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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук

Саратов 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Научный консультант:

доктор химических наук, профессор **Горячева Ирина Юрьевна**

Официальные оппоненты:

Веселова Ирина Анатольевна
доктор химических наук, доцент, профессор кафедры аналитической химии, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Жердев Анатолий Виталиевич
доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиохимии, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Камнев Александр Анатольевич
доктор химических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» (ИБФРМ РАН)

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Защита состоится 4 июня 2026 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета 24.2.392.03, созданного на базе ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского» по адресу: 410012, Саратов, ул. Астраханская, 83, корп. 1, Институт химии.

С диссертацией можно ознакомится в Зональной научной библиотеке имени В.А. Артисевич ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского» (410012, Саратов, ул. Университетская, 42) и на сайте: https://www.sgu.ru/research/dissertation-council/24-2-392-03/doktorskaya-dissertaciya-markin-v.

Автореферат разослан «____» _____ 2026 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор химических наук Русанова Т.Ю.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Определение концентрации лекарственных веществ (ЛВ)[1] 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 противоэпилептических препаратов. ТЛМ также проводят для некоторых антибиотиков, поскольку их нерациональное использование приводит к проявлению их токсического действия на организм пациентов, а также возникновению 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

---

[1] БЖЧ – биологические жидкости человека, ГГА – гель гидроксида алюминия, ГКР – гигантское комбинационное рассеяние света, КР – комбинационное рассеяние света, ЛВ – лекарственное вещество, МНЧ – медные наночастицы, МТК – метотрексат, НТФЭ – неудерживающая ТФЭ, НЧ – наночастицы, ПДДА – полидиаллилдиметиламмоний хлорид, САА – сульфаниламидные антибиотики, СМЗ – сульфаметоксазол, СНЧ – серебряные НЧ, СР – структурно родственный, ТЛМ – терапевтический лекарственный мониторинг, ФХА – фторхинолоновые антибиотики, ЦД – циклодекстрины, ЦИПРО – ципрофлоксацин, ЦСА – цефалоспориновые антибиотики, ЦТР – цефтриаксон, ЭХ – электрохимический

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 (pH 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 свойства, 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

Материал диссертационной работы опубликован в 24 статьях в журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов диссертаций, а также в 15 материалах конференций.

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 Министерства образования и науки Российской Федерации и Германской службы академических обменов (DAAD) (№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 объем 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы работы, сформулирована цель работы и задачи, необходимые для её достижения, а также показаны научная новизна и практическая значимость полученных результатов.

Глава 1. Возможности и ограничения ГКР при определении лекарственных веществ в биожидкостях человека: критический анализ литературы

В первой главе проведён краткий анализ основных достоинств и недостатков прямого и косвенного форматов ГКР-анализа и показано, что прямой формат является более перспективным с точки зрения дальнейшего научного развития ГКР-анализа и разработки новых способов его использования. Рассмотрены различные варианты возникновения конкурентных взаимодействий между молекулами целевого аналита и мешающих веществ за ГКР-активные центры на поверхности ГКР-подложек, а также влияние данных взаимодействий на аналитический ГКР-сигнал.

Проведён обобщающий анализ методик ГКР-анализа, предложенных для определения ЛВ в БЖЧ, и рассмотрены основные требования к подобным методикам и наиболее частые ошибки, совершаемые при их разработке. Показана необходимость учёта конкурентных взаимодействий между молекулами целевого аналита и молекулами эндо- и экзогенных компонентов БЖЧ для увеличения селективности и точности прямого ГКР-анализа; приведены основные способы контроля и устранения данных взаимодействий.

Глава 2. Спектроскопия ГКР структурно родственных антибиотиков

Согласно данным из литературы, большинство предложенных к настоящему времени методик ГКР-анализа направлены на определение только одного аналита и на оптимизацию условий регистрации под этот конкретный аналит. Поэтому данная глава посвящена поиску и изучению условий, позволяющих создавать

более универсальные методики ГКР-анализа, проводя анализ СР аналитов (в текущей работе – антибиотиков).

В качестве основных аналитов выбраны представители трёх классов антибиотиков: сульфаниламидные (САА), фторхинолоновые (ФХА) и цефалоспориновые (ЦСА) (рис. 1). Выбор данных классов обусловлен довольно сильным различием КР-активности молекулярных колебаний фрагментов молекул данных антибиотиков: 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. В качестве ГКР-подложки в данной главе использовали раствор коллоидных сферических серебряных НЧ (СНЧ), стабилизированных гидроксиламином (диаметр 44±7 нм, дзета-потенциал ~ –28 мВ).

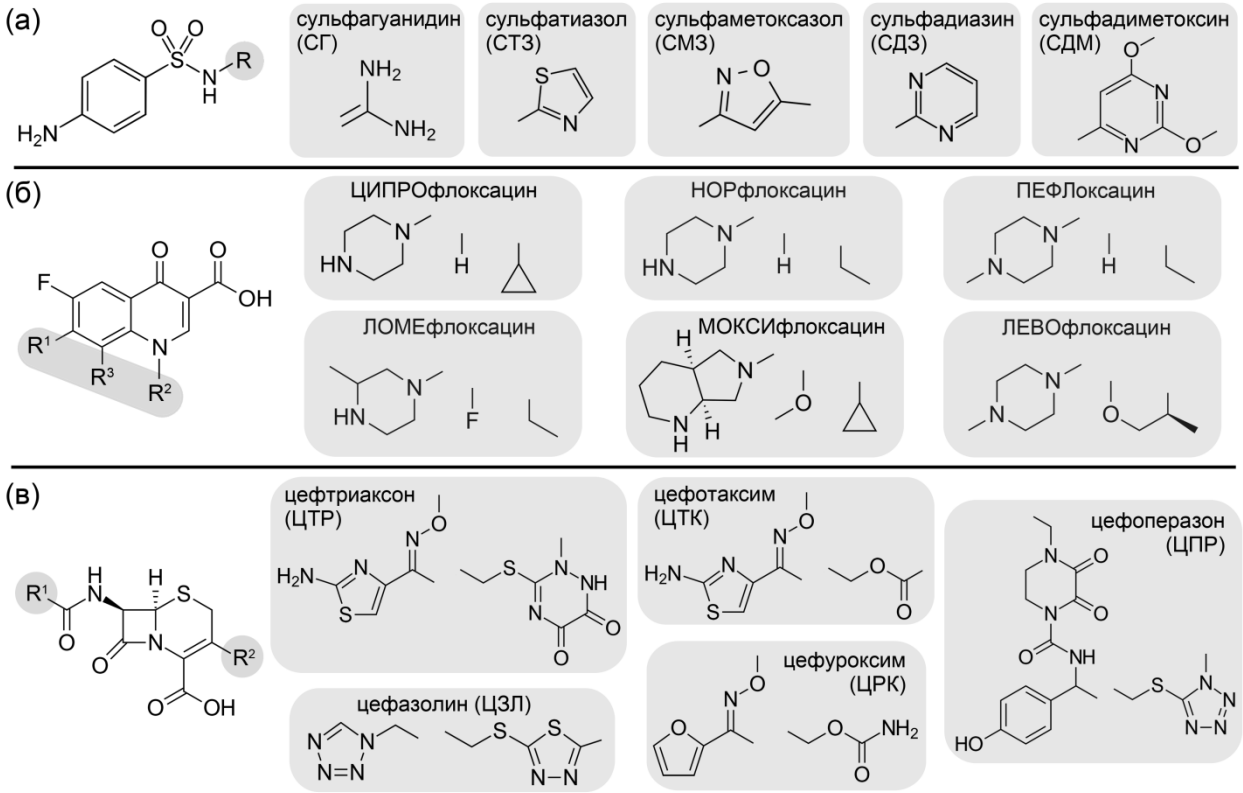


Рис. 1. Структурные формулы молекул антибиотиков, использованных в диссертации.

Показано, что для всех изученных классов антибиотиков существует сильная зависимость интенсивности ГКР-сигнала от pH и ионной силы раствора (рис. 2 и 3), что обусловлено как влиянием на ГКР-подложку, так и присутствием в составе молекул аналитов функциональных групп, которые могут подвергаться (де)протонированию (рис. 1). Наибольшая интенсивность сигнала достигается при низких (1.0–1.5) и высоких (12.0–13.0) значениях pH, а в диапазоне pH 2.5–11.5 сигнал очень слабый или отсутствует вовсе. Изучение влияния pH на гидродинамический диаметр частиц ГКР-подложки (рис. 2) показало, что увеличение интенсивности ГКР-сигнала для всех изученных антибиотиков коррелирует с увеличением степени агрегации СНЧ, что согласуется с

электромагнитным механизмом усиления КР-сигнала. Следовательно, низкая интенсивность ГКР-сигнала в диапазоне pH 2.5–11.5 связана с отсутствием агрегации СНЧ. Проведение искусственной агрегации СНЧ путём добавления pH-нейтрального агрегирующего агента (в данной работе NaCl) приводит к значительному увеличению интенсивности сигнала ФХА и некоторых ЦСА (цефазолин, цефтриаксон (ЦТР) и цефоперазон) (рис. 3).

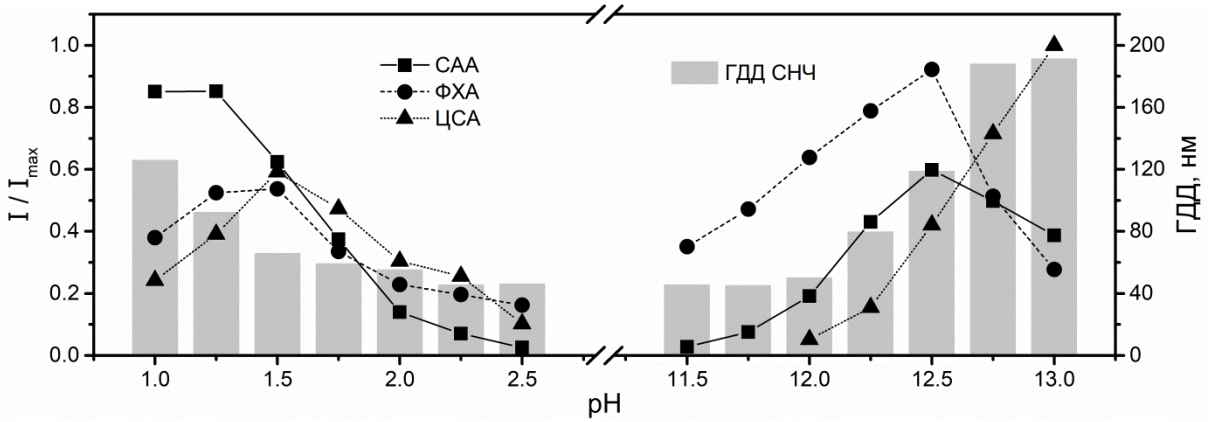


Рис. 2. Зависимость нормированной интенсивности ГКР-сигнала растворов САА (20 мкМ), ФХА (10 мкМ) и ЦСА (5 мкМ), а также значений гидродинамического диаметра (ГДД) СНЧ от величины pH. Графики построены с использованием усреднённых значений интенсивностей наиболее интенсивных ГКР-пиков антибиотиков в кислой и щелочной средах.

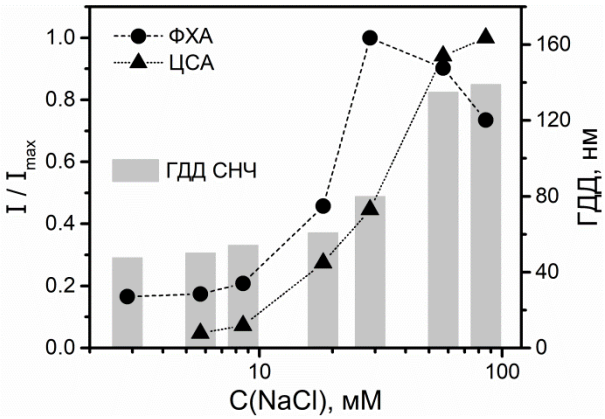


Рис. 3. Зависимость нормированной интенсивности ГКР-сигнала растворов ФХА (10 мкМ) и ЦСА (5 мкМ), а также гидродинамического диаметра (ГДД) СНЧ от концентрации активирующего агента (NaCl) при pH 5.5. Графики построены с использованием усреднённых значений интенсивностей наиболее интенсивных ГКР-пиков антибиотиков.

Поскольку при изменении pH изменяются и интенсивности, и профили ГКР-спектров, показано, что влияние pH на сигнал СР аналитов корректнее интерпретировать с точки зрения химического механизма усиления КР-сигнала, который основан на учёте (1) механизма и силы связывания молекул аналита с ГКР-подложкой и (2) вероятности осуществления переноса электрона от ГКР-подложки к молекуле при возбуждении поверхностного плазмонного резонанса лазерным излучением (зависит от электронодонорных свойств материала подложки и электроноакцепторных свойств молекул аналита). Так, появление избыточного положительного заряда за счёт протонирования СР (анилинового) фрагмента молекул САА (рис. 4а) приводит к увеличению интенсивности сигнала в кислой среде (рис. 2) благодаря усилению взаимодействия с поверхностью СНЧ, имеющей отрицательный заряд из-за адсорбированных хлорид-ионов (от HCl, используемой для корректировки pH). При этом взаимодействие разных

САА с подложкой через один и тот же СР фрагмент, а также повышение его электроноакцепторных свойств из-за положительного заряда приводят к наибольшему усилению колебаний именно этого фрагмента и появлению сильного сходства ГКР-спектров (рис. 4б). И наоборот, снижение сходства профилей спектров САА в щелочной среде (рис. 4в) обусловлено делокализацией избыточного отрицательного заряда в депротонированных молекулах (рис. 4а), приводящей как к усилению адсорбции САА на поверхности СНЧ преимущественно через $–SO_2–N^–$ группу (за счёт донорно-акцепторных взаимодействий между атомами серебра и неподелёнными электронными парами атомов кислорода и азота), так и к значительному усилению КР-активности замещающих фрагментов из-за увеличения их поляризуемости.

