в присутствии ПДДА (рис. 3.25а). Наконец, одна цепь ПДДА может взаимодействовать с большим количеством молекул САА, и улучшение чувствительности детектирования САА с помощью ПДДА (рис. 3.27) происходит за счёт концентрирования молекул аналита на ГКР-активной поверхности.

Методика ГКР-определения САА с использованием ПДДА и её метрологические характеристики

Итоговая методика ГКР-определения САА в моче в присутствии ПДДА включает следующие шаги:

- (1.1) подготовку мочи: разбавление дистиллированной водой в 20 раз для образцов, содержащих СДЗ и СДМ, и в 30 раз для образцов, содержащих СГ, СТЗ и СМЗ;
- (1.2) подготовку слюны: (а) смешивание образца с концентрированной уксусной кислотой (10:1 об.), встряхивание смеси в течение 30 сек и удаление образовавшегося сгустка муцина; (б) разбавление полученного раствора в 3 раза для образцов, содержащих СГ, СДЗ, СДМ, и в 4 раза для образцов, содержащих СМЗ и СТЗ.
- (2) смешивание порции подготовленного образца мочи или слюны (60 мкл) с ПДДА (400–500 кДа, 5 мг/мл, 60 мкл), HCl (1 М, 15 мкл) и СНЧ (40 мкл);
- (3) проведение ГКР-измерений и анализ результатов.

Общая продолжительность одного цикла анализа составляет менее 5 и 10 мин в случае анализа мочи и слюны, соответственно. Таким образом, в основе методики ГКР-определения САА в БЖЧ лежит добавление активирующего (НСI) и коактивирующего агентов (ПДДА) к дополнительно подготовленным образцам БЖЧ с молекулами САА. Это приводит как к снижению фонового сигнала (наиболее ярко видно в случае определения САА в моче, рис. 3.29), так и к увеличению сигнала аналита за счёт подавления адсорбции компонентов БЖЧ на СНЧ и улучшения адсорбции молекул аналита, соответственно.

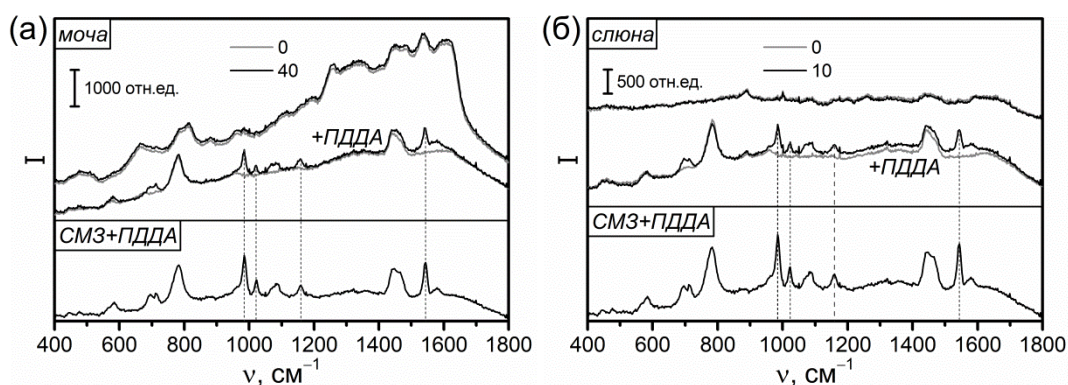


Рис. 3.29. ГКР-спектры мочи (а) и слюны (б) без (0) и с добавкой СМЗ (40 мкМ для мочи и 10 мкМ для слюны), а также без и с добавлением ПДДА (400–500 кДа, 5 мг/мл). Образцы БЖЧ без и с добавкой СМЗ были разбавлены (в 20 раз для мочи и в 4 раза для слюны). Все растворы были подкислены до рН 1.25 с помощью НСI.

Помимо добавления ПДДА и НСI, для достижения определения САА в требуемых диапазонах концентраций (подраздел 3.1.1), при разработке финальной методики анализа проведена оптимизация степени разбавления образцов БЖЧ в случае каждого аналита и вида БЖЧ (табл. 3.4). Также, в то время как для пробоподготовки образцов мочи (даже собранных в утреннее время) достаточно лишь их разбавления, в случае образцов слюны удаление муцина является обязательным этапом пробоподготовки. Муцин ингибирует ГКР-активацию СНЧ с помощью искусственной агрегации, что не позволяет достичь необходимого уровня интенсивности ГКР-сигнала. Также муцин существенно усложняет манипуляции со слюной, особенно для образцов небольшого объёма (<200 мкл). Однако этап его удаления требует только

добавления концентрированной уксусной кислоты и встряхивания смеси, без необходимости дальнейшего центрифугирования. Отметим, что анализ слюны даже более привлекателен для ТЛМ чем анализ мочи, поскольку концентрации САА в слюне напрямую коррелируют с их концентрациями в крови [70]. Таким образом, методика анализа требует только крайне легкую пробоподготовку и один цикл анализа занимает менее 10 мин (включая удаление муцина). С другой стороны, все ранее опубликованные методики ГКР-определения САА в объектах со сложным составом (продукты питания и моча) (в т.ч. разработанная нами методика, описанная в разделе 3.4, рис. 3.18) использовали более сложные и трудоёмкие ЖЖЭ [85,86] и ТФЭ [87]. Графики с полученными градуировочными зависимостями определения САА представлены на рис. 3.30, а метрологические характеристики конечной методики анализа – в табл. 3.4.

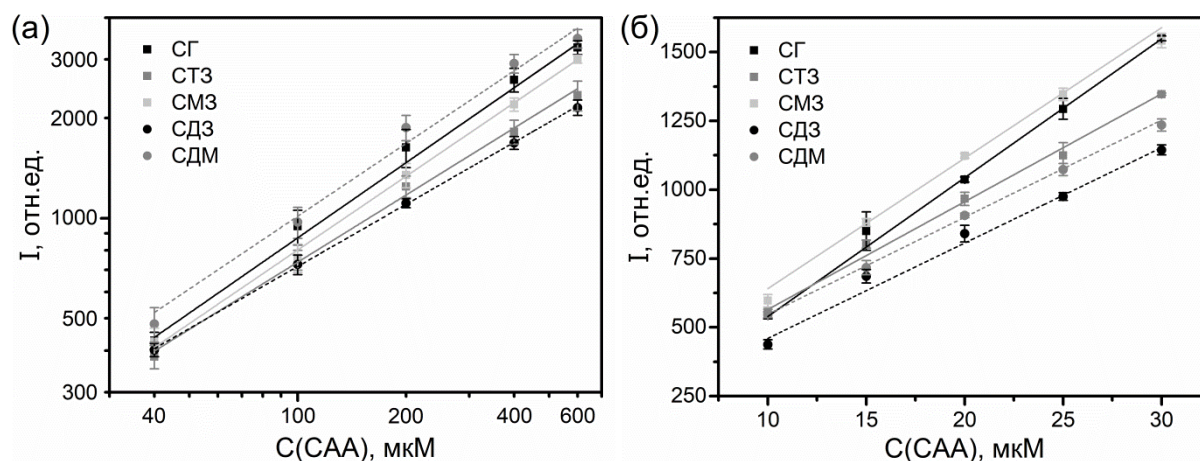


Рис. 3.30. Градуировочные графики для определения САА в моче (а) и слюне (б).

С физико-химической точки зрения также примечательно, что графики градуировочных зависимостей (рис. 3.30) для мочи и слюны описываются уравнениями с различными функциями (табл. 3.4): « $\lg(y) = a \cdot \lg(x) + b$ » и « $y = a \cdot x + b$ », соответственно. В случае мочи концентрации аналита относительно высоки и адсорбция молекул аналита на поверхности ГКР-подложки (которая прямо пропорциональна интенсивности сигнала) может быть описана изотермой адсорбции Фрейндлиха, которая имеет нелинейную зависимость от концентрации аналита. В случае слюны концентрации аналита низкие и адсорбция аналита и интенсивность сигнала линейно

зависят от концентрации аналита (изотерма Генри). Данный результат дополнительно демонстрирует высокую важность более детального изучения процессов адсорбции, протекающих в ходе ГКР-анализа, аналогично тому, как это было рассмотрено при анализе конкурентных взаимодействий при адсорбции молекул аналитов и мешающих примесей на ГКР-активные центры (разделы 1.2 и 1.3).

Табл. 3.4. Оптимальные значения величин разбавления аналит-содержащих образцов мочи и слюны, перед проведением ГКР-определения САА в присутствии ПДДА, а также метрологические характеристики конечной методики анализа.

Аналит	Разбавление, разы	Диапазон концентраций, мкМ	Уравнение градуировочной зависимости	S _r , %	Прав., %	C _{min} , мкМ	C _{lim} , мкМ
<i>Моча (6 образцов)</i>							
СГ			$\lg(y) = 0.749 \lg(x) + 1.442$ $R^2 = 0.998$	5–12	96–112	1.4	6.8
СТЗ	30		$\lg(y) = 0.669 \lg(x) + 1.528$ $R^2 = 0.996$	7–10	93–109	1.1	6.4
СМЗ		40–600	$\lg(y) = 0.734 \lg(x) + 1.435$ $R^2 = 0.999$	3–10	94–106	1.4	7.3
СДЗ	20		$\lg(y) = 0.616 \lg(x) + 1.619$ $R^2 = 0.999$	3–7	98–102	0.8	5.7
СДМ			$\lg(y) = 0.726 \lg(x) + 1.554$ $R^2 = 0.986$	6–12	90–110	1.0	5.4
<i>Слюна (3 образца)</i>							
СГ	3		$y = 50.4 x + 34.5$ $R^2 = 0.999$	3–8	99–107	0.59	3.6
СТЗ			$y = 39.2 x + 172.5$ $R^2 = 0.999$	2–5	97–106	0.04	10
СМЗ	4	10–30	$y = 47.4 x + 165.7$ $R^2 = 0.993$	2–4	91–101	0.14	8.6
СДЗ			$y = 34.6 x + 113.1$ $R^2 = 0.992$	2–4	94–105	1.98	13
СДМ	3		$y = 35.3 x + 178.2$ $R^2 = 0.999$	2–4	100–104	0.10	11

3.6.3. Поочерёдное определение цефалоспориновых антибиотиков, метотрексата и креатинина при их совместном присутствии в моче

Определение нескольких аналитов в одном образце одним методом является важным и необходимым направлением аналитической химии. В большинстве случаев для этой цели используется косвенный подход ГКР-анализа, а применение прямого ГКР-определения затруднено из-за ограниченной селективности спектроскопии ГКР в целом (детально рассмотрено в разделах 1.1 и 1.2). Важно отметить, что в случае прямого ГКР-анализа молекулы различных целевых аналитов также могут конкурировать за ГКР-активные центры на поверхности ГКР-подложки, мешая друг другу. Например, исследования смесей двух аналитов часто демонстрировали, что ГКР-сигнал одного или обоих аналитов уменьшается по интенсивности в смеси по сравнению с сигналом чистых растворов аналитов [88–90] (аналогично эффекту мешающих веществ, приведённому на рис. 1.2). К сожалению, большинство таких исследований часто недооценивают или даже игнорируют влияние конкуренции между аналитами. Более того, также существует плохая практика анализа спектров смесей, содержащих аналиты в соотношениях, совершенно далеких от соотношений аналита к аналиту, наблюдаемых в реальных системах (например, 1:1 [91,92] или 1:1:3 [93]). Также, пытаясь доказать возможность осуществления прямого мультиплексного ГКР-анализа, авторы часто выбирали пары аналитов со сравнимыми сродством к поверхности ГКР-подложки и КР-активностью, что скорее является исключением для компонентов реальных объектов.

Как результат, на данный момент прямое ГКР-определение нескольких аналитов наиболее достоверно осуществлено только путём полного пространственного разделения аналитов друг от друга и от примесей перед ГКР-измерениями с использованием тонкослойной [94] или высокоэффективной жидкостной [95] хроматографии. Напомним, что различные способы уменьшения конкурентных взаимодействий при

проведении прямого ГКР-анализа рассмотрены в общих чертах ранее в разделе 1.3. Однако высокая эффективность совмещения ГКР и хроматографии не доказывает, что невозможно эффективно использовать более простые варианты пробоподготовки. Поэтому в данном подразделе мы сосредоточились на применении и комбинировании простых и быстрых этапов пробоподготовки образца с целью управления конкурентной адсорбцией на поверхности ГКР-подложки.

Так, способность ПДДА подавлять фоновый сигнал и возможность усиления/ослабления ГКР-сигнала путём корректировки значения рН были использованы для разработки методики прямого ГКР-определения в моче нескольких аналитов, разных по химической природе: ЦСА, противоопухолевый препарат МТК и КРН. Выбор аналитов обоснован необходимостью контроля их концентраций в моче онкологических больных с сопутствующей бактериальной инфекцией. По данным литературы, совместное применение МТК и ЦСА может изменять скорость выведения одного или обоих препаратов и, следовательно, их концентрацию в БЖЧ [96,97]. Например, некоторые ЦСА могут ускорять выведение МТК, снижая его терапевтический эффект, а другие могут замедлять выведение МТК, увеличивая риск побочных эффектов. Таким образом, регулярный мониторинг концентрации этих препаратов в БЖЧ позволяет своевременно корректировать протокол лечения с целью максимизации терапевтического эффекта и минимизации проявления побочных эффектов. Контроль выведения КРН важен при лечении сложных пациентов, поскольку позволяет оценить функцию почек при хронических заболеваниях (например, сахарный диабет) и/или при применении препаратов, имеющих побочные эффекты на почки (включая МТК и ЦСА [98–100]).

ГКР-сигнал МТК в сложных смесях

Анализ строения молекулы МТК (рис. 3.31а) показывает, что она имеет сразу несколько групп, обладающих кислотно-основными свойствами. Поэтому проведено изучение влияния рН на ГКР-сигнал водных растворов

МТК (рис. 3.31б,в). Установлено, что рН сильно влияет как на спектральный профиль (рис. 3.31б), так и на интенсивность сигнала (рис. 3.31в), и в кислой среде (рН 2) сигнал примерно в 3 раза слабее, чем в щелочной (рН 13–13.25). Примечательно, что в диапазоне рН 3–11.5 сигнал МТК имеет крайне низкую интенсивность, причём добавление стандартного рН-нейтрального агента (NaCl) для активации ГКР-подложки не существенно увеличило интенсивность сигнала в нейтральной среде (рис. 3.31г).

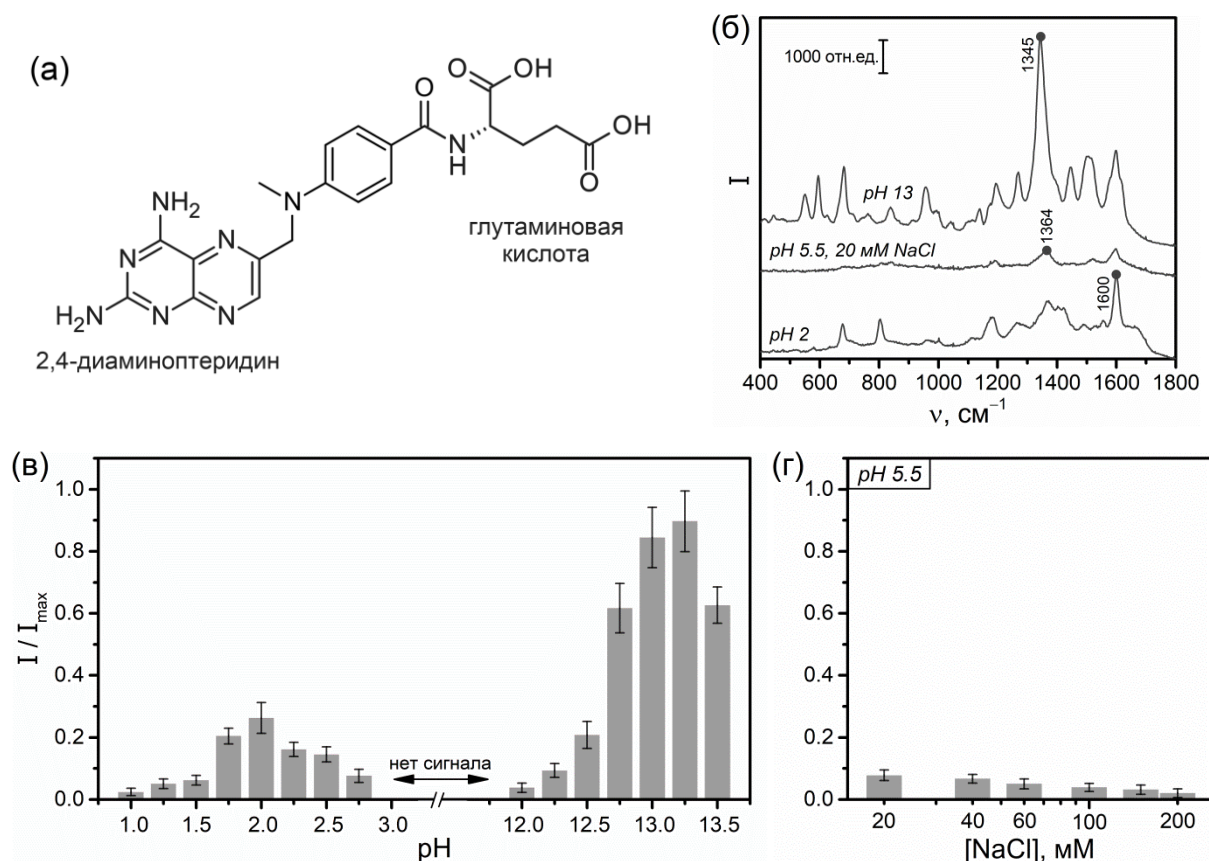


Рис. 3.31. (а) Структурная формула молекулы МТК. (б) Профили ГКР-спектров МТК при разных значениях рН. (в,г) Влияние рН (в) и концентрации NaCl (при рН 5.5) (г) на интенсивность ГКР-сигнала МТК (0.1 мкг/мл). Для построения графиков использовали ГКР-пики МТК, отмеченные на рисунке «б».

Положительное влияние высоких значений рН на интенсивность сигнала обусловлено улучшением взаимодействия поверхности ГКР-подложки (СНЧ) с молекулами МТК благодаря образованию неподелённых электронных пар при депротонировании карбоксильных групп остатка глутаминовой кислоты (рис. 3.32), а также предотвращению протонирования неподелённых электронных пар атомов азота птеридиновой части.

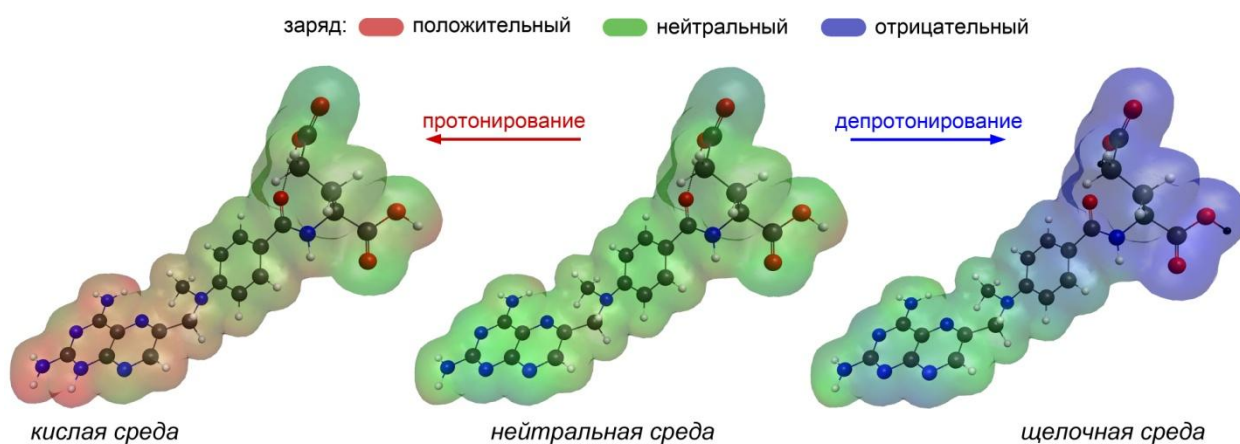


Рис. 3.32. Модели молекулы МТК в протонированном, нейтральном и депротонированном состояниях (симуляция нахождения молекул в растворах с различным рН). Изображения моделей дополнены изоповерхностями общей электронной плотности, окрашенными с использованием значений молекулярного электростатического потенциала.

Однако в щелочной среде в моче сигнал МТК полностью подавляется сигналом КРН мочи, особенно при низких концентрациях МТК (рис. 3.33а). Добавление ПДДА к образцу мочи с высоким значением рН приводит к полному подавлению сигнала мешающих компонентов мочи и появлению отчётливого спектра МТК (рис. 3.33б). Несмотря на то, что присутствие ПДДА также снижает интенсивность сигнала МТК (в ~ 3 раза), устранение конкуренции между молекулами МТК и компонентами мочи за ГКР-активные центры и удаление фонового сигнала является более важным преимуществом, компенсирующим потерю в интенсивности сигнала. Сравнение спектров растворов чистого МТК в отсутствии и в присутствии ПДДА (рис. 3.33) дополнительно показало изменение относительных интенсивностей пиков в ГКР-спектре МТК (изменение спектрального профиля), указывая на существенные изменения в электронной структуре молекул МТК в комплексе с ПДДА. Аналогичные изменения наблюдали и в ГКР-спектрах комплексов САА с ПДДА (рис. 3.25б), что указывает на то, что этот эффект является общей особенностью комплексов ПДДА.

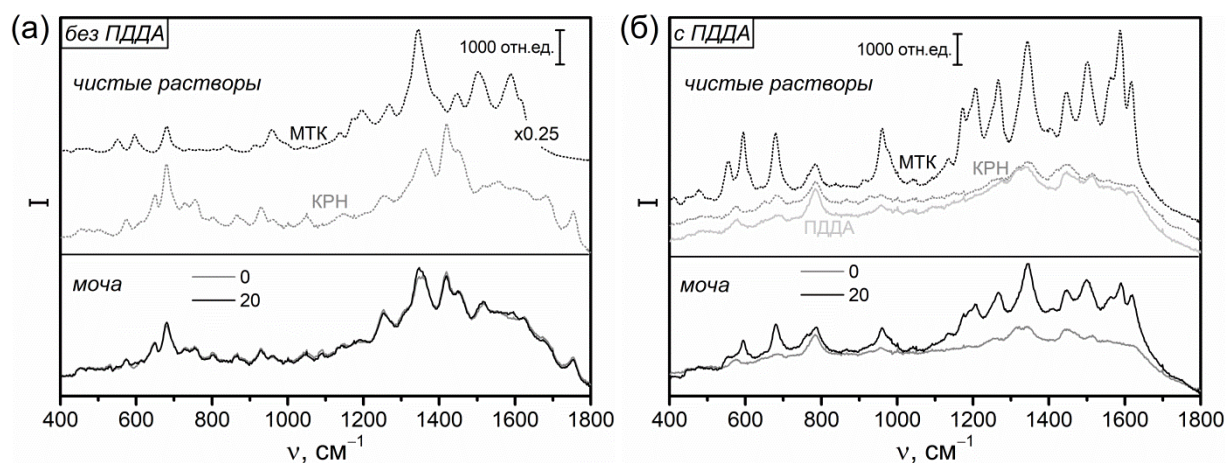


Рис. 3.33. ГКР-спектры растворов чистых МТК (0.02 мкг/мл) и КРН (3 мкг/мл) и спектры образцов УМ без (0) и с (20) добавленным МТК (20 мкг/мл) в отсутствии (а) и в присутствии (б) ПДДА (5 мг/мл). Коррекцию рН до 13 с помощью NaOH использовали для максимизации сигнала МТК. Образцы мочи (без и с аналитом) разбавляли в 1000 раз перед добавлением NaOH и ПДДА.

Несмотря на успех в устранении фонового сигнала от эндогенных компонентов мочи, возможность ГКР-детектирования МТК в щелочной среде в присутствии ПДДА также была исследована в более сложных условиях. Для этого проводили регистрацию спектров образцов мочи, содержащих минимальную концентрацию МТК (20 мкг/мл) и избыток других целевых аналитов (200 мкг/мл для ЦСА и 3000 мкг/мл для КРН). Пик МТК при 595 см^{-1} использовали для контроля влияния примесей, поскольку он не перекрывается с пиками ЦСА. Результаты измерений показали, что определение МТК в неразбавленной моче в присутствии ЦСА невозможно, поскольку в спектрах доминирует сигнал ЦСА (рис. 3.34а, пример для ЦТР). К счастью, использование простого разбавления исследуемой смеси водой (перед добавлением NaOH и ПДДА) позволяет существенно снизить сигнал ЦСА в смеси. Так, при 100-кратном разбавлении сигнал ЦСА все еще доминирует в результирующем ГКР-сигнале и сигнал МТК значительно подавляется (по сравнению с чистым раствором МТК). Однако дальнейшее разбавление приводит к снижению сигнала ЦСА и полному доминированию сигнала МТК при 2000-кратном разбавлении. Также при 2000-кратном разбавлении выравнивается интенсивность сигнала МТК в присутствии

разных ЦСА (рис. 3.34б). Несмотря на то, что разбавление не изменяет соотношение компонентов смеси, происходит снижение конкуренции между МТК и ЦСА за ГКР-активные центры за счёт (i) снижения абсолютной концентрации компонентов смеси и (ii) роста роли разницы в сродстве компонентов к поверхности ГКР-подложки. Таким образом, улучшение сигнала МТК при разбавлении мы связываем с более высоким его сродством к поверхности ГКР-подложки благодаря наличию двух стерически доступных COOH -групп, которые депротонируются в щелочной среде и обеспечивают более сильное электростатическое взаимодействие с ПДДА на поверхности СНЧ по сравнению с ЦСА, которые имеют только одну COOH -группу в середине молекул (рис. 2.9).

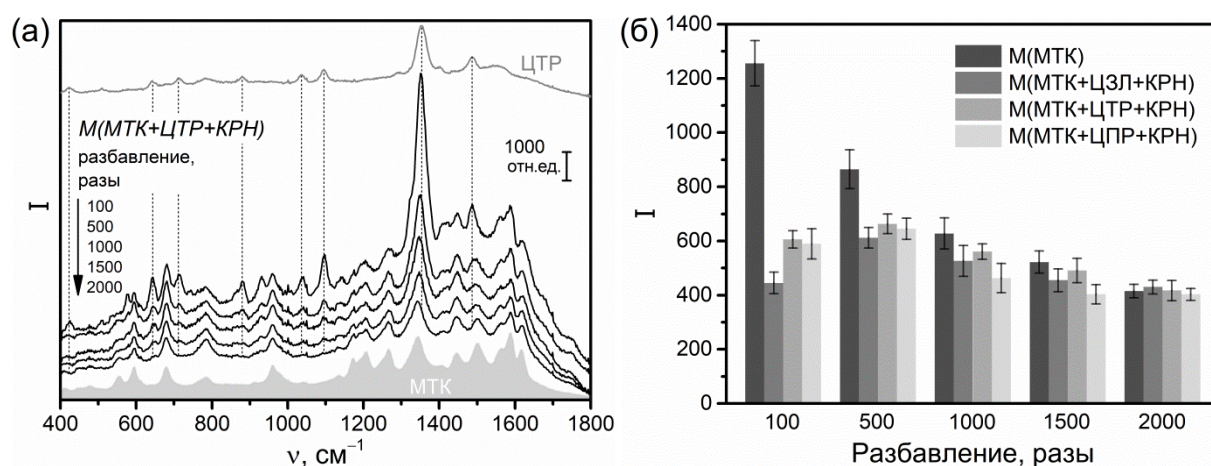


Рис. 3.34. Влияние степени разбавления на ГКР-спектры (а) и интенсивность пика МТК (при 595 см^{-1}) (б) в образцах мочи (М) с добавкой МТК (20 мкг/мл) без и с дополнительным добавлением КРН (3000 мкг/мл) и представителя ЦСА (200 мкг/мл). Перед ГКР-измерениями ко всем образцам добавляли NaOH и ПДДА.

ГКР-сигнал ЦСА в сложных смесях

Как было показано ранее (раздел 2.5, рис. 2.10 и 2.11), ЦСА (ЦЗЛ, ЦТР, ЦПР) могут генерировать интенсивные ГКР-спектры как в кислой и щелочной средах, так и в нейтральной при использовании активирующего агента. Однако в кислой среде добавление ПДДА приводит не только к устранению фонового сигнала от эндогенных компонентов мочи, но и к полному подавлению сигнала ЦТР (рис. 3.35), что снижает универсальность

методики. В случае же щелочной среды возникает высокая вероятность генерации интенсивных спектров МТК и КРН.

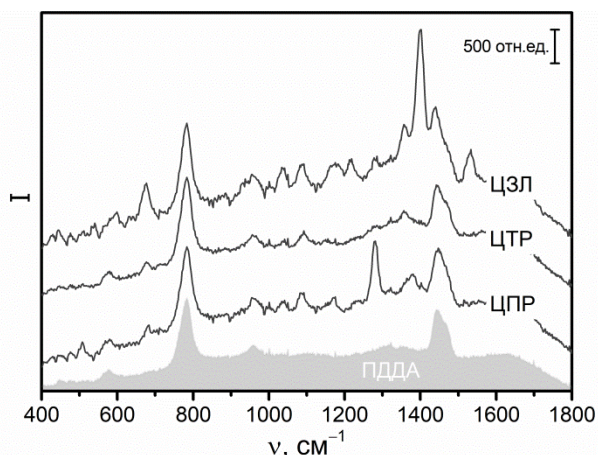


Рис. 3.35. ГКР-спектры чистых растворов ЦСА (0.33 мкг/мл) в присутствии ПДДА (5 мг/мл). Значение pH изучаемых растворов было равно 1.5.

Поэтому для разработки максимально достоверной и универсальной методики ГКР-определения ЦСА в моче в присутствии МТК и КРН наиболее предпочтительна нейтральная среда. При этом для увеличения усиливающих свойств ГКР-подложки использовали добавление pH-нейтрального активирующего агента (NaCl). Контрольные эксперименты показали, что в нейтральной среде добавлением ПДДА приводит к полному подавлению как фонового сигнала, сформированного эндогенными компонентами мочи (рис. 3.36), так и сигналов МТК и КРН (рис. 3.37). Следовательно, избыток молекул МТК и КРН в моче не влияет на сигнал ЦСА даже при минимальной концентрации ЦСА и максимальных МТК и КРН.

Также, аналогично детектированию МТК, предварительное разбавление мочи, содержащей ЦСА, дополнительно улучшает селективность ГКР-анализа. Однако для того чтобы, избежать насыщения аналитического сигнала и получить линейные градуировочные зависимости, степени разбавления мочи необходимо были оптимизировать для каждого представителя ЦСА отдельно. Так, образцы мочи, содержащие ЦЗЛ, ЦТР и ЦПР разбавляли в 120, 150 и 80 раз, соответственно.

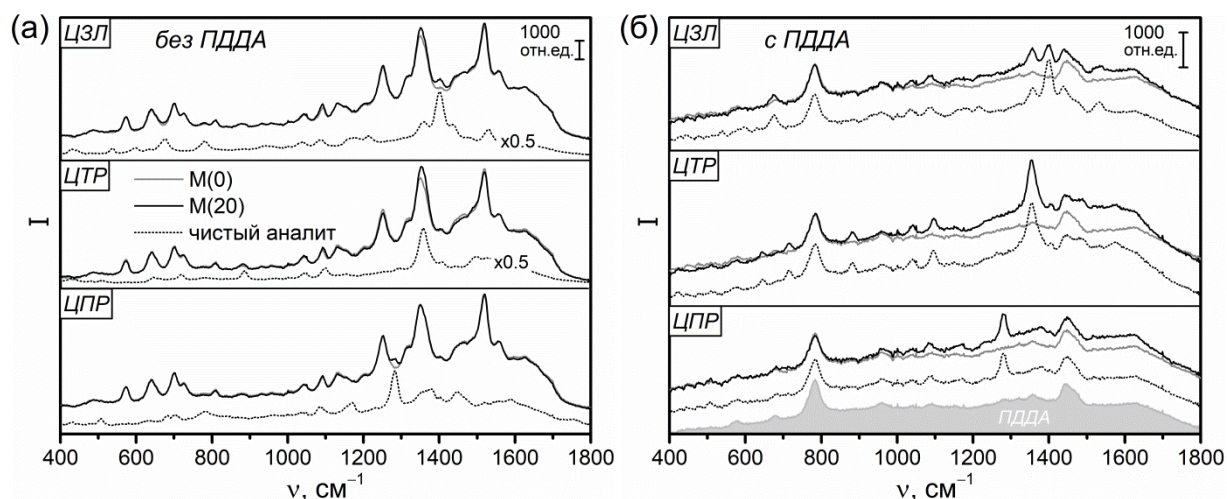


Рис. 3.36. ГКР-спектры без (а) и в присутствии (б) ПДДА (5 мг/мл) в случае образцов УМ без (M(0)) и с добавлением ЦСА (20 мкг/мл) (M(20)) и образцов чистых растворов ЦСА (0.33 мкг/мл). Образцы мочи (без и с анализом) предварительно разбавляли в 60 раз. Значение рН всех изучаемых образцов было равно 5.5; для активации СНЧ использовали NaCl (1 М).

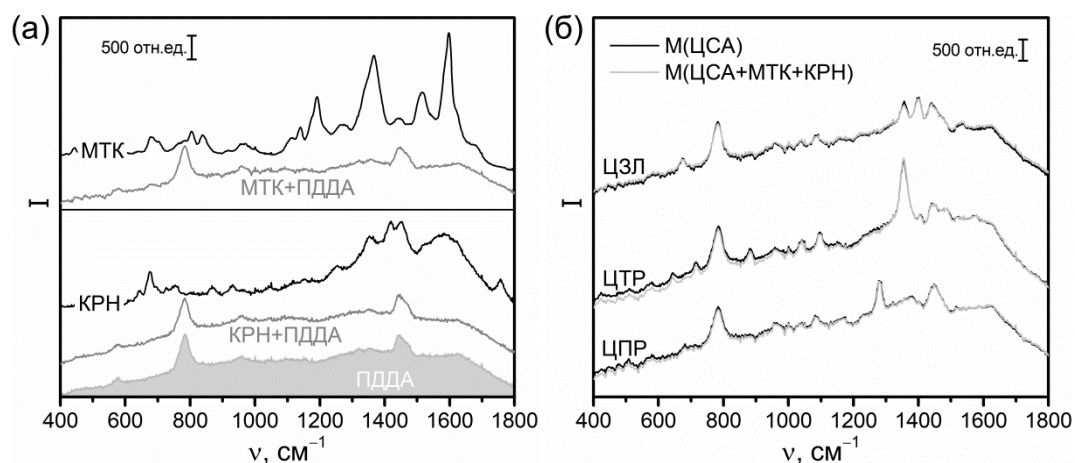


Рис. 3.37. (а) Влияние добавления ПДДА на ГКР-спектры чистых растворов МТК (3.33 мкг/мл) и КРН (50 мкг/мл) в нейтральной среде (рН 5.5); для активации СНЧ использовали NaCl (1 М). (б) ГКР-спектры образцов мочи, содержащей ЦСА (20 мкг/мл), без и с добавлением МТК (200 мкг/мл) и КРН (3000 мкг/мл); образцы мочи с анализом(ами) разбавляли в 60 раз водой перед добавлением ПДДА и NaCl.

ГКР-сигнал КРН в сложных смесях

Интенсивный, пригодный для анализа сигнал, КРН имеет только в щелочной среде (рН > 11, рис. 3.2б). Однако, как показано в предыдущих подразделах, и другие целевые аналиты (МТК и ЦСА) имеют интенсивный сигнал в щелочной среде. Так, ГКР-измерения смеси КРН при минимальной практически значимой концентрации (300 мкг/мл) и других аналитов при их

максимальных практически значимых концентрациях (200 мкг/мл) при рН 12 продемонстрировали сильное перекрытие ГКР-пигов всех аналитов в результирующем спектре (пример для ЦПР на рис. 3.38), которое не устраняется простым разбавлением смеси. Поэтому для достижения точного ГКР-определения КРН в присутствии других аналитов необходимо использовать дополнительную пробоподготовку.

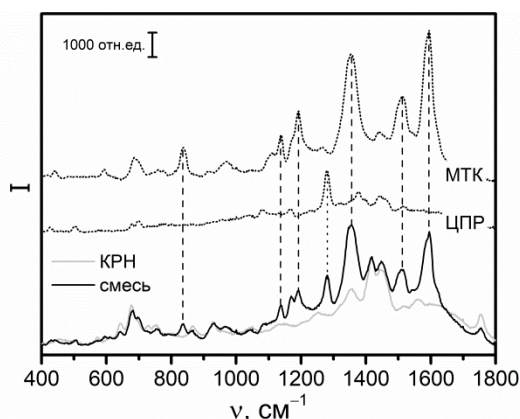


Рис. 3.38. ГКР-спектры чистых растворов МТК (200 мкг/мл), ЦПР (200 мкг/мл), КРН (300 мкг/мл) и их смеси (при тех же концентрациях). Растворы разбавляли в 600 раз и доводили до рН 12.

Для снижения влияния мешающих компонентов предложено использовать простую и быструю пробоподготовку, основанную на осаждении примесей органическим растворителем, что позволяет увеличить отношение «сигнал/шум». Данная пробоподготовка включает следующие шаги: (i) добавление водорастворимого растворителя к образцу, (ii) тщательное встряхивание смеси с последующим её центрифугированием, (iii) отбор порции надосадочной жидкости и её разбавление водой, и (iv) корректировку рН.

Поскольку наибольший негативный эффект на ГКР-сигнал КРН оказывает присутствие МТК (рис. 3.38), то растворитель подбирали таким образом, чтобы обеспечить наилучшие результаты по максимальному удалению из смеси именно МТК. Согласно измерениям спектров поглощения в УФ области спектра, наилучшие результаты по удалению МТК показал ацетон (рис. 3.39а), при этом оптимальное объёмное отношение

«анализируемый образец / растворитель» равно 1:100 (рис. 3.39б). При этих условиях концентрации ЛВ в образце снижаются на 63% для МТК и на 53, 60 и 43% для ЦЗЛ, ЦТР и ЦПР, соответственно, тогда как концентрация КРН остаётся неизменной.

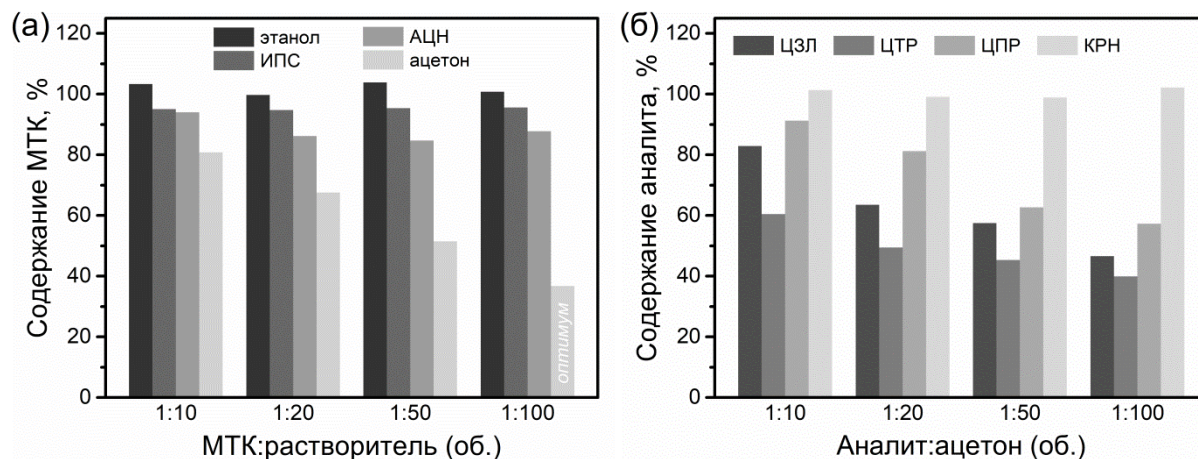


Рис. 3.39. (а) Зависимость содержания МТК в образце после обработки различными растворителями (АЦН – ацетонитрил, ИПС – изопропиловый спирт) и при различных объёмных отношениях раствора МТК (200 мкг/мл) к растворителю. **(б)** Влияние соотношения исследуемого раствора к ацетону на содержание КРН и ЦСА в растворе после пробоподготовки; концентрации ЦСА и КРН равны 200 и 300 мкг/мл, соответственно.

Наконец, корректировка величины рН образцов мочи, обработанных ацетоном, до 12 является оптимальной и позволяет получить спектры мочи, которые практически идентичны спектрам чистого раствора КРН (рис. 3.40). При этом молекулы ацетона, оставшиеся в смеси, не мешают ГКР-детектированию КРН из-за незначительного перекрытия пиков ацетона и КРН, а также низкого сродства молекул ацетона к поверхности подложки.

Методики анализа и их метрологические характеристики

Обобщая результаты предыдущих трёх подразделов, разработана методика определения содержания МТК, ЦСА (три представителя) и КРН в их смеси в моче. Для каждого аналита требуется свой собственный набор пробоподготовок, однако они очень просты и требуют мало времени для проведения (рис. 3.41). Так, суммарное время определения всех трёх аналитов составляет ~25–30 мин.

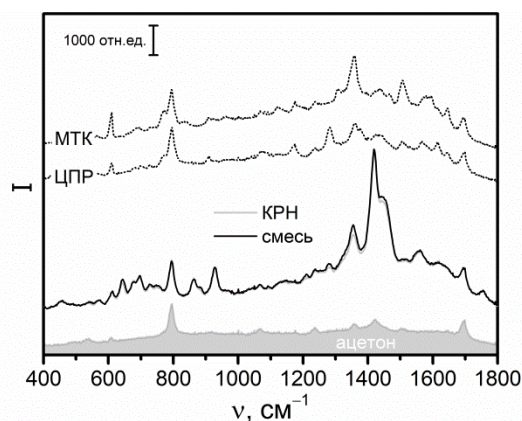


Рис. 3.40. ГКР-спектры чистых растворов МТК (200 мкг/мл), ЦПР (200 мкг/мл), КРН (300 мкг/мл) и их смеси (при тех же концентрациях) после обработки с помощью ацетона. Общее разбавление аналитов после пробоподготовки составило 600 раз с последующей корректировкой значения рН раствора до 12.

Отметим, что при определении каждого из аналитов использовали одинаковые начальные объёмы образца для анализа (10 мкл), а также одинаковые соотношения реагентов, добавляемых непосредственно перед ГКР-измерениями (ПДДА, активирующий агент, СНЧ). При этом данные объём и соотношения не являются идеальными для максимально чувствительного детектирования каждого отдельного аналита, но позволяют достичь практически требуемых метрологических характеристик и являются приемлемым компромиссом для упрощения методики анализа в целом.

Полученные графики градуировочных зависимостей (рис. 3.42) применимы для анализа в присутствии (в т.ч. в избытке) других целевых аналитов в различных концентрациях (20–200 мкг/мл для ЦСА и МТК, 300–3000 мкг/мл для КРН [101]). Это преимущество достигнуто благодаря тщательному выбору и оптимизации этапов пробоподготовки, позволившим нивелировать негативное влияние компонентов смеси на ГКР-сигнал целевого аналита. Данный результат значительно повышает универсальность ГКР-анализа мочи, поскольку концентрации в моче экзогенных (ЛВ) и эндогенных (КРН и другие метаболиты) компонентов могут значительно меняться в течение дня в широких пределах. Метрологические характеристики разработанных методик представлены в табл. 3.5.

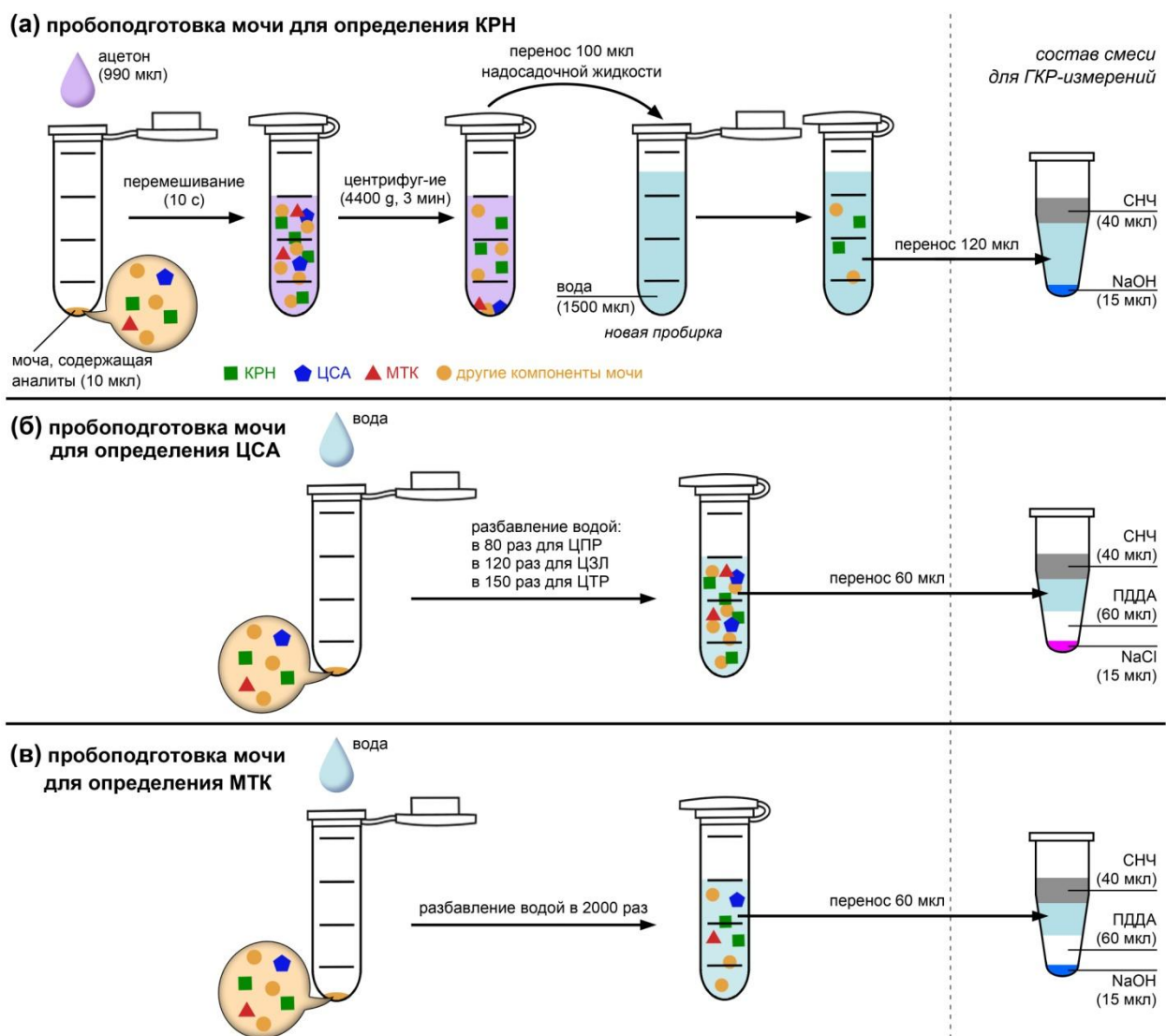


Рис. 3.41. Схематическое представление обобщенной методики (этапов пробоподготовок) ГКР-определения нескольких аналитов в их смеси в моче: **(а)** КРН, **(б)** ЦСА и **(в)** МТК.

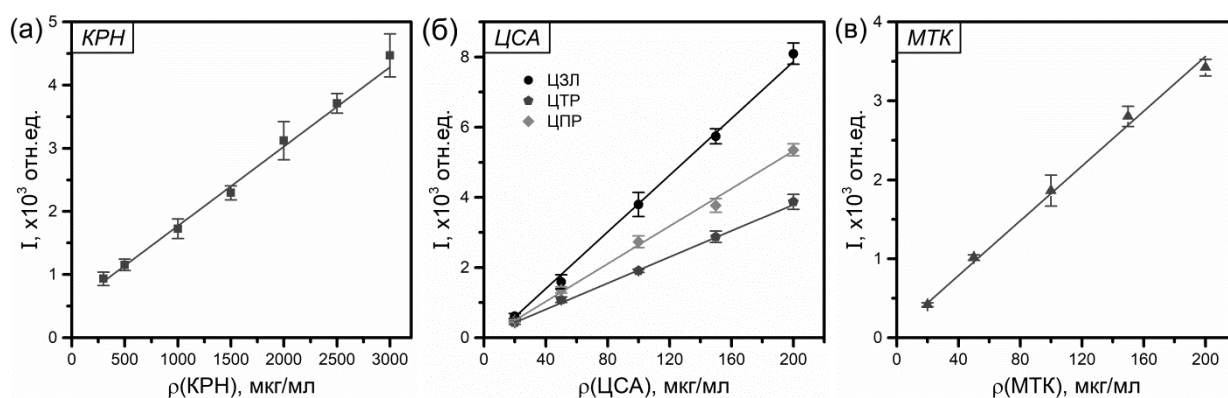


Рис. 3.42. Графики градуировочных зависимостей для ГКР-определения КРН **(а)**, ЦСА **(б)** и МТК **(в)** в моче, содержащей сразу несколько аналитов. Графики построены с использованием ГКР-пигов при 1419, 1354, 1356, 1281 и 595 см^{-1} в случае КРН, ЦЗЛ, ЦТР, ЦПР и МТК, соответственно.

Табл. 3.5. Метрологические характеристики методики прямого ГКР-анализа для определения нескольких аналитов в моче (данные получены с использованием 4 образцов мочи).

Аналит	Диапазон концентраций, мкг/мл	Уравнение градуировочной зависимости	s_r , %	Прав., %	C_{min} , мкг/мл	C_{lim} , мкг/мл
КРН	300–3000	$y = 1.26x + 511$ $R^2 = 0.995$	4–11	96–111	12	38.6
ЦЗЛ		$y = 40.40x - 219.1$ $R^2 = 0.998$	4–12	88–105	7.5	12.4
ЦТР	20–200	$y = 18.64x + 59.99$ $R^2 = 0.998$	3–10	97–109	0.9	10.5
ЦПР		$y = 26.81x - 41.12$ $R^2 = 0.998$	3–9	94–105	4.0	9.7
МТК	20–200	$y = 17.34x + 93.50$ $R^2 = 0.995$	3–10	94–106	1.2	16.6

Поскольку содержание КРН в исходных образцах мочи всегда не равно нулю, то для определения правильности ГКР-определения КРН в моче использовали независимый стандартный метод, основанный на реакции Яффе. Сравнение результатов обоих методов (табл. 3.6) показывает хорошую корреляцию найденных концентраций, однако ГКР-анализ значительно быстрее (~10 мин против ~25 мин), а многополосная структура ГКР-сигнала позволяет сравнивать спектральные профили зарегистрированного сигнала и спектра чистого аналита, что существенно повышает достоверность анализа за счёт исключения ложноположительных результатов.

Таким образом, данное исследование показывает, что селективность прямого формата ГКР-анализа аналитов с умеренным сродством к ГКР-подложке может быть улучшена не только путём комбинирования ГКР с методами разделения и концентрирования, но и путём управления процессом конкурентной адсорбции на поверхности ГКР-подложки с использованием маскирования компонентов БЖЧ с помощью ПДДА.

Табл. 3.6. Результаты определения КРН в образцах мочи, полученные с помощью прямого ГКР-анализа и контрольного метода (реакция Яффе).

Номер образца	Концентрация КРН в моче, мкг/мл		Правильность, %
	ГКР	реакция Яффе	
1	1087	1043	104
2	1585	1478	107
3	1251	1217	103
4	810	736	110
5	1928	1942	99

* * *

В рамках данной главы рассмотрены сложные случаи, когда сигнал целевых аналитов полностью подавляется фоновым сигналом эндогенных компонентов БЖЧ. Поэтому одним из ключевых результатов исследования стало выявление основных фонообразующих компонентов БЖЧ, препятствующих ГКР-определению ЛВ, что позволило более целенаправленно разрабатывать подходы по устранению влияния этих компонентов на ГКР-сигнал.

Так, предложены подходы на основе совмещения ГКР с некоторыми методами разделения и концентрирования (НТФЭ, ЖЖЭ, ТСХ) с целью удаления из анализируемой смеси одного или нескольких фонообразующих компонентов БЖЧ. Следует отметить, что путём оптимизации методик проведения экстракции и хроматографии (выбор сорбента/растворителя, корректировка рН) возможно удаление из смеси определенного фонообразующего компонента БЖЧ.

Также предложен новый способ маскирования компонентов БЖЧ при ГКР-анализе с помощью катионного полиэлектролита ПДДА. Маскирующее действие обусловлено комплексообразованием ПДДА с мешающими компонентами или предотвращением их адсорбции на ГКР-подложке за счёт электростатического отталкивания от ПДДА на поверхности подложки и/или стерических эффектов. С использованием данного простого подхода даже

удалось разработать методику определения трёх аналитов в моче в присутствии (в т.ч. избытке) других целевых аналитов. Примечательно, что ранее ГКР-определение нескольких аналитов в одном объекте с действительно сложным составом (как БЖЧ) успешно реализовано только с помощью совмещения ГКР с ВЭЖХ, более сложной и дорогостоящей в реализации, по сравнению с разработанным подходом.

В заключение приведём обобщенные данные по сравнению между собой разработанных методик определения ЛВ в моче с точки зрения скорости и простоты реализации, а также универсальности (табл. 3.7).

Табл. 3.7. Сравнение описанных в данной главе ГКР-методик.

Признак	Антибиотик	НТФЭ		ЖЖЭ	маскиро- вание	
		SiO ₂	ГГА			
I. Возможность определения антибиотиков в моче	ЦСА	ЦЗЛ	+	+	+	
		ЦТК		+		
		ЦРК				
		ЦТР	+	+	+	
		ЦПР	+	+	+	
	САА	СГ				+
		СТЗ			+	+
		СМЗ			+	+
		СДЗ			+	+
		СДМ			+	+
II. Простота реализации		средняя	средняя	низкая	высокая	
III. Продолжительность методики анализа		10 мин	15 мин	30 мин	5 мин	

Согласно представленным данным, по совокупности преимуществ «победителем» в данном сравнении стал подход на основе совмещения ГКР с маскированием с помощью ПДДА, в том числе позволяющий определять и противоопухолевый препарат МТК. Отметим, что сравнение

метрологических характеристик методик в данном случае нецелесообразно, поскольку (1) диапазоны концентраций ЛВ в моче фиксированы и определены фармакокинетическими исследованиями, (2) значения c_{\min} находятся ниже данных диапазонов для всех разработанных методик, а (3) значения s_r зависят в первую очередь от оптической системы КР-спектрометра. Также отметим, что во всех разработанных методиках в качестве ГКР-подложки применяли простой и быстрый в приготовлении коллоидный раствор СНЧ, стабилизированных гидроксиламином.

Представленные в главе результаты опубликованы в работах [6,50,51,102–104].

ГЛАВА 4. ГКР-АКТИВНЫЕ СОРБЕНТЫ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ТФЭ-ГКР-АНАЛИЗА

4.1. Общие сведения об особенностях и применении ГКР-активных сорбентов

Помимо «классических» ГКР-подложек, таких как коллоидные НЧ, также активно разрабатываются многофункциональные ГКР-подложки, которые помимо усиления КР-сигнала имеют дополнительные свойства, позволяющие улучшить анализ, например, его селективность и/или чувствительность [105]. Так, ГКР-подложки на основе металлических НЧ, встроенных в пористые (не)органические матрицы (ГКР-активные сорбенты), можно использовать как для концентрирования, так и для ГКР-определения аналита [106–108].

Важно отметить, что в случае ГКР-активных сорбентов устраняются проблемы, связанные с коллоидной и химической стабильностью встроенных НЧ [109], что существенно улучшает воспроизводимость сигнала и точность анализа. Регистрация спектров непосредственно с ГКР-активного сорбента дополнительно позволяет исключить этап элюирования и, как следствие, снизить потери аналита, исключить использование растворителей и сократить время проведения анализа.

Встраивание НЧ в матрицу сорбента также может обеспечить возможность многократного использования ГКР-активных сорбентов, что является несомненным преимуществом с учётом расходования благородных металлов при проведении ГКР-анализа. К сожалению, большинство работ посвящены разработке одноразовых сорбентов, что связано с трудностью подбора условий для удаления сорбированного аналита как из пор сорбента, так и с поверхности металла без разрушения структуры ГКР-активного сорбента и изменения его сорбционных и усиливающих свойств. Для решения этой проблемы в основном используют промывку сорбента водно-спиртовыми растворами [110,111], а также растворами стабилизаторов,

использованных для получения НЧ, чтобы заместить аналит на металлической поверхности [112,113]. Более экзотическими стратегиями очистки ГКР-активных сорбентов являются фотокаталитическое (при использовании матрицы сорбента, содержащий полупроводниковый наноструктурированный материал) [114,115] и термическое [116] разрушение сорбированного аналита с последующей промывкой от продуктов разложения. Однако обе стратегии очистки исключают использование модификации ГКР-активного сорбента для улучшения селективности и сорбционной способности, например, полимерами или другими органическими молекулами, которые также будут разрушаться в ходе очистки. Помимо этого величина температуры при отжиге ГКР-активных сорбентов должна контролироваться для предотвращения потери усиливающих свойств за счёт сплавления плазмонных НЧ.

Состав и структура ГКР-активных сорбентов

Основными требованиями к материалу матрицы ГКР-активных сорбентов являются высокая сорбционная способность, доступность, возможность модификации поверхности и низкая КР-активность (т.е. низкий собственный КР-сигнал). Поэтому существует ограниченное число материалов (органических [108,112] и неорганических [117–119]), пригодных для использования в качестве матрицы. Например, графен и оксид графена, которые в настоящее время являются популярными материалами для ТФЭ, не подходят для такой задачи из-за интенсивного собственного КР-сигнала [120]. В итоге наибольшее распространение получили ГКР-активные сорбенты на основе неорганических оксидов (в основном SiO_2 [116,117,121–123]) и полисахаридов [17,112,124]. Также для достижения максимальной эффективности материал матрицы ГКР-активного сорбента должен быть оптически прозрачным в видимом диапазоне для беспрепятственного прохождения лазерного излучения вглубь сорбента и участия в генерации ГКР-сигнала абсорбированных молекул аналита.

Существует два способа встраивания ГКР-активных НЧ в матрицу сорбента: (i) восстановление НЧ внутри сорбента и (ii) использование предварительно синтезированных НЧ в качестве основы для формирования пористой оболочки. В случае первого подхода возможно использование стандартных сорбентов с известными характеристиками, что обеспечивает лучший контроль структуры конечного ГКР-активного сорбента. Также восстановление НЧ металла осуществляется без использования стабилизатора, что приводит к отсутствию фонового сигнала и получению чистой металлической поверхности. Однако восстановление НЧ происходит в порах сорбента, что уменьшает пористость материала, ограничивая сорбцию аналитов, а также возникает сложность контроля размера и формы НЧ и достижения их однородного распределения в объёме сорбента. С другой стороны, второй способ обеспечивает максимальный контроль над морфологией и оптическими свойствами НЧ и, следовательно, усилением КР-сигнала. Также с использованием первого подхода возможно получение ГКР-активных сорбентов только в виде объёмных трёхмерных матриц со встроенными НЧ [112,118,125,126], в то время как второй подход позволяет также получать сорбенты в виде структуры «ядро-оболочка» (ГКР-активное ядро и пористая оболочка) [127,128], которые имеют малый и однородный размер.

Подходы по увеличению селективности и чувствительности анализа с использованием ГКР-активных сорбентов

Хотя НЧ имеют очень высокую удельную площадь поверхности и сами по себе могут использоваться в качестве сорбента, применение пористой матрицы в качестве носителя плазмонных НЧ способствует увеличению селективности ГКР-анализа. Так, матрица сорбента абсорбирует только аналиты, размер которых не превышает размер её пор [116,128]. Также сорбционная способность и селективность матрицы сорбента может быть повышена путём использования подходов молекулярного импринтинга [108], а также модификации матрицы полярными фрагментами ($-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, Al^{3+}

и т.д.) для увеличения электростатического взаимодействия с молекулами целевого аналита и/или исключения сорбции некоторых мешающих примесей [129,130].

Увеличение чувствительности анализа в некоторых случаях достигают путём использования в качестве матрицы сорбентов полимеров, изменяющих свой объём под воздействие температуры [125,131], pH [17,132,133] или дегидратации [112], что приводит к увеличению ГКР-сигнала за счёт (i) концентрирования аналита и/или (ii) формирования «горячих точек» в случае сорбентов, содержащих множество плазмонных НЧ [112,125,131,132].

Применение ГКР-активных сорбентов в анализе

Методики ТФЭ-ГКР-анализа могут быть реализованы в двух форматах. В первом формате микрочастицы сорбента диспергированы в анализируемом растворе и перед ГКР-определением их отделяют центрифугированием [116,127,128,134,135] или магнитной сепарацией (если сорбент имеет встроенные магнитные НЧ [17,125]). Во втором формате ГКР-активный сорбент используют для заполнения колонки для ТФЭ [117,121,122,126]. Примечательно, что в случае последнего формата заполнение ГКР-активным сорбентом капилляров или картриджей упрощает их интеграцию в проточную систему анализа, что позволит автоматизировать этапы ТФЭ, ГКР-детектирования и промывки [113,136].

Продолжительность ТФЭ-ГКР-методик определяется в первую очередь этапом сорбции аналита. Так, время инкубации ГКР-активного сорбента с аналитом зависит от свойств обоих и может варьироваться от нескольких минут [116,117,127,137] до нескольких часов [110,112,134,135].

Большинство из проанализированных выше публикаций посвящены разработке новых ГКР-активных сорбентов, способных демонстрировать высокую чувствительность, поэтому в качестве аналитов в основном использовали красители и тиольные соединения. Однако выявленные преимущества ГКР-активных сорбентов позволили разработать методики для определения в водных растворах таких низкомолекулярных соединений, как

ЛВ [126,138–140], пестициды [112,125,141,142], органические загрязнители [123,127,134] и взрывчатые вещества [143,144]. К сожалению, редко проводилось адекватное тестирование ТФЭ-ГКР-методик для определения аналитов в объектах со сложным составом (табл. 4.1). Более того, для тестирования использовали только по одному образцу сложного объекта, в то время как его состав непостоянен (например, сыворотка крови от человека к человеку или сок от партии к партии). Однако в проведенных исследованиях показано, что пористая матрица сорбента позволяет отделять низкомолекулярные аналиты от высокомолекулярных примесей (муцина слюны [117,121,122] и белков сыворотки крови [17,116,138]). В итоге достигается снижение уровня фонового ГКР-сигнала, а также предотвращается загрязнение ГКР-активной поверхности примесями и снижается конкуренция с ними за участки связывания на металлической поверхности.

Следует отметить, что в анализе объектов со сложным составом широко используют ГКР-активные сорбенты, полученные с использованием технологии молекулярного импринтинга благодаря повышенной селективности. Однако, хотя примеси могут не генерировать собственный ГКР-сигнал, но они могут занимать и блокировать участки распознавания ГКР-подложки, модифицированной молекулярно импринтированным полимером (МИП), что приводит к снижению интенсивности ГКР-сигнала целевого аналита. Например, показано, что МИП-ГКР-подложка, разработанная для определения патулина, лучше сорбирует и усиливает КР-сигнал целевого аналита по сравнению с его структурными аналогами (оксиндолем и 5-гидроксиметилфурфуролом) [145]. Однако интенсивность спектра патулина уменьшается примерно на 25% при детектировании патулина в эквимольной смеси с обоими структурными аналогами. Поэтому честное исследование селективности ГКР-активных сорбентов показывает их ограниченную селективность даже при использовании МИП. Также следует отметить, что синтез ГКР-активных сорбентов с использованием технологии

молекулярного импринтинга более сложный и продолжительный по времени (в т.ч. в связи с необходимостью отмывки матрицы от молекулы-шаблона), а также требует использования органических растворителей и более эксклюзивных реагентов.

Табл. 4.1. Примеры применения методик ТФЭ-ГКР-анализа для определения аналитов в реальных объектах. * – пересчитано из градуировочной зависимости.

Объект	Аналит	ГКР-активный сорбент	Прав., %	s_r , %	Ссылка
Зеленый чай	теофиллин	МИП со встроенными ЗНЧ	95	–	[139]
Сыворотка крови	МТК	золотые НЧ (ЗНЧ), встроенные в наносферы SiO ₂	–	5–27*	[116]
	б-тиогуанин	альгинатные микрочастицы со встроенными ЗНЧ	–	9–10	[17]
	трансферрин	золотые наностержни@МИП	98.6	8.4	[137]
Молоко	хлорамфеникол	МИП со встроенными ЗНЧ	96–98	2.3–3.4	[135]
Речная вода	цигалотрин	ЗНЧ@МИП	96–104	–	[141]
Яблочный сок	тиурам	ЗНЧ@полимер	–	6–11*	[110]
Апельсиновый сок			102–108	4.8–5.4	
Ягодное варенье	патулин	МИП со встроенными ЗНЧ	99–113	5–7.3	[145]
Фруктовое варенье			96–97	7–8	

Таким образом, хотя использование для анализа ГКР-активных сорбентов является перспективным направлением, число работ по применению ГКР-активных сорбентов для определения веществ, имеющих практическое значение и, тем более, в сложных матрицах всё ещё мало, несмотря на большой накопленный объём физико-химических знаний о данных материалах.

4.2. Силикагель со встроенными серебряными наночастицами

Синтез и исследование образцов

Для синтеза силикагеля со встроенными СНЧ ($\text{SiO}_2\text{-СНЧ}$), использовали золь-гель подход, основанный на щелочном гидролизе тетраэтилортосиликата (ТЭОС) с одновременным восстановлением ионов серебра до СНЧ. Водный раствор аммиаката серебра ($[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$) использовали в качестве прекурсора серебра, который готовили путём смешивания водных растворов аммиака (28%) и нитрата серебра (0.1–1 М) в объёмном отношении 1:5. Затем к 10 мл раствора ТЭОС в этиловом спирте (1:2, об.) поочередно добавляли 1 мл свежего раствора аммиаката серебра и 0.5 мл раствора восстановителя и тщательно перемешивали смесь после добавления каждого реагента. Затем смесь высушивали при комнатной температуре в течение 3 дней в темноте и вручную измельчали в ступке для получения порошка. Порошок $\text{SiO}_2\text{-СНЧ}$ дополнительно промывали 3 раза водой, высушивали и хранили при комнатной температуре в плотно закрытых микропробирках для центрифугирования.

В качестве восстановителей изучены аскорбиновая кислота (АК), формалин, борогидрид натрия и гидразин солянокислый. Восстановитель брали с небольшим избытком, чтобы провести полное восстановление СНЧ в матрице геля и исключить возникновение фотохимических реакций с остатками нитрата серебра (фотовосстановление до СНЧ) при использовании конечного сорбента в ГКР-анализе. При использовании АК и борогидрида натрия процесс восстановления ионов серебра происходит слишком быстро (за несколько секунд) и процесс гелеобразования не успевает за ростом СНЧ, которые агрегируют и оседают, неравномерно распределяясь в образующемся геле. В случае формалина процесс восстановления происходит, наоборот, слишком медленно, и СНЧ не успевают вырасти в уже сформированной матрице геля. Наконец, восстановление ионов серебра раствором гидразина протекает с наиболее оптимальной скоростью, сопоставимой с процессом гелеобразования, что обеспечивает равномерное

распределение СНЧ в матрице силикагеля. Более того, окисление гидразина при восстановлении серебра приводит к образованию азота, который более предпочтителен в качестве продукта реакции, чем другие трудноудаляемые соединения, которые могут приводить к появлению фонового ГКР-сигнала (например, молекулы окисленной АК).

Таким образом, важной особенностью разработанной методики синтеза является формирование и стабилизация СНЧ непосредственно в объёме силикагеля, что позволяет отказаться от использования стабилизаторов для СНЧ и тем самым увеличить отношение «сигнал/шум» при регистрации ГКР-спектров.

В ходе проведения экспериментов замечено, что варьирование концентрации добавки нитрата серебра влияет на время гелеобразования SiO_2 -СНЧ. Для изучения данного эффекта проведены дополнительные измерения вязкости реакционной смеси в процессе гелеобразования. Установлено, что все зависимости вязкости от времени имеют примерно одинаковый профиль (рис. 4.1а): сперва появляются три небольших пика (в интервале от 0.5 до 2.5 мин) и с 3 мин начинается процесс застывания и созревания геля. Центральный из этих 3-х пиков использовали для построения зависимости времени появления данного пика (времени начала гелеобразования) от концентрации нитрата серебра (рис. 4.1б). Полученная зависимость имеет экстремальный характер: быстрее всего гель образуется при концентрации AgNO_3 равной 0.3 и 0.5 М, медленнее – при 0.1 и 1 М.

Наличие экстремальной зависимости предположительно связано с различным количеством свободного гидрата аммиака, которое остаётся после образования комплекса между $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ и AgNO_3 и которое может влиять на скорость гидролиза ТЭОС и стабильность золя диоксида кремния. Например, аммиакат серебра, приготовленный с использованием 0.1 М AgNO_3 , содержит около 93% непрореагировавшего $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (от первоначально взятого). В результате поверхность частиц золя имеет большой отрицательный заряд, что препятствует их агломерации и приводит к

ингибированию процесса гелеобразования. С другой стороны, комплекс, приготовленный с использованием 1 М раствора AgNO_3 , содержит уже только 32% непрореагировавшего $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, приводя к снижению концентрации катализатора гелеобразования (ионов OH^-) и, следовательно, также к замедлению процесса гелеобразования.

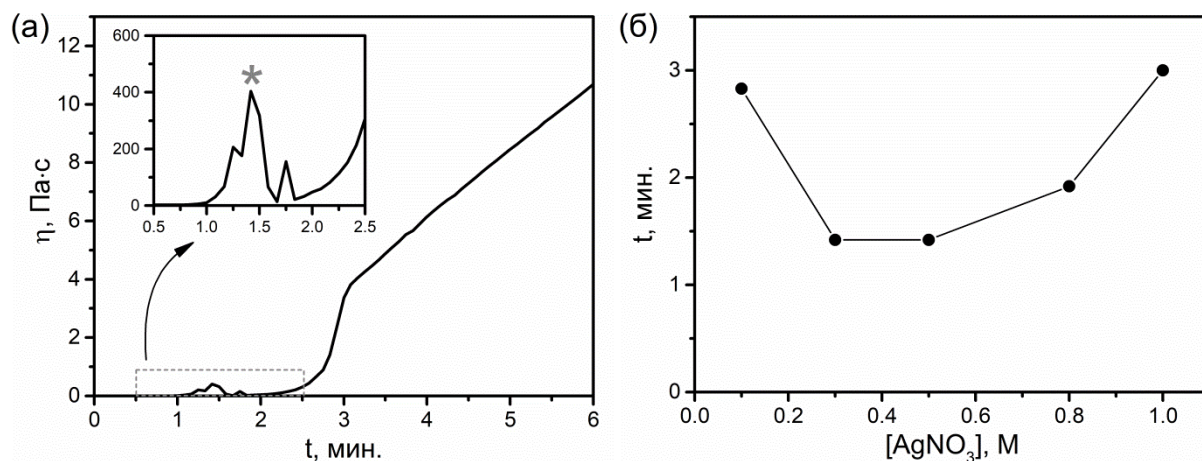


Рис. 4.1. (а) Характеристическая кривая изменения вязкости реакционной смеси во время образования геля. Время возникновения пика, отмеченного звездочкой, использовали как время начала гелеобразования. (б) Зависимость времени начала гелеобразования силикагеля от концентрации раствора AgNO_3 . Измерение вязкости в процессе гелеобразования проводили на вискозиметре SV-10 (A&D).

Аналогичная зависимость имеет место и при увеличении концентрации добавляемого восстановителя: с ростом концентрации гидразина солянокислого увеличивается время созревания геля. В данном случае природа эффекта аналогична описанной выше – нейтрализация гидроксид-ионов происходит соляной кислотой, связанной с гидразином.

При варьировании концентрации AgNO_3 в реакционной смеси от 0.1 до 1 М образцы $\text{SiO}_2\text{-СНЧ}$ приобретают различную окраску, связанную с варьированием количества и размера СНЧ (рис. 4.2а). Порошки образцов получены путём измельчения в ступке высушенных образцов. В итоге частицы $\text{SiO}_2\text{-СНЧ}$ в полученных порошках имеют широкое распределение по размерам (с максимумом при 100 мкм) (рис. 4.2б).

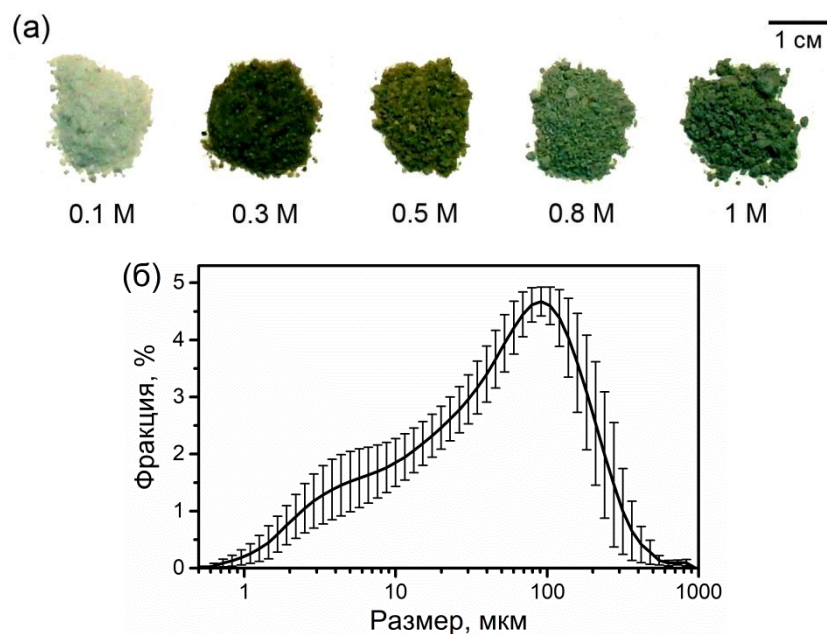


Рис. 4.2. (а) Фотографии образцов $\text{SiO}_2\text{-CHC}$, синтезированных с использованием раствора AgNO_3 различной концентрации. (б) Распределение частиц $\text{SiO}_2\text{-CHC}$ по размеру после ручного измельчения в ступке (усреднено по 6 образцам); измерения выполнены с использованием метода лазерной дифракции (прибор Mastersizer 2000).

Изучение образцов $\text{SiO}_2\text{-CHC}$ с помощью СЭМ подтвердило, что СНЧ встроены внутрь матрицы SiO_2 (рис. 4.3а,б). Средний размер СНЧ составил 76 нм ($s_r \sim 29\%$), однако точная оценка формы СНЧ внутри $\text{SiO}_2\text{-CHC}$ осложнена изолирующими свойствами матрицы диоксида кремния, низкой концентрацией СНЧ и, как следствие, низким контрастом СЭМ-изображений.

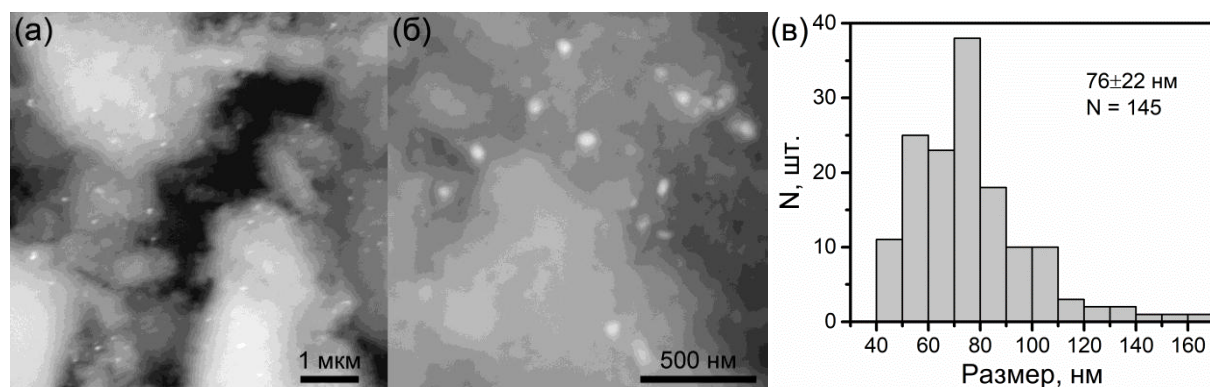


Рис. 4.3. (а,б) СЭМ-изображения образца $\text{SiO}_2\text{-CHC}$, полученного с использованием 0.3 М AgNO_3 и (в) распределение СНЧ по размеру внутри данного образца.

Используя результаты энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДРС) образцов $\text{SiO}_2\text{-CHC}$, синтезированных с использованием разных концентраций нитрата серебра, рассчитано

содержание в них основных элементов (кислорода, кремния и серебра). Результаты получены с помощью электронного микроскопа Mira II LMU с приставкой для проведения микроанализа методом ЭДРС. Как и ожидалось, содержание серебра в образцах $\text{SiO}_2\text{-СНЧ}$ линейно увеличивается с увеличением концентрации добавляемого нитрата серебра (рис. 4.4). Примечательно, что содержание кислорода в образцах превышает стехиометрическое для SiO_2 на 25–50%, что говорит о присутствии связанной воды в образцах. Тем не менее, состав гелей и степень их гидратации воспроизводятся хорошо.

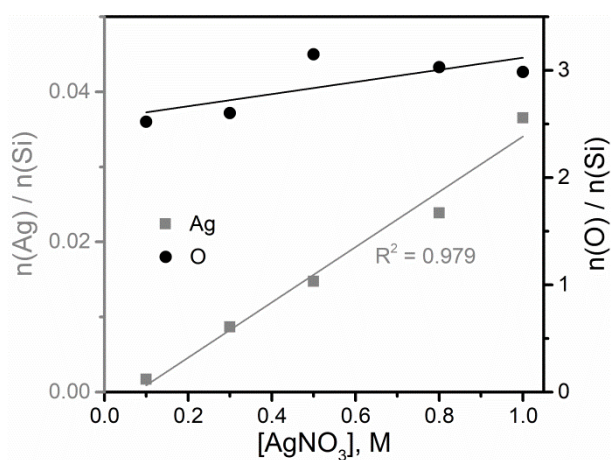


Рис. 4.4. Зависимость мольных отношений серебро/кремний и кислород/кремний (по данным ЭДРС) в образцах $\text{SiO}_2\text{-СНЧ}$, синтезированных с использованием разных концентраций AgNO_3 .

Усиливающие и оптические свойства образцов

Полученные образцы $\text{SiO}_2\text{-СНЧ}$ с различной концентрацией серебра использовали в процедуре ТФЭ в качестве ГКР-активных сорбентов (рис. 4.5). Навеску порошка $\text{SiO}_2\text{-СНЧ}$ (40 мг) помещали между 2 фриттами (размер пор 10 мкм) в колонку для ТФЭ объемом 1 мл и промывали 10 мл бидистиллированной воды для кондиционирования. Затем проводили ТФЭ, заключающуюся в пропускании через колонку 10 мл раствора роданина 6Ж (Р6Ж, рис. 4.5), который широко используется в качестве модельного соединения для оценки усиливающих свойств новых ГКР-подложек. Далее влажный ГКР-активный сорбент с сорбированными молекулами аналита извлекали из колонки и проводили регистрацию ГКР-спектров. ГКР-

измерения проводили с использованием КР-спектрометра Solar ТП, совмещенного с инвертированным микроскопом (100х объектив, 0.9 NA) с конфокальной оптической системой; длина волны лазера – 473 нм, мощность лазера на образце – 9 мВт, время накопления сигнала – 10 с. Для оценки степени извлечения аналита регистрировали спектры флуоресценции растворов до и после колонки.

