



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2022. Т. 22, вып. 3. С. 292–301

*Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2022, vol. 22, iss. 3, pp. 292–301

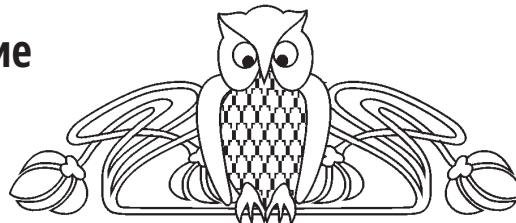
<https://ichbe.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1816-9775-2022-22-3-292-301>

Научная статья

УДК 543.424.2

## Электрохимическое ГКР исследование некоторых эндогенных компонентов биожидкостей человека



Н. Е. Маркина, А. М. Захаревич, А. В. Маркин ✉

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

Маркина Наталья Евгеньевна, кандидат химических наук, младший научный сотрудник лаборатории неорганической химии Института химии, n.e.markina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7031-1088>

Захаревич Андрей Михайлович, кандидат физико-математических наук, заведующий лабораторией диагностики наноматериалов и структур ОНИ наноструктур и биосистем, lab-15@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3813-5870>

Маркин Алексей Викторович, кандидат химических наук, доцент кафедры общей и неорганической химии Института химии, av\_markin@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7589-238X>

**Аннотация.** Разработана и оптимизирована методика электрохимического (ЭХ) получения медных электродов, пригодных для использования в качестве подложек в спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) света. Данные ГКР активные электроды использовали для проведения электроспектральных исследований, основанных на совмещении электрохимического и ГКР анализа (ЭХ-ГКР анализ). В качестве объектов анализа выбрали несколько эндогенных компонентов биожидкостей (мочевина, креатинин, мочевая кислота, билирубин), которые могут существенно влиять на ГКР анализ при определении других веществ в биожидкостях (например, лекарственных препаратов). Для растворов указанных веществ изучена зависимость ГКР сигнала и силы тока от величины поляризации поверхности ГКР активного электрода (приложенного потенциала) и уровня pH растворов. Установлено, что для всех аналитов значения приложенного потенциала, при которых наблюдается максимальный ГКР сигнал, находятся в области отрицательных величин (ниже  $-0.2$  В относительно медного псевдоэлектрода сравнения). Наиболее интенсивный ГКР сигнал большинство аналитов имеет в нейтральной среде (при оптимальном значении поляризации ГКР активного электрода), а самый слабый – в щелочной. Ингибирующее действие высоких значений pH предположительно связано с депротонированием молекул аналитов, приводящем к ухудшению их адсорбции на отрицательно поляризованных ГКР активных электродах. Анализ вольт-амперных характеристик позволил провести оценку возможного влияния ЭХ превращений изучаемых молекул на их ГКР сигнал. Результаты, полученные в данной работе, будут полезны при разработке методик ЭХ-ГКР определения различных эндо- и экзогенных веществ в биожидкостях человека.

**Ключевые слова:** гигантское комбинационное рассеяние, мочевина, креатинин, мочевая кислота, билирубин, ГКР-активные электроды, медные ГКР подложки, электрохимическая ячейка, электроспектральная система

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам (СП-1115.2021.4).

**Для цитирования:** Маркина Н. Е., Захаревич А. М., Маркин А. В. Электрохимическое ГКР исследование некоторых эндогенных компонентов биожидкостей человека // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2022. Т. 22, вып. 3. С. 292–301. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2022-22-3-292-301>

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

### Electrochemical SERS study of some endogenous components of human biofluids

N. E. Markina, A. M. Zakharevich, A. V. Markin ✉

Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

Natalia E. Markina, n.e.markina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7031-1088>

Andrey M. Zakharevich, lab-15@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3813-5870>

Alexey V. Markin, av\_markin@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7589-238X>