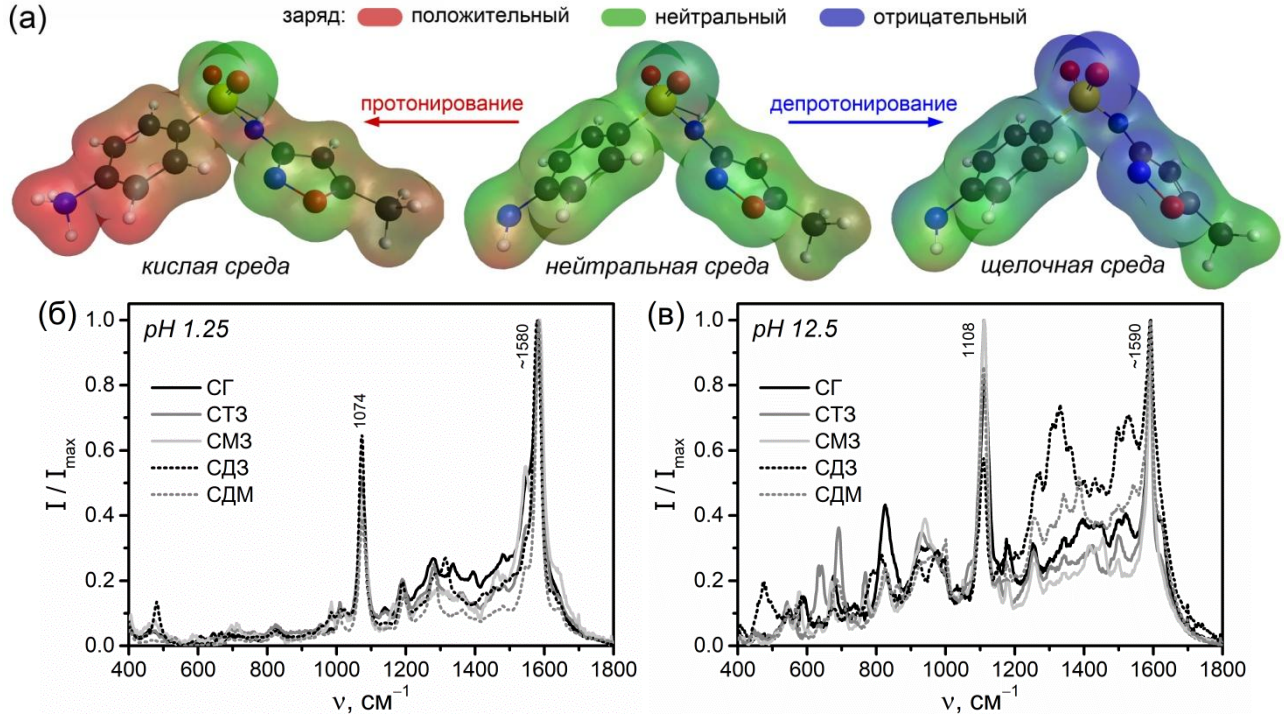


Рис. 4. (а) Модели молекул сульфаметоксазола (СМЗ) в различных степенях протонирования (симуляция нахождения молекул в растворах с различным pH), дополненные изоповерхностями общей электронной плотности, окрашенными с использованием значений молекулярного электростатического потенциала. **(б,в)** Нормированные ГКР-спектры растворов разных представителей САА (20 мкМ, рис.1а) в **(б)** кислой и **(в)** щелочной средах.

Аналогичный анализ в случае ФХА показал принципиально схожие результаты с той лишь разницей, что СР фрагмент ФХА лучше всего взаимодействует с СНЧ в депротонированном отрицательно заряженном состоянии (рис. 5а), поэтому максимальное сходство ГКР-спектров наблюдали в щелочной среде (рис. 5г). В кислой же среде взаимодействие СНЧ с ФХА происходит посредством протонированных положительно заряженных заместителей, обладающих низкой КР-активностью (преимущественно через R_1, рис. 5а), что приводит к снижению схожести спектров (рис. 5б) и их интенсивности (рис. 2).

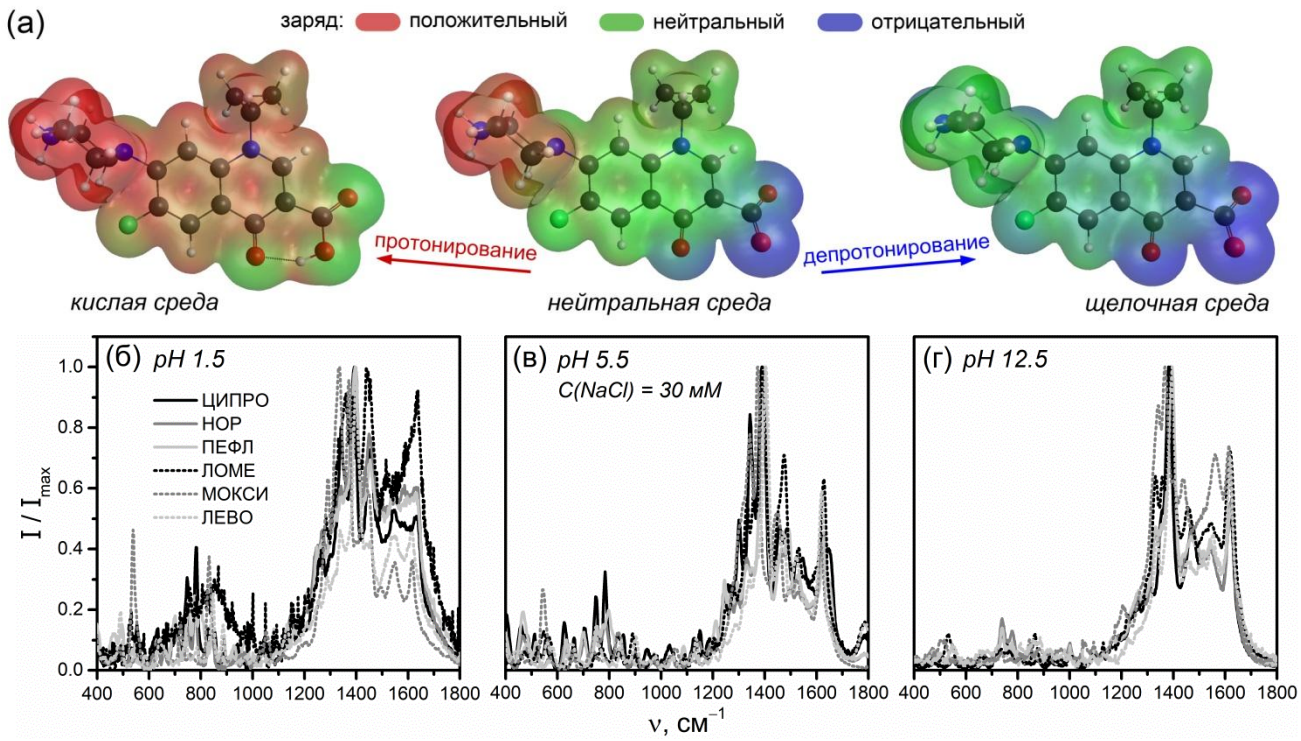


Рис. 5. (а) Модели молекул ципрофлоксацина (ЦИПРО) в различных степенях протонирования (симуляция нахождения молекул в растворах с различным pH), дополненные изоповерхностями общей электронной плотности, окрашенными с использованием значений молекулярного электростатического потенциала. **(б-г)** Нормированные ГКР-спектры растворов ФХА (10 мкМ, рис. 1б) с разными значениями pH.

Наконец, в случае ЦСА установлено отсутствие ярко выраженной схожести ГКР-спектров независимо от значения pH (рис. 6), что логично связанно с тем, что заместители при CP фрагменте имеют высокую КР-активность и в основном ответственны за адсорбцию ЦСА на поверхности ГКР-подложки, т.е. формируют основной спектральный сигнал. При этом заместители имеют существенно различающиеся состав и структуру (рис. 1в), что и приводит к возникновению различных спектральных профилей. Тем не менее, некоторое увеличение схожести спектров ЦСА в щелочной среде (рис. 6в) предположительно связано с гидролизом и раскрытием β-лактамного цикла с образованием второй карбоксильной группы, усиливающей адсорбцию ЦСА на поверхности ГКР-подложки именно через CP фрагмент.

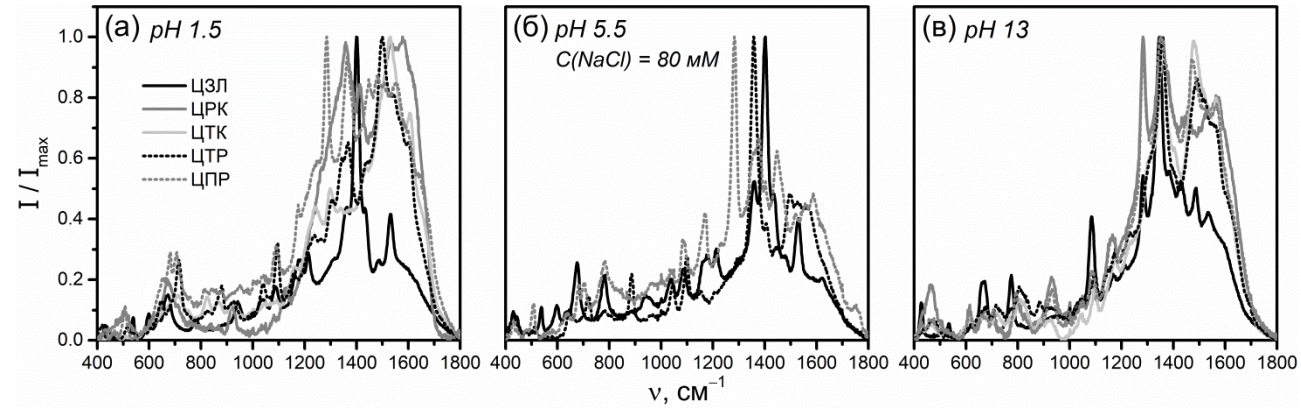


Рис. 6. Нормированные ГКР-спектры растворов ЦСА (5 мкМ, рис. 1в) с разными значениями pH.

Таким образом, помимо агрегации частиц ГКР-подложки, использование кислых и щелочных сред позволяет достичь максимальной чувствительности ГКР-анализа в случае большинства изученных антибиотиков благодаря реализации более сильных электростатических и/или донорно-акцепторных взаимодействий (де)протонированных молекул с поверхностью ГКР-подложки. Также показано, что анализ электронной структуры и учёт структурной родственности изучаемых веществ, а также привлечение теории химического механизма усиления КР-сигнала позволяют глубже анализировать ГКР-сигнал и лучше проводить поиск оптимальных условий регистрации ГКР-спектров с целью достижения максимальной чувствительности, селективности и универсальности ГКР-анализа.

Глава 3. Маскирование, разделение и концентрирование при ГКР-определении антибиотиков в биожидкостях человека

Отправной точкой исследований всей диссертационной работы стало выявление основных фонообразующих компонентов БЖЧ при значениях pH и ионной силы, обеспечивающих максимальный сигнал ЛВ, что позволило более целенаправленно разрабатывать подходы по устранению влияния этих компонентов на ГКР-сигнал ЛВ. Так, установлено, что креатинин и метаболиты гема (уробилиноиды в моче и билирубин в крови) являются основными фонообразующими компонентами БЖЧ в щелочной и кислой средах, соответственно. В нейтральной среде (при активации СНЧ с помощью NaCl) фоновый сигнал БЖЧ сформирован пуриновыми основаниям (мочевой кислотой, ксантином и гипоксантином). Также все БЖЧ содержат мочевину и неорганические соли, а некоторые БЖЧ содержат и высокомолекулярные соединения (белки в крови, муцин в слюне) – данные компоненты не продуцируют значимый ГКР-сигнал, однако могут существенно снижать адсорбцию целевых аналитов на ГКР-подложке.

Установлено, что при применении стандартной ГКР-подложки (СНЧ, стабилизированные гидроксиламином) сигнал эндогенных компонентов БЖЧ полностью подавляет сигнал изучаемых ЛВ в реальных БЖЧ независимо от разбавления образцов БЖЧ и длины волны возбуждающего излучения. Для устранения негативного влияния компонентов БЖЧ на ГКР-сигнал ЛВ в работе предложено совмещение ГКР с некоторыми методами разделения и концентрирования (НТФЭ, ЖЖЭ, ТСХ), а также маскированием компонентов БЖЧ.

ГКР-анализ с предварительным отделением ЛВ от компонентов БЖЧ методами разделения и концентрирования

ГКР-определение ЦСА после колоночной НТФЭ на силикагеле. Схема методики НТФЭ-ГКР-анализа в колоночном формате представлена на рис. 7а.

Предварительные эксперименты по измерению ГКР-сигнала образцов мочи, пропущенных через силикагель, показали, что использование подкисленной мочи не позволяет снизить фоновый ГКР-сигнал (рис. 7б), обусловленный присутствием уробилиноидов. С другой стороны, пропускание через колонку мочи с нейтральным и щелочным pH (рис. 7б) показало практически полное отсутствие фонового ГКР-сигнала мочи.