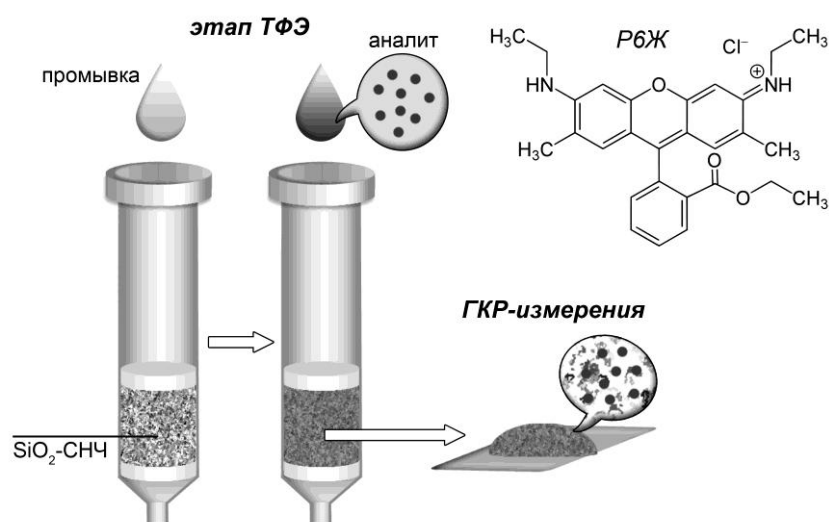


Рис. 4.5. Схема проведения ТФЭ и ГКР-измерений с использованием SiO₂-СНЧ. Во вставке изображена структурная формула Р6Ж.

Установлено, что наиболее интенсивный ГКР-сигнал Р6Ж генерирует образец, синтезированный с использованием 0.3 М раствора AgNO₃, в то время как образцы, полученные с использованием 0.8 и 1 М растворов, не показывают никакого усиления КР-сигнала (рис. 4.6а). Для объяснения данного эффекта порошки SiO₂-СНЧ исследовали методом спектроскопии диффузного отражения света (ДОС) с использованием спектрофотометра Lambda 950 (PerkinElmer) с интегрирующей сферой. Для нивелирования вклада рэлеевского рассеяния от матрицы SiO₂ из всех спектров ДОС образцов SiO₂-СНЧ вычитали спектр ДОС образца силикагеля, синтезированного с добавкой NaNO₃ (0.1 М) вместо AgNO₃. С целью облегчения интерпретации и повышения наглядности полученных результатов, спектры ДОС пересчитывали в спектры поглощения с использованием следующей формулы:

$$A = \lg(100/R), \quad (4.1)$$

где A – оптическая плотность; R – интенсивность отраженного света, %.

Анализ полученных спектров поглощения показал, что порошки SiO_2 -СНЧ поглощают свет в широком диапазоне длин волн (350 до 800 нм) (рис. 4.6б). Отметим, что образцы, полученные при использовании растворов AgNO_3 с концентрациями 0.1, 0.3 и 0.5 М, имеют максимум поглощения в области 400–500 нм, что подтверждает наличие СНЧ, имеющих плазмонно-резонансное поглощение в этой области (для сравнения приведен спектр коллоидных СНЧ) (рис. 4.6б).

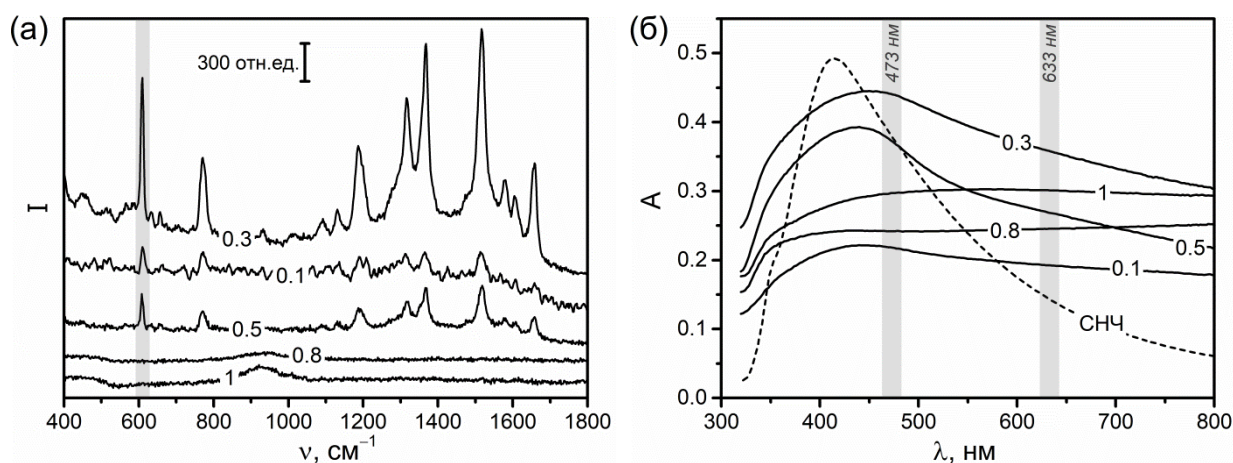


Рис. 4.6. Влияние молярной концентрации добавки AgNO_3 , использованной при синтезе образцов SiO_2 -СНЧ, на (а) ГКР-спектры раствора Р6Ж (10^{-5} М) и (б) спектры поглощения сухих порошков SiO_2 -СНЧ. Спектр «СНЧ» соответствует раствору коллоидных СНЧ, стабилизированных цитрат-ионами.

Сильное уменьшение максимума поглощения при 450 нм в спектрах поглощения образцов, синтезированных с использованием более высоких концентраций раствора AgNO_3 (0.8 и 1 М), происходит в связи с увеличением числа, размера и полидисперсности частиц серебра. Это приводит к уменьшению расстояния между частицами серебра, что вызывает смещение и исчезновение полосы их плазмонного поглощения. Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными измерениями спектров ДОС СНЧ, встроенных в полимерные [146] и кремниевые [147] матрицы.

Сравнение зависимостей ГКР-спектров и спектров ДОС от концентрации раствора AgNO_3 , использованного для синтеза, показывает, что наибольшее поглощение образца в районе 450 нм соответствует его

наибольшей способности к усилению КР-сигнала (рис. 4.7), что согласуется с результатами, полученными для других ГКР-подложек на основе серебра [148].

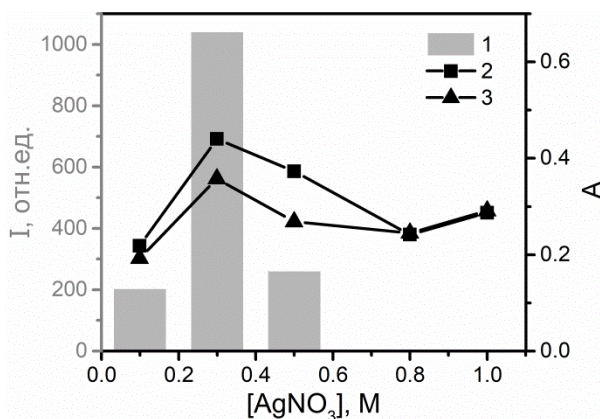


Рис. 4.7. Влияние концентрации AgNO_3 , использованной при приготовлении образцов $\text{SiO}_2\text{-СНЧ}$, на (1) интенсивность ГКР-спектра РБЖ (по пику при 612 см^{-1} на рис. 4.6а) и (2,3) значение оптической плотности образцов $\text{SiO}_2\text{-СНЧ}$ на длинах волн возбуждающего лазера 473 (2) и 633 (3) нм (по рис. 4.6б).

Также ожидается, что использование лазерного излучения, длина волны которого совпадает с максимумом поглощения ГКР-подложки, приведёт к дополнительному увеличению интенсивности ГКР-сигнала благодаря усилению генерации ППР. Для проверки данного эффекта провели регистрацию ГКР-спектров фолиевой кислоты (ФК) с использованием синего (473 нм) и красного (633 нм) лазеров и одного и того же образца $\text{SiO}_2\text{-СНЧ}$ (рис. 4.8). Регистрация ГКР-спектров с помощью лазера 473 нм в случае РБЖ ограничена из-за генерации интенсивного сигнала люминесценции и его сильного перекрывания с ГКР-сигналом. Анализ полученных результатов для ФК показал, что при использовании синего лазера генерируется в 50 раз более интенсивный ГКР-сигнал, что подтверждает возможность увеличения чувствительности ГКР-анализа при использовании возбуждающего излучения, максимально поглощающегося ГКР-подложкой.

Наконец важно отметить отсутствие какого-либо фонового ГКР-сигнала при использовании $\text{SiO}_2\text{-СНЧ}$, что связано в первую очередь с низкой КР-активностью связей в матрице сорбента (силикагеля), а также полной отмывкой образцов от побочных продуктов синтеза и остатков реагентов.

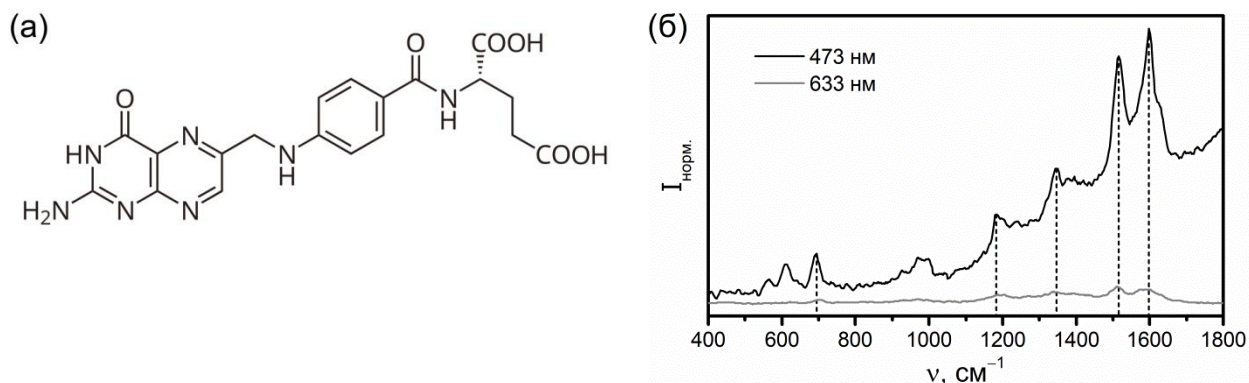


Рис. 4.8. (а) Структурная формула ФК. (б) ГКР-спектры ФК (10^{-5} М), полученные с использованием лазеров с различной длиной волны. Для сорбции ФК и генерации ГКР-сигнала использовался образец $\text{SiO}_2\text{-СНЧ}$, синтезированный с использованием 0.3 М AgNO_3 . Спектры были нормированы на одинаковую мощность лазеров (1 мВт) и время регистрации сигнала (1 с).

Оценка усиливающих свойств ГКР-активного сорбента

Проведение ТФЭ-ГКР-измерений с применением образца $\text{SiO}_2\text{-СНЧ}$, продемонстрировавшего максимальное усиление КР-спектров (полученного с использованием 0.3 М раствора AgNO_3), показало, что добавление стадии экстракции позволяет получить ГКР-сигнал раствора РБЖ концентрацией 10^{-7} М, что на 2 порядка ниже, чем без этапа экстракции (10^{-5} М). Для количественной оценки величины усиления КР-сигнала разработанным ГКР-активным сорбентом использовали значение коэффициента усиления (КУ), который рассчитывали по формуле:

$$КУ = \frac{I_{\text{ГКР}} \cdot S \cdot \rho_{\text{крист.}}}{I_{\text{КР крист.}} \cdot C_{\text{ГКР}} \cdot M} \quad (4.2),$$

где $C_{\text{ГКР}}$ – концентрация аналита, моль/л;

$I_{\text{ГКР}}$ – интенсивность пика ГКР-спектра аналита (концентрацией $C_{\text{ГКР}}$), нормированная на мощность лазера (1 мВт) и время накопления сигнала (1 с);

$I_{\text{КР крист.}}$ – интенсивность пика КР-спектра аналита в кристаллическом состоянии, нормированная на мощность лазера (1 мВт) и время накопления сигнала (1 с);

S – степень сорбции аналита на сорбенте;

$\rho_{\text{крист.}}$ – плотность порошка аналита, г/дм³;

M – молярная масса аналита, г/моль.

Учитывая, что степень сорбции Р6Ж (10^{-7} М) на образце SiO₂-СНЧ составила 98%, то в итоге КУ SiO₂-СНЧ составил $\sim 10^5$ при использовании пика Р6Ж при 612 см⁻¹ (рис. 4.9).

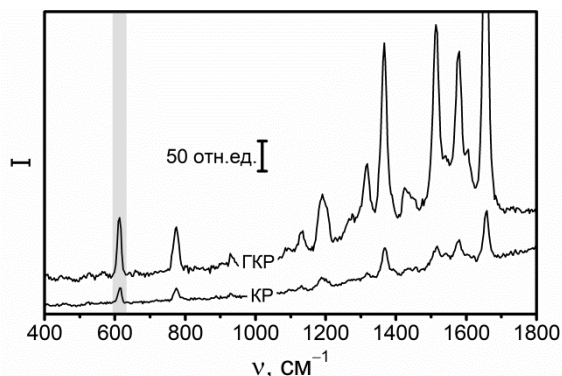


Рис. 4.9. КР-спектр Р6Ж в кристаллическом состоянии и ГКР-спектр раствора Р6Ж (10^{-7} М), полученный после этапа ТФЭ с использованием SiO₂-СНЧ в качестве сорбента. Интенсивность обоих спектров нормирована на одинаковую мощность лазера (1 мВт) и время накопления сигнала (1 с).

Использование стеклянных мультикапилляров в качестве носителя ГКР-активного силикагеля

Различные микро- и наноструктурированные стеклянные волокна и мультикапилляры (СМК) с высокой удельной площадью поверхности ранее уже использовали в качестве основы для изготовления ГКР-подложек [149,150]. Тем не менее, основной упор данных исследований был сделан преимущественно на уникальные оптические свойства данных структур в качестве светопроводящих волноводов нежели на ГКР-анализ. В текущей работе нами проведена модификация внутренней поверхности МКСС с помощью ГКР-активного сорбента для дополнительного увеличения сорбционной способности и, соответственно, ГКР-эффективности.

В отличие от методики синтеза образцов SiO₂-СНЧ, описанной выше, в данном случае синтез SiO₂-СНЧ проводили путём добавления предварительно синтезированных СНЧ в реакционную смесь для получения ГКР-активного золь-гель материала. Данный подход позволяет значительно

лучше контролировать усиливающие и оптические свойства конечных образцов SiO₂-СНЧ. Изначально готовили золь SiO₂-СНЧ путём смешивания 2 мл этанола, 20 мкл сконцентрированных в 100 раз СНЧ и 20 мкл ТЭОС и дальнейшей ультразвуковой (УЗ) обработки смеси в течение 15 мин.

В данной методике использовали СНЧ, стабилизированные цитрат-ионами [151], синтез которых включает (i) доведение до кипения при непрерывном перемешивании на магнитной мешалке 100 мл раствора AgNO₃ (1 мМ) и (ii) добавление 100 мкл цитрата натрия (0.5 М). Нагрев смеси прекращали через 30 мин, после чего раствор СНЧ охлаждали при комнатной температуре, не отключая перемешивания. Диаметр полученных СНЧ согласно результатам СЭМ-исследования составил 67±16 нм ($s_r \sim 24\%$, рис. 4.10).

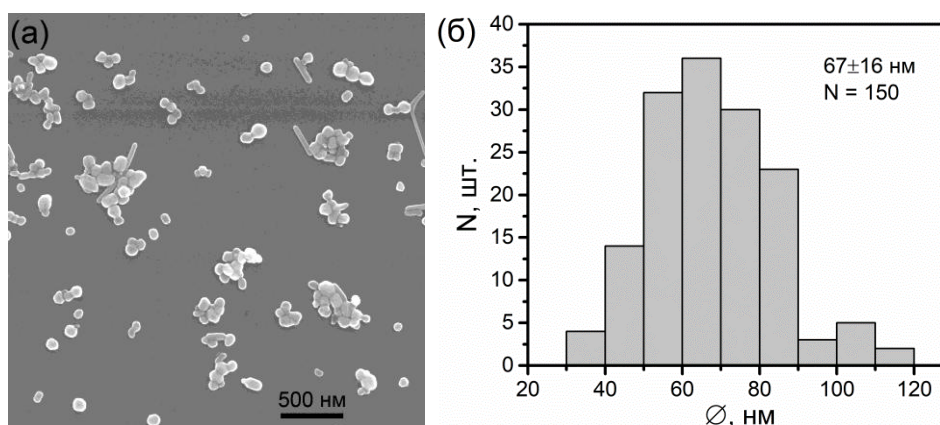


Рис. 4.10. СЭМ-изображение СНЧ, стабилизированных цитрат-ионами, (а) и гистограмма их распределения по размеру (б).

Исследование образцов методом ДРС показало, что размер частиц золя SiO₂-СНЧ больше и более однородный по сравнению с исходными СНЧ (рис. 4.11а). Близкое к нейтральному значение дзета-потенциала частиц золя SiO₂-СНЧ обусловлено высоким вкладом ОН-групп, которые плохо диссоциируют по сравнению с цитрат-ионами, используемыми для стабилизации СНЧ (рис. 4.11б).

Далее полученной смесью заполняли отрезки (длина ~2 см) СМК, выдерживали 15 мин для завершения модификации, после чего СМК промывали водой и высушивали при 50°C. В работе использовали СМК из

боросиликатного стекла, состоящие из 4293 капилляров (ООО НПП «НТС») и зафиксированные в наконечнике для микропипетки для удобства работы (рис. 4.12).

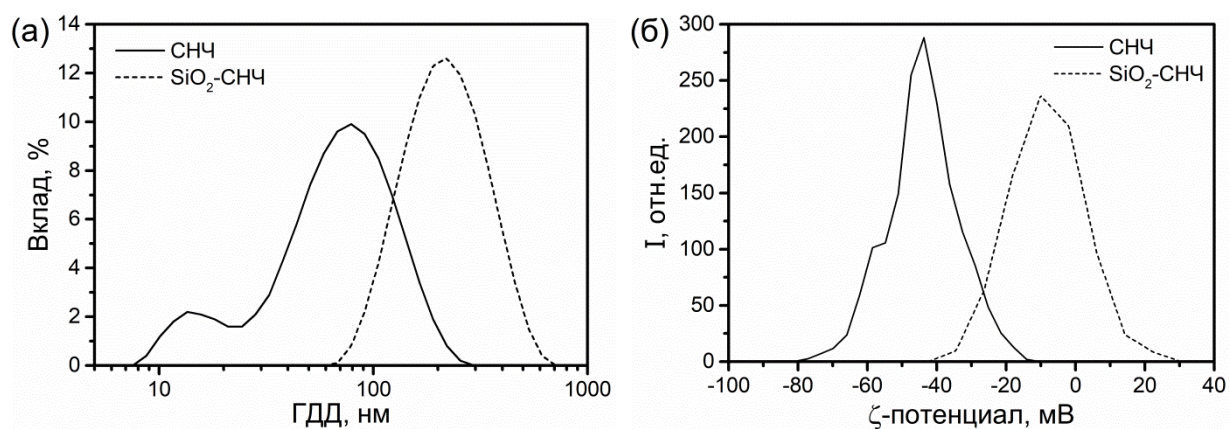


Рис. 4.11. Распределение по размеру (а) и дзета-потенциалу (б) образца СНЧ, стабилизированных цитрат-ионами, и образца частиц золя $\text{SiO}_2\text{-СНЧ}$.

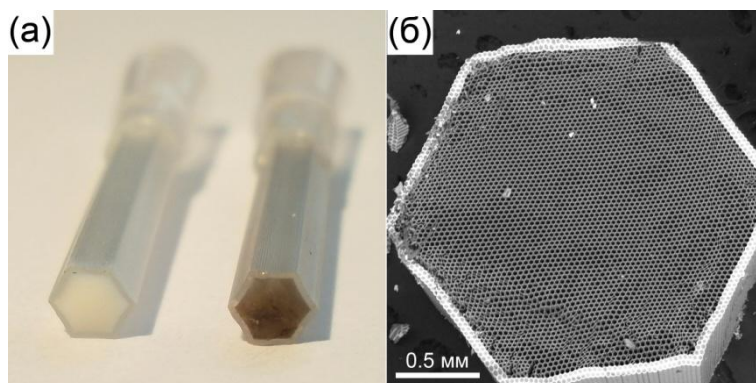


Рис. 4.12. (а) Фотография СМК до (слева) и после (справа) модификации покрытием из $\text{SiO}_2\text{-СНЧ}$. (б) СЭМ-изображение поперечного среза исходного СМК.

СЭМ-изображения СМК до и после модификации демонстрируют, что нанесение композита $\text{SiO}_2\text{-СНЧ}$ внутрь СМК увеличивает шероховатость и, как следствие, площадь контакта с анализируемым раствором, но при этом незначительно влияет на внутренний диаметр капилляров (рис. 4.13а,б). Отдельное СЭМ-исследование высушенного золя $\text{SiO}_2\text{-СНЧ}$ показало, что СНЧ внутри силикатной матрицы частично агрегированы (рис. 4.13в), что благоприятно для получения дополнительного усиления ГКР-сигнала молекул аналита, находящихся близко к месту соединения агрегированных частиц.

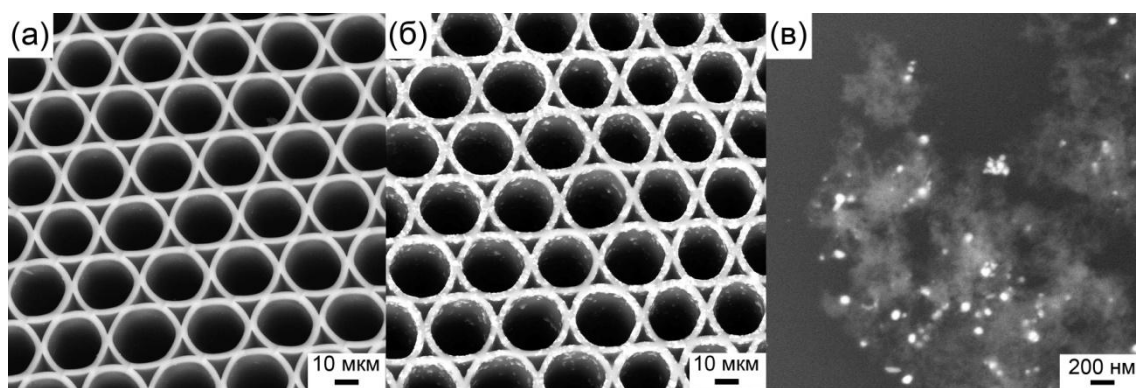


Рис. 4.13. СЭМ-изображения исходного (а) и модифицированного (б) СМК, а также композита SiO₂-СНЧ (в).

Методика ГКР-анализа с использованием ГКР-активных СМК включает пропускание 25 мкл раствора Р6Ж через модифицированный СМК и последующие измерения ГКР-спектров с торца СМК. Сравнение интенсивностей сигнала флуоресценции раствора Р6Ж (10^{-6} М) до и после пропускания через СМК показало, что степень сорбции аналита на композите SiO₂-СНЧ составила 98%. Таким образом, получена миниатюрная ГКР-активная колонка для ТФЭ, КУ которой составил $1.2 \cdot 10^7$, обладающая несколькими преимуществами. Во-первых, достигнута минитюаризация анализа за счёт увеличенной удельной поверхности СМК, а для анализа требуется всего 25 мкл аналита (по сравнению с 10 мл для ТФЭ-ГКР-методики с применением SiO₂-СНЧ). Во-вторых, не требуется извлечение сорбента из колонки, поскольку стеклянные капилляры не мешают ГКР-детектированию, т.е. не создают фонового ГКР-сигнала. Основной недостаток заключается в очень высокой стоимости СМК, особенно учитывая, что в случае некоторых аналитов регенерация поверхности ГКР-активного сорбента представляет значительные трудности.

4.3. Оксид алюминия со встроенными серебряными наночастицами

Синтез и исследование образцов

Встраивание предварительно синтезированных ГКР-активных НЧ в матрицу сорбента, предложенное в конце раздела 4.2, оказалось очень эффективным подходом. Поэтому в текущей работе также использовали для

встраивания в матрицу оксида алюминия предварительно синтезированные СНЧ, для восстановления и стабилизации которых использовали цитрат-ионы (конец раздела 4.2). Синтез оксида алюминия со встроенными СНЧ ($\text{Al}_2\text{O}_3\text{-СНЧ}$) осуществляли путём одновременного добавления растворов $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (5 мл, 0.2 г/мл) и Na_2CO_3 (4 мл, 0.12 г/мл) к 20 мл раствора СНЧ при непрерывном интенсивном перемешивании смеси на магнитной мешалке. Растворы $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ и Na_2CO_3 добавляли порциями по 1 мл. Смесь продолжали перемешивать в течение 5 мин после добавления последней порции соли алюминия. Затем гидроксид алюминия со встроенными СНЧ трижды промывали водой с помощью центрифугирования (5 мин, $1700\times g$), после чего промытую суспензию переливали в чашку Петри и высушивали при температуре 50°C в течение суток для получения $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-СНЧ}$. Высушенные образцы измельчали в ступке и хранили при комнатной температуре в плотно закрытых микропробирках для центрифугирования.

Ключевым моментом в синтезе $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-СНЧ}$ является порционное и одновременное добавление прекурсоров $\text{Al}(\text{OH})_3$ к интенсивно перемешиваемому раствору СНЧ. Это позволяет провести постепенное формирование геля $\text{Al}(\text{OH})_3$ и осуществить равномерное встраивание в него СНЧ, предотвращая их неконтролируемую агрегацию за счёт повышенной ионной силы реакционной смеси. Анализ образцов $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-СНЧ}$ с помощью СЭМ и ЭДРС подтверждает встраивание СНЧ в матрицу сорбента и отсутствие их агрегации (рис. 4.14).

Масса одного образца $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-СНЧ}$, полученного по описанной методике синтеза, составляет 380 ± 20 мг ($s_r \sim 5\%$), что соответствует выходу реакции $\sim 250\%$ (по Al_2O_3) и указывает на большое содержание кристаллизационной воды. Попытки удалить эту воду путём сушки при повышенных температурах привели к сильному ухудшению способности усиливать КР-сигнал, что предположительно связано со сплавлением близкорасположенных СНЧ в более крупные частицы при нагревании ГКР-активного сорбента до 70°C и выше [152]. Оценка удельной площади

поверхности (по методу Брунауэра-Эммета-Теллера) и распределения пор по размерам (по методу Баррета-Джойнера-Халенды) с использованием анализатора NOVA 1200e (Quantachrome) показала, что сухие порошки Al_2O_3 -СНЧ имеют два основных диапазона размера пор: от 1 до 10 нм и от 10 до 50 нм с вкладом 20% и 80% в удельную площадь поверхности ($\sim 30 \text{ м}^2/\text{г}$), соответственно.

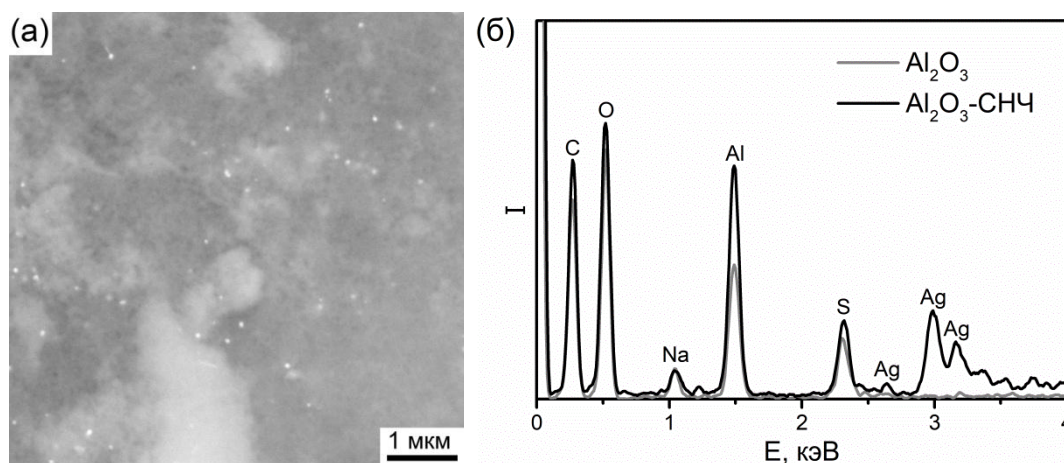


Рис. 4.14. СЭМ-изображение образца Al_2O_3 -СНЧ (а) и спектры, полученные методом ЭДРС, образцов Al_2O_3 без и со встроенными СНЧ (б).

Оптические, сорбционные и усиливающие свойства образцов

Схема методики совмещения процедуры ТФЭ и ГКР-измерений представлена на рис. 4.15. Порцию образца Al_2O_3 -СНЧ (20 мг) помещали в микропробирку для центрифугирования, добавляли 2 мл раствора аналита и перемешивали в течение 5 мин для завершения сорбции. Далее смесь центрифугировали (1 мин, $1700\times g$), надосадочную жидкость использовали для определения степени сорбции аналита по спектрам поглощения, а влажный осадок извлекали из пробирки для измерения ГКР-спектров. ГКР-измерения проводили с использованием КР-спектрометра Solar ТП, совмещенного с инвертированным микроскопом (100х объектив, 0.9 NA) с конфокальной оптической системой; длина волны лазера – 473 нм, мощность лазера на образце – 0.05 мВт, время накопления сигнала – 10 с. В качестве модельных аналитов использовали положительно и отрицательно заряженные соединения (Р6Ж и ФК, соответственно) для проверки

сорбционных свойств $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-СНЧ}$ по отношению к анализтам с разным зарядом.

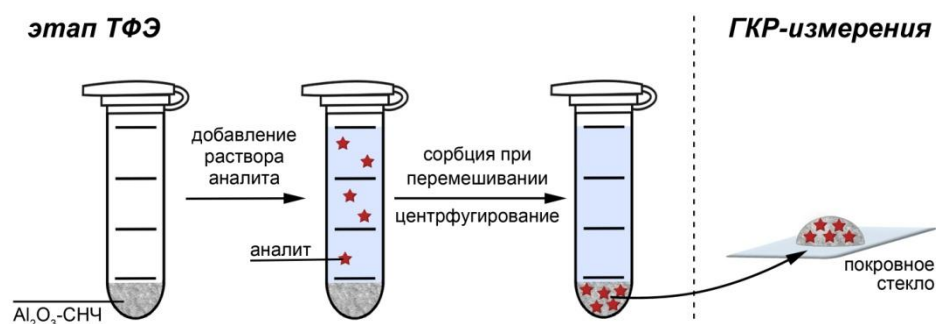


Рис. 4.15. Схема проведения ТФЭ с последующим проведением ГКР-анализа.

Дополнительным способом увеличения ГКР-сигнала является использование частично агрегированных СНЧ, поэтому перед встраиванием СНЧ в Al_2O_3 дополнительно проводили их искусственную и контролируемую агрегацию с помощью увеличения ионной силы раствора добавкой NaCl . Согласно данным ДРС ионная сила ниже 20 мМ не приводит к агрегации СНЧ (рис. 4.16а), тогда как увеличение ионной силы выше 40 мМ приводит к образованию больших и неоднородных агрегатов. Поэтому для искусственной агрегации СНЧ перед добавлением прекурсоров $\text{Al}(\text{OH})_3$ использовали ионную силу равную 30 мМ. Также установлено, что после создания ионной силы, оптимальной для проведения агрегации коллоидного раствора СНЧ, необходимо выждать 30 с. За это время достигается оптимальная степень агрегации и максимальный ГКР-сигнал РБЖ после процедуры ТФЭ-ГКР с использованием образца Al_2O_3 со встроенными агрегированными СНЧ ($\text{Al}_2\text{O}_3\text{-СНЧ}_{\text{агр.}}$) (рис. 4.16б).

Сравнение спектров поглощения образцов $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-СНЧ}$ и $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-СНЧ}_{\text{агр.}}$ (пересчитаны из спектров ДОС по формуле 4.1) показывает снижение значения оптической плотности на длине волны возбуждающего излучения (473 нм) в случае встраивания предварительно агрегированных СНЧ (рис. 4.17). Однако образование «горячих точек» внутри $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-СНЧ}_{\text{агр.}}$ обеспечивает увеличение интенсивности ГКР-сигнала почти на порядок по сравнению с $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-СНЧ}$ (рис. 4.16б). Более того, повышенное поглощение

света $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-СНЧ}_{\text{агр.}}$ в диапазоне 500–800 нм должно приводить к выравниванию эффективности генерации ГКР-сигнала при использовании возбуждающего излучения с длиной волны в диапазоне от видимого до ближнего ИК (БИК).

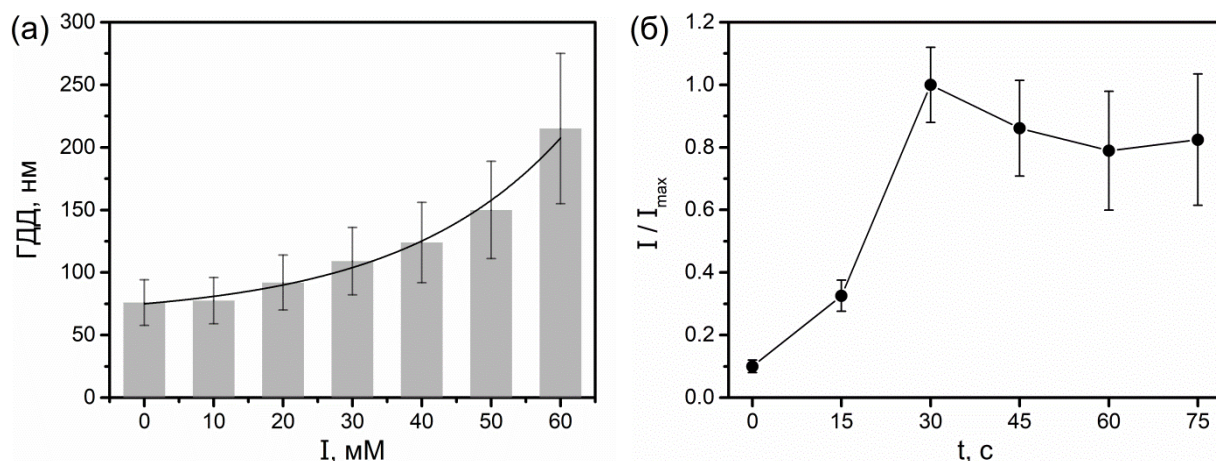


Рис. 4.16. (а) Зависимость ГДД СНЧ от ионной силы раствора (концентрации NaCl). (б) Зависимость интенсивности ГКР-сигнала Р6Ж (10^{-6} М, по пику при 612 см^{-1}) от времени агрегации СНЧ с помощью NaCl (ионная сила 30 мМ); в качестве нулевой точки использовали образец $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-СНЧ}$ с неагрегированным СНЧ.

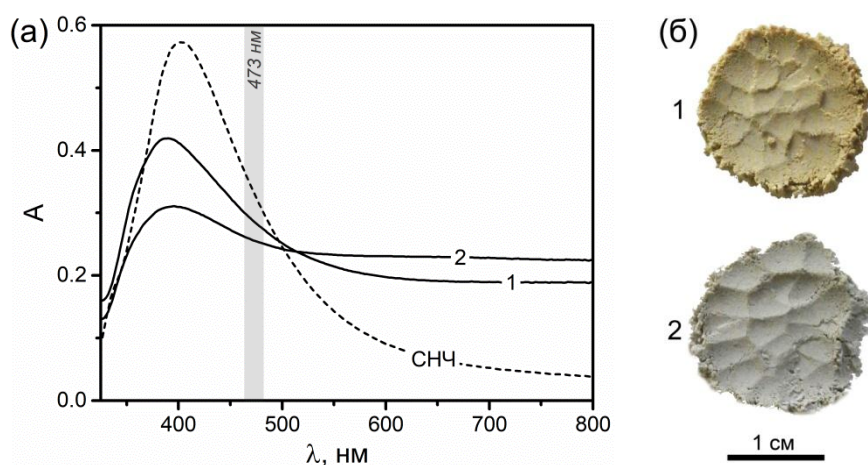


Рис. 4.17. Спектры поглощения (а) и фотографии (б) порошков оксида алюминия со встроенными неагрегированными (1) и искусственно агрегированными (2) СНЧ. Спектр «СНЧ» соответствует коллоидному раствору исходных СНЧ, разбавленному в 10 раз.

Измерение дзета-потенциала невысушенного образца $\text{Al}(\text{OH})_3$ со встроенными СНЧ показало, что он имеет положительное значение (рис. 4.18а). Следовательно, $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-СНЧ}_{\text{агр.}}$ должен иметь большее сродство к отрицательно заряженным анализам по сравнению с положительно заряженными. Действительно, изучение степени сорбции модельных

аналитов на образцах Al_2O_3 с и без СНЧ (рис. 4.18б) показало, что ФК имеет высокое сродство к $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-СНЧ}_{\text{агр}}$. (степень сорбции $\sim 80\%$). Также встраивание отрицательно заряженных цитрат-стабилизированных СНЧ в матрицу Al_2O_3 немного снижает сорбцию ФК (на $\sim 7\%$), что связано с частичным экранированием положительно заряженных сорбционных центров Al_2O_3 . С другой стороны, положительно заряженные молекулы Р6Ж должны иметь низкое сродство к сорбенту, что подтверждается низкими величинами степени сорбции Р6Ж на $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-СНЧ}_{\text{агр}}$. ($\sim 10\%$, рис. 4.18в).

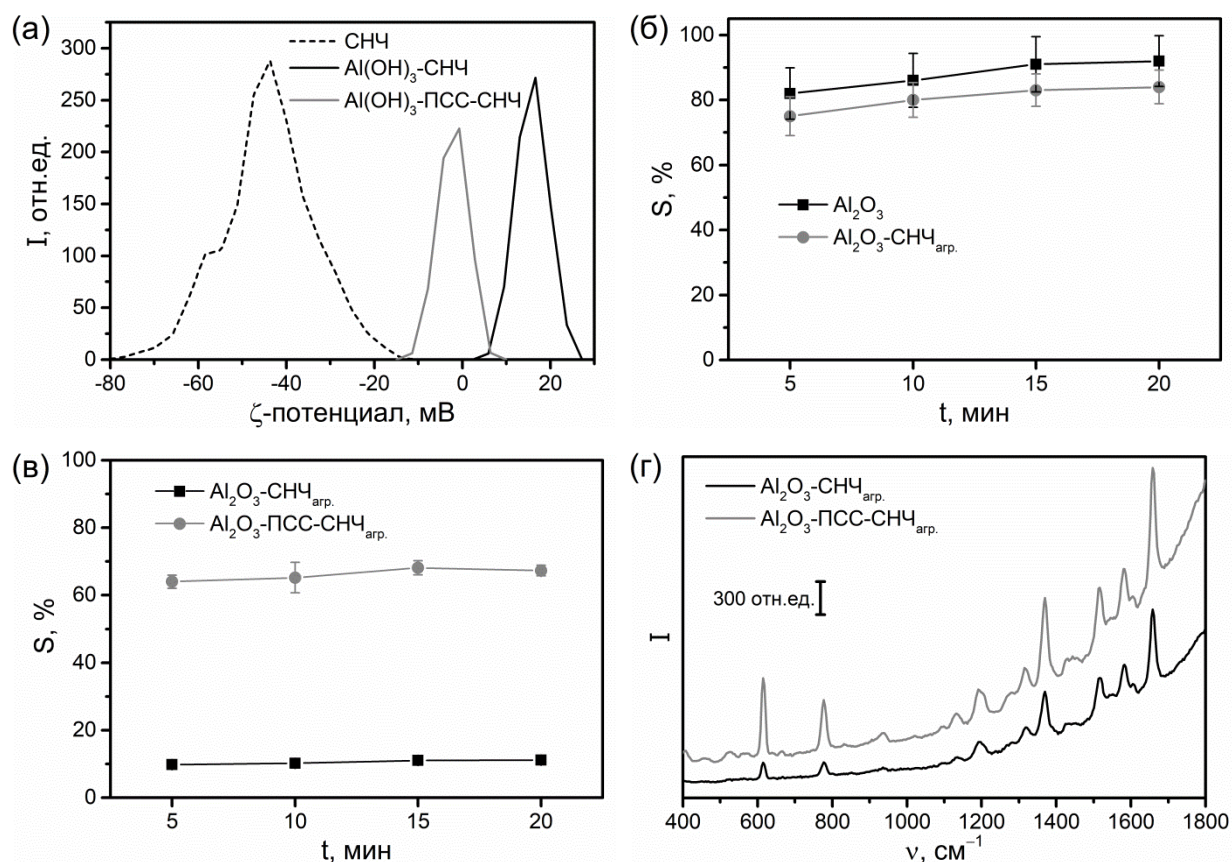


Рис. 4.18. (а) Распределение дзета-потенциала СНЧ, стабилизированных цитрат-ионами, и частиц геля $\text{Al}(\text{OH})_3$ без и с модификацией ПСС. (б,в) Влияние времени контакта аналитов с образцами сорбентов на степень сорбции (б) ФК (10^{-6} М) на Al_2O_3 без и со встроенными СНЧ и (в) Р6Ж (10^{-6} М) на образцах $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-СНЧ}_{\text{агр}}$. без и с модификацией ПСС. Результаты получены с использованием спектрофотометрии. (г) ГКР-спектры Р6Ж (10^{-8} М) после ТФЭ на образце $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-СНЧ}_{\text{агр}}$. без и с модификацией ПСС.

Для увеличения степени сорбции Р6Ж предложено модифицирование $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-СНЧ}$ с помощью полистиролсульфоната натрия (ПСС, рис. 3.22а), являющегося анионным полиэлектролитом. Методика получения

модифицированного сорбента (Al_2O_3 -ПСС-СНЧ_{агр.}) отличается от первоначальной методики только добавлением 1 мл раствора ПСС (2 мг/мл) в реакционную смесь после добавления первых порций (по 1 мл) $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ и Na_2CO_3 . Данный подход позволяет надёжно встраивать ПСС в матрицу сорбента и свести к минимуму его вымывание в процессе ТФЭ.

При содержании ПСС в конечном сорбенте всего ~0.5%, модификация привела к заметному смещению дзета-потенциала сорбента в сторону более отрицательных значений (с +16 до -2 мВ, рис. 4.18а). Это привело к значительному увеличению степени сорбции Р6Ж на Al_2O_3 -ПСС-СНЧ_{агр.} (с 10 до 65%, рис. 4.18в) за счёт сильного электростатического взаимодействия между положительно заряженными молекулами Р6Ж и отрицательно заряженными сульфогруппами ПСС. В результате увеличения сорбции Р6Ж произошло увеличение и его ГКР-сигнала (рис. 4.18г), в то время как присутствие ПСС в ГКР-активном сорбенте не привело к возникновению фонового ГКР-сигнала.

Изучение сорбции обоих модельных аналитов также показало, что 5 мин достаточно для проведения ТФЭ и увеличение времени сорбции не приводит к значительному увеличению степени сорбции (рис. 4.18б,в). Наконец, провели расчёт КУ образца Al_2O_3 -ПСС-СНЧ_{агр.} с использованием Р6Ж по формуле 4.2, который составил $8.4 \cdot 10^8$.

4.4. Микросферы карбоната кальция со встроенными серебряными наночастицами

Синтез и исследование образцов

Для получения образцов микросфер карбоната кальция со встроенными СНЧ (CaCO_3 -СНЧ) проведена модификация методики синтеза чистых микросфер CaCO_3 , ранее использованной для получения ГКР-подложек со структурой «ядро-оболочка» [120]. В новом варианте синтез CaCO_3 -СНЧ осуществляли путём одновременного добавления Na_2CO_3 и CaCl_2 (по 1 мл 1 М растворов) к 4 мл раствора предварительно синтезированных СНЧ,

стабилизированных цитрат ионами. Смешивание реагентов проводили при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке, которое отключали через 30 с и суспензию образовавшихся частиц CaCO_3 оставляли на 60 с до завершения их роста. Далее частицы 3 раза промывали водой от хлорида натрия с использованием центрифугирования (10 с, $2000\times g$), чтобы снизить ионную силу реакционной смеси и избежать перекристаллизации частиц CaCO_3 из микросфер в микрокубики. Полученные микросферы CaCO_3 -СНЧ промывали один раз этанолом (96%) для удаления воды, высушивали в течение 3 часов при 60°C и хранили при комнатной температуре в плотно закрытых микропробирках для центрифугирования. Высушивание образцов CaCO_3 -СНЧ осуществляли при 60°C , поскольку при этом достигается и максимальный ГКР-сигнал, и максимально высокая сорбционная способность CaCO_3 -СНЧ (рис. 4.19). Так, увеличение температуры сушки (с 20 до 100°C) приводит к увеличению степени сорбции Р6Ж за счёт максимального удаления растворителя из пор сорбента. Однако высушивание при 100°C приводит к падению ГКР-активности сорбента из-за температурной деградации СНЧ (что также наблюдалось при высушивании Al_2O_3 -СНЧ, раздел 4.3), поскольку происходит сплавление СНЧ в агрегаты с пониженными усиливающими свойствами [152].

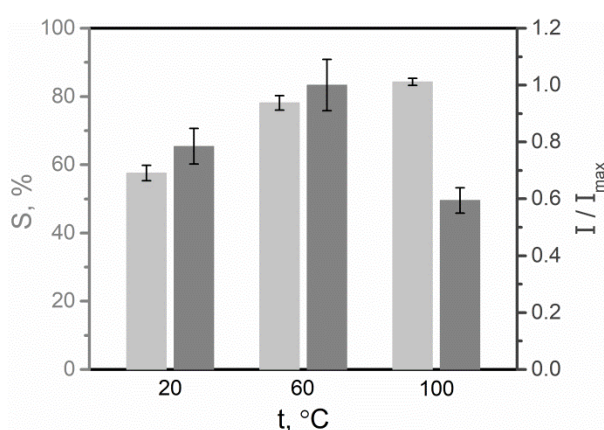


Рис. 4.19. Зависимость степени сорбции и интенсивности ГКР-сигнала раствора Р6Ж (10^{-8} М; по пику 1656 см^{-1}) от температуры высушивания CaCO_3 -СНЧ.

По данным СЭМ средний размер частиц CaCO_3 -СНЧ составляет 3.8 ± 0.8 мкм ($s_r \sim 21\%$) и присутствие СНЧ (~ 0.3 мас.%) не влияет на способность

CaCO_3 образовывать частицы сферической формы (рис. 4.20). Выход реакции синтеза CaCO_3 -СНЧ составил $93\pm 6\%$ ($n=10$).

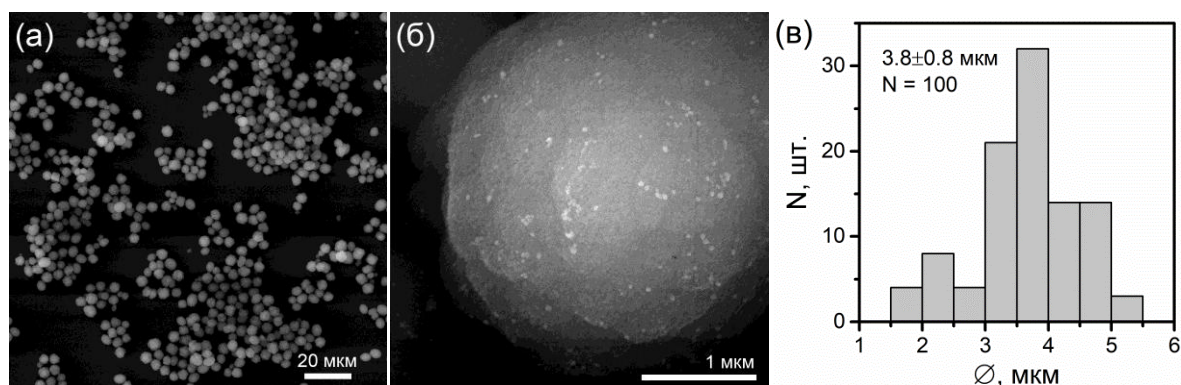


Рис. 4.20. (а,б) СЭМ-изображения микросфер CaCO_3 -СНЧ при разном увеличении и (в) гистограмма их распределения по размеру (диаметру).

Процедура ТФЭ с использованием CaCO_3 -СНЧ несколько отличается от таковой для Al_2O_3 -СНЧ (рис. 4.15) тем, что после смешивания сорбента (10 мг) с раствором аналита (0.5 мл), проведения ТФЭ и удаления рафината, дополнительно проводили растворение матрицы сорбента путём добавления 20 мкл HCl (5 М) и только потом проводили ГКР-измерения. ГКР-измерения проводили с использованием КР-спектрометра Solar ТП, совмещенного с инвертированным микроскопом (100х объектив, 0.9 NA) с конфокальной оптической системой; длина волны лазера – 473 нм, мощность лазера на образце – 0.5 мВт, время накопления сигнала – 1 с. Растворение матрицы сорбента в случае CaCO_3 -СНЧ необходимо, поскольку она сильно препятствует проникновению возбуждающего лазерного излучения вглубь микросфер и ограничивает его взаимодействие со встроенными СНЧ и молекулами аналита. Как следствие, ГКР-сигнал аналита практически отсутствует. Также известно, что, чем меньше расстояние от аналита до наноразмерной металлической поверхности, тем больше интенсивность ГКР-сигнала [33]. Поэтому растворение матрицы сорбента способствует высвобождению СНЧ и молекул аналита и их непосредственному взаимодействию. Дополнительно отметим, что по сравнению с Al_2O_3 микросферы CaCO_3 имеют меньшую удельную площадь поверхности (~ 20 м²/г со средним размером пор 55 ± 15 нм [153]), и высвобождение аналита

путём растворения матрицы CaCO_3 позволяет несколько нивелировать данный недостаток.

Для растворения CaCO_3 использовали раствор соляной кислоты достаточно высокой концентрации (5 М), поскольку использование кислоты меньшей концентрации приводит к разбавлению аналита и нивелированию преимуществ его концентрирования матрицей CaCO_3 , в то время как летучесть соляной кислоты в более высоких концентрациях осложняет работу с ней. Помимо концентрации важен объём добавляемой HCl . Так, при увеличении объёма с 10 до 30 мкл наблюдается рост интенсивности ГКР-сигнала, но снижается его воспроизводимость (увеличивается s_r) (рис. 4.21). Изучение процесса растворения с помощью оптической микроскопии показало, что увеличение объёма добавки кислоты увеличивает степень растворения CaCO_3 и приводит к полному растворению и значительному снижению ГКР-сигнала при добавлении 40 мкл и более. Отметим, что проведённые контрольные эксперименты по влиянию рН раствора РБЖ на его ГКР-сигнал (с применением цитрат-стабилизированных СНЧ) показали, что интенсивность и профиль ГКР-сигнала РБЖ в нейтральной и кислой средах (рН 6 и 1, соответственно) имеют примерно одинаковую интенсивность и профиль. Это связано с тем, что РБЖ уже использовали в протонированном виде (в виде соли с соляной кислотой), на который не влияет дополнительное присутствие кислот. Таким образом, снижение интенсивности ГКР-сигнала при использовании избытка HCl для растворения CaCO_3 связано с чрезмерной ионной силой смеси и усилением конкуренции между молекулами аналита и хлорид-ионами за адсорбцию на поверхности СНЧ. С другой стороны, использование 20 мкл HCl позволяет осуществить неполное растворение сорбента, и остаточная матрица CaCO_3 с частично высвобожденными агрегатами СНЧ обеспечивает достаточно высокий и, что немаловажно, более равномерный аналитический сигнал (рис. 4.21).

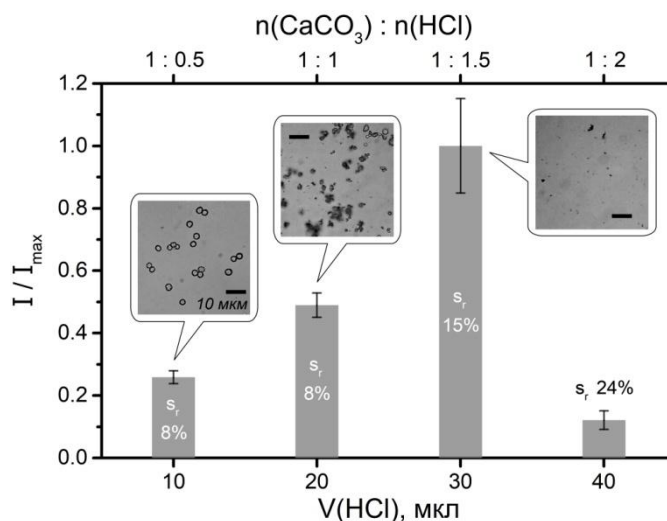


Рис. 4.21. Зависимость интенсивности ГКР-сигнала раствора Р6Ж (10^{-8} М, по пику при 1656 см^{-1}) от объёма HCl (5 М) (или мольного отношения «CaCO₃/HCl»), использованной для растворения CaCO₃-СНЧ после ТФЭ. На вставках приведены изображения образца CaCO₃-СНЧ после добавления HCl, полученные методом оптической микроскопии (инвертированный микроскоп Olympus IX71, оснащенный объективом (100x, 0.9 NA)).

Наконец важно отметить, что, несмотря на довольно низкое содержание СНЧ в образце CaCO₃-СНЧ (~0.3 мас.%), концентрация высвобожденных СНЧ в конечной смеси для ГКР-измерений примерно в 5 раз выше концентрации исходного раствора СНЧ, который использовали при синтезе CaCO₃-СНЧ. Данный фактор приводит к получению и более интенсивного, и более стабильного ГКР-сигнала за счёт увеличения количества светорассеивающих частиц.

Сорбционные и усиливающие свойства образцов

Согласно литературным данным дзета-потенциал микросфер CaCO₃ без встроенных СНЧ имеет отрицательное значение (примерно -12 мВ [154]). Однако поверхностный заряд CaCO₃-СНЧ должен иметь ещё более отрицательные значения благодаря встраиванию отрицательно заряженных СНЧ. Данное предположение подтверждается тем, что микросферы CaCO₃-СНЧ продемонстрировали высокую степень сорбции Р6Ж (~80%, рис. 4.22а), молекулы которого имеют положительный заряд в растворе. Также степень сорбции Р6Ж достигает максимального значения уже после 2 мин контакта аналита с сорбентом. С другой стороны, достижение степени сорбции в 45%

на образце CaCO_3 без встроенных СНЧ требует проведения ТФЭ в течение не менее 10 мин.

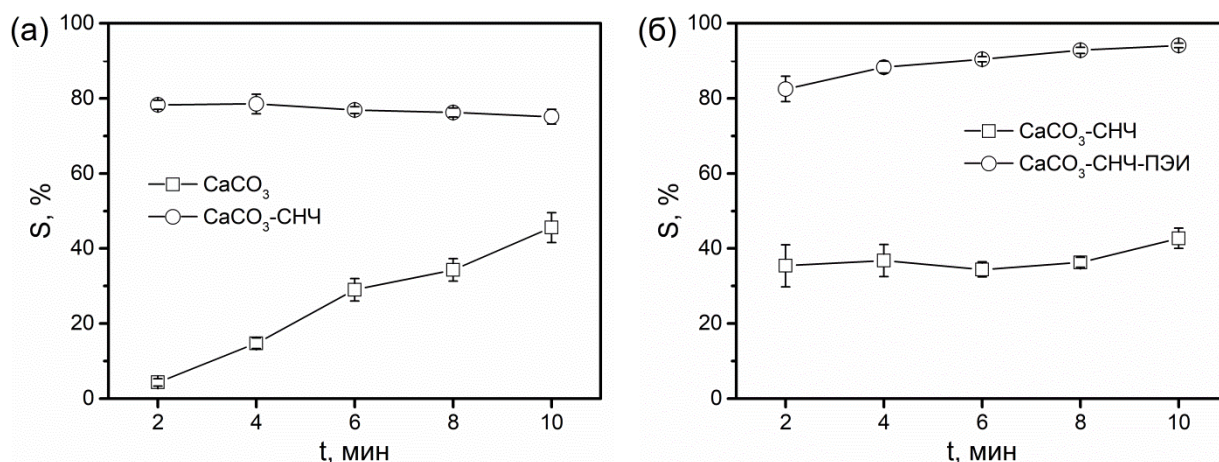


Рис. 4.22. Зависимость степени сорбции Р6Ж (10^{-6} М) (а) и ФС (10^{-5} М) (б) от времени контакта аналитов с образцами микросфер CaCO_3 с различным составом. Результаты получены с использованием спектрофлуориметрии.

Степень сорбции на CaCO_3 -СНЧ отрицательно заряженного аналита (в данном случае краситель Фотосенс (ФС)) ожидаемо оказалась ниже, чем для Р6Ж (~40%, рис. 4.22б). С целью дополнительного повышения сродства CaCO_3 -СНЧ к любым анионным аналитам предложено проведение модифицирования поверхности микросфер с помощью полиэтиленимина (ПЭИ, рис. 3.22г), являющегося катионным полиэлектролитом. Методика модификации включала добавление раствора ПЭИ (2 мл, 2 мг/мл) к 10 мг высушенного образца CaCO_3 -СНЧ, перемешивание смеси в течение 10 мин и промывку водой (3 раза) от избытка ПЭИ. Отметим, что модификацию сорбента проводили непосредственно перед проведением анализа во избежание слипания микрочастиц и перекристаллизации CaCO_3 . В итоге использование модифицированного сорбента (CaCO_3 -СНЧ-ПЭИ) позволило увеличить степень сорбции ФС примерно в 2 раза (рис. 4.22б). Отметим, что проведение модификации путём встраивания ПЭИ непосредственно в процессе синтеза (по аналогии с Al_2O_3 -ПСС-СНЧ_{агр.}) затруднено, поскольку добавление ПЭИ к раствору СНЧ приводит к немедленной агломерации и плохому встраиванию последних в матрицу CaCO_3 .

Далее $\text{CaCO}_3\text{-СНЧ}$ и $\text{CaCO}_3\text{-СНЧ-ПЭИ}$ использовали для разработки и тестирования ТФЭ-ГКР-методики детектирования модельных веществ. В случае РБЖ дополнительно получены ГКР-спектры с использованием контрольной ГКР-подложки: раствора СНЧ, сконцентрированного в 10 раз и активированного с помощью NaCl непосредственно перед ГКР-детектированием. После построения градуировочных графиков рассчитали пределы обнаружения РБЖ и в случае использования $\text{CaCO}_3\text{-СНЧ}$ получено значение c_{\min} на 2 порядка ниже по сравнению с контрольной ГКР-подложкой (рис. 4.23а) за счёт концентрирования аналита в ходе проведения ТФЭ.

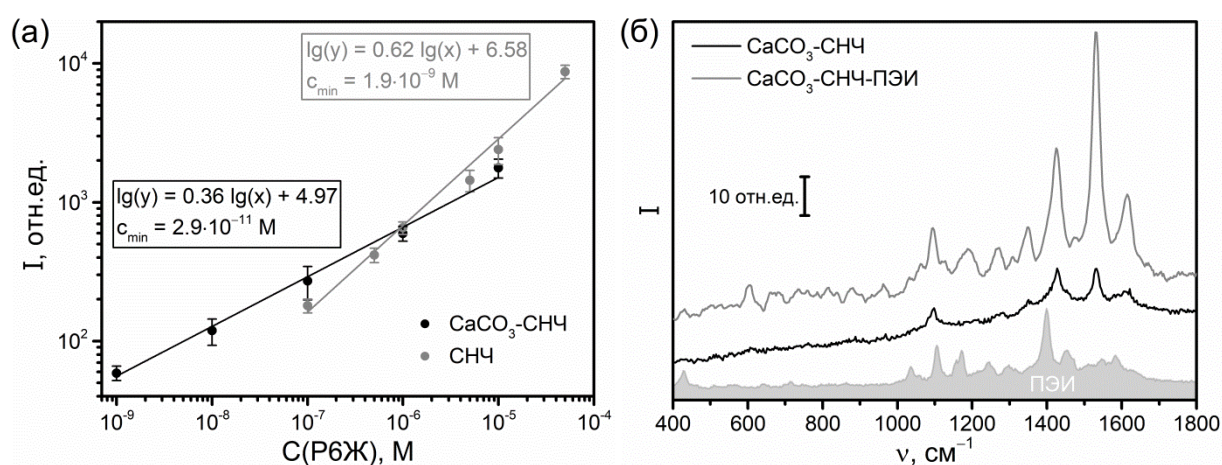


Рис. 4.23. (а) Градуировочные зависимости для определения РБЖ (по пику при 1656 см^{-1}), полученные с использованием $\text{CaCO}_3\text{-СНЧ}$ и агрегированных СНЧ (контрольная ГКР-подложка). (б) ГКР-спектры раствора ФС (10^{-6} М), полученные с помощью $\text{CaCO}_3\text{-СНЧ}$ с и без модификации ПЭИ; ГКР-спектр раствора ПЭИ приведен в качестве контроля.

Также установлено, что применение модификации $\text{CaCO}_3\text{-СНЧ}$ с помощью ПЭИ приводит к увеличению интенсивности ГКР-сигнала ФС в 6 раз (рис. 4.23б), хотя его степень сорбции увеличилась только в 2 раза (рис. 4.22б). Таким образом, присутствие ПЭИ также усиливает взаимодействие между высвобожденными СНЧ и молекулами ФС, причём ГКР-спектры ПЭИ не мешают детектированию спектров ФС (рис. 4.23б).

Расчёт КУ с использованием формулы 4.2 показал, что для микросфер $\text{CaCO}_3\text{-СНЧ}$ он составил 10^9 (с использованием РБЖ), а $\text{CaCO}_3\text{-СНЧ-ПЭИ}$ – $5.8 \cdot 10^7$ (с использованием ФС). Учитывая, что степень сорбции ФС на сорбенте выше чем РБЖ, то разницу в значениях КУ можно объяснить

частичной реализацией резонансного ГКР благодаря тому, что использованное лазерное излучение (473 нм) попадает в область поглощения молекул Р6Ж и практически не поглощается молекулами ФС (рис. 4.24).

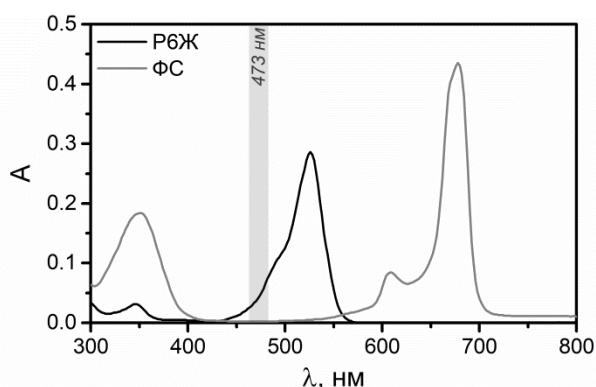


Рис. 4.24. Сопоставление профилей спектров поглощения модельных аналитов с длиной волны лазерного излучения, использованного для генерации ГКР-сигнала.

4.5. Определение лекарственных веществ в моче с использованием ГКР-активных сорбентов

Прежде чем приступить к применению разработанных ГКР-активных сорбентов в ГКР-определении ЛВ в БЖЧ, проведён сравнительный анализ их методик синтеза и некоторых свойств. Как было показано, сорбционную способность и селективность концентрирования ГКР-активных сорбентов можно усовершенствовать полиэлектролитами в зависимости от природы (заряда) аналита и при этом без увеличения фонового сигнала. Поэтому разработанные сорбенты сравнивали преимущественно с точки зрения простоты и скорости синтеза и способности к усилению КР-сигнала (сравнение КУ) (табл. 4.2).

Продолжительность получения золь-гель материалов ($\text{SiO}_2\text{-СНЧ}$ и $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-СНЧ}$) самая большая, поскольку требуют длительных стадий созревания и высушивания. Причём конечные образцы всё равно содержат много кристаллизационной воды, колебание содержания которой может снизить воспроизводимость аналитического сигнала. Также данные образцы требуют измельчения, и для получения однородно измельченных образцов следует использовать мельницу и сита. В отличие от золь-гель материалов

синтез микросфер $\text{CaCO}_3\text{-СНЧ}$ самый быстрый, образцы получают в виде однородных микронных частиц без присутствия остаточной воды (выход реакции синтеза $\sim 93\%$).

Табл. 4.2. Сравнение разработанных ГКР-активных сорбентов.

Признак	$\text{SiO}_2\text{-СНЧ}$	$\text{Al}_2\text{O}_3\text{-СНЧ}$	$\text{CaCO}_3\text{-СНЧ}$
КУ	10^5	$8.4 \cdot 10^8$	10^9
Продолжительность синтеза	20 мин	25 мин	5 мин
Продолжительность высушивания сорбентов	3 дня	1 день	3 часа
Особенности	<ul style="list-style-type: none"> – Остаётся кристаллизационная вода – Требуется измельчение – Неоднородные частицы 		<ul style="list-style-type: none"> – Непрозрачны для лазерного излучения – Однородные сферические микрочастицы – Растворяется в кислотах – Самый быстрый синтез
	<ul style="list-style-type: none"> – Наиболее сложный и долгий синтез – Максимальная химическая стабильность матрицы 	<ul style="list-style-type: none"> – Растворяется в кислотах и щелочах 	

С точки зрения стоимости наименее доступным является синтез $\text{SiO}_2\text{-СНЧ}$, поскольку он требует использования ТЭОС и этилового спирта. В свою очередь прекурсорами $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-СНЧ}$ и $\text{CaCO}_3\text{-СНЧ}$ являются распространенные и недорогие неорганические реактивы.

Если проводить сравнение способности разработанных ГКР-активных сорбентов усиливать КР-сигнал, то $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-СНЧ}$ и $\text{CaCO}_3\text{-СНЧ}$ демонстрируют конкурентоспособность по сравнению с другими ГКР-подложками на основе серебра, для большинства которых характерны КУ в диапазоне $10^6\text{--}10^8$ [155].

Таким образом, далее для определения ЛВ в моче использовали ГКР-активные сорбенты на основе Al_2O_3 и CaCO_3 . К тому же матрицы данных сорбентов можно относительно легко растворить в кислотах и/или щелочах,

что было использовано для высвобождения СНЧ и достижения максимальной чувствительности анализа.

4.5.1. Определение метотрексата в моче с использованием оксида алюминия со встроенными наночастицами серебра

Для ТФЭ-ГКР-определения противоопухолевого препарата МТК, являющегося структурным аналогом ФК, в качестве ГКР-активного сорбента использовали Al_2O_3 -СНЧ. В данном исследовании в матрицу сорбента встраивали СНЧ, восстановленные и стабилизированные гидроксиламином, которые значительно легче и быстрее синтезировать по сравнению с цитрат-стабилизированными СНЧ. Также новая методика ТФЭ-ГКР-анализа (рис. 4.25) включает этап растворения матрицы сорбента с помощью NaOH после сорбции МТК. Данный этап позволяет увеличить чувствительность определения МТК за счёт (1) высвобождения и агрегации СНЧ, (2) корректировки pH перед ГКР-измерениями для достижения максимального сигнала МТК, (3) достижения максимального взаимодействия между высвободившимися СНЧ и молекулами аналита. Поскольку методика анализа включает растворение матрицы сорбента после этапа ТФЭ и последующую неизбежную агрегацию высвободившихся СНЧ, то в ходе синтеза Al_2O_3 -СНЧ предварительную агрегацию СНЧ не применяли.

Предложенная методика ТФЭ-ГКР-определения МТК (рис. 4.25) дополнительно включает добавление внутреннего стандарта (ИПС, ~10% об.) к анализируемой смеси непосредственно перед проведением ГКР-измерений. ГКР-измерения проводили с использованием портативного КР-спектрометра i-Raman (B&WТек); длина волны лазера – 532 нм, числовая апертура зонда – 0.22, время накопления сигнала – 1 с. Количественное определение МТК проводили по ГКР-пику при 683 см^{-1} , интенсивность которого нормировали на величину интенсивности пика ИПС при 815 см^{-1} , что позволило уменьшить относительное стандартное отклонение сигнала аналита с 18–28% до 11–19%. В работе Zhang и Gellman [156] показано, что пропанол проявляет слабую и полностью обратимую физисорбцию на поверхности

серебра, обусловленную преимущественно дисперсионными и индукционными взаимодействиями. В то же время, молекулы МТК способны к образованию сразу нескольких донорно-акцепторных связей между неподелёнными электронными парами атомов азота и кислорода (рис. 3.31а) и атомами серебра на поверхности СНЧ. Усилению связи между МТК и СНЧ также способствует проведение анализа в щелочной среде, которая и препятствует протонированию неподелённых электронных пар атомов азота, и приводит к депротонированию карбоксильных групп и усилению их электронодонорных свойств. Поэтому ожидается, что данный внутренний стандарт не проявляет значимую конкуренцию с молекулами аналита за адсорбцию на ГКР-активную поверхность. С другой стороны, избыточное содержание ИПС (1300 мкМ против 0.44–6.7 мкМ МТК) гарантирует стабильность его сигнала в качестве внутреннего стандарта.

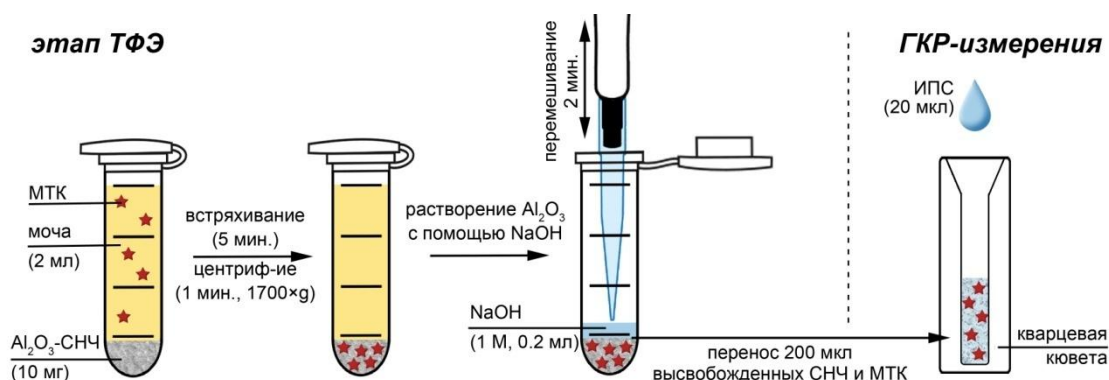


Рис. 4.25. Схема методики ТФЭ-ГКР-анализа для определения МТК в моче с использованием ГКР-активного сорбента ($\text{Al}_2\text{O}_3\text{-СНЧ}$).

Влияние компонентов мочи и разбавления мочи на ГКР-сигнал МТК

Проведение ТФЭ-ГКР-анализа образца мочи, содержащего МТК, показало, что одного только этапа ТФЭ недостаточно для определения МТК в моче, несмотря на то, что сигнал КРН практически отсутствует (рис. 4.26). Это связано с сохранением конкурентных взаимодействий между молекулами оставшихся компонентов мочи и МТК на поверхности сорбента. Установлено, что использование разбавления мочи в 10 и более раз перед проведением ТФЭ-ГКР-анализа приводит к снижению конкуренции за ГКР-активные центры и появлению отчётливого спектра МТК (рис. 4.26). Также

отметим, что этап ТФЭ позволил сконцентрировать молекулы аналита и увеличить интенсивность сигнала МТК почти в два раза.

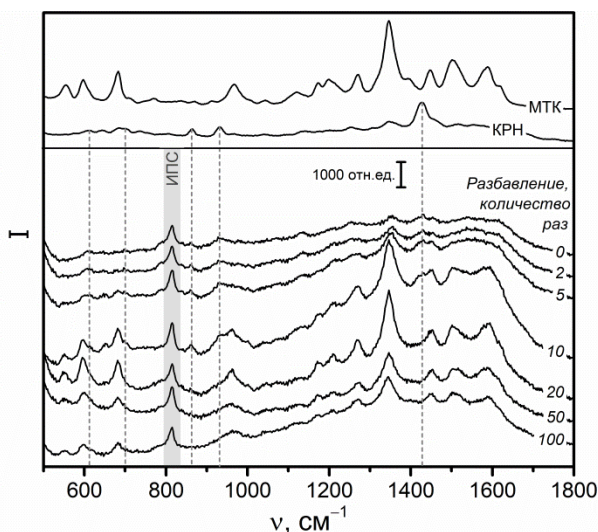


Рис. 4.26. Зависимость ГКР-сигнала образца УМ, содержащей МТК (20 мкг/мл), от величины разбавления смеси перед проведением ТФЭ-ГКР-анализа с использованием Al_2O_3 -СНЧ. Спектры МТК и КРН (основной фонообразующий компонент мочи в щелочных средах) приведены для сравнения в качестве контролей.

Чтобы выяснить какие основные эндогенные компоненты мочи ответственны за подавление сигнала аналита и определить оптимальную величину разбавления, проведено дополнительное исследование сорбции с использованием ГКР и спектрофотометрии. Для этого использовали более простые матрицы, такие как растворы мочевины (50 мг/мл), КРН (2 мг/мл), неорганических солей и ИМ (подраздел 3.1.1). Также протестировали два набора смесей, содержащих МТК и один или два компонента мочи:

1. соли + МТК, мочевины + МТК, КРН + МТК;
2. соли + мочевины + МТК, соли + КРН + МТК, ИМ (соли + мочевины + КРН) + МТК, реальная моча + МТК.

Эти смеси использовали для изучения влияния степени разбавления на (1) сорбцию МТК на этапе ТФЭ (2–10-кратное разбавление) и (2) ГКР-сигнал МТК после этапа ТФЭ (2–100-кратное разбавление). Результаты показали, что присутствие неорганических солей намного сильнее подавляет сорбцию МТК по сравнению с мочевиной и КРН, и разбавление не устраняет данный негативный эффект (рис. 4.27а). Однако сорбция МТК увеличивается при

разбавлении в случае, если помимо солей смесь содержит мочевины, КРН или оба этих вещества (рис. 4.27б). Отметим, что сорбцию МТК непосредственно из образца мочи не исследовали из-за сильного фонового сигнала.

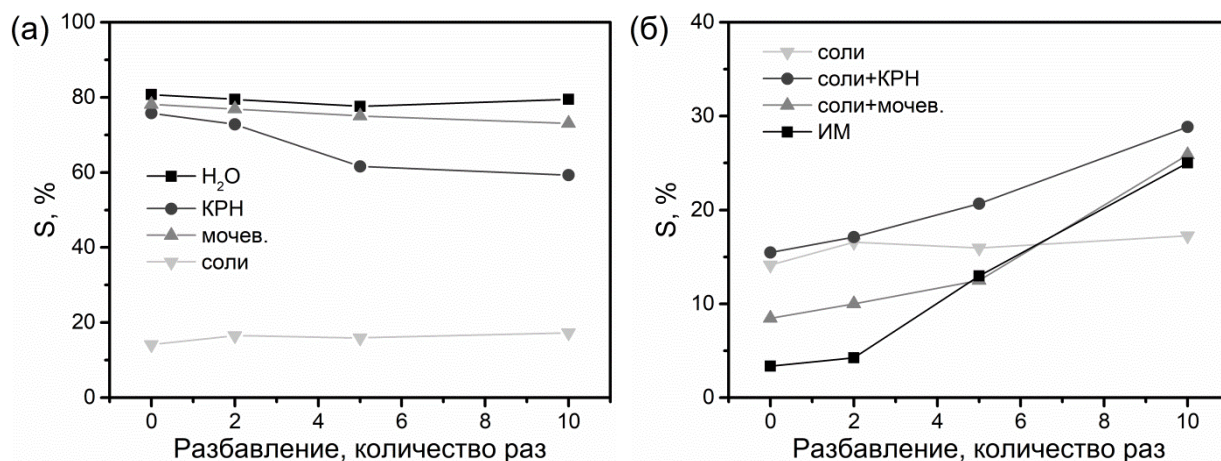


Рис. 4.27. Влияние величины разбавления на сорбцию МТК образцами Al_2O_3 -СНЧ из (а) отдельных компонентов мочи и (б) их смесей с добавками МТК (20 мкг/мл). Результаты получены по данным спектрофотометрии.

Исследование ГКР-сигнала в случае неразбавленных смесей МТК только с одним компонентом мочи показало, что присутствие солей приводит к максимальному снижению интенсивности сигнала (на ~35%) по сравнению с раствором чистого МТК, в то время как присутствие мочевины не оказывает значительного эффекта (рис. 4.28а). Неожиданные результаты получены для смесей МТК с КРН: интенсивность сигнала МТК в присутствии КРН увеличивается более чем в 2 раза (рис. 4.28а). Результаты для неразбавленных смесей с несколькими компонентами мочи (рис. 4.28б) показали, что происходит ещё большее снижение интенсивности ГКР-сигнала по сравнению со смесью МТК с солями. Примечательно, что усиление сигнала, обнаруженное для смеси МТК с КРН, полностью исчезает в присутствии солей (включая растворы МТК в ИМ). Однако ни один из этих компонентов или их смесей не приводит к подавлению сигнала, сравнимому с тем, что наблюдается в реальной моче (рис. 4.28б), что связано с совокупным вкладом множества других компонентов в случае реальной мочи, таких как УБЛ, пуриновые основания и другие метаболиты.

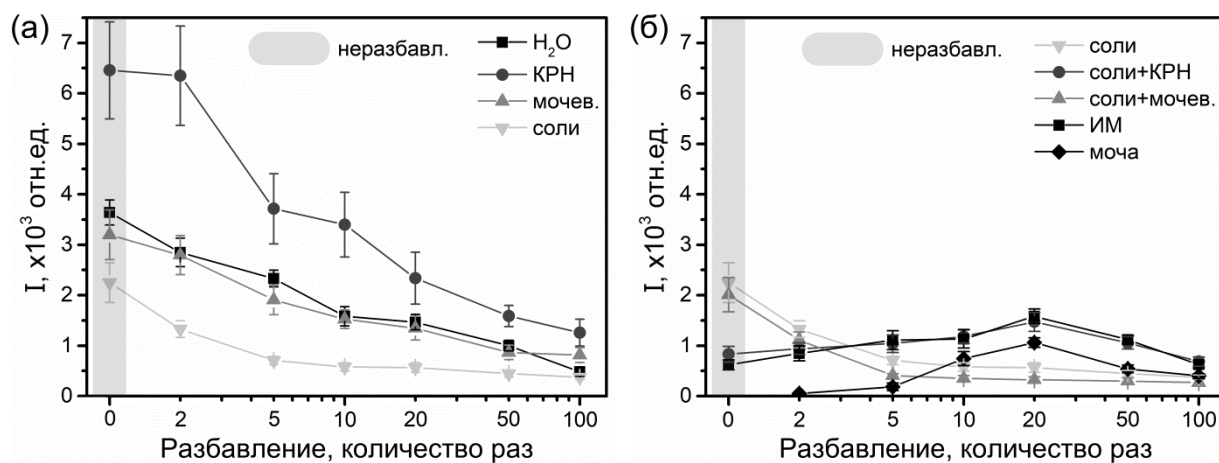


Рис. 4.28. Зависимость интенсивности ГКР-сигнала МТК (по пику при 683 см^{-1}) от величины разбавления смесей, содержащих МТК (20 мкг/мл) и (а) один или (б) несколько компонентов мочи (включая реальную мочу).