**Abstract.** The work describes electrochemical (EC) protocol suitable for preparation of copper electrodes which can be used as substrates in surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). These SERS-active electrodes have been used for electrospectral studies based on the combination of electrochemical and SERS analysis (EC-SRS analysis). Several endogenous bodyfluid components (urea, creatinine, uric acid, bilirubin)



have been selected for the study because they can significantly affect the SERS-based determination of other analytes in bodyfluids (for example, drugs). The influence of the SERS-active electrode polarization (applied potential) and the pH level of the analyte solutions on the SERS signal and current value have been investigated. The polarization values corresponded to the maximum SERS signal are observed at negative values for all analytes (below  $-0.2$  V vs. copper pseudo-reference electrode). The maximal SERS signal has been observed for most of the analytes in a neutral medium (at the optimum polarization value of the SERS-active electrode), and the weakest signal has been in an alkaline medium. The diminishing of EC-SERS signal at high pH values is explained by deprotonation of analyte molecules that deteriorates analyte adsorption onto the negatively polarized SERS-active electrodes. Analysis of the current-voltage curves has been used to estimate the possible influence of EC changes of the studied molecules on their EC-SERS signal. The results obtained in this work will be useful for the development of EC-SERS systems suitable for the determination of various endo- and exogenous compounds in human biofluids.

**Keywords:** surface-enhanced Raman spectroscopy, urea, creatinine, uric acid, bilirubin, SERS-active electrodes, copper SERS substrates, electrochemical cell, electrospectral system

**Acknowledgements.** The work was supported by the Scholarships of the President of the Russian Federation to young scientists and graduate students (SP-1115.2021.4).

**For citation:** Markina N. E., Zakharevich A. M., Markin A. V. Electrochemical SERS study of some endogenous components of human biofluids. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2022, vol. 22, iss. 3, pp. 292–301 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2022-22-3-292-301>

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

## Введение

Эффект гигантского комбинационного рассеяния света (ГКР) впервые был обнаружен при изучении адсорбции молекул пиридина на поверхности электрохимически (ЭХ) огрубленных металлических (серебряных) электродов [1]. По сравнению с обычным ГКР, электрохимический формат ГКР анализа (ЭХ-ГКР) основан на регистрации спектров молекул аналита при контролируемой величине поляризации наноструктурированной ГКР активной поверхности (ГКР подложка; ГКР активный электрод), на которой адсорбированы молекулы.

Таким образом, ЭХ-ГКР обеспечивает дополнительный контроль над величиной адсорбции, а также окислительно-восстановительным состоянием молекул аналитов (особенно в случае заряженных) вблизи ГКР подложки, что может дополнительно улучшить аналитические характеристики ГКР анализа [2]. Поэтому ЭХ-ГКР анализ традиционно использовали для исследования ЭХ реакций, процессов коррозии и их ингибирования, а также для электроспектрального изучения свойств наноструктурированных металлических поверхностей и их взаимодействия с различными молекулами [3–6].

В качестве материала для ГКР активных электродов в основном используют серебро и золото благодаря отличным усиливающим свойствам и хорошей химической стабильности [7, 8]. Однако основным ограничением таких электродов является относительно высокая стоимость изготовления и, как следствие, проведения ГКР анализа. Кроме того, юридические ограничения на использование и переработку благородных металлов могут дополнительно затруднить развитие и применение ГКР анализа в некоторых странах (в том числе в России). Поэтому медь является перспективным

материалом для изготовления ГКР активных электродов благодаря высокой доступности и экономичности [9]. Более того, при оптимальных условиях медные ГКР подложки демонстрируют сопоставимые величины усиления ГКР сигнала, что и серебряные, и более высокие величины, чем золотые подложки [10, 11].

Основным фактором, ограничивающим применимость медных ГКР подложек, являются их высокая реакционная способность и, как следствие, низкая химическая стабильность во времени [11–13]. Однако ЭХ-ГКР формат анализа позволяет остановить (предотвратить) окисление ГКР активных центров меди за счет поляризации поверхности электрода или проводить их быстрый ЭХ синтез или регенерацию [14].

Несмотря на давнюю историю ЭХ-ГКР, биохимический анализ с использованием данного подхода развит крайне слабо. Например, в ряде работ предложены методики ЭХ-ГКР детектирования мочевой кислоты в искусственной моче [15–17]. Однако ни в одной из данных методик не рассмотрено влияние других органических компонентов биожидкостей, которые могут конкурентно сорбироваться на поверхность ГКР активного электрода и приводить к возникновению интенсивного фонового ГКР сигнала или снижению интенсивности сигнала целевого аналита. Таким образом, целью настоящей работы стало изучение ГКР спектров некоторых диагностически значимых эндогенных компонентов биожидкостей человека (мочевина, креатинин, мочевая кислота, билирубин), которые также могут влиять на определение других аналитов в биожидкостях методом ЭХ-ГКР. Настоящее исследование проведено в ЭХ ячейке, оснащенной медным ГКР активным электродом. Определены оптимальные условия регистрации ГКР сигнала данных веществ.