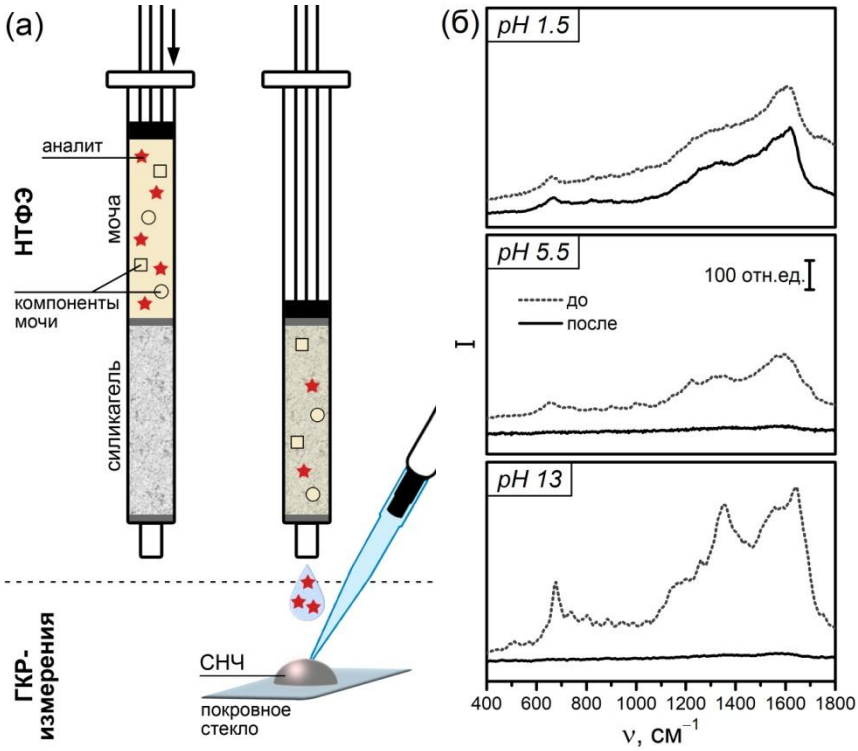


Рис. 7. (а) Схема проведения НТФЭ-ГКР-анализа образцов мочи в колоночном формате. **(б)** Влияние величины pH образцов утренней мочи на ГКР-сигнал до и после пропускания образцов через колонку с силикагелем.

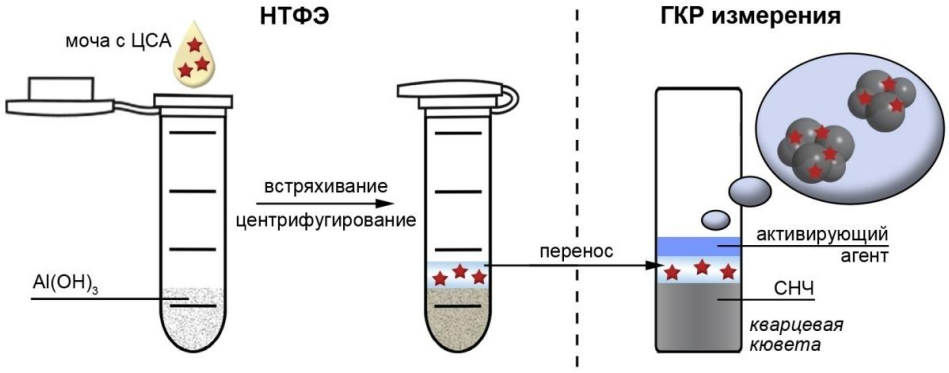
Спектрофотометрическое исследование изменения концентрации ЦСА после пропускания их растворов через колонку с сорбентом также показало, что в щелочной среде потери аналита за счёт сорбции на силикагеле на ~20% ниже, чем в нейтральной. Таким образом, корректировка уровня pH анализируемой мочи до ~13 позволяет достичь наиболее эффективного отделения ЦСА от компонентов мочи в ходе НТФЭ с силикагелем перед проведением ГКР-анализа.

Проверка разработанной методики с использованием мочи, содержащей ЦСА в минимальной для ТЛМ концентрации, показала, что в случае трёх ЦСА (цефазолин, ЦТР, цефоперазон) возможно устранение фонового сигнала и получение ГКР-спектров аналитов, пригодных для осуществления количественного анализа. В случае определения ЦТР в моче методика НТФЭ-ГКР-анализа имеет следующие метрологические характеристики: s_r 15–21%, правильность 87–112%, c_{min} 0.2 мкг/мл и c_{lim} 2.0 мкг/мл (данные получены с использованием 5 образцов мочи).

ГКР-определение ЦСА после НТФЭ на геле гидроксида алюминия. Схема второй методики НТФЭ-ГКР-определения ЦСА представлена на рис. 8. В данном случае сорбент для НТФЭ (гель гидроксида алюминия (ГГА)) синтезировали по простой и быстрой методике, заключающейся в одновременном добавлении в

воду растворов сульфата алюминия и карбоната натрия при интенсивном перемешивании. Показано, что разработанная методика синтеза ГГА является воспроизводимой, погрешность аналитического сигнала при использовании разных партий ГГА составила менее 6%, а сорбционные свойства ГГА хорошо воспроизводятся и стабильны >4 дней.

Рис. 8. Схема проведения НТФЭ-ГКР-анализа образцов мочи с применением ГГА.



Спектрофотометрическое изучение сорбции фонообразующих компонентов БЖЧ в ходе НТФЭ показало, что происходит снижение концентрации креатинина, мочевой кислоты и билирубина (структурного аналога уробилиноидов) до уровня ~7, ~25 и ~13% от исходных концентраций, соответственно. Регистрация ГКР-спектров растворов, полученных после обработки образцов мочи с помощью НТФЭ, показала незначительное изменение фонового сигнала в щелочных и нейтральных средах, что обусловлено всё ещё высоким содержанием креатинина и пуриновых оснований (рис. 9). Однако ГКР-анализ образцов мочи после НТФЭ и подкисления (HCl) показал практически полное устранение собственного ГКР-сигнала мочи (рис. 9, pH 1.5), что позволяет определять ЦСА в моче.

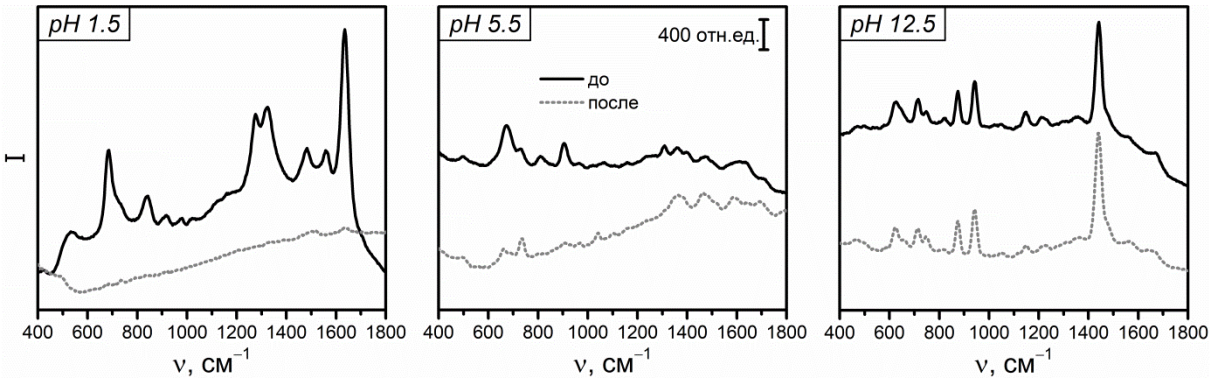


Рис. 9. Влияние агента для активации СНЧ (pH 1.5 – HCl; pH 5.5 – NaCl; pH 12.5 – NaOH) на ГКР-спектры утренней мочи после её обработки с помощью НТФЭ с использованием ГГА.

Оценка потерь аналита после проведения этапа НТФЭ показала, что концентрации почти всех ЦСА (кроме ЦТР) в надосадочной жидкости после взаимодействия с ГГА снижаются примерно одинаково (до ~20% от исходной концентрации). Максимальное снижение наблюдали для ЦТР, в случае которого остаётся только ~2% от исходной концентрации. Тем не менее, несмотря на значительность снижения концентраций ЦСА, высокая чувствительность ГКР всё

же позволяет проводить детектирование ГКР-сигнала на пригодном для количественного анализа уровне.

Для большинства ЦСА полученные градуировочные зависимости имеют нелинейный вид и аппроксимируются полиномиальными функциями, в то время как градуировочная зависимость для цефуроксима является линейной. Нелинейность данных зависимостей обусловлена как побочными процессами, происходящими во время НТФЭ (разбавление и удержание в сорбенте молекул аналита), так и нелинейной зависимостью от концентрации самого процесса адсорбции молекул на поверхности ГКР-подложки. Линейность градуировочного графика для цефуроксима связана с его слабой адсорбцией на ГКР-подложке. Тем не менее, все градуировочные зависимости воспроизводимы и пригодны для проведения ТЛМ; метрологические характеристики методики анализа представлены в табл. 1.

Табл. 1. Метрологические характеристики НТФЭ-ГКР-методики определения ЦСА в моче (данные получены с использованием 5 образцов мочи).

Аналит	Диапазон концентраций, мкг/мл	s_r, %	Прав., %	c_{min}, мкг/мл	c_{lim}, мкг/мл
цефазолин	25–500	5–20	96–107	3.5	19
цефуроксим	200–1000	6–18	96–102	135	280
цефотаксим	50–500	6–15	90–108	22	34
цефтриаксон	100–500	8–17	96–107	71	92
цефоперазон	50–500	3–13	93–103	35	45

ГКР-определение САА после ЖЖЭ. Для нивелирования влияния компонентов мочи на ГКР-сигнал САА предложено использовать ЖЖЭ в качестве дополнительного этапа пробоподготовки перед проведением ГКР-анализа. Оптимальные условия проведения ЖЖЭ определены путём регистрации спектров поглощения водных растворов САА. Так, максимальная степень извлечения САА достигнута с использованием хлороформа (по сравнению с гептаном, гексаном, дихлорметаном и тетрахлорметаном). Изучение влияния величины pH на эффективность ЖЖЭ показало, что максимальная эффективность экстракции САА достигается при значении pH их растворов равном 4, поскольку при данных условиях согласно значениям констант ионизации молекулы САА находятся в незаряженном состоянии, что способствует их переходу в гидрофобный растворитель. Наконец, установлено, что 5 мин достаточно для достижения равновесия и завершения экстракции.

Показано, что применение ЖЖЭ не обеспечивает полного отделения САА от всех мешающих компонентов мочи. Так, при регистрации ГКР-спектров экстрактов с добавкой NaOH возникает интенсивный фоновый сигнал, обусловленный присутствием креатинина (рис. 10б). С другой стороны, ГКР-

анализ подкисленных экстрактов показал снижение уровня фонового сигнала, обусловленного уробилиноидами (рис. 10а). Также установлено, что разбавление мочи, содержащей САА, перед этапом ЖЖЭ позволяет минимизировать разницу между спектрами образцов мочи, собранных в разное время дня и имеющих сильно отличающиеся содержания эндогенных компонентов.

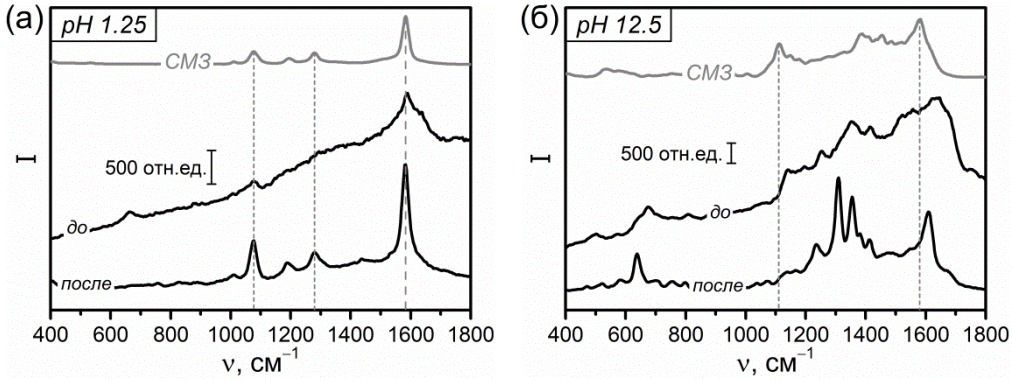


Рис. 10. ГКР-спектры экстрактов, полученных с помощью ЖЖЭ из образцов утренней мочи без (0) и с (10) добавкой СМЗ (10 мкг/мл), и влияние на них значения pH во время ГКР-анализа.

Таким образом, оптимизированная методика ЖЖЭ-ГКР-анализа включает: (1) разбавление мочи, содержащей САА, для уменьшения её буферных свойств и влияния эндогенных компонентов мочи, (2) подкисление разбавленных образцов до pH 4 для увеличения эффективности экстракции САА, (3) проведение ЖЖЭ с последующим выпариванием растворителя и переводом экстрагированного аналита в водную фазу, (4) подкисление экстракта до pH 1.25 с целью подавления остаточного фонового ГКР-сигнала и максимизации сигнала САА и (5) ГКР-детектирование аналитов с использованием СНЧ.

Проверка эффективности разработанной методики ГКР-определения в моче четырёх представителей САА в концентрации, минимально необходимой для проведения ТЛМ, показала возможность устранения фонового сигнала и получения ГКР-спектров аналитов, пригодных для осуществления количественного анализа. В случае СМЗ и при использовании 8 образцов мочи получены следующие метрологические характеристики методики: правильность 91–109%, s_r 11–18%, c_{min} 1.7 мкг/мл, c_{lim} 7.3 мкг/мл.