Показано, что разбавление закономерно снижает интенсивность ГКР-сигнала МТК в случае его смесей с одним компонентом мочи (рис. 4.28а). Однако для смесей с несколькими компонентами мочи разбавление демонстрирует немонотонное влияние на сигнал МТК, увеличивая его интенсивность с максимальным эффектом при использовании 20-кратного разбавления (рис. 4.28б). Экстремальный характер зависимости интенсивности сигнала МТК от степени разбавления сложных смесей мы объясняем двумя конкурирующими эффектами: (1) снижением интенсивности сигнала, вызванным присутствием солей, и (2) увеличением интенсивности, вызванным присутствием КРН. Действие солей быстро снижается при разбавлении, в то время как снижение положительного эффекта КРН требует более высоких степеней разбавления (рис. 4.28а). Важно отметить, что зависимости интенсивности ГКР-сигнала от величины разбавления в случаях КРН, ИМ и реальной мочи имеют очень похожие профили, что подтверждает ключевую роль именно КРН среди всех других компонентов мочи. Тем не менее, несмотря на то, что 20-кратное разбавление обеспечивает большую интенсивность сигнала МТК, сравнение ГКР-сигналов образцов УМ и ДМ, содержащих МТК, показывает, что минимальная разница между их спектрами достигается лишь при 100-кратном разбавлении (рис. 4.29).

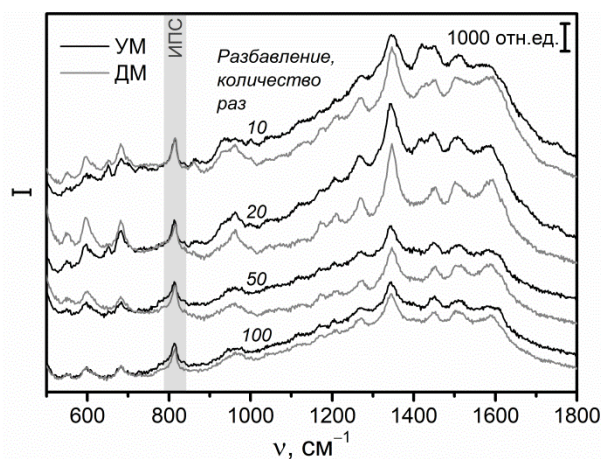


Рис. 4.29. Влияние величины разбавления образцов реальной мочи (УМ и ДМ), содержащих добавку МТК (20 мкг/мл), на ГКР-спектры, полученные путём проведения ТФЭ-ГКР-анализа.

Подводя итоги данного раздела, можно сделать следующие выводы. Во-первых, для разработки методик ГКР-анализа мочи следует сразу использовать реальные образцы мочи вместо водных растворов отдельных компонентов мочи или их смесей, поскольку они довольно плохо моделируют реальные образцы (даже в случае ИМ). Во-вторых, для конечной методики определения МТК необходимо использовать 100-кратное разбавление мочи перед ТФЭ-ГКР-анализом, поскольку в данном случае сводится к минимуму негативное влияние эндогенных компонентов мочи (в основном солей и КРН) на ГКР-сигнал и сорбцию МТК. Также эта величина разбавления максимально снижает влияние естественного изменения состава мочи от образца к образцу, сводя к минимуму разницу между ГКР-сигналами МТК в образцах мочи, собранной в утренние и дневные часы, что увеличивает универсальность методики. Наконец, для разбавления образцов мочи лучше использовать воду вместо каких-либо буферов, поскольку сорбция и ГКР-сигнал МТК снижаются в растворах неорганических солей (рис. 4.27, 4.28).

Влияние концентрации СНЧ внутри ГКР-активного сорбента на сигнал МТК

Описанные выше результаты были получены с использованием образцов Al_2O_3 -СНЧ, синтезированных с использованием растворов СНЧ с

концентрацией, соответствующей концентрации ионов серебра равной 1 мМ. Чтобы выяснить, является ли данный состав ГКР-активного сорбента оптимальным, дополнительно изучено влияние содержания СНЧ в Al_2O_3 -СНЧ на сорбционные и усиливающие свойства. При синтезе сорбентов использовали в 2 раза разбавленные СНЧ или СНЧ, сконцентрированные с помощью центрифугирования ($4400 \times g$, 8 мин) в 2, 4, 6 или 8 раз. Установлено, что рост содержания СНЧ увеличивает интенсивность ГКР-сигнала и чистых водных растворов МТК, и образцов мочи с добавкой МТК (рис. 4.30а). При этом большее увеличение интенсивности наблюдается в случае образцов мочи. Таким образом, рост содержания СНЧ в Al_2O_3 делает методику ТФЭ-ГКР-анализа более чувствительной к изменяющемуся составу мочи.

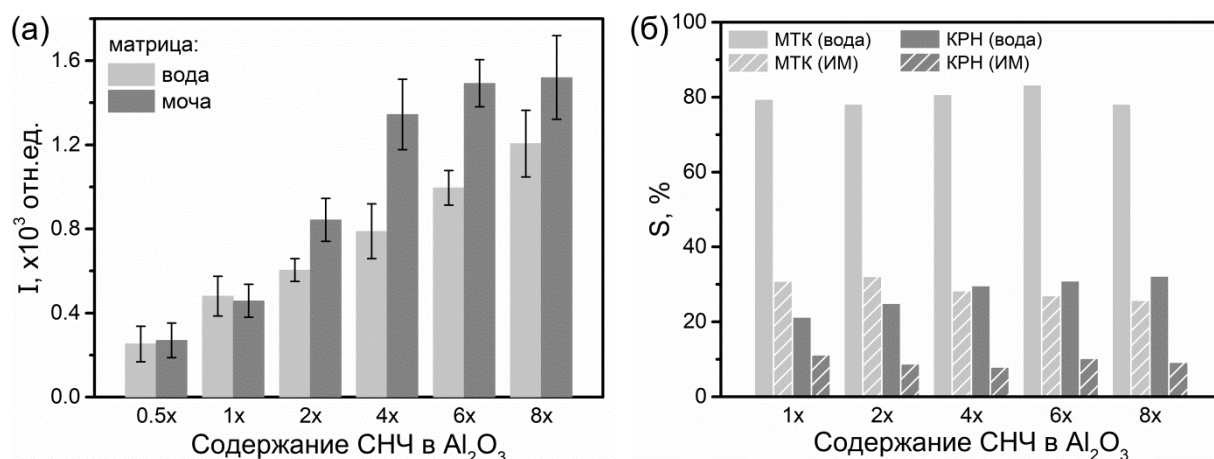


Рис. 4.30. Влияние содержания СНЧ внутри Al_2O_3 -СНЧ на: **(а)** интенсивность ГКР-сигнала МТК (по пику при 683 см^{-1}), сорбированного из водного раствора МТК (0.2 мкг/мл) и из разбавленного в 100 раз образца мочи с добавкой МТК (20 мкг/мл), **(б)** сорбцию МТК (2 мкг/мл) и КРН (20 мкг/мл) из водных растворов и искусственной мочи (ИМ). Содержание СНЧ выражали в единицах кратности относительно концентрации ионов серебра равной 1 мМ (т.е. $1x = 1\text{ мМ}$).

С другой стороны сорбционные свойства Al_2O_3 -СНЧ незначительно зависят от содержания СНЧ (рис. 4.30б). Так, в случае водных растворов чистого анализа сорбция МТК не меняется при увеличении содержания СНЧ, в то время как сорбция КРН постепенно возрастает с 20 до 30%. В случае образцов ИМ сорбция МТК несколько снижается при увеличении

содержания СНЧ (с 30% до 25%), а сорбция КРН систематически не изменяется. Таким образом, в общем можно сделать вывод, что увеличение содержания СНЧ в Al_2O_3 -СНЧ отрицательно влияет на точность и селективность определения МТК. Поэтому, если учесть, что разница между сигналами МТК в воде и в моче минимальна при концентрациях СНЧ до 1 мМ (рис. 4.30а), то концентрация СНЧ, соответствующая 1 мМ ионов серебра, является оптимальной, обеспечивая максимальный сигнал при минимальной чувствительности к изменению состава мочи, и эта концентрация выбрана для конечной методики синтеза Al_2O_3 -СНЧ.

ТФЭ-ГКР-определение МТК в моче

Оптимизированная ТФЭ-ГКР-методика с применением Al_2O_3 -СНЧ включает (точные значения параметров указаны на рис. 4.25):

- (1) 100-кратное разбавление образца мочи, содержащего МТК;
- (2) сорбцию МТК ГКР-активным сорбентом;
- (3) осаждение сорбента с помощью центрифугирования, удаление надосадочной жидкости;
- (4) растворение матрицы Al_2O_3 и регулировку рН с помощью NaOH;
- (5) добавление внутреннего стандарта (ИПС), проведение ГКР-измерений и анализ результатов.

Следовательно, для анализа одной пробы требуется не более 15 мин, включая анализ спектров. Разработанная методика ТФЭ-ГКР-определения МТК имеет следующие метрологические характеристики: правильность 97–104%, s_r 11–19%, c_{lim} 26 мкг/мл, c_{min} 4.2 мкг/мл (рис. 4.31а).

Также установлено, что методика синтеза сорбента обладает хорошей воспроизводимостью, а сам сорбент обладает высокой временной стабильностью усиливающих свойств. Так, ГКР-сигнал МТК, полученный с использованием разных партий ГКР-активного сорбента, имеет значение s_r менее 10%, в то время как усиливающие свойства сорбента сохраняются в течение длительного времени (> 3 месяцев) (рис. 4.31б), поскольку СНЧ

частично защищены от окисления матрицей Al_2O_3 и хранятся в сухом состоянии без доступа воды, которая значительно способствует окислению.

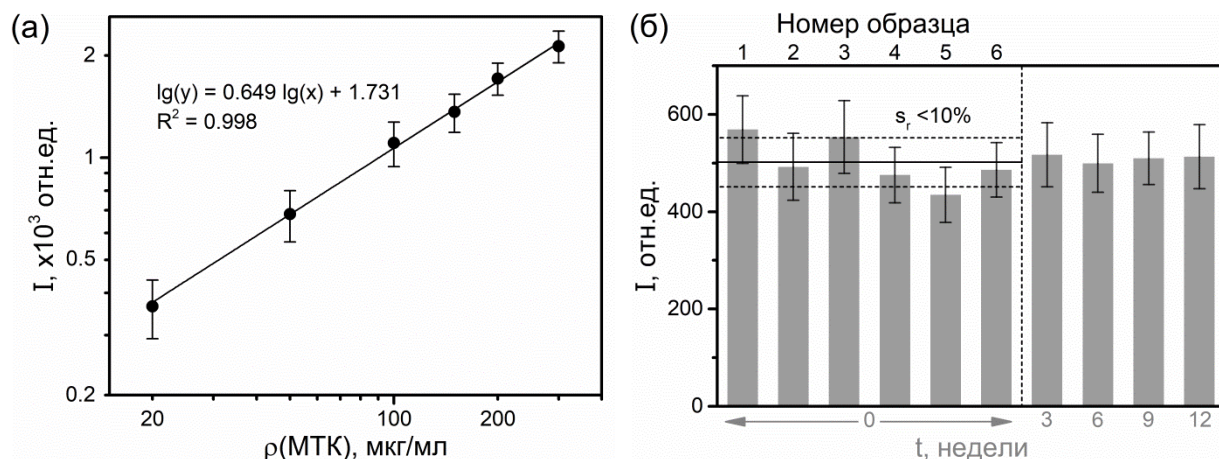


Рис. 4.31. (а) Градуировочная зависимость для ТФЭ-ГКР-определения МТК в моче (получена с использованием 11 образцов мочи). (б) Воспроизводимость синтеза Al_2O_3 -СНЧ по ГКР-сигналу МТК (0.2 мкг/мл), полученному с использованием свежеприготовленных образцов сорбента, и стабильность способности одного образца Al_2O_3 -СНЧ усиливать КР-сигнал при хранении. ГКР-пик МТК при 683 см^{-1} использовался для построения графиков.

Отметим, что методика может быть дополнительно улучшена путём корректировки характеристик сорбента с использованием модификации во время синтеза. Например, выше мы показали, что добавление молекул полиэлектролита в Al_2O_3 -СНЧ улучшает сорбцию заряженных аналитов.

4.5.2. Детектирование антибиотиков в моче с использованием микросфер CaCO_3 со встроенными наночастицами серебра

Для облегчения этапа ТФЭ при осуществлении ТЛМ предложено придание магнитоуправляемых свойств микросферам CaCO_3 путём встраивания СНЧ вместе с НЧ магнетита (CaCO_3 -СНЧ-Fe). Для синтеза НЧ магнетита навески FeCl_3 (60 мг) и FeSO_4 (30 мг) растворяли в 1 мл бидистиллированной воды, и полученный свежий раствор приливали к раствору NaOH (10 мл, 0.1 М) при интенсивном перемешивании [157,158]. Смесь перемешивали в течение 5 мин, затем НЧ магнетита осаждали с помощью постоянного (неодимового) магнита, отбирали 8 мл надосадочной жидкости и разбавляли с помощью 8 мл воды с добавкой 100 мкл NaOH (1

М). Далее смесь обрабатывали в УЗ ванне в течение 5 мин. Полученный образец хранили не дольше 3 дней и за это время использовали для встраивания в CaCO_3 . Согласно результатам измерения образцов НЧ магнетита методом ДРС их средний размер составил ~ 50 нм, а дзета-потенциал – ~ -40 мВ (рис. 4.32).

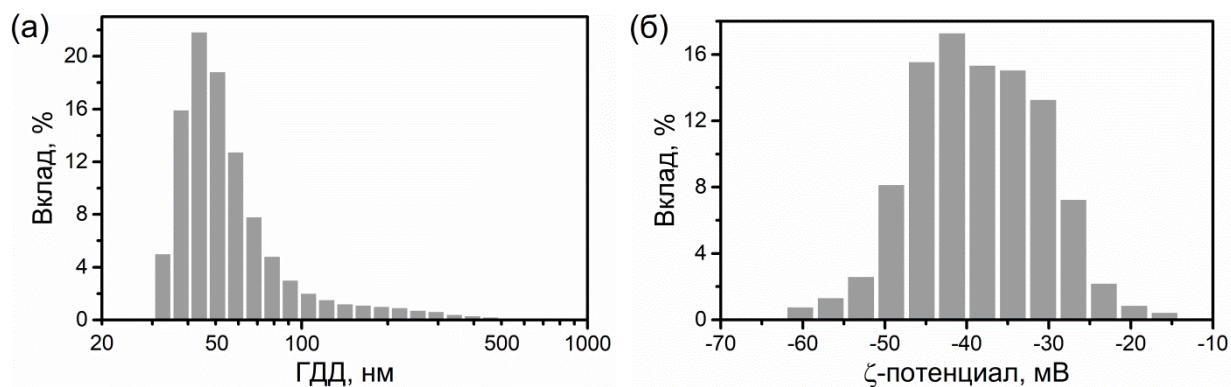


Рис. 4.32. Гистограммы распределения НЧ магнетита по размеру (а) и дзета-потенциалу (б), полученные методом ДРС.

При получении микросфер CaCO_3 -СНЧ-Fe (~ 2.7 мас.% Fe_3O_4) растворы Na_2CO_3 и CaCl_2 (по 1 мл 1 М растворов) добавляли к смеси НЧ магнетита (1 мл), воды (1 мл) и сконцентрированных в 2 раза цитрат-стабилизированных СНЧ (2 мл). Поскольку НЧ магнетита синтезировали без добавления какого-либо дополнительного органического стабилизатора, их встраивание не влияет на величину фонового ГКР-сигнала конечных сорбентов. Также КР-сигнал самих НЧ магнетита находится за пределами спектральной области, используемой для проведения ГКР-определения ЛВ. В итоге добавление магнитоуправляемости ГКР-активному сорбенту позволило исключить стадию центрифугирования сорбента при проведении ТФЭ и проводить отделение микрочастиц от раствора аналита путём использования постоянного магнита (рис. 4.33).

Наконец, при растворении матрицы CaCO_3 для высвобождения СНЧ и молекул аналита также происходит растворение НЧ магнетита, исключая какое-либо их влияние на регистрацию ГКР-сигнала. Дополнительно установлено, что усиливающие свойства сорбента сохраняются в течение длительного времени (минимум 4 месяца), а методика синтеза сорбента

обладает хорошей воспроизводимостью: значение s_r ГКР-сигнала при использовании сорбента от разных партий составляет 6%.

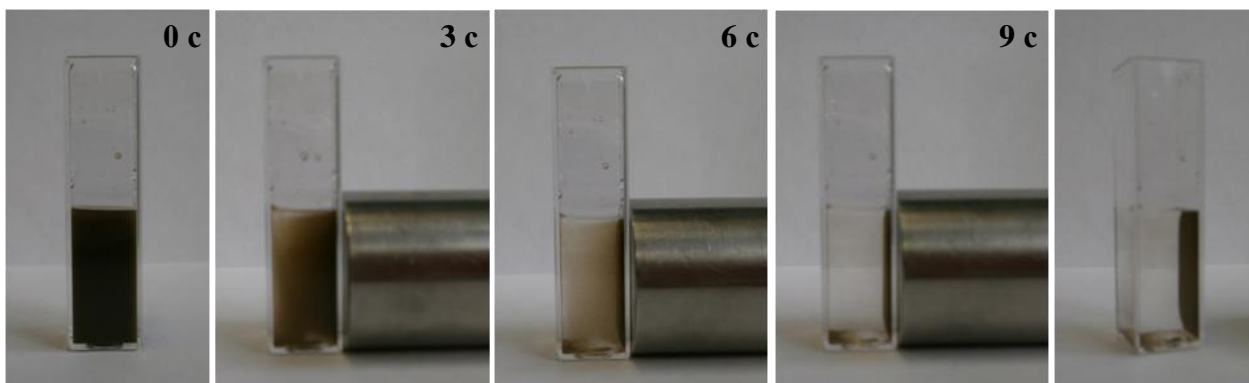


Рис. 4.33. Магнитоуправляемость ГКР-активных микросфер $\text{CaCO}_3\text{-CHC-Fe}$.

Обобщенная ТФЭ-ГКР-методика детектирования антибиотиков с использованием магнитного осаждения сорбента представлена на рис. 4.34. ГКР-измерения проводили с использованием КР-спектрометра Solar ТП, совмещенного с инвертированным микроскопом (100х объектив, 0.9 NA) с конфокальной оптической системой; длина волны лазера – 473 нм, мощность лазера на образце – 0.5 мВт, время накопления сигнала – 1 с.



Рис. 4.34. Схема проведения детектирования САА и ЦСА в моче, основанного на совмещении ТФЭ и ГКР.

Детектирование ЦСА

Поскольку все ЦСА содержат в своей структуре карбоксильную группу, депротонированную в условиях нейтральной среды, то для их детектирования использовали микросферы $\text{CaCO}_3\text{-CHC-Fe}$, модифицированные катионным полиэлектролитом. Как было показано в подразделе 3.6.1, ПДДА наиболее эффективно устраняет ГКР-сигнал мочи компонентов БЖЧ, поэтому его использовали для модификации сорбента

вместо ПЭИ. Установлено, что применение модификации увеличивает степень сорбции всех использованных в исследовании ЦСА (рис. 4.35), причём на степень сорбции МК (основного фонообразующего компонента мочи в нейтральной среде) модификация сорбента практически не повлияла.

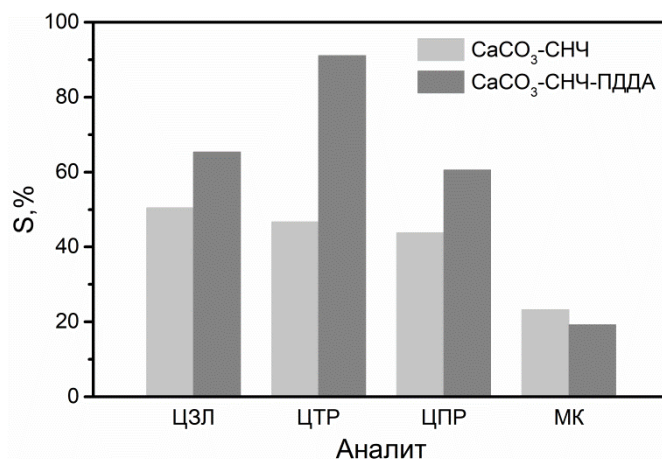


Рис. 4.35. Степень сорбции ЦСА (50 мкг/мл) и МК (1 мг/мл) на немодифицированном (CaCO₃-СНЧ-Fe) и модифицированном (CaCO₃-СНЧ-Fe-ПДДА) ГКР-активном сорбенте. Время контакта аналитов с образцами сорбентов – 10 мин. Результаты получены с использованием спектрофотометрии.

Проведённое тестирование ТФЭ-ГКР-методики с использованием образцов мочи с добавкой ЦСА (ЦЗЛ, ЦТР, ЦПР, 50 мкг/мл) показало отсутствие как фонового ГКР-сигнала мочи, так и значимой разницы в интенсивности сигнала ЦСА в образцах мочи, собранной в разное время дня. Таким образом, данный результат связан в первую очередь со способностью ПДДА препятствовать сорбции МК в нейтральной среде на СНЧ (рис. 3.23), поскольку даже при незначительной степени сорбции МК на сорбенте (~20%) её концентрация всё равно остаётся высокой по сравнению с ЦСА. Также перед проведением ТФЭ всё равно необходимо проводить разбавление образцов мочи, содержащих ЦЗЛ, ЦТР и ЦПР в 400, 500 и 200 раз, соответственно, чтобы избежать насыщения аналитического сигнала при высоких концентрациях ЦСА (400–500 мкг/мл).

Детектирование САА

Для ТФЭ САА использовали немодифицированные CaCO₃-СНЧ-Fe в растворах с рН близкой к нейтральной (5–6). В данных условиях САА имеют

нейтральный заряд и плохо растворимы в воде, что способствует сорбции на $\text{CaCO}_3\text{-СНЧ-Fe}$. Однако, поскольку САА не генерируют ГКР-спектры в нейтральной среде (раздел 2.3), то перед ГКР-детектированием матрицу сорбента растворяли с использованием избытка соляной кислоты (45 мкл, 5 М), что привело как к высвобождению СНЧ и молекул аналита, так и к установлению рН среды анализируемой смеси на уровне, оптимальном для ГКР-анализа САА (рН ~1).

Установлено, что степень сорбции большинства САА находится на уровне 40–60% (рис. 4.36а), в то время как сорбция БРБ (структурного аналога УБЛ – основных фонообразующих компонентов мочи в кислой среде) составила около 10%. Проверку разработанной ТФЭ-ГКР-методики провели для образцов мочи, содержащих СМЗ, поскольку он при небольших различиях в степени сорбции имеет наименьшую интенсивность ГКР-сигнала в кислой среде по сравнению с остальными САА (рис. 2.3а). Таким образом, именно определение СМЗ в моче больше всего подвержено влиянию конкурентных взаимодействий между компонентами мочи и молекулами САА на поверхности ГКР-подложки. Установлено, что при 10-кратном разбавлении мочи, содержащей СМЗ в минимальной для ТЛМ концентрации, интенсивность сигнала аналита в УМ значительно ниже сигнала аналита в ДМ. Этот результат свидетельствует о сорбции на ГКР-активном сорбенте эндогенных компонентов мочи, не обладающих собственным интенсивным ГКР-сигналом, однако конкурирующих с аналитом за ГКР-активные участки поверхности. Влияние таких компонентов на разницу в интенсивности ГКР-сигнала аналита в образцах УМ и ДМ снижается при увеличении степени разбавления и при 100-кратном разбавлении сводится к минимуму (рис. 4.36б).

Таким образом, оптимизированная ТФЭ-ГКР-методика с применением $\text{CaCO}_3\text{-СНЧ-Fe}$ включает (точные значения параметров указаны на рис. 4.34):
(1) разбавление образца мочи, содержащей антибиотик (в 100 раз в случае САА, в 200–500 раз в случае ЦСА);

- (2) сорбцию антибиотиков ГКР-активным сорбентом ($\text{CaCO}_3\text{-СНЧ-Fe}$ для САА и $\text{CaCO}_3\text{-СНЧ-Fe-ПДДА}$ для ЦСА);
- (3) отделение сорбента от жидкости с помощью магнита, удаление надосадочной жидкости;
- (4) растворение матрицы CaCO_3 и достижение оптимального для ГКР-анализа уровня pH с помощью HCl (5M; 20 мкл в случае ЦСА, 45 мкл в случае САА);
- (5) проведение ГКР-измерений и анализ результатов.

Общая продолжительность методики анализа составляет около 15 мин.

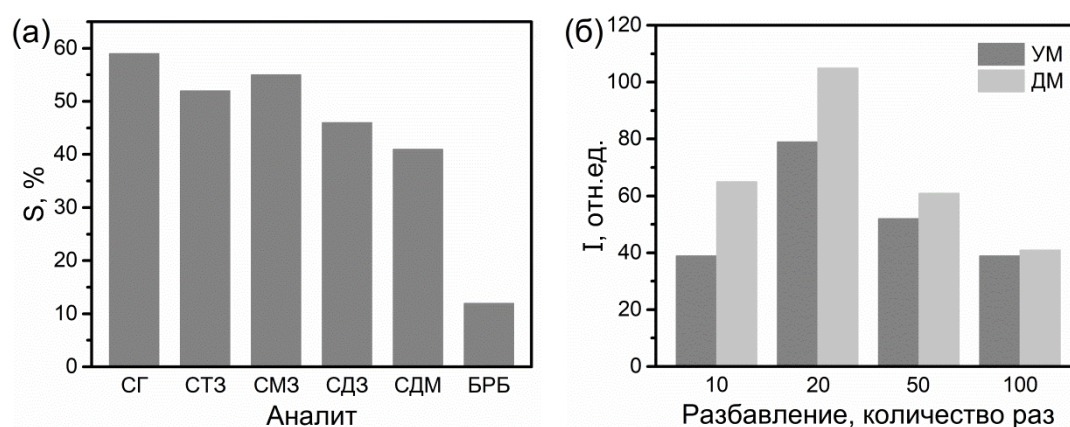


Рис. 4.36. (а) Степень сорбции САА (10 мкг/мл) и БРБ (200 мкг/мл) на образце $\text{CaCO}_3\text{-СНЧ-Fe}$. Время контакта аналитов с образцами сорбентов – 10 мин. Результаты получены с использованием спектрофотометрии. **(б)** Влияние разбавления образцов мочи (УМ и ДМ) с добавкой СМЗ (10 мкг/мл) перед проведением ТФЭ (с использованием $\text{CaCO}_3\text{-СНЧ-Fe}$) на интенсивность ГКР-сигнала СМЗ (по пику при 1074 см^{-1}).

В заключение отметим, что стадия растворения ГКР-активного сорбента на основе CaCO_3 может препятствовать анализу соединений, которые (1) нерастворимы в кислой среде, (2) гидролизуются в данных условиях, (3) имеют интенсивный ГКР-сигнал только в щелочной среде (например, МТК). В данных случаях альтернативным вариантом является ГКР-активный сорбент на основе Al_2O_3 благодаря амфотерным свойствам его матрицы, способной растворяться и кислотами, и щелочами.

Предложены и оптимизированы способы синтеза новых ГКР-подложек на основе пористых неорганических материалов (сорбентов) со встроенными СНЧ. Использование таких ГКР-активных сорбентов в анализе позволило: (i) увеличить чувствительность анализа за счёт концентрирования молекул аналита; (ii) улучшить аффинность к целевому аналиту и селективность анализа за счёт подбора материала сорбента и/или модификации его поверхности молекулами полиэлектролитов; (iii) существенно сократить время анализа благодаря исключению этапа элюирования из методики анализа и проведению регистрации спектров непосредственно с ГКР-активного сорбента или после растворения его матрицы и высвобождения СНЧ и молекул аналита.

Предложены методики ТФЭ-ГКР-определения ЛВ в моче с использованием ГКР-активных сорбентов на основе Al_2O_3 и $CaCO_3$. Данные сорбенты просты в изготовлении и обладают высокой стабильностью усиливающих свойств при длительном хранении (месяцы). Показано, что применение дополнительной стадии разбавления мочи перед проведением ТФЭ способствует не только уменьшению конкуренции между аналитом и компонентами мочи за ГКР-активные центры СНЧ, но и нивелирует чрезмерную чувствительность ГКР-определения и позволяет избежать насыщения аналитического сигнала при средних и высоких концентрациях аналита в моче. Также предложено растворение матрицы сорбента после ТФЭ (перед ГКР-детектированием) путём добавления кислоты или основания. Данный приём способствует увеличению чувствительности анализа как благодаря высвобождению СНЧ и молекул аналита из матрицы сорбента и облегчению их непосредственного взаимодействия друг с другом, так и одновременной корректировке рН для увеличения интенсивности ГКР-сигнала аналита.

Результаты, представленные в данной главе, опубликованы в работах [88,120,159–163].

ГЛАВА 5. СЕРЕБРЯНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЦИКЛОДЕКСТРИНАМИ, ДЛЯ ГКР-ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ В БИОЖИДКОСТЯХ ЧЕЛОВЕКА

5.1. Актуальность применения циклодекстринов в ГКР-анализе

Модификация ГКР-подложек различными молекулярными рецепторами является довольно распространенным подходом для преодоления низкой селективности, присущей ГКР, и повышения точности ГКР-анализа сложных смесей. Помимо широко распространенных молекулярных рецепторов, таких как антитела, аптамеры и полимеры с молекулярными отпечатками, для модификации ГКР-подложек также предложено использовать ЦД благодаря специфическим особенностям, которые будут рассмотрены в данном разделе.

ЦД представляют собой семейство циклических олигосахаридов, состоящих из связанных глюкопиранозных остатков (рис. 5.1а), которые образуют структуры с полостью, подходящей для образования комплексов включения («гость–хозяин») (рис. 5.1б) [164]. Данная структура позволяет использовать ЦД в качестве сорбентов и элементов распознавания, а химическая модификация одного или обоих ободов позволяет дополнительно управлять селективностью и/или прочностью комплексообразования.

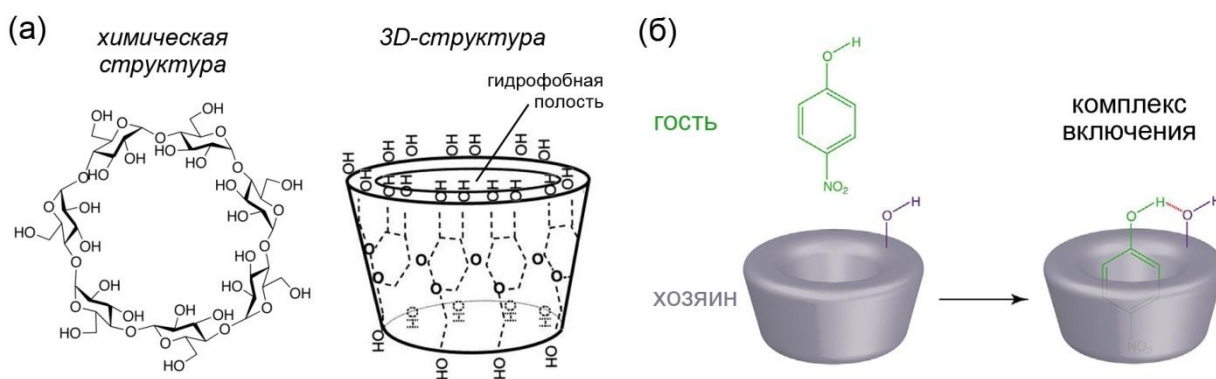


Рис. 5.1. (а) Пример строения молекулы ЦД, состоящей из 7 связанных глюкопиранозных остатков (β -ЦД). (б) Схематическое изображение комплекса включения с участием ЦД [165].

ГКР-подложки, модифицированные ЦД

Проведённый нами анализ литературы показал [166], что в ГКР-анализе с применением ЦД (ЦД-ГКР-анализ) протестированы все основные нативные ЦД (α -, β - и γ -ЦД) (рис. 5.2а), при этом β -ЦД и их производные использованы в исследованиях наиболее часто благодаря их доступности и более низкой стоимости по сравнению с другими видами ЦД. Среди производных ЦД наибольшее распространение получили ЦД с тиольными группами (ЦД-SH), что связано с их способностью прочно прикрепляться к металлической поверхности ГКР-подложек через данные группы. Однако их высокая стоимость, а также относительно низкая химическая стабильность (окисление $-SH$ -групп при хранении до $-S-S-$) значительно снижают их конкурентоспособность в качестве модификаторов по сравнению с другими типами модификаторов (например, антителами и аптамерами).

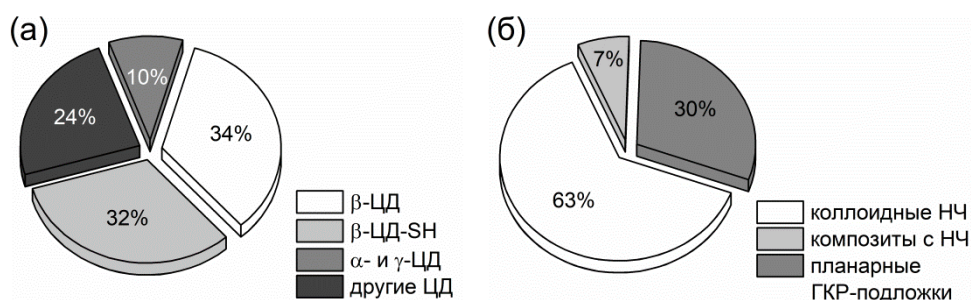


Рис. 5.2. Частота использования ЦД и их производных (а), а также различных типов ГКР-подложек (б) в ЦД-ГКР-анализе.

Анализ литературы также показал, что в качестве ГКР-активной основы ЦД-ГКР-подложек наибольшее распространение получили коллоидные НЧ металлов (в том числе анизотропные [167–169]), композиты с ГКР-активными элементами (например, структуры «ядро-оболочка» [170,171]), планарные ГКР-подложки (например, шероховатые металлические электроды [172–174], серебряные плёнки, полученные вакуумным напылением [175]) (рис. 5.2б). Установлено, что коллоидные растворы сферических СНЧ и ЗНЧ являются наиболее часто используемыми подложками (как и в ГКР-анализе в целом), благодаря простоте методик их приготовления.

Модификацию ГКР-подложек с помощью ЦД в большинстве работ проводили после изготовления ГКР-активной основы путём нанесения ЦД на чистую поверхность подложки или путём замены исходного стабилизатора. Также имеются примеры применения одностадийного синтеза коллоидных ЦД-ГКР-подложек путём восстановления ионов серебра или золота с помощью смеси глюкозы (восстановитель) и нативных ЦД (стабилизатор) [176–180] или избытка ЦД (одновременно и восстановитель, и стабилизатор) [181,182]. Готовые ЦД-ГКР-подложки как правило имеют обычные значения КУ (10^5 – 10^7), и в большинстве работ акцент сделан не столько на достижении максимальной чувствительности ЦД-ГКР-анализа, сколько на увеличении селективности анализа сложных смесей.

Влияние присутствия ЦД на ГКР-сигнал

Собственный ГКР-сигнал ЦД. Отсутствие ГКР-сигнала для нативных ЦД – одно из ключевых преимуществ, как правило, перечисляемых в работах, посвященных созданию и применению ЦД-ГКР-подложек. Однако в нескольких работах показано наличие значительного ГКР-сигнала, формируемого молекулами ЦД после нанесения на ГКР-активную часть [181,183]. Например, в одной работе показано, что СНЧ, стабилизированные γ -ЦД, имеют интенсивный ГКР-сигнал, сравнимый с сигналом аналита (рис. 5.3а) [181]. Авторы объясняют факт появления этого сигнала сильным связыванием продуктов окисления ЦД с поверхностью СНЧ через карбоксильные группы, образующиеся после частичного окисления молекул ЦД, использованных и для восстановления ионов серебра, и для модификации и стабилизации СНЧ. Это предположение подтверждается значительным отрицательным поверхностным зарядом модифицированных СНЧ (дзета-потенциал составил примерно -30 мВ), что указывает на присутствие анионных групп на поверхности СНЧ (предположительно карбоксильных) и что невозможно в случае стабилизации только молекулами нативных ЦД. Аналогичные результаты относительно фонового ГКР-сигнала и отрицательного заряда СНЧ, стабилизированных ЦД, получены и в другой

работе [183]. Более того, важно отметить, что применение β -ЦД-SH для модификации ГКР-подложек почти всегда приводит к генерации фонового сигнала, обусловленного присутствием таких ЦД (рис. 5.3б) [184], что осложняет анализ и ухудшает его точность.

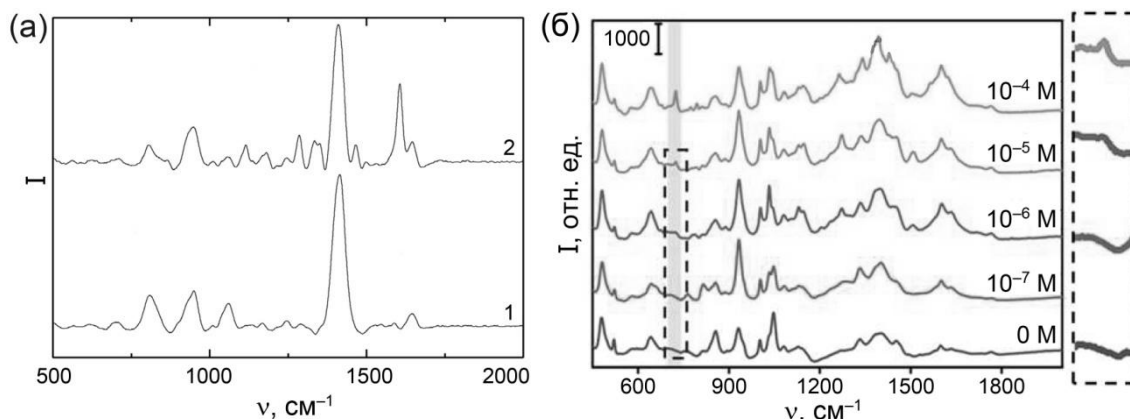


Рис. 5.3. (а) ГКР-сигнал СНЧ, модифицированных γ -ЦД, без (1) и в (2) присутствии аналита (хлорамфеникол) [181]. (б) ГКР-спектры ГКР-подложки, модифицированной β -ЦД-SH, без (0 М) и в присутствии бензантрацена в разных концентрациях [184].

Усиление/подавление ГКР-сигнала аналита в присутствии ЦД.

Примечательно, что лишь немногие публикации, содержащие сравнение ГКР-сигналов, полученных с использованием контрольной ГКР-подложки (без ЦД) и ЦД-ГКР-подложки, однозначно демонстрируют увеличение интенсивности сигнала аналита. При этом модифицирование с помощью ЦД увеличивает интенсивность сигнала аналита не более чем на порядок. Так, ГКР-сигнал перилена увеличился в ~ 1.5 раза [185], бутилбензилфталата – в 2–5 раз [171], меламина – в 3 раза [176], 6-меркаптопурина – в 4–8 раз [186]. Причём в трёх из четырёх [171,185,186] упомянутых работах использовали ГКР-подложки, модифицированные одинаковым видом ЦД (нативный β -ЦД), следовательно, степень увеличения сигнала аналита сильно зависит от его природы. Несколько работ также показали принципиальную необходимость присутствия ЦД для проведения ГКР-анализа, поскольку ГКР-сигнал аналитов (сIBUTРАМИН [182] и САА [187]) появляется только после модификации СНЧ молекулами ЦД.

Важно отметить, что в нескольких публикациях также описано снижение интенсивности ГКР-сигнала, вызванное присутствием молекул ЦД и образованием комплекса включения с аналитом [172,188]. Можно выделить два основных фактора, способных привести к такому уменьшению ГКР-сигнала. Во-первых, свободные молекулы аналита и молекулы аналита в комплексах включения по-разному взаимодействуют с ГКР-активной поверхностью. Также образование комплекса включения может происходить в объёме раствора, а не на поверхности ГКР-подложки. Степень и механизм адсорбции комплексов включения с различным соотношением «ЦД/аналит» также могут быть разными, что приводит к снижению сигнала. Например, уменьшение интенсивности ГКР-сигнала может происходить, если после модификации ГКР-активного элемента не удалить избыток модифицирующего ЦД [189].

Во-вторых, молекулы ЦД могут ингибировать усиление КР-сигнала, например, предотвращая образование «горячих точек» или изменяя эффективность переноса заряда между аналитом и металлом. Например, Yang с соавт. [186] показали, что ЦД могут улучшать коллоидную стабильность в растворах с высокой ионной силой, что приводит к необходимости использовать в 10 раз более концентрированный раствор активирующего агента (например, хлорида натрия) для достижения сигнала нужной интенсивности.

С другой стороны следует отметить, что уменьшение интенсивности ГКР-сигнала, вызванное присутствием ЦД, было предложено использовать для отслеживания образования комплексов включения [190,191]. В таком случае образование комплекса вызывает ингибирование взаимодействия аналита с ГКР-подложкой, что приводит к снижению сигнала, коррелирующему со степенью ассоциации молекул аналита и ЦД.

Применение ЦД-ГКР-методик анализа

Примеры молекул аналитов, определяемых с использованием ЦД-ГКР-подложек, а также информация о метрологических характеристиках методик

анализа представлены в таблице 5.1. Из приведённых данных видно, что ЦД-ГКР-подход в основном использовали для определения ароматических соединений или соединений с ароматическими фрагментами. Это обусловлено тем, что полость молекул ЦД практически неполярна и гидрофобна, поэтому в водных растворах аналиты с ароматическими фрагментами с мало- и неполярными заместителями хорошо взаимодействуют с полостью ЦД. Наличие π -сопряженной электронной системы у таких аналитов приводит к большой поляризуемости их молекул и, как следствие, к высокой КР-активности (по сравнению с алифатическими соединениями). Ещё следует отметить, что, к сожалению, такие метрологические характеристики как c_{\min} , s_r и правильность редко использовали для описания ЦД-ГКР-методик, что затрудняет оценку их реальной эффективности и применимости для анализа.

Табл. 5.1. Примеры ЦД-ГКР-методик анализа и их некоторые метрологические характеристики. 4-МФБК – 4-меркаптофенилбороновая кислота, ПВС – поливиниловый спирт, ЭДА – этилендиамин, ИТО – оксид индия, допированный оксидом олова. * – пересчитано из градуировочной зависимости.

Аналит	Тип ЦД	ГКР-подложка	c_{\min} , мкМ	s_r , %	Ссылка
<i>ЛВ</i>					
марбофлоксацин		СНЧ@ЦД	0.0017	–	[180]
6-меркаптопурин			0.0024	2–20*	[186]
сульфамонотоксин			–	9–17*	
СДЗ	β -ЦД	гидрогель ПВС со	–	–	[187]
сульфадимидин		встроенными	–	–	
сIBUTРАМИНА		СНЧ@ЦД	9.5	3–18*	[182]
гидрохлорид					
лютеолин	β -ЦД с привитым ЭДА	НЧ SiO ₂ @Ag, покрытые ЦД	–	6–26*	[192]
<i>Загрязнители</i>					
бутилбензилфталат	β -ЦД	ЗНЧ@ЦД	–	5–27*	[193]
антрацен			–	7–10	
нафталин	β -ЦД-SH	ЗНЧ@ЦД	–	–	[194]

Продолжение табл. 5.1.

Аналит	Тип ЦД	ГКР-подложка	C_{\min} , мкМ	s_r , %	Ссылка	
пирен	β -ЦД с	ЗНЧ@ЦД	0.0004	3–28*	[195]	
антрацен	привитой		0.0044	1–15*		
	4-МФБК					
<i>o</i> -фенилендиамин	α -ЦД	СНЧ@ЦД	0.03	1–4*	[178]	
полихлорированные бифенилы	β -ЦД-SH	ITO электрод покрытый СНЧ	–	< 15	[196]	
перилен	димер β -ЦД	НЧ SiO ₂ @Ag, покрытые ЦД	–	4–45*	[185]	
ионы ртути	α -ЦД	СНЧ@ЦД покрытые метимазолом	0.0005	–	[177]	
<i>Пестициды</i>						
паракват	β -ЦД-SH	микрочастицы золота, покрытые ЦД	–	3–9*	[197]	
дикват			–	4–12*		
дифензокват			–	4–10*		
карбендазим			50	–		[167]
метилпаратион			–	–		[168]
<i>Нелегальные добавки</i>						
меламин	α -ЦД	СНЧ@ЦД	0.02	2–14*	[176]	
судан III	β -ЦД-SH	фильтровальная бумага, покрытая	–	11–	[169]	
судан IV		ЗНЧ@ЦД	–	20*		
				8–15*		
фенформина гидрохлорид	β -ЦД	СНЧ@ЦД	0.008	2–16*	[179]	

Форматы прямого ЦД-ГКР-анализа. Самый простой формат ЦД-ГКР-анализа аналогичен таковому для прямого ГКР-анализа в целом и включает добавление анализируемого раствора к ЦД-ГКР-подложке с последующей регистрацией аналитического сигнала. Однако существуют примеры и других форматов прямого ЦД-ГКР-анализа.

В некоторых работах предложено использование внутреннего стандарта для повышения точности ГКР-определения аналитов. Например, Zhang с соавт. [194] описали применение мезопористых ЗНЧ, модифицированных β -ЦД-SH, для определения ПАУ (антрацен и нафталин). Фоновый сигнал от β -ЦД-SH авторы использовали для нормирования интенсивности аналитического сигнала и минимизации значения s_r . В другой работе, Yu с

соавт. [195] разработали ЦД-ГКР-методику определения ПАУ (антрацен и пирен), в которой использовали конъюгат нативного β -ЦД с 4-меркаптофенилбороновой кислотой, и сигнал последней использовали в качестве внутреннего стандарта. Важно отметить, что конъюгат был приготовлен путём связывания 4-меркаптофенилбороновой кислоты с молекулами ЦД через ОН-группы за пределами полости ЦД, что позволило сохранить полость свободной для формирования комплекса с аналитом. К сожалению, сигнал этого внутреннего стандарта состоит из множества ГКР-пиков в диапазоне от 400 до 2000 см^{-1} , что осложняет анализ сигнала из-за значительного перекрытия пиков стандарта с пиками аналита.

Также в некоторых методиках анализа использовали ГКР-активные сорбенты со встроенными металлическими НЧ, модифицированными ЦД, для совмещения ТФЭ и ГКР-детектирования [169,182,187,198]. Например, Ouyang с соавт. [182,187] разработали гидрогель поливинилового спирта со встроенными СНЧ, покрытыми β -ЦД, и показали увеличение сорбционной способности (и, следовательно, ГКР-сигнала) на 50% и 25% при определении сибутрамина [187] и САА [182], соответственно, по сравнению с аналогичным композитом без ЦД. Wu с соавт. [169] разработали гибкую ГКР-подложку на основе фильтровальной бумаги с нанесенными ЗНЧ, модифицированными β -ЦД-SH. Авторы предложили использовать иммобилизацию ЗНЧ в пористой структуре бумаги для облегчения экстракции молекул аналита (гидрофобные красители судан III и судан IV), которую осуществляли путём протирки поверхности интересующего объекта ГКР-подложкой, смоченной в гексане. Сравнение с ГКР-подложкой без ЦД (только бумага+ЗНЧ) показало, что присутствие ЦД позволяет детектировать аналиты при концентрациях в 10 раз ниже.

Отметим, что ЦД-ГКР-подложки также использовали в реализации косвенного и некоторых других форматах ГКР-анализа. Однако, поскольку диссертационная работа посвящена возможностям именно прямого ГКР,

подробная информация о других форматах ЦД-ГКР-анализа представлена в обзорной статье диссертанта [166].

Селективность. Использование ЦД может улучшить селективность ГКР-анализа из-за ограниченного размера и строгой формы полости ЦД, а также её низкой полярности. Однако в большинстве опубликованных работ по ЦД-ГКР-анализу не проводили адекватную оценку селективности методик с обоснованным выбором мешающих соединений и их концентраций, что ставит под сомнение применимость данных методик для анализа реальных образцов со сложным составом.

Например, наиболее часто исследовали зависимость ГКР-сигнала аналита от присутствия неорганических ионов [177,179,180,186]. Однако их выбор в качестве конкурентов не вполне разумен (особенно при низких концентрациях), поскольку они плохо взаимодействуют с полостью ЦД и могут вообще не иметь (Г)КР-сигнала (например, галогенид-ионы, катионы металлов). С другой стороны, в некоторых случаях учёт присутствия ионов оправдан. Во-первых, высокая ионная сила раствора аналита может влиять на растворимость молекул аналита и их взаимодействие с полостью ЦД. Во-вторых, оценка влияния ионов является обязательной, когда взаимодействие между ионами и молекулами аналита значительно и может привести к разрушению комплексов «ЦД–аналит» [177]. В-третьих, объекты анализа с высокой ионной силой (морская вода, моча и т.д.) могут значительно влиять на коллоидную стабильность коллоидных ЦД-ГКР-подложек, следовательно, это влияние необходимо исследовать и учитывать для достижения максимальной точности методики анализа. Во всех остальных случаях необходимость исследования влияния присутствия ионов весьма сомнительна.

ЦД-ГКР-методики тестировали в анализе таких сложных объектов, как фармацевтические препараты [179,182,186,199], цельное и сухое молоко [176], образцы почвы [195], природная вода [177,178,187,188], алкогольные напитки [171,193] и ИМ человека [54]. Работы, в которых проводили

определение аналитов с адекватной оценкой метрологических характеристик, представлены в таблице 5.2. Однако влияние мешающих компонентов объекта подробно исследовали только в нескольких работах [54,176,182].

Табл. 5.2. Примеры применения методик ЦД-ГКР-анализа для определения аналитов в реальных объектах.

Объект	Аналит	Число образцов	Правильность, %	s_r , %	Ссылка
Фармацевтические препараты	6-меркаптопурин	2	102–103	< 4	[186]
	сIBUTрамин гидрохлорид	6	90–110	–	[182]
	фенформин гидрохлорид	4	95–105	< 6	[179]
Природная вода	о-фенилендиамин	4	98–104	< 4	[178]
	сульфамонотоксин	1	93	–	
	СДЗ	1	114	–	[187]
	сульфадимидин	1	94	–	
	малахитовый зеленый	1	85–103	< 6	[188]
Алкогольные напитки	ионы ртути	4	98–105	< 4	[177]
		2	–	5–25	[171]
Почва	бутилбензилфталат	2	87–109	< 8	[193]
	пирен	2	102–103	< 2	[195]
Молочный порошок	антрацен	2	102–106	< 3	
	Молоко	меламин	4	–	< 7
		3	89–104	< 5	

Несмотря на растущий интерес к применению ГКР для анализа БЖЧ, использование ЦД-ГКР-подхода в этом направлении было предложено только в одной статье [54]. Авторы использовали коммерческую планарную ГКР-подложку, модифицированную β -ЦД-SH, для определения в моче ацетиламантадина (биомаркера рака). К сожалению, в исследовании использовали образцы ИМ с сильно упрощенным составом, но оценка селективности проведена довольно критично. Например, авторы продемонстрировали, что модификация β -ЦД-SH не позволяет устранить отрицательный эффект некоторых метаболитов (КРН и кортикостерона),

которые заметно конкурируют с целевым аналитом, снижая интенсивность его ГКР-сигнала и, как следствие, достоверность определения.

В нескольких работах исследовали селективность ЦД-ГКР-подложек по отношению к СР соединениям или соединениям, выполняющим те же функции, что и аналит. Например, селективность ЦД-ГКР-подложек продемонстрирована для: инсектицида метилпаратиона по сравнению с другими органическими загрязнителями (мирекс, фталоцианин, гидрохинон, резорцин и 1,3-фенилендиамин) [168]; *o*-фенилендиамина по сравнению с другими ароматическими аминами [178]; лютеолина по сравнению с другими флавоноидами (гесперетин, нарингенин, кверцетин) [192]; пирена и антрацена по сравнению с другими ПАУ [185,200]. С другой стороны, Ouyang с соавт. [187] показали, что их ЦД-ГКР-подложка имеет равное сродство к нескольким САА. Этот факт предположительно связан с реализацией одинакового механизма образования комплекса «ЦД–аналит» (через анилиновый фрагмент). В этом случае плохую селективность к соединениям со схожими структурами можно рассматривать как преимущество, которое может быть использовано для разработки более универсальных класс-специфичных методик анализа.

Преимущества, ограничения и перспективы использования ЦД в ГКР-анализе

Преимущества:

1. ЦД достаточно экономически выгодны (особенно β -ЦД), стабильны и имеют известный и постоянный размер полости, что положительно влияет на воспроизводимость результатов.

2. ЦД улучшают коллоидную стабильность ГКР-подложек на основе коллоидных НЧ металлов [186].

3. ЦД позволяют изменять взаимодействие между ГКР-подложкой и компонентами смеси (и, следовательно, интенсивность ГКР-сигнала компонентов), например, улучшать в случае аналитов и/или ухудшать в случае мешающих компонентов [190,193–195,199].

4. ЦД могут влиять на ориентацию молекул аналита на поверхности ГКР-подложки, что также влияет на усиление КР-сигнала [172,201,202].

Ограничения:

1. ЦД обладают худшей селективностью по сравнению с элементами биологического распознавания, такими как антитела и аптамеры. Действительно, согласно примерам, приведённым в таблице 5.1, один и тот же вид ЦД был предложен для улучшения определения различных аналитов. К счастью, многополосный характер ГКР-сигнала частично компенсирует это ограничение, снижая вероятность ложноположительных результатов за счёт различения сигнала аналитов и примесей с использованием анализа спектральных профилей. Более того, ограниченная селективность позволяет разрабатывать методики для определения конкретных классов аналитов с использованием одного типа молекул распознавания и методики анализа [187,195].

2. Взаимодействие между ЦД и молекулой-гостем также слабее, чем в комплексах «антиген–антитело». С другой стороны, обратимость образования комплексов включения с ЦД позволяет реализовать разнообразные форматы ЦД-ГКР-анализа (как прямые, так и косвенные) и облегчить разработку ГКР-сенсоров, позволяющих непрерывно отслеживать изменения концентрации аналита во времени.

3. В некоторых случаях ЦД снижают ГКР-сигнал, что может быть связано с блокированием ГКР-активных центров на поверхности подложки молекулами ЦД или с образованием комплексов включения в объёме раствора вместо поверхности ГКР-подложки [172,188,190,191].

4. ЦД могут быть источником фонового сигнала, особенно в случае тиольных производных ЦД [181,183,184,194]. В таких случаях, ГКР-сигнал от ЦД предложено использовать в качестве внутреннего стандарта для увеличения точности анализа (снижения s_r) [194].

Перспективы. К сожалению, в опубликованных работах не проводили подробные исследования селективности ЦД-ГКР-методик и оценку

конкурентных взаимодействий между аналитом и примесями за поверхность ЦД-ГКР-подложки. Следовательно, работа в этом направлении крайне актуальна, поскольку поможет ответить на вопрос о возможности применения ЦД-ГКР-методик для определения аналитов в сложных матрицах с переменным составом (в т.ч. БЖЧ). Важно отметить, что при изучении конкурентных взаимодействий необходимо не только правильно выбрать мешающие примеси (например, молекулярные компоненты объекта исследования вместо ионов металлов), но использовать их в концентрации, соответствующей таковой в реальных объектах, т.е. при реалистичных соотношениях «аналит/мешающее соединение».

Одним из важнейших недостатков, которые были выявлены в ходе анализа литературы, является отсутствие надлежащих контрольных измерений. Например, всего в нескольких работах проведено сравнение эффективности ЦД-ГКР-подложки со «стандартными» ГКР-подложками, например, СНЧ, стабилизированными цитрат-ионами [176,186], синтез которых проще и дешевле. Более того, даже если контрольную ГКР-подложку использовали для сравнения, то часто не принимали во внимание разницу в концентрации контрольных НЧ и НЧ, модифицированных ЦД, хотя известно, что интенсивность ГКР-сигнала существенно зависит от концентрации ГКР-активного материала. Кроме того, условия сбора ГКР-сигнала с использованием контрольной ГКР-подложки (например, рН, ионная сила, использование активирующего агента) часто не были оптимизированы в то время как для ЦД-ГКР-подложек использовали наилучшие условия регистрации сигнала аналита.

Таким образом, проведённый критический обзор литературы [166] показал, что существует противоречивая информация об эффективности применения ЦД в ГКР-анализе (особенно в случае реальных образцов со сложным составом), поэтому представленные далее исследования проведены для оценки реального потенциала применения ЦД-ГКР-методик для

определения аналитов в образцах БЖЧ и способности ЦД улучшать селективность анализа.

5.2. Синтез и исследование серебряных наночастиц, модифицированных циклодекстринами

Для получения СНЧ@ЦД использовали одностадийный синтез, при котором ЦД выступали в качестве восстановителя и стабилизатора СНЧ [182]. Синтез включал в себя нагрев до 60°C и выдерживание при интенсивном перемешивании щелочного раствора ЦД (9.9 мл, рН 11.7) с добавкой AgNO₃ (100 мкл, 0.1 М). Образцы СНЧ@ЦД, полученные таким образом, перед использованием в ГКР-анализе требуют промывки для удаления избытка молекул ЦД и побочных продуктов реакции, поскольку без этой стадии сигнал ЛВ слабый или не наблюдается вовсе (ФХА, САА). Для отмывки 1 мл готовых СНЧ@ЦД центрифугировали (4400×g, 5 мин), отбирали 0.97 мл надосадочной жидкости и добавляли такой же объём дистиллированной воды, затем коллоид обрабатывали в УЗ ванне и использовали для ГКР-измерений. Однако промывка сильно снижает коллоидную стабильность СНЧ@ЦД, поэтому образцы без отмывки использовали для длительного хранения, поскольку они стабильны во времени, а промытые образцы готовили перед ГКР-измерениями и использовали в течение 1–2 дней.

5.2.1. Оптимизация синтеза

С целью оптимизации синтеза СНЧ@ЦД провели изучение зависимости ГКР-сигнала от концентрации ЦД (на примере β-ЦД) и времени реакции, поскольку эти факторы влияют на скорость и полноту синтеза, а также определяют коллоидную стабильность СНЧ@ЦД и их взаимодействие с молекулами аналита. Кроме того, в ранее описанных методиках синтеза СНЧ@β-ЦД предлагают значительно отличающееся время синтеза (от 0.5 до 3 часов [186,187]) без каких-либо пояснений касательно причин такого выбора. Для регистрации спектров в пределах данной главы использовали

портативный КР-спектрометр (i-Raman, B&WТек), совмещенный с оптическим микроскопом (объектив 20х, NA 0.4); длина волны лазера – 532 нм, мощность лазера на образце – 43 мВт, время накопления сигнала – 1 с. Анализируемая смесь состояла из раствора аналита, раствора ГКР-подложки (СНЧ@ЦД или контрольные СНЧ) и активирующего агента (NaCl/HCl/NaOH) в объёмном соотношении 12:4:1. В данной главе в качестве контрольной ГКР-подложки использовали СНЧ, восстановленные и стабилизированные гидроксиламином. При синтезе всех ГКР-подложек, включая контрольную, использовали одинаковую молярную концентрацию ионов серебра (1 мМ раствор AgNO₃). Все ГКР-спектры нормировали на интенсивность пика при 230 см⁻¹, соответствующего колебаниям связи Ag–Cl [203]. Также отслеживали изменения значения ППР раствора СНЧ@β-ЦД во время синтеза путём регистрации спектров поглощения в УФ–видимом диапазоне.

Во-первых, изучение кинетики реакции показало тривиальный эффект: скорость реакции (оцениваемая как изменение оптической плотности и интенсивности ГКР-сигнала за определенный промежуток времени) значительно увеличивается с ростом концентрации β-ЦД (рис. 5.4). Это хорошо видно по интенсивности сигнала через 20 мин после начала реакции: использование 10 мМ β-ЦД приводит к наиболее быстрому росту сигнала. Оптическая плотность СНЧ@β-ЦД перестает изменяться через час после начала синтеза независимо от используемой концентрации β-ЦД (рис. 5.4б). С другой стороны, рост интенсивности ГКР-сигнала сильно зависит от используемой концентрации β-ЦД: увеличение концентрации ускоряет рост ГКР-активности и сокращает время, когда интенсивность достигает максимума (рис. 5.4а). Поэтому при оптимизации синтеза новых ГКР-активных материалов необходимо использовать именно ГКР-сигнал, а не спектры поглощения. Тем не менее предпочтительнее более длительное время синтеза СНЧ@β-ЦД, чтобы гарантировать достижение максимальной усиливающей способности (180 мин для описанной системы, рис. 5.4а).

Однако при низкой концентрации β -ЦД (0.1 мМ) интенсивность ГКР-сигнала не достигает своего максимума даже после 180 мин реакции.

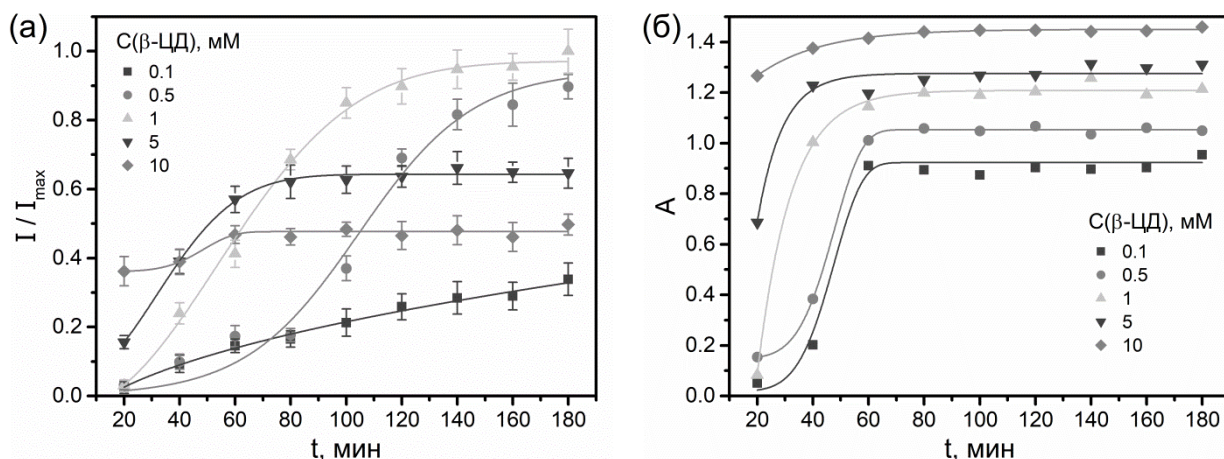


Рис. 5.4. Влияние концентрации β -ЦД, используемой для синтеза СНЧ@ β -ЦД, на кинетику реакции в соответствии с интенсивностью (а) ГКР-сигнала МТК и (б) пика ППР раствора СНЧ@ β -ЦД (при 410 нм). Условия получения ГКР-сигнала: 0.25 мкг/мл МТК, 60 мМ NaCl, pH 6.5, пик при 1364 см^{-1} .

Анализ влияния увеличения концентрации β -ЦД (при фиксированном времени реакции, 180 мин) показал, что интенсивность пика ППР СНЧ@ β -ЦД монотонно увеличивается (рис. 5.5а). В то же время ГКР-активность СНЧ@ β -ЦД нелинейно зависит от концентрации β -ЦД и имеет максимум при использовании 1 мМ раствора β -ЦД. Низкий уровень ГКР-активности при низких концентрациях β -ЦД (0.1 и 0.5 мМ) мы связываем с неполным восстановлением СНЧ и плохим покрытием поверхности СНЧ молекулами β -ЦД. Хотя более низкие значения оптической плотности также могут указывать на неполное восстановление СНЧ при низких концентрациях β -ЦД, разница в интенсивности ГКР-сигналов намного больше по сравнению с разницей в концентрации СНЧ (согласно измерениям спектров поглощения). Поэтому предположено, что восстановление СНЧ может эффективно протекать при низких концентрациях β -ЦД (0.1 и 0.5 мМ), но непрореагировавших молекул β -ЦД недостаточно, чтобы покрыть поверхность СНЧ и усилить адсорбцию молекул аналита.

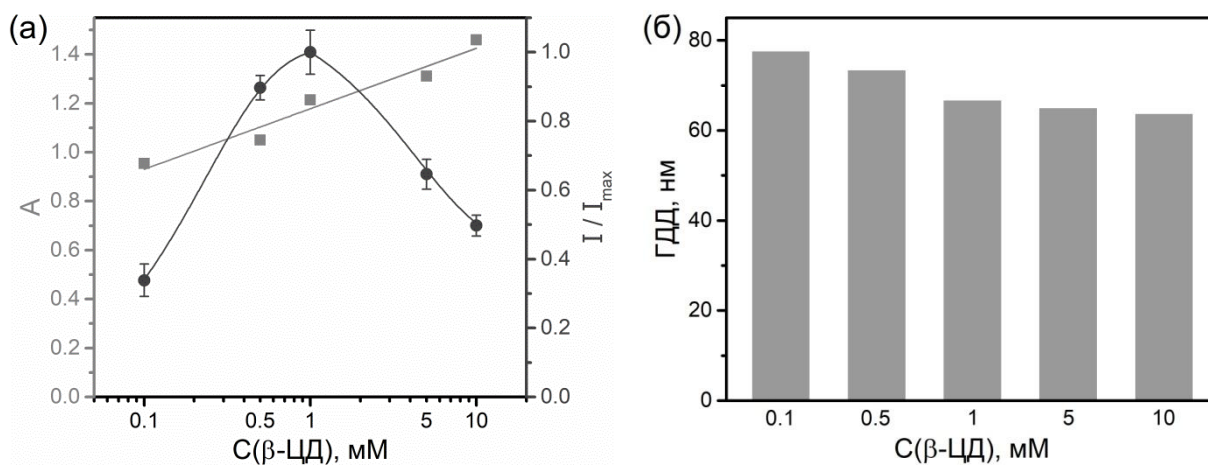


Рис. 5.5. (а) Влияние концентрации β-ЦД, используемой для синтеза СНЧ@β-ЦД, на интенсивность ГКР-сигнала МТК и пика ППР раствора СНЧ@β-ЦД. Зависимости построены по результатам для СНЧ@β-ЦД, синтезированных в течение 180 мин (рис. 5.4). **(б)** Влияние концентрации β-ЦД, используемой для синтеза СНЧ@β-ЦД, на ГДД синтезированных СНЧ@β-ЦД в течение 180 мин.

С другой стороны, использование β-ЦД в концентрациях выше 1 мМ также приводит к снижению ГКР-сигнала. Этот факт связан с конкуренцией между молекулами β-ЦД, адсорбированными на ГКР-активной поверхности, и молекулами β-ЦД, растворенными в объеме, за взаимодействие с молекулами аналита. Таким образом, избыток β-ЦД приводит к образованию комплекса включения «β-ЦД–аналит» в объеме раствора, что препятствует взаимодействию аналита с СНЧ@β-ЦД. Уменьшение сигнала при высоких концентрациях β-ЦД также может быть связано с многослойной адсорбцией β-ЦД на СНЧ. Действительно, многочисленные гидроксильные группы облегчают ассоциацию молекул ЦД посредством внутримолекулярных водородных связей [204]. Как следствие, образование ассоциатов ЦД на поверхности СНЧ может препятствовать доступу молекул аналитов к ГКР-активным центрам.

Таким образом, интенсивность поглощения возбуждающего света и КР-усиление подложки далеко не всегда коррелируют друг с другом и интенсивность поглощения сама по себе не может быть использована для прогнозирования интенсивности ГКР-сигнала. Поэтому использование постулатов только ЭМ механизма усиления КР-сигнала следует использовать

очень осторожно, особенно в случае систем, в которых возможны конкурентные взаимодействия за ГКР-активные центры. Также установлено, что увеличение концентрации β -ЦД при фиксированном времени реакции (180 мин) приводит к умеренному уменьшению ГДД СНЧ@ β -ЦД с ~80 нм до ~65 нм (рис. 5.5б). Это связано с более быстрым образованием СНЧ и их лучшей стабилизацией в случаях избытка молекул β -ЦД.

5.2.2. Исследование образцов

С использованием оптимизированной методики синтеза были получены четыре типа образцов СНЧ, модифицированных как нативными ЦД (α -ЦД и β -ЦД), так и их производными с гидроксипропильными (ГП) группами (ГП- α -ЦД и ГП- β -ЦД) (рис. 5.6а).

Размер СНЧ, модифицированных ЦД

Согласно результатам СЭМ-анализа все типы СНЧ@ЦД имеют сферическую форму и размер, сопоставимый с размером контрольных СНЧ (рис. 5.6б,в). Спектры поглощения СНЧ@ЦД, полученные с использованием разных ЦД, практически идентичны (рис. 5.6г). Следовательно, можно заключить, что состав ЦД незначительно влияет на морфологию и плазмонные свойства модифицированных СНЧ.

Примечательно, что по сравнению с СЭМ-измерениями размера, результаты ДРС-измерений показывают гораздо большую разницу в значениях ГДД для СНЧ с и без покрытия ЦД: ~70 и ~50 нм для СНЧ@ЦД и контрольных СНЧ, соответственно (рис. 5.5б, 5.6в). Данный результат обусловлен как вкладом молекул ЦД, адсорбированных на поверхности СНЧ, в значение ГДД, так и способностью ЦД увеличивать гидратную оболочку путём образования ассоциатов с молекулами воды посредством водородных связей. Таким образом, результаты СЭМ характеризуют только металлическую часть размера ГКР-подложки, а результаты ДРС характеризуют подложку в целом, в том числе при условиях, в которых регистрировали ГКР-сигнал (т.е. в растворах).

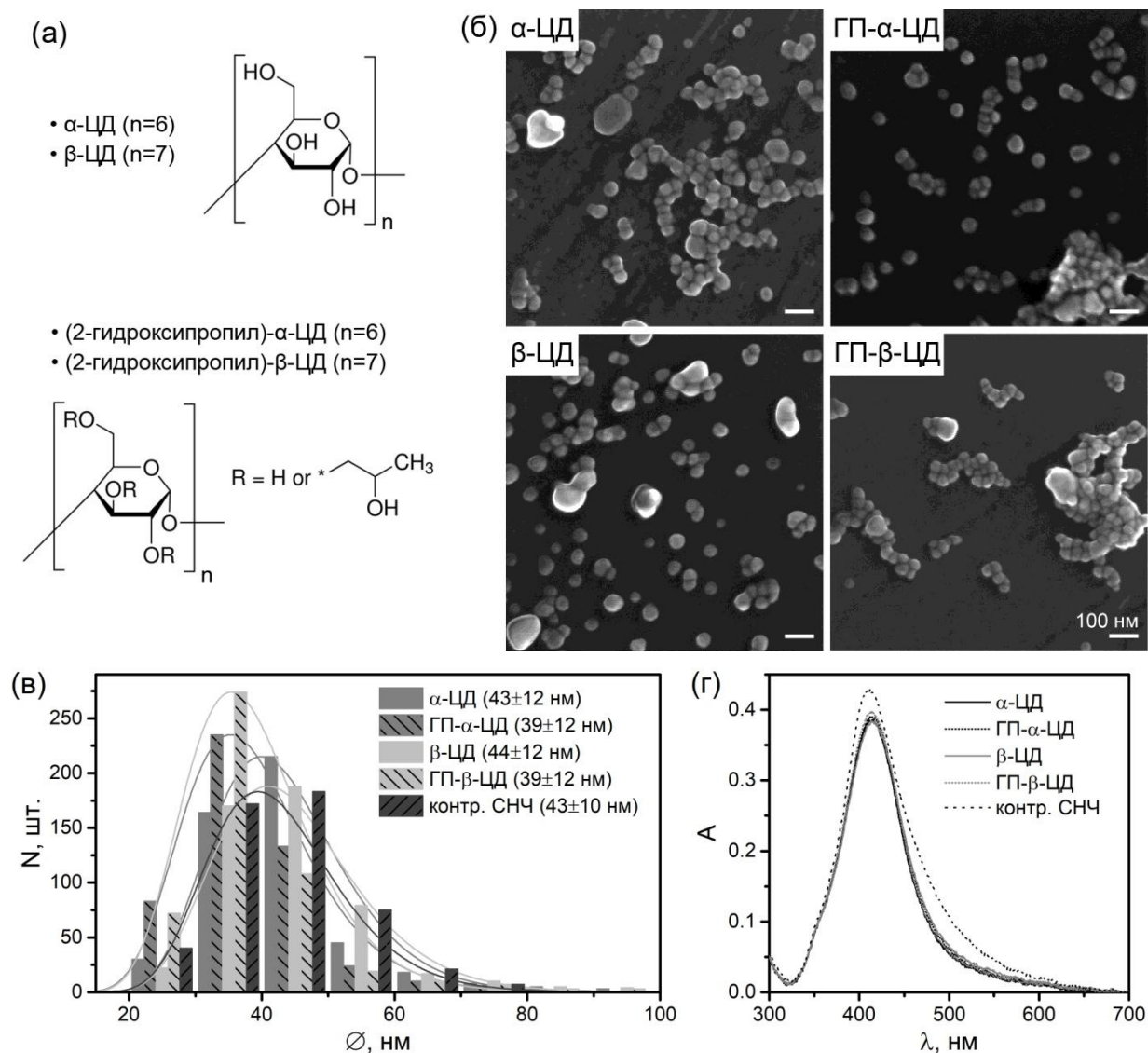


Рис. 5.6. (а) Структурные формулы ЦД, использованных в работе. (б–г) СЭМ-изображения (б), распределение частиц по размерам (в) и спектры поглощения (г) образцов СНЧ, модифицированных различными ЦД, а также контрольных СНЧ без ЦД.

Воспроизводимость синтеза СНЧ, модифицированных ЦД, и стабильность образцов во времени

Поскольку использование β-ЦД для модификации СНЧ обеспечивает и максимальную интенсивность сигнала интересующих аналитов (подробнее в разделе 5.3), и минимизирует траты на изготовление ГКР-подложки, проведено тщательное изучение воспроизводимости синтеза СНЧ@β-ЦД. Установлено, что синтез имеет хорошую воспроизводимость от образца к образцу (s_r интенсивности ГКР-сигнала аналита менее 10%) и образцы СНЧ@β-ЦД сохраняют усиливающие свойства в течение не менее 6 недель (рис. 5.7).

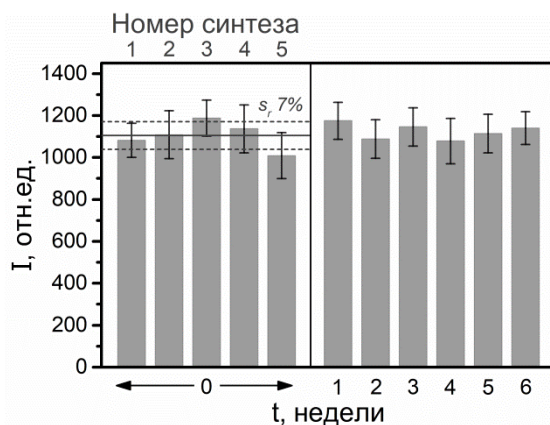


Рис. 5.7. Результаты изучения воспроизводимости синтеза СНЧ@ β -ЦД и стабильность их усиливающих свойств во времени. Усиливающие свойства оценивали по интенсивности ГКР-сигнала ЦИПРО (0.5 мкг/мл; пик при 1393 см^{-1}).

Исследование влияния ионной силы на коллоидную стабильность СНЧ, модифицированных ЦД

Как будет показано в разделе 5.3, модификация СНЧ с помощью ЦД обеспечивает наибольший положительный эффект на аналитический сигнал (максимальная интенсивность полезного и отсутствие фонового сигнала) при использовании активирующего агента (NaCl) в нейтральной среде. С другой стороны известно, что добавка активирующего агента всегда ведет к агрегации НЧ, поэтому провели оценку степени агрегации в случае СНЧ@ β -ЦД. Так, по данным ДРС, увеличение концентрации β -ЦД при синтезе улучшает коллоидную стабильность СНЧ@ β -ЦД, делая их менее чувствительными к увеличению концентрации NaCl (рис. 5.8а). Также следует отметить, что независимо от используемой для синтеза концентрации ЦД, СНЧ@ β -ЦД обладают лучшей коллоидной стабильностью по сравнению с контрольными СНЧ. Это проявляется в более плавном росте и меньшем размере агрегатов СНЧ@ β -ЦД, образующихся при увеличении концентрации NaCl.

Учитывая, что агрегация частиц ГКР-подложек, как правило, увеличивает интенсивность ГКР-сигнала, наибольшую интенсивность сигнала ожидалось получить при использовании СНЧ@ β -ЦД, приготовленных с использованием 0.1 мМ β -ЦД, поскольку они образуют

самые большие агрегаты (рис. 5.8а). Однако согласно ГКР-измерениям происходит лишь умеренное усиление сигнала при увеличении концентрации NaCl, что предположительно связано с недостаточным покрытием поверхности СНЧ молекулами β -ЦД (рис. 5.8б). С другой стороны, несмотря на улучшение коллоидной стабильности, при высоких концентрациях β -ЦД (5 и 10 мМ) происходит значительное снижение интенсивности ГКР-сигнала, что обусловлено (1) конкуренцией между молекулами ЦД на поверхности СНЧ и молекулами ЦД в объеме раствора за взаимодействие с молекулами аналита и (2) многослойной адсорбцией молекул ЦД на ГКР-активной поверхности.

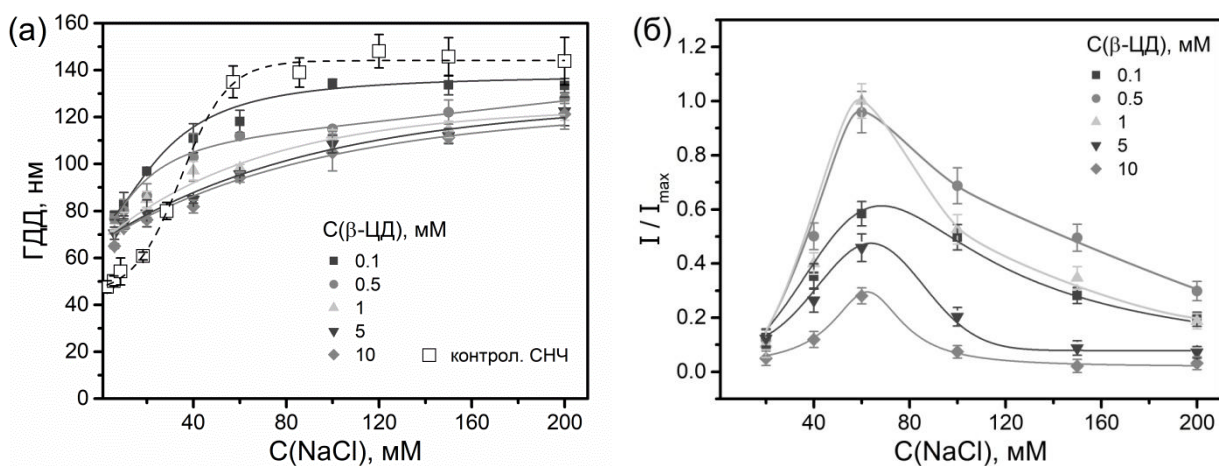


Рис. 5.8. Влияние концентрации β -ЦД, используемой для синтеза СНЧ@ β -ЦД, и концентрации NaCl (активирующего агента) на **(а)** ГДД СНЧ@ β -ЦД и **(б)** интенсивность ГКР-сигнала МТК (0.1 мкг/мл, рН 6.5, пик при 1364 см⁻¹).