## Материалы и методы

В работе использовали следующие реактивы: хлорид натрия (NaCl, х.ч.), соляная кислота (HCl, х.ч.), гидроксид натрия (NaOH, х.ч.), мочеви́на (ч.д.а.), креатинин (КРН, х.ч.), мочеви́ная кислота (МК, х.ч.), билирубин (БРБ, х.ч.), фольгированный текстолит с медным покрытием, графитовые электроды. В качестве электролита использовали 0.9% NaCl (физиологический раствор). Регулировку величины pH проводили добавлением растворов HCl и NaOH (1 М) в электролит. В работе использовали следующие концентрации анализов: мочеви́на – 2.5 мг/мл, КРН – 200 мкг/мл, МК – 100 мкг/мл, БРБ – 50 мкг/мл. Данные значения приблизительно соответствуют концентрациям анализов в таких биожидкостях человека, как моча и плазма крови [18, 19]. Все растворы готовили с использованием бидистиллированной воды.

ГКР спектры регистрировали с помощью портативного спектрометра комбинационного рассеяния (КР) света (QEPro, Ocean Optics, США) с длиной волны возбуждающего излучения 638 нм (18 мВт) и временем накопления сигнала 1 с. ЭХ часть исследования проведена с использованием потенциостата-гальваностата Р-40Х (Electrochemical Instruments, Россия).

ЭХ-ГКР измерения проводили в стандартной кварцевой кювете (1×1×4 см), заполненной образцом (1.5 мл), и с помещенными в нее ГКР активным медным электродом (рабочий электрод), медным псевдоэлектродом сравнения и графитовым контрэлектродом. ГКР активный электрод и псевдоэлектрод сравнения изготавливали из полоски фольгированного текстолита с медным покрытием, размещая оба электрода на одном фрагменте текстолита. Графитовый контрэлектрод содержал отверстие для пропуска возбуждающего излучения и регистрации ГКР сигнала. Для достижения ГКР активности проводили ЭХ огрубление поверхности рабочего электрода в растворе NaCl (0.9%), изменяя величину поляризации медного электрода (0 В → +0.2 В → -1.0 В → 0 В; 50 мВ/с).

Регистрацию ГКР сигнала проводили при одновременной регистрации вольт-амперных характеристик (ВАХ) рабочего электрода. Для этого проводили изменение величины поляризации рабочего электрода (50 мВ/с) в следующей последовательности: 0 В → +0.2 В → -1.0 В → 0 В. Очистку ГКР активной поверхности после измерений проводили с помощью краткосрочной отрицательной поляризации рабочего электрода (-2 В, 2 с) с последующей однократной промывкой электрода водой.

## Результаты и их обсуждение

### *Электрохимическая ячейка для ЭХ-ГКР измерений*

Изготовление и регенерацию ГКР активной поверхности рабочего электрода, а также измерение ВАХ и ЭХ-ГКР сигнала проводили в ЭХ ячейке с использованием трехэлектродной системы. Основным элементом ячейки является медный рабочий электрод, который подвергали ЭХ обработке с целью получения ГКР активных центров на его поверхности. В качестве основы электрода использовали фольгированный текстолит с медным покрытием, который имеет достаточно низкую стоимость и применяется в микроэлектронике для изготовления печатных плат. Важно, что согласно литературным данным чистота меди является не самым критическим фактором для усиления КР сигнала [20–22], что позволяет успешно использовать медь электрохимической чистоты в ЭХ-ГКР анализе. Также отличные электроизоляционные свойства текстолита позволили разместить несколько электродов (рабочий и псевдоэлектрод сравнения) на одном куске текстолита, делая ячейку максимально компактной.

### *Получение и очистка ГКР активной поверхности*

Для достижения ГКР активности в работе использовали ЭХ обработку поверхности рабочего электрода с помощью единичного цикла окисления–восстановления (ОВ цикла) материала электрода. Данный подход отличается простотой, требует минимального количества реактивов (достаточно только раствора электролита) и позволяет быстро создавать нанощероховатую поверхность с большим содержанием ГКР активных центров [8, 23].

Очистку ГКР активной поверхности рабочего электрода после завершения ЭХ-ГКР измерений осуществляли с помощью краткосрочной отрицательной поляризации электрода (-2 В, 2 с). Механизм регенерации в данном случае основан на активном выделении молекулярного водорода при потенциалах ниже -1 В, что приводит к вытеснению адсорбированных молекул с поверхности электрода (десорбции молекул аналита) [23].