ГКР-детектирование ФХА после ТСХ. Тестирование разработанных НТФЭ-ГКР-методик показало их неэффективность для определения ФХА в моче. Поэтому предложено совмещение ГКР-анализа с ТСХ разделением молекул ФХА и компонентов мочи на ТСХ-пластинах с силикагелем с последующим добавлением ГКР-подложки (СНЧ) в зону очищенного аналита и регистрацией сигнала непосредственно с сорбента. Установлено, что оптимизированный состав подвижной фазы (2%-ый раствор уксусной кислоты) позволяет проводить эффективное отделение всех изученных ФХА от компонентов мочи, 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).

Для достижения максимальной чувствительности анализа регистрацию ГКР-сигнала отделённых ФХА проводили, добавляя к зоне аналита раствор NaOH и затем раствор СНЧ, поскольку ГКР-спектры ФХА имеют наибольшую интенсивность и сходство спектральных профилей в щелочной среде (рис. 2 и 5). Анализ ГКР-спектров до и после разделения показал, что совмещение ТСХ и ГКР позволяет полностью устранить фоновый сигнал мешающих компонентов (преимущественно креатинина) при общей продолжительности анализа менее 20 мин. Однако данной методике присущи высокие значения s_r (25–35%), что связано с регистрацией ГКР-сигнала с поверхности сорбента с неоднородно распределенными СНЧ, а также постепенным испарением воды с ТСХ-пластины в ходе регистрации ГКР-сигнала, что приводит к постоянному изменению соотношения «аналит/СНЧ» и, как следствие, интенсивности ГКР-сигнала. Поэтому разработанную методику ТСХ-ГКР-анализа можно использовать только для полуколичественного определения ФХА в моче.

Маскирование мешающих компонентов БЖЧ с помощью ПДДА

Влияние ПДДА на ГКР-сигнал фонообразующих компонентов БЖЧ. В качестве способа усиления адсорбции ЛВ и/или уменьшения адсорбции основных фонообразующих компонентов БЖЧ на поверхности ГКР-подложки изучено добавление раствора полиэлектролита к анализируемой смеси. Установлено, что добавление катионного полиэлектролита ПДДА приводит к полному подавлению ГКР-сигнала компонентов БЖЧ при всех изученных значениях pH. Однако в случае некоторых ЛВ и при определенных величинах pH сохраняется возможность регистрации ГКР-сигнала аналитов в присутствии ПДДА.

Результаты полуэмпирических квантовохимических расчётов показывают, что комплексы ПДДА с молекулами большинства изученных компонентов БЖЧ, находящихся в нейтральном состоянии, имеют отрицательные значения энтальпии комплексообразования (рис. 11). Следовательно, предположено, что происходит связывание этих компонентов с ПДДА в растворе, приводя к снижению их адсорбции на поверхности СНЧ и уменьшению ГКР-сигнала. Логично, что перевод молекул данных компонентов в отрицательно заряженное состояние (депротонированная форма в щелочных растворах) приводит к ещё большему усилению их взаимодействия с молекулами ПДДА, положительный заряд которых не зависит от величины pH. С другой стороны, подавление в кислой среде фонового сигнала от креатинина и уробилиноидов, протонированные молекулы которых имеют положительные энтальпии комплексообразования с ПДДА (рис. 11б), предположительно обусловлено тем, что адсорбированный на поверхности СНЧ слой молекул ПДДА электростатически и стерически препятствует адсорбции данных компонентов на ГКР-активных центрах.

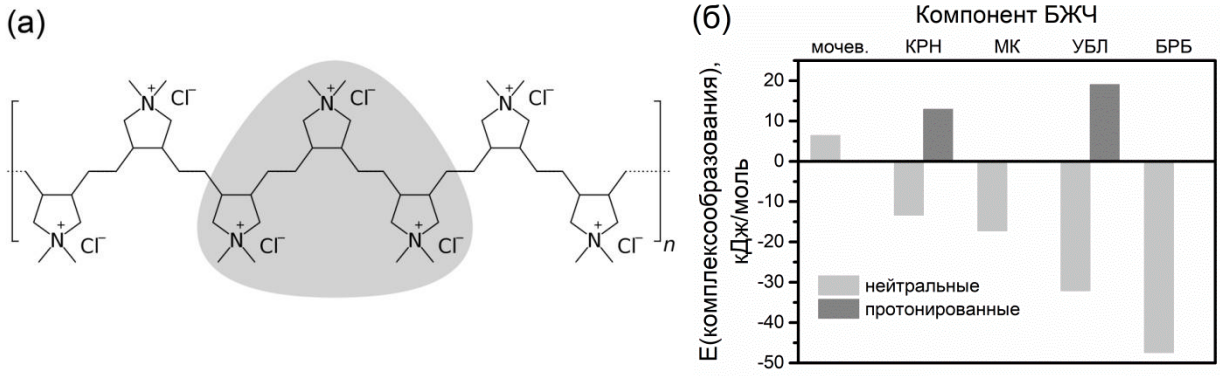


Рис. 11. (а) Схематическое изображение строения фрагмента ПДДА, состоящего из трёх мономеров (выделен серым цветом), который использовали для моделирования комплексов ПДДА с молекулами основных компонентов БЖЧ. **(б)** Теоретические энтальпии образования комплексов ПДДА с компонентами БЖЧ, молекулы которых находятся в нейтральном или протонированном состояниях. Мочев. – мочевина, КРН – креатинин, МК – мочевая кислота, УБЛ – уробилин, БРБ – билирубин.

ГКР-определение САА в моче и слюне в присутствии ПДДА. Установлено, что присутствие ПДДА сильно влияет на адсорбцию САА на ГКР-активных участках. При этом происходит (1) полное подавление сигнала САА в щелочной среде, (2) изменение относительных интенсивностей ГКР-пиков САА в кислой среде (рис. 12б) при сохранении положений пиков и сходства профилей ГКР-спектров разных САА (рис. 12а), (3) увеличение интенсивности ГКР-сигнала САА (рис. 12в) и, как следствие, чувствительности анализа (снижение предела обнаружения в ~10 раз в случае СМЗ). Максимальное увеличение интенсивности ГКР-сигнала САА (в ~2.5 раза) достигается при использовании ПДДА с высокой молекулярной массой (400–500 кДа) и концентрацией 5 мг/мл, которые и применяли в окончательной методике анализа.

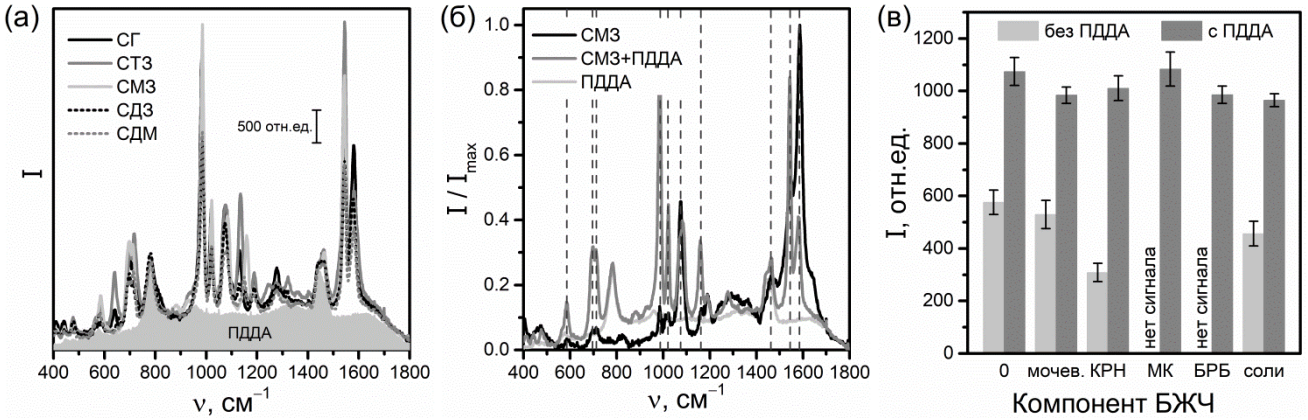


Рис. 12. (а) ГКР-спектры САА (10 мкМ; pH 1.25, HCl) в присутствии ПДДА. **(б)** Влияние добавления ПДДА (400–500 кДа, 5 мг/мл) на профиль ГКР-спектра СМЗ (pH 1.25, HCl). **(в)** Влияние добавки ПДДА (400–500 кДа, 5 мг/мл) на интенсивность ГКР-сигнала водных растворов СМЗ (40 мкМ) в смеси с наиболее распространенными компонентами БЖЧ, концентрации которых соответствуют их средним концентрациям в моче. Перед ГКР-измерениями смеси СМЗ с данными компонентами разбавляли в 20 раз и доводили до pH 1.25 с помощью HCl. Мочев. – мочевина, КРН – креатинин, МК – мочевая кислота, БРБ – билирубин.

Для интерпретации установленного влияния ПДДА на ГКР-сигнал САА проведены полуэмпирические квантовохимические расчёты комплексов ПДДА-САА (аналогично расчётам комплексов ПДДА с компонентами БЖЧ). Показано, что депротонирование молекул САА при увеличении pH среды значительно усиливает взаимодействие САА с ПДДА, приводя к блокировке взаимодействия САА с СНЧ и исчезновению сигнала аналитов в щелочной среде в присутствии ПДДА. С другой стороны, установлено, что в кислой среде взаимодействие САА с ПДДА осуществляется через $–SO_2–$ группу, а протонированный СР (анилиновый) фрагмент остаётся свободным для взаимодействия с поверхностью СНЧ через хлорид-ионы, позволяя генерировать ГКР-спектры с одинаковыми профилями для комплексов всех САА с ПДДА (рис. 12а). Наконец, увеличение интенсивности ГКР-сигнала и улучшение чувствительности детектирования САА в присутствии ПДДА обусловлено концентрированием молекул САА на ГКР-активной поверхности, покрытой ПДДА.

Проведённое исследование влияния ПДДА на селективность детектирования САА (на примере СМЗ, рис. 12в) в смеси с основными эндогенными компонентами БЖЧ, показало, что ПДДА значительно улучшает селективность обнаружения СМЗ в присутствии отдельных компонентов, особенно в случаях креатинина, мочевой кислоты и билирубина.

В итоге увеличение селективности и чувствительности определения САА путём добавления ПДДА и pH-корректирующего агента (HCl) позволило разработать универсальную и быструю (5–10 мин) методику, подходящую для ГКР-определения 5 разных САА в двух типах БЖЧ; этапы пробоподготовки и метрологические характеристики методики приведены в табл. 2.

Табл. 2. Этапы пробоподготовки образцов мочи и слюны, содержащих САА, перед проведением ГКР-определения САА в присутствии ПДДА, а также метрологические характеристики конечной методики анализа.

БЖЧ	**Пробоподготовка**	**Диапазон концентраций, мкМ**	s_r, %	**Прав., %**	c_{min}, мкМ	c_{lim}, мкМ
Моча (6 образцов)	разбавление водой, добавление HCl и ПДДА	40–600	3–12	93–112	0.8–1.4	5.4–7.3
Слюна (3 образца)	коагуляция муцина уксусной кислотой, разбавление водой, добавление HCl и ПДДА	10–30	2–8	91–107	0.04–1.98	3.6–13

ГКР-определение нескольких аналитов при совместном присутствии в моче. Возможность усиления/ослабления ГКР-спектров путём корректировки pH, а

также способность ПДДА подавлять сигнал фонообразующих компонентов БЖЧ использовали для разработки методики поочерёдного ГКР-определения нескольких разных по химической природе аналитов, одновременно присутствующих в моче: ЦСА (три представителя), противоопухолевый препарат МТК и креатинин. Выбор лекарств обоснован необходимостью контроля их концентраций в моче онкологических больных с сопутствующей бактериальной инфекцией, а контроль концентрации креатинина позволяет оценить функцию почек при некоторых хронических заболеваниях и/или при применении препаратов, имеющих побочные эффекты на почки (в т.ч. МТК и ЦСА).

Важной отличительной особенностью разработанной методики является её пригодность для определения нескольких аналитов в моче в присутствии других целевых аналитов, в т.ч. значительном избытке по сравнению с определяемым аналитом. Данный результат достигнут благодаря нивелированию негативного влияния конкурентных взаимодействий на ГКР-сигнал аналита, определение которого необходимо в данный конкретный момент, путём тщательного подбора и оптимизации простых этапов пробоподготовки (табл. 3). При этом суммарное время определения всех трёх аналитов составляет ~25–30 мин. Отметим, что ранее ГКР-определение нескольких аналитов в одном объекте с действительно сложным составом успешно реализовано только с помощью совмещения ГКР с ВЭЖХ, что, конечно, является более сложным и дорогостоящим вариантом реализации, по сравнению с разработанным подходом.

Табл. 3. Этапы пробоподготовки образцов мочи, содержащих смесь аналитов, а также метрологические характеристики методики их определения (данные получены с использованием 4 образцов мочи). КРН – креатинин, ЦСА – цефалоспориновые антибиотики, МТК – метотрексат.

Аналит	Диапазон концентраций, мкг/мл	Пробоподготовка	s_r, %	Прав., %	c_{min}, мкг/мл	c_{lim}, мкг/мл
КРН	300–3000	осаждение примесей ацетоном, разбавление водой, добавление NaOH	4–11	96–111	12	38.6
ЦСА	20–200	разбавление водой, добавление NaCl и ПДДА	3–12	88–109	0.9–7.5	9.7–12.4
МТК	20–200	разбавление водой, добавление NaOH и ПДДА	3–10	94–106	1.2	16.6

Сравнение между собой разработанных методик определения ЛВ в моче, описанных в текущей главе, с точки зрения скорости и простоты реализации, а также универсальности (табл. 4) показало, что наиболее перспективным является 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 предопределены 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.