5.3. Влияние циклодекстринов на полезный и фоновый аналитический ГКР-сигнал

Влияние структуры ЦД на ГКР-сигнал ЛВ

Выбор оптимального вида ЦД для синтеза ГКР-подложки и дальнейшего использования в определении ЛВ в БЖЧ основывался на оценке интенсивности ГКР-сигнала аналитов. Предварительно проведено изучение зависимости ГКР-сигнала от концентрации аналитов для СНЧ без и с покрытием молекулами ЦД; пример для ЦИПРО и β -ЦД приведен на рис. 5.9а. Анализ результатов показал, что в случае СНЧ@ЦД при росте

концентрации аналита происходит более быстрый рост сигнала и его выход на постоянное значение. Поэтому для определения оптимального вида ЦД использовали концентрации аналитов, находящиеся в нижней части зависимости сигнала от концентрации. Также, из литературы известно (раздел 5.1), что ЦД лучше взаимодействуют с неполярными молекулами, что будет подтверждено нами для изучаемых ЛВ далее в подразделе «Влияние присутствия ЦД на интенсивность ГКР-сигнала ЛВ», поэтому эксперименты по определению оптимального вида ЦД осуществляли по ГКР-сигналу в нейтральной среде.

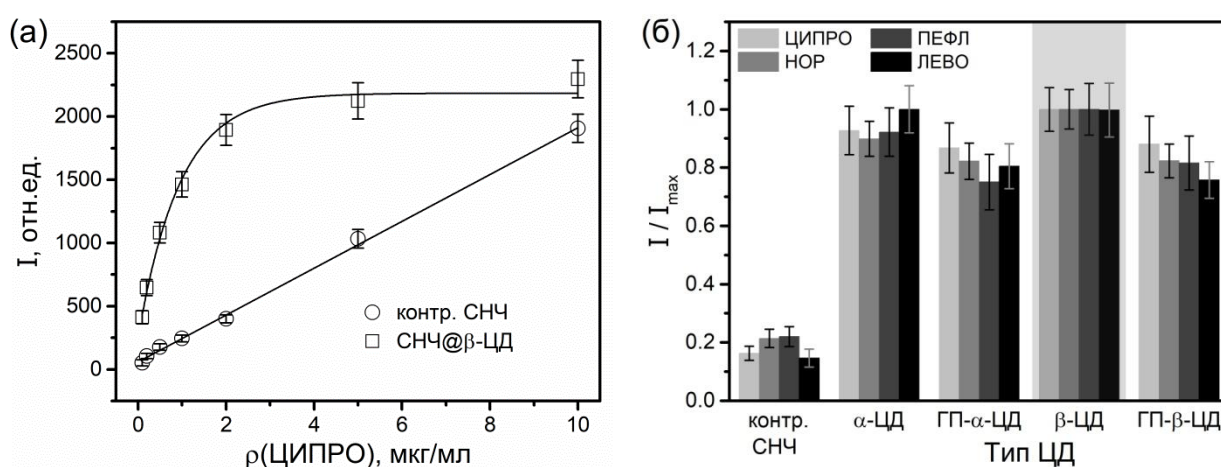


Рис. 5.9. (а) Градуировочные зависимости для раствора чистого ЦИПРО (0.5 мкг/мл), полученные с использованием СНЧ@ β -ЦД и контрольных СНЧ. (б) Зависимость интенсивности ГКР-сигнала растворов разных ФХА (0.5 мкг/мл) от вида ЦД, использованного для модификации СНЧ. Регистрацию ГКР-спектров проводили в нейтральной среде (рН 6.5) в растворе NaCl (60 мМ). Для построения графиков использовали наиболее интенсивные пики ФХА (рис. 2.8в).

В случае представителей ФХА показано, что разница в усиливающих свойствах СНЧ, покрытых разными видами ЦД, небольшая (до 20%) и их усиливающие свойства существенно превосходят таковые для контрольных СНЧ (рис. 5.9б). Тем не менее, наиболее интенсивный ГКР-сигнал получен при использовании СНЧ покрытых β -ЦД. Некоторое снижение интенсивности сигнала в случае СНЧ, покрытых другими видами ЦД, мы связываем со стерическими факторами, уменьшающими адсорбцию молекул ФХА на поверхности ГКР-подложки: (i) меньшим размером полости в случае

α -ЦД и (ii) частичной блокировкой входа в полость ГП группами в случае производных ЦД. Например, в литературе ранее показано, что комплекс ЛЕВО с нативным β -ЦД имеет в 3 раза более высокую константу устойчивости по сравнению с комплексом с ГП- β -ЦД [205] и в 3–5 раз более высокие константы устойчивости (в зависимости от pH) по сравнению с комплексами с α -ЦД [206].

В случае МТК, ЦСА и САА установлено, что образцы СНЧ, модифицированные различными видами ЦД, демонстрируют небольшие различия в усиливающих свойствах: как в случае ФХА разница в интенсивностях не более 20%. При этом ни один вид ЦД не выделяется так, чтобы говорить об его явном приоритете для использования в ЦД-ГКР-определении данных ЛВ.

Влияние присутствия ЦД на ГКР-сигнал мочи

Помимо положительного влияния присутствия ЦД на чувствительность ГКР-детектирования аналитов, немаловажно оценить влияние ЦД на ГКР-сигнал мешающих (фонообразующих) компонентов мочи. Так, анализ ГКР-спектров образцов УМ, полученных с использованием СНЧ@ β -ЦД, показал, что в кислой среде интенсивность и профиль ГКР-сигнала не претерпевают значительных изменений после модификации поверхности СНЧ молекулами ЦД (рис. 5.10). Ранее нами было показано, что фоновый сигнал мочи при низких значениях pH в основном обусловлен присутствием УБЛ (рис. 3.2а), молекулы которых состоят из ароматических фрагментов, остающихся незаряженными в кислой среде, и способных взаимодействовать с неполярной полостью ЦД. Также, аналогично БРБ, УБЛ имеют низкую растворимость в воде, что дополнительно способствует их адсорбции на поверхности СНЧ@ЦД благодаря гидрофобным взаимодействиям.

Анализ спектров мочи, полученных в нейтральной среде, показал снижение интенсивности сигнала эндогенных компонентов в присутствии ЦД. Снижение сигнала в данном случае связано с депротонированием кислотных метаболитов (УБЛ и МК), анионные формы которых гораздо

лучше взаимодействуют с водой, нежели с полостью ЦД на поверхности СНЧ. КРН, с другой стороны, является слабым основанием (pK_a сопряженной кислоты равно 4.96 [75]), что приводит к частичному протонированию его молекул в средах, близких к нейтральным, и ухудшению его взаимодействия с ЦД.

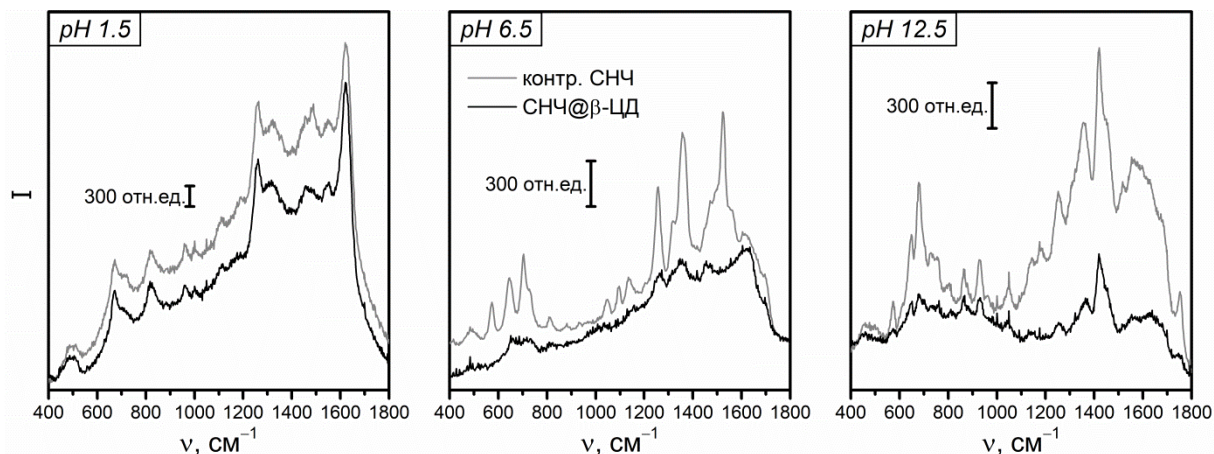


Рис. 5.10. Влияние pH и модификации СНЧ с помощью β -ЦД на ГКР-спектры образца УМ, разбавленного в 200 раз. В нейтральной среде (pH 6.5) дополнительно проводили активацию СНЧ с помощью раствора NaCl.

В щелочной среде сигнал мочи также снижается (рис. 5.10) благодаря переводу в заряженное (депротонированное) состояние большинства компонентов мочи, способных к генерации ГКР-сигнала. Единственным значимым компонентом остаётся КРН, поскольку его молекулы становятся электронейтральными (т.е. способными к взаимодействию с ЦД) и пики которого проявляются даже в присутствии ЦД.

Влияние присутствия ЦД на интенсивность ГКР-сигнала ЛВ

Как показано в подразделе «Влияние структуры ЦД на ГКР-сигнал ЛВ», присутствие ЦД значительно увеличивает чувствительность ГКР-детектирования за счёт улучшения адсорбции молекул аналитов на поверхности СНЧ@ЦД (рис. 5.9). Однако чувствительность ЦД-ГКР-анализа зависит не только от используемого вида ЦД, но и строения и заряда молекул, взаимодействующих с ЦД. Так, в кислой среде помимо того, что использование СНЧ@ЦД не позволяет устранить ГКР-сигнал эндогенных компонентов мочи (т.е. фоновый сигнал при ГКР-анализе), дополнительно

происходит снижение интенсивности (в случае МТК и ФХА) или полное исчезновение (в случае САА) ГКР-сигнала ЛВ. Как и для некоторых эндогенных компонентов, рассмотренных выше, данный результат обусловлен ухудшением взаимодействия СНЧ@ЦД с ЛВ из-за протонирования их молекул (рис. 2.4а, 2.6б, 3.32), в результате чего аналиты гораздо лучше взаимодействуют с полярной водой, нежели с неполярной полостью ЦД. Исключение составляют лишь ЦСА, которые проявляют преимущественно слабые кислотные свойства (pK_a в диапазоне 2–3.5 [75]) и в кислых средах сохраняют нейтральный заряд. Поэтому в умеренно кислых растворах (pH 1–4) ГКР-сигнал ЦСА, полученный с помощью СНЧ@ЦД, такой же или немного интенсивнее сигнала, полученного с помощью контрольных СНЧ.

Из-за депротонирования и перехода в анионное состояние, интенсивность ГКР-спектров ЛВ в щелочной среде также ниже (ЦСА, ФХА, САА), либо сопоставима (МТК, рис. 5.11а) по интенсивности со спектрами, полученными при использовании контрольных СНЧ. Более того, несмотря на снижение интенсивности сигнала мочи в щелочной среде в присутствии ЦД (рис. 5.10), обнаружено, что ГКР-сигнал КРН всё равно полностью перекрывает сигнал ЛВ при регистрации их спектров в моче. При этом дополнительное разбавление образца мочи с аналитом не позволяет избавиться от фона и получить сигнал аналита (на рис. 5.11б приведен пример для МТК в моче).

В случае САА ранее было установлено (раздел 2.3), что использование контрольных СНЧ (стабилизированных гидроксиламином или цитрат-ионами) не позволяет получить ГКР-сигнал САА в нейтральной среде (даже при добавлении активирующего агента). Однако модификация СНЧ с помощью ЦД способствует адсорбции САА на поверхности ГКР-подложки и позволяет регистрировать спектры некоторых САА в нейтральной среде даже без применения активации СНЧ с помощью NaCl (рис. 5.12а). Отсутствие ГКР-сигнала СГ предположительно связано с более гидрофильной природой

его заместителей (рис. 2.2), что делает взаимодействие СГ с водой более предпочтительным по сравнению с гидрофобной полостью ЦД. К сожалению, последующее детальное изучение методики определения САА с использованием СНЧ@ β -ЦД показало, что она слишком чувствительна к присутствию компонентов БЖЧ. Так, регистрация спектров смесей СМЗ с такими компонентами БЖЧ как МК и неорганические соли приводит к практически полному подавлению аналитического сигнала (рис. 5.12б). Поэтому дальнейшие работы по развитию методики определения САА в БЖЧ с помощью ЦД-ГКР-анализа не проводили, поскольку это требует значительного усложнения этапа пробоподготовки, что снижает её конкурентоспособность по сравнению с методикой с добавлением ПДДА (подраздел 3.6.2).

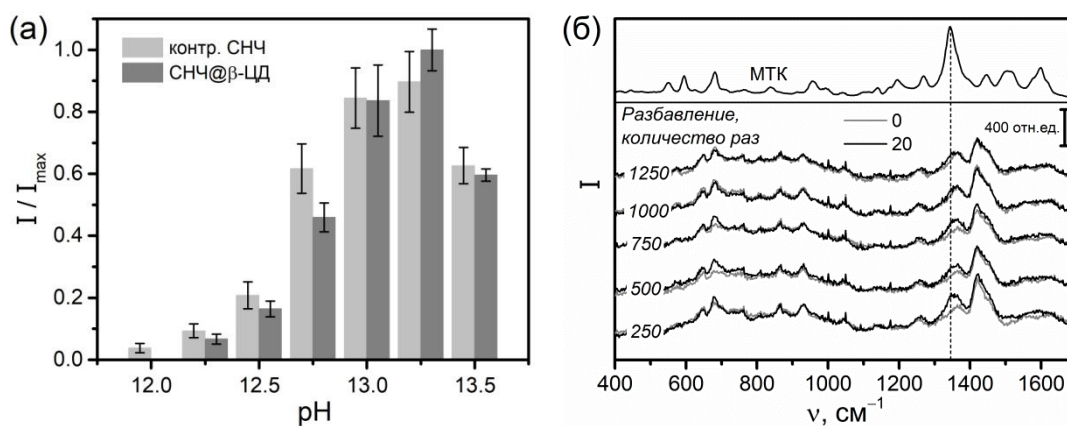


Рис. 5.11. (а) Зависимость интенсивности ГКР-сигнала щелочных растворов МТК (0.1 мкг/мл, по пику при 1345 см^{-1}) от величины рН; спектры получены с использованием СНЧ@ β -ЦД и контрольных СНЧ. (б) Влияние разбавления на ГКР-спектры УМ без (0) и с (20) добавкой МТК (20 мкг/мл); спектры получены с использованием СНЧ@ β -ЦД и при рН 13.25.

В случае нейтральной среды для получения интенсивных ГКР-спектров МТК, ФХА и ЦСА с использованием СНЧ@ЦД принципиально необходимо добавление рН-нейтрального активирующего агента (NaCl). Также сравнение СНЧ@ β -ЦД и контрольных СНЧ при оптимальных концентрациях NaCl показало, что первые в 7, 5 и 2 раза лучше увеличивают интенсивность КР-сигнала МТК, ЦИПРО и ЦТР, соответственно (рис. 5.13). Также отметим, что присутствие ЦД, их структура и концентрация не влияют на профили

спектров всех изученных ЛВ и компонентов БЖЧ, т.е. образование комплексов включения на поверхности ГКР-подложки несущественно влияет на электронную структуру аналитов.

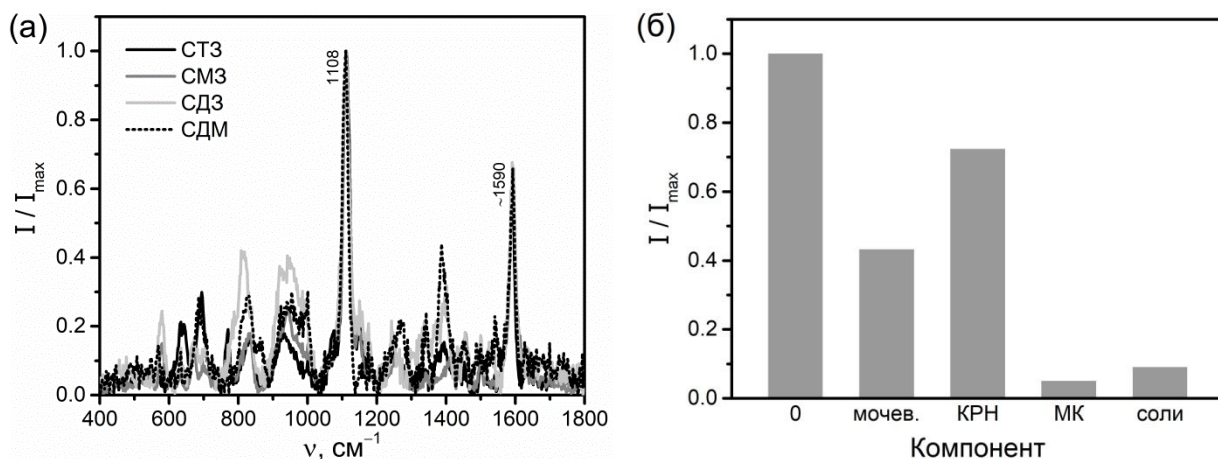


Рис. 5.12. (а) Профили ГКР-спектров некоторых САА, полученные с использованием СНЧ@β-ЦД (рН 6.5). (б) Интенсивность ГКР-сигнала СМЗ (10 мкг/мл, по пику при 1108 см⁻¹) без (0) и в присутствии некоторых компонентов БЖЧ: мочевины (30 мг/мл), КРН (2 мг/мл), МК (1 мг/мл), смеси неорганических солей. СМЗ и его смеси с данными компонентами разбавляли в 20 раз перед ГКР-измерениями.

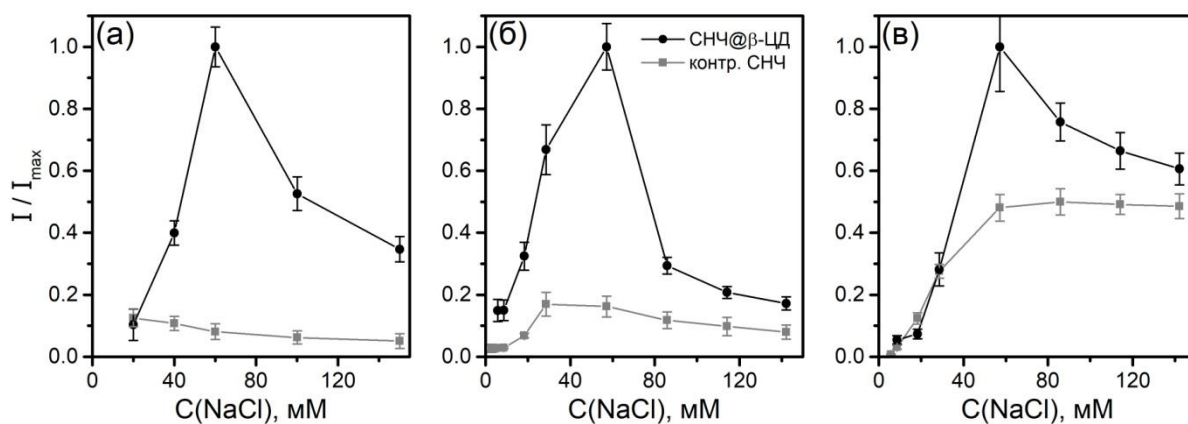


Рис. 5.13. Влияние концентрации NaCl (при рН 6.5) на интенсивность ГКР-спектров растворов: (а) МТК (0.1 мкг/мл), (б) ЦИПРО (0.5 мкг/мл) и (в) ЦТР (2 мкг/мл). Спектры получены с использованием СНЧ@β-ЦД и контрольных СНЧ; пики при 1364, 1393 и 1358 см⁻¹ использовались для построения графиков.

Установлено, что СНЧ@β-ЦД и контрольные СНЧ имеют существенно отличающиеся зависимости интенсивности ГКР-сигнала от концентрации NaCl (рис. 5.13). Так, в случае использования СНЧ@β-ЦД данная зависимость имеет ярко выраженный нелинейный вид, при котором максимальная интенсивность сигнала ЛВ достигается при ~60 мМ NaCl для

трёх разных ЛВ разных классов. В случае контрольных СНЧ данная зависимость не имеет явного максимума и для разных аналитов существенно отличается.

Проведённое ранее изучение зависимости ГДД СНЧ@ β -ЦД от концентрации NaCl (рис. 5.8a) показало, что рост концентрации NaCl приводит к запуску агрегации СНЧ@ β -ЦД и образцы с наиболее интенсивным ГКР-сигналом образуют агрегаты именно при 60 мМ NaCl. Более того, агрегация СНЧ@ β -ЦД также приводит к изменению их спектров поглощения и используемая длина волны возбуждающего лазера (532 нм) начинает лучше взаимодействовать с ГКР-подложкой по сравнению с неагрегированными СНЧ@ β -ЦД (рис. 5.14). Примечательно, что спектры поглощения СНЧ@ β -ЦД сильно изменяются именно до 60 мМ NaCl и при этой концентрации поглощение света при 532 нм достигает максимума.

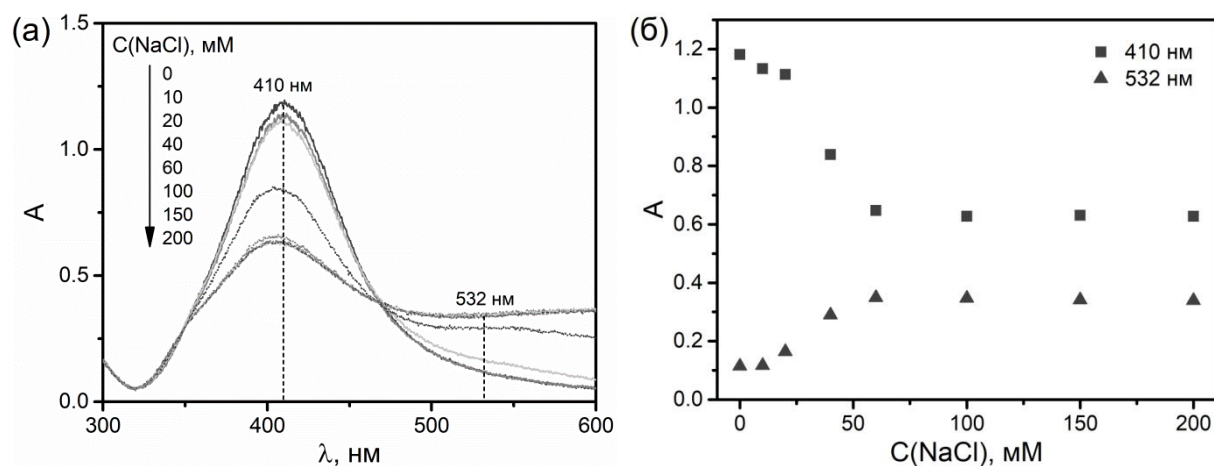


Рис. 5.14. Влияние концентрации NaCl на (а) спектры поглощения СНЧ@ β -ЦД и (б) оптическую плотность СНЧ@ β -ЦД при фиксированных длинах волн. Длина волны 410 нм соответствует положению основного пика ППР СНЧ@ β -ЦД. Длина волны 532 нм соответствует длине волны лазера, используемого для возбуждения ГКР-сигнала.

Наконец, дальнейшее увеличение концентрации NaCl выше 60 мМ во всех изученных случаях приводит к снижению интенсивности ГКР-сигнала (рис. 5.13), что мы связываем с ослаблением взаимодействия между аналитом и полостью ЦД. Так, ранее сообщалось о негативном влиянии хлоридов щелочных металлов (NaCl и KCl) на стабильность комплексов включения между ЦД и молекулярными красителями [207,208].

5.4. Методики ГКР-определения лекарственных веществ в биожидкостях человека

5.4.1. Определение метотрексата и цефалоспориновых антибиотиков в моче

Пробоподготовка

Благодаря положительному эффекту ЦД на селективность (снижение фонового сигнала) и чувствительность (увеличение сигнала ЛВ) ГКР-анализа, открывается возможность использовать максимально простые варианты пробоподготовки. Так, использование простого разбавления образцов мочи, содержащих ЛВ, оказалось достаточным для уменьшения влияния эндогенных компонентов БЖЧ на взаимодействие ЛВ с СНЧ@ β -ЦД и улучшения точности ЦД-ГКР-определения МТК и ЦСА. Для разбавления использовали дистиллированную воду, поскольку на примере МТК, ЦИПРО и ЦТР в растворе NaCl в предыдущем разделе было показано, что ионная сила раствора сильно влияет на интенсивность сигнала ЛВ (рис. 5.13).

Изучение влияния разбавления на ГКР-сигнал мочи с добавлением МТК показало, что при увеличении степени разбавления до 750 раз происходит увеличение сигнала аналита и монотонное уменьшение интенсивности фонового сигнала (рис. 5.15). Однако дальнейшее разбавление (≥ 1000 раз) логически приводит к снижению и фонового сигнала, и сигнала МТК из-за слишком сильного уменьшения концентрации аналита. Несмотря на заметное снижение фонового сигнала после разбавления, наиболее интенсивный пик МТК (1364 см^{-1}) в наибольшей степени перекрывается с ГКР-пиками эндогенных компонентов мочи. Поэтому в дальнейшем в методике ГКР-определения МТК в моче использовали 1000-кратное разбавление образцов мочи и ГКР-пик МТК при 1598 см^{-1} . Сравнение с контрольными СНЧ на данном этапе не проводили, поскольку они не продуцируют интенсивный сигнал МТК в нейтральной среде даже после добавления активирующего агента (рис. 5.13а).

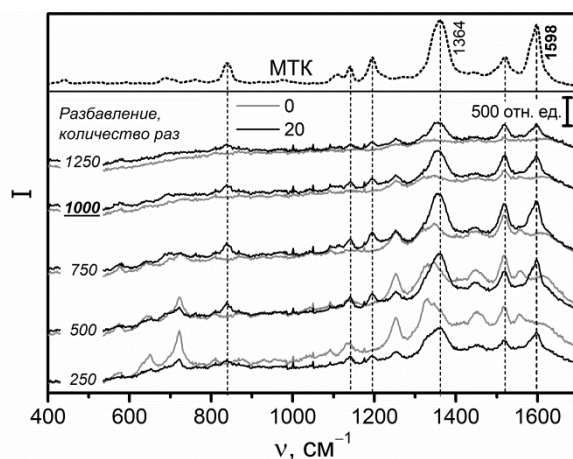


Рис. 5.15. Зависимость ГКР-спектров образцов УМ без (0) и с (20) добавлением МТК (20 мкг/мл) от степени разбавления образца. Спектры получены с использованием СНЧ@β-ЦД. ГКР-спектр раствора чистого МТК добавлен в качестве контроля.

Аналогично проведена оптимизация степени разбавления образцов мочи, содержащих молекулы ЦСА, и оптимальные значения составили 400, 300 и 200 раз в случае ЦЗЛ, ЦТР и ЦПР, соответственно. Помимо снижения фонового сигнала данные разбавления позволили снизить и интенсивность сигнала ЛВ, которая оказалась слишком высокой для диапазона концентраций, нужного для решения практических задач в ТЛМ. Таким образом, применение разбавления позволило получить градуировочные зависимости с линейными зависимостями интенсивности ГКР-сигнала от концентрации аналитов без выхода интенсивности на насыщение. Наконец, в отличие трёх ЦСА, указанных выше, применение СНЧ@β-ЦД в нейтральной среде с добавлением NaCl (60 мМ) не позволило улучшить ГКР-спектры других изучаемых ЦСА (ЦРК и ЦТК). Дело в том, что профили ГКР-спектров ЦРК и ЦТК, полученные с использованием как контрольных СНЧ, так и СНЧ@β-ЦД имеют спектры с очень широкими, сильно перекрывающимися пиками, которые сложно использовать для анализа.

Методики определения

Оптимизированные методики ЦД-ГКР-определения МТК и ЦСА (не одновременного) включают:

- (1) разбавление образцов мочи (в 1000 раз в случае МТК; в 400, 300, 200 раз в случае ЦЗЛ, ЦТР и ЦПР, соответственно);

- (2) смешивание разбавленных образцов мочи (120 мкл) с СНЧ@β-ЦД (40 мкл) и активирующим агентом (10 мкл, NaCl, 1 M);
- (3) проведение ГКР-измерений и анализ результатов.

На один цикл анализа мочи требуется до 10 мин.

Полученные графики градуировочных зависимостей для определения данных ЛВ в моче представлены на рисунке 5.16, а метрологические характеристики методик ЦД-ГКР-определения представлены в таблице 5.3.

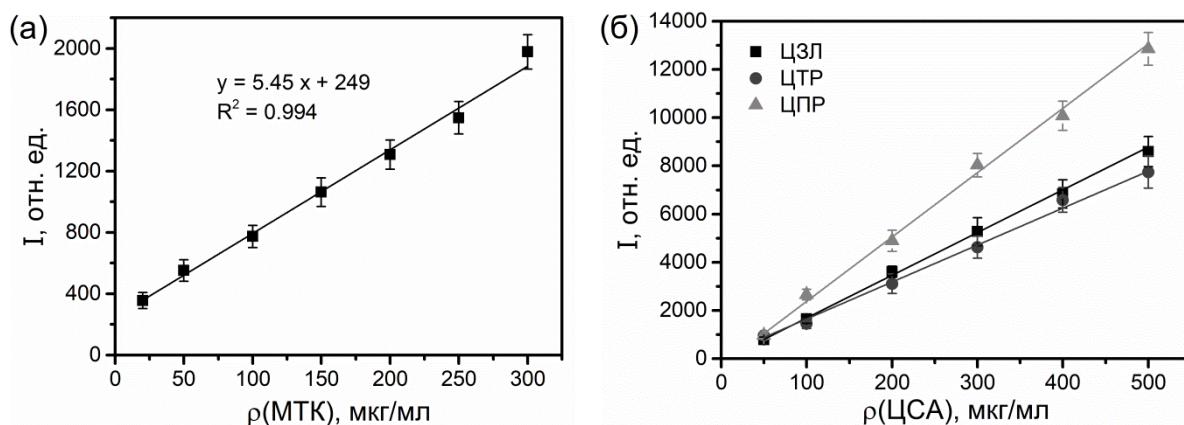


Рис. 5.16. Градуировочные зависимости для определения в моче (а) МТК и (б) ЦСА, полученные с использованием оптимизированных ЦД-ГКР-методик анализа. Графики построены с использованием ГКР-пигов при 1598, 1402, 1358 и 1281 см⁻¹ в случае МТК, ЦЗЛ, ЦТР и ЦПР, соответственно.

Табл. 5.3. Метрологические характеристики ЦД-ГКР-методики, предложенной для определения МТК и ЦСА в моче.

Аналит	Число образцов мочи	Диапазон концентраций, мкг/мл	Уравнение градуировочной зависимости	s _r , %	Прав., %	c _{min} , мкг/мл	c _{lim} , мкг/мл
МТК	6	20–300	y = 5.45 x + 249 R ² = 0.994	6–15	95–111	0.3	107
ЦЗЛ			y = 17.3 x – 6.55 R ² = 0.998	7–12	96–104	11	36
ЦТР	5	50–500	y = 15.7 x + 25.4 R ² = 0.996	8–13	92–110	13	46
ЦПР			y = 26.1 x – 156 R ² = 0.995	6–14	91–108	13	28

5.4.2. Определение фторхинолоновых антибиотиков в моче и плазме крови

Пробоподготовка: разбавление образца

При детектировании ФХА в моче с использованием контрольных СНЧ установлено, что образцы мочи и без, и с добавкой ФХА генерируют интенсивные и практически идентичные ГКР-спектры, независимо от используемой степени разбавления (пример для ЦИПРО на рис. 5.17а), что свидетельствует о полном подавлении сигнала аналита сигналом мешающих компонентов. При использовании СНЧ@ β -ЦД вместе с разбавлением образцов мочи удалось достигнуть снижения фонового сигнала и появления пиков аналитов. Однако интенсивность ГКР-спектров ФХА настолько низкая, что отношение «сигнал/шум» совершенно недостаточно для проведения точного количественного определения ФХА в реальных образцах мочи.

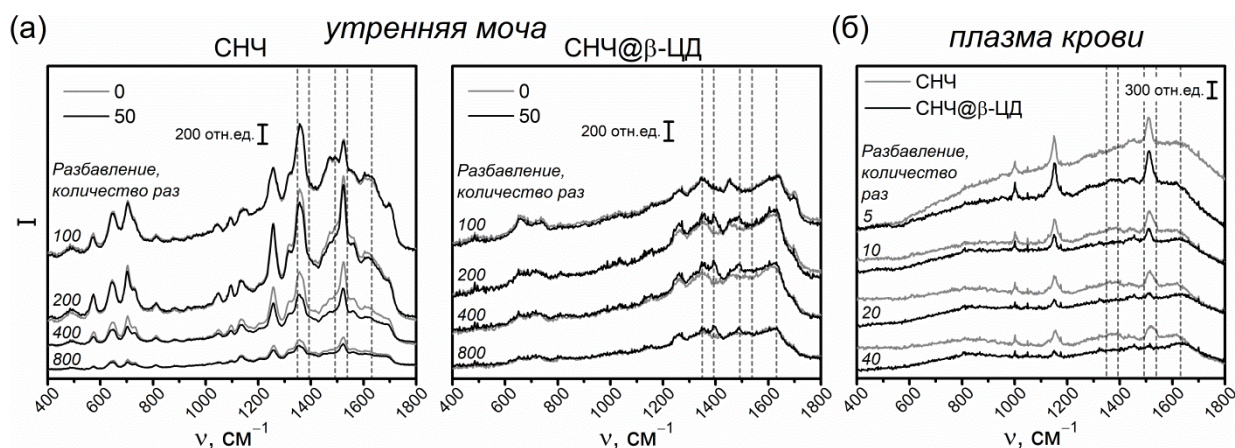


Рис. 5.17. (а) Влияние разбавления мочи и модификации СНЧ молекулами β -ЦД на ГКР-спектры УМ без (0) и с (50) добавлением ЦИПРО (50 мкг/мл). (б) Влияние разбавления плазмы крови и модификации СНЧ β -ЦД на ГКР-спектры плазмы крови без (0) и с (5) добавлением ЦИПРО (5 мкг/мл). Пунктирные линии указывают положение наиболее интенсивных ГКР-пикув ЦИПРО в нейтральной среде (рис. 2.8в).

Для выявления компонентов мочи, оказывающих наибольшее влияние на интенсивность сигнала ФХА, дополнительно проведён ГКР-анализ смеси ЦИПРО (50 мкг/мл) с основными низкомолекулярными органическими компонентами БЖЧ. В качестве компонентов выбраны те, которые способны

к формированию фонового КР- и ГКР-сигнала в нейтральной среде (при физиологических уровнях концентраций): мочевины (50 мг/мл), КРН (2 мг/мл), МК (1 мг/мл). Перед ГКР-измерениями смеси разбавляли в 100 раз, чтобы избежать выхода интенсивности сигнала аналита на насыщение. ГКР-спектры, идентичные спектрам раствора чистого ЦИПРО, наблюдали для смесей ЦИПРО с мочевиной и КРН и в случае контрольных СНЧ, и в случае СНЧ@ β -ЦД, что указывает на отсутствие конкурентных взаимодействий за ГКР-активные участки между этими метаболитами и молекулами аналита. С другой стороны, добавление МК приводит к значительным изменениям в спектре ЦИПРО, что означает наличие сильного взаимодействия молекул МК с ГКР-активными участками, сопоставимого с таковым для молекул аналита (рис. 5.18). При этом в случае контрольных СНЧ конкурентные взаимодействия выражены гораздо сильнее, чем в случае СНЧ@ β -ЦД, что приводит к полному преобладанию сигнала МК над сигналом ЦИПРО.

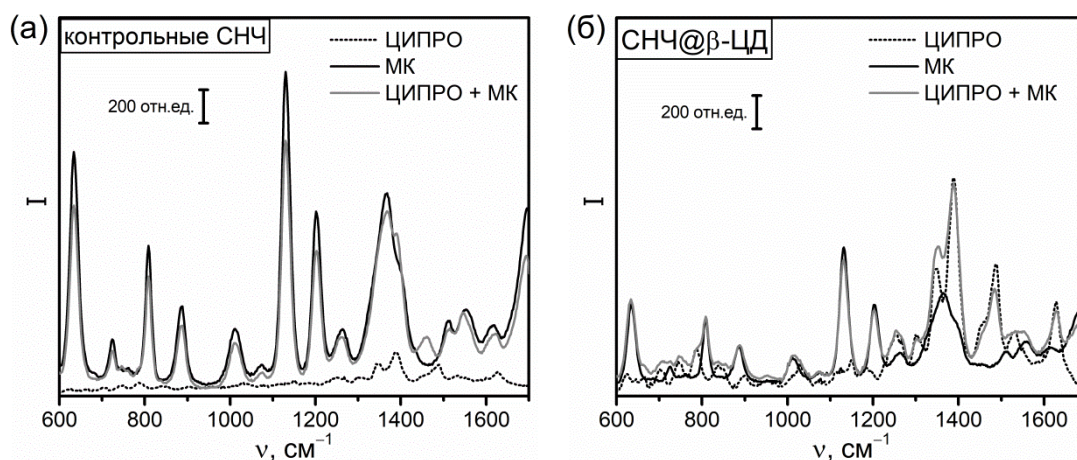


Рис. 5.18. Влияние присутствия МК (10 мкг/мл) на ГКР-спектры ЦИПРО (0.5 мкг/мл), полученные с использованием контрольных СНЧ (а) и СНЧ, модифицированных β -ЦД (б).

В случае плазмы крови использование как СНЧ@ β -ЦД, так и контрольных СНЧ не позволяет регистрировать ГКР-спектры, содержащие пики ФХА, в том числе при использовании разбавления образца; пример для плазмы с добавлением ЦИПРО представлен на рис. 5.17б. Более того, наблюдаемые спектры соответствуют спектрам резонансного КР (не ГКР!) каротиноидов (β -каротин, ликопин и лютеин), которые генерируют интенсивный сигнал при использовании длин волн возбуждения сине-

зеленого диапазона (400–530 нм) [74]. Отсутствие ГКР-сигнала молекул аналита и низкомолекулярных компонентов плазмы мы связываем с сильной адсорбцией белков плазмы крови на поверхности ГКР-подложки, что приводит к снижению или полной блокировке взаимодействия между ГКР-активными центрами и другими молекулами.

Пробоподготовка: осаждение мешающих компонентов

Таким образом, представленные результаты наглядно показывают, что ГКР- и ЦД-ГКР-определение ФХА в моче и плазме крови очень чувствительны к присутствию некоторых компонентов БЖЧ. Более того, ранее описанные в диссертации методики анализа на основе НТФЭ, ЖЖЭ, маскирования, а также применения ГКР-активных сорбентов не позволили провести детектирование ФХА в моче. Таким образом, адсорбция именно ФХА на ГКР-подложке в наибольшей степени подвержена влиянию конкурентных взаимодействий в присутствии компонентов БЖЧ. Это приводит к необходимости использования дополнительных этапов пробоподготовки исследуемых БЖЧ для увеличения отношения «сигнал/шум». Поэтому методика ЦД-ГКР-определения ФХА была дополнена простым этапом пробоподготовки образцов, позволяющим осаждать и удалять некоторые мешающие компоненты БЖЧ (преимущественно МК и белки).

Разработанный этап включает в себя добавление смешиваемого с водой органического растворителя к образцу БЖЧ, содержащему аналит, с последующим встряхиванием (10 с) и центрифугированием смеси (4400×g, 3 мин). Затем в случае образцов мочи порцию надосадочной жидкости (50 мкл) переносят в новую пробирку и разбавляют водой до объёма 2 мл. В случае образцов плазмы крови порцию надосадочной жидкости (400 мкл) переносят в новую пробирку и выпаривают растворитель при 70°C в течение 1 ч, а затем остаток растворяют в 400 мкл воды. Далее подготовленные таким образом образцы БЖЧ использовали для ГКР-измерений.

Тестирование различных растворителей показало, что обработка образцов мочи ацетонитрилом (АЦН) позволяет получить наиболее интенсивный сигнал ФХА (рис. 5.19а). Как показано выше (рис. 5.18), МК является наиболее важным мешающим компонентом при ГКР- и ЦД-ГКР-определении ФХА в моче. Контрольные эксперименты по обработке раствора чистой МК различными растворителями (по процедуре пробоподготовки мочи, описанной выше) показали, что добавление АЦН приводит к осаждению ~60% МК, в то время как остальные растворители не влияют на концентрацию МК (рис. 5.19б). Это доказывает, что положительное действие АЦН обусловлено осаждением МК, что, как следствие, приводит к снижению интенсивности фонового и увеличению интенсивности полезного аналитического ГКР-сигнала образцов мочи, содержащих ФХА.

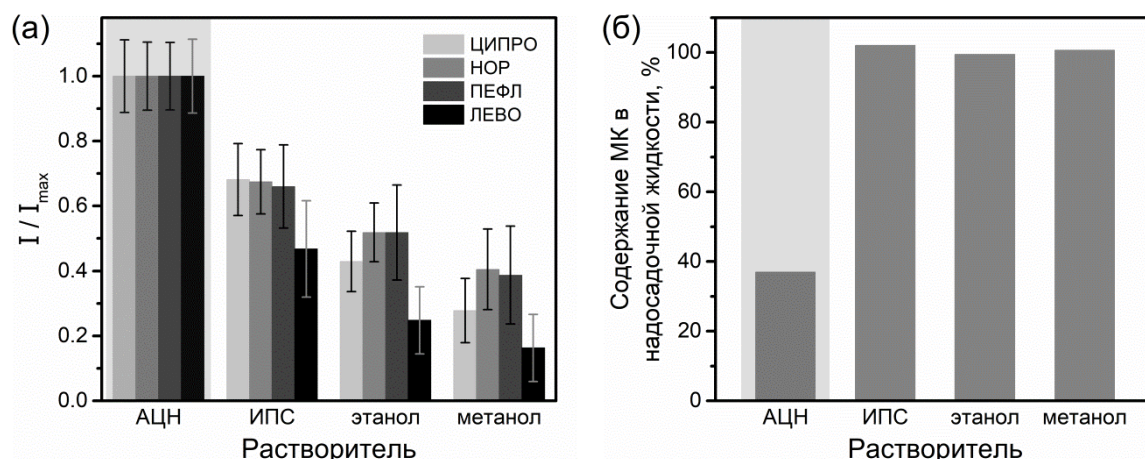


Рис. 5.19. (а) Влияние различных растворителей, использованных при пробоподготовке образцов УМ с добавкой различных ФХА, на интенсивность ГКР-сигнала ФХА. **(б)** Остаточное содержание МК после пробоподготовки его раствора (1 мг/мл) с использованием различных растворителей (рассчитано по результатам спектрофотометрии). Для экспериментов в обоих рисунках объёмное отношение «моча(МК)/растворитель» составляло 1:9.

Установлено, что оптимальное объёмное отношение между БЖЧ и АЦН составило 1:9 как для мочи, так и для плазмы крови, что соответствует максимальной интенсивности сигнала ФХА с минимальным значением s_T (рис. 5.20). Важно, что в случае плазмы крови использование АЦН также

позволяет осаждать молекулы белков. Способность удалять белки также объясняет уменьшение сигнала аналита при увеличении объёмного отношения «плазма крови/АЦН» более 1:9 при пробоподготовке (рис. 5.20б): происходит частичное соосаждением молекул аналита, связанных с удаляемыми белками.

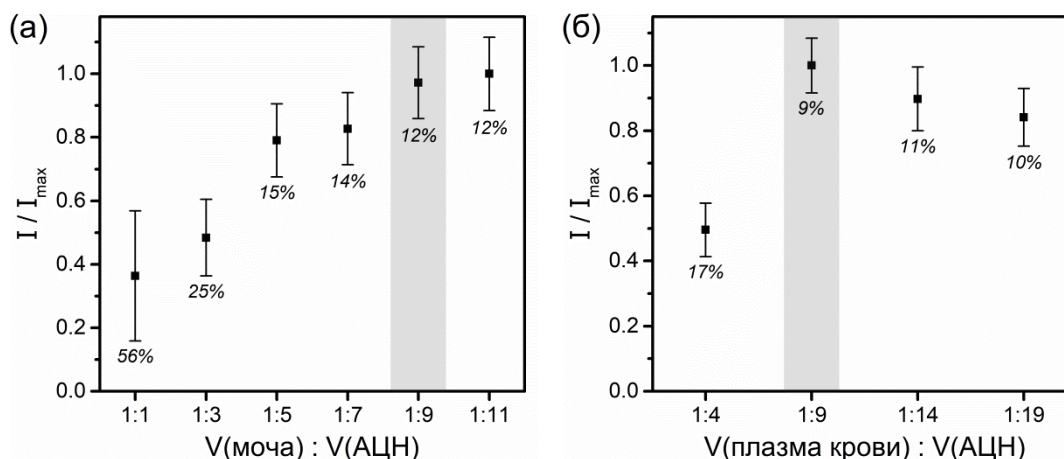


Рис. 5.20. Влияние объёмного отношения «моча/АЦН» (а) и «плазма крови/АЦН» (б) на интенсивность ГКР-сигнала ЦИПРО (по пику при 1393 см^{-1}). Использовали концентрации ЦИПРО в моче и плазме крови равные 50 и 5 мкг/мл, соответственно.

Тем не менее, одной только обработки с помощью АЦН недостаточно для обеспечения максимального сигнала ФХА и минимизации влияния молекул растворителя и оставшихся метаболитов. Поэтому использовали сочетание обработки с помощью АЦН и разбавления водой обработанного образца мочи (рис. 5.21). Установлено, что разбавление обработанных с помощью АЦН образцов мочи в 40 раз уменьшает разницу в аналитическом сигнале между образцами УМ и ДМ, поскольку их спектры имеют примерно одинаковую интенсивность при таком разбавлении (пример для ЦИПРО приведен на рис. 5.21). Это связано со снижением разницы в абсолютном содержании мешающих компонентов, ионной силе и собственной буферной ёмкости образцов мочи, собранных в разное время.

Однако в случае плазмы крови концентрации ФХА более чем на порядок ниже по сравнению с таковыми в моче (согласно фармакокинетическим исследованиям [68]) и чувствительности ГКР не хватает для детектирования аналитов при больших разбавлениях образцов. Поэтому в случае плазмы

крови после её обработки с помощью АЦН дополнительно следует выпаривать растворитель из смеси плазма-АЦН и перерастворять остаток в том же объёме воды. Таким образом, суммарные разбавления мочи и плазмы крови после пробоподготовки (с учётом смешивания с АЦН и разбавления чистой водой), составили 400 и 10 раз, соответственно. Важно отметить, что большая степень разбавления смеси моча-АЦН и испарение АЦН из смеси плазма-АЦН необходимы также для того, чтобы избежать появления фонового КР-сигнала АЦН.

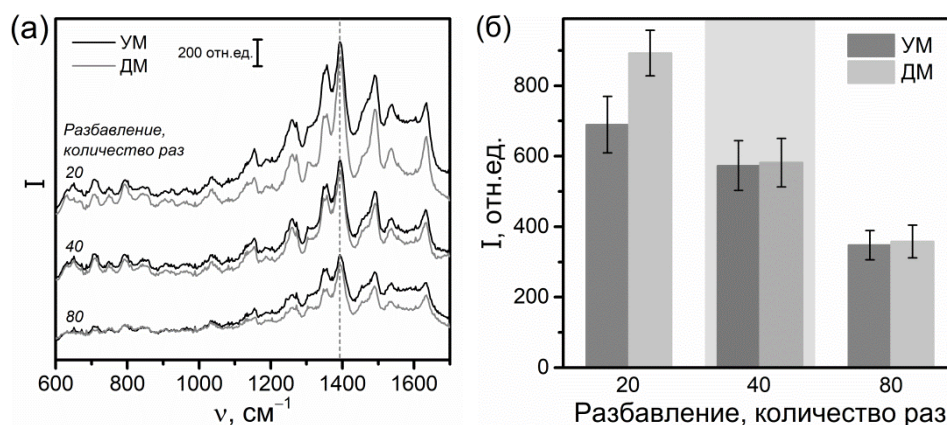


Рис. 5.21. Влияние разбавления смеси моча-АЦН (1:9 по объёму) на ГКР-спектры образцов УМ и ДМ с добавкой ЦИПРО (50 мкг/мл) и обработанных АЦН (а), а также на интенсивность ГКР-пика ЦИПРО при 1393 см^{-1} (б).

ГКР-измерения БЖЧ после разработанного этапа пробоподготовки показали, что в случае контрольных СНЧ сохраняется значительный фоновый сигнал для образцов мочи и отсутствует сигнал аналита для образцов плазмы крови (рис. 5.22). Таким образом, использование ЦД для модификации ГКР-подложки является ключевым фактором для повышения селективности анализа за счёт улучшения взаимодействия подложки с молекулами ФХА (рис. 5.9б) и уменьшения взаимодействия с эндогенными компонентами БЖЧ (в первую очередь с пуриновыми основаниями, рис. 5.18), а разработанный этап пробоподготовки образцов позволяет значительно улучшить отношение «сигнал/шум» (рис. 5.22).

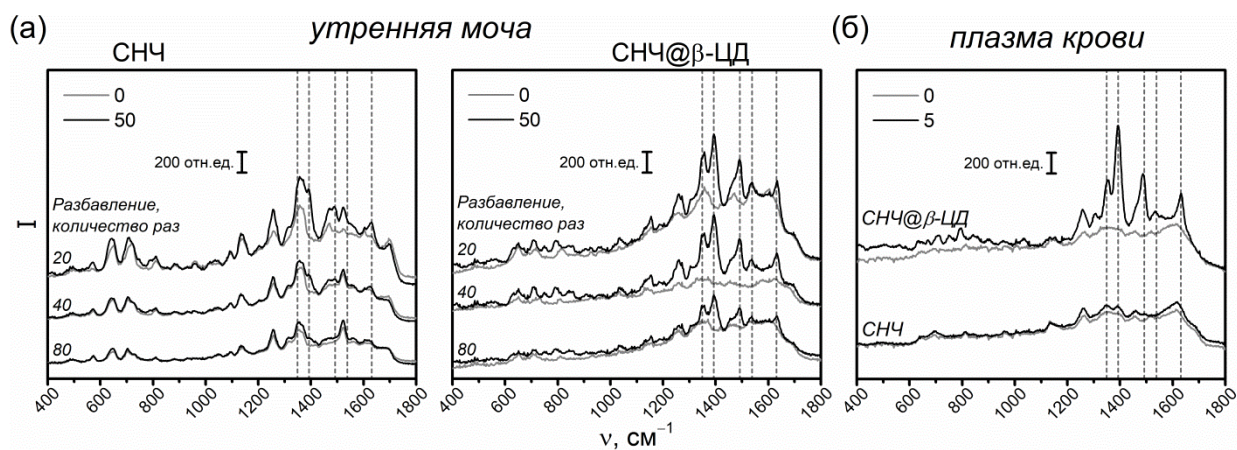


Рис. 5.22. (а) Влияние разбавления смеси моча-АЦН и модификации СНЧ молекулами β-ЦД на ГКР-спектры УМ без (0) и с (50) добавлением ЦИПРО (50 мкг/мл) и обработанной АЦН. **(б)** Влияние модификации СНЧ молекулам β-ЦД на ГКР-спектры плазмы крови без (0) и с (5) добавлением ЦИПРО (5 мкг/мл) и обработанной АЦН; общее разбавление плазмы составило 10 раз. Пунктирные линии указывают положение наиболее интенсивных ГКР-пигов ЦИПРО в нейтральной среде (рис. 2.8в).

Методика определения

Оптимизированная методика ЦД-ГКР-определения ФХА включает:

- (1) осаждение компонентов БЖЧ путём добавления АЦН и взятия порции надосадочной жидкости;
- (2) разбавление этой порции водой в случае образцов мочи или испарение растворителя из этой порции и перерастворение остатка в воде в случае образцов плазмы крови;
- (3) смешивание подготовленных образцов БЖЧ с СНЧ@β-ЦД и активирующим агентом (NaCl);
- (4) проведение ГКР-измерений и анализ результатов.

Один цикл анализа мочи занимает не более 15 мин; анализ образцов плазмы крови требует дополнительного времени на испарение растворителя (~1 ч).

Полученные градуировочные зависимости для определения ФХА в моче и плазме представлены на рис. 5.23. Примечательно, что градуировочные зависимости для ЦИПРО и НОР в моче почти идентичны (рис. 5.23а). Поскольку у данных аналитов структурное сходство наблюдается не только

во фторхинолоновом, но пиперазиновом фрагментах (рис. 5.23в), то сходство градуировочных зависимостей свидетельствует о ключевой роли именно пиперазинового фрагмента в адсорбции ФХА на поверхности ЦД-ГКР-подложки. Исходя из этой логики, можно предположить, что падение интенсивности ГКР-сигнала в случае ПЕФЛ и ЛЕВО связано со стерическими ограничениями при образовании комплекса с ЦД из-за добавления метильной группы к пиперазиновому фрагменту (рис. 5.23в). При этом адсорбция ЛЕВО несколько хуже, чем ПЕФЛ (меньше угол наклона градуировочной зависимости), что мы связываем с дополнительным стерическим ограничением, возникающим при взаимодействии с ЦД, из-за дополнительного атома кислорода в его структуре.

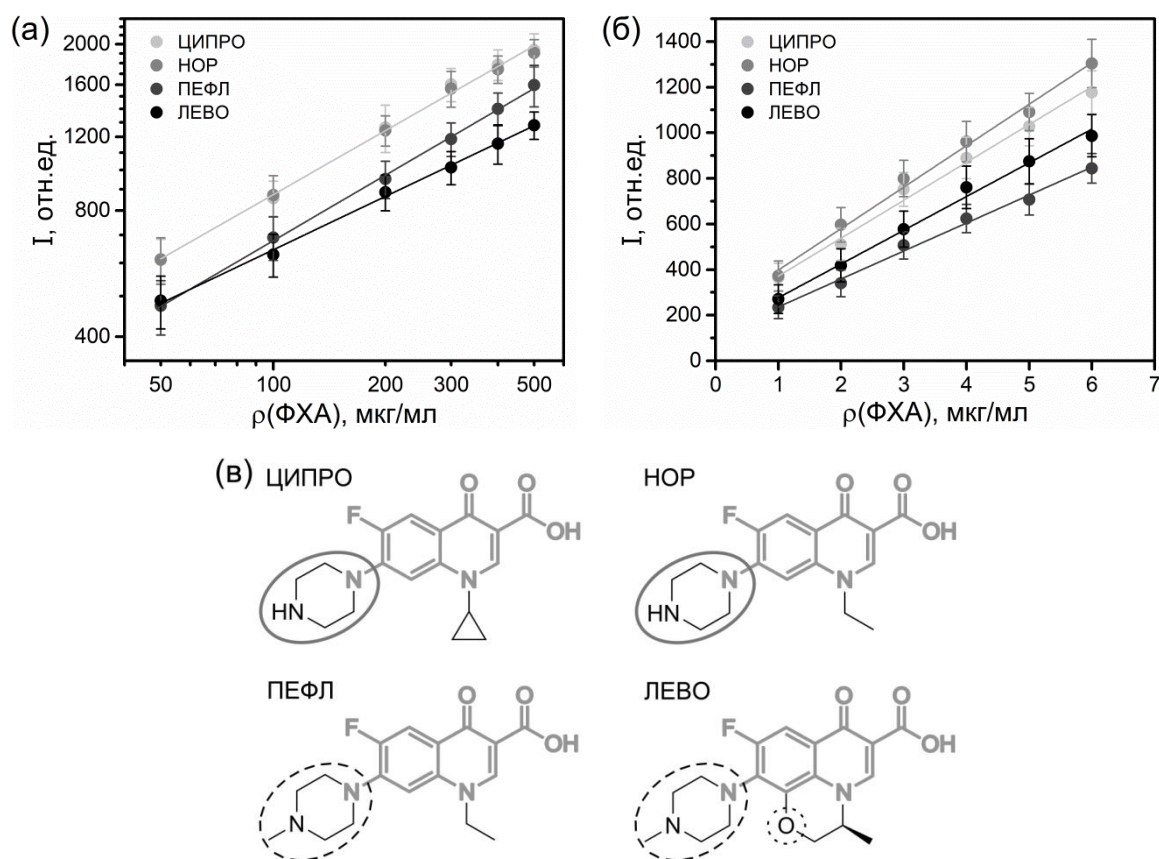


Рис. 5.23. (а,б) Градуировочные зависимости для определения ФХА в образцах мочи (а) и плазмы крови (б), полученные с использованием оптимизированной ЦД-ГКР-методики. Графики получены с использованием наиболее интенсивных ГКР-пигов ФХА (рис. 2.8в). (в) Структурные формулы молекул ФХА с указанием дополнительных структурно-схожих фрагментов.

Однако градуировочные зависимости для определения этих же аналитов в плазме крови уже не подчиняются логике, предложенной для образцов мочи (рис. 5.23б). Данное рассогласование мы связываем с разной степенью связывания ФХА с осаждаемыми белками плазмы крови, что приводит к разной степени потерям аналитов при проведении пробоподготовки образцов [209].

Метрологические характеристики методики анализа представлены в таблице 5.4. Они демонстрируют, что ЦД-ГКР-анализ пригоден для определения ФХА в реальных образцах как мочи, так и плазмы крови. Однако значения s_r и правильность определения в случае плазмы крови несколько хуже по сравнению с таковыми для мочи, что, предположительно, связано с потерями аналита из-за соосаждения молекул ФХА вместе с белками плазмы, а также погрешностями от шага испарения растворителя.

Табл. 5.4. Метрологические характеристики ЦД-ГКР-методики, предложенной для определения ФХА в БЖЧ.

Аналит	Диапазон концентраций, мкг/мл	Уравнение градуировочной зависимости	s_r , %	Прав., %	C_{min} , мкг/мл	C_{lim} , мкг/мл
<i>Моча (10 образцов)</i>						
ЦИПРО	50–500	$\lg y = 0.509 \lg x + 1.923$ $R^2 = 0.997$	8–13	97–105	2.9	31
НОР			7–13	96–103	3.3	35
ПЕФЛ		$\lg y = 0.521 \lg x + 1.789$ $R^2 = 0.998$	9–15	97–102	5.8	59
ЛЕВО		$\lg y = 0.424 \lg x + 1.960$ $R^2 = 0.997$	8–14	97–103	3.0	51
<i>Плазма крови (3 образца)</i>						
ЦИПРО	1–6	$y = 166.1 x + 205.3$ $R^2 = 0.991$	8–17	91–109	0.05	2.0
НОР		$y = 181.9 x + 215.6$ $R^2 = 0.993$	8–17	93–111	0.05	1.3
ПЕФЛ		$y = 122.6 x + 113.5$ $R^2 = 0.994$	8–21	93–108	0.17	2.7
ЛЕВО		$y = 147.9 x + 128.5$ $R^2 = 0.995$	9–23	93–104	0.34	2.3

Таким образом, разработанная ЦД-ГКР-методика для определения ФХА является более универсальной, поскольку подходит для ГКР-определения различных ФХА как в моче, так и в плазме крови при ТЛМ.

5.4.3. Определение лекарственных веществ в образцах мочи с избытком эндогенных компонентов

Поскольку проведение антибактериальной терапии подразумевает, что организм пациента находится в различной степени нарушения нормальной жизнедеятельности, то и содержание компонентов БЖЧ может выходить за рамки нормы. Логично, что выход за пределы нормы в сторону повышения содержания компонентов более значимый, чем в сторону понижения содержания. Для оценки влияния такого повышения на точность ГКР-анализа провели дополнительное исследование работоспособности разработанных методик ГКР-определения ФХА, ЦСА и МТК в более сложных условиях. Для этого использовали образцы мочи с двухкратно завышенным содержанием некоторых основных метаболитов (по отношению к их физиологическому содержанию в моче).

Образцы для исследования индивидуального влияния компонентов на аналитический ГКР-сигнал готовили путём добавления к порции УМ (1 мл), содержащей ЛВ в минимальной концентрации для ТЛМ, навески мочевины (50 мг), КРН (2 мг), МК (1 мг), бычьего сывороточного альбумина (БСА, 3 мг), глюкозы (5 мг) или неорганических солей (подраздел 3.1.1). Добавление к образцу УМ сразу всех перечисленных компонентов использовали для оценки их коллективного влияния.

Анализ полученных результатов показал, что только в случае ФХА избыток МК, неорганических солей и смеси всех компонентов оказывает влияние на интенсивность сигнала аналитов (изменение интенсивности на 7–16%, рис. 5.24). Важно отметить, что влияние этих компонентов на сигнал ЛВ можно достаточно легко учесть при интерпретации результатов анализа, проведя оценку их содержания с использованием стандартных методик.

Наблюдаемые эффекты и выводы могут быть применимы и к плазме крови, т.к. она также содержит изученные компоненты БЖЧ.

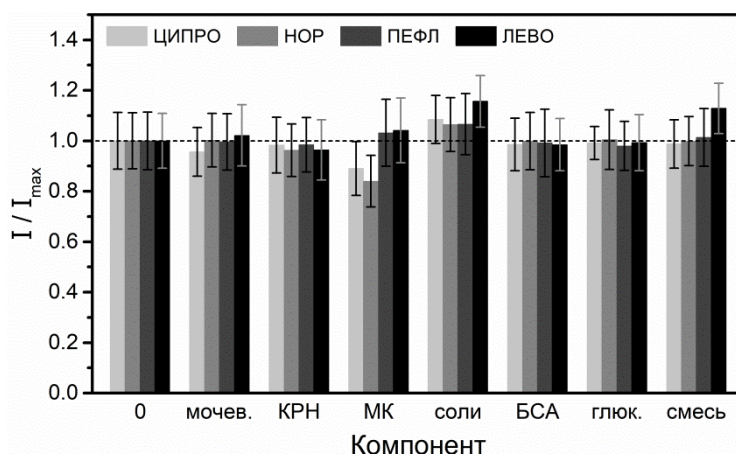


Рис. 5.24. Влияние двукратного искусственного избытка некоторых компонентов мочи (относительно физиологически нормальных концентраций) на интенсивность ГКР-сигнала ФХА (50 мкг/мл) в образце УМ с добавкой ФХА и после пробоподготовки. В качестве контрольного образца использовали мочу без добавок (0). Для построения гистограммы использовали наиболее интенсивные пики ФХА (рис. 2.8в).

Аналогичное исследование влияния избытка компонентов мочи на интенсивность ГКР-сигнала МТК и ЦСА показало, что только избыток МК приводит к снижению сигнала ЛВ. Однако наблюдаемое снижение ещё менее значительно, чем в случае ФХА и составило 5 и 5–8% для МТК и ЦСА, соответственно.

Таким образом, разработанные методики ЦД-ГКР-определения ЛВ обладают приемлемой точностью даже в случае образцов мочи с концентрациями эндогенных компонентов, превышающими нормальные значения, которые могут возникать, например, при некоторых заболеваниях (сахарный диабет, почечная недостаточность) или особых условиях окружающей среды (например, высокая температура).

* * *

Проведённые физико-химические исследования по изучению условий синтеза СНЧ@ЦД показали, что на усиливающие свойства ЦД-ГКР-подложки существенно влияют концентрация ЦД и время синтеза, в то время

как структура ЦД очень слабо влияет на морфологию, плазмонные и усиливающие свойства. Также показано, что сам синтез имеет хорошую воспроизводимость, а полученные образцы сохраняют коллоидную стабильность и усиливающие свойства не менее 1.5 месяцев.

Установлено, что модифицирование ГКР-подложек молекулами ЦД усиливает взаимодействие подложки с электронейтральными слабополярными частями молекул аналитов (или целыми молекулами) и ингибирует взаимодействие с полярными заряженными молекулами мешающих компонентов. Этот эффект уменьшает конкуренцию за ГКР-активные центры, что позволило впервые разработать ЦД-ГКР-методики определения ЛВ (САА, ЦСА, МТК) в БЖЧ с использованием упрощенных вариантов их пробоподготовки (только разбавление и осаждение мешающих компонентов БЖЧ растворителем).

Проведённая проверка разработанных ЦД-ГКР-методик анализа с использованием образцов мочи с искусственно завышенной концентрацией её некоторых эндогенных компонентов показала незначительное снижение сигнала ЛВ и пригодность применения данных методик для образцов БЖЧ пациентов, у которых в силу некоторых заболеваний могут повышаться концентрации компонентов БЖЧ.

Представленные в главе результаты опубликованы в работах [166,189,210].

ГЛАВА 6. ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ И ВАРИАНТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В АНАЛИЗЕ МЕДНЫХ ГКР-ПОДЛОЖЕК

6.1. Общие сведения о ГКР-подложках на основе меди

Как правило, в качестве ГКР-подложек используются металлические наноструктуры на основе золота и серебра, усиливающие КР-сигнал адсорбированных на них молекул за счёт специфических плазмонных свойств [33,211]. Однако стоимость благородных металлов и их соединений, а также правовые условия, регулирующие их покупку/продажу, использование и утилизацию, могут существенно препятствовать широкому распространению ГКР-анализа. Как следствие, разработка новых ГКР-подложек направлена, среди прочего, на выявление альтернатив серебряным и золотым ГКР-подложкам. В настоящее время можно выделить два направления разработки ГКР-подложек, не содержащих благородных металлов: (1) применение полупроводниковых соединений металлов [212] и (2) применение медных наноструктур [213].

Первое направление довольно сомнительно, поскольку не позволяет достичь приемлемых усиливающих свойств ГКР-подложек (КУ обычно до 10^2 – 10^3). С другой стороны, медь имеет действительно большой потенциал в качестве альтернативного материала ГКР-подложек. Во-первых, медные ГКР-подложки обладают значительным КУ ($\sim 10^5$ – 10^7), сопоставимым с таковым для серебряных и золотых подложек. Во-вторых, содержание меди в земной коре на 3 порядка превышает содержание серебра и на 4 порядка – содержание золота. В конечном итоге это приводит к гораздо более низкой цене металлической меди и доступности её соединений. Наконец, наноструктуры меди демонстрируют и другие интересные свойства, которые можно комбинировать с ГКР, например, обладают более выраженной каталитической активностью, что было использовано для мониторинга каталитических превращений, протекающих непосредственно на поверхности медных ГКР-подложек [214].

Однако число опубликованных работ, посвященных получению и применению медных ГКР-подложек, составляет примерно 1% от общего числа публикаций по ГКР. Публикационная история исследований, посвященных медным ГКР-подложкам, представлена на рис. 6.1. Статьи, опубликованные до 2000 г., в основном посвящены изучению различных физико-химических свойств медных ГКР-подложек и спектральных характеристик адсорбированных на них молекул. Рост числа публикаций, использующих медные ГКР-подложки, наблюдаемый с 2010 г., связан с (1) изготовлением новых подложек с повышенной химической стабильностью, например, в сочетании с двумерными наноструктурами, такими как графен, и (2) всё более острым запросом на поиск альтернатив благородным металлам. При этом примерно половина статей, опубликованных с 2010 г., посвящена именно аналитическим приложениям. Поэтому в данном разделе проведено краткое обобщение и критическое обсуждение имеющейся информации о медных ГКР-подложках и оценка их потенциала для применения в химическом анализе.

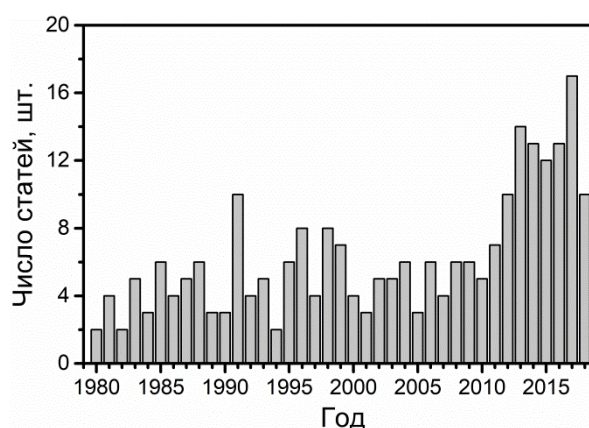


Рис. 6.1. Публикационная история исследований, проведённых с использованием медных ГКР-подложек, за период с 1980 по 2018 г.

Изготовление медных ГКР-подложек

Основные методы изготовления медных ГКР-подложек, их достоинства и недостатки перечислены в табл. 6.1. Если описанный в публикации процесс изготовления включал несколько этапов, например, ЭХ или вакуумное осаждение металлической плёнки с последующей полировкой, травлением

или отжигом, то в качестве основного выбирали тот метод, после которого подложка приобретала ГКР-активность. Популярность того или иного метода изготовления медных ГКР-подложек оценивали путём подсчёта его вклада в общее число опубликованных работ.

Исторически первые и наиболее распространённые подходы изготовления медных ГКР-подложек основаны на ЭХ процессах, таких как анодирование, потенциостатическое осаждение и циклическая обработка этапами окисления и восстановления. Данные подходы обладают такими преимуществами, как доступность реагентов и оборудования, а также высокая скорость процесса изготовления подложки. В то же время предложены и довольно экзотические альтернативы, например, метод микрогравировки металлической поверхности с получением высокопериодических плазмонных структур с хорошо воспроизводимыми свойствами.

Табл. 6.1. Методы изготовления медных ГКР-подложек и их основные достоинства и недостатки.

Метод изготовления	Достоинства	Недостатки	Ссылка
<i>ЭХ методы (53% работ)</i>			
Активация медной поверхности путём проведения циклов окисления-восстановления (ОВ)	– Простая методика изготовления с использованием доступных реагентов и оборудования	– Удельная площадь поверхности ниже, чем у коллоидных ГКР-подложек	[214–217]
Анодирование – окисление (травление) поверхности меди	– Высокий контроль процесса изготовления путём регулировки напряжения и/или тока электрической цепи	– Низкий контроль морфологии	[218–222]
Потенциостатическое осаждение – восстановление медного нанощероховатого покрытия	– Минимальный собственный фоновый ГКР-сигнал		[223–228]

Продолжение табл. 6.1.

Метод изготовления	Достоинства	Недостатки	Ссылка
<i>Методы «мокрой» химии (23% работ)</i>			
Синтез коллоидных МНЧ или наноструктурированных покрытий путём восстановления соединений меди в растворах	– Самая высокая удельная поверхность конечной ГКР-подложки – Возможность управления размером и формой МНЧ, т.е. их оптическими свойствами	– Конкурентные процессы на поверхности ГКР-подложки между молекулами стабилизатора и аналита, т.е. возможен интенсивный собственный фоновый ГКР-сигнал – Растворитель и стабилизатор могут влиять на реакционную способность и коррозию МНЧ	[229–231]
Травление (окисление) поверхности медных пластин азотной кислотой	– Быстрый (<10 мин) и простой процесс изготовления – Минимальный собственный фоновый ГКР-сигнал	– Очень активный и опасный реагент для травления – Низкий контроль морфологии	[232–234]
<i>Методы вакуумного изготовления (9% работ)</i>			
Напыление в вакууме ГКР-активных медных плёнок на твёрдую основу	– Высокий контроль структуры медной плёнки – Минимальный собственный фоновый ГКР-сигнал	– Требуется дорогое и сложное оборудование – Материал основы может влиять на структуру осаждаемой плёнки	[35,235]

Продолжение табл. 6.1.

Метод изготовления	Достоинства	Недостатки	Ссылка
<i>Другие методы (15% работ)</i>			
Механическая полировка оксидом алюминия и/или алмазным порошком	– Дешёвый и простой процесс изготовления	– Слабые усиливающие свойства подложки – Наименьший контроль над структурой поверхности по сравнению с другими методами изготовления	[218,236]
Восстановление твёрдых соединений меди с помощью H ₂ или СО	– Позволяет изготавливать твёрдые пористые композиты со встроенными МНЧ	– Требуются высокие температуры (>200°C) и инертная или восстанавливающая атмосфера	[237,238]
Отжиг тонких медных плёнок	– Минимальный собственный фоновый ГКР-сигнал	– Требует вакуумного напыления и инертной атмосферы при отжиге – Материал основы может влиять на структуру осаждаемой плёнки	[239,240]
Микрогравировка – процесс механического нанесения углублений на металлической поверхности с помощью специального наконечника	– Быстрое изготовление периодических структур при нормальной температуре и давлении – Минимальный собственный фоновый ГКР-сигнал – Высокий контроль геометрии и воспроизводимости ГКР-активной структуры	– Требует использования специального оборудования	[241]

Анализ опубликованных работ показал, что значение КУ медных ГКР-подложек имеет очень большой разброс: от 10^2 [242,243] до 10^7 [228,231,244]. Основным объяснением больших различий в КУ является применение медных ГКР-подложек с различной структурой, разные условия регистрации ГКР-спектров и использование разных аналитов. Следует отметить, что даже при использовании одной и той же ГКР-подложки применение различных подходов к расчёту КУ (например, использование концентраций аналитов вместо числа адсорбированных молекул) может приводить к изменению значения рассчитанного КУ на 1–2 порядка [244,245].

В случае ЭХ методов изготовления результаты анализа литературы также показали, что чистота меди не является критическим фактором для медных ГКР-подложек. Laufer с соавт. [246] сообщили об одинаковой ГКР-активности медных электродов, изготовленных из технической медной фольги со следовыми количествами хрома и из медной пластины с чистотой 99.99%. К таким же выводам пришли в другой работе, в которой сообщалось об ЭХ активированных сплавах меди (40–70% Cu) с цирконием [222] и другими металлами (Ti, Hf) [247,248]. Авторы объясняют данный факт тем, что в первую очередь происходит ЭХ травление участков поверхности металлов, которые более активны, чем медь, что приводит к обогащению поверхности медью и образованию ГКР-активных микродоменов из меди. В случае других методов изготовления ГКР-подложек данные о влиянии чистоты меди на усиление КР-сигнала отсутствуют.

Таким образом, выбор метода изготовления влияет на структуру медной ГКР-подложки, её морфологию, удельную площадь поверхности и собственный фоновый сигнал (например, от стабилизатора НЧ) и зависит от конечной аналитической цели. Например, вакуумное осаждение, несмотря на высокую стоимость оборудования, обеспечивает наиболее чистую поверхность подложки и рекомендуется для прецизионных фундаментальных исследований. С другой стороны, ЭХ подходы и методы «мокрой» химии больше подходят для рутинного использования в

химическом анализе благодаря высокой доступности и экономической эффективности.

Факторы, влияющие на усиливающие свойства медных ГКР-подложек

Возбуждающее излучение. КР-усиление сильно зависит от энергии фотонов возбуждающего света, поэтому правильный выбор длины волны лазера обеспечивает максимальный ГКР-сигнал и требуемый уровень чувствительности ГКР-анализа. Однако, поскольку оптические свойства металлов, используемых для изготовления ГКР-подложек, существенно различаются в видимой и БИК областях спектра, усиливающие свойства медных, серебряных и золотых ГКР-подложек некорректно сравнивать при использовании одного источника возбуждения. Тем не менее, в большинстве работ, посвященных медным ГКР-подложкам, должного внимания выбору корректной длины волны возбуждения не уделялось.

Например, ГКР-спектры, полученные с использованием медной ГКР-подложки, были впервые опубликованы в 1980 г. [214]. Авторы зарегистрировали ГКР-спектры пиридина, адсорбированного на медном электроде, а КУ подложки составил 10^5 – 10^6 . Однако ранее в 1975 г. Fleischmann с соавт. [249] также исследовали пиридин, адсорбированный на медном электроде, и не наблюдали значительного КР-усиления, что привело их к выводу о слабых усиливающих свойствах меди в целом. Разница в этих работах заключается в длине волны возбуждения, используемой для ГКР-измерений: Pettinger с соавт. использовали длину волны 647.1 нм, тогда как Fleischmann с соавт. использовали 514.5 нм, показавшую отличные результаты для серебряных электродов. К сожалению, аналогичные утверждения о слабых усиливающих свойствах медных ГКР-подложек часто встречаются по настоящий момент.

Определение оптимальной длины волны возбуждения осуществляется путём регистрации профиля возбуждения, т.е. зависимости интенсивности ГКР-сигнала или КУ от длины волны возбуждения (при одинаковой плотности мощности падающего света) (рис. 6.2). Оценку профилей

возбуждения проводили для разных медных ГКР-подложек. Так, при исследовании профиля возбуждения коллоидных МНЧ, стабилизированных цитратом, наблюдали экспоненциальный рост интенсивности ГКР-сигнала пиридина при увеличении длины волны возбуждения с 532 до 752.5 нм [229]. В другой работе авторы наблюдали увеличение КУ для электродов из анодированной меди с 10^3 до 10^5 при увеличении длины волны возбуждения в диапазоне 600–660 нм [218]. Chase и Parkinson [250] сравнили медные, серебряные и золотые шероховатые электроды и продемонстрировали увеличение КУ примерно в 4 раза для медных электродов при увеличении длины волны возбуждения с 632.8 до 1064 нм.

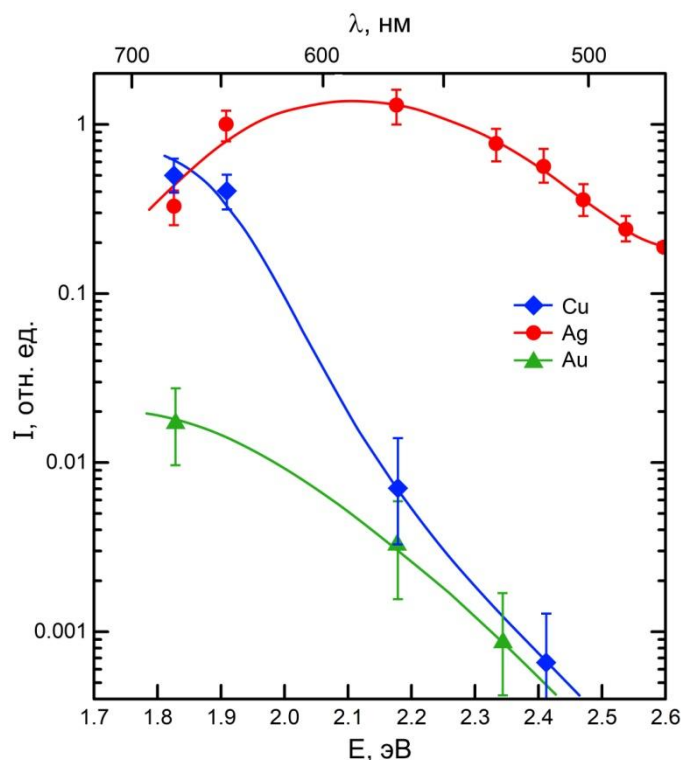


Рис. 6.2. Зависимости интенсивности ГКР-сигнала пиридина от длины волны возбуждающего излучения (профили возбуждения) для медных, серебряных и золотых пленок, полученных вакуумным напылением [35].

Определение профилей возбуждения пленок меди, серебра и золота, полученных вакуумным напылением, было выполнено Ladouceur с соавт. [235] и Rockrand [35]. Ladouceur с соавт. использовали длины волн возбуждения 450–750 нм и обнаружили максимальный ГКР-сигнал с использованием подложек на основе меди для длин волн света красного

диапазона (647.1, 676.5 и 752.5 нм). Кроме того, Rockrand наблюдал рост ГКР-сигнала в 10^3 раз с увеличением длины волны возбуждения от 500 до 700 нм (514, 568.2, 647.1 и 676 нм) (рис. 6.2). Также было показано, что эффективность КР-усиления медных ГКР-подложек в условиях резонанса сопоставима с усилением ГКР-подложек на основе серебра, и значительно лучше усиления ГКР-подложек на основе золота.