В ходе работы установлено, что данный способ очистки позволяет многократно использовать ГКР-активный электрод и не приводит к существенным потерям материала электрода. Тем не менее, такой способ способствует только удалению адсорбированных молекул с поверхности электрода, но не восстанавливает ГКР активные центры, потерянные в ходе измерения ЭХ-ГКР



сигнала. Поэтому в данной работе проводили реактивацию поверхности рабочего электрода с помощью ОВ цикла через каждые 6–8 измерений ЭХ-ГКР сигнала.

*Измерение ЭХ-ГКР сигнала*

Измерение ЭХ-ГКР сигнала осуществляли путем регистрации ГКР сигнала при одновременном контролируемом изменении величины поляризации рабочего электрода в интервале от +0.2 до -1.0 В (рис. 1, а, б). Для возбуждения ГКР

сигнала в работе использовали лазер с длиной волны света 638 нм, которая позволяет достигать максимального усиления КР сигнала при использовании медных ГКР подложек, в том числе ГКР активных электродов [9]. Одновременно с ГКР измерениями проводили регистрацию ВАХ исследуемого раствора (см. рис. 1, б). Сравнение спектральной и ЭХ информации использовали для выявления ЭХ превращений исследуемых молекул и оценки их влияния на ЭХ-ГКР сигнал.

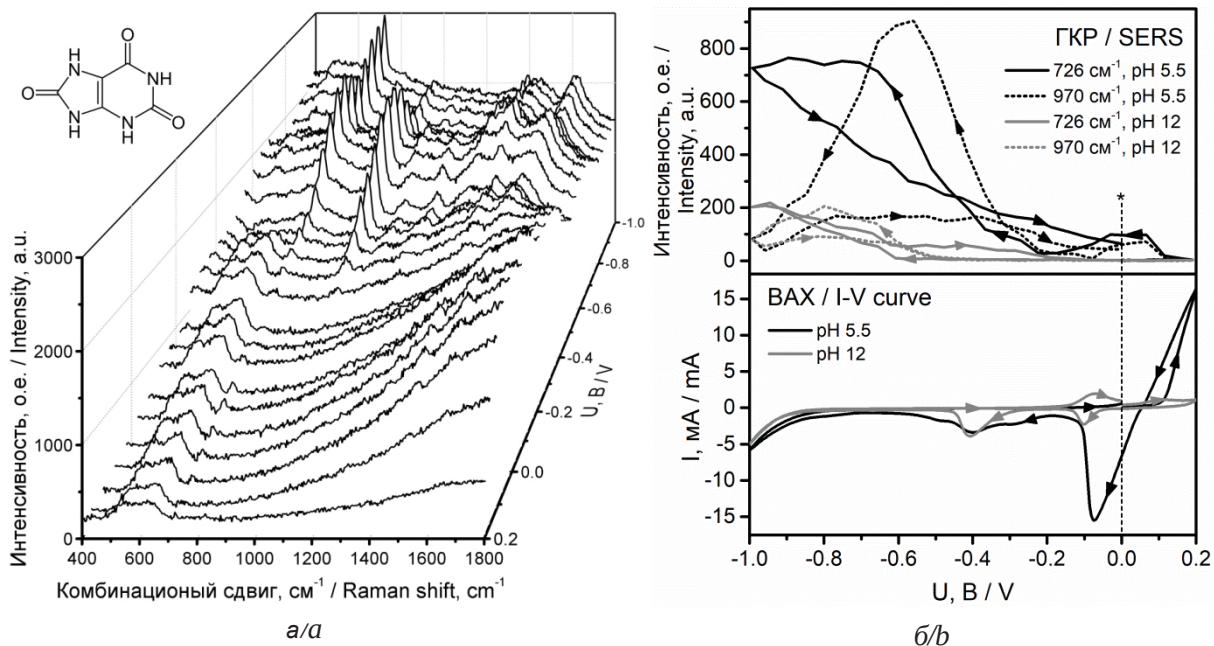


Рис. 1. ГКР спектры: а – мочевой кислоты (100 мкг/мл в 0.9% NaCl, pH 5.5), полученные при различных значениях поляризации рабочего электрода; б – влияние величины приложенного потенциала на интенсивность основных ГКР пиков мочевой кислоты (726 и 970 см<sup>-1</sup>) и силу тока в исследуемом растворе (ВАХ); момент начала поляризации отмечен \*  
 Fig. 1. SERS spectra: a – of uric acid (100 µg/mL in 0.9% NaCl, pH 5.5) obtained at various polarization values of the working electrode; b – influence of the applied potential on SERS signal intensity (726 and 970 cm<sup>-1</sup>) and current in the uric acid solution (current-voltage (I-V) curve; the start of polarization is marked by \*