Табл. 4. Сравнение разработанных методик ГКР-определения, основанных на совмещении ГКР-детектирования с методами разделения, концентрирования и маскирования.

Признак	Антибиотики	НТФЭ		ЖЖЭ	маскиро-вание
		SiO_2	ГГА		
I. Возможность определения антибиотиков в моче	цефалоспорины	3 шт.	4 шт.		3 шт.
	сульфаниламиды	–	–	4 шт.	5 шт.
II. Простота реализации		средняя	средняя	низкая	высокая
III. Продолжительность методики анализа		10 мин	15 мин	30 мин	5 мин

Глава 4. ГКР-активные сорбенты для проведения ТФЭ-ГКР-анализа

Помимо «классических» подложек на основе коллоидных растворов НЧ металлов, для ГКР-анализа сложных смесей перспективным является использование многофункциональных ГКР-подложек. Помимо усиления КР-сигнала такие подложки имеют дополнительные свойства, позволяющие улучшить анализ, например, его селективность и/или чувствительность. Так, ГКР-подложки на основе пористых (не)органических матриц со встроенными металлическими НЧ (ГКР-активные сорбенты) можно использовать как для ГКР-детектирования, так и для концентрирования молекул аналита. В случае данных подложек дополнительно снижаются или даже полностью устраняются трудности, связанные с коллоидной и химической стабильностью встроенных НЧ, а регистрация спектров непосредственно с ГКР-активного сорбента с адсорбированным молекулами аналита позволяет исключить этап элюирования и использование органических растворителей, снизить потери аналита и сократить время проведения анализа.

В ходе исследования разработаны методики синтеза новых ГКР-активных сорбентов на основе различных неорганических матриц (силикагель, оксид алюминия и карбонат кальция) со встроенными СНЧ, изучены их сорбционные и усиливающие свойства (рассчитаны коэффициенты усиления). Показано, что в случае заряженных аналитов сорбционную способность ГКР-активных сорбентов и селективность концентрирования на них можно улучшить с помощью их модификации молекулами полиэлектролитов. Все разработанные методики синтеза воспроизводимы, а усиливающие свойства ГКР-активных сорбентов

сохраняются в течение длительного времени (>3 месяцев). Поэтому выбор сорбентов для дальнейшего применения в ГКР-определении ЛВ в БЖЧ проводили путём сравнения подложек с точки зрения простоты и скорости синтеза и способности усиливать КР-сигнал (табл. 5).

Табл. 5. Сравнение разработанных ГКР-активных сорбентов.

Признак	**SiO_2-СНЧ**	**Al_2O_3-СНЧ**	**$CaCO_3$-СНЧ**
Коэффициент усиления	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	– Остаётся кристаллизационная вода – Требуется измельчение – Неоднородные частицы		– Непрозрачны для лазерного излучения – Однородные сферические микрочастицы – Растворяется в кислотах – Самый быстрый синтез
	– Наиболее сложный и долгий синтез – Максимальная химическая стабильность матрицы	– Растворяется в кислотах и щелочах	

Получение золь-гель материалов (SiO_2-СНЧ и Al_2O_3-СНЧ) самое продолжительное, поскольку требуются стадии созревания и высушивания. При этом конечные образцы содержат много кристаллизационной воды, непостоянство содержания которой может снизить воспроизводимость результатов анализа. В отличие от синтеза золь-гель материалов, синтез микросфер $CaCO_3$-СНЧ быстрый, образцы не требуют измельчения, поскольку их сразу получают в виде порошка однородных сферических частиц и выходом реакции синтеза ~93%. Синтез SiO_2-СНЧ также является наименее экономически эффективным, поскольку требует использования ТЭОС и этилового спирта. В свою очередь прекурсорами Al_2O_3 и $CaCO_3$ являются распространённые и недорогие неорганические соли.

Сравнение способности разработанных ГКР-активных сорбентов усиливать КР-сигнал показало, что Al_2O_3-СНЧ и $CaCO_3$-СНЧ демонстрируют наибольший потенциал, в том числе при сравнении с другими ГКР-подложками на основе серебра, для большинства которых характерны коэффициенты усиления в диапазоне 10^6–10^8.

Таким образом, по совокупности рассмотренных характеристик для дальнейшей работы по определению ЛВ использовали ГКР-активные сорбенты на основе Al_2O_3 и $CaCO_3$. Интересным дополнительным преимуществом данных

сорбентов является возможность относительно лёгкого растворения их матрицы в кислотах и/или щелочах. Данную способность использовали для достижения максимальной чувствительности анализа путём высвобождения СНЧ и молекул аналита после ТФЭ, что способствует улучшению их взаимодействия, а также для одновременной корректировки pH смеси до оптимального уровня. Обобщенная схема методики совмещения ТФЭ и ГКР-измерений с использованием ГКР-активных сорбентов представлена на рис. 13; для анализа одной пробы требуется не более 15 мин, включая анализ спектров.

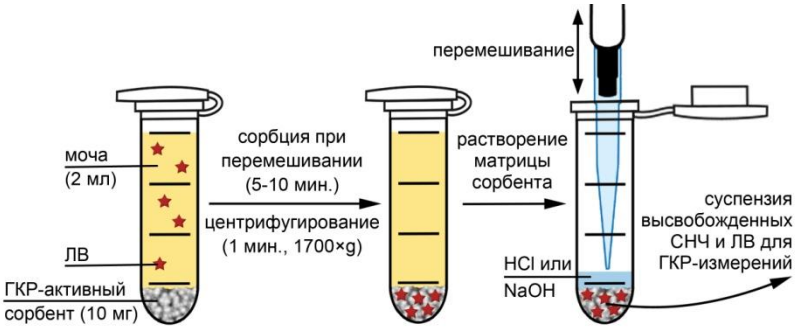


Рис. 13. Схема методики ТФЭ-ГКР-анализа для определения ЛВ в моче с использованием ГКР-активного сорбента. Для растворения матрицы сорбента использовали NaOH в случае Al_2O_3-СНЧ и HCl в случае $CaCO_3$-СНЧ.

ТФЭ-ГКР-определение МТК в моче с использованием Al_2O_3-СНЧ

Проведено детальное изучение зависимости (i) сорбции МТК на Al_2O_3-СНЧ во время этапа ТФЭ и (ii) ГКР-сигнала МТК после этапа ТФЭ от степени разбавления (2–100 раз) смеси МТК с одним или несколькими эндогенными компонентами мочи (креатинин, мочевина, соли). Установлено, что присутствие мочевины и креатинина снижают сорбцию МТК на сорбенте примерно на 20%, а присутствие неорганических солей – почти на 80%, причём дополнительное разбавление смесей не устраняет этот эффект. Данные результаты дополнительно подтверждают важность учёта не только фонообразующих, но и не образующих фонового сигнала компонентов БЖЧ.

Исследование ГКР-сигнала смесей МТК с одним компонентом мочи показало, что присутствие солей приводит к максимальному снижению сигнала МТК (рис. 14а). Однако ни один из исследованных компонентов или их смесей не приводит к подавлению сигнала, сравнимому с тем, что наблюдается в реальной моче (рис. 14б), что связано с синергетическим вкладом множества других компонентов в случае реальной мочи. Изучение влияния разбавления показало, что в случае смесей МТК с одним компонентом мочи происходит просто монотонное снижение ГКР-сигнал МТК (рис. 14а), а в некоторых смесях с несколькими компонентами мочи (в том числе в реальной моче) интенсивность сигнала МТК зависит от разбавления немонотонно с максимумом интенсивности при 20-кратном разбавлении (рис. 14б). Однако полное устранение пиков креатинина из ГКР-сигнала МТК в моче, а также достижение минимальной разницы между ГКР-спектрами МТК в образцах мочи, собранных утром и днём,

происходит только при 100-кратном разбавлении, которое и использовали далее в конечной методике анализа.

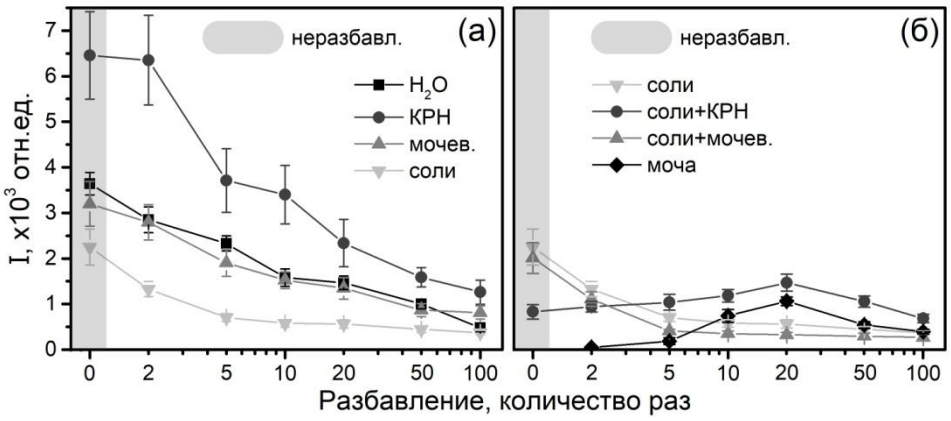


Рис. 14. Зависимость интенсивности ГКР-сигнала МТК от величины разбавления смесей, содержащих МТК (20 мкг/мл) и **(а)** один или **(б)** несколько компонентов мочи (включая мочу). КРН – креатинин, мочев. – мочевина.

Таким образом, точность оптимизированной методики ТФЭ-ГКР-определения МТК не зависит от времени сбора мочи и варьирования её состава, а этап ТФЭ позволяет сконцентрировать молекулы аналита и увеличить ГКР-сигнал МТК почти в два раза после 5 мин сорбции. Разработанная методика имеет следующие метрологические характеристики: правильность 97–104%, s_r 11–19%, c_{lim} 26 мкг/мл, c_{min} 4.2 мкг/мл (данные получены с использованием 11 образцов мочи).

ТФЭ-ГКР-детектирование антибиотиков в моче с использованием микросфер $CaCO_3$-СНЧ

Детектирование ЦСА. Поскольку все ЦСА содержат в своей структуре карбоксильную группу, депротонированную в условиях нейтральной среды, то для их детектирования использовали микросферы $CaCO_3$-СНЧ, модифицированные ПДДА. Установлено, что применение модификации увеличивает степень сорбции всех использованных в исследовании ЦСА (с 44–50% до 60–90% в зависимости от конкретного ЦСА), причём на степень сорбции мочевой кислоты (основного фонообразующего компонента мочи в нейтральной среде) модификация сорбента практически не повлияла (сохранилась на уровне 20%).

Дополнительно для ускорения этапа ТФЭ предложено придание магнитоуправляемых свойств микросферам $CaCO_3$-СНЧ путём встраивания СНЧ вместе с НЧ магнетита ($CaCO_3$-СНЧ-Fe), что позволяет проводить быстрое отделение микрочастиц от анализируемого раствора после ТФЭ путём использования постоянного магнита.

Тестирование ТФЭ-ГКР-методики с использованием образцов мочи с добавкой ЦСА (цефазолин, ЦТР, цефоперазон, 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. Данный результат связан в первую очередь со способностью ПДДА препятствовать сорбции мочевой кислоты на СНЧ в нейтральной среде, поскольку в отсутствии ПДДА

появляется фоновый сигнал из-за изначально высокой разницы между концентрациями мочевой кислоты и ЦСА в реальной моче (1.2 мМ *vs* 0.05–0.08 мМ).

Детектирование САА. Для ТФЭ молекул САА использовали $CaCO_3$-СНЧ-Fe без дополнительной модификации и в растворах с pH, близким к нейтральному значению (5–6), поскольку в данных условиях САА плохо растворимы в воде, что способствует сорбции их молекул на $CaCO_3$-СНЧ-Fe. Однако, поскольку САА не генерируют ГКР-спектры в нейтральной среде (рис. 2), то перед ГКР-детектированием матрицу сорбента растворяли с использованием избытка соляной кислоты, что помимо высвобождения СНЧ и молекул аналита из $CaCO_3$ позволило установить pH среды анализируемой смеси на уровне, оптимальном для ГКР-анализа САА (pH ~1).

Установлено, что степень сорбции большинства САА находится на уровне 40–60%, в то время как сорбция БРБ (структурного аналога уробилиноидов – основных фонообразующих компонентов мочи в кислой среде) составила около 10%. Также для устранения влияние эндогенных компонентов мочи на разницу в интенсивности ГКР-сигнала САА в образцах утренней и дневной мочи необходимо разбавление образцов в 100 или более раз. Наконец установлено, что обе ТФЭ-ГКР-методики позволяют детектировать ЦСА и САА в моче на уровнях, достаточных для проведения ТЛМ.

Глава 5. Серебряные наночастицы, модифицированных циклодекстринами, для ГКР-определения лекарственных веществ в биожидкостях человека

Модификация ГКР-подложек различными молекулярными рецепторами является довольно распространённым подходом для улучшения селективности и повышения точности ГКР-анализа сложных смесей, включая БЖЧ. Наиболее широко распространенными рецепторами являются антитела и аптамеры, которые преимущественно используют в косвенном формате ГКР-анализа ввиду значительной блокировки ГКР-активных центров самими рецепторами. Перспективным вариантом рецепторов для прямого ГКР-анализа являются ЦД, молекулы которых имеют небольшой размер, несущественно экранируют ГКР-активные центры и имеют очень низкую КР-активность молекулярных колебаний. Ввиду отсутствия в литературе информации о селективности ЦД-модифицированных ГКР-подложек при анализе объектов со сложным составом, в диссертационной работе проведены исследования по оценке реального потенциала ЦД-ГКР-анализа (его селективности и чувствительности) для определения ЛВ в образцах БЖЧ.