Все эксперименты по оценке профилей возбуждения проводили с использованием свежеприготовленных медных ГКР-подложек (т.е. не подвергшихся частичному окислению). Однако процессы окисления могут существенно влиять на усиливающие свойства подложек как минимум из-за изменения их оптических свойств. Например, Wang с соавт. [226] исследовали усиливающие свойства нанодендритов из чистой меди, частично окисленной меди и оксида меди (I) (Cu_2O) с использованием длин волн возбуждения 532 и 633 нм. Авторы установили, что частичное окисление увеличивает интенсивность ГКР-сигнала на более коротких длинах волн, т.е. применение структур медь– Cu_2O приводит к более интенсивному сигналу, чем чистая медь или Cu_2O при использовании длины волны возбуждения 532 нм. Данный результат авторы объяснили наличием слоя Cu_2O , который увеличивает вклад химического механизма в КР-усиление. Также Cu_2O – полупроводниковый материал с шириной запрещенной зоны 2.36 эВ (525 нм); таким образом, возбуждение 532 нм практически совпадает с шириной запрещенной зоны Cu_2O , что приводит к процессам переноса заряда и увеличению интенсивности ГКР-сигнала. При использовании длины волны возбуждения 633 нм результаты были противоположными, и максимальный сигнал был достигнут при использовании чистой металлической меди. Таким образом, эти результаты демонстрируют потенциальную применимость частично окисленных медных ГКР-подложек для анализа, если длина волны возбуждения соответствует ширине запрещенной зоны Cu_2O . Однако важно отметить, что при этом усиливающие свойства частично окисленных

подложек всё равно сильно уступают таковым для не окисленных (на один – два порядка).

Значение pH и температура. Температура и pH значительно влияют на эффективность анализа с использованием медных ГКР-подложек, поскольку они влияют на срок службы подложек и взаимодействие молекул аналита с поверхностью меди. Например, помимо (де)протонирования молекул аналита и изменения их взаимодействия с ГКР-активной поверхностью (детально рассмотрено в разделах 2.3–2.5), изменение pH может усилить коррозию медных ГКР-подложек. Так, несмотря на то, что медь напрямую не реагирует с неокисляющими кислотами, коррозия медных ГКР-подложек при низких значениях pH возможна в присутствии сторонних окислителей, например, медные наноструктуры могут довольно активно растворяться в HCl и H₂SO₄ в присутствии кислорода воздуха за счёт промежуточного образование CuO или Cu(OH)₂ [216]. С другой стороны, кислая среда позволяет очищать поверхность медной ГКР-подложки от оксидного слоя [215,216], который снижает ГКР-активность и изменяет оптические и сорбционные свойства поверхности [236,251]. На рис. 6.3а показаны КР-спектры поверхности меди до и после процедуры очистки [215]. В случае щелочной и нейтральной сред происходит усиление коррозии поверхности медных ГКР-подложек и снижение ГКР-сигнала [216,236], связанное со значительным усилением восстановительных свойств меди в присутствии гидроксид-ионов [252], активным взаимодействием с кислородом воздуха и образованием нерастворимых продуктов окисления (Cu₂O, КР-пики при 625 и 525 см⁻¹) [216].

В нескольких работах также продемонстрировано, что при температурах выше комнатной происходит уменьшение интенсивности ГКР-сигнала. Например, при исследовании влияния температуры от 12 до 72°C на ГКР-сигнал нейромедина В с использованием ГКР-активных медных электродов (рис. 6.3б) обнаружено значительное снижение интенсивности ГКР-сигнала при температурах выше 40°C, которое может достигать 50% и более [227].

Аналогичное снижение ГКР-сигнала, связанное с десорбцией молекул аналита с поверхности меди, наблюдали и в другой работе [223]. Другие авторы наблюдали необратимое уменьшение ГКР-сигнала, инициируемое высокой температурой, обусловленное отжигом и перестройкой структуры поверхности, которые приводят к дезактивации ГКР-активных центров [253,254].

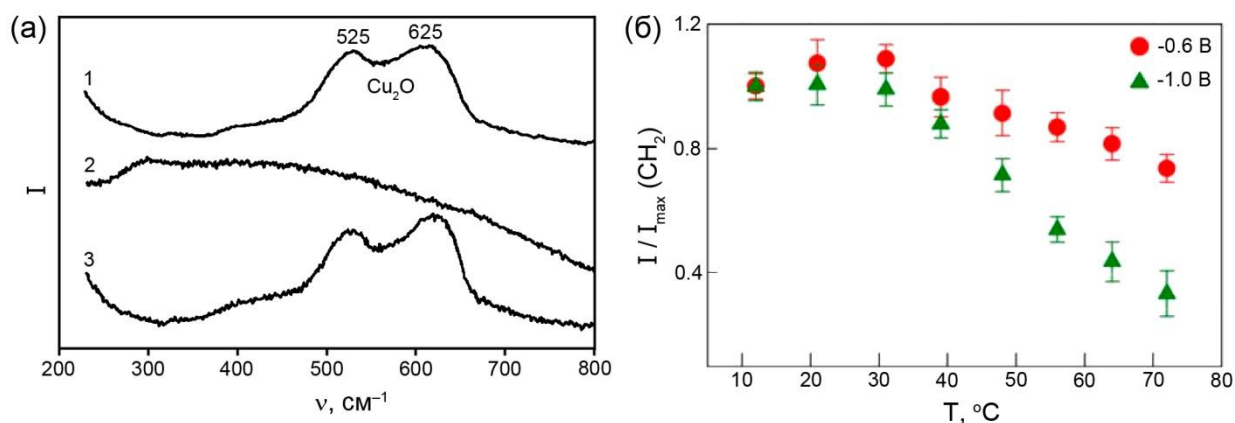


Рис. 6.3. (а) КР-спектры медной поверхности: (1) подвергшейся окислению атмосферным кислородом, (2) той же поверхности, очищенной раствором HCl (10%), и (3) повторно окисленной выдерживанием образца на открытом воздухе в течение нескольких дней [215]. (б) Влияние температуры на интенсивность ГКР-пика метиленовых групп ($2909\text{--}2927 \text{ cm}^{-1}$) нейромедина Б; сигнал регистрировали с использованием ГКР-активного медного электрода при различных значениях потенциала поляризации электрода [227].

Метод изготовления подложки. Сравнение усиливающих свойств медных ГКР-подложек, изготовленных с использованием различных подходов, проводили лишь в нескольких работах, поскольку такое сравнение требует применения одних и тех же молекул аналита, условий измерения и метода расчёта КУ. Например, Angel с соавт. [255] сравнили раствор коллоидных МНЧ с медными электродами и обнаружили одинаковый КУ для обеих подложек: $5 \cdot 10^5$ при использовании 3-хлорпиридина и $2 \cdot 10^5$ при использовании пиридина. Dendisova-Vyskovska с соавт. [245] также продемонстрировали сопоставимое КР-усиление раствора коллоидных МНЧ ($1.7 \cdot 10^5$) и потенциостатически осажденных медных поверхностей ($1.5 \cdot 10^5$).

В нескольких исследованиях изучено влияние уровня шероховатости на усиливающие свойства медных ГКР-подложек. Так, для получения

шероховатой поверхности проводили анодирование механически полированного медного электрода, при этом данный этап позволил увеличить КУ с $1.7 \cdot 10^3$ до $6 \cdot 10^4$ [218]. Несколько работ были посвящены изучению влияния шероховатости при использовании пористых медных ГКР-подложек [233,234], в которых пористость достигалась химическим травлением медных сплавов соляной кислотой. Так, Chen с соавт. [233] использовали сплав Cu-Mn и обнаружили, что зависимость ГКР-сигнала от степени шероховатости не является линейной, и максимальный КУ ($\sim 10^5$) достигается при умеренной степени шероховатости (рис. 6.4). Это объяснялось компромиссом между двумя факторами: (i) увеличением ГКР-активности при уменьшении размера пор и (ii) снижением активности за счёт остаточного присутствия Mn.

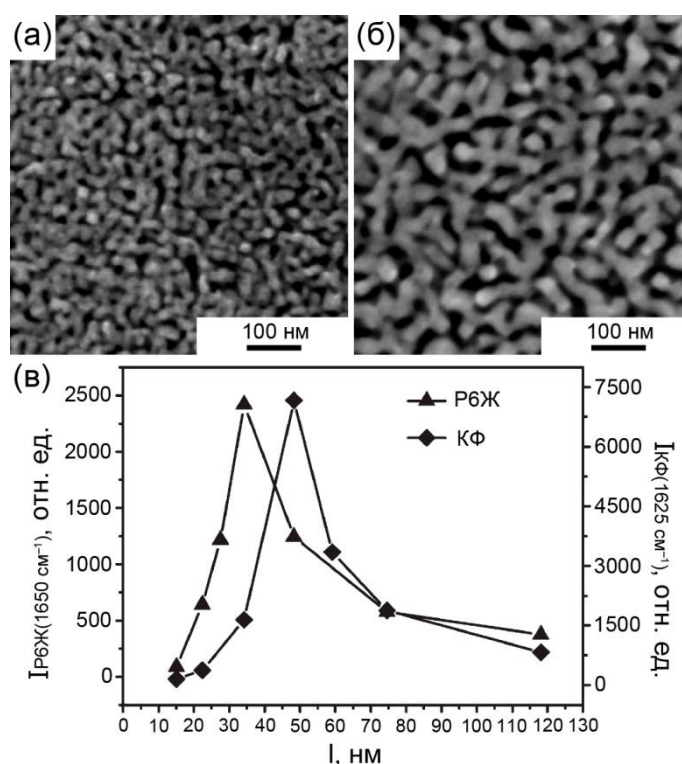


Рис. 6.4. (а,б) СЭМ-изображения нанопористой меди, полученной путём разрушения сплава Cu-Mn в течение 2 (а) и 32 (б) ч травлением соляной кислотой. (в) Зависимость интенсивности ГКР-сигнала Р6Ж и кристаллического фиолетового (КФ) от размера нанопор (l), образованных в результате травления медной поверхности (а,б) [233].

Таким образом, перечисленные выше работы показывают, что природа анализита и выбор возбуждающего излучения в большинстве случаев

оказывают большее влияние на максимально достижимое усиление КР-сигнала медными ГКР-подложками по сравнению технологией изготовления.

Химическая стабильность медных ГКР-подложек. Основным ограничением применимости медных ГКР-подложек является их более высокая химическая активность и, соответственно, более низкая химическая стабильность (подверженность коррозии) по сравнению с подложками на основе благородных металлов. Поскольку ГКР-сигнал чувствителен к изменениям химического состава поверхности ГКР-подложек, то можно выделить два основных негативных эффекта окисления меди на ГКР-сигнал: (1) уменьшение КР-усиления в результате снижения плазмонных свойств и (2) изменение адсорбционных свойств поверхности (изменение взаимодействия «аналит-подложка») из-за изменения состава поверхности. Таким образом, подверженность коррозии является важным фактором, который необходимо обязательно учитывать при разработке медных ГКР-подложек для их успешного применения в ГКР-анализе.

Было предложено два подхода для снижения влияния коррозии меди на ГКР-анализ. Первый основан на применении только свежеприготовленных медных ГКР-подложек или активации поверхности меди непосредственно перед анализом (например, ЭХ обработка в случае медных электродов). Второй подход включает защиту поверхности меди от коррозии с помощью различных защитных покрытий. Недостатком второго подхода является возможное снижение усиливающих свойств и, как следствие чувствительности анализа, в результате блокировки ГКР-активных центров. Например, этот эффект можно наблюдать при использовании таких защитных покрытий, как поверхностно-активные вещества [256] и полимеры [257]. Более того, нанесение защитного покрытия может привести к возникновению (увеличению) фонового сигнала.

К сожалению, ни одна из ранее опубликованных работ о медных ГКР-подложках не содержала информацию о проверке долговременной стабильности ГКР-активности (месяцы). Однако Halouzka и соавт. [228]

предложили ЭХ изготовленные ГКР-активные нанодендриты и кратко отметили, что медная ГКР-подложка может успешно использоваться и спустя одну неделю после изготовления. Примечательно, что авторы хранили подложки в высушенном состоянии, и мы предполагаем, что это является одним из ключевых моментов увеличения срока хранения медных ГКР-подложек.

Практическое применение

Анализ литературы показал, что большинство публикаций, посвященных медным ГКР-подложкам, представляют собой фундаментальные ГКР-исследования наноструктурированных медных поверхностей и различных поверхностных комплексов. Однако в ряде работ рассматривается и практическое использование медных ГКР-подложек, среди которых можно выделить два основных направления: (1) исследование химических реакций на медных поверхностях и (2) детектирование и количественное определение различных аналитов. Первое направление связано с исследованием коррозии меди и реакций, катализируемых медной поверхностью. Второе направлено на разработку и применение аналитических методик ГКР-определения содержания различных веществ в различных объектах, в которых медь применяли вместо благородных металлов при изготовлении ГКР-подложек.

Изучение реакций на поверхности меди: коррозия. ГКР-исследование коррозии меди является исторически первым и наиболее проработанным практическим применением медных ГКР-подложек. Это неудивительно, поскольку первое наблюдение ГКР-эффекта вообще было также выполнено при попытке исследовать коррозию серебра с помощью КР-спектроскопии [258]. Для этой цели использовали ГКР в сочетании с ЭХ исследованиями, которые являются «золотым стандартом» при исследовании коррозии [219,220]. Хотя измерение вольт-амперных характеристик позволяет быстро и просто оценить ингибирование коррозии, они не дают информации о составе и структуре сформированного защитного слоя. Комбинация ЭХ

анализа с ГКР преодолевает это ограничение благодаря непосредственному *in situ* исследованию адсорбции как ингибиторов коррозии, так и ионов, вызывающих и/или ускоряющих коррозию [219].

Однако исследования коррозии в настоящее время не представляют большого научного интереса, но опубликованные результаты по этой теме очень полезны с практической точки зрения и составляют основу для объяснения и прогнозирования химической стабильности новых медных ГКР-подложек. Кроме того, разработанные методики исследования коррозии могут быть использованы для дополнительной характеристики медных ГКР-подложек, используемых для катализа и химического анализа. Например, для определения поведения медных ГКР-подложек (срок их хранения и стабильность) в относительно агрессивных средах, характеризующихся высокой ионной силой и рН, ускоряющими окисление наноструктур меди.

Изучение реакций на поверхности меди: катализ. Несмотря на увеличенную скорость коррозии, относительно высокая реакционная способность меди дает важное преимущество – наличие гораздо большей каталитической активности, по сравнению с серебром и золотом. Каталитические свойства наноструктур меди хорошо известны и в настоящее время широко используются в органической химии. Кроме того, каталитически активные центры также облегчают реализацию процессов переноса заряда при КР-усилении [259]. Как следствие, открывается возможность изучать реакции, катализируемые наноструктурированными медными поверхностями, с помощью ГКР. Так, медные ГКР-подложки использовали для *in situ* ГКР-мониторинга реакций, катализируемых этими же подложками, таких как синтез метанола [237], электрокаталитическое восстановление CO_2 [215,217,224,247], разложение NO [260].

Также проведены исследования медных ГКР-подложек в реакциях каталитического восстановления нитроароматических соединений в аминапроизводные. Например, Shin с соавт. [232] провели сравнительное исследование каталитической активности ГКР-активных поверхностей на

основе золота, серебра и меди для изучения поверхностно-индуцированного фотовосстановления 4-нитрофенола в 4-аминофенол (АмТФ). Уменьшение интенсивности ГКР-пика, соответствующего колебанию NO_2 , свидетельствует об успешном течении реакции (рис. 6.5). Авторы обнаружили, что медная наноструктурированная поверхность показывает более высокую эффективность фотовосстановления, чем золотая и серебряная, что авторы связывают с лучшими каталитическими свойствами меди.

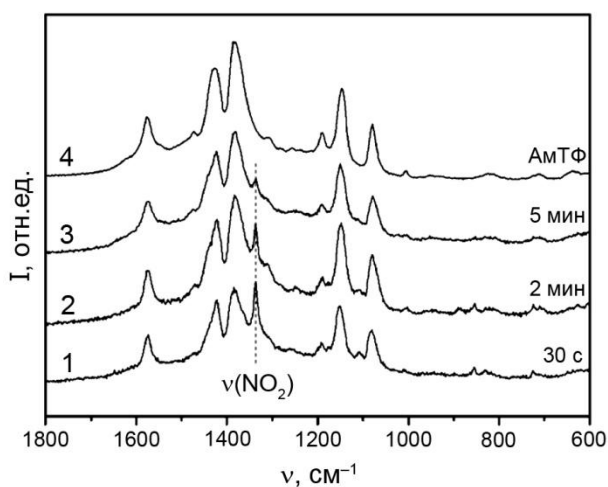


Рис. 6.5. Кинетика изменения ГКР-спектров при превращении 4-нитрофенола в АмТФ посредством фотовосстановления (1–3); контрольный ГКР-спектр АмТФ (4). В качестве ГКР-подложки использована медная фольга, протравленная с помощью HNO_3 [232].

Таким образом, бифункциональные медные наноструктуры (ГКР-подложки с каталитической активностью) являются мощным инструментом для исследования различных поверхностно-индуцированных реакций, происходящих на медных поверхностях. Хотя результаты исследований по этой теме впервые были опубликованы в 1996 г., они до сих пор недостаточно изучены и будут полезны для изучения механизмов органических реакций, катализируемых медью. А в случае, если удастся существенно повысить химическую стабильность медных ГКР-подложек без уменьшения каталитической активности, то такие подложки станут многообещающей альтернативой ГКР-активным катализаторам на основе золота и золото-платиновых композитов.

Химический анализ. Хотя усиливающие свойства медных наноструктур были обнаружены всего через несколько лет после обнаружения усиливающих свойств серебряных наноструктур, первые публикации, посвященные применению медных ГКР-подложек в анализе, были опубликованы лишь в 1990-х годах [221,230]. Однако очень немногие из опубликованных работ соответствуют критериям качества аналитической химии и содержат описание основных метрологических характеристик [221,228,230]. Так, разработана методика ГКР-определения *n*-аминобензойной кислоты, пиридина и *n*-нитробензойной кислоты с использованием коллоидных МНЧ [230]. Авторы получили градуировочные зависимости и значения s_{\min} для всех аналитов, при этом значения s_r составили менее 15%, что сравнимо с s_r сигнала, генерируемого серебряными ГКР-подложками. Также была проведена оптимизация значения рН для каждого аналита и продемонстрирована его важность для успешного ГКР-детектирования. Авторы отметили, что используемые МНЧ не содержат стабилизатора на основе больших органических молекул, что обеспечивает минимальный фоновый сигнал, но приводит к низкой коллоидной стабильности. Для преодоления недостатка стабильности авторы предложили проведение анализа в проточно-инжекционной системе, в которой седиментация не влияет на стабильность ГКР-сигнала.

Barber и соавт. [221] разработали методику спектроэлектрохимического ГКР-определения никотина с использованием медных электродов, обработанных циклами ОВ. Авторы также оценили эффективность медной ГКР-подложки путём сравнения с аналогично полученным серебряным электродом и установили, что ГКР-подложка на основе серебра позволяет достичь примерно на порядок меньшее значение s_{\min} , чем подложка на основе меди (0.043 против 0.5 мкМ). Хотя ГКР-подложка на основе серебра показала лучшие метрологические характеристики, медная ГКР-подложка все равно продемонстрировала относительно хорошие результаты, что объясняется

оптимизацией условий анализа, таких как значение рН, приложенное напряжение и выбор подходящего источника возбуждения (647.1 нм).

Halouzka с соавт. [228] изготовили углеродные микроэлектроды с медным покрытием и использовали их для ГКР-детектирования наркотических веществ. КУ разработанной медной ГКР-подложки составил 10^6 – 10^7 , однако концентрации наркотиков, которые удалось зарегистрировать с помощью медной ГКР-подложки, оказались неожиданно низкими (10^{-10} – 10^{-12} М) с учётом среднего значения КУ. Это может быть связано с использованным подходом к регистрации ГКР-сигнала, основанном на высушивании аналита на ГКР-активной поверхности, т.е. проведении своего рода концентрирования.

Хотя число работ, посвященных анализу, чрезвычайно мало, многие физико-химические исследования с применением медных ГКР-подложек могут быть использованы в качестве отправной точки и адаптированы для аналитических задач. Так, имеются работы по детектированию аналитов, которые интересны с точки зрения анализа: взрывчатые вещества [261], аминокислоты [262], пептиды [225,227], составляющие нуклеиновых кислот [240,263], биоактивные соединения [230,264,265]. В большинстве этих работ использовали фиксированную и одновременно довольно высокую концентрацию аналитов (например, 10^{-5} М), поскольку целью работ было исследование взаимодействия между наноструктурированной медной поверхностью и адсорбированными молекулами и проверка применимости новых медных ГКР-подложек. Однако это не ограничивает аналитический потенциал этих публикаций, поскольку чувствительность можно повысить за счёт правильной оптимизации условий анализа.

Преимущества и ограничения применения медных ГКР-подложек

Согласно проанализированным выше результатам медь является экономически выгодным плазмонным материалом, а медные ГКР-подложки обладают КР-усилением, сравнимым с подложками на основе серебра [35] и золота [35,235] (табл. 6.2). Конкурентоспособность меди по сравнению с

благородными металлами может быть достигнута за счёт изготовления медных ГКР-подложек с требуемым уровнем шероховатости и оптимизации таких условий ГКР-измерений, как длина волны возбуждения, значение pH и температура.

Табл. 6.2. Сравнение ГКР-подложек на основе меди, серебра и золота.

Критерий	Материал ГКР-подложки		
	Cu	Ag	Au
Стоимость	низкая	средняя	высокая
КР-усиление при оптимальных условиях	$Ag \geq Cu > Au$		
Оптимальный диапазон длин волн возбуждения ГКР-сигнала	красный–БИК	видимый	красный–БИК
Химическая стабильность	низкая	средняя	высокая

Наноструктуры на основе меди демонстрируют большой потенциал для анализа на основе ГКР, но реализация этого потенциала и достижение максимальной чувствительности и воспроизводимости анализа требуют тщательного учёта относительно низкой химической стабильности и специфических оптических свойств медных ГКР-подложек. Также методики анализа с использованием медных ГКР-подложек следует тестировать для анализа объектов со сложным составом, которые могут значительно влиять на фоновый сигнал и химическую стабильность из-за присутствия соединений, способствующих коррозии меди, таких как хлорид- и гидроксид-ионы (например, неорганические соединения в БЖЧ). Наконец, хотя стабильность во времени (срок хранения) медных ГКР-подложек в соответствующих матрицах или при различных условиях хранения, а также воспроизводимость результатов анализа от партии к партии являются важными параметрами, они подробно не обсуждались в опубликованных ранее работах и должны рассматриваться в будущих исследованиях, чтобы обеспечить возможность применения медных ГКР-подложек в рутинном ГКР-анализе.

6.2. Теоретическое изучение поглощения света кластерами меди в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах длин волн

Для моделирования плазмонных свойств МНЧ и интерпретации экспериментальных данных в основном используют подход Ми-Ганса [266] и метод дискретного дипольного приближения с использованием диэлектрических параметров, соответствующих объёмным материалам [267]. К сожалению, эти подходы не позволяют получить информацию об электронной структуре наноструктур в основном и возбужденном состояниях. Для преодоления этого недостатка можно использовать квантовохимические методы изучения электронной структуры, такие как нестационарная теория функционала плотности (НТФП; TD-DFT). Данный метод позволяет получить информацию о (i) разрешенных электронных переходах и (ii) электронной структуре (т.е. реакционной способности) наноструктур и их комплексов с различными молекулами как в основном, так и в возбужденном состоянии [268]. В дальнейшем эту информацию можно использовать для объяснения процессов с участием фотонов/плазмонов, происходящих на поверхности ГКР-подложек, например, при оценке вклада механизма переноса заряда в усиление и профили ГКР-спектров.

Помимо кластеров серебра и золота, НТФП в основном использовали для изучения оптических (плазмонных) свойств медных кластеров (2–20 атомов) с максимально компактной структурой и геометрией, приближенной к сферической [269–271]. К сожалению, в данных исследованиях основное внимание уделяли анализу части спектров, находящейся в УФ диапазоне длин волн (3–6 эВ; 400–200 нм), в то время как для аналитического ГКР наиболее важен диапазон от 500 до 800 нм. Дело в том, что при использовании для анализа сложных биологических объектов (таких как БЖЧ) возбуждающих лазеров с длинами волн света в данном диапазоне можно свести к минимуму побочные процессы взаимодействия зондирующего света с материалом матрицы, такие как фотодеструкция и флуоресценция. Наконец, известно, что оптические свойства данных

кластеров в видимом и БИК диапазонах спектра сильно зависят от конформации кластера, которая варьируется в очень широких пределах при увеличении числа атомов в кластере, что дополнительно затрудняет анализ результатов расчётов и их сравнение с экспериментальными данными.

Помимо сферических металлических НЧ (основные модели 3D-кластеров), широкое распространение получило экспериментальное изучение псевдо-одномерных (1D) металлических НЧ (наностержни и нанопроволоки), обладающих более выраженным ППР в красном и БИК диапазонах длин волн света [272,273]. Важным преимуществом таких НЧ является возможность дополнительной настройки параметров ППР (в первую очередь положения максимума), варьируя отношение длины к толщине частиц. Оптические свойства теоретических моделей 1D-кластеров можно настраивать таким же образом, делая их крайне привлекательным объектом для теоретического изучения оптических свойств ГКР-подложек. Поэтому в данной части работы в качестве основного объекта изучения использовали гипотетические медные кластеры с 2–22 атомами, с линейной геометрией и максимальным соотношением сторон (моноатомная толщина). Первоначально данные объекты были выбраны для облегчения интерпретации результатов моделирования, поскольку 1D-геометрия позволяет исключить влияние таких факторов, как варьирование межатомных расстояний, валентных углов и числа связей на атом. Однако, как будет показано в ходе работы, данное упрощение геометрии кластеров оказалось крайне удачным, поскольку в отличие от 3D-кластеров, кластеры с 1D-структурой гораздо лучше отражают оптические свойства (наличие и характеристики ППР) не только наностержней, но и металлических наноструктур в целом. Главным образом это выражается в том, что в процесс перехода в возбужденное состояние вовлечено сразу несколько электронов по аналогии с коллективными колебаниями электронного газа при возбуждении ППР в металлах.

Несмотря на достаточное число статей касающихся экспериментального изучения медных 1D-наноструктур [274], лишь некоторые из них

демонстрируют структуры с действительно интенсивным ППР в БИК диапазоне длин волн [266,267,275]. Например, изучена зависимость интенсивности ППР в медных наностержнях и нанопроволоках от угла падения луча поляризованного света по отношению к длинной оси стержня/провода [266,275]. В другой работе [275] показано, что положение и интенсивность полосы ППР в медных нанопроволоках зависят от длины, толщины и среднего расстояния между соседними проволоками. Также показано, что единственный медный наностержень может обладать несколькими полосами ППР в БИК диапазоне длин волн [267]. Наконец, на данный момент отсутствуют теоретические работы, посвященные изучению оптических свойств медных 1D-кластеров, а также содержащие оценку их способности усиливать ГКР-спектры на основании информации об их электронной структуре в основном и возбужденных электронных состояниях.

Таким образом, целью данной части диссертации является изучение возбужденных состояний медных 1D-кластеров с акцентом на возбуждения в видимом и БИК диапазонах длин волн света (от ~450 до 2000 нм). Это обусловлено тем, что плазмонные свойства медных наноструктур в видимом и БИК диапазонах длин волн представляют наибольший интерес для аналитических (включая ГКР) [276] и биомедицинских приложений [277]. Исследование также включает анализ влияния длины (числа атомов), межатомного расстояния и геометрии кластера на характеристики полос возбуждения. Наконец, проведена оценка способности медных кластеров усиливать КР-спектры с точки зрения ЭМ механизма усиления. Полученные в данном разделе результаты позволят в целом лучше понять особенности усиливающих свойств медных ГКР-подложек и будут полезны при интерпретации экспериментальных результатов, полученных при применении данных подложек в ГКР-анализе (представлены в последующих разделах).

6.2.1. Предварительный анализ теоретических спектров поглощения медных кластеров

Все расчёты проводили с использованием программы Firefly v.8.2 [278,279]. Для расчётов спектров поглощения использовали метод НТФП с гибридным функционалом PBE0, зарекомендовавшим себя в качестве достаточно точного подхода для описания возбужденных электронных состояний [280,281]. В качестве базисного набора использовали дважды валентно-расщепленный базис с эффективным потенциалом для химически инертных (не валентных) атомных орбиталей (LANL2DZ) благодаря его достаточной точности и высокой ресурсоэффективности в подобных расчётах [282,283]. Выбор кластеров с чётным числом атомов и с синглетной мультиплетностью обусловлен техническими и теоретическими сложностями при изучении систем с открытыми оболочками методом НТФП. Ожидаемые оптические свойства кластеров с нечётным числом атомов оценены косвенно и обсуждаются в разделе 6.2.4. Аналогичный уровень теории использовали для оптимизации геометрии и расчётов спектров поглощения изомеров медного кластера с 20 атомами с эллипсоидальной и пирамидальной 3D-геометрией (рис. 6.6), которые использовали в качестве объектов сравнения.

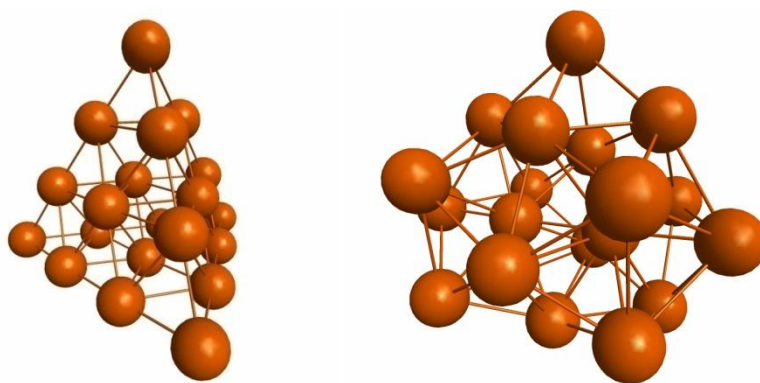


Рис. 6.6. 3D-изомеры медных кластеров с 20 атомами с пирамидальной и эллипсоидальной геометрией, использованные для сравнения с 1D-кластерами.

Число возбужденных состояний в расчётах было достаточным для расчёта спектров поглощения в диапазоне энергий вплоть до ~ 3 эВ (т.е. от БИК до ~ 400 – 450 нм). Построение спектров поглощения (FWHM = 0.1 эВ) и спектров плотности энергетических состояний (FWHM = 0.3 эВ) проводили с

использованием программы GaussSum 3.0 [284]. Полученные теоретические спектры поглощения медных кластеров в видимом и БИК диапазонах длин волн представлены на рис. 6.7а–в.

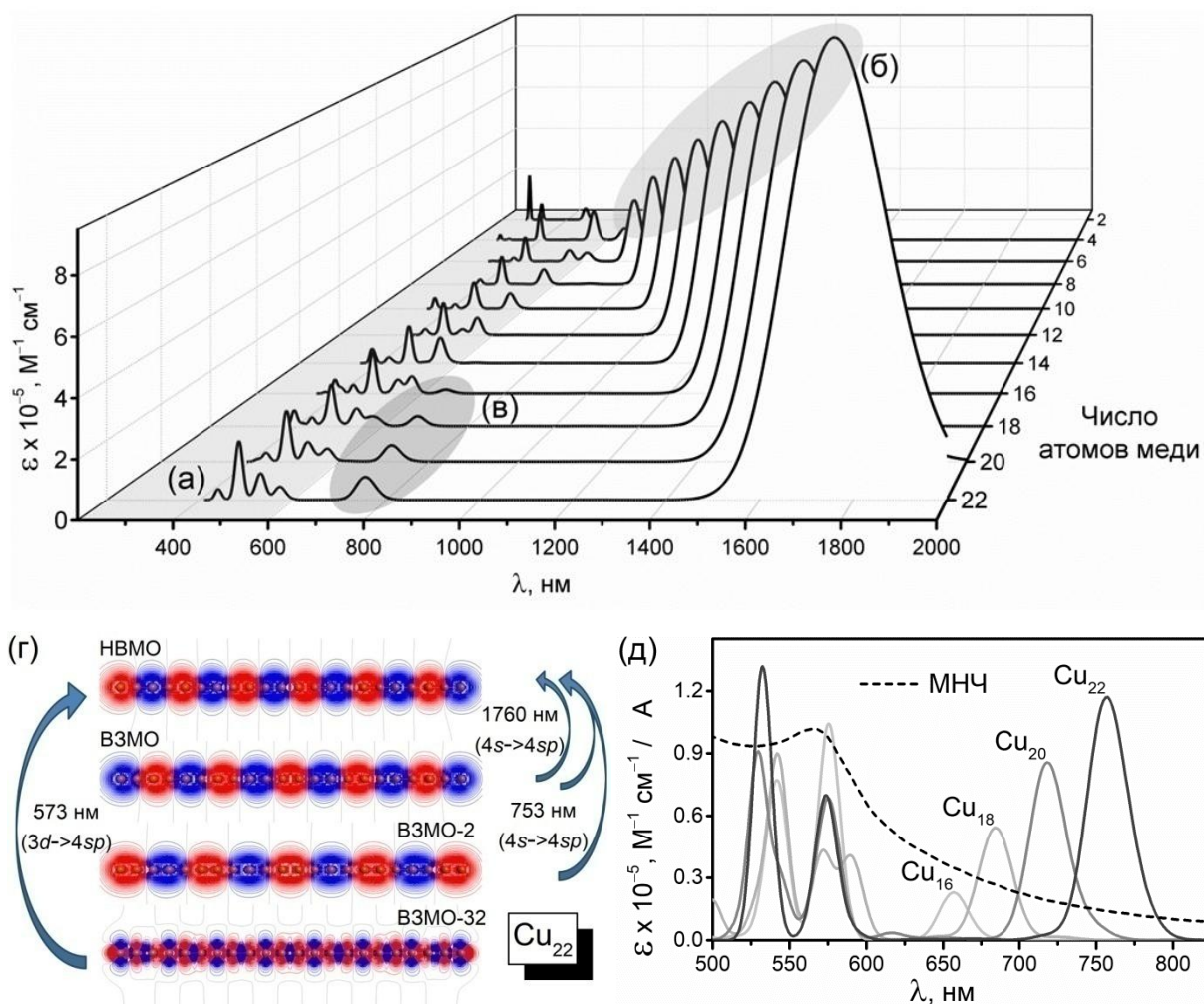


Рис. 6.7. (а–в) Теоретические спектры поглощения линейных кластеров меди одноатомной толщины и с различным числом атомов; межатомные расстояния равны 2.556 \AA (расстояния для объёмной меди [285]). Интенсивность поглощения выражена в единицах молярного коэффициента поглощения (ϵ). Полосы (а) соответствуют межзонным переходам с участием электронов $3d$ -подуровня, а наборы полос (б) и (в) соответствуют переходам зоны проводимости. (г) Пример молекулярных орбиталей (МО), участвующих в формировании межзонных возбуждений (полоса при 573 нм) и возбуждений зоны проводимости (753 и 1760 нм) медного кластера с 22 атомами. ВЗМО и НВМО – верхняя заполненная и нижняя вакантная МО, соответственно. Стрелки обозначают направления переходов электронов при формировании возбужденных состояний. (д) Спектр экстинкции раствора реальных коллоидных МНЧ и теоретические спектры поглощения кластеров меди с 16–22 атомами с акцентом только на межзонные переходы и переходы зоны проводимости красного диапазона длин волн.

Предварительный анализ молекулярных орбиталей (МО), участвующих в формировании возбужденных состояний показал, что можно выделить два вида возбуждений в медных кластерах: (i) межзонные и (ii) внутри зоны проводимости. Межзонные возбуждения состоят из множественных переходов электронов из валентной зоны, состоящей преимущественно из орбиталей $3d$ -подуровня (частично гибридованных с s - и p -орбиталями), в зону проводимости, состоящую из вакантных $4sp$ -орбиталей. Так, для кластера с 22 атомами полоса межзонного возбуждения с минимальной энергией (573 нм) образуется в основном за счёт электронных переходов с МО, располагающихся на 32 уровня ниже верхней заполненной МО (ВЗМО), на нижнюю вакантную МО (НВМО) (рис. 6.7г). Эти возбуждения требуют фотонов с энергией более 2 эВ (<600 нм; рис. 6.7а,д) и присущи всем медным наноструктурам (пример спектра коллоидных сферических МНЧ на рис. 6.7д).

Возбуждения зоны проводимости практически полностью сформированы переходами электронов с ВЗМО на НВМО, поэтому требуют фотонов с меньшей энергией и соответствуют интенсивным полосам, наблюдаемым в красном и БИК диапазонах длин волн (БИК-полосы; рис. 6.7б). Пример структуры МО, вовлеченных в формирование полосы возбуждения в зоне проводимости, приведен для кластера с 22 атомами на рис. 6.7г.

Наконец, крупные медные кластеры ($n=16-22$) имеют дополнительные полосы («красные» полосы; рис. 6.7в,д) между межзонными возбуждениями и основными возбуждениями зоны проводимости БИК диапазона длин волн. Анализ структуры МО, вовлеченных в формирование этих полос, показал, что их также можно отнести к возбуждениям зоны проводимости, но имеющим большую энергию перехода за счёт преимущественного участия занятых орбиталей несколько ниже ВЗМО (рис. 6.7г).

6.2.2. Межзонные возбуждения

Влияние размера кластера

Межзонные возбуждения значительно перекрывают друг друга, поскольку диапазон энергий, соответствующий $3d$ -орбиталям, имеет высокую плотность энергетических состояний (диапазон от -8 до -6.5 эВ на рис. 6.8а). Поэтому все полосы поглощения с энергией выше ~ 2 эВ (< 600 нм) состоят сразу из нескольких возбужденных состояний (≥ 2); пример показан на рис. 6.8б. Следовательно, при изучении зависимости силы осциллятора от числа атомов в кластере для полос в диапазоне 400 – 600 нм (рис. 6.8г) проводили суммирование значений сил осциллятора возбужденных состояний, участвующих в формировании полосы.

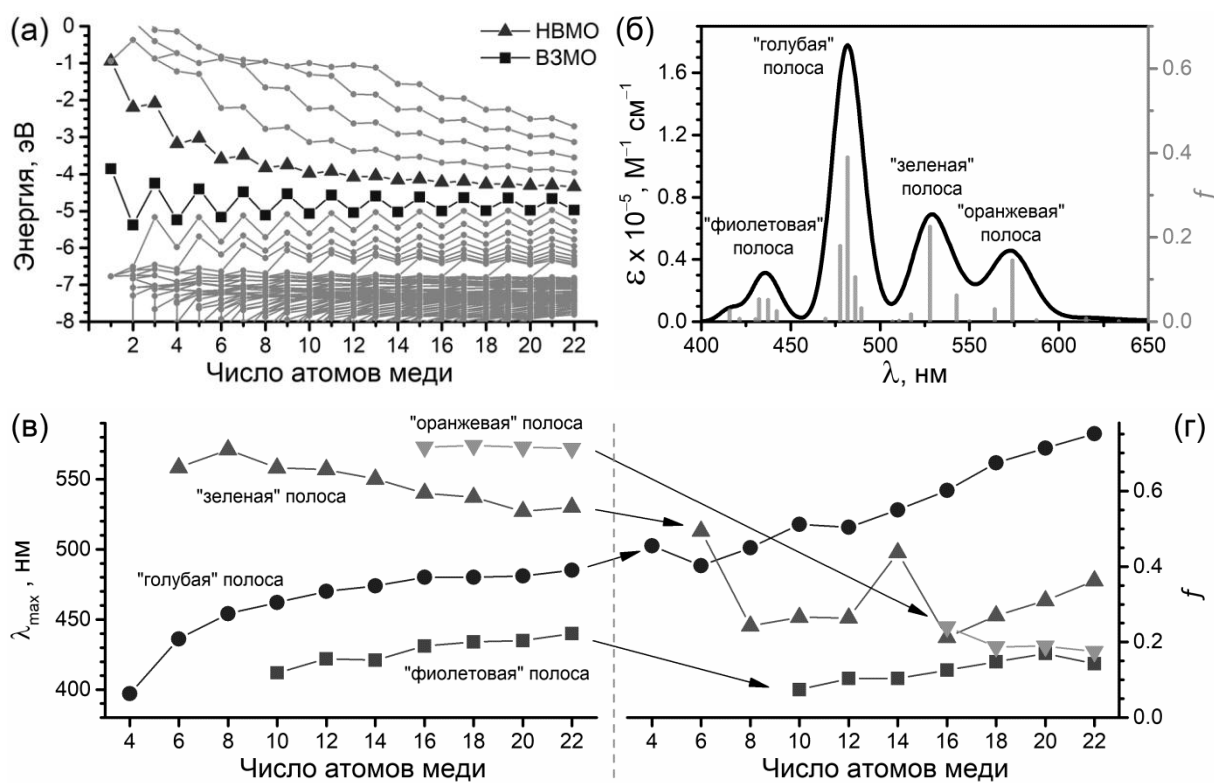


Рис. 6.8. (а) Влияние размера медного кластера на энергию МО, которые могут участвовать в формировании полос поглощения в диапазоне длин волн света от УФ до БИК. (б) Спектр поглощения медного кластера с 20 атомами в видимом диапазоне длин волн с указанием положения максимумов и силы осциллятора (f) возбужденных состояний, участвующих в формировании спектра. (в,г) Влияние размера медного кластера на характеристики полос межзонных переходов: (в) положение максимума поглощения (λ_{max}) и (г) суммарную силу осциллятора полосы (f).

Изучение влияния роста размера медного кластера на положение максимумов полос поглощения и их суммарные силы осциллятора (рис. 6.8в,г) показало, что для полос в диапазоне 400–500 нм («фиолетовые» и «синие» полосы) наблюдается смещение положения максимумов в длинноволновую область и рост значения силы осциллятора. Данный факт связан со значительным снижением энергии вакантных МО (НВМО+n, n=0–4; рис. 6.8а), что приводит к уменьшению энергетической щели между занятыми 3*d*- и вакантными 4*sp*-орбиталями. Как следствие, уменьшается энергия фотонов, необходимая для осуществления электронного перехода. Рост значений суммарных сил осциллятора также объясним уменьшением ширины запрещенной зоны. Если учесть, что с увеличением размера кластера число 3*d*- и 4*s*-электронов растет неодинаково из-за 10-кратного избытка 3*d*-электронов в атомах меди по сравнению с 4*s*-электронами, то уменьшение зазора между ВЗМО и НВМО приводит к значительному увеличению доли 3*d*-электронов, принимающих участие в формировании возбужденных состояний.

Влияние размера кластера на полосы с меньшей энергией возбуждения («зеленые» и «оранжевые»; рис. 6.8в,г) менее однозначно. Положения «оранжевых» полос (550–580 нм) практически не изменяется, а значения силы осциллятора этих полос медленно уменьшаются. С другой стороны, «зеленые» полосы (560–520 нм) испытывают сдвиг в коротковолновую область, и их значения сил осциллятора меняются немонотонно. Эти результаты можно интерпретировать как уменьшение вклада 4*s*-электронов в возбуждения, что увеличивает энергию данных полос. Кроме того, рост вклада 3*d*-электронов постепенно приводит к увеличению значений сил осциллятора, как это было для полос в диапазоне 400–500 нм. Vaishya и др. [269] также наблюдали увеличение вклада 3*d*-электронов в межзонные переходы с ростом числа атомов в медных кластерах с 3D-геометрией. Авторы также объясняли этот факт прямым вовлечением 3*d*-электронов в низкоэнергетические возбуждения за счёт их гибридизации с 4*s*-

энергетическими уровнями и, дополнительно, экранированием $4s$ -электронов $3d$ -электронами. Таким образом, можно сделать вывод, что медные 1D- и 3D-кластеры имеют схожую зависимость характеристик межзонных электронных переходов от размера кластера. Следовательно, результаты изучения зависимости усиливающих свойств от размера кластера (подраздел 6.2.6, рис. 6.15 и 6.16), полученные для 1D-кластеров, можно экстраполировать на 3D-кластеры.

Влияние геометрии кластера

Проведено сравнение спектров поглощения медных кластеров с различной геометрией, но одинаковым числом атомов ($N=20$) (рис. 6.9а). Поскольку геометрии 3D-кластеров получены путём оптимизации длин связей и валентных углов по энергии, для более корректного сравнения в случае линейного изомера также использовали кластер с межатомным расстоянием, оптимизированным по энергии (0.2352 нм; рис. 6.9б).

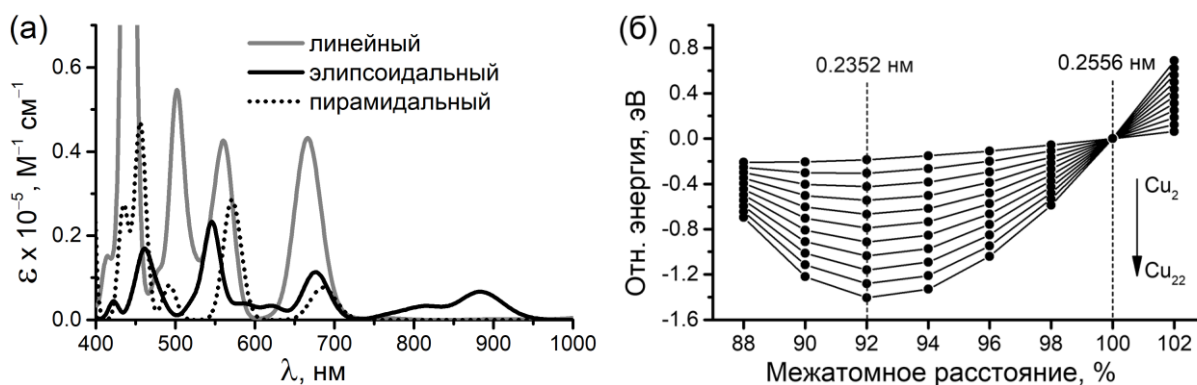


Рис. 6.9. (а) Сравнение теоретических спектров поглощения медных кластеров (20 атомов) с различной геометрией; изображения изомеров представлены на рис. 6.10а'–в'. (б) Влияние межатомного расстояния на полную энергию линейных медных кластеров; расстояния представлены в % относительно межатомного расстояния в металлической меди (0.2556 нм – 100%).

Детальный анализ возбужденных состояний линейного изомера показывает, что МО, которые участвуют в электронных переходах, помимо базисных функций с d -типом симметрии также всегда имеют вклады функций s - и p -типов симметрии (5–15% и 2–5%, соответственно) (рис. 6.10а). Данный факт объясняется запретом прямых переходов $3d$ -электронов

на вакантные МО ($4sp$) в случае оптически разрешенных переходов. Таким образом, возбуждения с участием межзонных переходов могут происходить только с участием гибридов занятых МО (dsp). Дополнительный анализ МО, участвующих в формировании полос поглощения, показал, что данные МО в основном содержат базисные функции p - и d -типов, ориентированные вдоль кластера.

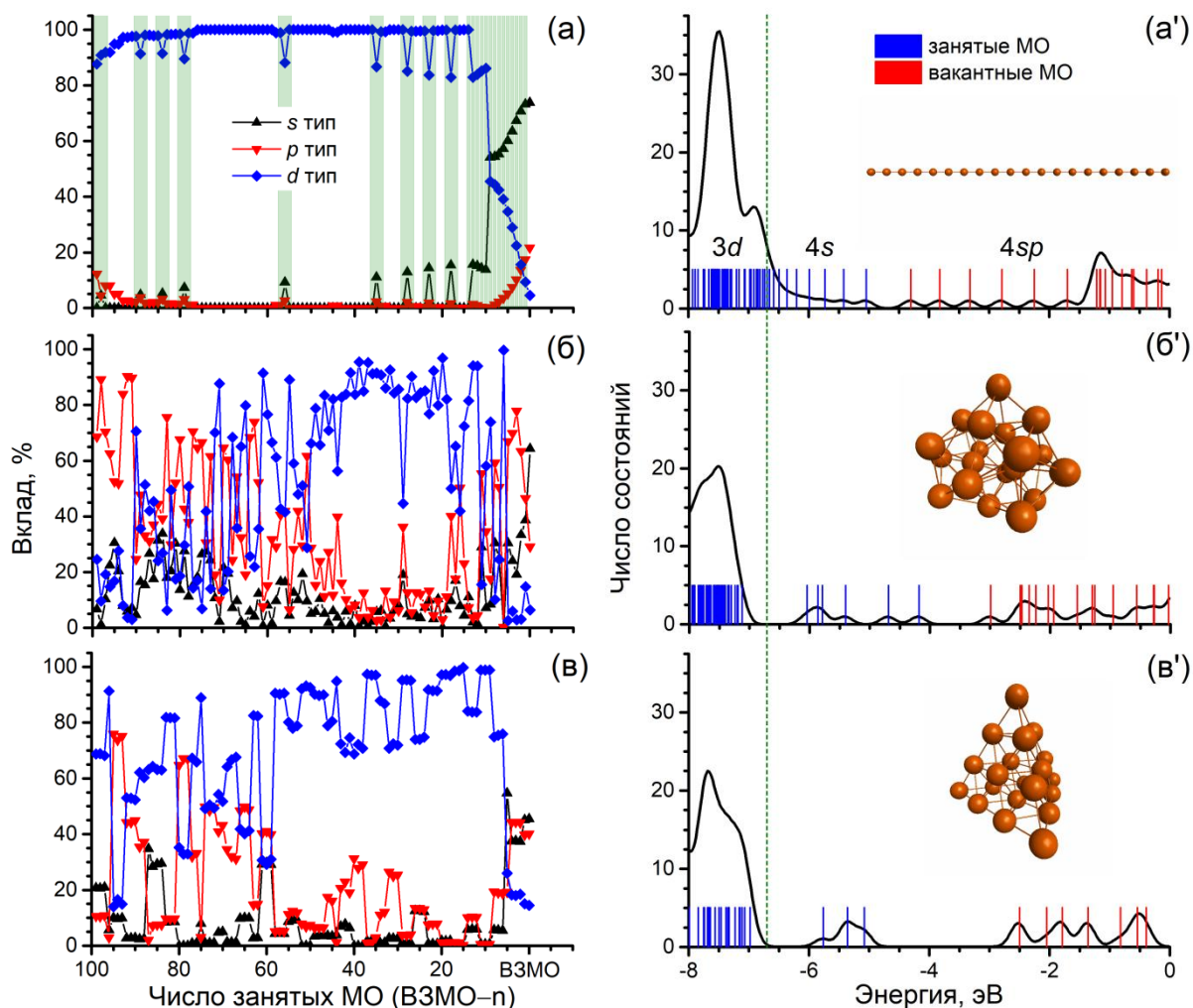


Рис. 6.10. Электронное строение медных кластеров с 20 атомами и различной геометрией: (а–в) вклад базисных функций s -, p - и d -типов симметрии в занятые МО (выделенные МО принимают участие в формировании полос поглощения) и (а'–в') спектр плотности энергетических состояний (FWHM = 0.3 эВ).

Исходя из вышеизложенных рассуждений ожидалось, что вероятность осуществления межзонных переходов и, как следствие, значения сил осциллятора (интенсивность поглощения) будут значительно больше в случае 3D-кластеров поскольку увеличение координационного числа атомов

меди в случае 3D-изомеров приводит к значительному увеличению и числа гибридованных МО, и степени их гибридизации (рис. 6.10б,в). Однако сравнение спектров поглощения (рис. 6.9а) показывает, что полосы медного кластера с линейной геометрией имеют большие значения поглощения по сравнению с полосами 3D-кластеров. Для объяснения установленного расхождения проведён анализ спектров плотности энергетических состояний изомеров (рис. 6.10а'–в'). Результаты анализа показывают, что 3D-изомеры имеют большее разделение между занятыми и вакантными МО. Поэтому ожидается, что сильное межзонное поглощение для этих кластеров будет наблюдаться при более высоких энергиях возбуждения (<400 нм) по сравнению с линейным изомером.

6.2.3. Возбуждения зоны проводимости

Полосы БИК диапазона длин волн

Наиболее интенсивные полосы поглощения, относящиеся к возбуждениям зоны проводимости, находятся в красном и БИК диапазонах длин волн (650–1800 нм; рис. 6.7б). В отличие от межзонных переходов, данные полосы состоят только из одного возбужденного состояния и их максимум поглощения и сила осциллятора имеют линейную зависимость от размера кластера (рис. 6.11а). Существование линейной корреляции между значением силы осциллятора полос поглощения металлических 1D-кластеров и размером кластеров уже было показано ранее в теоретических исследованиях кластеров на основе щелочных металлов [286,287]. Однако линейная корреляция между положением максимума полосы возбуждения и размером кластера показана нами впервые и её можно объяснить с позиции возникновения стоячих плазмон-поляритонных волн при взаимодействии валентных электронов с возбуждающим светом [288].

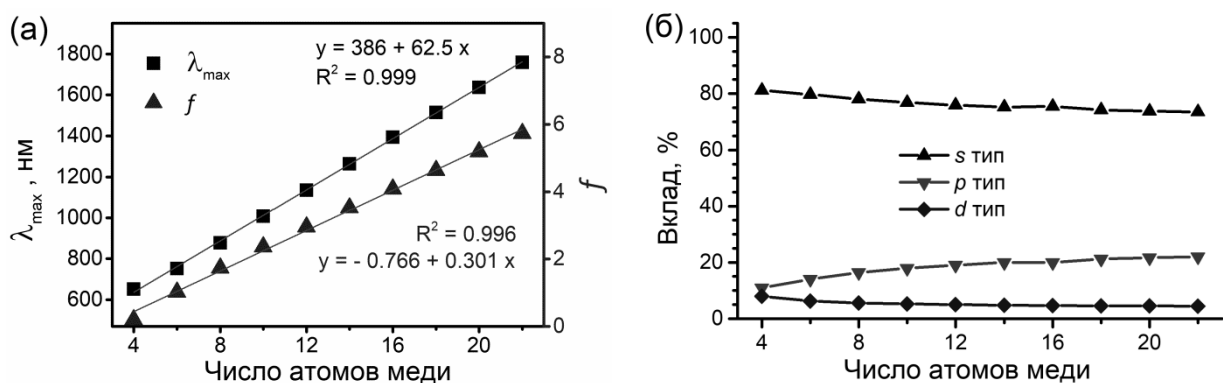


Рис. 6.11. Влияние размера медных кластеров на (а) положение (λ_{\max}) и силу осциллятора (f) полос возбуждений зоны проводимости и (б) вклад базисных функций s -, p - и d -типов симметрии в ВЗМО.

За исключением кластеров с 2 и 4 атомами, полосы БИК диапазона длин волн в основном образованы за счёт электронных переходов с ВЗМО на НВМО (ВЗМО→НВМО). Однако полоса кластера с 4 атомами состоит из переходов ВЗМО–2→НВМО (53%) и ВЗМО→НВМО (45%), и оба перехода осуществляются в зоне проводимости, полоса кластера с двумя атомами уже имеет 23% вклада межзонных переходов ($3d \rightarrow 4sp$). Поэтому полосу кластера с 2 атомами исключили из дальнейшего анализа. Анализ структуры ВЗМО и НВМО также показал, что они в основном содержат базисные функции p -типа, ориентированные вдоль кластера. Таким образом, возбуждения в линейных кластерах, основанные и на межзонных переходах и на возбуждениях зоны проводимости преимущественно ориентированы в продольном направлении, аналогично колебаниям электронного газа при возбуждениях ППР в металлических наностержнях и нанопроволоках.

Анализ спектров плотности энергетических состояний и вклада базисных функций различной симметрии в заполненные МО показывает, что по сравнению с медными 3D-кластерами, 1D-кластеры имеют и наименьший зазор между вакантными и занятыми МО (рис. 6.10а'), и наименьший вклад функций d -типа в их ВЗМО (рис. 6.10а). Данный факт связан со снижением координационного числа атомов меди, что приводит к существенному снижению энергии НВМО и уменьшению вклада $3d$ -орбиталей в формирование химических связей. Эти факты объясняют появление полос

поглощения в БИК диапазоне длин волн и их высокую интенсивность (вероятность осуществления электронного перехода) в случае медных 1D-кластеров по сравнению медными 3D-кластерами.

Рост размера кластера не оказывает существенного влияния на вклад d -функций в ВЗМО (5–8%), но приводит к постепенному росту степени sp -гибридизации (рис. 6.11б). Поскольку переходы электронов с МО с одинаковой симметрией запрещены ($s \rightarrow s$ и $p \rightarrow p$), именно гибридный (sp) характер ВЗМО и НВМО, а также низкий вклад d -функций ответственны за высокую вероятность переходов, т.е. высокую интенсивность поглощения.

Наличие интенсивных полос поглощения в БИК диапазоне длин волн в теоретических спектрах качественно согласуется с экспериментальными результатами, полученными Oh и др. [267] и Duan и др. [275] для медных наностержней и нанопроволок, соответственно. Таким образом, полосы БИК диапазона длин волн можно отнести к аналогам продольных дипольных возбуждений ППР в реальных медных 1D-наноструктурах. К сожалению, гипотетический характер изученных медных кластеров и большой разброс в геометрических характеристиках реальных наностержней (нанопроволок) не позволяют провести количественное сравнение теоретических и практических результатов. Так, наличие в образце наностержней с различным отношением длины к толщине может привести к существенному перекрытию полос ППР с меньшей энергией (дипольных) и большей энергией (квадрупольных) в результирующем спектре экстинкции. Однако имеется явное согласие с экспериментальными результатами, особенно касающимися небольших медных кластеров.

Lescoultre и др. провели экспериментальные и теоретические исследования спектров поглощения медных 3D-кластеров (1–9 атомов) в неоновой матрице [270] и обнаружили, что теоретические результаты для кластера с 3 атомами имеют существенное отличие от экспериментальных результатов из-за наличия полосы с относительно высокой интенсивностью и неожиданно низкой энергией (2.46 эВ / 504 нм). Авторы рассматривали для

расчётов только кластеры с оптимизированной 3D-геометрией; однако линейный медный кластер с 3 атомами, вероятно, также может быть стабильным, внося вклад в спектр поглощения. Используя эту гипотезу, мы объединили результаты Lecoultre и др. для этого кластера с нашими теоретическими результатами для медных кластеров с межатомным расстоянием, оптимизированным по энергии (0.2352 нм; рис. 6.9б). Дополнительно принят во внимание коротковолновый сдвиг полосы поглощения на $\sim 0.1\text{--}0.2$ эВ, вызванный влиянием матрицы, в которой измеряли спектры поглощения реальных кластеров (твёрдый неон) [270,289]. В результате обнаружено очень хорошее согласие для значений сил осциллятора (рис. 6.12а). Однако значение максимума полосы поглощения значимо смещено от основного тренда (на 48 нм / 0.227 эВ), что мы связываем с открытой электронной структурой (наличие неспаренного электрона) этого кластера из-за нечётного числа атомов; подробные обсуждения приведены в разделе 6.2.4.

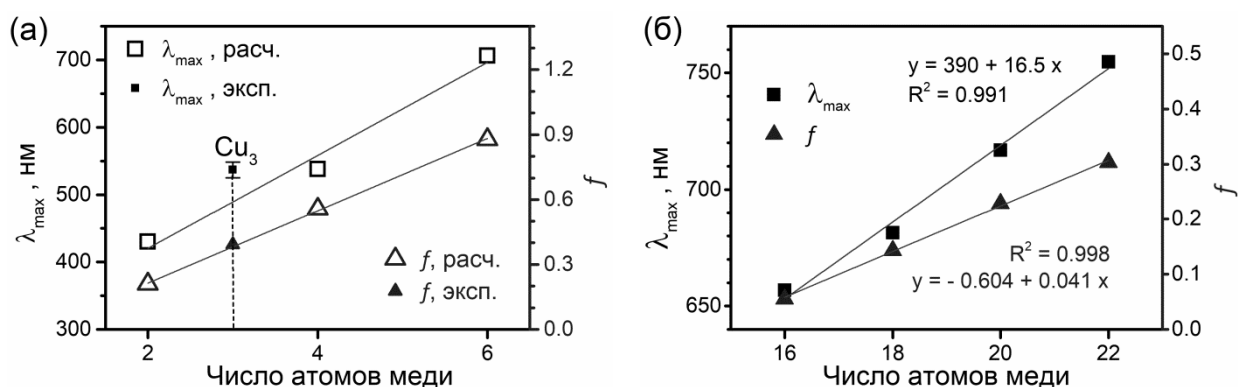


Рис. 6.12. (а) Сравнение теоретических (2, 4 и 6 атомов; межатомное расстояние 0.2352 нм, рис. 6.9б) и экспериментальных (3 атома) характеристик полос поглощения (положение максимума и сила осциллятора) линейных медных кластеров в БИК диапазоне длин волн. (б) Влияние размера медных кластеров на характеристики «красных» полос (рис. 6.7в,д).

Полосы красного диапазона длин волн

Эти полосы появляются в ограниченном диапазоне длин волн (600–800 нм) и только в случае крупных медных кластеров (16–22 атома). Существование нескольких возбужденных состояний в зоне проводимости в

теоретических спектрах согласуется с наличием нескольких полос ППР в красном и БИК диапазонах длин волн, которые ранее наблюдали в экспериментальных спектрах медных наностержней и нанопроволок [267]. Сопоставимая интенсивность этих полос и полос межзонных переходов, а также их значительно более низкая интенсивность по сравнению с полосами БИК диапазона длин волн (более чем на порядок) также согласуются с экспериментальными результатами. Следовательно, эти полосы можно также отнести к аналогам продольных возбуждений ППР реальных медных наностержней, но с более высокой энергией и меньшей интенсивностью.

Поскольку полосы красного диапазона длин волн находятся гораздо ближе к области межзонных электронных возбуждений, чем полосы БИК диапазона длин волн, ожидается, что межзонные возбуждения могут влиять на них. Анализ МО, вовлеченных в формирование данных полос, показывает, что каждая полоса формируется из множественных переходов (обычно 4–9) с $VЗМО-n$ на $НВМО+n$ (где $n=1-3$). При этом МО ниже $VЗМО$ ($VЗМО-n$) могут содержать довольно существенный вклад базисных функций d -типа: до 50% для кластеров с 18–22 атомами и до ~80% для кластера с 16 атомами. Тем не менее, эти полосы отнесены нами именно к возбуждениям зоны проводимости, поскольку при увеличении длины кластеров, вклад функций d -типа существенно уменьшается, а положение максимума и значение силы осциллятора данных полос сохраняют линейную зависимость от размера кластера (рис. 6.12б) (аналогично полосам БИК диапазона длин волн, рис. 6.11а).

Влияние межатомного расстояния на возбуждения зоны проводимости

Как обсуждалось выше, разница в спектрах поглощения медных 1D- и 3D-кластеров обусловлена различными значениями координационных чисел, что приводит к увеличению зазора между $VЗМО$ и $НВМО$ (рис. 6.10а'–в'). Для дополнительного изучения влияние геометрии 1D-кластеров на их спектры поглощения исследовано влияние межатомного расстояния на полосы, отнесенные к возбуждениям зоны проводимости (рис. 6.13). Как и

ожидалось, уменьшение межатомного расстояния приводит к смещению положения полос в коротковолновую область и уменьшению значений их силы осциллятора. Для полос красного диапазона длин волн крупных кластеров также обнаружено, что значение силы осциллятора наименьшего кластера (16 атомов) обладает очень большой чувствительностью к изменению расстояния по сравнению с другими кластерами (рис. 6.13а). Этот факт предположительно связан с сильным влиянием межзонных переходов, находящихся в максимальной близости к данной полосе в случае данного кластера.

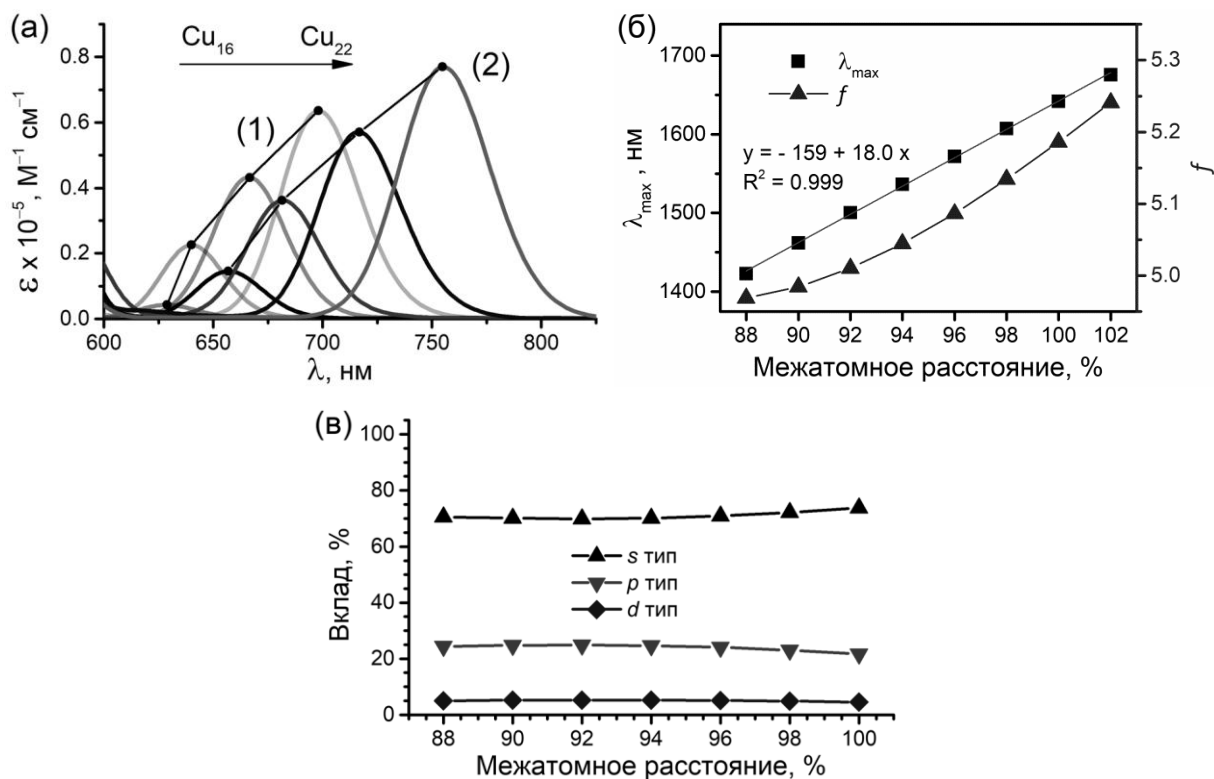


Рис. 6.13. (а) Полосы возбуждения зоны проводимости в красном диапазоне длин волн для кластеров с (1) межатомным расстоянием, оптимизированным по энергии (0.2352 нм, рис. 6.9б), и (2) расстоянием, соответствующим объёмной меди (0.2556 нм). (б) Влияние изменения межатомного расстояния на положение максимума и силу осциллятора полосы возбуждений зоны проводимости в БИК диапазоне длин волн в линейном медном кластере с 20 атомами (0.2556 нм принято за 100%; 0.2352 нм соответствует 92%). (в) Влияние межатомного расстояния в линейном медном кластере с 20 атомами на вклад базисных функций различной симметрии в ВЗМО.

Более подробный анализ влияния межатомного расстояния на полосы БИК диапазона длин волн, проведённый для медного кластера с 20 атомами

(рис. 6.13б), показал, что положение полосы поглощения зависит от данного параметра несколько больше, чем значение силы осциллятора. Например, полоса медного кластера с оптимальным межатомным расстоянием смещена на 8.6% относительно кластера с расстоянием, соответствующим объёмной меди, в то время как значение силы осциллятора снижается всего на 3.4%. Мы объясняем этот результат слабой зависимостью гибридизации МО, формирующих полосы поглощения, от межатомного расстояния (рис. 6.13в). Таким образом, можно сделать вывод, что возбужденные состояния и профили результирующих спектров поглощения (рис. 6.9а) зависят от межатомных расстояний существенно меньше по сравнению с формой кластера и координационным числом составляющих его атомов, особенно в случае значений сил осциллятора.

6.2.4. Поглощение света кластерами с нечётным числом атомов

Оценку оптических свойств кластеров с нечётным числом атомов проводили косвенно путём анализа энергий МО и участия в их формировании базисных функций различной симметрии. Установлено, что кластеры с чётным и нечётным числом атомов имеют схожую зависимость величины энергии граничных МО (ВЗМО и НВМО) от размера кластера, стремясь достигнуть практически постоянных значений с ростом числа атомов в кластере (рис. 6.8а и 6.14а). Однако в целом зависимость энергий МО и значений ширины запрещенной зоны от числа атомов в кластере имеют осциллирующий характер. Это связано с тем, что ВЗМО кластеров с чётным числом атомов ниже по энергии, чем ВЗМО кластеров с нечётным числом атомов, поскольку последние являются системами с открытыми электронными оболочками из-за нечётного числа электронов. Например, сравнение кластеров с 20 и 19 атомами показало, что последний имеет на 2–7% (0.11–0.33 эВ) и 1–7% (0.06–0.21 эВ) большие значения энергии для ВЗМО– n ($n=0-9$) и НВМО+ n ($n=0-4$), соответственно, тогда как для ещё более низколежащих МО разница оказалась меньше 0.5% (<0.02 эВ) (рис. 6.14б). Поэтому ожидается, что именно полосы возбуждения зоны

проводимости (полосы красного и БИК диапазонов длин волн) будут в наибольшей степени зависеть от того, в каком состоянии находится кластер (открытая/закрытая электронная оболочка), демонстрируя длинноволновое смещение данных полос в случае кластеров с нечётным числом атомов. Напротив, ожидается, что значения силы осциллятора (т.е. интенсивность поглощения) не будут зависеть от этого фактора, поскольку анализ вкладов базисных функций различной симметрии не показал существенных различий между кластерами с чётным и нечётным числом атомов (рис. 6.14в).

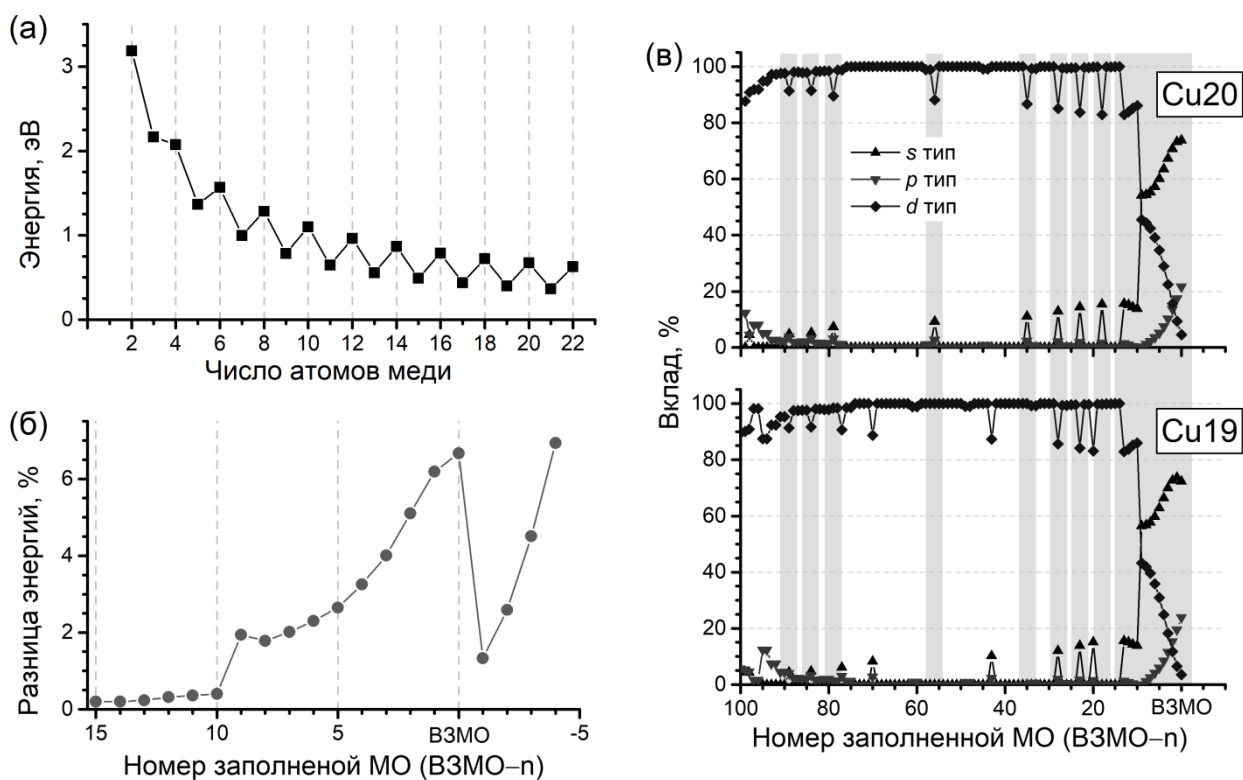


Рис. 6.14. (а) Влияние размера кластера на разницу энергий ВЗМО и НВМО; результаты для ВЗМО и НВМО показаны на рис. 6.8а. (б) Разница энергий МО между медными кластерами с 19 и 20 атомами (относительно последнего). (в) Вклад базисных функций различной симметрии в занятые МО для медных кластеров с 19 и 20 атомами меди; выделенные МО соответствуют МО кластера с 20 атомами, участвующим в формировании разрешенных возбужденных состояний. Все результаты приведены для кластеров с межатомным расстоянием 0.2556 нм.

Сделанные выводы находятся в отличном согласии с экспериментальными результатами для медных 3D-кластеров с нечётным числом атомов [270]. Так, нейтральные медные кластеры (2–9 атомов) с

нечётным числом атомов всегда имеют полосы поглощения в диапазоне энергий 2.0–2.5 эВ, в то время как кластеры с чётным числом атомов поглощают свет только в диапазоне >2.5 эВ. Таким образом, показанный ранее значительный длинноволновый сдвиг (0.226 эВ) экспериментальной полосы, наблюдаемый для медного кластера с тремя атомами (рис. 6.12а), полностью согласуется с обсуждаемыми выводами, как и то, что значение силы осциллятора не зависит от того имеет ли кластер чётное или нечётное число электронов.

6.2.5. Плазмонный характер полос поглощения

Учитывая, что ППР подразумевает коллективные колебания электронного облака, дополнительно проведена оценка плазмонных свойств для полос поглощения, связанных с межзонными переходами, и полос возбуждений зоны проводимости. Поскольку значение силы осциллятора прямо пропорционально вероятности перехода электрона в возбужденное состояние, то сумма значений сил осциллятора по всем переходам, формирующим конкретную полосу, напрямую связана с числом электронов, задействованных в осуществлении этих переходов. Так, суммарное значение силы осциллятора для 1D-кластера с 20 атомами для всех межзонных возбуждений (диапазон 400–600 нм) составило 1.4. Для всех переходов в видимом и БИК диапазонах длин волн (>400 нм, рис. 6.9а) в случае 3D-кластеров данный параметр оказался гораздо меньше: 0.35 и 0.44 для сферических и пирамидальных кластеров, соответственно. Значение аналогичного порядка (~ 0.2) получено для полос красного диапазона длин волн (600–800 нм, рис. 6.7в) 1D-кластера. Однако единственная полоса БИК диапазона длин волн (1636 нм для кластера с 20 атомами) имеет суммарное значение силы осциллятора равное 5.2 (рис. 6.11а), явно свидетельствуя о вовлечении гораздо большего числа электронов при возбуждении данной полосы и демонстрируя наибольшее сходство с коллективным колебанием электронного газа, возникающем при возбуждении ППР в плазмонных наноструктурах.

Таким образом, полосы поглощения ниже 600 нм (т.е. все полосы межзонных переходов) следует относить скорее к внутриатомным электронным переходам, нежели к плазмонным (т.е. коллективным) электронным колебаниям. Хотя экспериментальные результаты, касающиеся оптических свойств одномерных медных цепочек с моноатомной толщиной, пока недоступны, наши выводы находятся в прекрасном качественном согласии с экспериментальными результатами для медных наностержней [267], нанопластинок [290] и нанооболочек [291]. Авторы данных работ также наблюдали наличие гораздо более интенсивного поглощения у полос в красном и БИК диапазонах длин волн (>600 нм) по сравнению с полосами межзонных переходов.

6.2.6. Усиливающая способность медных кластеров

Поскольку результаты расчёта спектров поглощения предоставляют полную информацию об электронной структуре кластеров меди и в основном, и в возбужденных состояниях, проведена оценка способности медных кластеров усиливать КР-спектры с точки зрения ЭМ механизма усиления. Этот механизм реализуется в результате увеличения НЭП вокруг плазмонных наноструктур после их резонансного взаимодействия с фотонами света и возбуждения ППР. Следовательно, процедура оценки усиливающих свойств включала анализ изменений НЭП, возникающих вокруг кластеров при переходе электронной структуры кластеров в различные возбужденные состояния. Сам анализ состоял в построении карт пространственного распределения отношения НЭП вокруг кластера в возбужденном состоянии (E_i ; i – номер возбужденного состояния) к НЭП вокруг кластера в основном состоянии (E_0). Согласно ЭМ механизму усиления [292] данное отношение НЭП имеет прямую корреляцию с КУ:

$$КУ \sim \left(\frac{E_i}{E_0} \right)^4$$

На рис. 6.15 приведен пример анализа изменения распределения НЭП вокруг медного кластера с 22 атомами, находящегося в различных

возбужденных состояниях с ненулевой силой осциллятора. Энергии перехода в данные состояния соответствуют энергиям полос поглощения в теоретических спектрах (рис. 6.7), поэтому карта для каждого состояния также помечена соответствующей длиной волны света. Важно отметить, что в спектрах на рис. 6.7 отчётливо видны только наиболее интенсивные полосы, в то время как при анализе изменения распределения НЭП изучены и более слабые переходы. Размер шага при построении карт составил 0.25 \AA . Использование 1D-кластеров позволило существенно сократить время расчётов и ограничиться построением только 2D-карт благодаря симметричности распределения НЭП относительно центральной оси и геометрического центра кластеров.

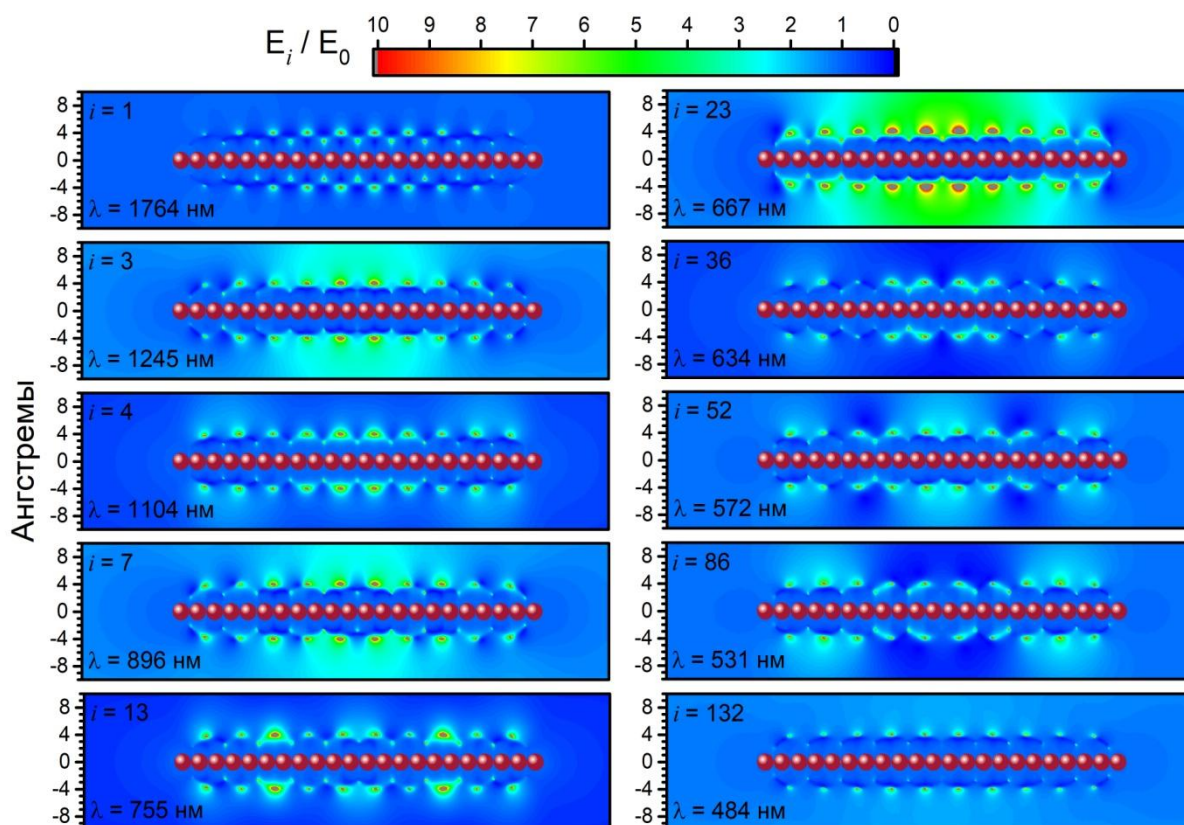


Рис. 6.15. Карты распределения изменения НЭП (E_i/E_0) вокруг кластера меди с 22 атомами, находящегося в различных возбужденных состояниях с ненулевой силой осциллятора (т.е. взаимодействующих со светом с поглощением). E_i и E_0 соответствуют НЭП вокруг кластера в возбужденном и основном состояниях, соответственно; i – номер состояния.