На всех ВАХ, полученных в ходе исследования, наблюдаются интенсивные ЭХ процессы в диапазоне потенциалов от -0.1 до +0.2 В (см. рис. 1, в), которые соответствуют окислению (0.05–0.2 В) и восстановлению (-0.1–0.05 В) материала рабочего электрода (меди). Поэтому прохождение области положительных потенциалов (от 0 до +0.2 В) использовали для дополнительной *in situ* активации ГКР активных центров в присутствии молекул аналита. Нижняя граница величин поляризации электрода (-1.0 В) обусловлена началом побочного ЭХ процесса (восстановление атомов водорода).

Механизм возникновения и дополнительного усиления интенсивности ГКР сигнала в случае ЭХ-ГКР систем основан на двух эффектах: (i) электрофоретической экстракции молекул из

раствора и (ii) изменении положения уровня Ферми рабочего электрода. Второй эффект обусловлен усилением КР сигнала за счет изменения поляризуемости молекул при переносе заряда с ГКР подложки на молекулы. Поскольку степень (де)протонирования молекул аналитов сильно влияет на эффективность как электрофоретической экстракции, так и процесса переноса заряда, в работе изучено влияние pH среды на результаты ЭХ-ГКР анализа.

*ЭХ-ГКР детектирование мочевой кислоты*

Изучение зависимости ГКР сигнала МК от потенциала поляризации электрода и значения pH раствора аналита показало, что ГКР сигнал МК без поляризации электрода отсутствует при любых значениях pH (см. рис. 1). В нейтральной среде (pH 5.5) интенсивность основных





ГКР пиков МК возрастает при приложении отрицательного потенциала к рабочему электроду и достигает максимального значения при потенциалах ( $U_{\max}$ ), равных  $-0.7$  В ( $726 \text{ см}^{-1}$ ) и  $-0.6$  В ( $970 \text{ см}^{-1}$ ) соответственно. Следует отметить, что данные пики МК сильно перекрываются с пиками КРН, что важно учитывать при разработке методик ЭХ-ГКР определения данных веществ в смеси (например, в моче и плазме крови).

В щелочной среде (pH 12) максимальное значение ГКР сигнала наблюдается при несколько более отрицательных значениях потенциала ( $-0.8$  –  $-1$  В). Однако интенсивность ГКР сигнала в щелочной среде примерно в 4 раза ниже по сравнению с нейтральной, что предположительно связано с ухудшением адсорбции депротонированных молекул МК (анионов) на поверхности отрицательно заряженного электрода. ГКР сигнал МК в кислой среде (pH 2) зарегистрировать не удалось, в том числе при приложении потенциала (во всем исследуемом диапазоне). Отсутствие сигнала в данном случае предположительно связано с протонированием неподеленных электронных пар молекул МК, что приводит к сильному ингибированию их адсорбции на поверхности электрода.

Анализ ВАХ показал, что молекулы аналита претерпевают ЭХ превращения (пик при  $-0.2$  В; см. рис. 1, б). Важно, что данные превращения присутствуют как в нейтральной, так и кислой среде, и рост ГКР сигнала (см. рис. 1, б) совпадает с началом ЭХ реакции. Следовательно, можно предположить, что зарегистрированные ЭХ-ГКР спектры относятся именно к восстановленной форме МК и это важно учитывать при расшифровке ГКР пиков и изучении механизма усиления ГКР сигнала.

#### ЭХ-ГКР детектирование мочевины

ГКР сигнал мочевины удалось зарегистрировать только в нейтральной среде (рис. 2, а), и он наблюдается только при приложении потенциала ( $U_{\max} = -0.6$  В) (см. рис. 2, б). Несмотря на присутствие ОВ пика в интервале потенциалов, совпадающем с интервалом интенсивного ЭХ-ГКР сигнала, мочевины не обладает ЭХ активностью в данном диапазоне потенциалов. Поэтому предположили, что наблюдаемый ОВ пик обусловлен восстановлением комплекса ионов меди (II) с мочевиной, который образуется на этапе *in situ* активации рабочего электрода наряду с гидратным и хлоридным комплексами.