ГКР-подложка, модифицированная молекулами ЦД

Синтезированы образцы коллоидных сферических СНЧ, модифицированных различными ЦД (α и β и их производными с гидроксипропильными группами)

(СНЧ@ЦД); средний диаметр частиц во всех образцах составил ~40 нм. В данном синтезе молекулы ЦД использовали в качестве и модификатора поверхности, и восстановителя ионов серебра. Показано, что тип ЦД не влияет на морфологию и плазмонные свойства (спектры поглощения) получаемых СНЧ@ЦД. Более того, не выявлено существенных отличий в интенсивности и профилях ГКР-спектров ЛВ, полученных при использовании СНЧ, покрытых разными ЦД. Поэтому использование β-ЦД является более оптимальным благодаря его низкой стоимости. Установлено, что предложенный протокол синтеза СНЧ@β-ЦД имеет хорошую воспроизводимость от образца к образцу (s_r интенсивности ГКР-сигнала менее 10%), а полученные образцы сохраняют коллоидную стабильность и усиливающие свойства не менее 1.5 месяцев.

Варьирование условий синтеза показало, что усиливающие свойства СНЧ@β-ЦД существенно зависят от концентрации ЦД (изученный диапазон: 0.1–10 мМ) и продолжительности синтеза. Так, несмотря на продолжающийся монотонный рост оптической плотности образцов при увеличении концентрации ЦД (рост числа и/или размера СНЧ), использование ЦД в концентрациях выше 1 мМ приводит к снижению ГКР-сигнала. Этот факт связан с конкуренцией между молекулами β-ЦД, адсорбированными на ГКР-активной поверхности СНЧ, и молекулами β-ЦД, растворенными в объёме, за взаимодействие с молекулами аналита. Анализ влияния продолжительности синтеза показал, что спектры поглощения СНЧ@β-ЦД перестают изменяться через час после начала синтеза независимо от используемой концентрации β-ЦД. Однако усиливающие свойства продолжают расти и чтобы гарантировать полноту синтеза и максимально интенсивный ГКР-сигнал предпочтительнее более длительное время синтеза СНЧ@β-ЦД (180 мин для изученной системы).

Таким образом, показано, что интенсивность поглощения возбуждающего света ГКР-подложкой и её усиливающие свойства далеко не всегда коррелируют друг с другом, и интенсивность поглощения сама по себе не может быть использована для прогнозирования усиливающих свойств подложки. Поэтому использование постулатов только электромагнитного механизма усиления КР-сигнала следует использовать осторожно, особенно в случае систем, в которых возможна конкурентная адсорбция на ГКР-активные центры.

Влияние присутствия ЦД на ГКР-сигнал мочи и ЛВ

Анализ ГКР-спектров образцов мочи показал, что в присутствии ЦД в нейтральной среде происходит наибольшее снижение интенсивности сигнала эндогенных компонентов мочи (рис. 15). В случае кислотных метаболитов (уробилиноиды и мочевая кислота) это связано с образованием анионных форм, которые плохо взаимодействуют с гидрофобной полостью ЦД. В случае креатинина отсутствие ГКР-сигнала предположительно обусловлено его слабыми

основными свойствами, что приводит к частичному протонированию его молекул в нейтральных средах и ухудшению их взаимодействия с полостью ЦД.

В кислой среде интенсивность и профиль ГКР-сигнала мочи не претерпевают значительных изменений после модификации поверхности СНЧ молекулами β-ЦД (рис. 15а). Это связанно с тем, что уробилиноиды (основные фонообразующие компоненты мочи в кислой среде), состоящие из ароматических фрагментов, остаются незаряженными и способны взаимодействовать с неполярной полостью ЦД. Более того уробилиноиды имеют низкую растворимость в воде, что дополнительно способствует их адсорбции на ЦД-модифицированной поверхности СНЧ благодаря гидрофобным взаимодействиям.

В щелочной среде при модификации поверхности СНЧ молекулами β-ЦД сигнал мочи также снижается (рис. 15в) благодаря переводу в отрицательно заряженное состояние большинства компонентов мочи, способных к генерации интенсивного ГКР-сигнала. Единственным компонентом, способным к взаимодействию с полостью ЦД, остаётся креатинин, поскольку его молекулы в щелочной среде становятся электронейтральными, что подтверждается наличием его пиков при использовании СНЧ и СНЧ@β-ЦД.

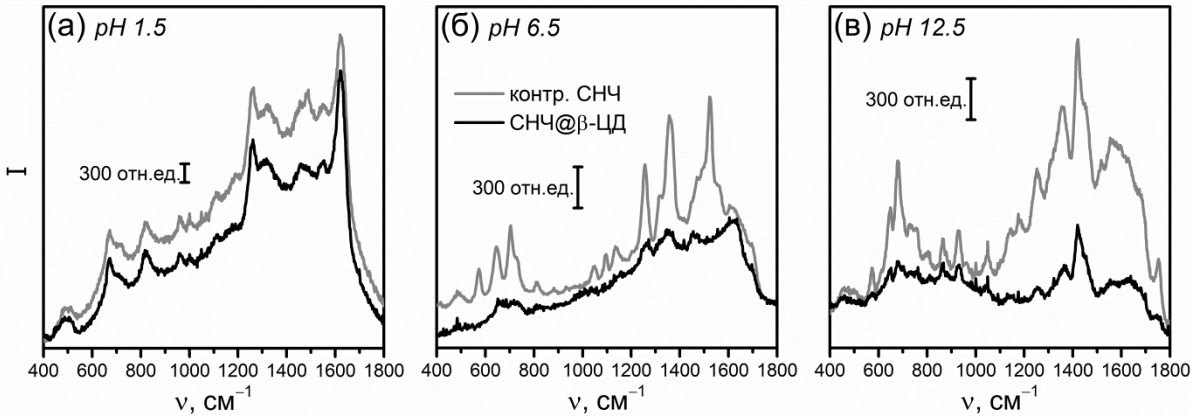


Рис. 15. Влияние pH и модификации СНЧ молекулами β-ЦД на ГКР-спектры образца мочи, разбавленного в 200 раз. В нейтральной среде (pH 6.5) дополнительно проводили активацию СНЧ с помощью раствора NaCl.

Изучение ГКР-спектров ЛВ с помощью СНЧ@β-ЦД показало снижение интенсивности сигнала большинства ЛВ как в кислой, так и щелочной среде, что обусловлено ухудшением взаимодействия СНЧ@ЦД с молекулами ЛВ в катионной и анионной формах. Также, несмотря на снижение интенсивности сигнала мочи в щелочной среде в присутствии ЦД (рис. 15в), ГКР-сигнал креатинина всё равно полностью перекрывает сигнал ЛВ при регистрации их спектров в образцах мочи с высоким pH. Однако в случае нейтральной среды сравнение СНЧ@β-ЦД и контрольных СНЧ показало, что присутствие ЦД увеличивает интенсивность ГКР-сигнала МТК, ЦИПРО и ЦТР в 7, 5 и 2 раза, соответственно (рис. 16). Также обнаружено, что присутствие ЦД, их структура и

концентрация не влияют на профили ГКР-спектров всех изученных ЛВ и компонентов БЖЧ.

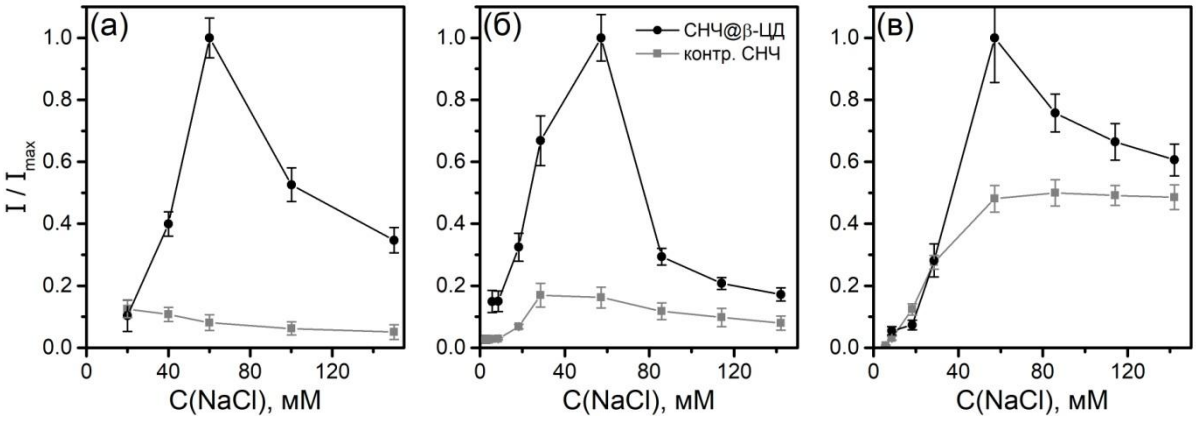


Рис. 16. Влияние концентрации NaCl (при pH 6.5) на интенсивность ГКР-спектров растворов: **(а)** МТК (0.1 мкг/мл), **(б)** ЦИПРО (0.5 мкг/мл) и **(в)** ЦТР (2 мкг/мл). Спектры получены с использованием СНЧ@β-ЦД и контрольных СНЧ, стабилизированных гидроксиламином.

Методики ГКР-определения ЛВ в БЖЧ

Таким образом, согласно приведённым выше результатам, использование β-ЦД для модификации СНЧ позволяет существенно увеличить и селективность, и чувствительность ГКР-определения ЛВ в нейтральной среде с использованием pH-нейтрального активирующего агента (NaCl). Это дало возможность разработать простые и быстрые (до 10 мин) методики ГКР-определения МТК и ЦСА в моче, в которых в качестве пробоподготовки перед ГКР-измерениями достаточно использовать только разбавление проб водой (200–1000 раз).

В случае ЦД-ГКР-определения ФХА требуется дополнительное увеличение соотношения «сигнал/шум» осаждением некоторых эндогенных компонентов БЖЧ (главным образом мочевой кислоты и белков) с помощью ацетонитрила с последующим разбавлением очищенной смеси водой. Поскольку концентрации ЛВ в крови значительно ниже, чем в моче, при определении ФХА в плазме крови проводили выпаривание ацетонитрила после удаления белков плазмы с последующим перерастворением остатка в том же объёме воды. В результате один цикл определения ФХА в моче занимает не более 15 мин, а анализ образцов плазмы требует дополнительного времени на выпаривание растворителя (~1 ч).

Метрологические характеристики разработанных методик ЦД-ГКР-анализа представлены в табл. 6. Установлено, что благодаря сильному структурному сходству ЦИПРО и норфлоксацина (рис. 1б) для их определения в моче можно использовать один и тот же градуировочный график. Дополнительно показано, что разработанные методики сохраняют приемлемую точность даже в случае образцов мочи с концентрациями основных эндогенных компонентов, двукратно превышающими нормальные значения, что может возникать, например, при некоторых заболеваниях (сахарный диабет, почечная недостаточность).

Табл. 6. Метрологические характеристики методик ГКР-определения ЛВ в БЖЧ при использовании СНЧ@β-ЦД. МТК – метотрексат, ЦСА – цефалоспориновые антибиотики, ФХА – фторхинолоновые антибиотики.

Аналит	Вид БЖЧ	Число образцов БЖЧ	Диапазон концентраций, мкг/мл	s_r, %	Прав., %	c_{min}, мкг/мл	c_{lim}, мкг/мл
МТК	моча	6	20–300	6–15	95–111	0.3	107
ЦСА		5	50–500	6–14	91–110	11–13	28–46
ФХА		10	50–500	7–15	96–105	2.9–5.8	31–59
ФХА	плазма крови	3	1–6	8–23	91–111	0.05–0.34	1.3–2.7

Глава 6. Теоретическое изучение и варианты использования в анализе медных ГКР-подложек

Согласно анализу литературы в качестве ГКР-подложек преимущественно используют металлические наноструктуры на основе золота и серебра, однако стоимость благородных металлов и их соединений, а также правовые условия, регулирующие их покупку/продажу, использование и утилизацию, могут замедлять и ограничивать распространение ГКР-анализа в целом. Как следствие, разработка новых ГКР-подложек направлена, среди прочего, на выявление альтернатив подложкам на основе серебра и золота и одной из таких альтернатив являются наноструктуры на основе меди. Однако реализация потенциала медных ГКР-подложек и достижение максимальной чувствительности и воспроизводимости анализа (особенно в случае анализа БЖЧ) нуждаются в учёте ряда особенностей медных наноструктур, а именно относительно низкой химической стабильности и специфических оптических свойств.

Теоретическое изучение поглощения света кластерами меди

В работе проведено теоретическое изучение плазмонных свойств медных кластеров с использованием метода нестационарной теории функционала плотности. Основное внимание уделено исследованию электронных возбуждённых состояний одномерных (1D) медных кластеров с линейной геометрией и состоящих из 2–20 атомов (3D-модели с 20 атомами использовали для сравнения). Исследование включало расчёт спектров электронного поглощения (рис. 17) с применением гибридного функционала PBE0 и анализ электронной структуры кластеров в основном и возбуждённом состояниях.