Из анализа полученных карт можно сделать следующие выводы:

1) Действительно высокое усиление КР-сигнала может быть достигнуто только на очень коротких расстояниях от кластера (до $\sim 5-7 \text{ \AA}$), сопоставимых с размерами адсорбированных молекул. Этот факт является действительно значимым для ГКР с практической точки зрения, поскольку дополнительно показывает необходимость минимизации расстояния между молекулами аналита и ГКР-активной поверхностью путём усиления адсорбции. Также при использовании молекул-рецепторов их размер должен быть как можно меньше. При этом в литературе часто встречается утверждение, что ЭМ механизм усиления работает на расстояниях до десятков и сотен ангстрем, что с точки зрения нашего экспериментального опыта и полученных теоретических результатов является явным преувеличением.

2) Количественный анализ изменений НЭП вокруг кластера показал, что рост НЭП в основном не превышает 10–15 раз, приводя к КУ от 10^4 до $5 \cdot 10^4$ (уравнение 6.1), что согласуется с экспериментальными результатами, полученными для медных наностержней и нанопроволок [242,293].

Дальнейший детальный анализ самих карт изменения НЭП представляется малоинформативным, поэтому далее рассчитывали значение КУ, усредненное по всей карте для каждого конкретного возбужденного состояния. Полученные значения использовали для изучения профилей возбуждения ГКР-сигнала для каждого кластера, которые представляют собой зависимости усредненного КУ от длины волны возбуждающего света (рис. 6.16).

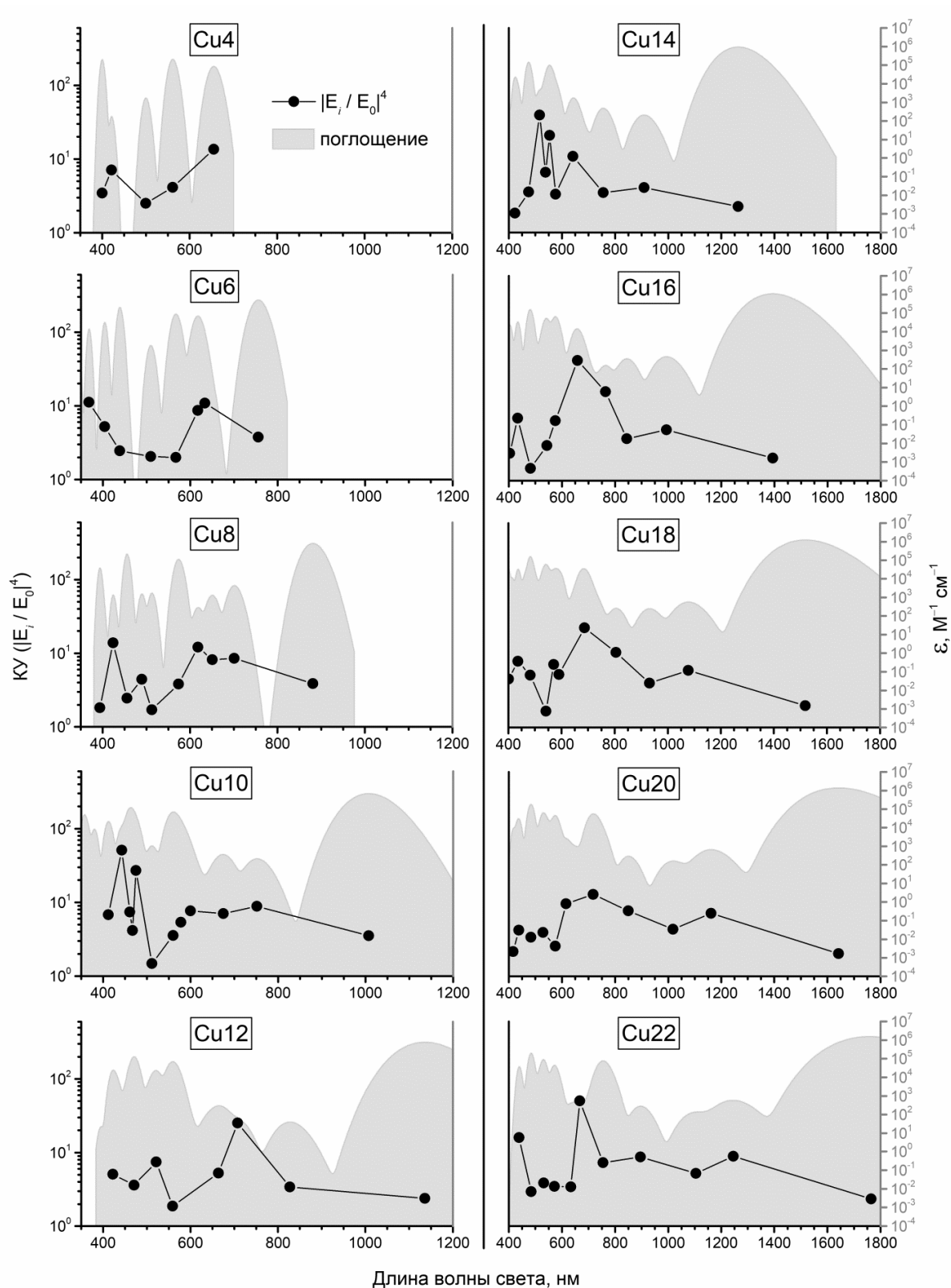


Рис. 6.16. Теоретические спектры поглощения линейных кластеров с различным числом атомов и значения усредненного КУ (●) для возбужденных состояний с ненулевой силой осциллятора. Спектры поглощения представлены с логарифмической шкалой ординат для облегчения визуального отображения возбужденных состояния с большой разницей интенсивности поглощения.

Анализ профилей возбуждения показал, что максимальные КУ можно достичь только в диапазоне 600–800 нм, что хорошо согласуется с экспериментальными профилями возбуждения для МНЧ [35]. Таким образом, возбуждения, основанные на межзонных переходах, не оптимальны для аналитических применений ГКР, что объясняет ошибочность выводов множества исследований, утверждавших, что медные ГКР-подложки в принципе плохо или совсем не усиливают КР-спектры: в данных исследованиях использовали возбуждающее излучение с длиной волны короче 600 нм (например, 532, 514.5 или 488 нм). Мы связываем этот факт с тем, что межзонные переходы больше всего влияют на внутриатомное перераспределение электронной плотности, которое приводит к относительно небольшим абсолютным изменениям НЭП по сравнению с изменениями, возникающими при перераспределении электронной плотности в самых верхних (валентных) МО (т.е. в зоне проводимости).

С другой стороны, наиболее интенсивные полосы БИК диапазона длин волн также в основном обеспечивают низкое усиление, что связано с низкой энергией возбуждающих фотонов, не способных привести к существенным изменениям электронной структуры зоны проводимости. Данный пример наглядно демонстрирует, что высокое значение поглощения света ГКР-подложкой не всегда согласуется с высокими значениями КУ.

Таким образом, полученные теоретические результаты имеют хорошее согласие с реальными спектрами поглощения МНЧ и кластера с тремя атомами, значениями КУ медных ГКР-подложек, а также профилями возбуждения ГКР-сигнала.

Наиболее важным результатом является теоретическое подтверждение и обоснование того, почему медные ГКР-подложки наиболее эффективно усиливают только при использовании возбуждающих лазеров с длиной волны света больше 600 нм. Также теоретически доказано, что и в случае ЭМ механизма усиливающий эффект распространяется на расстояния,

сопоставимые лишь с размерами адсорбционного слоя на поверхности ГКР-подложки.

Поэтому, несмотря на гипотетический характер строения, 1D-кластеры с моноатомной толщиной являются перспективной моделью для дальнейшего теоретического изучения зависимости ГКР-сигнала систем «подложка+аналит» от плазмонных свойств подложки, которые легко контролировать, варьируя размер кластеров. Также упрощённая структура кластеров дополнительно позволяет существенно облегчить как проведение расчётов, так и интерпретацию результатов (по сравнению с 3D-моделями кластеров).

6.3. ГКР-анализ с использованием медных наночастиц

6.3.1. Синтез и изучение химической стабильности ГКР-активных медных наночастиц

Как показано в разделе 6.1, на данный момент существует множество подходов изготовления медных ГКР-подложек. В случае получения коллоидных растворов ГКР-подложек существует очень большое разнообразие подходов синтеза с применением различных восстановителей и стабилизаторов, обладающих как положительными (простота синтеза, высокие усиливающие свойства и т.д.), так и отрицательными (низкая воспроизводимость, чрезмерная чувствительность к температуре и чистоте реактивов и т.д.) сторонами. В результате анализа различных подходов и собственных поисковых экспериментов был разработан воспроизводимый и простой синтез коллоидного раствора МНЧ, который основан на восстановлении ионов Cu^{2+} (раствор CuSO_4) гидратом гидразина в водной среде в присутствии цитрат-ионов, которые использовали в качестве стабилизатора (рис. 6.17). Для этого к смеси воды (4.9 мл), цитрата натрия (50 мкл, 0.1 М) и нитрата меди(II) (25 мкл, 0.1 М) добавляли гидрат гидразина (125 мкл) и подвергали нагреву в микроволновой (МВ) печи (800

Вт) до тех пор, пока смесь из бесцветной не становилась красной (примерно после 40 с).

МВ нагрев был выбран не только для ускорения реакции, но и для минимизации влияния стенок реакционного сосуда и достижения максимальной гомогенности полученных МНЧ, поскольку в отличие от классических способов нагрева, МВ излучение проникает вглубь образца и нагрев происходит сразу по всему объёму реакционной смеси [294]. Полученный таким образом раствор МНЧ использовали для ГКР-измерений сразу после синтеза. ГКР-измерения проводили с использованием портативного КР-спектрометра QEPro (Ocean Optics) с длиной волны лазера равной 638 нм (оптимальная для медных ГКР-подложек), мощностью лазера на образце – 18 мВт, числовой апертурой зонда – 0.22 NA, временем накопления сигнала – 1 с.

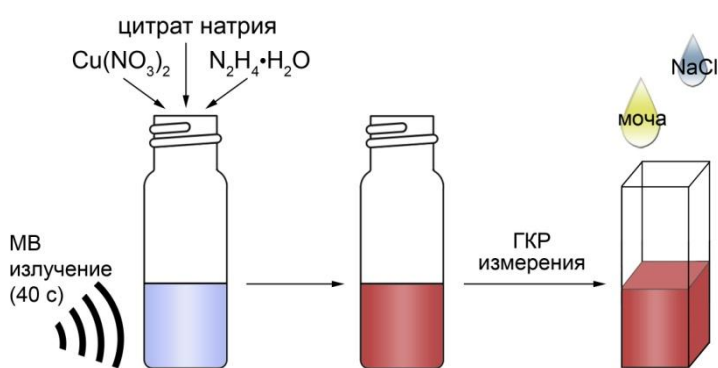


Рис. 6.17. Схематическая иллюстрация синтеза МНЧ для ГКР-детектирования ЦСА в моче.

Установлено, что регистрацию ГКР-спектров ЦСА следует проводить в нейтральной среде и при добавлении активирующего агента для искусственной агрегации МНЧ (NaCl). Использование кислой среды приводит к снижению сигнала ЛВ, а щелочной – к появлению интенсивного фонового сигнала от молекул стабилизатора (цитрат-ионов) (рис. 6.18).

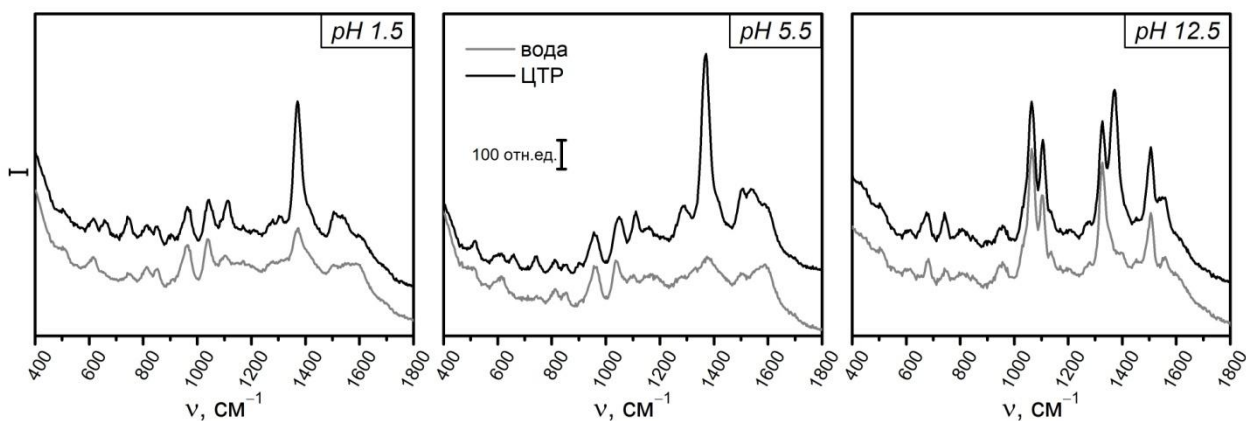


Рис. 6.18. ГКР-спектры МНЧ без (вода) и в присутствии аналита (ЦТР, 5 мкг/мл) при разных значениях рН. ГКР-спектры в нейтральной среде (рН 5.5) получены в присутствии рН-нейтрального активирующего агента (NaCl, 50 мМ).

Изучение возможного влияния природы аниона в соли меди показало, что этот параметр не оказывает существенного влияния на ГКР-эффективность МНЧ (рис. 6.19а). Однако для финальной методики синтеза всё же выбран $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ из-за слабых комплексообразующих свойств нитрат-ионов и, как следствие, очень низкого их сродства к поверхности МНЧ. Этот факт сводит к минимуму возможные конкурентные взаимодействия между нитрат-ионами и молекулами аналита за адсорбцию на ГКР-активные центры.

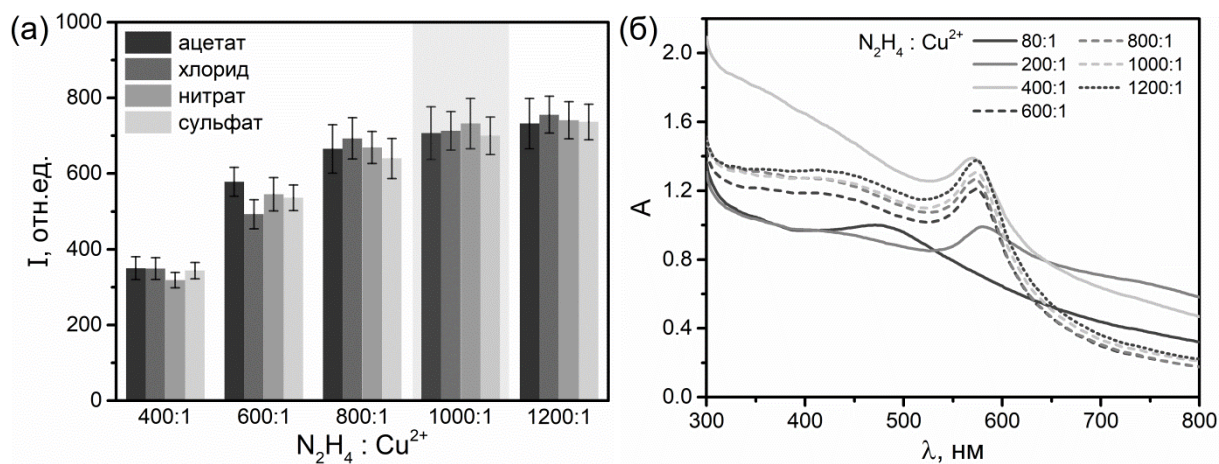


Рис. 6.19. (а) Влияние мольного отношения « $\text{N}_2\text{H}_4:\text{Cu}^{2+}$ » и состава аниона в соли меди на интенсивность ГКР-сигнала ЦТР (5 мкг/мл; пик при 1368 cm^{-1}). **(б)** Влияние мольного отношения « $\text{N}_2\text{H}_4:\text{Cu}^{2+}$ » на спектры поглощения МНЧ. В качестве прекурсоров для синтеза МНЧ использовали нитрат меди и цитрат натрия в мольном отношении 1:2.

Помимо достижения хорошего контроля над скоростью реакции, применение гидразина для восстановления ионов меди позволяет

дополнительно минимизировать концентрации побочных продуктов реакции. Так, продуктом окисления гидразина является N_2 , который не влияет на состав раствора МНЧ (его рН и ионную силу) и не конкурирует со стабилизатором и аналитом за ГКР-активные центры на поверхности меди. Отметим, что присутствие N_2H_4 даже в существенном избытке по отношению к ионам меди (мольные отношения 80:1 и 200:1) не позволяло достичь необходимой ГКР-активности МНЧ, и приходилось использовать очень большой избыток N_2H_4 (мольные отношения более 400:1) (рис. 6.19а). Оптимальное мольное отношение, которое далее использовали для синтеза МНЧ для ГКР-анализа, составило 1000:1, поскольку дальнейшее увеличение количества гидразина не привело к значительному увеличению ГКР-сигнала. На основании измерений спектров поглощения МНЧ (рис. 6.19б) был сделан вывод, что использование умеренного избытка N_2H_4 не позволяет осуществить полное восстановление ионов меди и синтезировать МНЧ с интенсивной полосой ППП при ~ 570 нм, характерной для сферических МНЧ [245,252]. Это можно объяснить низкой стабильностью N_2H_4 в присутствии металлической меди, которая катализирует его разложение до N_2 , H_2 и H_2O , особенно при нагревании [295,296]. Это также объясняет отсутствие химической стабильности синтезированных МНЧ во времени даже при использовании значительного избытка гидразина.

В отличие от восстановителя, концентрация цитрат-ионов оказывает немонотонное влияние на ГКР-эффективность МНЧ с максимумом при мольном отношении цитрата к ионам меди равном 2:1 (рис. 6.20а). Важно отметить, что МНЧ, синтезированные без стабилизатора, вообще не обладают способностью усиливать КР-сигнал, что мы связываем с образованием слишком мелких и агрегированных МНЧ. Это объяснение подтверждается результатами измерения спектров поглощения МНЧ (рис. 6.20б): добавление стабилизатора и увеличение его концентрации способствует росту частиц с лучшими плазмонными свойствами (увеличение интенсивности полосы ППП при ~ 570 нм) и, следовательно, способствует

увеличению усиления КР-сигнала. С другой стороны, хотя увеличение концентрации стабилизатора не увеличивает фоновый сигнал, использование количества стабилизатора выше оптимального уменьшает интенсивность ГКР-сигнала ЛВ, что связано с конкуренцией между молекулами аналита и стабилизатора за ГКР-активную поверхность.

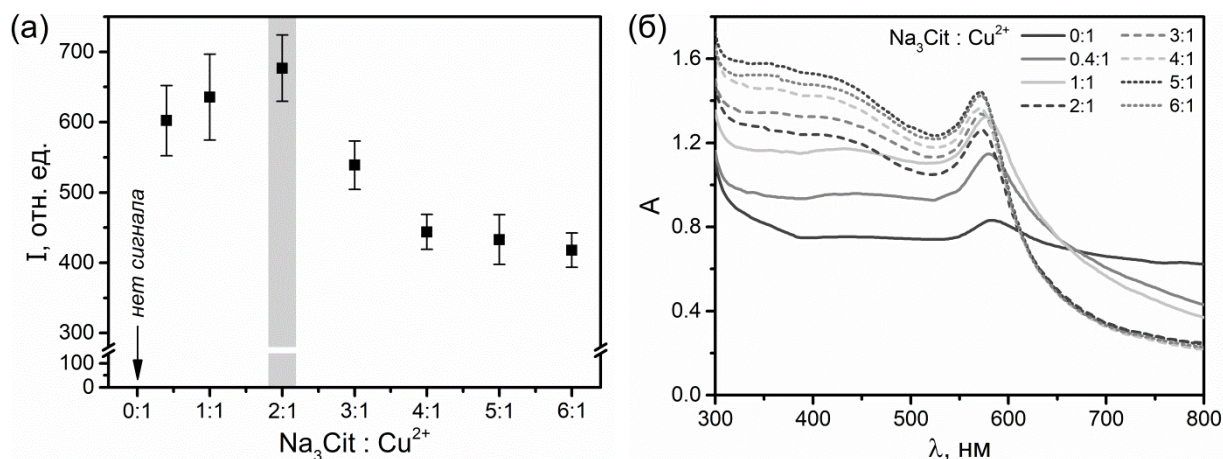


Рис. 6.20. (а) Влияние мольного отношения « $\text{Na}_3\text{Cit}:\text{Cu}^{2+}$ » на интенсивность ГКР-сигнала ЦТР (5 мкг/мл; пик при 1368 см^{-1}). (б) Влияние мольного отношения « $\text{Na}_3\text{Cit}:\text{Cu}^{2+}$ » на спектры поглощения МНЧ. Использовали мольное отношение « $\text{N}_2\text{H}_4:\text{Cu}^{2+}$ » равное 1000:1.

Согласно изображениям, полученным с помощью СЭМ, МНЧ, приготовленные с использованием оптимизированной методики, имеют сферическую форму со средним размером 32 нм (s_r 22%) (рис. 6.21). Поскольку атом меди имеет меньшую электронную плотность по сравнению с атомами серебра и золота и, соответственно, меньший контраст в электронной микроскопии, то, к сожалению, не удалось получить СЭМ-изображения МНЧ высокого качества.

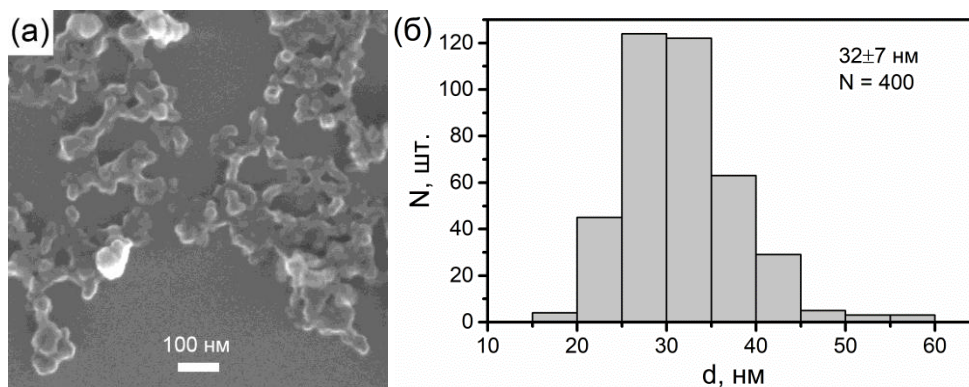


Рис. 6.21. СЭМ-изображение МНЧ, стабилизированных цитрат-ионами, (а) и их распределение по размерам (б).

Оценка стабильности усиливающих свойств МНЧ во времени показала, что ГКР-сигнал аналита снижается на 20% и 50% в течение 4 и 28 мин после синтеза, соответственно (рис. 6.22а). Поскольку полоса ППР МНЧ с течением времени уширяется и смещается в красную область (рис. 6.22б), мы объясняем потерю ГКР-активности частичным окислением поверхности МНЧ [297]. Тем не менее, исследование воспроизводимости ГКР-сигнала, генерируемого свежесинтезированными образцами МНЧ, показало, что значения s_r сигнала, полученного как с использованием одного, так и разных образцов МНЧ, составило менее 10% (рис. 6.22в). Таким образом, хотя стабильность полученных МНЧ сильно ограничена во времени, свежеприготовленные МНЧ можно использовать для проведения воспроизводимого ГКР-анализа.

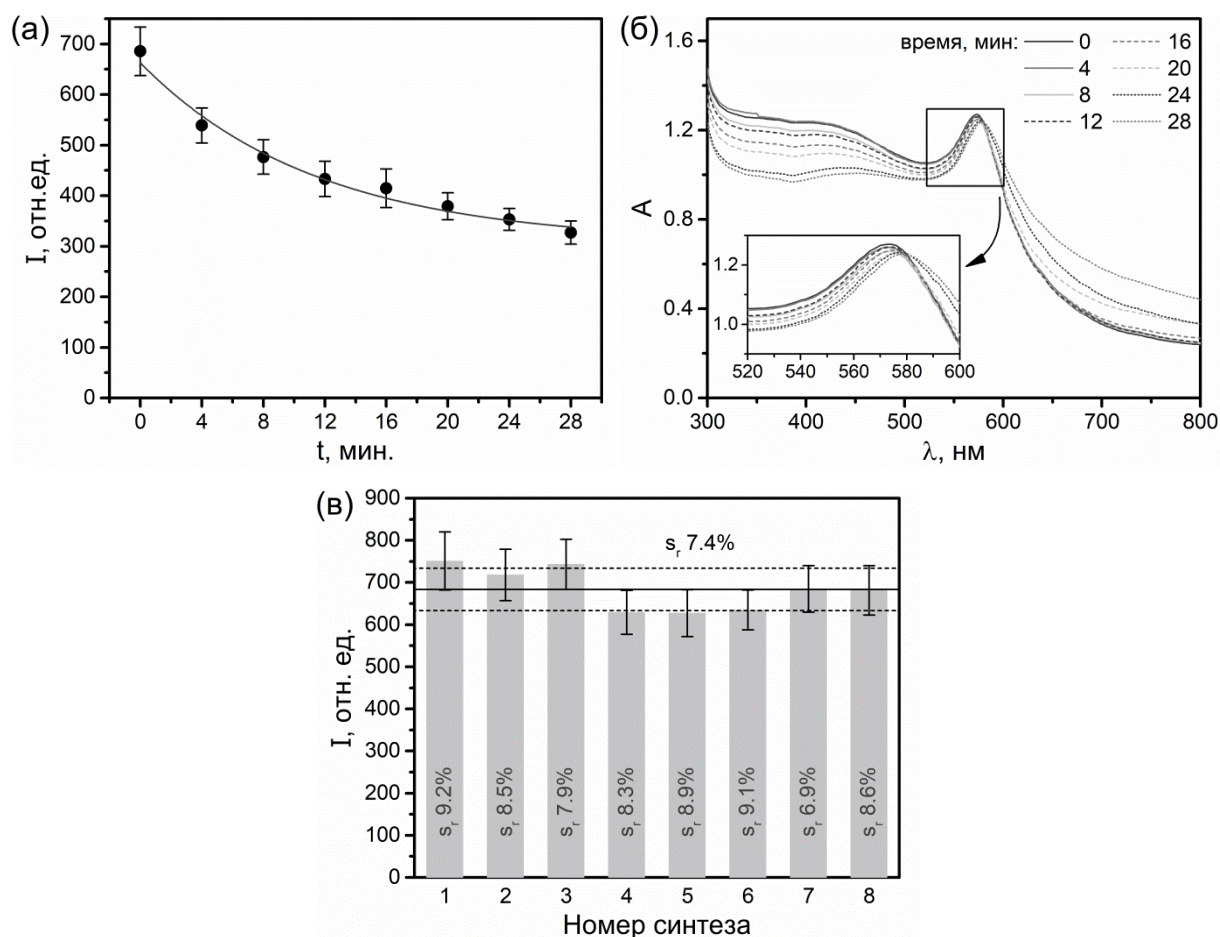


Рис. 6.22. (а,б) Влияние времени хранения МНЧ на интенсивность ГКР-сигнала ЦТР (5 мкг/мл; пик при 1368 см^{-1}) (а) и на спектры поглощения МНЧ (б). (в) Воспроизводимость усиливающих свойств свежеприготовленных образцов МНЧ при регистрации ГКР-сигнала ЦТР.

6.3.2. Сравнение усиливающих свойств медных, золотых и серебряных наночастиц

Проведены контрольные исследования способности МНЧ усиливать ГКР-сигнал в сравнении с таковой для СНЧ и ЗНЧ. Чтобы свести к минимуму разницу между поверхностными свойствами, все растворы НЧ готовили с использованием МВ нагрева, одинаковой мольной концентрации атомов металлов (0.5 мМ) и с использованием цитрат-ионов в качестве стабилизатора. Согласно данным просвечивающей растровой электронной микроскопии (рис. 6.23) синтезированные таким образом МНЧ, СНЧ и ЗНЧ имеют разные размеры (32 ± 7 , 39 ± 9 и 13 ± 2 нм, соответственно). Несмотря на различия в размере, рассчитанные значения площади поверхности НЧ в 1 мл раствора оказались довольно сопоставимы: 27, 32 и 24 см² в случае МНЧ, СНЧ и ЗНЧ, соответственно. Поэтому ожидается, что интенсивность ГКР-сигнала будет зависеть только от усиливающих свойств ГКР-подложки и силы взаимодействия между аналитом и подложкой. Также для всех ГКР-подложек использовали одинаковый этап активации НЧ перед ГКР-измерениями путём искусственной агрегации с использованием раствора NaCl.

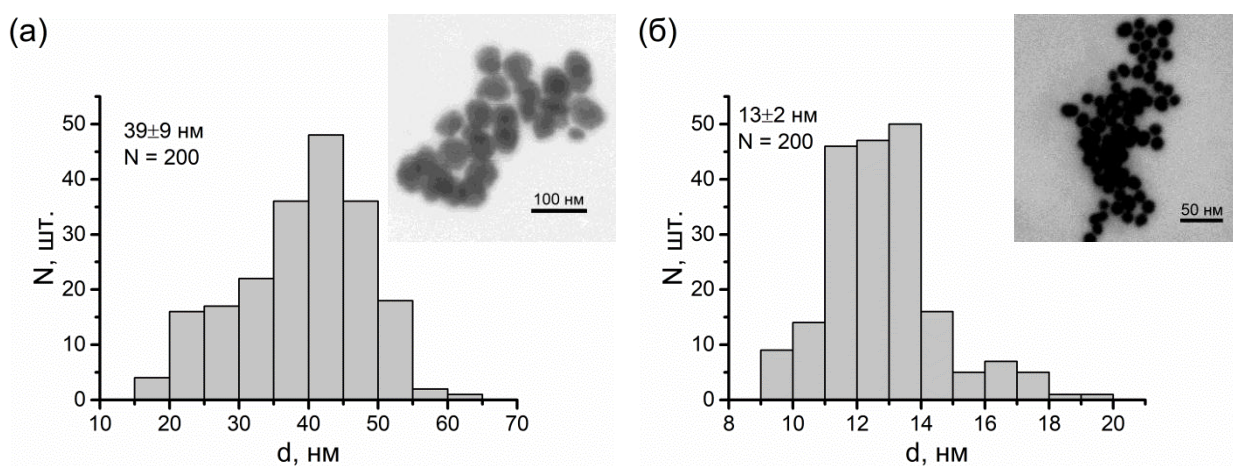


Рис. 6.23. Изображения, полученные просвечивающей растровой электронной микроскопией, и распределение по размерам СНЧ (а) и ЗНЧ (б).

Помимо представителя ЦСА (ЦТР), в качестве тестового аналита дополнительно использовали АмТФ как широко распространенный аналит для тестирования ГКР-подложек на основе именно золота и серебра. В

качестве возбуждающего излучения использовали лазер с длиной волны 638 нм, являющегося оптимальным для всех трёх типов подложек (рис. 6.2).

Оценка усиления с помощью АмТФ показала, что СНЧ обладают самым лучшим усилением КР-сигнала, а ЗНЧ и МНЧ показали сопоставимую эффективность (рис. 6.24а). Однако при использовании ЦТР лучшие результаты показали МНЧ (рис. 6.24б). Примечательно, что усиливающая способность ЗНЧ при определении ЦТР оказалась значительно ниже СНЧ и МНЧ, чем в случае АмТФ. Полученные результаты (как для АмТФ, так и для ЦТР) противоречат результатам, ожидаемым после анализа спектров поглощения активированных (агрегированных) ГКР-подложек (рис. 6.25). Так, в соответствии с теорией ЭМ механизма усиления КР-сигнала мы ожидали, что ЗНЧ продемонстрируют наилучшие результаты в случае обоих веществ благодаря лучшему взаимодействию с возбуждающим излучением (наибольшая экстинкция при 638 нм). С другой стороны, подложка на основе серебра должна была продемонстрировать наименьшее усиление КР-сигнала в случае и АмТФ, и ЦТР, поскольку слабее всего взаимодействует с использованным возбуждающим излучением.

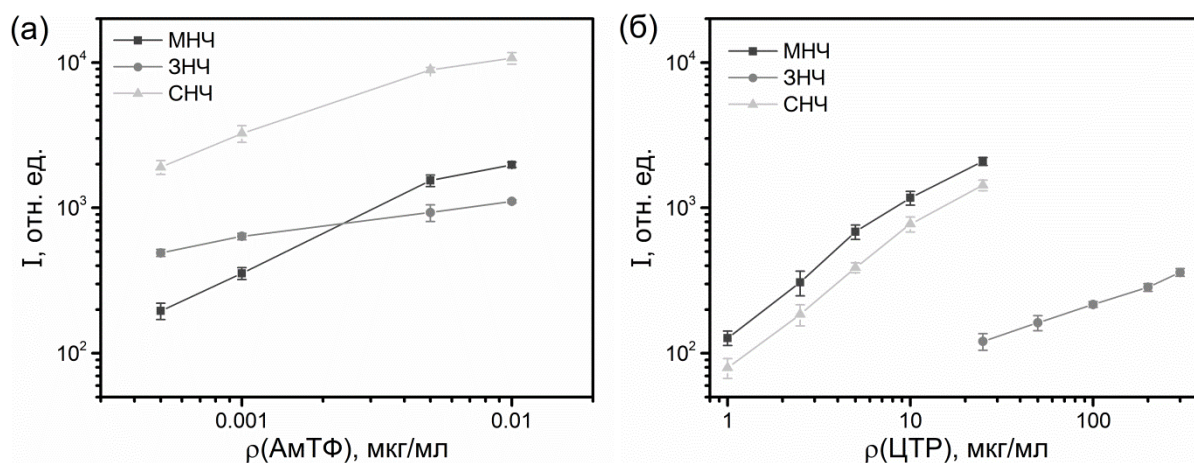


Рис. 6.24. Влияние концентрации АмТФ (а) и ЦТР (б) на интенсивность ГКР-сигнала (по пикам при 1084 и 1368 см^{-1} для АмТФ и ЦТР, соответственно). Результаты были получены с использованием растворов МНЧ, ЗНЧ и СНЧ, активированных путём агрегации с помощью раствора NaCl.

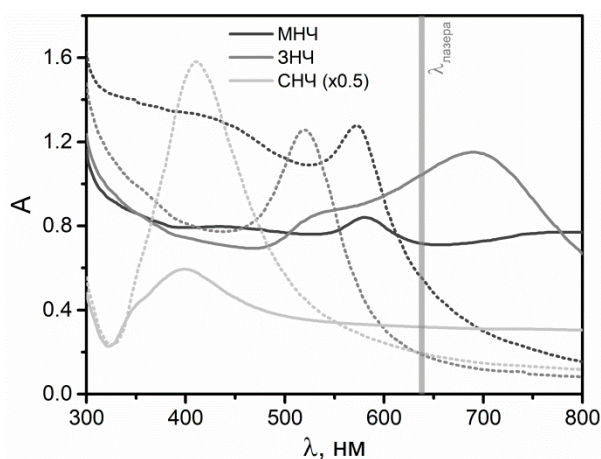


Рис. 6.25. Спектры поглощения МНЧ, ЗНЧ и СНЧ до (штриховые линии) и после (сплошные линии) агрегации активатором (раствор NaCl).

Установленное несоответствие в случае ЗНЧ объяснимо с точки зрения вклада химического механизма в усиление КР-сигнала, согласно которому происходит дополнительное усиление за счёт переноса заряда с подложки на молекулу при возбуждении ППР. В свою очередь вероятность осуществления переноса зависит от электронодонорных свойств материала ГКР-подложки, электроноакцепторных свойств адсорбированной молекулы аналита и прочности связывания аналита с поверхностью подложки. Так, несмотря на то, что комплекс «ЗНЧ-молекула» проявляет наибольшее взаимодействие с возбуждающими фотонами (рис. 6.25), высокая химическая инертность золота препятствует переносу заряда и электронодонорные свойства ЗНЧ могут проявляться только в случае аналитов, ковалентно связанных с их поверхностью (таких как АмТФ и другие тиолсодержащие соединения). Таким образом, недостаточно сильное взаимодействие между подложкой и аналитом в случае комплекса «ЗНЧ-ЦТР» снижает вероятность осуществления переноса заряда и реализацию дополнительного (химического) усиления (по сравнению с комплексами ЦТР с СНЧ и МНЧ). И наоборот, медь, являясь самым реакционноспособным из использованных металлов подложек, легче образует комплексы с ЦТР за счёт формирования прочных донорно-акцепторных связей, что увеличивает вероятность переноса заряда и, как следствие, дополнительно повышает интенсивность ГКР-сигнала.

Полученные результаты согласуются с предыдущими исследованиями профилей возбуждения ГКР-подложек на основе меди, серебра и золота, приготовленных ЭХ [298] и вакуумным [35] методами. Эти исследования проводили с использованием пиридина в качестве аналита и также показали, что подложки на основе золота демонстрируют наименьшую степень КР-усиления при прочих одинаковых условиях измерений. Таким образом, можно сделать вывод, что выбор подходящей пары «аналит – материал ГКР-подложки» также важен для успешной разработки чувствительных методик ГКР-анализа, как и выбор оптимальной длины волны возбуждения.

6.3.3. ГКР-определение цефалоспориновых антибиотиков в моче

Влияние матрицы мочи на ГКР-сигнал

Для минимизации влияния матрицы и уменьшения разницы между образцами УМ и ДМ использовали разбавление мочи водой. Результаты тестирования разбавления показывают, что спектры образцов чистой мочи становятся сходными начиная со 100-кратного разбавления (рис. 6.26а). Однако разница в интенсивности сигнала аналита (ЦТР) в образцах УМ и ДМ при 100-кратном разбавлении составляет 5–6 раз, уменьшаясь до 2–3 раз при 400-кратном разбавлении и почти полностью исчезая только в случае 1000-кратного разбавления (рис. 6.26б).

Стоит отметить, что ГКР-спектры образцов мочи, полученные с использованием МНЧ, не имеют интенсивных пиков, связанных с присутствием эндогенных органических компонентов мочи (например, КРН и МК) (рис. 6.26). Следовательно, уменьшение интенсивности сигнала аналита в УМ по сравнению с сигналом в ДМ можно объяснить конкурентными взаимодействиями, которые происходили на поверхности МНЧ между аналитом и компонентами мочи с низкой КР-активностью, такими как мочевины и неорганические ионы. Обобщённое влияние таких взаимодействий на ГКР-сигнал обсуждено в разделе 1.2 (рис. 1.2б).

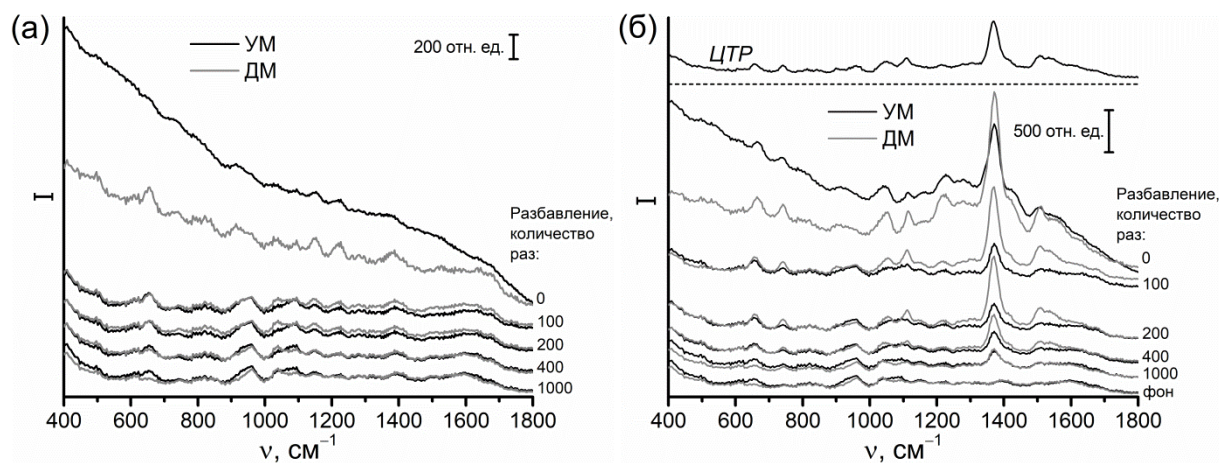


Рис. 6.26. Влияние разбавления на ГКР-спектры образцов мочи, собранных утром (УМ) и днем (ДМ) без (а) и с (б) добавкой ЦТР (50 мкг/мл).

Также установлено, что после разбавления в 1000 раз спектры образцов мочи с добавкой ЦСА и спектры чистых растворов ЦСА (концентрация ЦСА везде одинаковая) имели практически одинаковые и интенсивность, и спектральные профили (рис. 6.27). Этот факт подтверждает, что при такой степени разбавления существует лишь незначительная конкуренция молекул аналита с эндогенными компонентами мочи (при их нормальном содержании в моче) за ГКР-активные центры, и данная ГКР-методика будет достаточно селективной по отношению к ЦСА.

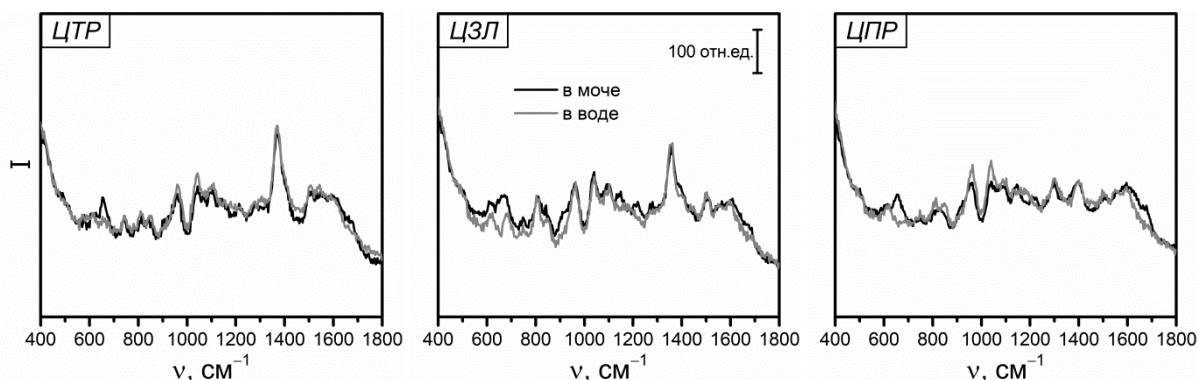


Рис. 6.27. ГКР-спектры (1) образцов мочи с добавкой ЦСА (50 мкг/мл) и разбавленных в 1000 раз и (2) чистых водных растворов ЦСА (0.05 мкг/мл).

Методика анализа и её метрологические характеристики

Окончательная методика ГКР-определения ЦСА (ЦТР, ЦЗЛ, ЦПР) в образцах мочи с использованием МНЧ включает следующие этапы:

- (1) разбавление образца мочи, содержащего аналит, в 1000 раз;
- (2) синтез МНЧ (детальное описание в подразделе 6.3.1);

- (3) смешивание разбавленной мочи (0.2 мл), активирующего агента (NaCl, 1 М, 35 мкл) и синтезированных МНЧ (0.5 мл);
- (4) ГКР-измерения и анализ полученных результатов.

Продолжительность одного цикла анализа не превышает 15 мин. Важно отметить, что из-за низкой химической стабильности МНЧ необходимо использовать для регистрации ГКР-сигнала сразу после синтеза.

Анализ градуировочных зависимостей (рис. 6.28) показал, что ЦПР демонстрирует значительно более низкую степень адсорбции на поверхности МНЧ по сравнению с ЦТР и ЦЗЛ. Так, полученные уравнения зависимостей (табл. 6.3) соответствуют линеаризованной форме изотермы Фрейндлиха, в которой свободный коэффициент прямо пропорционален константе адсорбции и его значение самое низкое для ЦПР. Этот факт объясняет ухудшение таких метрологических характеристик определения ЦПР, как s_T и пределы обнаружения и определения (табл. 6.3).

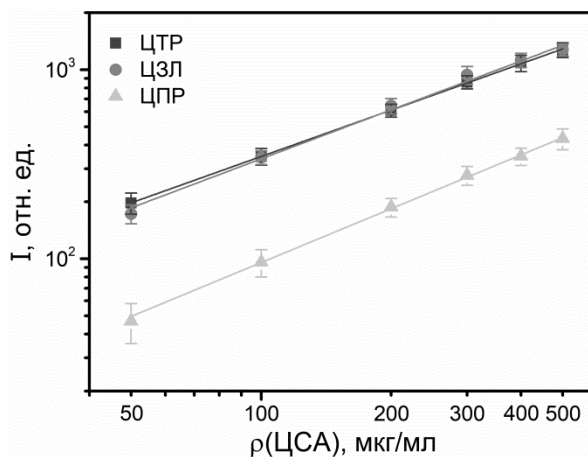


Рис. 6.28. Графики градуировочных зависимостей для определения ЦСА в образцах мочи. Для построения графиков использовали пики при 1368, 1356 и 1299 см^{-1} в случае ЦТР, ЦЗЛ и ЦПР, соответственно.

Дополнительно провели проверку разработанной методики на возможность определения ЦСА в моче с избыточным содержанием некоторых эндогенных компонентов (рис. 6.29). Для этого в образцах мочи с добавками антибиотиков искусственно повышали концентрацию мочевины, КРН, МК, БСА, глюкозы и солей. Увеличение концентрации каждого компонента проводили дискретно (от 1 до 5 раз), при этом величина каждого

шага увеличения концентраций была равна 20, 2, 1, 1 и 1 мг/мл для мочевины, КРН, МК, БСА и глюкозы, соответственно. Выбранные значения концентраций для мочевины, КРН и МК соответствуют их средним концентрациям в моче здорового человека. Данные для солей представлены в подразделе 3.1.1.

Табл. 6.3. Метрологические характеристики методики ГКР-определения некоторых ЦСА в моче (7 образцов) с помощью МНЧ.

Аналит	Уравнение градуировочной зависимости	s_r , %	Прав., %	C_{min} , МКГ/МЛ	C_{lim} , МКГ/МЛ
ЦТР	$\lg(y) = 0.814 \lg(x) + 0.913$ $R^2 = 0.999$	8–13	98–101	7.5	33
ЦЗЛ	$\lg(y) = 0.859 \lg(x) + 0.811$ $R^2 = 0.994$	7–12	93–107	8.8	36
ЦПР	$\lg(y) = 0.945 \lg(x) + 0.090$ $R^2 = 0.998$	10–24	97–106	36	129

Анализ полученных ГКР-спектров ЦСА в образцах мочи показал, что даже резкое увеличение концентраций органических компонентов, а именно мочевины, КРН, МК, БСА или глюкозы (в пять раз относительно их нормальных концентраций в моче), не повлияло на сигнал ЛВ (рис. 6.29а). Однако при увеличении концентрации солей интенсивность сигнала заметно уменьшается (рис. 6.29б). Добавление смеси всех перечисленных эндогенных компонентов (органические соединения плюс соли) также привело к уменьшению интенсивности сигнала до ~75% от исходной интенсивности для ЦТР и ЦЗЛ и до ~90% для ЦПР при пятикратном избытке компонентов мочи (рис. 6.29в). Таким образом, присутствие неорганических ионов является основной причиной снижения сигнала ЛВ в данной методике анализа. Важно отметить, что хотя влияние солей значительно, их концентрация не увеличивается более чем в 2 раза, даже в моче людей с заболеваниями, способствующими повышению их концентрации (сахарный диабет, хронические заболевания почек) [299]. Таким образом, можно сделать вывод, что разработанная методика достаточно точна и в случае

анализа образцов мочи с патологически высокими концентрациями эндогенных компонентов.

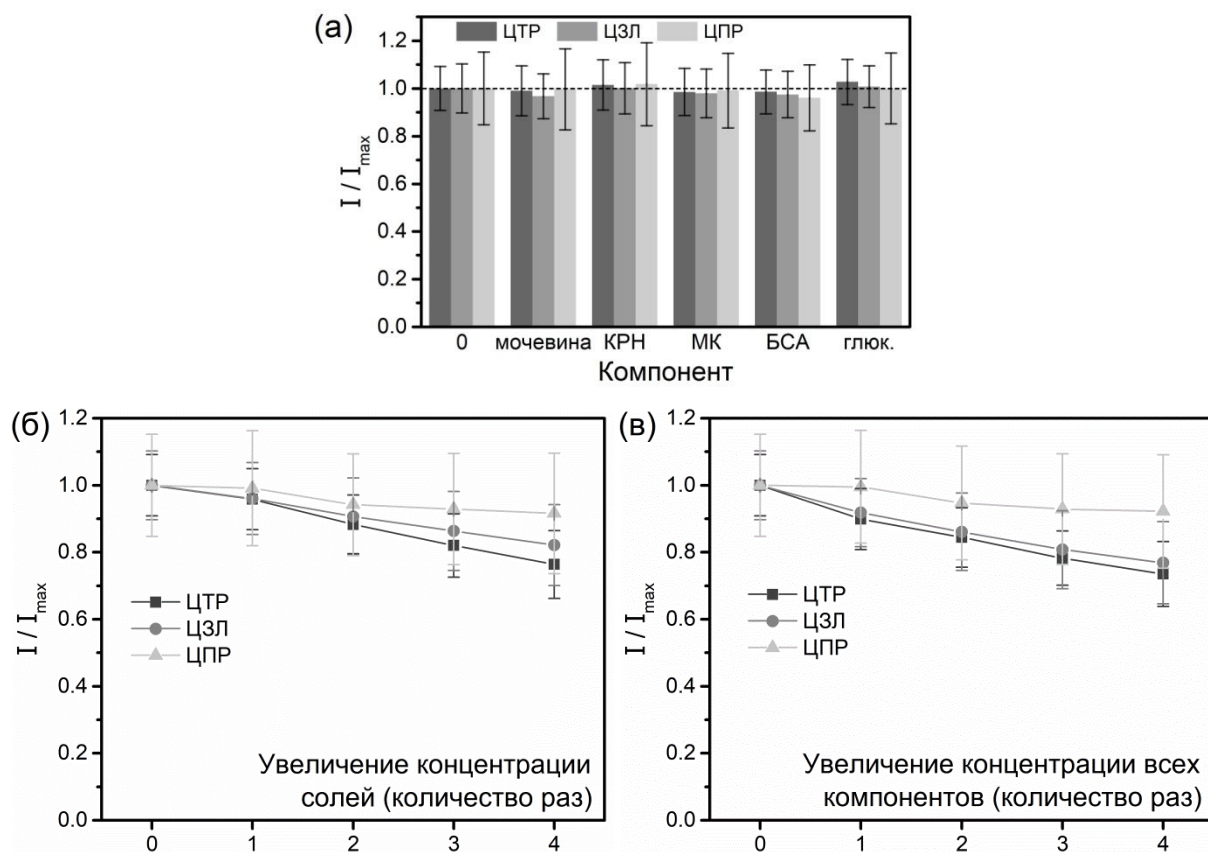


Рис. 6.29. (а) Интенсивности ГКР-спектров ЦТР, ЦЗЛ и ЦПР (все 50 мкг/мл) в моче без (0) и с избыточными концентрациями (в 5 раз относительно нормальных уровней) мочевины (100 мг/мл), КРН (10 мг/мл), МК (5 мг/мл), БСА (5 мг/мл) или глюкозы (5 мг/мл). (б,в) Интенсивности ГКР-спектров ЦТР, ЦЗЛ и ЦПР (все 50 мкг/мл) в моче без (0) и с избыточными концентрациями (относительно нормальных уровней) смеси неорганических солей (б) и смеси всех исследованных компонентов мочи (в). Каждое деление по оси x соответствует дополнительным 20, 2, 1, 1 и 1 мг/мл мочевины, КРН, МК, БСА и глюкозы, соответственно.

6.4. Увеличение химической стабильности медных ГКР-подложек путём создания композитных материалов

Анализ литературы (раздел 6.1), а также методики анализа, приведённой в предыдущем разделе, показал, что высокая реакционная способность медных наноструктур и связанная с ней их недостаточная химическая стабильность во времени приводят к коротким срокам хранения медных ГКР-

подложек. Всё вместе это является основной проблемой, которую необходимо преодолеть для изготовления пригодных для практики и конкурентоспособных медных ГКР-подложек [213].

Хотя воспроизводимые результаты можно получить, используя свежеприготовленные МНЧ, методика не допускает задержек по времени и нуждается в проведении синтеза каждый раз перед измерениями, что осложняет её использование. В качестве возможного решения предложено проведение синтеза медных ГКР-подложек и процедуры ГКР-анализа с использованием проточно-инжекционных систем [136], поскольку это позволит с одной стороны ограничить контакт между МНЧ и воздухом, тем самым снизив скорость их окисления, а с другой – автоматизировать синтез свежих МНЧ. Однако данный подход довольно сложен в реализации с технической точки зрения, поскольку требует применения довольно дорогостоящих прецизионных микроинжекционных и микропоточных систем, качественно совмещёнными с КР-спектрометрами. Наконец, ГКР-активность частично окисленных МНЧ может быть восстановлена добавлением кислот, которые растворяют оксидную плёнку на ГКР-активной поверхности. Однако если окисление было слишком длительным, ГКР-активность не восстанавливается из-за полной потери металлической меди (например, в случае коллоидных МНЧ). Таким образом, предотвращение или замедление окисления наноструктурированной медной поверхности является более оптимальной стратегией, позволяющей избежать необратимой потери ГКР-активности.

В данном разделе приведены разработанные нами подходы по увеличению срока хранения медных ГКР-подложек, которые основаны на создании композитных материалов, таких как (i) микроразмерные структуры типа «ядро-оболочка» с медной наноструктурированной оболочкой и (ii) ГКР-активные сорбенты на основе неорганических матриц (ГГА, микросферы CaCO_3) со встроенными МНЧ. В первом случае увеличение химической стабильности связано с уменьшением удельной площади

поверхности (по сравнению с коллоидными МНЧ, описанными в предыдущем разделе) и, как следствие, значительным уменьшением скорости окисления наноструктурированного медного слоя. Во втором случае увеличение химической стабильности и сроков хранения МНЧ основано на встраивании последних в твёрдую неорганическую матрицу и замедлении диффузии кислорода к поверхности меди.

Все ГКР-измерения в пределах данного раздела проводили с использованием КР-спектрометра Solar ТП, совмещённого с инвертированным микроскопом (100х объектив, 0.9 NA) с конфокальной оптической системой; длина волны лазера – 633 нм, мощность лазера на образце – 5 мВт, время накопления сигнала – 1 с.

6.4.1. ГКР-активные структуры типа «ядро-оболочка» с медным наноструктурированным покрытием

В качестве первого варианта увеличения срока хранения медных ГКР-подложек предложен подход нанесения слоя МНЧ на неорганическую матрицу (сферические микрочастицы CaCO_3 ; $\text{CaCO}_3@Cu$). Микросферы CaCO_3 синтезировали путём быстрого добавления Na_2CO_3 (3 мл, 0.167 М) к CaCl_2 (3 мл, 0.167 М) при непрерывной обработке ультразвуком в течение 100 с в УЗ ванне (35 кГц, 50 Вт). Затем частицы промывали два раза водой и один раз этанолом с последующей сушкой при 60°C в течение 3 ч.

Для нанесения наноструктурированного медного покрытия на поверхность микросфер сначала к 10 мг CaCO_3 добавляли 5 мл CuSO_4 (1 мМ) и перемешивали в течение 3 мин для максимальной адсорбции ионов меди на поверхности CaCO_3 . Этот этап необходим, чтобы инициировать восстановление меди именно на поверхности CaCO_3 , а не в объёме растворителя с образованием коллоидного раствора МНЧ. Затем к смеси добавляли восстановитель (гидразин-гидрат, 150 мкл) и нагревали при помощи МВ воздействия (800 Вт, 20 с) для восстановления медной оболочки на поверхности CaCO_3 . После оседания образца $\text{CaCO}_3@Cu$ (под действием силы тяжести) удаляли 3 мл надосадочной жидкости, а оставшуюся

суспензию хранили в закрытой пластиковой пробирке при комнатной температуре. Отметим, что промывку композита не проводили, поскольку было обнаружено, что добавление этого этапа уменьшает КР-усиление композита, что, предположительно, связано с частичным окислением поверхности меди. Кроме того, промывание даже и не требуется, поскольку прекурсоры и побочные продукты не влияют на фоновый ГКР-сигнал. Напротив, использованный избыток N_2H_4 удаляет кислород из смеси и увеличивает стабильность образца при хранении. Также отметим, что синтез не требует использования стабилизаторов, что приводит к минимизации и фонового сигнала, и конкуренции аналита со стабилизатором.

Проведение синтеза микросфер $CaCO_3$ при постоянном УЗ воздействии позволило получить частицы в ~ 2.5 раза меньшего размера по сравнению с методикой, использующей механическое перемешивание магнитной мешалкой (раздел 4.4). Так, согласно СЭМ-изображениям, размер конечного композита составляет 1.4 ± 0.4 мкм ($s_r \sim 28\%$, $N = 200$) (рис. 6.30а,б). В итоге такие частицы медленнее оседают и полностью покрываются оболочкой меди при синтезе. Хотя результаты СЭМ не позволяют провести различие между МНЧ и $CaCO_3$, композит $CaCO_3@Cu$ имеет тёмно-красный цвет, а результаты измерения ЭДРС подтверждают присутствие медной оболочки в композите, предварительно отмытом от ионов меди (рис. 6.30в).

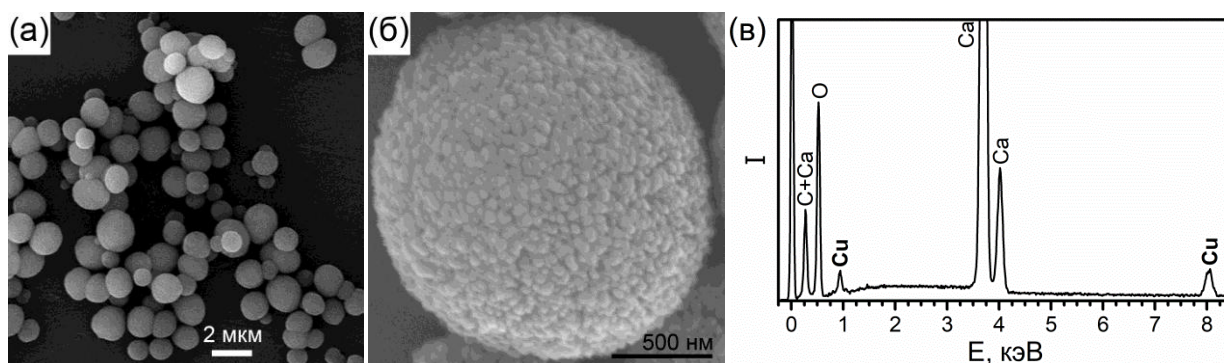


Рис. 6.30. СЭМ-изображения (а,б) и ЭДРС-спектр (в) микросфер $CaCO_3@Cu$.

Сравнение стабильности ГКР-сигнала ЦТР во времени, полученного образцами МНЧ и $CaCO_3@Cu$, показало, что $CaCO_3@Cu$ генерируют стабильный ГКР-сигнал в течение не менее 4 дней после приготовления, в то

время как интенсивность сигнала от МНЧ падает на 50% всего за 30 мин (рис. 6.31). Таким образом, создание наноструктурированных медных покрытий в виде структур типа «ядро-оболочка» является действенным способом получения медных ГКР-подложек с увеличенной химической стабильностью и пригодных для использования в ГКР-анализе вместо МНЧ. К тому же для создания таких структур можно использовать CaCO_3 со встроенными НЧ магнетита (подраздел 4.5.2), открывая возможность проведения, например, экстракционного концентрирования при больших соотношениях «анализируемый раствор – ГКР-подложка».

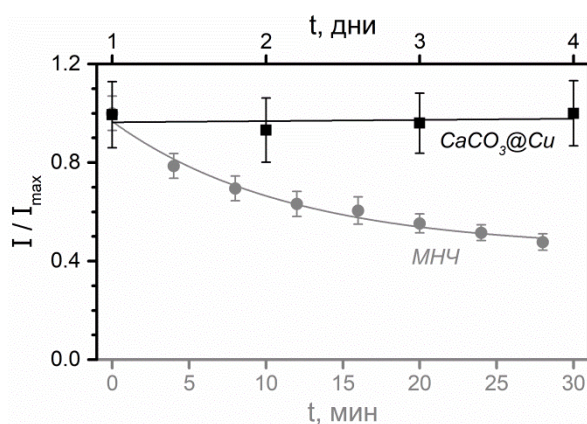


Рис. 6.31. Влияние времени хранения МНЧ и $\text{CaCO}_3@Cu$ на интенсивность ГКР-сигнала ЦТР (5 мкг/мл, пик при 1368 см^{-1}).

6.4.2. ГКР-активные сорбенты со встроенными медными наночастицами

Синтез МНЧ и влияние pH на их стабильность и усиливающие свойства

В данном разделе для встраивания в неорганические матрицы (ГГА и микросферы CaCO_3) использовали МНЧ, полученные путём восстановления ионов меди борогидридом натрия в водной среде и стабилизированные АК. К смеси 4.25 мл воды, 250 мкл CuSO_4 (0.1 М) и АК (44 мг) добавляли свежеприготовленный раствор NaBH_4 (500 мкл; 4 мг/мл в холодной воде, 4°C). Добавление NaBH_4 осуществляли порциями (по 100 мкл) каждые 30 с при одновременной УЗ обработке и перемешивании. После завершения добавления NaBH_4 суспензию МНЧ в АК дополнительно обрабатывали УЗ в течение 3 мин и использовали для ГКР-измерений или встраивания в ГГА

или CaCO_3 . По данным СЭМ средний диаметр МНЧ составляет 10 ± 2 нм ($s_r \sim 20\%$), причём распределение по размерам МНЧ говорит об их полидисперсности (рис. 6.32а,б). Спектр поглощения свежеприготовленной суспензии МНЧ имеет плазмонный пик при 585 нм и достаточно высокую оптическую плотность в красной области спектра (рис. 6.32в), что указывает на значительную агрегацию МНЧ и слабые стабилизирующие свойства АК.

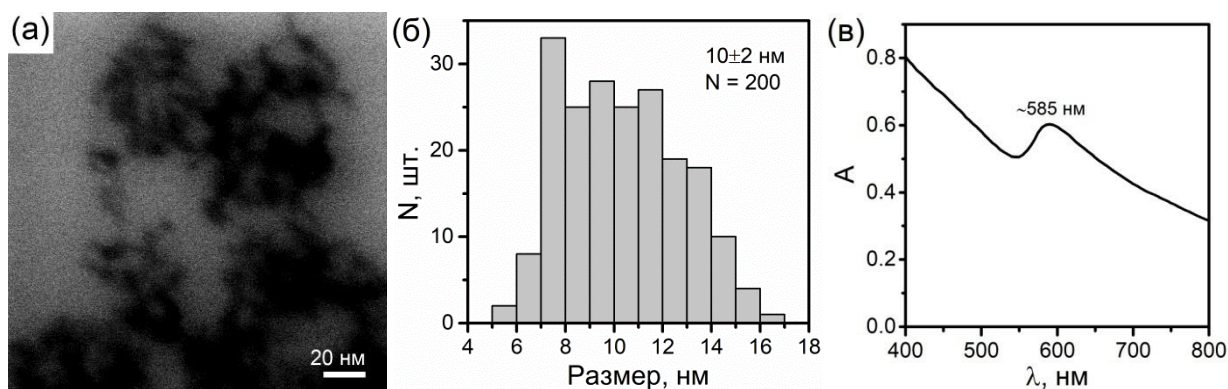


Рис. 6.32. СЭМ-изображение МНЧ, стабилизированных АК (а), гистограмма их распределения по размеру (б) и спектр поглощения (в).

Реакция синтеза МНЧ (табл. 6.4-1) [252] протекает очень быстро из-за высоких восстановительных свойств NaBH_4 (табл. 6.4-2) и достаточно высоких окислительных свойств ионов Cu^{2+} в кислой среде (табл. 6.4-3). Добавление NaBH_4 проводили порционно, поскольку быстрое добавление сразу всего объёма реагента приводит к образованию слишком мелких МНЧ с очень низкой и коллоидной, и химической стабильностью. Следует отметить, что NaBH_4 быстро разлагается в воде из-за гидролиза (табл. 6.4-5), и именно этот процесс не позволяет использовать NaBH_4 для долговременной защиты МНЧ от окисления. Поэтому для защиты МНЧ от окисления кислородом воздуха использовали раствор АК, в котором и хранили готовые МНЧ. Отметим, что АК является относительно слабым стабилизатором, что обеспечивает лёгкое замещение её молекул на поверхности МНЧ молекулами аналита, но в то же время приводит к недолговременной коллоидной стабильности МНЧ, которые флокулируют в течение 10–15 мин. Однако, в случае необходимости, обработка в УЗ ванне

позволяет ресуспензировать МНЧ и снова сделать их пригодными для встраивания в неорганические матрицы.

Табл. 6.4. Химическая реакция синтеза МНЧ путём восстановления ионов меди(II) с помощью NaBH_4 (1), связанные с ней окислительно-восстановительные полуреакции реагентов (2,3), а также (полу)реакции побочных процессов (4,5) [252].

Уравнения		
1	$2\text{CuSO}_4 + \text{NaBH}_4 + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{Cu} + 2\text{H}_2 + \text{H}_3\text{BO}_3 + \text{NaHSO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$	
2	$\text{H}_3\text{BO}_3 + 7\text{H}^+ + 8e^- \leftrightarrow \text{BH}_4^- + 3\text{H}_2\text{O}$	$E^\circ = -0.481 \text{ В}$
3	$\text{Cu}^{2+} + 2e^- \leftrightarrow \text{Cu}^0(\text{ТВ})$	$E^\circ = +0.337 \text{ В}$
4	$\text{Cu}_2\text{O}(\text{ТВ}) + \text{H}_2\text{O} + 2e^- \leftrightarrow 2\text{Cu}^0(\text{ТВ}) + 2\text{OH}^-$	$E^\circ = -0.360 \text{ В}$
	$\text{NaBH}_4 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NaBO}_2 + 4\text{H}_2\uparrow$	
5	$4\text{NaBO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow 2\text{NaOH} + \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 + 7\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow 2\text{NaOH} + 4\text{H}_3\text{BO}_3$	

Установлено, что в нейтральной и щелочной средах ГКР-активность МНЧ значительно снижается по сравнению с кислой средой. Например, промывка образца МНЧ водой или восстановление МНЧ без добавления АК приводили к исчезновению ГКР-активности (по сигналу Р6Ж). Мы объясняем этот результат частичным окислением поверхности МНЧ с образованием CuO в нейтральной среде и Cu_2O в щелочной среде [216]. Анализ стандартных окислительно-восстановительных потенциалов металлической меди показал, что в щелочной среде её потенциал снижается на $\sim 0.7 \text{ В}$, приводя к сильному повышению восстановительных свойств (табл. 6.4-4). При этом повышение рН раствора происходит из-за гидролиза NaBH_4 (табл. 6.4-5), что в конечном итоге облегчает окисление МНЧ кислородом воздуха.

Проведено дополнительное изучение усиливающих свойств МНЧ в диапазоне рН 1–3 с использованием более сильных кислот (HCl и H_2SO_4) (рис. 6.33). Установлено, что между значениями рН 2 и 3 реализуется их относительно одинаковое влияние на интенсивность ГКР-сигнала. Однако дальнейшее понижение рН привело к значительно большему росту

интенсивности сигнала в случае HCl. Как и в случае использования NaCl в качестве активатора ГКР-подложек, мы связываем этот эффект с адсорбцией ионов хлора на поверхность МНЧ, которые затем выступают как отрицательно заряженные линкеры для положительно заряженных (протонированных) молекул аналита [300]. Помимо усиления адсорбции, образование таких поверхностных комплексов также может вносить вклад в химический механизм усиления КР-сигнала [301]. Таким образом, в дальнейшей работе с ГКР-активными сорбентами для растворения матриц композитов (ГГА, CaCO₃), высвобождения МНЧ и достижения максимальной интенсивности ГКР-спектров использовали HCl. Однако присутствие HCl способствует окислению МНЧ кислородом воздуха и образованию растворимого хлорида меди, поскольку присутствие ионов хлора снижает электродный потенциал меди. Поэтому ГКР-анализ с использованием МНЧ и ГКР-активных сорбентов на их основе необходимо проводить в течение 10–15 мин после растворения матрицы сорбента.

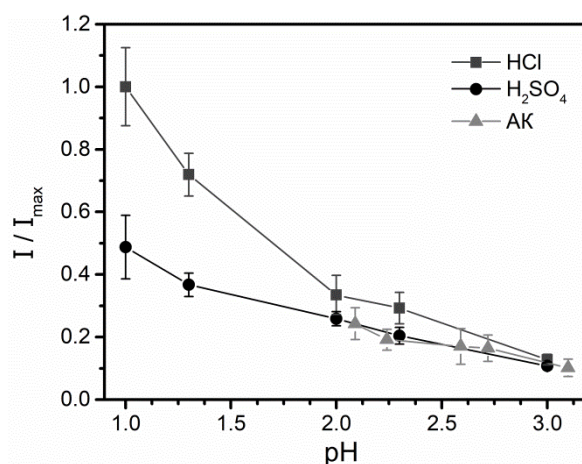


Рис. 6.33. Влияние pH и природы кислоты на ГКР-сигнал, полученный с использованием МНЧ (по интенсивности ГКР-пика Р6Ж (1 мкМ) при 612 см⁻¹).

Синтез ГГА со встроенными МНЧ

Встраивание МНЧ в матрицу ГГА (ГГА-МНЧ) проводили аналогично методике синтеза Al₂O₃-СНЧ (раздел 4.3), но без стадии высушивания, поскольку при нагреве большое содержание воды в образце способствует быстрому окислению встроенных МНЧ. СЭМ-исследования не позволили продемонстрировать присутствие МНЧ внутри ГГА-МНЧ, поскольку медь

имеет низкий контраст по сравнению с матрицей ГГА (рис. 6.34а). Поэтому для доказательства успешного встраивания МНЧ и их сохранения после стадий промывки использовали ЭДРС (рис. 6.34б).

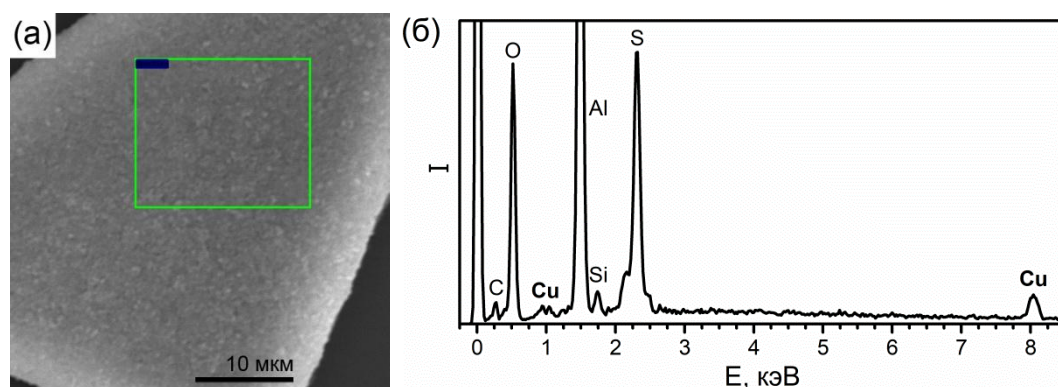


Рис. 6.34. СЭМ-изображение (а) и спектр ЭДРС (б) высушенного образца ГГА-МНЧ. Квадрат на СЭМ-изображении указывает область, откуда проводилась регистрация спектра ЭДРС.

Синтез микросфер CaCO_3 со встроенными МНЧ

Микросферы CaCO_3 со встроенными МНЧ (CaCO_3 -МНЧ) получали по методике аналогичной методике синтеза CaCO_3 -СНЧ (раздел 4.4). В данном синтезе этап высушивания не влиял на усиливающие свойства встроенных МНЧ, поскольку его осуществляли после предварительной промывки образца этанолом для удаления воды и ускорения высушивания. Образец CaCO_3 -МНЧ представляет собой порошок, состоящий из сферических микрочастиц диаметром 3.4 ± 0.3 мкм ($s_r \sim 9\%$, рис. 6.35). Выход синтеза составил $71 \pm 2\%$ ($N = 10$), что примерно на 20% ниже, чем для CaCO_3 -СНЧ (раздел 4.4). Снижение выхода объясняется влиянием избытка АК, используемой для стабилизации МНЧ, которая вступает в реакцию с Na_2CO_3 , используемым для синтеза CaCO_3 . Этим же можно объяснить немного меньший и более однородный размер частиц CaCO_3 -МНЧ по сравнению с CaCO_3 -СНЧ.

Успешное встраивание МНЧ в матрицу CaCO_3 и их сохранение после нескольких стадий промывки доказано с использованием измерения спектров ДОС (рис. 6.36а) и ЭДРС (рис. 6.36б). Среднее содержание меди в CaCO_3 -МНЧ составило ~ 2.1 мкмоль ($s_r 3\%$) на навеску CaCO_3 -МНЧ, используемую

для ГКР-анализа (10 мг) (рис. 6.36в). Это значение согласуется с теоретически рассчитанным содержанием меди в навеске композита (2.0 мкмоль). Таким образом, полученные результаты демонстрируют высокую воспроизводимость синтеза CaCO_3 -МНЧ.

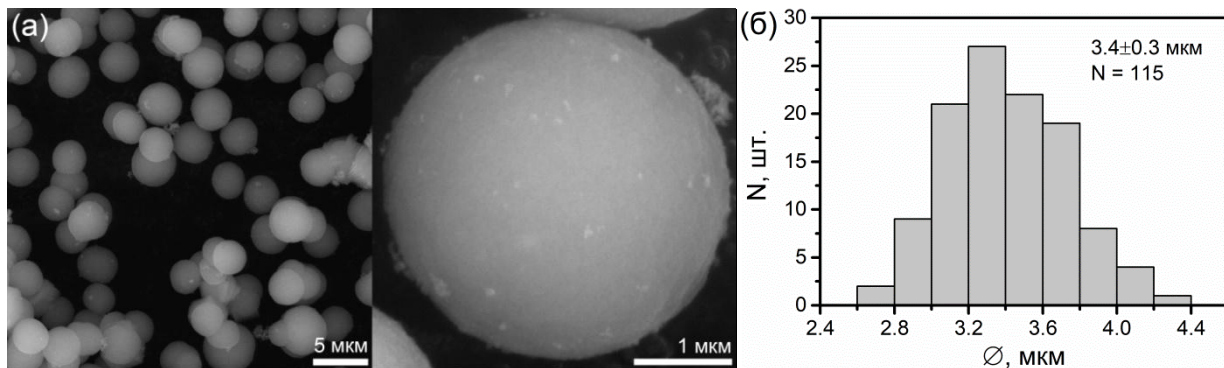


Рис. 6.35. СЭМ-изображения микрочастиц CaCO_3 -МНЧ (а) и гистограмма их распределения по размеру (б).

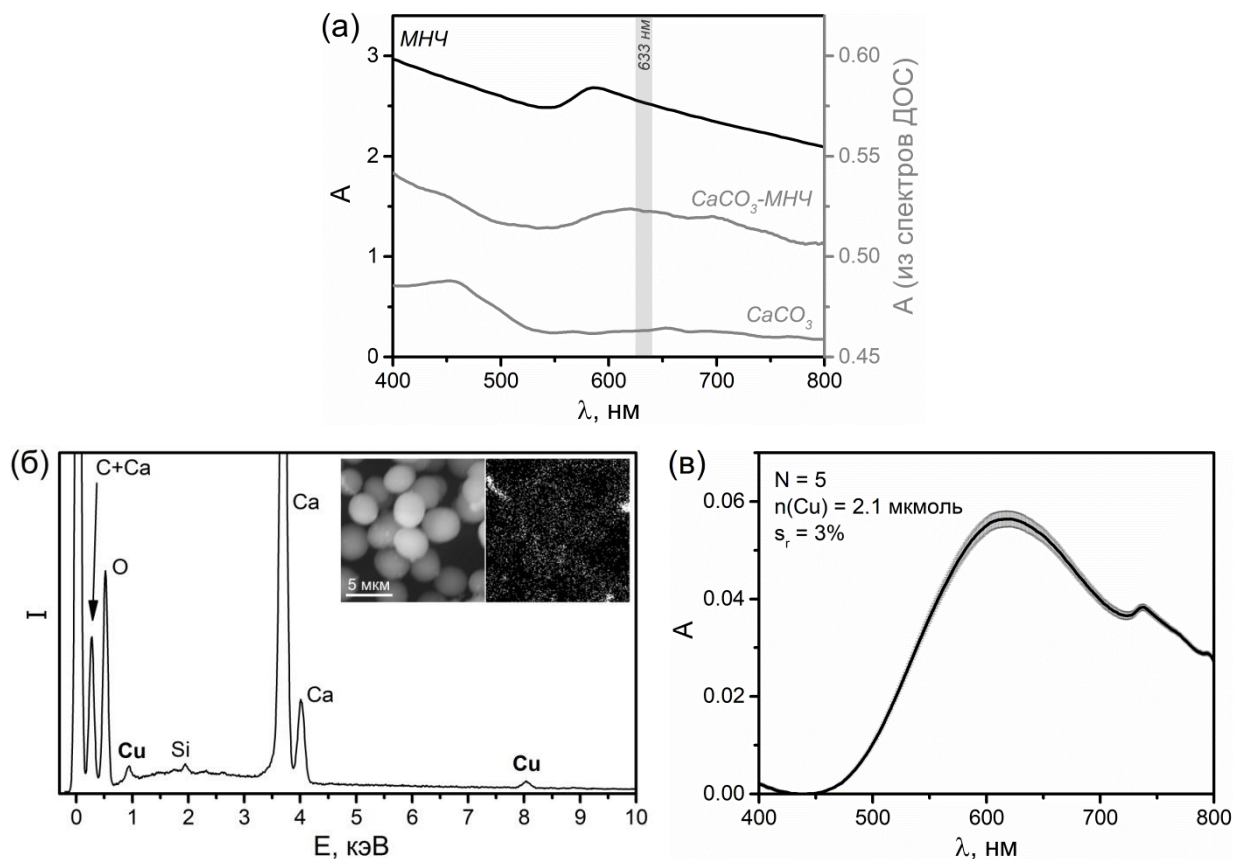


Рис. 6.36. (а) Спектры поглощения раствора МНЧ, сухого порошка CaCO_3 -МНЧ и порошка чистого CaCO_3 . Спектры поглощения для CaCO_3 -МНЧ и CaCO_3 были пересчитаны из спектров ДОС. (б) ЭДРС-спектр порошка CaCO_3 -МНЧ. (в) Спектр поглощения комплекса $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$, усредненный по результатам измерений 5 навесок образцов CaCO_3 -МНЧ (от разных синтезов), растворенных в HCl и содержащих добавку избытка $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ для образования комплекса.