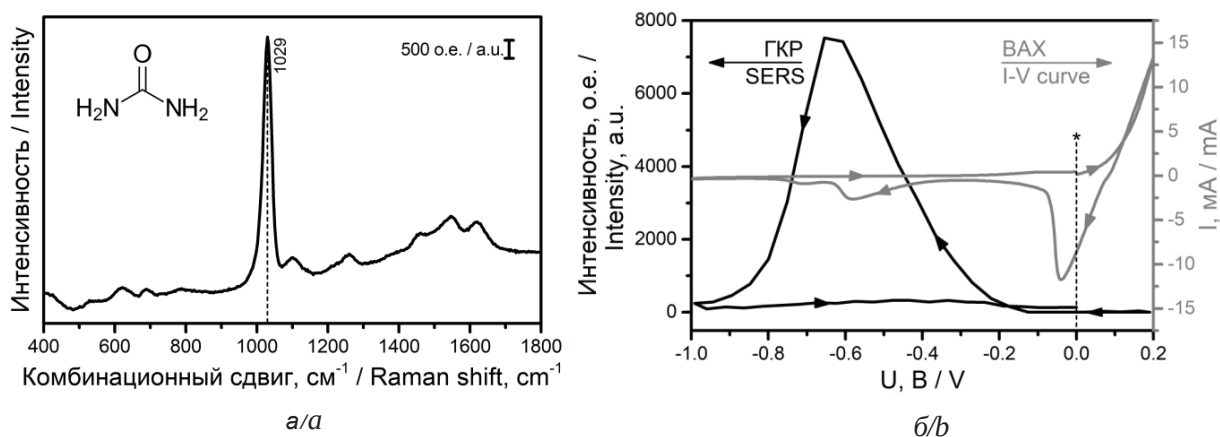


Рис. 2. ЭХ-ГКР спектр: а – раствора мочевины (2.5 мг/мл в 0.9% NaCl, pH 5.5,  $U = -0.6$  В); б – влияние величины приложенного потенциала на интенсивность ГКР пика мочевины ( $1029 \text{ см}^{-1}$ ) и силу тока в исследуемом растворе (ВАХ); момент начала поляризации отмечен \*

Fig. 2. EC-SERS spectrum: a – of urea (2.5 mg/mL in 0.9% NaCl, pH 5.5,  $U = -0.6$  V); b – influence of the applied potential on SERS signal intensity ( $1029 \text{ cm}^{-1}$ ) and current in the uric acid solution (current-voltage (*I-V*) curve); the start of polarization is marked by \*

#### ЭХ-ГКР детектирование билирубина

БРБ имеет отчетливый ГКР сигнал только в кислой среде (рис. 3, а) и интенсивность его сигнала увеличивается примерно в 3 раза при приложении потенциала ( $U_{\max} = -0.3$  В) (см. рис. 3, б). Также ГКР сигнал наблюдается и в отсутствие поляризации ГКР-активного электрода,

что свидетельствует о хорошем взаимодействии (адсорбции) молекул БРБ с медной поверхностью.

ОВ пик, предположительно соответствующий реакции восстановления БРБ на медной поверхности ( $-0.8$  В; см. рис. 3, б), находится на значительном удалении от интервала потенциалов с интенсивным ГКР сигналом ( $+0.2$  –  $-0.6$  В).