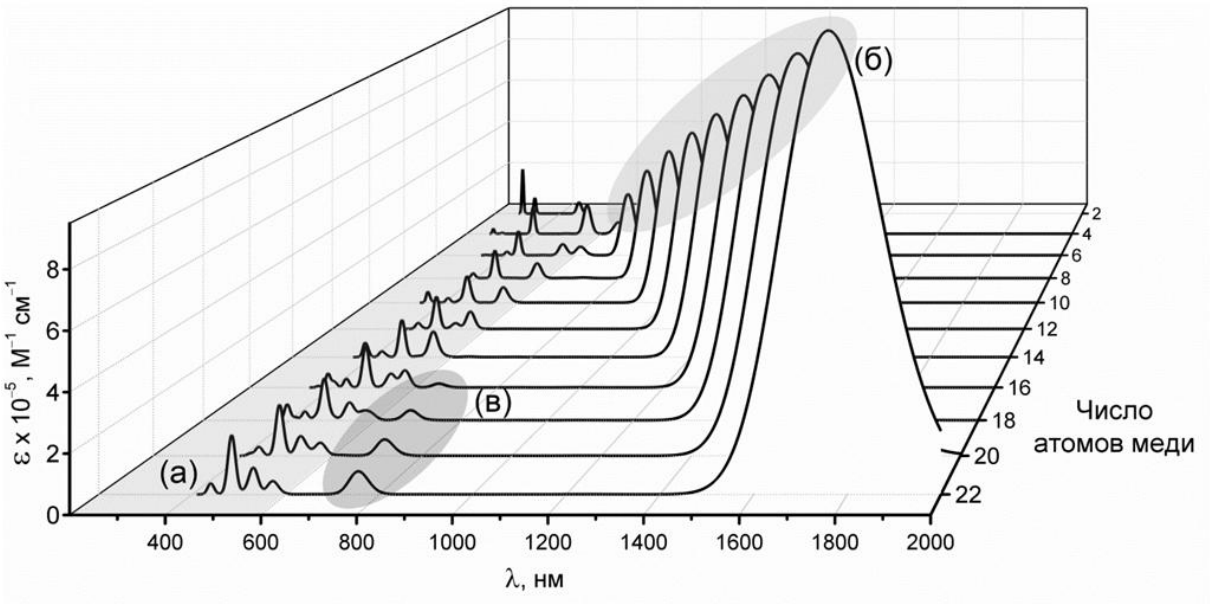


Рис. 17. Теоретические спектры поглощения линейных кластеров меди одноатомной толщины и с различным числом атомов; ε – молярный коэффициент поглощения. Полосы «а» соответствуют возбуждениям на основе межзонных переходов с участием электронов 3*d*-подуровня, а наборы полос «б» и «в» соответствуют возбуждениям в зоне проводимости.

Установлено, что медные кластеры демонстрируют два типа электронных возбуждений: межзонные переходы и возбуждения зоны проводимости. Выявлено, что оптические свойства кластеров существенно зависят от их размера и геометрии. Например, при увеличении числа атомов в 1D-кластерах наблюдается сильное смещение полос поглощения возбуждений зоны проводимости в длинноволновую область (рис. 17б,в). Также показано, что 1D-кластеры обладают более выраженными плазмонными свойствами в красном и ближнем ИК диапазонах длин волн света по сравнению с 3D-аналогами.

Полученные данные об электронной структуре кластеров в основном и возбуждённом состояниях использовали для изучения способности 1D-кластеров усиливать КР-сигнал в соответствии с электромагнитной теорией. Установлено, что максимальное усиление КР-сигнала достигается при генерации возбуждённых состояний в диапазоне 600–800 нм, что обуславливает необходимость использования возбуждающих лазеров с соответствующей длиной волны света. Несмотря на использование упрощённой модели медных кластеров (моноатомные цепочки), полученные результаты очень хорошо согласуются с экспериментальными, ранее описанными в литературе. Дополнительно показано, что значимый усиливающий эффект распространяется лишь на очень короткие расстояния, сопоставимые с размерами адсорбционного слоя на поверхности ГКР-подложки, что подтверждает требование прямой адсорбции молекул аналита на поверхность ГКР-подложки.

Таким образом, в ходе исследования изучены фундаментальные закономерности формирования оптических и усиливающих свойств медных

кластеров, позволяющие улучшить практическое применение медных ГКР-подложек в анализе.

ГКР-анализ с использованием МНЧ

В ходе изучения влияния химической стабильности медных ГКР-подложек на точность анализа разработана методика экспрессного синтеза ГКР-активных МНЧ (средний диаметр 32 нм), основанная на восстановлении ионов Cu^{2+} гидратом гидразина в водной среде в присутствии стабилизатора (цитрат-ионов). Применение микроволнового нагрева позволило существенно ускорить реакцию и сократить время синтеза до 40 с, поскольку микроволновое излучение проникает вглубь образца и нагрев происходит сразу по всему объёму реакционной смеси. Изучение влияния количества восстановителя и стабилизатора, а также природы аниона в соли меди на ГКР-эффективность МНЧ использовали для оптимизации синтеза.

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. Тем не менее, исследование воспроизводимости ГКР-сигнала, генерируемого свежесинтезированными образцами МНЧ, продемонстрировало, что s_r сигнала, полученного с использованием разных образцов МНЧ, имеет значения менее 8%. Таким образом, несмотря на сильно ограниченную химическую стабильность полученных МНЧ во времени, свежеприготовленные МНЧ можно использовать для проведения воспроизводимого ГКР-анализа.

Способность МНЧ усиливать ГКР-сигнал сравнили с таковой для СНЧ и золотых НЧ с использованием двух разных по структуре аналитов – ЦТР (рис. 1в) и 4-аминотиофенол. Оценка усиления КР-сигнала 4-аминотиофенола показала, что СНЧ обладают лучшим усилением, а золотые НЧ и МНЧ показали сопоставимую эффективность (рис. 18а). Однако МНЧ показали лучшие результаты (особенно относительно золотых НЧ) при детектировании ЦТР (рис. 18а), что связано с более высокой реакционной способностью меди и образованием прочных донорно-акцепторных связей с атомами азота и кислорода молекул ЦТР, что увеличивает и адсорбцию ЦТР, и вероятность реализации химического механизма усиления. Примечательно, что в соответствии с теорией электромагнитного механизма золотые НЧ должны усиливать КР-сигнал молекул аналитов эффективнее всех изученных НЧ, поскольку демонстрируют наилучшее взаимодействие с возбуждающим излучением (рис. 18б). Таким образом, дополнительно показано, что интенсивное плазмонное поглощение не обязательно приводит к высоким усиливающим свойствам ГКР-подложек, и для достижения максимальной чувствительности ГКР-анализа использование наиболее подходящего сочетания «аналит – материал ГКР-подложки» также важно, как и выбор оптимальной длины волны возбуждения.

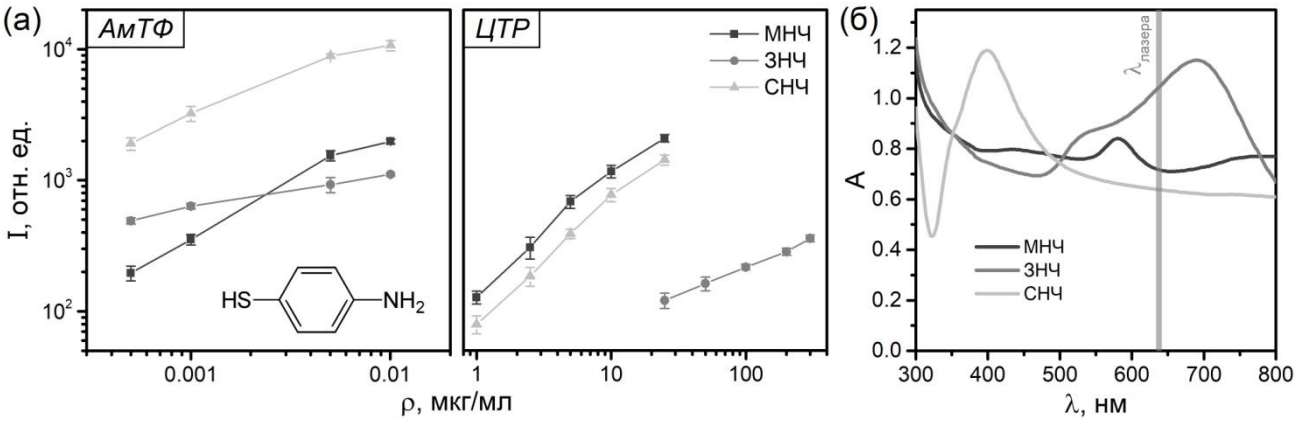


Рис. 18. (а) Влияние концентрации 4-аминотиофенола (АмТФ) и ЦТР на интенсивность ГКР-сигнала. Результаты получены с использованием растворов МНЧ, золотых НЧ (ЗНЧ) и СНЧ, стабилизированных цитрат-ионами и активированных путём агрегации с помощью раствора NaCl. **(б)** Спектры поглощения МНЧ, ЗНЧ и СНЧ после агрегации активатором (раствор NaCl).

ГКР-спектры образцов мочи, полученные с использованием МНЧ, не имеют интенсивных пиков, связанных с присутствием таких эндогенных компонентов мочи, как креатинин и мочевая кислота. Однако в образцах мочи, собранных утром и днём, наблюдается разная интенсивность сигнала ЦТР, что связано с конкурентными взаимодействиями на поверхности МНЧ между молекулами аналита и компонентов мочи с низкой КР-активностью, таких как мочевина и неорганические ионы. Установлено, что для нивелирования влияния матрицы мочи и достижения максимальной селективности ГКР-определения ЦСА с помощью МНЧ достаточно провести только разбавление образцов (в 1000 раз), поскольку при данном разбавлении спектры ЦСА в воде и моче имеют практически одинаковые интенсивность и спектральные профили.

Оптимизированная методика ГКР-определения ЦСА в моче с использование МНЧ требует не более 15 минут и включает микроволновый синтез МНЧ, их смешивание с 1000-кратно разбавленным образцом мочи и агрегирующим агентом, измерение ГКР-сигнала. Метрологические характеристики методики представлены в табл. 7. Анализ угловых коэффициентов градуировочных зависимостей показал более низкую степень адсорбции цефоперазона на поверхности МНЧ по сравнению с ЦТР и цефазолином, что объясняет ухудшение метрологических характеристик его определения. Также установлено, что разработанная методика сохраняет свою точность при определении ЦСА в моче с избыточным (относительно нормы) содержанием некоторых эндогенных компонентов.

Табл. 7. Метрологические характеристики методики ГКР-определения некоторых ЦСА в моче (7 образцов) с помощью МНЧ. ЦТР – цефтриаксон, ЦЗЛ – цефазолин, ЦПР – цефоперазон

Аналит	s_r, %	Прав., %	c_{min}, мкг/мл	c_{lim}, мкг/мл
ЦТР	8–13	98–101	7.5	33
ЦЗЛ	7–12	93–107	8.8	36
ЦПР	10–24	97–106	36	129

Увеличение химической стабильности медных ГКР-подложек путём создания композитных материалов

Несмотря на пригодность свежеприготовленных коллоидных МНЧ для точного ГКР-анализа, применение более стабильных ГКР-подложек, безусловно, практичнее. Поэтому для увеличения срока хранения медных подложек предложено создание ГКР-активных сорбентов со встроенными МНЧ, а также микроразмерных структур типа «ядро-оболочка» с медной наноструктурированной оболочкой. В первом случае увеличение химической стабильности и сохранение усиливающих свойств МНЧ основано на их встраивании в твёрдую неорганическую матрицу (ГГА и $CaCO_3$) и замедлении диффузии кислорода к поверхности меди, во втором – на уменьшении удельной площади поверхности (по сравнению с коллоидным раствором МНЧ) и, как следствие, значительным уменьшением скорости окисления наноструктурированного медного слоя.

Установлено, что ГКР-активность медных наноструктур значительно снижается в нейтральной и щелочной средах по сравнению с кислой, что связано с увеличением восстановительных свойств металлической меди и окислением её поверхности кислородом воздуха. Изучение усиливающих свойств МНЧ в диапазоне pH 1–3 с использованием разных кислот показало, что HCl способствует получению более интенсивного ГКР-сигнала, поскольку анионы хлора, как упоминалось ранее, выступают в качестве линкеров для протонированных молекул аналитов, а образование таких поверхностных комплексов способствует реализации химического механизма усиления и дополнительному увеличению интенсивности ГКР-сигнала. Поэтому при проведении ГКР-анализа с использованием ГГА-МНЧ и $CaCO_3$-МНЧ растворение матриц сорбентов для высвобождения МНЧ и молекул аналита осуществляли с помощью HCl.

Установлено, что все композиты продемонстрировали значительное увеличение химической стабильности и усиливающих свойств МНЧ в сравнении с раствором коллоидных МНЧ, теряющим способность усиливать КР-сигнал уже через 12 ч. Так, усиливающие свойства $CaCO_3$, покрытых наноструктурированным слоем меди, и ГГА-МНЧ сохраняются в течение примерно недели, а встраивание МНЧ внутрь микросфер $CaCO_3$ и хранение композита в высушенном состоянии позволяют сохранить усиливающие свойства МНЧ на протяжении 4 месяцев. Также образцы $CaCO_3$-МНЧ демонстрируют значение коэффициента усиления ($\sim 4 \cdot 10^8$), сопоставимое с таковым для $CaCO_3$-СНЧ (10^9) и другими ГКР-активными материалами на основе медных наноструктур, предложенными ранее в литературе. Поэтому именно микросферы $CaCO_3$-МНЧ далее использовали для ГКР-определения ЦТР и сульфадиметоксина.