6.4.3. Стабильность во времени усиливающих свойств медных наночастиц в ГКР-активных сорбентах

ГКР-анализ с использованием ГКР-активных сорбентов с МНЧ включал предварительную ТФЭ на них молекул аналита с дальнейшим растворением матрицы сорбента и высвобождением МНЧ и аналита перед регистрацией ГКР-спектров. Таким образом, матрица ГГА и CaCO_3 служила не только в качестве временного защитника МНЧ от окисления во время хранения, но и для первоначальной сорбции (экстракции) аналитов из анализируемого раствора.

В случае CaCO_3 -МНЧ методику ТФЭ-ГКР-анализа проводили аналогично методике, разработанной для CaCO_3 -СНЧ (раздел 4.4). В случае ГГА-МНЧ методика анализа включала смешивание 100 мкл геля и 100 мкл раствора аналита с последующим встряхиванием смеси в течение 10 минут для завершения сорбции. Затем гель осаждали центрифугированием (5 мин, $1700 \times g$), надосадочный раствор удаляли, осадок сорбента растворяли с помощью HCl (1 М, 100 мкл) и полученный раствор использовали для регистрации ГКР-сигнала.

Исследование стабильности усиливающих свойств суспензии МНЧ во времени в растворе АК показало довольно быстрое снижение ГКР-активности (интенсивности ГКР-сигнала РБЖ) со временем (рис. 6.37). Тем не менее, АК увеличивает стабильность МНЧ по сравнению с ранее описанными МНЧ, приготовленными без стабилизатора [230] или стабилизированными цитрат-ионами (рис. 6.22а) [229], которые теряют половину ГКР-активности в течение 30 мин. В то же время, проверка ГКР-активности CaCO_3 -МНЧ показала, что, в отличие от растворов коллоидных МНЧ, их усиливающие свойства сохраняются в течение 120 дней (4 месяца) (рис. 6.37) и за исследованный период времени усиление снизилось всего на 3%. В случае ГГА-МНЧ временная стабильность ГКР-активности приблизительно в 80 раз лучше по сравнению с коллоидными МНЧ и позволяет применять его в ГКР-анализе в течение примерно одной недели

(рис. 6.37). Улучшение временной стабильности в случае обоих разработанных композитов объясняется механической защитой МНЧ от кислорода воздуха с помощью твёрдой матрицы CaCO_3 или ГГА. Намного большая временная стабильность CaCO_3 -МНЧ по сравнению с ГГА-МНЧ объясняется хранением CaCO_3 -МНЧ в сухом состоянии, что существенно замедляет окисление МНЧ. Таким образом, благодаря наилучшим срокам хранения далее все дальнейшие исследования по изучению сорбции, усиливающих свойств и разработке методик ГКР-анализа проводили с использованием CaCO_3 -МНЧ.

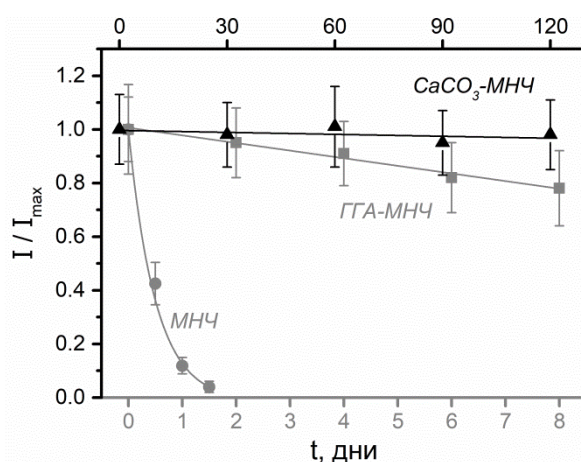


Рис. 6.37. Влияние времени хранения МНЧ и ГГА-МНЧ (нижняя ось x), а также CaCO_3 -МНЧ (верхняя ось x) на ГКР-сигнал Р6Ж (1 мкМ, по пику при 612 см^{-1}).

Предварительное исследование сорбционной способности CaCO_3 -МНЧ показало, что 10 мин является оптимальным временем сорбции Р6Ж (рис. 6.38а). В ходе анализа графиков градуировочных зависимостей (рис. 6.38б) установлено, что использование CaCO_3 -МНЧ позволяет достичь большей чувствительности анализа. Так, расчёт пределов обнаружения для Р6Ж с использованием МНЧ и CaCO_3 -МНЧ в качестве ГКР-подложек показал, что этап ТФЭ позволил снизить предел обнаружения примерно на 3 порядка. Более того, значения c_{\min} примерно одинаковы в случае использования CaCO_3 -МНЧ и CaCO_3 -СНЧ ($3.8 \cdot 10^{-11} \text{ М}$ против $2.9 \cdot 10^{-11} \text{ М}$, рис. 4.23а), что наглядно демонстрирует конкурентоспособность медных ГКР-подложек (и ГКР-активных сорбентов со встроенными МНЧ).

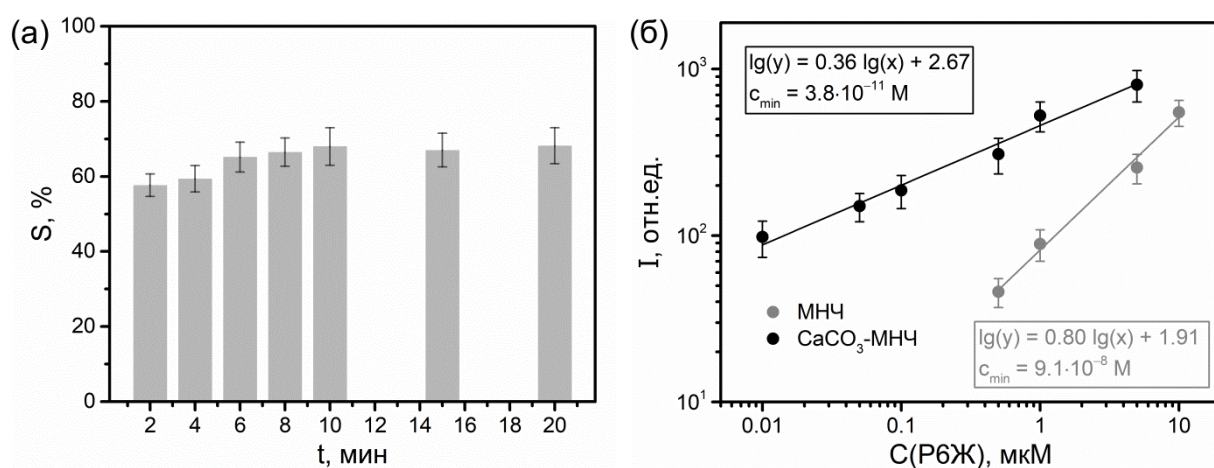


Рис. 6.38. (а) Зависимость степени сорбции Р6Ж (10^{-7} М) на CaCO_3 -МНЧ от времени контакта аналита с сорбентом. Результаты получены с использованием спектрофлуориметрии. (б) Зависимость интенсивности ГКР-сигнала от концентрации Р6Ж (по ГКР-пику при 612 см^{-1}); результаты получены с использованием CaCO_3 -МНЧ, а также МНЧ в качестве контроля.

Табл. 6.5. Сравнение ГКР-активности подложек на основе меди, полученных в диссертационной работе (первая строка), с результатами из литературы; все результаты были получены для Р6Ж в качестве модельного аналита. КУ – коэффициент усиления; Γ – графен; вОГ – восстановленный оксид графена.

ГКР-подложка	Длина волны возбуждающего излучения, нм	КУ	Ссылка
МНЧ		$6.2 \cdot 10^6$	–
CaCO_3 -МНЧ		$4.3 \cdot 10^8$	–
Кремниевая пластинка@МНЧ		$2.3 \cdot 10^7$	[302]
Нанополоски $\text{Cu}(\text{VO}_3)_2$ @МНЧ	633 (резонансная λ для МНЧ)	$7.7 \cdot 10^7$	[244]
Медная поверхность с микроцарапинами		$2.8 \cdot 10^5$	[303]
Медная поверхность с нанополостями		$3 \cdot 10^6$	[241]
МНЧ		$6 \cdot 10^8$	[261]
Нанопористая медная фольга	532 (резонансная λ для Р6Ж)	$2.5 \cdot 10^5$	[231]
МНЧ@Г		$1.2 \cdot 10^6$	[304]
МНЧ/вОГ		$2.8 \cdot 10^6$	[305]

Наконец, сравнение значений КУ разработанных МНЧ и CaCO_3 -МНЧ с другими ГКР-активными материалами на основе медных наноструктур, представленными в литературе (табл. 6.5), показало, что они демонстрируют сопоставимые усиливающие свойства. Однако в опубликованных ранее работах по медным ГКР-подложкам совершенно не оценивали стабильность их усиливающих свойств во времени, что является серьезным недостатком.

6.4.4. Детектирование антибиотиков с использованием микросфер CaCO_3 со встроенными медными наночастицами

Для более гибкого использования CaCO_3 -МНЧ в ГКР-анализе разработаны и протестированы два формата методик анализа (рис. 6.39). Первый формат подразумевает использования CaCO_3 -МНЧ в качестве ГКР-активного сорбента и проведение ТФЭ перед ГКР-измерениями. Во втором формате подразумевается, что CaCO_3 -МНЧ используется только как форма долговременного хранения МНЧ и при проведении ГКР-анализа матрицу CaCO_3 сразу растворяют добавлением подкисленного раствора аналита. Формат I тестировали с использованием ЦТР в качестве целевого аналита, формат II тестировали с использованием СДМ.

Анализ ГКР-спектров ЦТР и СДМ, полученных с использованием CaCO_3 -МНЧ, показал, что они полностью согласуются с ГКР-спектрами этих веществ в кислых средах, полученными ранее с использованием СНЧ (рис. 2.10б). Графики градуировочных зависимостей для обоих веществ представлены на рис. 6.40а и метрологические характеристики для каждого формата методик приведены в таблице 6.6. Оценка степень сорбции ЦТР на CaCO_3 -МНЧ с помощью спектрофотометрии показала значения 47.5% и 44.4% для 100 и 500 мкг/мл, соответственно. Несмотря на то, что степень сорбции является средней, этого достаточно для точного ГКР-детектирования антибиотика.

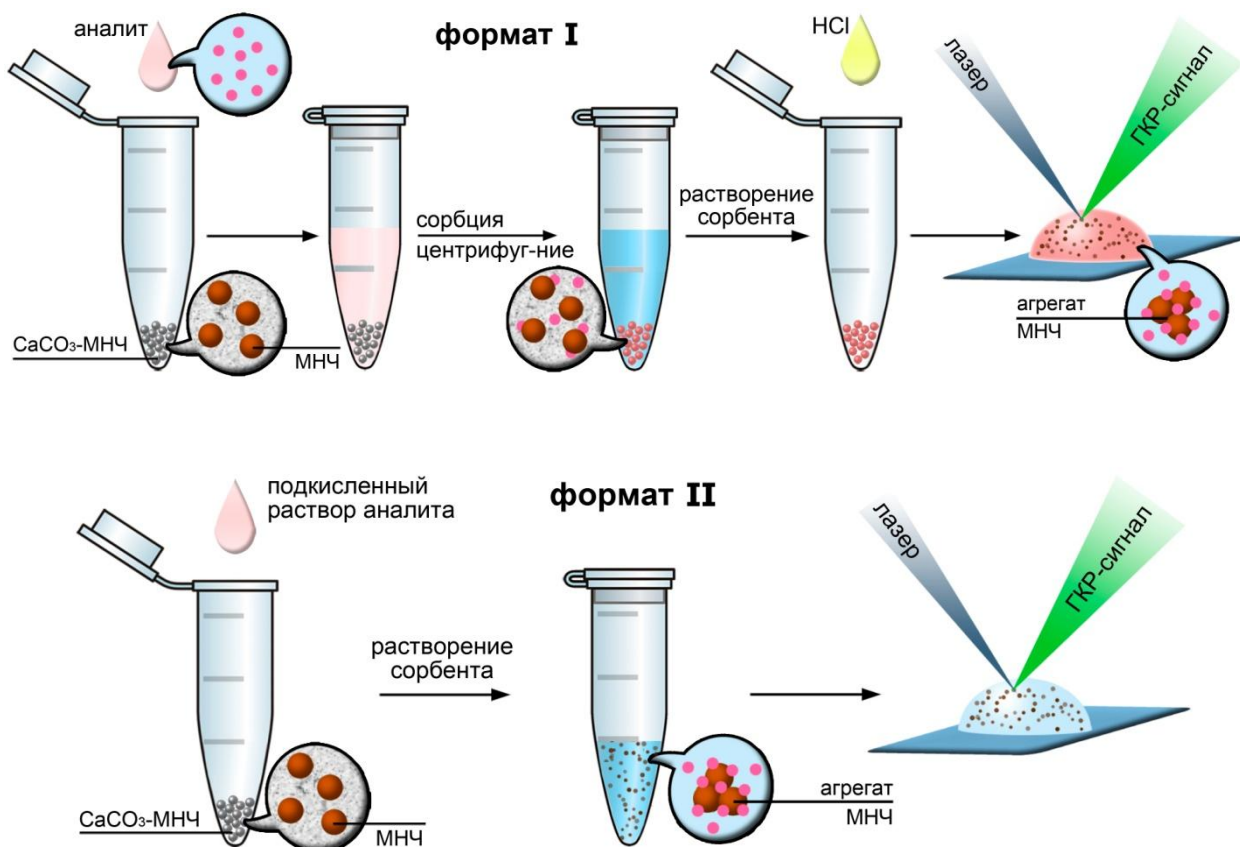


Рис. 6.39. Схемы форматов анализа с использованием CaCO₃-МНЧ.

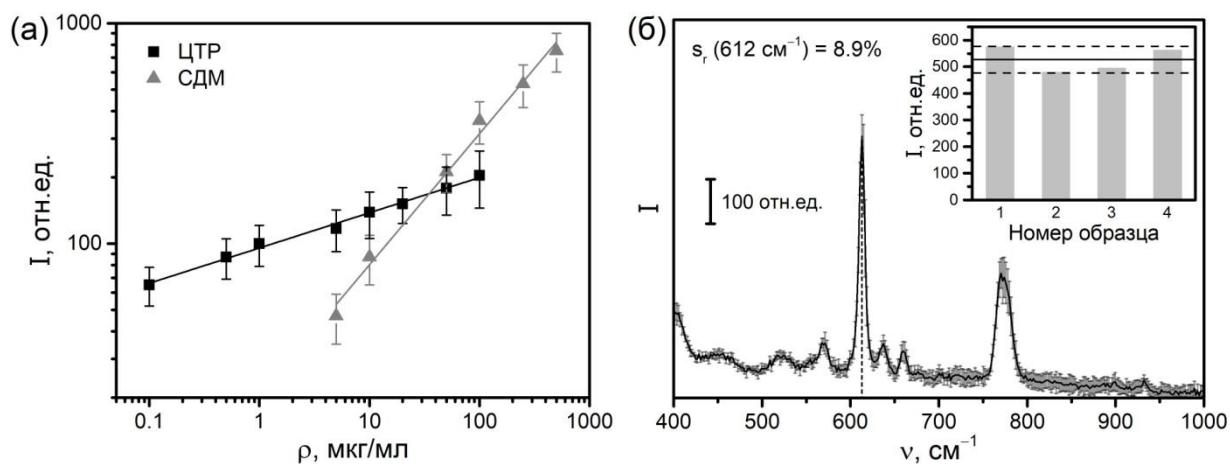


Рис. 6.40. (а) Зависимости ГКР-сигнала от концентрации ЦТР (по пику при 1368 см⁻¹) и СДМ (по пику при 1074 см⁻¹), полученные с использованием форматов анализа I и II для ЦТР и СДМ, соответственно. (б) ГКР-спектр Р6Ж (1 мкМ), усредненный по 4 спектрам, полученным при использовании образцов CaCO₃-МНЧ от разных синтезов.

Погрешность измерения аналитического ГКР-сигнала при проведении анализа с помощью разработанных методик имеет достаточно высокие значения (18–26%), однако значения правильности находятся на приемлемом для ТЛМ уровне (табл. 6.6). Ранее нами (разделы 3.2, 4.4) и другими исследователями [5,10,17,31,80,169,185,306] были получены сопоставимые

значения s_r при использовании других видов ГКР-подложек и конфокальной оптической системы при регистрации ГКР-сигнала. Таким образом, случайная погрешность в случае разработанной методики связана в первую очередь с чувствительностью оптической системы к локальной неоднородности образцов, а не с предложенной медной ГКР-подложкой. Также, учитывая, что в данном исследовании впервые получены ГКР-активные медные структуры с химической стабильностью более одного месяца, то композит CaCO_3 -МНЧ является действительно конкурентоспособной заменой ГКР-подложкам на основе благородных металлов.

Табл. 6.6. Метрологические характеристики разработанных методик определения антибиотиков с использованием CaCO_3 -МНЧ.

Аналит	Формат анализа	Уравнение градуировочной зависимости	s_r , %	Прав., %	C_{\min} , мкг/мл	C_{\lim} , мкг/мл
ЦТР	I	$\lg(y) = 0.16 \lg(x) + 1.98$ $R^2 = 0.994$	18–26	95–105	$2.9 \cdot 10^{-5}$	$5.5 \cdot 10^{-2}$
СДМ	II	$\lg(y) = 0.59 \lg(x) + 1.31$ $R^2 = 0.991$	18–25	87–113	1.3	9.9

6.5. Спектроэлектрохимический анализ с использованием медных ГКР-активных электродов

Эффект ГКР впервые был обнаружен при изучении адсорбции молекул пиридина на поверхности ЭХ огрубленных серебряных электродов [258]. По сравнению с обычным ГКР, ЭХ формат ГКР-анализа (ЭХ-ГКР) основан на регистрации спектров молекул аналита, адсорбированных на поверхности ГКР-активного электрода при контролируемой величине поляризации данного электрода. Таким образом, ЭХ-ГКР обеспечивает дополнительный контроль над величиной адсорбции (особенно в случае заряженных молекул) и, как следствие, интенсивностью ГКР-сигнала, а также окислительно-восстановительным состоянием молекул аналитов вблизи ГКР-подложки

[307]. Поэтому ЭХ-ГКР традиционно использовали для исследования ЭХ реакций, процессов коррозии и их ингибирования, а также для спектроскопического изучения свойств наноструктурированных металлических поверхностей и их взаимодействия с различными молекулами [308–310].

Помимо определения таких стандартных параметров как оптимальные значения pH и степени разбавления исследуемых образцов, в ЭХ-ГКР-анализе также необходимо определить величину поляризации ГКР-активного электрода, при которой достигается максимально интенсивный ГКР-сигнал исследуемого вещества (U_{\max}). При данном значении поляризации достигается максимальная чувствительность анализа. Более того, если компоненты анализируемой смеси имеют достаточно большую разницу в значениях U_{\max} (>0.5 В), появляется возможность использования поляризации ГКР-активного электрода и для улучшения селективности ГКР-определения [311]. И, наоборот: при совпадении значений U_{\max} для аналитов и мешающих компонентов наблюдалось значительное снижение интенсивности сигнала аналита в смеси по сравнению с чистым раствором аналита [312,313] и/или доминирование ГКР-сигнала примесного соединения [314]. В таких случаях для устранения конкурентных взаимодействий на поверхности ГКР-активного электрода применяли предварительную обработку образца с помощью ТФЭ или ЖЖЭ [315–317], коррекцию значения pH [312,318], химическую модификацию ГКР-активной поверхности [319].

Тем не менее, несмотря на давнюю историю ЭХ-ГКР, анализ БЖЧ с использованием данного подхода развит крайне слабо. Например, в ряде работ предложены методики ЭХ-ГКР-детектирования МК [312,318,320] и ЛЕВО [56] в образцах ИМ, имеющих крайне упрощённый и постоянный состав, не соответствующий параметрам реальной мочи. Также было предложено много вариантов конструкций ячеек для проведения спектроскопического ГКР-анализа [56,315,316,319,321,322], которые зачастую имеют довольно сложное строение и в основном разработаны для

использования с КР-спектрометрами, совмещёнными с оптическими микроскопами, что затрудняет их использование с портативными вариантами КР-спектрометров с простыми оптоволоконными зондами.

Таким образом, целью данного раздела стала разработка ЭХ ячейки и методики проведения спектроэлектрохимических измерений на основе ГКР, позволяющих проводить детектирование ЛВ в образцах реальной мочи. Ранее нами уже было успешно разработано несколько разных методик ГКР-определения САА и ЦСА, в то время как для определения ФХА удалось разработать только одну методику (подраздел 5.4.2). Поэтому работы по ЭХ-ГКР-анализу в первую очередь были направлены на разработку методики детектирования именно ФХА, чтобы расширить возможности ГКР-анализа представителей именно этого класса антибиотиков. Отметим, что представители ФХА подвергаются как протонированию, так и депротонированию, позволяя осуществлять электрофоретическую экстракцию молекул с заряженными фрагментами на поверхности ГКР-активного электрода при ЭХ-ГКР-анализе.

6.5.1. Установка для проведения спектроэлектрохимического ГКР-анализа

Все ЭХ исследования в данном разделе проводили с использованием потенциостата-гальваностата Р-40Х (Electrochemical Instruments) и ЭХ ячейки, состоящей из трёхэлектродной системы с электродами, помещёнными в стандартную кварцевую кювету (10×10×45 мм) с раствором изучаемого образца. Рабочий электрод (РЭ) вырезали из цельной медной пластины (99.9%, 80×10×0.5 мм). Как отмечалось ранее, согласно литературным данным чистота меди не является критически значимым фактором для генерации интенсивного ГКР-сигнала [222,247,248], поэтому в качестве материала РЭ использовали медь стандартной электротехнической чистоты (99.9%) с целью дополнительного повышения доступности ЭХ-ГКР-анализа. Напротив РЭ помещали вспомогательный электрод (ВЭ), который вырезали из графитовой пластины (80×10×1 мм). В нижней части ВЭ было

просверлено отверстие диаметром 3 мм для прохождения лазерного луча и регистрации ГКР-сигнала. Между РЭ и ВЭ помещали микроэлектрод сравнения (МЭС, Ag/AgCl в 3.5 М растворе KCl), который готовили согласно методике Schmidt с соавт. [323] с использованием стеклянного капилляра (внутренний диаметр 1 мм, длина 90 мм). Все три электрода жёстко закрепляли в специально изготовленной пластиковой крышке для кюветы, так чтобы электроды сохраняли своё положение в оптической системе при смене анализируемого образца, а также для облегчения перемещения и промывания электродов. Разработанную ЭХ ячейку использовали для (а) создания/обновления ГКР-активного слоя на поверхности медного РЭ (подраздел 6.5.2), (б) регистрации ГКР-сигнала аналита при приложенном потенциале (подраздел 6.5.3), (в) очистки РЭ путём ЭХ десорбции аналита (подраздел 6.5.4). Схематическое изображение ячейки и указанных процедур приведено в последней части подраздела 6.5.3, вместе с детальным описанием итоговой методики ЭХ-ГКР-анализа.

При кратковременном хранении электродов между измерениями их вынимали из кюветы с анализируемым раствором, ополаскивали дистиллированной водой и помещали в другую кювету с раствором NaCl (100 мМ). Для обеспечения длительного хранения МЭС ополаскивали водой и хранили в растворе KCl (3.5 М), а РЭ и ВЭ ополаскивали водой и хранили в сухом виде, что замедляет окисление медной поверхности (по аналогии с сохранением МНЧ в матрице CaCO₃).

На всех этапах проведения ЭХ-ГКР-измерений в качестве электролита использовали 100 мМ раствор NaCl, который готовили разбавлением физиологического раствора (NaCl, 150 мМ) водой и/или исследуемым образцом, а также, при необходимости, рН-корректирующим раствором (HCl или NaOH). Физраствор выбран в качестве основы для электролита вместо более распространенного в электрохимии KCl благодаря его легкодоступности в любой больнице и, следовательно, больничной лаборатории. Тестовые эксперименты по сравнению NaCl и KCl показали

отсутствие различий в результатах измерения ГКР-сигнала. Также ранее исследователи показали, что ЭХ-ГКР-сигнал пиридина более стабилен во времени в присутствии хлорид-ионов в электролите, в т.ч. при ЭХ активации электродов, по сравнению с иодид- и перхлорат-ионами [324].

ГКР-измерения проводили с использованием портативного КР-спектрометра (QEPro, Ocean Optics) с длиной волны лазера равной 638 нм, мощностью лазера на образце – 18 мВт, числовой апертурой зонда – 0.22 NA, временем накопления сигнала – 1 с. Кювету с размещёнными электродами и подключенными к ним проводами, соединяющими их с потенциостатом, помещали в специальный металлический кюветодержатель (OOA-HOLDER-RFA, Ocean Optics) с зафиксированным в нём оптическим зондом, подключенным к КР-спектрометру. Кюветодержатель оснащён микрометрическими винтами для точного позиционирования кюветы (и электродов) относительно оптического зонда, что позволило осуществить точное фокусирование возбуждающего излучения на поверхности ГКР-активного электрода. Таким образом, достигается жёсткое фиксирование всех элементов оптической системы, обеспечивающее воспроизводимую регистрации ГКР-сигнала с поверхности РЭ. Также благодаря достаточно низкой числовой апертуре зонда (NA 0.22) регистрирующая система имеет низкую чувствительность к неоднородностям ГКР-активной поверхности, и погрешности в позиционировании электродов, возникающие при смене анализируемого раствора и промывке электродов, не влияли на интенсивность регистрируемого сигнала. В результате текущая установка не требует регулировки положения фокусировки перед каждым измерением, что существенно упрощает и ускоряет процедуру анализа и минимизирует ошибки оператора, связанные с выбором места регистрации.

6.5.2. Создание ГКР-активной поверхности медного электрода

Достижение ГКР-активности РЭ (далее – активация) может быть достигнуто различными физическими [325] и (электро)химическими [221,264,326] подходами. Однако ЭХ подходы являются наиболее

предпочтительными, поскольку одно и то же ЭХ оборудование (потенциостат и ЭХ ячейка) может быть использовано и для создания ГКР-активного РЭ, и для проведения ГКР-анализа. ГКР-активность РЭ в случае ЭХ подходов достигают путём (i) катодного осаждения наноструктурированного металлического покрытия [264,322], (ii) анодного травления поверхности электрода [221] и (iii) применения циклов ОВ [321,326].

В текущей работе для активации поверхности медного РЭ мы использовали обработку поверхности с помощью циклов ОВ. Процесс первоначальной ГКР-активации медного РЭ с гладкой поверхностью включает применение десяти циклов ОВ с непрерывной развёрткой значений потенциала (*vs* Ag/AgCl) согласно следующей схеме для каждого цикла: $-100 \text{ мВ} \rightarrow +400 \text{ мВ} \rightarrow -600 \text{ мВ} \rightarrow -100 \text{ мВ}$ (50 мВ/с). Аналогично проводили реактивацию ГКР-активного РЭ после длительного хранения (>8 ч) на воздухе с целью удаления оксидного слоя. Данный подход приводит к минимальным потерям материала электрода, поскольку при нём происходит «реструктуризация» поверхности РЭ путём чередования растворения и осаждения материала электрода. Также данный подход не требует каких-либо специфических реагентов, кроме электролита, и позволяет быстро создавать нанощероховатую поверхность с большим содержанием ГКР-активных центров [327,328].

Из литературы также известно, что максимально интенсивный ГКР-сигнал достигается, когда молекулы аналита адсорбируются на свежеприготовленных ГКР-активных участках [321,329]. В случае ЭХ-ГКР-анализа это легче всего реализовать, проводя повторную активацию непосредственно в анализируемом растворе, содержащем молекулы аналита. Данный тип активации далее будет обозначаться как «*in situ* активация», а активация в растворе чистого электролита – «*ex situ* активация». При этом присутствие молекул аналита практически не влияет на сам процесс ЭХ активации, поскольку их концентрация значительно меньше (на порядки) по

сравнению с ионами электролита, являющихся основными носителями заряда в растворе. Поэтому для *in situ* активации использовали те же значения потенциалов, что и для активации поверхности свежих РЭ. Ранее было показано, что при использовании уже активированных РЭ число циклов ОВ в ходе повторной *in situ* активации пренебрежимо мало влияет на интенсивность полученного ЭХ-ГКР-сигнала [330], поэтому в нашей работе активация включала проведение только одного цикла ОВ.

Важно отметить, что эффективность активации сильно зависит от значения pH раствора. Так, использование щелочных и нейтральных сред ограничивает активацию, поскольку в данных средах на этапе окисления медной поверхности образуются плохо растворимые соединения (Cu_2O (табл. 6.4-4) и $\text{Cu}(\text{OH})_2$, соответственно), препятствующие образованию комплексов «аналит-медь» на ГКР-активных участках. С другой стороны, кислая среда благоприятствует образованию растворимых медных комплексов (например, гидратированных ионов Cu^{2+}), которые могут в дальнейшем реагировать с молекулами аналита с образованием новых комплексов, которые восстанавливаются во время восстановительной части цикла ОВ и способствуют формированию поверхностных комплексов «аналит-медь» и получению более интенсивного ГКР-сигнала. Поэтому в текущей работе активацию (и *ex situ*, и *in situ*) проводили в растворе NaCl (100 мМ) с корректировкой до pH 2 с помощью HCl. При этом использование кислой среды само по себе способствует растворению и удалению оксидного слоя с медной поверхности РЭ.

Наконец следует отметить, что и *ex situ*, и *in situ* активацию необходимо проводить при выключенном лазерном освещении, поскольку ГКР-активные участки и их комплексы с адсорбированными молекулами могут подвергаться фотохимической деструкции из-за высокой плотности мощности сфокусированного возбуждающего излучения и сильного его поглощения материалом подложки [331].

Таким образом, активация поверхности медного РЭ путём его ЭХ обработки позволяет эффективно нивелировать недостаток химической стабильности меди за счёт простого и быстрого получения и регенерации ГКР-активных центров наноструктурированной медной поверхности.

6.5.3. Детектирование фторхинолоновых антибиотиков в моче

Влияние pH и потенциала поляризации РЭ на ЭХ-ГКР-сигнал ЦИПРО

Возникновение и дополнительное усиление интенсивности ГКР-сигнала в случае ЭХ-ГКР-систем основано на (i) увеличении сорбции молекул на поверхность РЭ за счёт электрофоретической экстракции молекул из раствора и (ii) изменении положения уровня Ферми материала РЭ в результате поляризации. Второй эффект обуславливает усиление КР-сигнала за счёт облегчения переноса заряда с ГКР-подложки на молекулы, приводящего к изменению поляризуемости молекул, т.е. за счёт реализации химического механизма усиления. Следовательно, поскольку степень (де)протонирования молекул аналитов сильно влияет на эффективность как электрофоретической экстракции, так и процесса переноса заряда, то в первую очередь изучено влияние значения pH анализируемого раствора на интенсивность и профиль ЭХ-ГКР-спектров, а также на значение U_{\max} .

Измерение ЭХ-ГКР-сигнала осуществляли путём регистрации ГКР-спектров при одновременном контролируемом непрерывном изменении величины поляризации РЭ от +0.2 до -1.0 В (50 мВ/с; vs Ag/AgCl) (рис. 6.41а). Предварительные исследования проводили, используя раствор чистого ЦИПРО (5 мкг/мл в 100 мМ NaCl) без (pH 6) и с корректировкой уровня pH (pH 2 и pH 12) (рис. 6.41б).

Анализ результатов показал, что в отсутствие внешнего приложенного потенциала (разорванная электрическая цепь) и в случае приложенных потенциалов в диапазоне от +0.2 до -0.3 В (vs Ag/AgCl) ГКР-сигнал ЦИПРО на медном ГКР-активном РЭ крайне слабый в средах с изученными значениями pH. Однако изменение потенциала поляризации РЭ в сторону больших отрицательных значений приводит к появлению интенсивных ГКР-

спектров ЦИПРО (рис. 6.41б,в). Примечательно, что U_{\max} во всех средах имеет близкие значения в диапазоне от -0.8 до -1.2 В, однако интенсивность ЭХ-ГКР-спектра ЦИПРО значительно больше в нейтральной среде (рН 6) (рис. 6.41в).

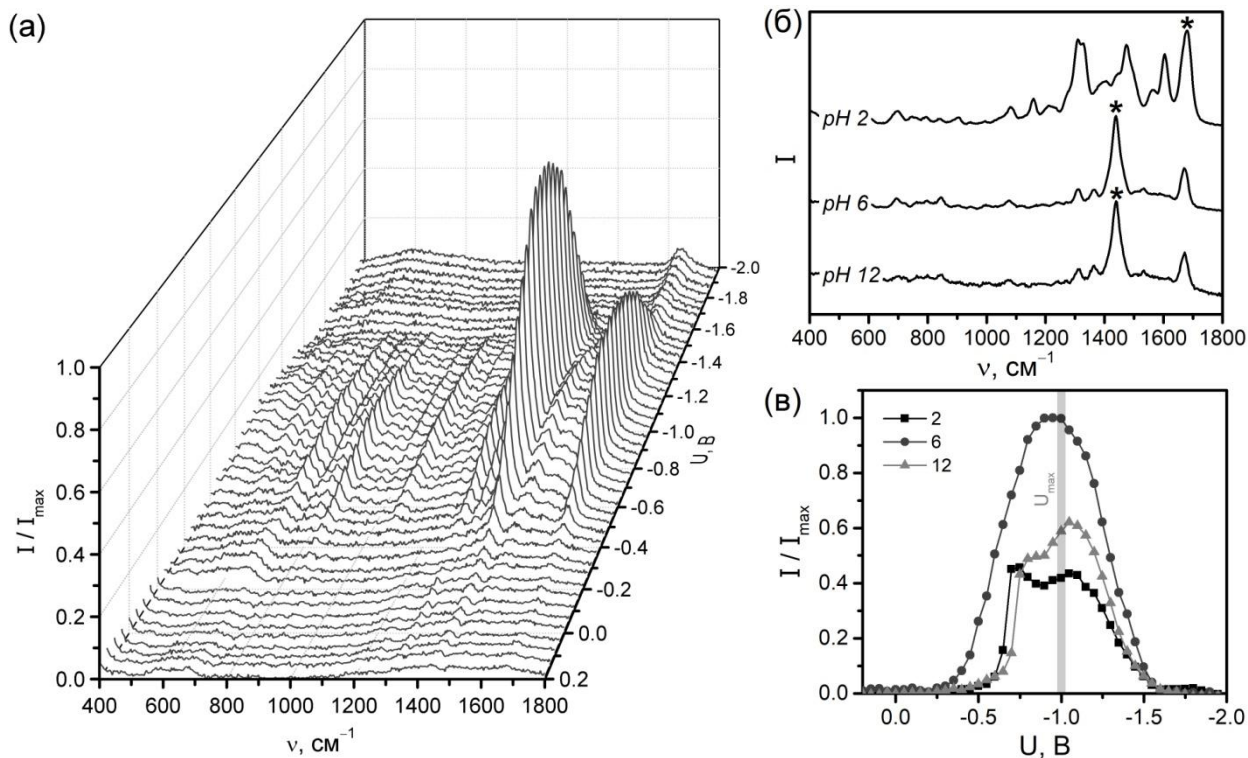


Рис. 6.41. (а) ГКР-спектры ЦИПРО (5 мкг/мл в 100 мМ NaCl, рН 6), полученные при различных значениях поляризации РЭ (*vs* Ag/AgCl). (б) Профили ГКР-спектров ЦИПРО в разных средах при $U = -1.0$ В *vs* Ag/AgCl. (в) Влияние величины приложенного потенциала на интенсивность основных ГКР-пигов ЦИПРО в разных средах (выделены на рис. 6.41б).

Одинаковость спектральных профилей в нейтральной и щелочной средах обусловлена одинаковым электронным строением СР фрагмента ФХА в данных средах. Действительно, в нейтральной среде молекулы ФХА существуют в форме цвиттер-иона (рис. 2.6б), при этом карбоксильная группа хинолонового фрагмента депротонирована и именно через неё реализуется взаимодействие ФХА с поверхностью РЭ. Однако в щелочной среде наблюдается более низкая интенсивность сигнала, что связано с ухудшением адсорбции депротонированных молекул ЦИПРО на

поверхности отрицательно поляризованного РЭ из-за электростатического отталкивания между ними.

В кислой среде происходит протонирование неподелённых электронных пар в молекулах ФХА, что приводит к нескольким эффектам: (i) уменьшению интенсивности сигнала (рис. 6.41в) из-за невозможности прямого донорно-акцепторного взаимодействия электронодонорных атомов ФХА с атомами меди на поверхности РЭ; (ii) усилению притяжения положительно заряженных молекул ФХА к отрицательно поляризованной поверхности РЭ; (iii) увеличению электроноакцепторных свойств и вероятности реализации химического механизма усиления, что приводит к изменению механизма адсорбции молекул аналита на поверхности электрода, сопровождающегося изменением профиля ГКР-сигнала (рис. 6.41б). Таким образом, возможность регистрации достаточно интенсивного ЭХ-ГКР-сигнала ФХА в кислой среде осуществима благодаря осуществлению последних двух эффектов.

Влияние компонентов мочи на ЭХ-ГКР-сигнал ЦИПРО

Для изучения селективности ЭХ-ГКР-детектирования провели регистрацию ЭХ-ГКР-сигнала мочи с добавкой ЦИПРО в средах с разной величиной рН и при значениях U_{\max} , соответствующих максимальному сигналу ЦИПРО в данных средах (рис. 6.42А). Установлено, что в моче с нейтральной средой (рН 6) происходит значительное снижение интенсивности ГКР-сигнала ЦИПРО (примерно в 4 раза), в то время как в моче с высоким уровнем рН сигнал ЦИПРО вообще отсутствует, что свидетельствует о полном ингибировании адсорбции молекул ЦИПРО на поверхности РЭ (рис. 6.42а',а'').

Дополнительное изучение ЭХ-ГКР-сигнала основных фонообразующих компонентов БЖЧ (рис. 6.42Б,В) показало, что в нейтральной и щелочной средах не может быть проведено селективное детектирование аналита в присутствии эндогенных компонентов мочи. Это связано с тем, что при оптимальном для ЦИПРО значении поляризации РЭ также генерируются интенсивные ГКР-спектры КРН и МК (рис. 6.42в',в''). При этом нейтральная

среда приводит к генерации наиболее интенсивных ЭХ-ГКР-спектров всех 4 изученных компонентов БЖЧ в широком диапазоне значений приложенных потенциалов (от +0.3 до -1.7 В vs Ag/AgCl), поэтому корректировка pH в случае ЭХ-ГКР-анализа БЖЧ для определения в них ЛВ имеет ключевое значение.

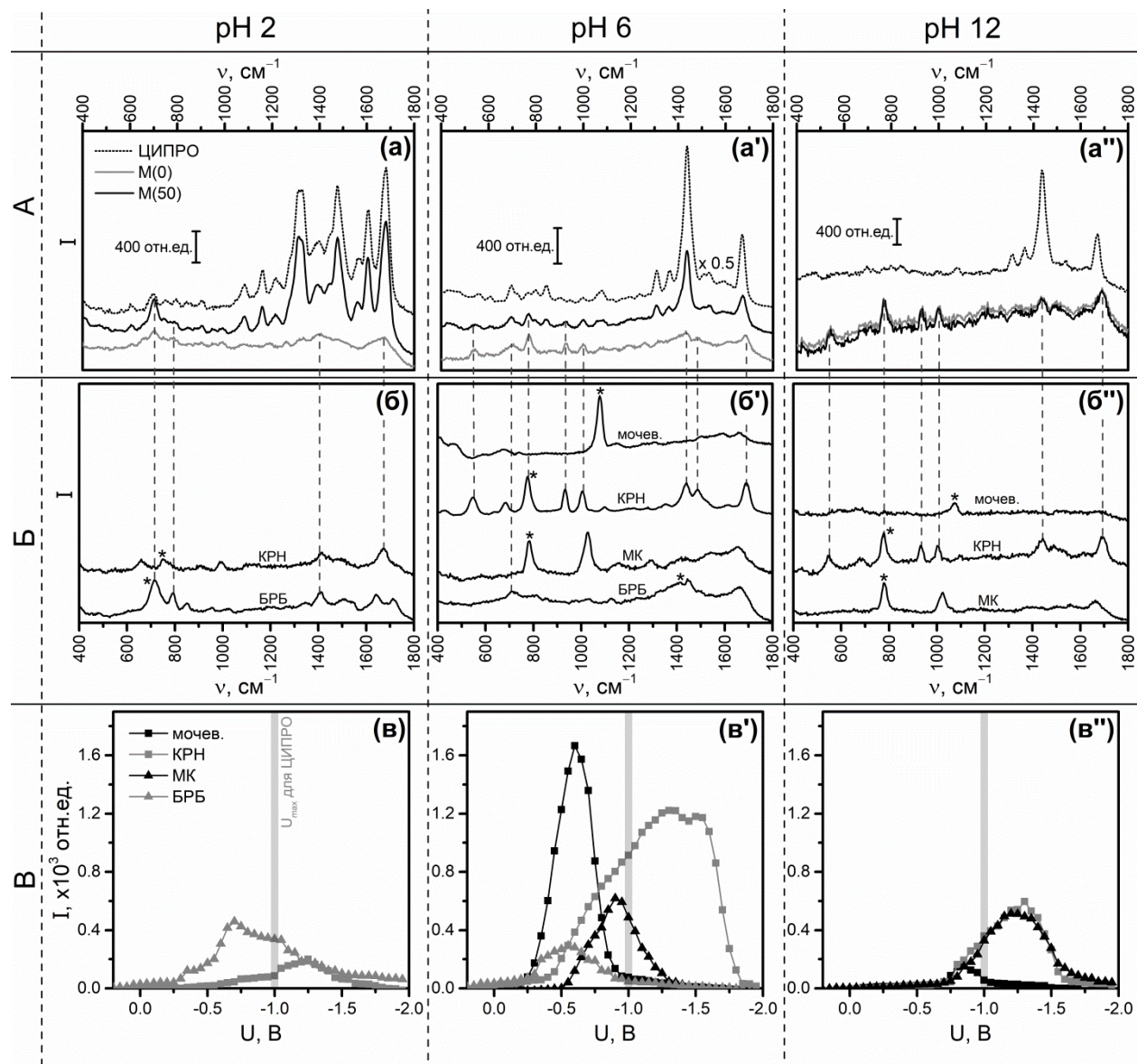


Рис. 6.42. (А) Влияние значения pH на ЭХ-ГКР-спектры ($U = -1.0$ В vs Ag/AgCl) раствора ЦИПРО (5 мкг/мл), а также образцов мочи без (M(0)) и с (M(50)) добавкой ЦИПРО (50 мкг/мл), которые разбавляли в 10 раз перед измерениями. **(Б)** Профили ЭХ-ГКР-спектров компонентов БЖЧ при их U_{max} и при разных значениях pH. **(В)** Зависимость интенсивности основных ГКР-пигов компонентов БЖЧ (выделены звездочками на рис. 6.42Б) от величины pH и приложенного потенциала (vs Ag/AgCl). Значения концентраций компонентов БЖЧ соответствуют их средним концентрациям в моче, разбавленным в 5 раз (подраздел 3.1.1).

С другой стороны, в кислой среде продуцируется лишь слабый ЭХ-ГКР-сигнал только 2ух компонентов БЖЧ (КРН и БРБ) (рис. 6.42б,в), что позволило получить сигнал ЦИПРО в моче сопоставимый по интенсивности с сигналом ЦИПРО в чистой воде (рис. 6.42а). При этом ГКР-спектр чистой мочи в кислой среде не имеет интенсивных пиков, способных перекрываться с пиками аналита и дополнительно усложнять его детектирование. Однако дополнительное изучение влияния рН на ЭХ-ГКР-сигнал в кислых средах показало, что при значении рН 3 профиль спектра мочи без и с добавкой ЦИПРО повторяет профиль КРН (рис. 6.43), а при рН 1 происходит окисление хлорид ионов и активное выделение газообразного хлора на электродах, что препятствует сорбции аналита и может приводить к его окислению хлором. Таким образом, предпочтительнее проводить ЭХ-ГКР-детектирование ЦИПРО в кислой среде при рН 2 и $U = -1.0 \text{ В vs Ag/AgCl}$, поскольку при данных условиях адсорбция аналита на поверхности ГКР-активного медного электрода менее всего подвержена влиянию конкурентной адсорбции эндогенных компонентов мочи.

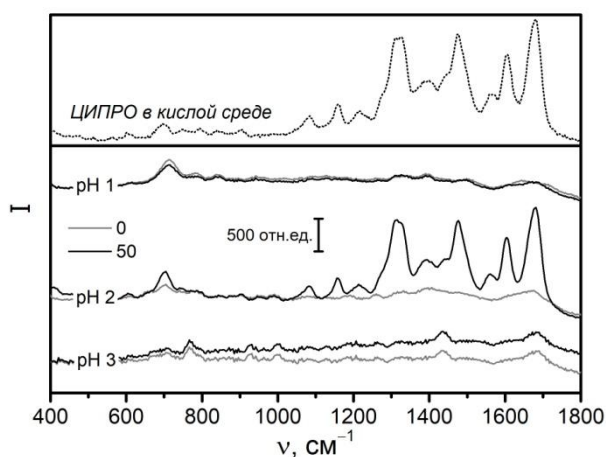


Рис. 6.43. Влияние величины рН в кислых средах на ЭХ-ГКР-спектры образцов мочи без (0) и с (50) добавкой ЦИПРО (50 мкг/мл), разбавленных в 10 раз перед анализом.

Также проведение ЭХ-ГКР-измерений растворов других представителей ФХА (рис. 2.6а) показало, что ФХА имеют очень похожие профили спектров и почти одинаковые значения U_{\max} при рН 2 (рис. 6.44). Таким образом, разработанная методика ЭХ-ГКР-анализа имеет высокую универсальность и селективность применительно в детектированию ФХА в моче.

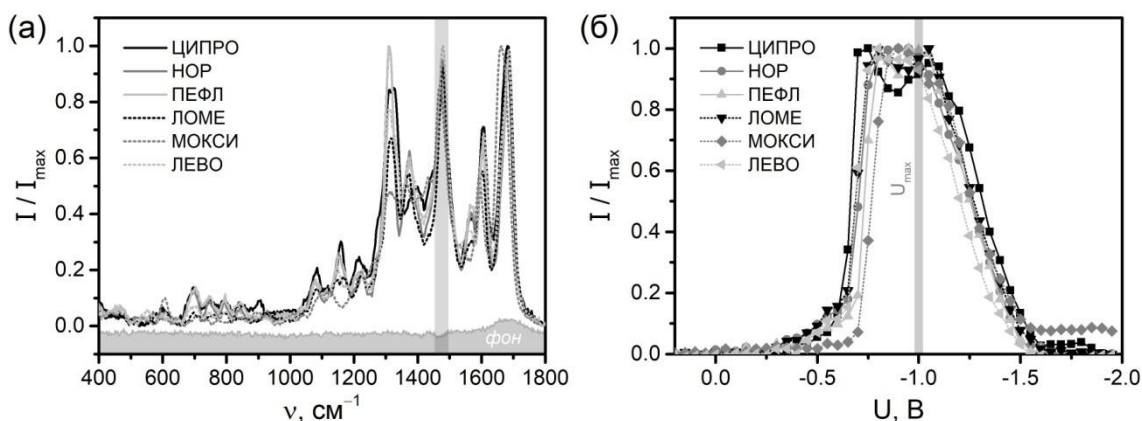


Рис. 6.44. (а) Профили ГКР-спектров ФХА при рН 2 и при $U = -1.0$ В vs Ag/AgCl. **(б)** Влияние величины приложенного потенциала на интенсивность ГКР-пика ФХА в кислой среде (рН 2; пик выделен на рис. 6.44а).

Итоговая методика проведения ЭХ-ГКР-измерений ФХА

Несмотря на полученные положительные результаты, слабым моментом данных ЭХ-ГКР-измерений является сложность совмещения ГКР-измерений с одновременным изменением потенциала поляризации РЭ, особенно если учесть, что нужно использовать отдельное программное обеспечение для каждого из приборов. Действительно, в случае непрерывного изменения потенциала возникает необходимость очень тщательной временной синхронизации данного процесса с измерениями ГКР-сигнала. Более того, при непрерывном изменении потенциала получается зарегистрировать лишь пару спектров в области U_{\max} , что не позволяет оценить воспроизводимость аналитического сигнала.

Однако непрерывное изменение поляризации РЭ целесообразно только на этапе определения значения U_{\max} , после определения которого регистрацию аналитического сигнала можно проводить при фиксированном значении потенциала, что и было использовано в итоговой методике детектирования ФХА в моче. В результате существует чёткая граница между этапами *in situ* активации и измерений ГКР-спектров, что значительно облегчает синхронизацию во времени спектральной и ЭХ составляющих процесса анализа.

Также следует отметить, что в отличие от коллоидных ГКР-подложек со свободно движущимися частицами, использование ГКР-активных электродов подразумевает регистрацию сигнала с зафиксированных ГКР-активных участков, что может приводить к фотохимической деградации ГКР-активных центров и их комплексов с молекулами аналитов. Так, при непрерывной регистрации ГКР-спектров в течение 30 с наблюдается спад интенсивности сигнала примерно на 20% (рис. 6.45). Поэтому для предотвращения процессов фотодеградации общее время регистрации сигнала и время регистрации одного спектра ограничили 10 с и 0.5 с, соответственно. Этого достаточно для регистрации и последующего усреднения 20 спектров и получения воспроизводимого сигнала ($s_r \sim 3\%$, рис. 6.45). Причём, несмотря на двукратное снижение интенсивности ЭХ-ГКР-сигнала, связанное с двукратным снижением времени регистрации одного спектра, сигнал всё равно получается избыточно интенсивным для анализа. Так, для получения градуировочных графиков во всём диапазоне концентраций ФХА, требуемом для ТЛМ, образец мочи, содержащий ФХА, необходимо дополнительно разбавить водой в 10–20 раз в зависимости от представителя ФХА.

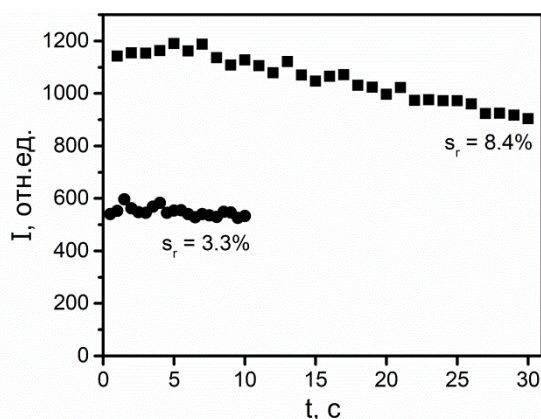


Рис. 6.45. Изменение интенсивности ЭХ-ГКР-спектра ЦИПРО (5 мкг/мл, по пику при 1476 см⁻¹) при сборе сигнала ($U = -1$ В vs Ag/AgCl) в течение 30 с (время накопления сигнала 1 с) и 10 с (время накопления сигнала 0.5 с).

Обобщая полученные результаты, методика проведения ЭХ-ГКР-детектирования ФХА в моче включает следующие этапы (рис. 6.46):

- 1) если используется новый медный РЕ или электрод после длительного перерыва в работе (>8 ч), проведение *ex situ* активации (рис. 6.46-I), состоящей из 10 циклов ОВ согласно следующей схеме для каждого цикла: $-100 \text{ мВ} \rightarrow +400 \text{ мВ} \rightarrow -600 \text{ мВ} \rightarrow -100 \text{ мВ}$ (50 мВ/с);
- 2) смешивание в кварцевой кювете 1000 мкл раствора NaCl (150 мМ), 350 мкл HCl (50 мМ) и 150 мкл образца мочи, содержащего ФХА и разбавленного в 10–20 раз, и помещение кюветы в кюветодержатель, к которому предварительно присоединён оптический зонд КР-спектрометра;
- 3) погружение в приготовленную смесь электродов (РЕ, ВЭ, МЭС), подключенных проводами к потенциостату, проведение дополнительной *in situ* активации (один цикл ОВ, рис. 6.46-II), регистрацию ЭХ-ГКР-спектров при U_{max} (рис. 6.46-III) и обработку результатов анализа;
- 4) очистку поверхности РЕ для повторного использования (рис. 6.46-IV) (подробно обсуждено далее в подразделе 6.5.4).

Продолжительность одного цикла анализа не превышает 10 мин (без учёта *ex situ* активации РЕ).

6.5.4. Очистка поверхности медного ГКР-активного электрода после анализа

Ресурсоэффективность ГКР-анализа в целом весьма ограничена так называемыми «эффектами памяти», связанными с загрязнением (зачастую перманентным) поверхности подложки молекулами аналита и/или молекулами-помехами после предыдущего цикла анализа. Действительно, хотя широкое использование в ЭХ-ГКР-анализе одноразовых электродных систем, полученных с помощью трафаретной печати, устраняет необходимость регенерации ГКР-активной поверхности, это осуществляется за счёт увеличения и стоимости, и отходов анализа [311–314,320,322,325,328]. Однако в отличие от ГКР-подложек на основе коллоидных растворов металлических НЧ, поверхность ГКР-активного электрода технически легче очистить от молекул аналита для дальнейшего

повторного использования, например, путём тщательной промывки. Более того, часто упускаемое из виду, но очень важное преимущество ЭХ-ГКР-систем заключается в простоте очистки (регенерации) поверхности подложки путём использования всё тех же ЭХ подходов, например, электростатической десорбции при определенных величинах поляризации ГКР-активной поверхности РЭ. Так, из показанных ранее результатов видно, что смещение поляризации РЭ в сторону более положительных или отрицательных потенциалов относительно U_{\max} приводит к уменьшению или даже полному исчезновению ГКР-сигнала (рис. 6.41в).

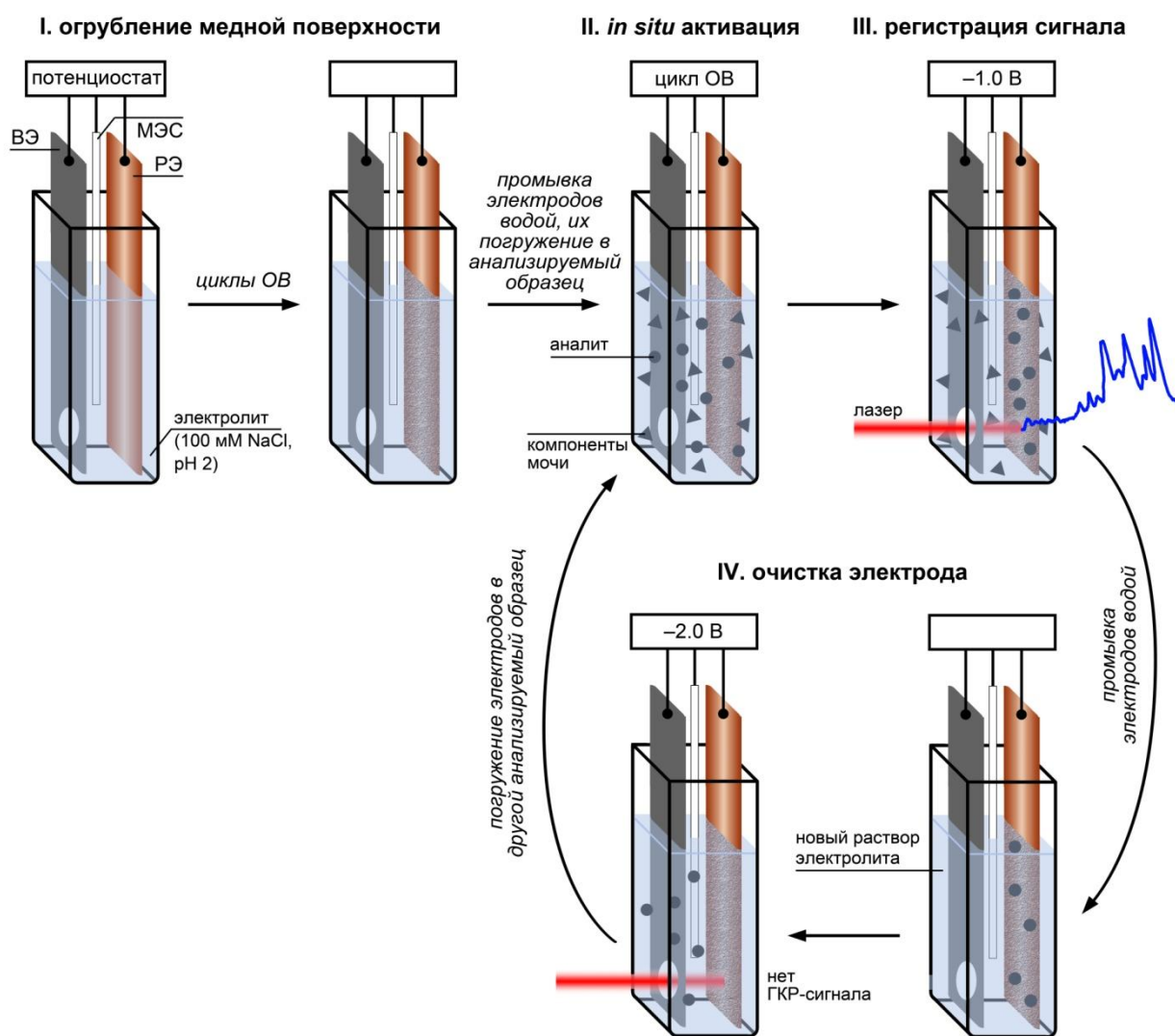


Рис. 6.46. Схематическое изображение ячейки для проведения ЭХ-ГКР-измерений и осуществления этапов ГКР-активации медного РЭ, ЭХ-ГКР-анализа и регенерации РЭ.

К сожалению, на данный момент существует очень мало исследований, демонстрирующих полезность применения поляризации для очистки

поверхности ГКР-подложки и регенерации её ГКР-активных центров [321,327]. Например, Pothier и Forcé [327] наблюдали снижение ГКР-сигнала пиридина при значительных отрицательных величинах поляризации электрода (-2.0 В) при использовании серебряного РЭ. В данном случае процесс удаления молекул аналита преимущественно основан на протекании побочной реакции, включающей ЭХ восстановление молекул растворителя (воды), приводящее к быстрому образованию газообразного водорода. В результате молекулы водорода вытесняют адсорбированные молекулы аналита, тем самым регенерируя ГКР-активную поверхность, а выделяющиеся пузырьки газа приводят к перемешиванию раствора вблизи поверхности, способствуя смыванию аналита с поверхности. Стоит отметить, что, согласно ряду исследований, регенерация с помощью отрицательной поляризации оказывает лишь незначительное влияние на морфологию ГКР-активной поверхности [315,322]. Наконец, хотя подавление ГКР-сигнала может быть достигнуто и путём положительной поляризации электрода, использование отрицательных потенциалов предпочтительнее, поскольку положительная поляризация может вызвать значительное окисление и потерю материала ГКР-подложки.

Изучение описанного выше подхода очистки поверхности ГКР-подложки применительно к медному РЭ показало, что при использовании низких концентраций ЦИПРО в моче (50 мкг/мл) происходит полное устранение сигнала аналита, который не возникает снова даже при нахождении РЭ в исследуемом растворе. Однако в случае мочи, содержащей высокую концентрацию ЦИПРО (500 мкг/мл), одного лишь приложения отрицательного потенциала недостаточно (протестированы значения от -1.0 до -2.5 В vs Ag/AgCl) и значительный остаточный сигнал ЦИПРО сохраняется и после переноса обработанного РЭ в чистый раствор электролита. Следовательно, очистка поляризацией также имеет свои ограничения и явно зависит от концентрации аналита, чего ранее не было показано. Также, хотя применение этапа *in situ* активации ГКР-активного

электрода позволяет достичь дополнительного усиления (подраздел 6.5.2), ранее проведённые исследования показали, что это достигается благодаря более прочному связыванию молекул аналита по сравнению с *ex situ* активацией [329]. Как следствие *in situ* активация осложняет регенерацию РЭ для повторного использования.

Важно отметить, что в описанных выше экспериментах, как и в литературных примерах [321,327], очистку поверхности проводили непосредственно в анализируемом растворе сразу после измерения ЭХ-ГКР-сигнала. Логично, что в данном случае высокая концентрация аналита в растворе не будет способствовать десорбции молекул с поверхности, т.е. очистке поверхности. Поэтому предложен чуть более сложный, но и более универсальный этап очистки, основанный на сочетании промывки и *ex situ* поляризации РЭ. Этот этап включает в себя (i) однократную промывку электродов чистой водой после завершения анализа (~15–20 с) и (ii) кратковременную (10 с) отрицательную поляризацию (–2.0 В *vs* Ag/AgCl) ГКР-активного электрода в чистом электролите (100 мМ раствор NaCl, pH 2) (рис. 6.46-IV).

Помимо удаления остаточных молекул аналита важной задачей этапа отмывки является удаление и эндогенных компонентов мочи для минимизации конкурентных взаимодействий на поверхности РЭ, приводящих к снижению ГКР-сигнала аналита и/или образованию фонового сигнала. С этой точки зрения, хотя значений потенциалов поляризации от –1.6 до –1.8 В *vs* Ag/AgCl достаточно для удаления молекул аналита (рис. 6.41в), исследование ЭХ-ГКР-сигнала мочи и её компонентов (рис. 6.42В) показало, что приложение потенциала –2.0 В обеспечивает более полное удаление мешающих молекул с поверхности РЭ.

В итоге, использование образцов мочи, содержащих добавку ЦИПРО максимально высокой концентрации, необходимой для определения в моче (500 мкг/мл), показало, что процедура очистки успешно справляется с десорбцией как экзо- (ФХА), так и эндогенных компонентов мочи (рис.

6.47а). Также с использованием мочи, содержащей низкую концентрацию ЦИПРО (50 мкг/мл), оценили воспроизводимость ЭХ-ГКР-методики, включающей в себя этап очистки РЭ. Так, погрешность аналитического сигнала, собранного в результате нескольких циклов повторений измерения сигнала и очистки (рис. 6.47б), составила всего 6%.

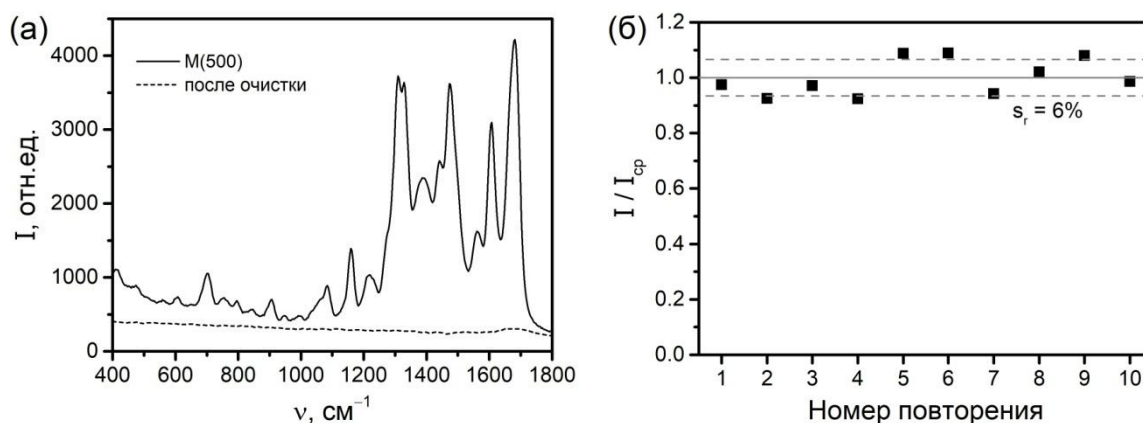


Рис. 6.47. (а) ЭХ-ГКР-спектры, зарегистрированные с поверхности РЭ, погруженного в образец мочи с добавкой ЦИПРО (500 мкг/мл) (М(500)) и в раствор чистого электролита после очистки поверхности РЭ. **(б)** Зависимость интенсивности ГКР-сигнала ЦИПРО в моче (50 мкг/мл, по пику при 1476 cm^{-1}) от числа повторений ЭХ-ГКР-измерений (циклов «измерение-очистка», рис. 6.46-II-IV). Образцы мочи, содержащие ЦИПРО, разбавляли в 10 раз; ЭХ-ГКР-измерения проводили при $\text{pH} = 2$ и $U = -1.0 \text{ V vs Ag/AgCl}$.

Таким образом, разработана методика ЭХ-ГКР-детектирования ФХА в моче, достоинствами которой являются как улучшенная универсальность (пригодна для определения разных представителей ФХА), так и ресурсоэффективность, достигнутая использованием гораздо более доступного ГКР-активного материала (меди вместо серебра или золота) для создания РЭ с возможностью его многократного использования для проведения большого числа циклов ЭХ-ГКР-анализа.

* * *

Проведены теоретические исследования оптических и усиливающих свойств медных кластеров. Несмотря на то, что использовалась упрощённая и существенно облегчающая проведение расчётов структура медных кластеров (моноатомные цепочки), полученные результаты хорошо

согласуются с экспериментальными, ранее описанными в литературе. В результате проведённых квантовохимических расчётов показана наибольшая эффективность усиления КР-сигнала при использовании возбуждающих лазеров с длиной волны света больше 600 нм, при этом НЭП (усиливающий эффект в случае ЭМ механизма) распространяется на расстояния, сопоставимые лишь с размерами адсорбционного слоя на поверхности ГКР-подложки.

Проведённое экспериментальное сравнение усиливающих свойств МНЧ, СНЧ и ЗНЧ показало, что они зависят не только от материала ГКР-подложки, но и от свойств аналита. Так, установлено, что ГКР-сигнал ЦСА наибольшей интенсивности генерируется при использовании МНЧ. Данный результат в очередной раз подчёркивает важность учёта строения анализируемых молекул, их взаимодействия с материалом ГКР-подложки и вклада химического механизма в усиление КР-сигнала.

Разработана ЭХ ячейка, содержащая медный РЭ, для проведения спектроэлектрохимического ГКР-анализа. В результате с использованием одной ЭХ ячейки стало возможным (1) создание ГКР-активной поверхности медного РЭ, (2) концентрирование аналитов при определённом потенциале поляризации медного РЭ для проведения более чувствительных и селективных ГКР-измерений, (3) ЭХ очистка ГКР-активной поверхности для повторного применения РЭ. Более того, предложенный спектроэлектрохимический подход ГКР-анализа, благодаря замкнутости цикла, можно автоматизировать, интегрировав в микропоточную систему.

Показано, что влияние низкой химической стабильности медных ГКР-подложек на ГКР-сигнал может быть нивелировано с использованием нескольких подходов. Наиболее очевидный – это использование свежесинтезированных МНЧ при проведении ГКР-измерений. Поэтому была разработана и оптимизирована методика быстрого МВ синтеза МНЧ. Второй подход – создание композитных материалов на основе неорганических матриц с МНЧ. Так, встраивание МНЧ внутрь микросфер CaCO_3 и хранение

композита в высушенном состоянии позволили сохранить усиливающие свойства МНЧ на протяжении 4 месяцев, в то время как раствор коллоидных МНЧ теряет способность усиливать КР-сигнал уже через 12 ч. Третий подход – применение ЭХ регенерации ГКР-активных центров на поверхности медной ГКР-подложки перед использованием в анализе.

Наконец, разработанные медные ГКР-подложки впервые были успешно использованы для ГКР-детектирования антибиотиков двух классов (ЦСА и ФХА) в объекте со сложным составом (реальная моча).

Таким образом, результаты, представленные в данной главе, демонстрируют, что при правильном выборе длины волны возбуждения и использовании какого-либо из подходов по снижению влияния низкой химической стабильности на ГКР-сигнал медные ГКР-подложки являются наиболее доступной альтернативой подложкам на основе серебра и золота.

Представленные в главе результаты опубликованы в работах [213,252,307,332–338].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в диссертационной работе описаны разнообразные новые подходы по увеличению селективности ГКР-определения ЛВ в БЖЧ. Так, для каждой изученной группы СР антибиотиков и противоопухолевого препарата МТК удалось разработать несколько методик ГКР-анализа, основанных на разных подходах устранения мешающего влияния эндогенных компонентов БЖЧ на ГКР-сигнал аналита. Все разработанные методики отличаются простотой и имеют метрологические характеристики, удовлетворяющие требованиям практики. Поэтому выбор конкретной методики, в случае изученных ЛВ, зависит в первую очередь от оснащённости лаборатории оборудованием и реактивами (например, для ЭХ-ГКР-измерений дополнительно требуется потенциостат).

Отметим, что для некоторых ЛВ, изученных в настоящей работе, ранее уже были предложены методики их определения в объектах со сложным составом, однако при их реализации использовали существенно более сложные этапы пробоподготовки [13,21,87] и, зачастую, более сложные и трудоёмкие в изготовлении ГКР-подложки [13,85,339–341]. Более того, большинство методик, описанных ранее в литературе, разработаны для определения только какого-либо одного конкретного ЛВ, в то время как методики, описанные в настоящей диссертационной работе, отличаются большей универсальностью, позволяя определять разные представители антибиотиков одного класса, что стало возможным благодаря учёту структурной родственности аналитов при разработке методик.

Значимым достижением является разработка методики прямого ГКР-анализа, позволяющей поочерёдно определять аналиты в их смеси в объекте со сложным составом. Ранее подобный анализ проводили только при совмещении ГКР с хроматографией. И ключевым моментом в данном случае является демонстрация именно огромной значимости учёта и контроля возможных конкурентных взаимодействий на поверхности ГКР-подложки,

что позволяет существенно улучшить точность и селективность прямого ГКР-анализа.

Проведённые исследования в области разработки и использования медных ГКР-подложек также внесли существенный вклад в развитие аналитического применения данного типа подложек. Так, тщательный анализ литературы по данной теме (начиная с 1980 года) позволил выявить и обобщить критически важные моменты, требующие более тщательного рассмотрения перед осуществлением ГКР-анализа, например, зависимость усиления медными подложками от длины волны возбуждающего излучения, низкая химическая стабильность медных наноструктур и влияние природы аналита на взаимодействие с медной ГКР-подложкой. Проработка данных моментов позволила не только впервые разработать методики ГКР-определения ЛВ в реальных БЖЧ с использованием медных подложек, но и значительно повысить их химическую стабильность (увеличить срок хранения) и даже сделать пригодными для многократного использования. Таким образом, появляется реальная перспектива замены ГКР-подложек на основе благородных металлов (серебра и золота) и, как следствие, снижения стоимости и увеличения доступности ГКР-анализа.

Применение разработанных подходов по увеличению селективности ГКР-определения ЛВ (включая СР) в БЖЧ, а также новых ГКР-подложек может быть расширено для детектирования других СР соединений (других ЛВ, пестицидов и т.д.) и перенесено на смежные области, например, контроль качества продуктов питания, ветеринария и т.д. При этом разнообразие предложенных подходов и подложек также призвано показать гибкость процесса разработки и реализации методик ГКР-анализа, что полезно использовать при разработке новых методик.

ВЫВОДЫ

1. Предложены разнообразные подходы для улучшения селективности, чувствительности и доступности прямого ГКР-анализа, совокупность которых способствует развитию спектроскопии ГКР как инструмента для определения ЛВ в реальных образцах БЖЧ. Полученные результаты имеют фундаментальный характер и позволяют экстраполировать предложенные подходы для ГКР-определения ЛВ в других видах объектов со сложным составом.

2. На примере представителей антибиотиков трёх разных классов (САА, ФХА и ЦСА) впервые проведено сравнение ГКР-спектров СР аналитов. В случае таких аналитов выявлены закономерности, влияющие на генерацию ГКР-спектров и степень сходства их спектральных профилей: наличие структурной схожего КР-активного фрагмента, его расположение в молекуле (доступность для взаимодействия с ГКР-подложкой), наличие электроноакцепторных свойств СР фрагмента. Установлена первоочередная роль значения рН в управлении процессами адсорбции, генерации схожих ГКР-спектров, получении максимально интенсивного ГКР-сигнала. Проанализировано влияние строения заместителей при СР фрагменте на спектральные профили.

3. Предложены подходы на основе совмещения ГКР с некоторыми методами разделения и концентрирования (НТФЭ, ЖЖЭ, ТСХ) с целью удаления из анализируемой смеси одного или нескольких эндогенных фонообразующих компонентов БЖЧ. Это позволило снизить конкуренцию между целевым аналитом и компонентом БЖЧ за адсорбцию на поверхности ГКР-подложки и привело к уменьшению/полному устранению фонового ГКР-сигнала. Разработаны НТФЭ-ГКР-методики для определения ЦСА в моче с использованием разных сорбентов, которые, в зависимости от природы, эффективно удерживают разные фонообразующие компоненты БЖЧ. Также разработаны и оптимизированы ГКР-методики на основе ЖЖЭ и ТСХ для определения в моче САА и ФХА, соответственно.

4. Предложен новый способ маскирования мешающих компонентов БЖЧ, основанный на предотвращении их адсорбции на поверхность ГКР-подложки в присутствии катионного полиэлектролита ПДДА. С использованием ПДДА и благодаря тщательному подбору и оптимизации этапов пробоподготовки, позволяющих управлять процессом конкурентной адсорбции на поверхности ГКР-подложки, разработаны простые и быстрые методики ГКР-определения САА в двух типах БЖЧ (моча и слюна), а также методика поочерёдного определения трёх аналитов, одновременно присутствующих в моче (в т.ч. в избытке).

5. Предложены новые варианты гетерогенных аналитических систем, сочетающих твёрдофазное концентрирование органических соединений на ГКР-активных сорбентах (силикагель, оксид алюминия или карбонат кальция со встроенными СНЧ) и последующее ГКР-определение непосредственно в сорбенте или после растворения матрицы сорбента. Разработаны методики ТФЭ-ГКР-детектирования ЛВ в моче. Показано улучшение аффинности к целевому аналиту и, как следствие, селективности анализа за счёт подбора материала сорбента и модификатора его поверхности, а также регистрации ГКР-спектров при значениях рН, в которых генерируется наиболее интенсивный сигнал аналита.

6. Изучена и обоснована возможность использования ЦД в качестве модификатора ГКР-подложек для усиления их взаимодействия с электронейтральными слабополярными частями молекул аналитов (или целыми молекулами) и ингибирования взаимодействия с полярными заряженными молекулами эндогенных компонентов БЖЧ. Путём оптимизации условий синтеза ЦД-ГКР-подложки (для увеличения аналитического сигнала) и этапов пробоподготовки (для улучшения селективности) разработаны методики ЦД-ГКР-определения СР антибиотиков (ЦСА, ФХА) и МТК в моче и плазме крови. Данные методики сохраняют свою точность и в случае анализа образцов БЖЧ с двукратным

превышением эндогенных компонентов, что может встречаться при некоторых заболеваниях.

7. Получены и изучены различные новые медные ГКР-подложки, демонстрирующие усиливающие свойства, сопоставимые с таковыми для подложек на основе серебра и золота. Показано, что ключевыми факторами, влияющими на усиливающие свойства медных ГКР-подложек, являются использование возбуждающего излучения с подходящей длиной волны света (больше 600 нм) и низкая химическая стабильность меди в наноразмерном состоянии. Для повышения стабильности были предложены разные подходы: использование свежесинтезированных МНЧ, создание композитов со встроенными МНЧ, ЭХ регенерация медной поверхности при проведении спектроэлектрохимического ГКР-анализа. Разработанные медные ГКР-подложки впервые были успешно использованы для ГКР-детектирования антибиотиков (ЦСА и ФХА) в объекте со сложным составом (моча).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cialla-May D., Bonifacio A., Bocklitz T., Markin A., Markina N., Fornasaro S., Dwivedi A., Dib T., Farnesi E., Liu C., Ghosh A., Popp J. Biomedical SERS – the current state and future trends // *Chem. Soc. Rev.* 2024. V. 53. P. 8957–8979.
2. Cialla-May D., Bonifacio A., Markin A., Markina N., Fornasaro S., Dwivedi A., Dib T., Farnesi E., Liu C., Ghosh A., Schmitt M., Popp J. Recent advances of surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) in optical biosensing // *Trends Anal. Chem.* 2024. V. 181. P. 117990.
3. Wang Z., Zong S., Wu L., Zhu D., Cui Y. SERS-activated platforms for immunoassay: probes, encoding methods, and applications // *Chem. Rev.* 2017. V. 117. P. 7910–7963.
4. Khlebtsov B., Khlebtsov N. Surface-enhanced Raman scattering-based lateral-flow immunoassay // *Nanomaterials.* 2020. V. 10. P. 2228.
5. Wang J., Luo Z., Lin X. An ultrafast electrochemical synthesis of Au@Ag core-shell nanoflowers as a SERS substrate for thiram detection in milk and juice // *Food Chem.* 2023. V. 402. P. 134433.
6. Markina N.E., Markin A.V. Determination of multiple analytes in urine using label-free SERS coupled with simple sample pretreatments // *Anal. Chim. Acta.* 2024. V. 1332. P. 343383.
7. Moldovan R., Milenko K., Vereshchagina E., Iacob B.-C., Schneider K., Farcău C., Bodoki E. EC-SERS detection of thiabendazole in apple juice using activated screen-printed electrodes // *Food Chem.* 2023. V. 405. P. 134713.
8. Liu J., Liu W., Huang Y., Zhao X., Feng Z., Wang D., Gong Z., Fan M. Self-supporting liquid film as reproducible SERS platform for therapeutic drug monitoring of berberine hydrochloride in human urine // *Microchem. J.* 2021. V. 165. P. 106122.
9. Nuntawong N., Eiamchai P., Somrang W., Denchitcharoen S., Limwicchan S., Horprathum M., Patthanasettakul V., Chaiya S., Leelapojanaporn A., Saiseng S., Pongsethasant P., Chindaudom P. Detection of methamphetamine/amphetamine

in human urine based on surface-enhanced Raman spectroscopy and acidulation treatments // *Sens. Actuators B*. 2017. V. 239. P. 139.

10. Berger A.G., Restaino S.M., White I.M. Vertical-flow paper SERS system for therapeutic drug monitoring of flucytosine in serum // *Anal. Chim. Acta*. 2017. V. 949. P. 59-66.

11. Fornasaro S., Bonifacio A., Marangon E., Buzzo M., Toffoli G., Rindzevicius T., Schmidt M.S., Sergio V. Label-free quantification of anticancer drug imatinib in human plasma with surface enhanced Raman spectroscopy // *Anal. Chem*. 2018. V. 90. P. 12670–12677.

12. Yu B., Cao C., Li P., Mao M., Xie Q., Yang L. Sensitive and simple determination of zwitterionic morphine in human urine based on liquid-liquid micro-extraction coupled with surface-enhanced Raman spectroscopy // *Talanta*. 2018. V. 186. P. 427.

13. Soufi G., Dumont E., Göksel Y., Slipets R., Raja R.A., Schmiegelow K., Bagheri H., Boisen A., Zor K. Discrimination and quantification of methotrexate in the presence of its metabolites in patient serum using SERS mapping, assisted by multivariate spectral data analysis // *Biosens. Bioelectron*. X. 2023. V. 14. P. 100382.

14. Dmitrieva E.V., Kapitanova O.O., Lv S., Sinyashin O.G., Veselova I.A. Coupling of chromatography with surface-enhanced Raman spectroscopy: trends and prospects // *Front. Chem*. 2025. V. 13. P. 1548364.

15. Lai H., Yu Z., Li G., Zhang Z. Advanced sample preparation techniques for rapid surface-enhanced Raman spectroscopy analysis of complex samples // *J. Chromatogr. A*. 2022. V. 1675. P. 463181.