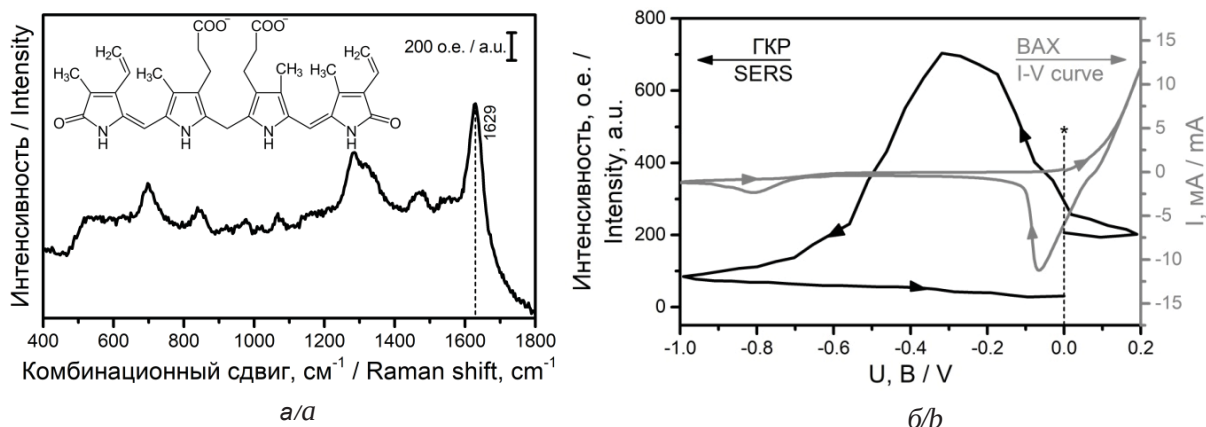


Рис. 3. ЭХ-ГКР спектр: а – раствора билирубина (50 мкг/мл в 0.9% NaCl, pH 2,  $U = -0.3$  В); б – влияние величины приложенного потенциала на интенсивность ГКР пика билирубина ( $1629\text{ см}^{-1}$ ) и силу тока в исследуемом растворе (ВАХ); момент начала поляризации отмечен \*

Fig. 3. EC-SERS spectrum: a – of bilirubin (50  $\mu\text{g/mL}$  in 0.9% NaCl, pH 2,  $U = -0.3$  V); b – influence of the applied potential on SERS signal intensity ( $1629\text{ cm}^{-1}$ ) and current in the bilirubin solution (current-voltage ( $I$ - $V$ ) curve; the start of polarization is marked by \*

Примечательно, что повторного появления и роста ГКР сигнала при прохождении интервала ГКР-активности (от  $-1.0$  до  $0$  В) не происходит. Из данных результатов можно предположить, что ЭХ восстановленная форма БРБ плохо взаимодействует с медной поверхностью и не участвует в формировании ЭХ-ГКР сигнала.

#### ЭХ-ГКР детектирование креатинина

Согласно исследованиям, проведенным нами ранее, КРН является одним из самых значимых эндогенных метаболитов, которые могут сильно влиять на точность и воспроизводимость ГКР анализа [24, 25]. КРН находится в биожидкостях в высокой концентрации и хорошо адсорбируется на поверхности ГКР подложек, что приводит к существенным конкурентным взаимодействиям, осложняющим определение других веществ. Поэтому одной из главных задач данной работы стала оценка возможности использования поляризации ГКР подложки для получения дополнительного контроля над ГКР сигналом КРН и снижения его мешающего влияния на результаты анализа.

Анализ ЭХ-ГКР результатов показал существенное отличие КРН от других изученных молекул метаболитов (рис. 4). На примере МК (в нейтральной среде), мочевины и БРБ показано, что после прохождения области потенциалов с интенсивным ГКР сигналом (от  $+0.2$  до  $-1.0$  В), повторное прохождение данной области в обратном направлении (от  $-1.0$  до  $0$  В) не приводит к возникновению сигнала. Однако КРН сохраняет существенный остаточный ГКР сигнал при из-

менении приложенного потенциала в обратном направлении (от  $-1.0$  до  $0$  В). Данный результат дополнительно подтверждает, что КРН сильно связывается с поверхностью ГКР подложек и использование поляризации ГКР активного электрода не позволяет полностью устранить его ГКР сигнал. Также значение  $U_{\text{max}}$  для КРН сильно сдвинуто в отрицательную область по сравнению с другими аналитами. Оба эти факта сыграли решающее значение при разработке универсального этапа очистки ГКР активной поверхности после анализа, который включает в себя поляризацию электрода при  $2$  В в течение  $2$  с.

Другим отличием КРН является наличие четкого ГКР сигнала при всех использованных значениях pH (при оптимальном значении поляризации ГКР активного электрода) и расположение области потенциалов с ГКР сигналом не зависит от величины pH. Однако изменение pH приводит к изменению профиля ЭХ-ГКР сигнала, и как в случае других аналитов, в щелочной среде сигнал КРН значительно слабее. Ослабление сигнала и сильные изменения профиля спектра, наблюдаемые в щелочной среде, вероятнее всего, обусловлены переходом креатинина в креатин (рис. 5, а). Известно, что равновесие данной реакции зависит от pH среды и в щелочной среде оно сдвинуто именно в сторону креатина [26]. Небольшие изменения профилей спектров в нейтральной и кислой средах (см. рис. 4, а) обусловлены равновесием протонированных и депротонированных форм