Спектроэлектрохимический анализ с использованием медных ГКР-активных электродов

В качестве альтернативного варианта нивелирования низкой стабильности медных ГКР-подложек во времени предложено совмещение спектроскопии ГКР с ЭХ подходами, позволяющими быстрое создание и регенерацию ГКР-активных центров на поверхности металлических электродов. Для этого разработана и оптимизирована система спектроэлектрохимического анализа, основанная на проведении ГКР-измерений при одновременном приложении электрического потенциала к ГКР-подложке в ЭХ ячейке (ЭХ-ГКР-анализ). Разработанная ЭХ ячейка состоит из трёх электродов, помещённых в стандартную кварцевую кювету (рис. 19): медного рабочего электрода (полоска электротехнической меди), микроэлектрода сравнения (Ag/AgCl) и графитового вспомогательного электрода с отверстием для пропускания возбуждающего излучения и регистрации ГКР-сигнала. Для созданной системы разработана и оптимизирована методика спектроэлектрохимического ГКР-анализа, которая включает следующие шаги:

(I) создание или обновление ГКР-активного слоя на поверхности медного электрода путём ЭХ обработки (*ex situ* активация) новой медной поверхности или реактивации поверхности после хранения более 8 ч;

(II) дополнительную ЭХ обработку поверхности в растворе, содержащем молекулы аналита (*in situ* активация);

(III) установление потенциала, позволяющего достичь ГКР-сигнал максимальной интенсивности (U_{max}), и регистрацию аналитического сигнала;

(IV) ЭХ очистку ГКР-активной поверхности от адсорбированных молекул перед повторным использованием.

Продолжительность одного цикла анализа не превышает 10 мин (без учёта *ex situ* активации рабочего электрода).

Установлено, что для осуществления *ex situ* активации поверхности медного электрода (рис. 19, этап I) достаточно использование десяти циклов окисления-восстановления в растворе чистого электролита. Данный подход не требует каких-либо специфических реагентов, кроме электролита, и позволяет быстро создавать наношероховатую поверхность с большим содержанием ГКР-активных центров путём чередования растворения и осаждения материала электрода.

Осуществление *in situ* активации включало проведение дополнительного цикла окисления-восстановления в растворе, содержащем молекулы аналита (рис. 19, этап II), что позволяет увеличить чувствительность анализа, поскольку при адсорбции молекул аналита на свежеприготовленных ГКР-активных участках достигается максимально интенсивный ГКР-сигнал.

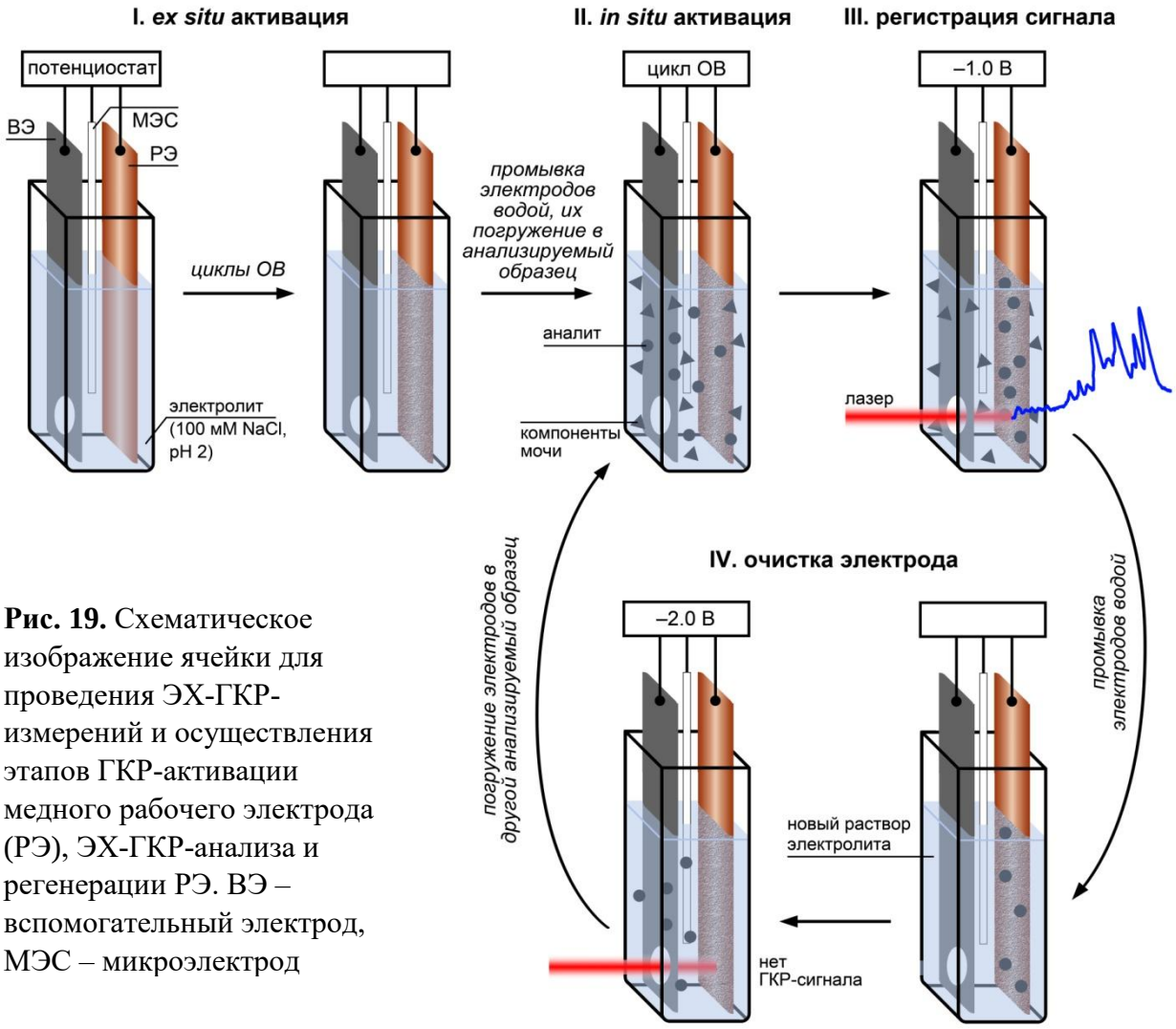


Рис. 19. Схематическое изображение ячейки для проведения ЭХ-ГКР-измерений и осуществления этапов ГКР-активации медного рабочего электрода (РЭ), ЭХ-ГКР-анализа и регенерации РЭ. ВЭ – вспомогательный электрод, МЭС – микроэлектрод

Активацию (и *ex situ*, и *in situ*) проводили в растворе электролита (NaCl 100 мМ) с величиной pH, скорректированной до 2 с помощью HCl. Помимо растворения и удаления оксидного слоя с медной поверхности рабочего электрода, кислая среда благоприятствует образованию растворимых комплексов ионов Cu^{2+}. Данные комплексы могут в дальнейшем реагировать с молекулами аналита с образованием новых комплексов, которые восстанавливаются во время восстановительной части цикла окисления-восстановления и способствуют формированию поверхностных комплексов «аналит-медь» и получению более интенсивного ГКР-сигнала.

Изучение ГКР-спектров ФХА (рис. 20) и основных компонентов мочи в электролите с разной величиной pH с помощью разработанной ЭХ-ГКР-методики показало, что только в кислой среде компоненты мочи продуцируют слабый ЭХ-ГКР-сигнал и адсорбция аналита на поверхности ГКР-активного медного электрода менее всего подвержена влиянию конкурентной адсорбции компонентов мочи. При этом исследованные ФХА (6 представителей) имеют в кислой среде схожие профили спектров и одинаковое значение U_{max}.

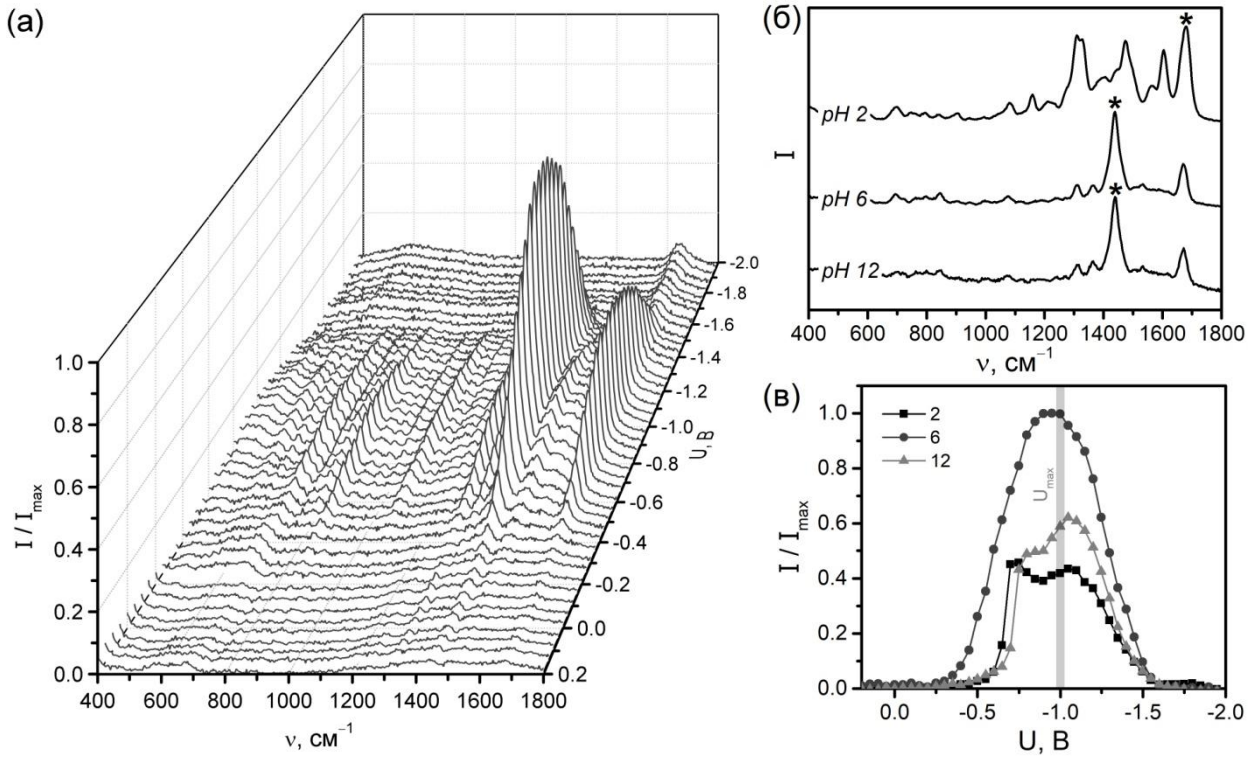


Рис. 20. (а) ГКР-спектры ЦИПРО (5 мкг/мл в 0.1 М NaCl, pH 6), полученные при различных значениях поляризации рабочего электрода (*vs* Ag/AgCl). **(б)** Профили ГКР-спектров ЦИПРО в разных средах при U = –1.0 В *vs* Ag/AgCl. **(в)** Влияние величины приложенного потенциала на интенсивность основных ГКР-пиков ЦИПРО в разных средах (выделены на рис. 20б).

Этап очистки поверхности рабочего электрода (рис. 19, этап IV) включал в себя (i) однократную промывку электродов чистой водой после завершения анализа и (ii) кратковременную (10 с) отрицательную поляризацию (–2.0 В *vs* Ag/AgCl) ГКР-активного электрода в чистом электролите (pH 2). Механизм данной ЭХ очистки основан на активном выделении молекулярного водорода при потенциалах в диапазоне от –1.5 до –2.5 В, что приводит к вытеснению и «смыванию» адсорбированных молекул аналита с поверхности рабочего электрода. Предложенная методика очистки ГКР-активной поверхности позволяет успешно провести десорбцию как ФХА, так и компонентов мочи, причём при проведении нескольких циклов «измерение-очистка» наблюдается хорошая воспроизводимость интенсивности аналитического сигнала (s_r составило 6%).

Таким образом, разработана методика ЭХ-ГКР-определения ФХА в моче, достоинствами которой являются универсальность (пригодность для определения разных представителей ФХА), использование более дешёвого ГКР-активного материала (меди вместо серебра или золота) и возможность многократного использования одних и тех же электродов для ЭХ-ГКР-анализа.

В **заключении** диссертации проведено сравнение разработанных методик анализа с существующими в научной литературе, отмечены ключевые прорывные моменты работы, а также перспективные направления дальнейших исследований.

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 pH 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 pH, 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).

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

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. 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.

3. 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.

4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. **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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. **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.
15. 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.
16. **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.

17. **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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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 microspheresc with Astralen and silver nanoparticles // Langmuir. 2013. V. 29. P. 4140–4147.
24. 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.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность своему научному консультанту д.х.н., профессору Горячевой И.Ю. за постоянную всестороннюю поддержку, ценные рекомендации по организации работы и предоставленные ресурсы; Dr. Dana Cialla-May из Института фотонных технологий (г. Йена, Германия) за плодотворное многолетнее сотрудничество и доступ к различным КР-спектрометрам; д.х.н., профессору Горину Д.А. и д.х.н., доценту Русановой Т.Ю. за помощь и предоставление ресурсов на начальных этапах проводимых исследований; к.ф.-м.н. Захаревичу А.М. за многолетнее сотрудничество и изучение ГКР-подложек, использованных в работе, методом электронной микроскопии; к.х.н. Маркиной Н.Е. за неоценимую помощь на всех этапах выполнения диссертационной работы. Благодарю всех соавторов работ, подготовленных и опубликованных в рамках диссертационного исследования.