16. Маркина Н.Е., Горячева И.Ю., Маркин А.В. Применение спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния для определения лекарственных и наркотических средств в биожидкостях человека // *Журн. аналит. химии*. 2022. Т. 77. №8. С. 684–703.

17. Yue S., Sun X.T., Wang Y., Zhang W.S., Xu Z.R. Microparticles with size/charge selectivity and pH response for SERS monitoring of 6-thioguanine in blood serum // *Sens. Actuators B*. 2018. V. 273. P. 1539–1547.
18. Zhang Q., Li D., Cao X., Gu H., Deng W. Self-assembled microgels arrays for electrostatic concentration and surface-enhanced Raman spectroscopy detection of charged pesticides in seawater // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. P. 11192–11199.
19. Jaworska A., Fornasaro S., Sergio V., Bonifacio A. Potential of surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) in therapeutic drug monitoring (TDM). A critical review // *Biosensors*. 2016. V. 6. P. 47.
20. Mamián-López M.B., Poppi R.J. Quantification of moxifloxacin in urine using surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) and multivariate curve resolution on a nanostructured gold surface // *Anal. Bioanal. Chem.* 2013. V. 405. P. 7671.
21. Subaihi A., Trivedi D.K., Hollywood K.A., Bluett J., Xu Y., Muhamadali H., Ellis D.I., Goodacre R. Quantitative online liquid chromatography–surface-enhanced Raman scattering (LC-SERS) of methotrexate and its major metabolites // *Anal. Chem.* 2017. V. 89. P. 6702.
22. Gan S., Shi X., Zhu X., Wu C., Li Z., Han T., Lu R. Rapid dynamic determination of cetirizine dihydrochloride in urine using surface enhanced Raman scattering with silver colloids // *Anal. Lett.* 2018. V. 51. P. 1163.
23. Cheng J., Wang S., Zhang S., Wang P., Xie J., Han C., Su X.O. Rapid and sensitive determination of clenbuterol residues in animal urine by surface-enhanced Raman spectroscopy // *Sens. Actuators B*. 2019. V. 279. P. 7.
24. Fornasaro S., Cialla-May D., Sergio V., Bonifacio A. The role of surface enhanced Raman scattering for therapeutic drug monitoring of antimicrobial agents // *Chemosensors*. 2022. V. 10. P. 128.
25. Clarke S.J., Littleford R.E., Smith W.E., Goodacre R. Rapid monitoring of antibiotics using Raman and surface enhanced Raman spectroscopy // *Analyst*. 2005. V. 130. P. 1019–1026.

26. Farquharson S., Brouillette C., Smith W., Shende C. A surface-enhanced Raman spectral library of important drugs associated with point-of-care and field applications // *Front. Chem.* 2019. V. 7. P. 706.
27. Doctor E.L., McCord B. Comparison of aggregating agents for the surface-enhanced Raman analysis of benzodiazepines // *Analyst.* 2013. V. 138. P. 5926–5932.
28. Huang R., Han S., Li X. Detection of tobacco-related biomarkers in urine samples by surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with thin-layer chromatography // *Anal. Bioanal. Chem.* 2013. V. 405. P. 6815–6822.
29. Doctor E.L., McCord B. The application of supported liquid extraction in the analysis of benzodiazepines using surface enhanced Raman spectroscopy // *Talanta.* 2015. V. 144. P. 938–943.
30. Zhou S., Hu Z., Zhang Y., Wang D., Gong Z., Fan M. Differentiation and identification structural similar chemicals using SERS coupled with different chemometric methods: the example of fluoroquinolones // *Microchem. J.* 2022. V. 183. P. 108023.
31. Xie Y., Wang X., Han X., Xue X., Ji W., Qi Z., Liu J., Zhao B., Ozaki Y. Sensing of polycyclic aromatic hydrocarbons with cyclodextrin inclusion complexes on silver nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering // *Analyst.* 2010. V. 135. P. 1389–1394.
32. Saute B., Premasiri R., Ziegler L., Narayanan R. Gold nanorods as surface enhanced Raman spectroscopy substrates for sensitive and selective detection of ultra-low levels of dithiocarbamate pesticides // *Analyst.* 2012. V. 137. P. 5082–5087.
33. Jahn M., Patze S., Hidi I.J., Knipper R., Radu A.I., Mühlig A., Yüksel S., Peksa V., Weber K., Mayerhöfer T., Cialla-May D., Popp J. Plasmonic nanostructures for surface enhanced spectroscopic methods // *Analyst.* 2016. V. 141. P. 756–793.
34. Leopold N., Lendl B. A new method for fast preparation of highly surface-enhanced Raman scattering (SERS) active silver colloids at room

temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride // *J. Phys. Chem. B*. 2003. V. 107. P. 5723–5727.

35. Pockrand I. Raman spectroscopy of pyridine-exposed Ag, Cu and Au films in UHV. A comparative study // *Chem. Phys. Lett.* 1982. V. 85. P. 37–42.

36. Qiang Z., Adams C. Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics // *Water Res.* 2004. V. 38. P. 2874–2890.

37. Cairns D. *Essentials of pharmaceutical chemistry*. Pharmaceutical Press, London, Chicago. 2008. P. 69–71.

38. Shiohara A., Wang Y., Liz-Marzán L.M. Recent approaches toward creation of hot spots for SERS detection // *J. Photochem. Photobiol. C*. 2014. V. 21. P. 2–25.

39. Ratkaj M., Miljanić S. Adsorption mechanisms of sulfathiazole on gold, silver and copper surfaces studied by SERS // *Vib. Spectrosc.* 2014. V. 74. P. 104–109.

40. Kha T.N., Si N.T., Tran V.M., Vo K.Q., Nguyen M.T., Nhat P.V. Binding mechanism and surface-enhanced Raman scattering of the antimicrobial sulfathiazole on gold nanoparticles // *ACS Omega*. 2023. V. 8. P. 43442–43453.

41. Shen X.R., Zheng H., Pang R., Liu G.K., Wu D.Y., Tian Z.Q. Experimental and theoretical study of surface-enhanced Raman spectra of sulfadiazine adsorbed on nanoscale gold colloids // *J. Phys. Chem. A*. 2019. V. 123. P. 9199–9208.

42. Ungurean A., Oltean M., David L., Leopold N., Ramalho J.P.P., Chiş V. Adsorption of sulfamethoxazole molecule on silver colloids: a joint SERS and DFT study // *J. Mol. Struct.* 2014. V. 1073. P. 71–76.

43. Takács-Novák K., Noszál B., Hermeicz I., Keresztúri G., Podányi B., Szasz G. Protonation equilibria of quinolone antibacterials // *J. Pharm. Sci.* 1990. V. 79. P. 1023–1028.

44. Sun J., Sakai S., Tauchi Y., Deguchi Y., Chen J., Zhang R., Morimoto K. Determination of lipophilicity of two quinolone antibacterials, ciprofloxacin and

grepafloxacin, in the protonation equilibrium // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2002. V. 54. P. 51–58.

45. Langlois M.-H., Montagut M., Dubost J.-P., Grellet J., Saux M.-C. Protonation equilibrium and lipophilicity of moxifloxacin // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005. V. 37. P. 389–393.

46. Lecomte S., Moreau N.J., Manfait M., Aubard J., Baron M.-H. Surface-enhanced Raman spectroscopy investigation of fluoroquinolone/DNA/DNA gyrase/Mg²⁺ interactions: Part I. Adsorption of pefloxacin on colloidal silver—effect of drug concentration, electrolytes, and pH // *Biospectroscopy.* 1995. V. 1. P. 423–436.

47. Filgueiras A.L., Paschoal D., Dos Santos H.F., Sant’Ana A.C. Adsorption study of antibiotics on silver nanoparticle surfaces by surface-enhanced Raman scattering spectroscopy // *Spectrochim. Acta A.* 2015. V. 136. P. 979–985.

48. Yamana T., Tsuji A. Comparative stability of cephalosporins in aqueous solution: kinetics and mechanisms of degradation // *J. Pharm. Sci.* 1976. V. 65. P. 1563–1574.

49. Ribeiro A.R., Lutze H.V., Schmidt T.C. Base-catalyzed hydrolysis and speciation-dependent photolysis of two cephalosporin antibiotics, ceftiofur and cefapirin // *Water Res.* 2018. V. 134. P. 253–260.

50. Markina N.E., Markin A.V. Application of aluminum hydroxide for improvement of label-free SERS detection of some cephalosporin antibiotics in urine // *Biosensors.* 2019. V. 9. P. 91.

51. Markina N.E., Goryacheva I.Yu., Markin A.V. SERS as a tool for determination of structurally related compounds: the case of sulfanilamide class antibiotics // *Talanta.* 2024. V. 277. P. 126433.

52. Маркина Н.Е., Маркин А.В. Структурная родственность аналитов в ГКР спектрах фторхинолоновых антибиотиков / Материалы IV Всероссийской конференции по аналитической спектроскопии с международным участием, Краснодар, 2023, С. 67.

53. Modell H., Cliff W., Michael J., McFarland J., Wenderoth M.P., Wright A. A physiologist's view of homeostasis // *Adv. Physiol. Educ.* 2015. V. 39. P. 259–266.
54. Cao G., Hajisalem G., Li W., Hof F., Gordon R. Quantification of an exogenous cancer biomarker in urinalysis by Raman Spectroscopy // *Analyst.* 2014. V. 139. P. 5375–5378.
55. Hidi I.J., Jahn M., Pletz M.W., Weber K., Cialla-May D., Popp J. Toward levofloxacin monitoring in human urine samples by employing the LoC-SERS technique // *J. Phys. Chem. C.* 2016. V. 120. P. 20613–20623.
56. Bindesri S.D., Alhatab D.S., Brosseau C.L. Development of an electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy (EC-SERS) fabric-based plasmonic sensor for point-of-care diagnostics // *Analyst.* 2018. V. 143. P. 4128–4135.
57. Welling P.G., Craig W.A., Amidon G.L., Kunin C.M. Pharmacokinetics of trimethoprim and sulfamethoxazole in normal subjects and in patients with renal failure // *J. Infect. Dis.* 1973. V. 128. P. S565.
58. Czerwinski A.W., Pederson J.A., Barry J.P. Cefazolin plasma concentrations and urinary excretion in patients with renal impairment // *J. Clin. Pharmacol.* 1974. V. 14. P. 560–566.
59. Singlas E., Taburet A.M., Landru I., Albin H., Ryckelinck J.Ph. Pharmacokinetics of ciprofloxacin tablets in renal failure; influence of haemodialysis // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1987. V. 31. P. 589–593.
60. Männistö P., Tuomisto J., Saris N.E., Lehtinen T. Pharmacokinetic studies with trimethoprim and different doses of sulfadiazine in healthy human subjects // *Chemother.* 1973. V. 19. P. 289–298.
61. Vree T.B., Hekster Y.A., Damsma J.E., Tjhuis M., Friesen W.T. Pharmacokinetics and mechanism of renal excretion of short acting sulphonamides and N4-acetylsulphonamide derivatives in man // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1981. V. 20. P. 283–292.

62. Kosmidis J., Stathakis C., Anyfantis A., Daikos G.K. Cefuroxime in renal insufficiency: Therapeutic results in various infections and pharmacokinetics including the effects of dialysis // *Proc. R. Soc. Med.* 1977. V. 70. P. 139–143.
63. Bailey R.R., Peddie B., Blake E. Serum and urine concentrations of cefoperazone in severe chronic renal failure // *Drugs*. 1981. V. 22. P. 46–51.
64. Patel I.H., Chen S., Parsonnet M., Hackman M.R., Brooks M.A., Oniko J., Kaplan S.A. Pharmacokinetics of ceftriaxone in humans // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1981. V. 20. P. 634–641.
65. Ohkawa M., Okasho A., Motoi I., Tokunaga S., Shoda R., Kawaguchi S., Sawaki M., Shimamura M., Hirano S., Kuroda K., Awazu S. Elimination kinetics of cefotaxime and desacetyl cefotaxime in patients with renal insufficiency and during hemodialysis // *Chemotherapy*. 1983. V. 29. P. 4–12.
66. Montay G., Jacquot C., Bariety J., Cunci R. Pharmacokinetics of pefloxacin in renal insufficiency // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1985. V. 29. P. 345–349.
67. Hofbauer H., Naber K.G., Kinzig-Schippers M., Sörgel F., Rustige-Wiedemann C., Wiedemann B., Reiz A., Kresken M. Urine bactericidal activity of pefloxacin versus norfloxacin in healthy female volunteers after a single 800-mg oral dose // *Infection*. 1997. V. 25. P. 121–126.
68. Wagenlehner F.M.E., Kinzig-Schippers M., Sörgel F., Weidner W., Naber K.G. Concentrations in plasma, urinary excretion and bactericidal activity of levofloxacin (500 mg) versus ciprofloxacin (500 mg) in healthy volunteers receiving a single oral dose // *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2006. V. 28. P. 551–559.
69. Bratlid D., Moe P.J. Pharmacokinetics of high-dose methotrexate treatment in children // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1978. V. 14. P. 143–147.
70. Eatman F.B., Maggio A.C., Pocolinko R., Boxenbaum H.G., Geitner K.A., Glover W., Macasieb T., Holazo A., Weinfeld R.E., Kaplan S.A. Blood and salivary concentrations of sulfamethoxazole and trimethoprim in man // *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 1977. V. 5. P. 615–624.

71. Rose C., Parker A., Jefferson B., Cartmell E. The characterization of feces and urine: A review of the literature to inform advanced treatment technology // *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 2015. V. 45. P. 1827–1879.
72. Bonifacio A., Cervo S., Sergio V. Label-free surface-enhanced Raman spectroscopy of biofluids: fundamental aspects and diagnostic applications // *Anal. Bioanal. Chem.* 2015. V. 407. P. 8265–8277.
73. Premasiri W.R., Chen Y., Williamson P.M., Bandarage D.C., Pyles C., Ziegler L.D. Rapid urinary tract infection diagnostics by surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): identification and antibiotic susceptibilities // *Anal. Bioanal. Chem.* 2017. V. 409. P. 3043–3054.
74. Bonifacio A., Dalla Marta S., Spizzo R., Cervo S., Steffan A., Colombatti A., Sergio V. Surface-enhanced Raman spectroscopy of blood plasma and serum using Ag and Au nanoparticles: a systematic study // *Anal. Bioanal. Chem.* 2014. V. 406. P. 2355–2365.
75. <https://go.drugbank.com/>
76. Rudy B.C., Senkowski B.Z. Sulfamethoxazole // *Analytical Profiles of Drug Substances.* 1973. V. 2. P. 467–486.
77. Stober H., DeWitte W. Sulfadiazine // *Analytical Profiles of Drug Substances.* 1982. V. 11. P. 523–551.
78. Kapoor V.K. Sulfathiazole // *Anal. Profiles Drug Subst. Excip.* 1993. V. 22. P. 389–430.
79. Thangadurai S., Shukla K., Anjaneyulu Y. Separation and detection of certain β -lactam and fluoroquinolone antibiotic drugs by thin layer chromatography // *Anal. Sci.* 2002. V. 18. P. 97–100.
80. Marsich L., Bonifacio A., Mandal S., Krol S., Beleites C., Sergio V. Poly-l-lysine-coated silver nanoparticles as positively charged substrates for surface-enhanced Raman scattering // *Langmuir.* 2012. V. 28. P. 13166–13171.
81. Oh H., Kim M., Park J. Polyelectrolyte modified Ag-nanosphere: A practical approach for sensitive and selective SERS-based detection of organic pollutants // *Opt. Mater.* 2024. V. 156. P. 116036.

82. Stewart J.J.P. Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA (2016) <http://OpenMOPAC.net>
83. Řezáč J., Hobza P. Advanced corrections of hydrogen bonding and dispersion for semiempirical quantum mechanical methods // *J. Chem. Theory Comput.* 2012. V. 8. P. 141–151.
84. Stefancu A., Biro O.M., Todor-Boer O., Botiz I., Cortés E., Leopold N. Halide–metal complexes at plasmonic interfaces create new decay pathways for plasmons and excited molecules // *ACS Photonics.* 2022. V. 9. P. 895–904.
85. Hu W., Chen Y., Xia L., Hu Y., Li G. Flexible membrane composite based on sepiolite/chitosan/(silver nanoparticles) for enrichment and surface-enhanced Raman scattering determination of sulfamethoxazole in animal-derived food // *Microchim. Acta.* 2022. V. 189. P. 199.
86. Yu Z., Huang L., Zhang Z., Li G. Magnetic $Ti_3C_2T_x/Fe_3O_4/Ag$ substrate for rapid quantification of trace sulfonamides in aquatic products by surface enhanced Raman spectroscopy // *Chin. Chem. Lett.* 2022. V. 33. P. 3853–3858.
87. Xu L., Wu R., Geng X., Zhu X., Xiong Y., Chen T., Ai S. Rapid detection of sulfonamide antibiotics residues in swine urine by surface-enhanced Raman spectroscopy // *Spectrochim. Acta A.* 2022. V. 267. P. 120570.
88. Markina N.E., Markin A.V., Zakharevich A.M., Goryacheva I.Yu. Calcium carbonate microparticles with embedded silver and magnetite nanoparticles as new SERS-active sorbent for solid phase extraction // *Microchim. Acta.* 2017. V. 184. P. 3937–3944.
89. Muehlig A., Jahn I.J., Heidler J., Jahn M., Weber K., Sheen P., Zimic M., Cialla-May D., Popp J. Molecular specific and sensitive detection of pyrazinamide and its metabolite pyrazinoic acid by means of surface enhanced Raman spectroscopy employing in situ prepared colloids // *Appl. Sci.* 2019. V. 9. P. 2511.
90. Cho S.H., Baek K.M., Han H.J., Kim M., Park H., Jung Y.S. Selective, quantitative, and multiplexed surface-enhanced Raman spectroscopy using aptamer-functionalized monolithic plasmonic nanogrids derived from cross-point nano-welding // *Adv. Funct. Mater.* 2020. V. 30. P. 2000612.

91. Ma Y., Liu H., Mao M., Meng J., Yang L., Liu J. Surface-enhanced Raman spectroscopy on liquid interfacial nanoparticle arrays for multiplex detecting drugs in urine // *Anal. Chem.* 2016. V. 88. P. 8145–8151.
92. Zhao Y., Xu Y., Jing X., Ma W. SERS-active plasmonic metal NP-CsPbX₃ films for multiple veterinary drug residues detection // *Food Chem.* 2023. V. 412. P. 135420.
93. Chamuah N., Saikia A., Joseph A.M., Nath P. Blu-ray DVD as SERS substrate for reliable detection of albumin, creatinine and urea in urine // *Sens. Actuators B Chem.* 2019. V. 285. P. 108–115.
94. Han C., Wang Q., Yao Y., Zhang Q., Huang J., Zhang H., Qu L. Thin layer chromatography coupled with surface enhanced Raman scattering for rapid separation and on-site detection of multi-components // *J. Chromatogr. A.* 2023. V. 1706. P. 464217.
95. Týčová A., Klepárník K. Combination of liquid-based column separations with surface-enhanced Raman spectroscopy // *J. Sep. Sci.* 2019. V. 42. P. 431–444.
96. Iven H., Brasch H. Cephalosporins increase the renal clearance of methotrexate and 7-hydroxymethotrexate in rabbits // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1990. V. 26. P. 139–143.
97. Bubik R.J., Osmon D.R., Oravec C.P., Rivera C.G. Two cases of severe neutropenia in patients on low-dose methotrexate and ceftriaxone // *Am. J. Health Syst. Pharm.* 2019. V. 76. P. 804–809.
98. Demirkaya E., Atay A.A., Musabak U., Sengul A., Gok F. Ceftriaxone-related hemolysis and acute renal failure // *Pediatr. Nephrol.* 2006. V. 21. P. 733–736.
99. Shen-Hua W., Fan-Yi M., Qing-Ling Z., Li-Na Z., Li-Jun M. Ceftriaxone-associated renal toxicity in adults: a case report and recommendations for the management of such cases // *J. Clin. Pharm. Ther.* 2016. V. 41. P. 348–350.
100. Wiczer T., Dotson E., Tuten A., Phillips G., Maddocks K. Evaluation of incidence and risk factors for high-dose methotrexate-induced nephrotoxicity // *J. Oncol. Pharm. Practice.* 2016. V. 22. P. 430–436.

101. Barr D.B., Wilder L.C., Caudill S.P., Gonzalez A.J., Needham L.L., Pirkle J.L. Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: implications for urinary biologic monitoring measurements // *Environ. Health Perspect.* 2005. V. 113. P. 192–200.
102. Markina N.E., Goryacheva I.Yu., Markin A.V. Sample pretreatment and SERS-based detection of ceftriaxone in urine // *Anal. Bioanal. Chem.* 2018. V. 410. P. 2221–2227.
103. Markina N.E., Markin A.V., Weber K., Popp J., Cialla-May D. Liquid-liquid extraction assisted SERS detection of sulfamethoxazole in spiked human urine // *Anal. Chim. Acta.* 2020. V. 1109. P. 61–68.
104. Маркина Н.Е., Захаревич А.М., Маркин А.В. Совмещение ТСХ с ГКР для детектирования антибиотиков фторхинолонового ряда в моче / Материалы IV Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» с международным участием, Краснодар, 2020, С. 141.
105. Yang L., Li P., Liu J. Progress in multifunctional surface-enhanced Raman scattering substrate for detection // *RSC Adv.* 2014. V. 4. P. 49635–49646.
106. Alvarez-Puebla R.A., Liz-Marzán L.M. Traps and cages for universal SERS detection // *Chem. Soc. Rev.* 2012. V. 41. P. 43–51.
107. Innocenzi P., Malfatti L. Mesoporous materials as platforms for surface-enhanced Raman scattering // *Trends Anal. Chem.* 2019. V. 114. P. 233–241.
108. Guo X., Li J., Arabi M., Wang X., Wang Y., Chen L. Molecular-imprinting-based surface-enhanced Raman scattering sensors // *ACS Sens.* 2020. V. 5. P. 601–619.
109. Kang H., Buchman J.T., Rodriguez R.S., Ring H.L., He J., Bantz K.C., Haynes C.L. Stabilization of silver and gold nanoparticles: preservation and improvement of plasmonic functionalities // *Chem. Rev.* 2019. V. 119. P. 664–699.
110. Sun H., Liu H., Wu Y. A green, reusable SERS film with high sensitivity for in-situ detection of thiram in apple juice // *Appl. Surf. Sci.* 2017. V. 416. P. 704–709.

111. Jiang Y., Carboni D., Malfatti L., Innocenzi P. Graphene oxide-silver nanoparticles in molecularly-imprinted hybrid films enabling SERS selective sensing // *Materials*. 2018. V. 11. P. 1674.
112. Aldeanueva-Potel P., Faucher E., Alvarez-Puebla R.A., Liz-Marzan L.M., Brust M. Recyclable molecular trapping and SERS detection in silver-loaded agarose gels with dynamic hot spots // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. P. 9233–9238.
113. Wang W., Guo Q., Xu M., Yuan Y., Gu R., Yao J. On-line surface enhanced Raman spectroscopic detection in a recyclable Au@SiO₂ modified glass capillary // *J. Raman Spectrosc.* 2014. V. 45. P. 736–744.
114. Zhou Y., Chen J., Zhang L., Yang L.B. Multifunctional TiO₂-coated Ag nanowire arrays as recyclable SERS substrates for the detection of organic pollutants // *Eur. J. Inorg. Chem.* 2012. V. 2012. P. 3176.
115. Zou X.X., Silva R., Huang X.X., Al-Sharab J.F., Asefa T. A self-cleaning porous TiO₂-Ag core-shell nanocomposite material for surface-enhanced Raman scattering // *Chem. Commun.* 2013. V. 49. P. 382.
116. Chen M., Luo W., Zhang Z., Wang R., Zhu Y., Yang H., Chen X. Synthesis of multi-Au-nanoparticle-embedded mesoporous silica microspheres as self-filtering and reusable substrates for SERS detection // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2017. V. 9. P. 42156–42166.
117. Farquharson S., Gift A.D., Shende C., Maksymiuk P., Inscore F.E., Murrain J. Detection of 5-fluorouracil in saliva using surface-enhanced Raman spectroscopy // *Vib. Spectrosc.* 2005. V. 38. P. 79–84.
118. Jana D., Mandal A., De G. High Raman enhancing shape-tunable Ag nanoplates in alumina: a reliable and efficient SERS technique // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2012. V. 4. P. 3330–3334.
119. Iancu V., Baia L., Tarcea N., Popp J., Baia M. Towards TiO₂-Ag porous nanocomposites based SERS sensors for chemical pollutant detection // *J. Mol. Struct.* 2014. V. 1073. P. 51–57.
120. Stetciura I.Y., Markin A.V., Ponomarev A.N., Yakimansky A.V., Demina T.S., Grandfils C., Volodkin D.V., Gorin D.A. New surface-enhanced

Raman scattering platforms: composite calcium carbonate microspheres coated with astralen and silver nanoparticles // *Langmuir*. 2013. V. 29. P. 4140–4147.

121. Farquharson S., Shende C., Sengupta A., Huang H., Inscore F. Rapid detection and identification of overdose drugs in saliva by surface-enhanced Raman scattering using fused gold colloids // *Pharmaceutics*. 2011. V. 3. P. 425–439.

122. Inscore F., Shende C., Sengupta A., Huang H., Farquharson S. Detection of drugs of abuse in saliva by surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) // *Appl. Spectrosc.* 2011. V. 65. P. 1004–1008.

123. Shanthil M., Fathima H., Thomas K.G. Cost-effective plasmonic platforms: glass capillaries decorated with Ag@SiO₂ nanoparticles on inner walls as SERS substrates // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2017. V. 9. P. 19470–19477.

124. Lofrumento C., Ricci M., Platania E., Becucci M., Castellucci E. SERS detection of red organic dyes in Ag-agar gel // *J. Raman Spectrosc.* 2013. V. 44. P. 47–54.

125. Contreras-Cáceres R., Abalde-Cela S., Guardia-Girós P., Fernández-Barbero A., Pérez-Juste J., Alvarez-Puebla R.A., Liz-Marzán L.M. Multifunctional microgel magnetic/optical traps for SERS ultradetection // *Langmuir*. 2011. V. 27. P. 4520–4525.

126. Hu R., Tang R., Xu J., Lu F. Chemical nanosensors based on molecularly-imprinted polymers doped with silver nanoparticles for the rapid detection of caffeine in wastewater // *Anal. Chim. Acta*. 2018. V. 1034. P. 176–183.

127. Xue J.Q., Li D.W., Qu L.L., Long Y.T. Surface-imprinted core-shell Au nanoparticles for selective detection of bisphenol A based on surface-enhanced Raman scattering // *Anal. Chim. Acta*. 2013. V. 777. P. 57–62.

128. Gao Z., Burrows N.D., Valley N.A., Schatz G.C., Murphy C.J., Haynes C.L. In solution SERS sensing using mesoporous silica-coated gold nanorods // *Analyst*. 2016. V. 141. P. 5088–5095.

129. López-Puente V., Angelomé P.C., Soler-Illia G.J.A.A., Liz-Marzán L.M. Selective SERS sensing modulated by functionalized mesoporous films // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2015. V. 7. P. 25633–25640.
130. Markina N.E., Zakharevich A.M., Markin A.V. Improvement of creatinine SERS detection using molecularly imprinted silica gel // *Proc. SPIE*. 2019. V. 11065. P. 110651M.
131. Jiang C., Qian Y., Gao Q., Dong J., Qian W. In situ controllable preparation of gold nanorods in thermo-responsive hydrogels and their application in surface enhanced Raman scattering // *J. Mater. Chem.* 2010. V. 20. P. 8711–8716.
132. Qian X., Li J., Nie S. Stimuli-responsive SERS nanoparticles: conformational control of plasmonic coupling and surface Raman enhancement // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. P. 7540–7541.
133. Gupta M.K., Chang S., Singamaneni S., Drummy L.F., Gunawidjaja R., Naik R.R., Tsukruk V.V. pH-triggered SERS via modulated plasmonic coupling in individual bimetallic nanocobs // *Small*. 2011. V. 7. P. 1192–1198.
134. Bompert M., De Wilde Y., Haupt K. Chemical nanosensors based on composite molecularly imprinted polymer particles and surface-enhanced Raman scattering // *Adv. Mater.* 2010. V. 22. P. 2343–2348.
135. Xie Y.F., Zhao M.Y., Hu Q., Cheng Y.L., Guo Y.H., Qian H., Yao W.R. Selective detection of chloramphenicol in milk based on a molecularly imprinted polymer-surface-enhanced Raman spectroscopic nanosensor // *J. Raman Spectrosc.* 2017. V. 48. P. 204–210.
136. Jahn I.J., Zukovskaja O., Zheng X.S., Weber K., Bocklitz T.W., Cialla-May D., Popp J. Surface-enhanced Raman spectroscopy and microfluidic platforms: challenges, solutions and potential applications // *Analyst*. 2017. V. 142. P. 1022–1047.
137. Lv Y.Q., Qin Y.T., Svec F., Tan T.W. Molecularly imprinted plasmonic nanosensor for selective SERS detection of protein biomarkers // *Biosens. Bioelectron.* 2016. V. 80. P. 433–441.

138. Kantarovich K., Tsarfati I., Gheber L.A., Haupt K., Bar I. Writing droplets of molecularly imprinted polymers by nano fountain pen and detecting their molecular interactions by surface-enhanced Raman scattering // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. P. 5686–5690.

139. Liu P., Liu R.Y., Guan G.J., Jiang C.L., Wang S.H., Zhang Z.P. Surface-enhanced Raman scattering sensor for theophylline determination by molecular imprinting on silver nanoparticles // *Analyst.* 2011. V. 136. P. 4152–4158.

140. Carrasco S., Benito-Peña E., Navarro-Villoslada F., Langer J., Sanz-Ortiz M.N., Reguera J., Liz-Marzán L.M., Moreno-Bondi M.C. Multibranched gold–mesoporous silica nanoparticles coated with a molecularly imprinted polymer for label-free antibiotic surface-enhanced Raman scattering analysis // *Chem. Mater.* 2016. V. 28. P. 7947–7954.

141. Li H.J., Wang X.N., Wang Z.R., Jiang J.Q., Qiao Y., Wei M.B., Yan Y.S., Li C.X. A high-performance SERS-imprinted sensor doped with silver particles of different surface morphologies for selective detection of pyrethroids in rivers // *New J. Chem.* 2017. V. 41. P. 14342–14350.

142. Fathima H., Paul L., Thirunavukkuarasu S., Thomas K.G. Mesoporous silica-capped silver nanoparticles for sieving and surface-enhanced Raman scattering-based sensing // *ACS Appl. Nano Mater.* 2020. V. 3. P. 6376–6384.

143. Yang L.B., Ma L.A., Chen G.Y., Liu J.H., Tian Z.Q. Ultrasensitive SERS detection of TNT by imprinting molecular recognition using a new type of stable substrate // *Chem. Eur. J.* 2010. V. 16. P. 12683–12693.

144. Riskin M., Ben-Amram Y., Tel-Vered R., Chegel V., Almog J., Willner I. Molecularly imprinted Au nanoparticles composites on Au surfaces for the surface plasmon resonance detection of pentaerythritol tetranitrate, nitroglycerin, and ethylene glycol dinitrate // *Anal. Chem.* 2011. V. 83. P. 3082–3088.

145. Zhu Y., Wu L., Yan H., Lu Z., Yin W., Han H. Enzyme induced molecularly imprinted polymer on SERS substrate for ultrasensitive detection of patulin // *Anal. Chim. Acta.* 2020. V. 1101. P. 111–119.

146. Wang D., An J., Luo Q., Li X., Li M. A convenient approach to synthesize stable silver nanoparticles and silver/polystyrene nanocomposite particles // *J. Appl. Polym. Sci.* 2008. V. 110. P. 3038–3046.
147. Yeshchenko O.A., Dmitruk I.M., Alexeenko A.A., Kotko A.V., Verdal J., Pinchuk A.O. Size and temperature effects on the surface plasmon resonance in silver nanoparticles // *Plasmonics*. 2012. V. 7. P. 685–694.
148. Lin W.C., Liao L.S., Chen Y.H., Chang H.C., Tsai D.P., Chiang H.P. Size dependence of nanoparticle-SERS enhancement from silver film over nanosphere (AgFON) substrate // *Plasmonics*. 2011. V. 6. P. 201–206.
149. White I.M., Yazdi S.H., Yu W.W. Optofluidic SERS: synergizing photonics and microfluidics for chemical and biological analysis // *Microfluid. Nanofluid.* 2012. V. 13. P. 205–216.
150. Markin A.V., Markina N.E., Goryacheva I.Yu. Raman spectroscopy based analysis inside photonic-crystal fibers // *Trends Anal. Chem.* 2017. V. 88. P. 185–197.
151. Lee P.C., Meisel D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols // *J. Phys. Chem.* 1982. V. 86. P. 3391–3395.
152. Moon K.S., Dong H., Maric R., Pothukuchi S., Hunt A., Li Y., Wong C.P. Thermal behavior of silver nanoparticles for low-temperature interconnect applications // *J. Electron. Mater.* 2005. V. 34. P. 168–175.
153. Svenskaya Y.I., Navolokin N.A., Bucharskaya A.B., Terentyuk G.S., Kuz'mina A.O., Burashnikova M.M., Maslyakova G.N., Lukyanets E.A., Gorin D.A. Calcium carbonate microparticles containing a photosensitizer Photosens: preparation, ultrasound stimulated dye release, and in vivo application // *Nanotechnologies in Russia*. 2014. V. 9. P. 398–409.
154. Volodkin D.V., Petrov A.I., Prevot M., Sukhorukov G.B. Matrix polyelectrolyte microcapsules: new system for macromolecule encapsulation // *Langmuir*. 2004. V. 20. P. 3398–3406.
155. Haynes C.L., McFarland A.D., Van Duyne R.P. Surface-enhanced Raman spectroscopy // *Anal. Chem.* 2005. V. 77. P. 338–346.

156. Zhang R., Gellman A.J. Straight-chain alcohol adsorption of the silver(110) surface // *J. Phys. Chem.* 1991. V. 95. P. 7433–7437.

157. German S.V., Inozemtseva O.A., Markin A.V., Metvalli K., Khomutov G.B., Gorin D.A. Synthesis of magnetite hydrosols in inert atmosphere // *Colloid Journal.* 2013. V. 75. P. 483–486.

158. Маркина Н.Е., Пожаров М.В., Захаревич А.М., Бурмистрова Н.А., Маркин А.В. Детектирование лекарственных веществ магнитоуправляемыми ГКР-активными структурами «ядро-оболочка» // *Известия Саратовского университета. Новая сер. Сер. Химия. Биология. Экология.* 2016. Т. 16. Вып. 1. С. 52–58.

159. Русанова Т.Ю., Маркин А.В., Юрова Н.С., Бесараб Н.П., Горин Д.А. Золь-гель материалы с наночастицами серебра для одновременного концентрирования и определения веществ методом гигантского комбинационного рассеяния света // *Известия Саратовского университета. Новая сер. Сер. Химия. Биология. Экология.* 2013. Т. 13. Вып. 4. С. 12–19.

160. Markina N.E., Markin A.V., Zakharevich A.M., Gorin D.A., Rusanova T.Yu., Goryacheva I.Yu. Multifunctional silver nanoparticles doped silica for solid-phase extraction and surface-enhanced Raman scattering detection // *J. Nanopart. Res.* 2016. V. 18. P. 353.

161. Yurova N.S., Markina N.E., Pozharov M.V., Zakharevich A.M., Rusanova T.Yu., Markin A.V. SERS-active sorbent based on aluminum oxide loaded with silver nanoparticles // *Colloid Surf. A.* 2016. V. 495. P. 169–175.

162. Yurova N.S., Markina N.E., Galushka V.V., Burashnikova M.M., Zakharevich A.M., Markin A.V., Rusanova T.Yu. New SERS-active alumina-based sorbents containing Ag nanoparticles // *Proc. SPIE.* 2016. V. 9917. P. 99171G.

163. Markina N.E., Zakharevich A.M., Markin A.V. Determination of methotrexate in spiked human urine using SERS-active sorbent // *Anal. Bioanal. Chem.* 2020. V. 412. P. 7757–7766.

164. Jansook P., Ogawa N., Loftsson T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications // *Int. J. Pharm.* 2018. V. 535. P. 272–284.
165. Morin-Crini N, Winterton P., Fourmentin S., Wilson L.D., Fenyvesi E., Crini G. Water-insoluble β -cyclodextrin–epichlorohydrin polymers for removal of pollutants from aqueous solutions by sorption processes using batch studies: A review of inclusion mechanisms // *Prog. Polym. Sci.* 2018. V. 78. P. 1–23.
166. Markina N.E., Cialla-May D., Markin A.V. Cyclodextrin-assisted surface-enhanced Raman spectroscopy: a critical review // *Anal. Bioanal. Chem.* 2022. V. 414. P. 923–942.
167. Strickland A.D., Batt C.A. Detection of carbendazim by surface-enhanced Raman scattering using cyclodextrin inclusion complexes on gold nanorods // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. P. 2895–2903.
168. Wang J., Kong L.T., Guo Z., Xu J.Y., Liu J.H. Synthesis of novel decorated one-dimensional gold nanoparticle and its application in ultrasensitive detection of insecticide // *J. Mater. Chem.* 2010. V. 20. P. 5271–5289.
169. Wu M., Li P., Zhu Q., Wu M., Li H., Lu F. Functional paper-based SERS substrate for rapid and sensitive detection of Sudan dyes in herbal medicine // *Spectrochim. Acta A.* 2018. V. 196. P. 110–116.
170. Abalde-Cela S., Hermida-Ramón J.M., Contreras-Carballada P., De Cola L., Guerrero-Martínez A., Alvarez-Puebla R.A., Liz-Marzán L.M. SERS chiral recognition and quantification of enantiomers through cyclodextrin supramolecular complexation // *ChemPhysChem.* 2011. V. 12. P. 1529–1535.
171. Zhou Y., Li J., Zhang L., Ge Z., Wang X., Hu X., Xu T., Li P., Xu W. HS- β -cyclodextrin-functionalized Ag@Fe₃O₄@Ag nanoparticles as a surface-enhanced Raman spectroscopy substrate for the sensitive detection of butyl benzyl phthalate // *Anal. Bioanal. Chem.* 2019. V. 411. P. 5691–5701.
172. Barreto W.J., Santos P.S., Rubim J.C. SERS of the bis(4,5-dimercapto-1,3-dithiole-2-thionato) nickelate(III) complex ion and of its inclusion compound

in γ -cyclodextrin adsorbed on a silver electrode // *Vib. Spectrosc.* 1993. V. 6. P. 87–93.

173. Wang X.M., Yan M.D., Zhu J.J., Chen H.Y. The surface-enhanced Raman spectroelectrochemical study on the interaction between β -cyclodextrin and the electrochemically generated radical intermediate of flavin // *J. Electroanal. Chem.* 1998. V. 451. P. 187–192.

174. McNally A., Forster R.J., Keyes T.E. Interfacial supramolecular cyclodextrin-fullerene assemblies: host reorientation and guest stabilization // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2009. V. 11. P. 848–856.

175. Hill W., Fallourd V., Klockow D. Investigation of the adsorption of gaseous aromatic compounds at surfaces coated with heptakis(6-thio-6-deoxy)- β -cyclodextrin by surface-enhanced Raman scattering // *J. Phys. Chem. B.* 1999. V. 103. P. 4707–4713.

176. Ma P., Liang F., Sun Y., Jin Y., Chen Y., Wang X., Zhang H., Gao D., Song D. Rapid determination of melamine in milk and milk powder by surface-enhanced Raman spectroscopy and using cyclodextrin-decorated silver nanoparticles // *Microchim. Acta.* 2013. V. 180. P. 1173–1180.

177. Ma P., Liang F., Yang Q., Wang D., Sun Y., Wang X., Gao D., Song D. Highly sensitive SERS probe for mercury(II) using cyclodextrin-protected silver nanoparticles functionalized with methimazole // *Microchim. Acta.* 2014. V. 181. P. 975–981.

178. Ma P., Liang F., Wang D., Yang Q., Cao B., Song D., Gao D., Wang X. Selective determination of o-phenylenediamine by surface-enhanced Raman spectroscopy using silver nanoparticles decorated with α -cyclodextrin // *Microchim. Acta.* 2015. V. 182. P. 167–174.

179. Zhang L., Li P., Bu X., Wu J., Zhang X., Zhao B., Tian Y. Combined host-guest complex with coffee-ring effect for constructing ultrasensitive SERS substrate for phenformin hydrochloride detection in healthcare products // *Anal. Bioanal. Chem.* 2018. V. 410. P. 7599–7609.

180. Zhao R., Bi S., Shao D., Sun X., Li X. Rapid determination of marbofloxacin by surface-enhanced Raman spectroscopy of silver nanoparticles modified by β -cyclodextrin // *Spectrochim. Acta A*. 2020. V. 229. P. 118009.
181. Gannimani R., Ramesh M., Mtambo S., Pillay K., Soliman M.E., Govender P. γ -Cyclodextrin capped silver nanoparticles for molecular recognition and enhancement of antibacterial activity of chloramphenicol // *J. Inorg. Biochem.* 2016. V. 157. P. 15–24.
182. Ouyang L., Jiang Z., Wang N., Zhu L., Tang H. Rapid surface enhanced Raman scattering (SERS) detection of sibutramine hydrochloride in pharmaceutical capsules with a β -cyclodextrin- Ag/polyvinyl alcohol hydrogel substrate // *Sensors*. 2017. V. 17. P. 1601.
183. de Souza M.L., Otero J.C., López-Tocón I. Comparative performance of citrate, borohydride, hydroxylamine and β -cyclodextrin silver sols for detecting ibuprofen and caffeine pollutants by means of surface-enhanced Raman spectroscopy // *Nanomaterials*. 2020. V. 10. P. 2339.
184. Yuan Q., Wang Y. SERS detection of hydrophobic molecules: thio- β -cyclodextrin-driven rapid self-assembly of uniform silver nanoparticle monolayers and analyte trapping // *Biosensors*. 2025. V. 15. P. 52.
185. Hahm E., Jeong D., Cha M.G., Choi J.M., Pham X.H., Kim H.M., Kim H., Lee Y.S., Jeong D.H., Jung S., Jun B.H. β -CD dimer-immobilized Ag assembly embedded silica nanoparticles for sensitive detection of polycyclic aromatic hydrocarbons // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 26082.
186. Yang L., Chen Y., Li H., Luo L., Zhao Y., Zhang H., Tian Y. Application of silver nanoparticles decorated with β -cyclodextrin in determination of 6-mercaptopurine by surface-enhanced Raman spectroscopy // *Anal. Methods*. 2015. V. 7. P. 6520–6527.
187. Ouyang L., Zhu L., Ruan Y., Tang H. Preparation of a native β -cyclodextrin modified plasmonic hydrogel substrate and its use as a surface-enhanced Raman scattering scaffold for antibiotics identification // *J. Mater. Chem. C*. 2015. V. 3. P. 7575–7582.

188. Jia F., Yang X., Li Z. Synthesis and application of colloidal beta-cyclodextrin-decorated silver nanoparticles for rapid determination of malachite green in environmental water using surface-enhanced Raman spectroscopy // *RSC Adv.* 2016. V. 6. P. 92723–92728.

189. Markina N.E., Markin A.V., Cialla-May D. Cyclodextrin-assisted SERS determination of fluoroquinolone antibiotics in urine and blood plasma // *Talanta.* 2023. V. 254. P. 124083.

190. Burckbuchler V., Wintgens V., Lecomte S., Percot A., Leborgne C., Danos O., Kichler A., Amiel C. DNA compaction into new DNA vectors based on cyclodextrin polymer: Surface enhanced Raman spectroscopy characterization // *Biopolymers.* 2006. V. 81. P. 360–370.

191. Hao Y.Q., Wu Y., Wu L., Liu J., Luo G. Surface-enhanced Raman scattering studies on the recognition mechanism of glutathione peroxidase mimics, bis-cyclodextrin diselenide // *Colloids Surf. A.* 2005. V. 257–258. P. 111–115.

192. Choi J.M., Hahm E., Park K., Jeong D., Rho W.Y., Kim J., Jeong D.H., Lee Y.S., Jhang S.H., Chung H.J., Cho E., Yu J.H., Jun B.H., Jung S. SERS-based flavonoid detection using ethylenediamine- β -cyclodextrin as a capturing ligand // *Nanomaterials.* 2017. V. 7. P. 8.

193. Li J., Hu X., Zhou Y., Zhang L., Ge Z., Wang X., Xu W. β -Cyclodextrin-stabilized Au nanoparticles for the detection of butyl benzyl phthalate // *ACS Appl. Nano Mater.* 2019. V. 2. P. 2743–2751.

194. Zhang D., Hao R., Zhang L., You H., Fang J. Ratiometric sensing of polycyclic aromatic hydrocarbons using capturing ligand functionalized mesoporous Au nanoparticles as a surface-enhanced Raman scattering substrate // *Langmuir.* 2020. V. 36. P. 11366–11373.

195. Yu Z., Grasso M.F., Sorensen H.H., Zhang P. Ratiometric SERS detection of polycyclic aromatic hydrocarbons assisted by β -cyclodextrin-modified gold nanoparticles // *Microchim. Acta.* 2019. V. 186. P. 391.

196. Zhu C., Meng G., Huang Q., Li Z., Huang Z., Wang M., Yuan J. Large-scale well-separated Ag nanosheet-assembled micro-hemispheres modified with

HS- β -CD as effective SERS substrates for trace detection of PCBs // *J. Mater. Chem.* 2012. V. 22. P. 2271–2278.

197. Koh E.H., Moon J.Y., Kim S.Y., Lee W.C., Park S.G., Kim D.H., Jung H.S. A cyclodextrin-decorated plasmonic gold nanosatellite substrate for selective detection of bipyridylum pesticides // *Analyst.* 2021. V. 146. P. 305–314.

198. Vassalini I., Ribaud G., Gianoncelli A., Casula M.F., Alessandri I. Plasmonic hydrogels for capture, detection and removal of organic pollutants // *Environ. Sci.: Nano.* 2020. V. 7. P. 3888–3900.

199. Bodoki E., Oltean M., Bodoki A., Ştiufiuc R. Chiral recognition and quantification of propranolol enantiomers by surface enhanced Raman scattering through supramolecular interaction with β -cyclodextrin // *Talanta.* 2012. V. 101. P. 53–58.

200. Zengin A., Tamer U., Caykara T. SERS detection of polyaromatic hydrocarbons on a β -cyclodextrin containing polymer brush // *J. Raman Spectrosc.* 2018. V. 49. P. 452–461.

201. Maeda Y., Kitano H. Inclusional complexation by cyclodextrins at the surface of silver as evidenced by surface-enhanced resonance Raman spectroscopy // *J. Phys. Chem.* 1995. V. 99. P. 487–488.

202. Yamamoto H., Maeda Y., Kitano H. Molecular recognition by self-assembled monolayers of cyclodextrin on Ag // *J. Phys. Chem. B.* 1997. V. 101. P. 6855–6860.

203. Liang E.J., Engert C., Kiefer W. Surface-enhanced Raman scattering of halide ions, pyridine and crystal violet on colloidal silver with near-infrared excitation: low-wavenumber vibrational modes // *Vib. Spectrosc.* 1995. V. 8. P. 435–444.

204. Loftsson T., Masson M., Brewster M.E. Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes // *J. Pharm. Sci.* 2004. V. 93. P. 1091–1099.

205. Li J., Zhang X. Preparation and characterization of the inclusion complex of ofloxacin with β -CD and HP- β -CD // *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 2011. V. 69. P. 173–179.

206. Tóth G., Mohácsi R., Rácz Á., Rusu A., Horváth P., Szente L., Béni S., Noszál B. Equilibrium and structural characterization of ofloxacin–cyclodextrin complexation // *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 2013. V. 77. P. 291–300.
207. Mochida K., Kagita A., Matsui Y., Date Y. Effects of inorganic salts on the dissociation of a complex of β -cyclodextrin with an azo dye in an aqueous solution // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1973. V. 46. P. 3703–3707.
208. Buvári Á., Barcza L. Complex formation of inorganic salts with β -cyclodextrin // *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 1989. V. 7. P. 379–389.
209. Bergogne-Bérézin E. Clinical role of protein binding of quinolones // *Clin. Pharmacokinet.* 2002. V. 41. P. 741–750.
210. Markina N.E., Goryacheva I.Yu., Markin A.V. Amplification of SERS signal of methotrexate using beta-cyclodextrin modified silver nanoparticles // *Colloids and Interfaces.* 2023. V. 7. P. 42.
211. Reguera J., Langer J., de Aberasturi D.J., Liz-Marzán L.M. Anisotropic metal nanoparticles for surface enhanced Raman scattering // *Chem. Soc. Rev.* 2017. V. 46. P. 3866–3885.
212. Tan X., Melkersson J., Wu S., Wang L., Zhang J. Noble-metal-free materials for surface-enhanced Raman spectroscopy detection // *ChemPhysChem.* 2016. V. 17. P. 2630–2639.
213. Markin A.V., Markina N.E., Popp J., Cialla-May D. Copper nanostructures for chemical analysis using surface-enhanced Raman spectroscopy // *Trends Anal. Chem.* 2018. V. 108. P. 247–259.
214. Wenning U., Pettinger B., Wetzel H. Angular-resolved Raman spectroscopy of pyridine on copper and gold electrodes // *Chem. Phys. Lett.* 1980. V. 70. P. 49–54.
215. Smith B.D., Irish D.E. A surface enhanced Raman scattering study of the intermediate and poisoning species formed during the electrochemical reduction of CO₂ on copper // *J. Electrochem. Soc.* 1997. V. 144. P. 4288–4296.

216. Chan H.Y.H., Takoudis C.G., Weaver M.J. Oxide film formation and oxygen adsorption on copper in aqueous media as probed by surface-enhanced Raman spectroscopy // *J. Phys. Chem. B*. 1999. V. 103. P. 357–365.

217. Santos V.O., Leite I.R., Brolo A.G., Rubim J.C. The electrochemical reduction of CO₂ on a copper electrode in 1-n-butyl-3-methyl imidazolium tetrafluoroborate (BMI.BF₄) monitored by surface-enhanced Raman scattering (SERS) // *J. Raman Spectrosc.* 2016. V. 47. P. 674–680.

218. Allen C.S., Schatz G.C., van Duyne R.P. Tunable laser excitation profile of surface enhanced Raman scattering from pyridine adsorbed on a copper electrode surface // *Chem. Phys. Lett.* 1980. V. 75. P. 201–205.

219. Fleischmann M., Hill R., Mengoli G., Musiani M.M., Akhavan J. A comparative study of the efficiency of some organic inhibitors for the corrosion of copper in aqueous chloride media using electrochemical and surface enhanced Raman scattering techniques // *Electrochim. Acta*. 1985. V. 30. P. 879–888.

220. Musiani M.M., Mengoli G., Fleischmann M., Lowry R.B. An electrochemical and SERS investigation of the influence of pH on the effectiveness of some corrosion inhibitors of copper // *J. Electroanal. Chem.* 1987. V. 217. P. 187–202.

221. Barber T.E., List M.S., Haas J.W. III, Wachter E.A. Determination of nicotine by surface-enhanced Raman scattering (SERS) // *Appl. Spectrosc.* 1994. V. 48. P. 1423–1427.

222. Kudelski A., Janik-Czachor M., Varga M., Dolata M., Bukowska J., Molnar A., Szummer A. Effect of electrochemical pretreatment on SERS and catalytic activity of Cu–Zr amorphous alloys // *Appl. Catal., A*. 1999. V. 181. P. 123–130.

223. Niaura G., Malinauskas A. Surface-enhanced Raman scattering from chloride on copper electrodes // *Chem. Phys. Lett.* 1993. V. 207. P. 455–460.

224. Oda I., Ogasawara H., Ito M. Carbon monoxide adsorption on copper and silver electrodes during carbon dioxide electroreduction studied by infrared

reflection absorption spectroscopy and surface-enhanced Raman spectroscopy // *Langmuir*. 1996. V. 12. P. 1094–1097.

225. Ignatjev I., Podstawka-Proniewicz E., Niaura G., Lombardi J.R., Proniewicz L.M. Potential induced changes in neuromedin B adsorption on Ag, Au, and Cu electrodes monitored by surface-enhanced Raman scattering // *J. Phys. Chem. B*. 2011. V. 115. P. 10525–10536.

226. Wang R.C., Li C.H. Cu, Cu–Cu₂O core–shell, and hollow Cu₂O nanodendrites: structural evolution and reverse surface-enhanced Raman scattering // *Acta Mater*. 2011. V. 59. P. 822–829.

227. Ignatjev I., Proniewicz E., Proniewicz L.M., Niaura G. Effect of potential on temperature-dependent SERS spectra of neuromedin B on Cu electrode // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2013. V. 15. P. 807–815.

228. Halouzka V., Halouzkoval B., Jirovsky D., Hemzal D., Ondra P., Siranidi E., Kontos A.G., Falaras P., Hrbac J. Copper nanowire coated carbon fibers as efficient substrates for detecting designer drugs using SERS // *Talanta*. 2017. V. 165. P. 384–390.

229. Creighton J.A., Alvarez M.S., Wertz D.A., Garoff S., Kim M.W. Surface-enhanced Raman scattering by molecules adsorbed on aqueous copper colloids // *J. Phys. Chem.* 1983. V. 87. P. 4793–4799.

230. Angebrannt M.J., Winizfordner J.D. Surface enhanced Raman spectroscopy on copper hydrosols // *Talanta*. 1992. V. 39. P. 569–572.

231. Li M., Su Y., Zhao J., Geng H., Zhang J., Zhang L., Yang C., Zhang Y. One-pot preparation of thin nanoporous copper foils with enhanced light absorption and SERS properties // *Cryst. Eng. Comm.* 2015. V. 17. P. 1296–1304.

232. Shin K.S., Lee H.S., Joo S.W., Kim K. Surface-induced photoreduction of 4-nitrobenzenethiol on Cu revealed by surface-enhanced Raman scattering spectroscopy // *J. Phys. Chem. C*. 2007. V. 111. P. 15223–15227.

233. Chen L.Y., Yu J.S., Fujita T., Chen M.W. Nanoporous copper with tunable nanoporosity for SERS applications // *Adv. Funct. Mater.* 2009. V. 19. P. 1221–1226.

234. Diao F., Xiao X., Luo B., Sun H., Ding F., Ci L., Si P. Two-step fabrication of nanoporous copper films with tunable morphology for SERS application // *Appl. Surf. Sci.* 2018. V. 427. P. 1271–1279.
235. Ladouceur H.D., Tevault D.E., Smardzewski R.R. Surface-enhanced Raman scattering from vapor deposited copper, silver, and gold. Excitation profiles and temperature dependence // *J. Chem. Phys.* 1983. V. 78. P. 980–985.
236. Furukawa H., Takahashi M., Ito M. SERS of pyridine on a Cu electrode without ORC // *J. Electroanal. Chem.* 1988. V. 256. P. 213–217.
237. Petersen P., Krasser W. Surface enhanced Raman scattering from a ternary catalyst Cu/ZnO/Al₂O₃ under reaction conditions // *Appl. Surf. Sci.* 1996. V. 103. P. 91–100.
238. Pereira A.J., Gomes J.P., Lenz G.F., Schneider R., Chaker J.A., de Souza P.E.N., Felix J.F. Facile shape-controlled fabrication of copper nanostructures on borophosphate glasses: synthesis, characterization, and their highly sensitive surface-enhanced Raman scattering (SERS) properties // *J. Phys. Chem. C.* 2016. V. 120. P. 12265–12272.
239. Liu Y., Hu Y., Zhang J. Few-layer graphene-encapsulated metal nanoparticles for surface-enhanced Raman spectroscopy // *J. Phys. Chem. C.* 2014. V. 118. P. 8993–8998.
240. Qiu H., Huo Y., Li Z., Zhang C., Chen P., Jiang S., Xu S., Ma Y., Wang S., Li H. Surface-enhanced Raman scattering based on controllable-layer graphene shells directly synthesized on Cu nanoparticles for molecular detection // *ChemPhysChem.* 2015. V. 16. P. 2953–2960.
241. Yan Y., Zhang J., Xu P., Miao P. Fabrication of arrayed triangular micro-cavities for SERS substrates using the force modulated indentation process // *RSC Adv.* 2017. V. 7. P. 11969–11978.
242. Keating M., Song S., Wei G., Graham D., Chen Y., Placido F. Ordered silver and copper nanorod arrays for enhanced Raman scattering created via guided oblique angle deposition on polymer // *J. Phys. Chem. C.* 2014. V. 118. P. 4878–4884.

243. Hu Q., Liu X., Wu C., You Q., Shi T., Zhang W. A general and rapid approach to hybrid metal nanoparticle–ZnO nanowire arrays and their use as active substrates for surface-enhanced Raman scattering detection // *RSC Adv.* 2016. V. 6. P. 1542–1548.

244. Lin H., Shao Q., Hu F., Wang H., Shao M. A direct detection of amino acids with surface-enhanced Raman scattering: Cu nanoparticle-coated copper vanadate nanoribbons from mechanochemistry // *Thin Solid Films.* 2014. V. 558. P. 385–390.

245. Dendisova-Vyskovska M., Prokopec V., Clupek M., Matejka P. Comparison of SERS effectiveness of copper substrates prepared by different methods: what are the values of enhancement factors? // *J. Raman Spectrosc.* 2012. V. 43. P. 181–186.

246. Laufer G., Schaaf T.F., Huneke J.T. Surface enhanced Raman scattering from cyanide adsorbed on copper // *J. Chem. Phys.* 1980. V. 73. P. 2973–2976.

247. Kudelski A., Kedzierzawski P., Bukowska J., Janik-Czachor M. An SERS investigation of CO intermediate adsorption on a modified Cu-Zr amorphous alloy during CO₂ reduction // *Russ. J. Electrochem.* 2000. V. 36. P. 1186–1188.

248. Kudelski A., Janik-Czachor M., Bukowska J., Pisarek M., Szummer A. Effect of ageing in air on morphology and surface-enhanced Raman scattering (SERS) activity of Cu-based amorphous alloys // *Mater. Sci. Eng., A.* 2002. V. 326. P. 364–369.

249. Paul R.L., McQuillan A.J., Hendra P.J., Fleischmann M. Laser Raman spectroscopy at the surface of a copper electrode // *J. Electroanal. Chem.* 1975. V. 66. P. 248–249.

250. Chase B., Parkinson B. A study of the wavelength and potential dependence of surface-enhanced Raman scattering on Cu, Ag, and Au Electrodes // *J. Phys. Chem.* 1991. V. 95. 7810–7813.

251. Xue G., Zhang J. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) study on the air oxidation of copper and its reactions with azoles // *Appl. Spectrosc.* 1991. V. 45. P. 760–764.
252. Markin A.V., Markina N.E. Experimenting with plasmonic copper nanoparticles to demonstrate color changes and reactivity at the nanoscale // *J. Chem. Educ.* 2019. V. 96. P. 1438–1442.
253. Ha D.H., Kim J.J. Surface-enhanced Raman scattering of the pyridine KCl-water-copper system: temperature dependence // *Phys. Rev., B.* 1988. V. 38. P. 12704–12707.
254. Xue G., Dong J., Zhang M. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) and surface-enhanced resonance Raman scattering (SERRS) on HNO₃-roughened copper foil // *Appl. Spectrosc.* 1991. V. 45. P. 756–759.
255. Angel S.M., Katz L.F., Archibald D.D., Honigs D.E. Near-infrared surface-enhanced Raman spectroscopy. Part II: copper and gold colloids // *Appl. Spectrosc.* 1989. V. 43. P. 367–372.
256. Ramani T., Prasanth K.L., Sreedhar B. Air stable colloidal copper nanoparticles: synthesis, characterization and their surface-enhanced Raman scattering properties // *Physica E.* 2016. V. 77. P. 65–71.
257. Wang Y., Asefa T. Poly(allylamine)-stabilized colloidal copper nanoparticles: synthesis, morphology, and their surface-enhanced Raman scattering properties // *Langmuir.* 2010. V. 26. P. 7469–7474.
258. Fleischmann M., Hendra P.J., McQuillan A.J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode // *Chem. Phys. Lett.* 1974. V. 26. P. 163–166.
259. Otto A. The ‘chemical’ (electronic) contribution to surface-enhanced Raman scattering // *J. Raman Spectrosc.* 2005. V. 36. P. 497–509.
260. Lust M., Pucci A., Otto A. SERS and infrared reflection-absorption spectroscopy of NO on cold-deposited Cu // *J. Raman Spectrosc.* 2006. V. 37. P. 166–174.
261. Hamad S., Podagatlapalli G.K., Mohiddon M.A., Soma V.R. Cost effective nanostructured copper substrates prepared with ultrafast laser pulses for

explosives detection using surface enhanced Raman scattering // *Appl. Phys. Lett.* 2014. V. 104. P. 263104.

262. Bassetto V.C., Russell A.E., Kubota L.T., Bartlett P.N. Preparation of copper sphere segment void templates for electrochemical SERS and their use to study the interaction of amino acids with copper under potentiostatic control // *Electrochim. Acta.* 2014. V. 144. P. 400–405.

263. Li X., Liu S., Li W., Mo Y., Hu J. SERS study and DFT simulation of the interaction of cytosine with copper electrode // *Z. Phys. Chem.* 2011. V. 225. P. 661–672.

264. Bloxham S., Eicher-Lorka O., Jakubėnas R., Niaura G. Adsorption of cysteamine at copper electrodes as studied by surface-enhanced Raman spectroscopy // *Spectrosc. Lett.* 2003. V. 36. P. 211–226.

265. Dendisova-Vyskovska M., Broncova G., Clupek M., Prokopec V., Matejka P. In situ SERS spectroelectrochemical analysis of antioxidants deposited on copper substrates: What is the effect of applied potential on sorption behavior? // *Spectrochim. Acta A.* 2012. V. 99. P. 196–204.

266. Zong R.L., Zhou J., Li B., Fu M., Shi S.K., Li L.T. Optical properties of transparent copper nanorod and nanowire arrays embedded in anodic alumina oxide // *J. Chem. Phys.* 2005. V. 123. P. 094710.

267. Oh M.K., Baik H.J., Kim S.K., Park S. Multiple surface plasmon resonances in silver and copper nanorods // *J. Mater. Chem.* 2011. V. 21. P. 19069.

268. Morton S.M., Silverstein D.W., Jensen L. Theoretical studies of plasmonics using electronic structure methods // *Chem. Rev.* 2011. V. 111. P. 3962–3994.

269. Baishya K., Idrobo J.C., Ogut S., Yang M., Jackson K.A., Jellinek J. First-principles absorption spectra of Cu_n ($n = 2\text{--}20$) clusters // *Phys. Rev. B.* 2011. V. 83. P. 245402.

270. Lecoultre S., Rydlo A., Félix C., Buttet J., Gilb S., Harbich W. Optical absorption of small copper clusters in neon: Cu_n ($n = 1\text{--}9$) // *J. Chem. Phys.* 2011. V. 134. P. 074303.

271. Anak B., Bencharif M., Rabilloud F. Time-dependent density functional study of UV-visible absorption spectra of small noble metal clusters (Cu_n , Ag_n , Au_n , $n = 2-9, 20$) // RSC Adv. 2014. V. 4. P. 13001–13011.

272. Sönnichsen C., Franzl T., Wilk T., von Plessen G., Feldmann J., Wilson O., Mulvaney P. Drastic reduction of plasmon damping in gold nanorods // Phys. Rev. Lett. 2002. V. 88. P. 077402.

273. Khlebtsov B.N., Khlebtsov N.G. Multipole plasmons in metal nanorods: scaling properties and dependence on particle size, shape, orientation, and dielectric environment // J. Phys. Chem. C. 2007. V. 111. P. 11516–11527.

274. Bhanushali B., Ghosh P., Ganesh A., Cheng W. 1D copper nanostructures: progress, challenges and opportunities // Small. 2015. V. 11. P. 1232–1252.

275. Duan J.L., Cornelius T.W., Liu J., Karim S., Yao H.J., Picht O., Rauber M., Muller S., Neumann R. Surface plasmon resonances of Cu nanowire arrays // J. Phys. Chem. C. 2009. V. 113. P. 13583–13587.

276. Dykman L., Khlebtsov N. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives // Chem. Soc. Rev. 2012. V. 41. P. 2256–2282.

277. Cao J., Sun T., Grattan K.T.V. Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensors: A review // Sensor Actuat B-Chem. 2014. V. 195. P. 332–351.

278. Granovsky A.A. Firefly Version 8. <http://classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html>.

279. Schmidt M.W., Baldrige K.K., Boatz J.A., Elbert S.T., Gordon M.S., Jensen J.H., Koseki S., Matsunaga N., Nguyen K.A., Su S., Windus T.L., Dupuis M., Montgomery J.A. General atomic and molecular electronic structure system // J. Comput. Chem. 1993. V. 14. P. 1347–1363.

280. Adamo C., Barone V. Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: the PBE0 model // J. Chem. Phys. 1999. V. 110. P. 6158–6170.

281. Jacquemin D., Mennucci B., Adamo C. Excited-state calculations with TD-DFT: from benchmarks to simulations in complex environments // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2011. V. 13. P. 16987–16998.
282. Wu D.Y., Liu X.M., Duan S., Xu X., Ren B., Lin S.H., Tian Z.Q. Chemical enhancement effects in SERS spectra: a quantum chemical study of pyridine interacting with copper, silver, gold and platinum metals // *J. Phys. Chem. C.* 2008. V. 112. P. 4195–4204.
283. Gao B., Ruud K., Luo Y. Plasmon resonances in linear noble-metal chains // *J. Chem. Phys.* 2012. V. 137. P. 194307.
284. O'Boyle N.M., Tenderholt A.L., Langner K.M. Cclib: a library for package-independent computational chemistry algorithms // *J. Comp. Chem.* 2008. V. 29. P. 839–845.
285. Kittel C. Introduction to solid-state physics. John Wiley & Sons Inc, New York. 2018. 720 p.
286. Yan J., Yuan Z., Gao S. End and central plasmon resonances in linear atomic chains // *Phys. Rev. Lett.* 2007. V. 98. P. 216602.
287. Yan J., Gao S. Plasmon resonances in linear atomic chains: free-electron behaviour and anisotropic screening of d electrons // *Phys. Rev. B.* 2008. V. 78. P. 235413.
288. Schider G., Krenn J.R., Hohenau A., Ditlbacher H., Leitner A., Aussenegg F.R., Schaich W.L., Puscasu I., Monacelli B., Boreman G. Plasmon dispersion relation of Au and Ag nanowires // *Phys. Rev. B.* 2003. V. 68. P. 155427.
289. Kolb D.M., Rotermund H.H., Schrittenlacher W., Schroeder W. Optical spectrum of matrix-isolated Cu₂ // *J. Chem. Phys.* 1984. V. 80. P. 695–700.
290. Pastoriza-Santos I., Sánchez-Iglesias A., Rodríguez-González B., Liz-Marzán L.M. Aerobic synthesis of Cu nanoplates with intense plasmon resonances // *Small.* 2009. V. 5. P. 440–443.

291. Wang H., Tam F., Grady N.K., Halas N.J. Cu nanoshells: effects of interband transitions on the nanoparticle plasmon resonance // *J. Phys. Chem. B*. 2005. V. 109. P. 18218–18222.
292. Jensen L., Aikens C.M., Schatz G.C. Electronic structure methods for studying surface-enhanced Raman scattering // *Chem. Soc. Rev.* 2008. V. 37. P. 1061–1073.
293. Yang H.J., He S.Y., Tuan H.Y. Self-seeded growth of five-fold twinned copper nanowires: mechanistic study, characterization, and SERS applications // *Langmuir*. 2014. V. 30. P. 602–610.
294. Zhu Y.J., Chen F. Microwave-assisted preparation of inorganic nanostructures in liquid phase // *Chem. Rev.* 2014. V. 114. P. 6462–6555.
295. Manukyan K.V., Cross A., Rouvimov S., Miller J., Mukasyan A.S., Wolf E.E. Low temperature decomposition of hydrous hydrazine over FeNi/Cu nanoparticles // *Appl. Catal. A Gen.* 2014. V. 476. P. 47–53.
296. Tafreshi S.S., Roldan A., de Leeuw N.H. Micro-kinetic simulations of the catalytic decomposition of hydrazine on the Cu(111) surface // *Faraday Discuss.* 2017. V. 197. P. 41–57.
297. Rice K.P., Walker E.J.Jr, Stoykovich M.P., Saunders A.E. Solvent-dependent surface plasmon response and oxidation of copper nanocrystals // *J. Phys. Chem. C*. 2011. V. 115. P. 1793–1799.
298. Pettinger B., Wetzel H. Surface enhanced Raman scattering from pyridine, water, and halide ions on Au, Ag, and Cu electrodes // *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 1981. V. 85. P. 473–481.
299. Plough I.C., Baker E.M. Maximum physiological concentration of sodium in human urine // *J. Appl. Physiol.* 1959. V. 14. P. 1036–1038.
300. Noda L.K., Sala O. SERS effect of isonicotinic acid adsorbed on a copper electrode // *J. Mol. Struct.* 1987. V. 162. P. 11–17.
301. Rubim J.C., Sala O. The contribution of charge transfer excitation to the SERS effect on copper electrodes // *J. Mol. Struct.* 1986. V. 145. P. 157–172.

302. Shao Q., Que R., Shao M., Cheng L., Lee S.T. Copper nanoparticles grafted on a silicon wafer and their excellent surface-enhanced Raman scattering // *Adv. Funct. Mater.* 2012. V. 22. P. 2067–2070.
303. Zhang J., Yan Y., Hu Z., Zhao X. Fabrication of copper substrates for surface-enhanced Raman scattering using the microscratching method // *Proc. I Mech. E Part B: J. Engineering Manufacture.* 2016. V. 232. P. 1310–1315.
304. Zhang X., Shi C., Liu E., Li J., Zhao N., He C. Nitrogen-doped graphene network supported copper nanoparticles encapsulated with graphene shells for surface-enhanced Raman scattering // *Nanoscale.* 2015. V. 7. P. 17079–17087.
305. He L., Liu C., Hu J., Gu W., Zhang Y., Dong L., Fu X., Tang J. Hydrophobic ligand-mediated hierarchical Cu nanoparticles on reduced graphene oxides for SERS platform // *Cryst. Eng. Comm.* 2016. V. 18. P. 7764–7771.
306. Žukovskaja O., Agafilushkina S., Sivakov V., Weber K., Cialla-May D., Osminkina L., Popp J. Rapid detection of the bacterial biomarker pyocyanin in artificial sputum using a SERS-active silicon nanowire matrix covered by bimetallic noble metal nanoparticles // *Talanta.* 2019. V. 202. P. 171–177.
307. Markin A.V., Arzhanukhina A.I., Markina N.E., Goryacheva I.Yu. Analytical performance of electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy: A critical review // *Trends Anal. Chem.* 2022. V. 157. P. 116776.
308. Sabanés N.M., Domke K.F. Raman under water – nonlinear and nearfield approaches for electrochemical surface science // *ChemElectroChem.* 2017. V. 4. P. 1814–1823.
309. Wain A.J., O’Connell M.A. Advances in surface-enhanced vibrational spectroscopy at electrochemical interfaces // *Adv. Phys.-X.* 2017. V. 2. P. 188–209.
310. Willets K.A. Probing nanoscale interfaces with electrochemical surface-enhanced Raman scattering // *Curr. Opin. Electrochem.* 2019. V. 13. P. 18–24.
311. Hernandez S., Perales-Rondon J.V., Heras A., Colina A. Electrochemical SERS and SOERS in a single experiment: A new methodology for quantitative analysis // *Electrochim. Acta.* 2020. V. 334. P. 135561.

312. Zhao L., Blackburn J., Brosseau C.L. Quantitative detection of uric acid by electrochemical-surface enhanced Raman spectroscopy using a multilayered Au/Ag substrate // *Anal. Chem.* 2015. V. 87. P. 441–447.

313. Greene B.H.C., Alhatab D.S., Pye C.C., Brosseau C.L. Electrochemical-surface enhanced Raman spectroscopic (EC-SERS) study of 6-thiouric acid: a metabolite of the chemotherapy drug azathioprine // *J. Phys. Chem. C.* 2017. V. 121. P. 8084–8090.

314. Ibáñez D., Pérez-Junquera A., González-García M.B., Hernández-Santos D., Fanjul-Bolado P. Spectroelectrochemical elucidation of B vitamins present in multivitamin complexes by EC-SERS // *Talanta.* 2020. V. 206. P. 120190.

315. Viehrig M., Rajendran S.T., Sanger K., Schmidt M.S., Alstrøm T.S., Rindzevicius T., Zór K., Boisen A. Quantitative SERS assay on a single chip enabled by electrochemically assisted regeneration: a method for detection of melamine in milk // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. P. 4317–4325.

316. González-Hernández J., Ott C.E., Arcos-Martínez M.J., Colina A., Heras A., Alvarado-Gámez A.L., Urcuyo R., Arroyo-Mora L.E. Rapid determination of the ‘legal highs’ 4-MMC and 4-MEC by spectroelectrochemistry: simultaneous cyclic voltammetry and in situ surface-enhanced Raman spectroscopy // *Sensors.* 2022. V. 22. P. 295.

317. Göksel Y., Dumont E., Slipets R., Rajendran S.T., Sarikaya S., Thamdrup L.H.E., Schmiegelow K., Rindzevicius T., Zor K., Boisen A. Methotrexate detection in serum at clinically relevant levels with electrochemically assisted SERS on a benchtop, custom built raman spectrometer // *ACS Sens.* 2022. V. 7. P. 2358–2369.

318. Huang C.Y., Hsiao H.C. Integrated EC-SERS chip with uniform nanostructured EC-SERS active working electrode for rapid detection of uric acid // *Sensors.* 2020. V. 20. P. 7066.

319. McGlashen M.L., Davis K.L., Morris M.D. Surface-enhanced Raman scattering of dopamine at polymer-coated silver electrodes // *Anal. Chem.* 1990. V. 62. P. 846–849.

320. Hernandez S., Perales-Rondon J.V., Heras A., Colina A. Determination of uric acid in synthetic urine by using electrochemical surface oxidation enhanced Raman scattering // *Anal. Chim. Acta*. 2019. V. 1085. P. 61–67.

321. Pothier N.J., Forcé R.K. Surface-enhanced Raman spectroscopy at a silver electrode as a real-time detector in flowing streams // *Appl. Spectrosc.* 1992. V. 46. P. 147–151.

322. Li D., Li D.W., Fossey J.S., Long Y.T. Portable surface-enhanced Raman scattering sensor for rapid detection of aniline and phenol derivatives by on-site electrostatic preconcentration // *Anal. Chem.* 2010. V. 82. P. 9299–9305.

323. Schmidt B., King D., Kariuki J. Designing and using 3D-printed components that allow students to fabricate low-cost, adaptable, disposable, and reliable Ag/AgCl reference electrodes // *J. Chem. Educ.* 2018. V. 95. P. 2076–2080.

324. Kudelski A., Bukowska J. Influence of photochemical effects on irreversible loss of “active sites” on SERS active silver electrode // *Spectrochim. Acta A*. 1995. V. 51. P. 573–578.

325. Zhu Z., Espulgar W.V., Yoshikawa H., Saito M., Fan B., Dou X., Tamiya E. Electrochemically modulated surface-enhanced Raman spectra of aminogluthethimide (AGI) on a Ag-sputtered electrode // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2018. V. 91. P. 1579–1585.

326. Lee N.S., Hsieh Y.Z., Paisley R.F., Morris M.D. Surface-enhanced Raman spectroscopy of the catecholamine neurotransmitters and related compounds // *Anal. Chem.* 1988. V. 60. P. 442–446.

327. Pothier N.J., Forcé R.K. Detection of biologically important compounds in flowing aqueous streams by surface-enhanced Raman spectroscopy at a silver electrode // *Appl. Spectrosc.* 1994. V. 48. P. 421–425.

328. Ibáñez D., González-García M.B., Hernández-Santos D., Fanjul-Bolado P. Detection of dithiocarbamate, chloronicotiny and organophosphate pesticides by electrochemical activation of SERS features of screen-printed electrodes // *Spectrochim. Acta A*. 2021. V. 248. P. 119174.

329. Beer K.D., Tanner W., Garrell R.L. Ex situ vs. in situ electrode roughening procedures for surface-enhanced Raman spectroscopy // *J. Electroanal. Chem. Interf. Electrochem.* 1989. V. 258. P. 313–325.

330. Thierry D., Leygraf C. The influence of photoalteration on surface-enhanced Raman scattering from copper electrodes // *Surf. Sci.* 1985. V. 149. P. 592–600.

331. Mernagh T.P., Cooney R.P. Laser microzone damage in surface-enhanced Raman scattering by pyridine on copper electrodes // *J. Raman Spectrosc.* 1985. V. 16. P. 62–66.

332. Markina N.E., Volkova E.K., Zakharevich A.M., Goryacheva I.Yu., Markin A.V. SERS detection of ceftriaxone and sulfadimethoxine using copper nanoparticles temporally protected by porous calcium carbonate // *Microchim. Acta.* 2018. V. 185. P. 481.

333. Markin A.V., Skaptsov A.A., Markina N.E. Influence of bending of monoatomic copper chains with 10 and 22 atoms on their absorbance spectra: TD-DFT calculations // *Proc. SPIE.* 2018. V. 10716. P. 1071623.

334. Markina N.E., Gorbachev I.A., Badaeva E.V., Zakharevich A.M., Markin A.V. SERS detection of some drugs using aluminum hydroxide with embedded copper nanoparticles // *Proc. SPIE.* 2019. V. 11065. P. 110651A.

335. Markina N.E., Danchuk A.I., Zakharevich A.V., Markin A.V. Synthesis, Raman enhancement, and chemical stability of CaCO₃ microparticles with copper coating // *J. Phys. Conf. Ser.* 2019. V. 1410. P. 012221.

336. Markin A.V., Markina N.E., Al-Alwani A.J., Skaptsov A.A. Light absorption in visible–NIR range by linear copper clusters ($n = 2–22$) with monoatomic thickness: a TD-DFT study // *J. Nanopart. Res.* 2020. V. 22. P. 7.

337. Markina N.E., Ustinov S.N., Zakharevich A.M., Markin A.V. Copper nanoparticles for SERS-based determination of some cephalosporin antibiotics in spiked human urine // *Anal. Chim. Acta.* 2020. V. 1138. P. 9–17.

338. Маркина Н.Е., Захаревич А.М., Маркин А.В. Электрохимическое ГКР исследование некоторых эндогенных компонентов биожидкостей

человека // Известия Саратовского университета. Новая сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2022. Т. 22. Вып. 3. С. 292–301.

339. Liu C., Franceschini C., Weber S., Dib T., Liu P., Wu L., Farnesi E., Zhang W., Sivakov V., Luppa P.B., Popp J., Cialla-May D. SERS-based detection of the antibiotic ceftriaxone in spiked fresh plasma and microdialysate matrix by using silver-functionalized silicon nanowire substrates // Talanta. 2024. V. 271. P. 125697.

340. Soufi G., Badillo-Ramírez I., Seriola L., Raja R.A., Schmiegelow K., Zor K., Boisen A. Solid-phase extraction coupled to automated centrifugal microfluidics SERS: Improving quantification of therapeutic drugs in human serum // Biosens. Bioelectron. 2024. V. 266. P. 116725.

341. Cao Y., Yang Y., Zhao W., Liu H., Zhang X., Chen H., Sui M., Ma P. SERS based determination of ceftriaxone, ampicillin, and vancomycin in serum using $WS_2/Au@Ag$ nanocomposites and a 2D-CNN regression model // Spectrochim. Acta A. 2025. V. 333. P. 125850.