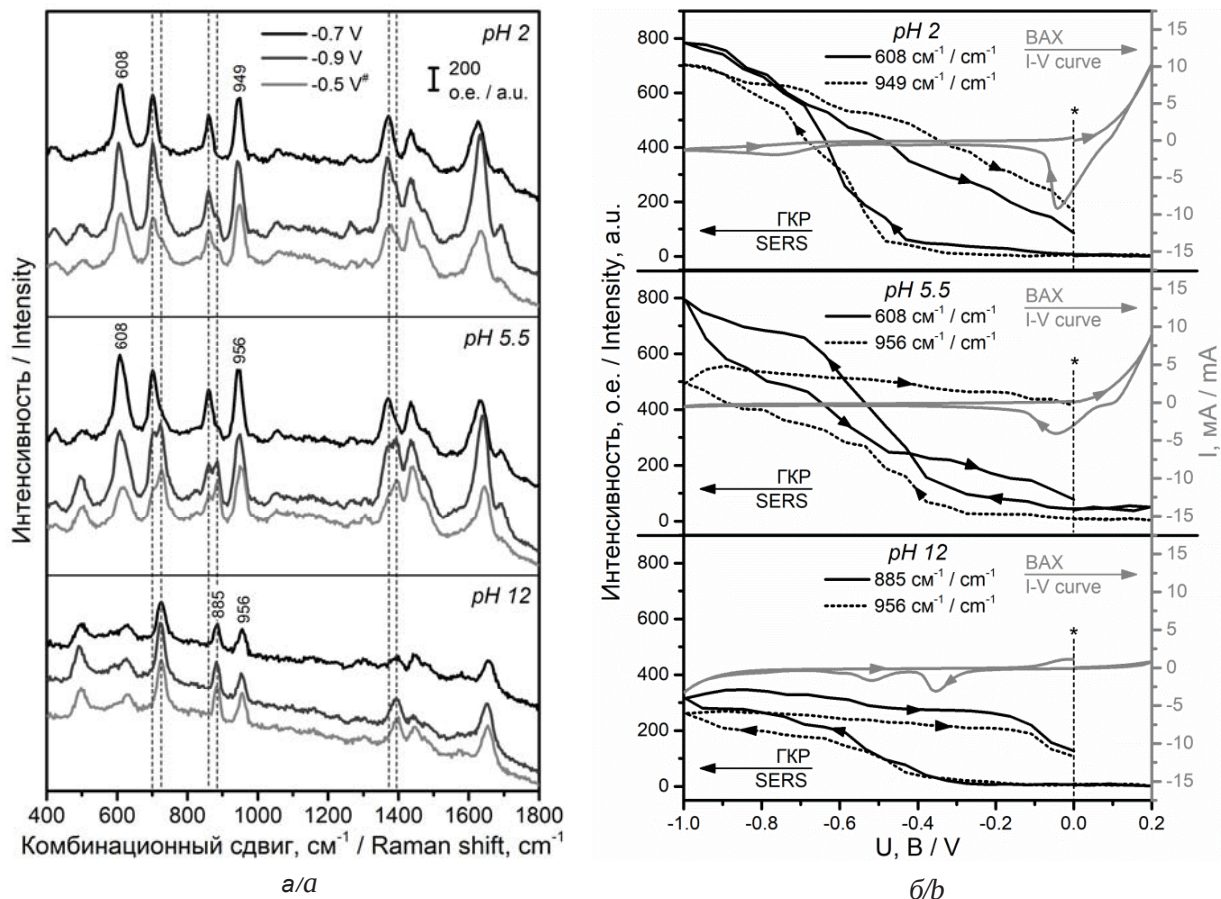


Рис. 4. ЭХ-ГКР спектры: а – раствора креатинина (200 мкг/мл в 0.9% NaCl), полученные при различных величинах pH и значениях поляризации рабочего электрода (# – значение потенциала при движении в направлении от -1.0 к 0 В); б – влияние величины приложенного потенциала и величины pH на интенсивность ГКР пиков креатинина и силы тока в исследуемом растворе (BAX); момент начала поляризации отмечен \*

Fig. 4. EC-SERS spectra: a – of creatinine (200 μg/mL in 0.9% NaCl) at different pH values and applied potential (# – potential value at changing of the electrode polarization from -1.0 to 0 V); b – influence of the applied potential and pH value on SERS signal intensity and current in the creatinine solution (current-voltage (I-V) curve); the start of polarization is marked \*

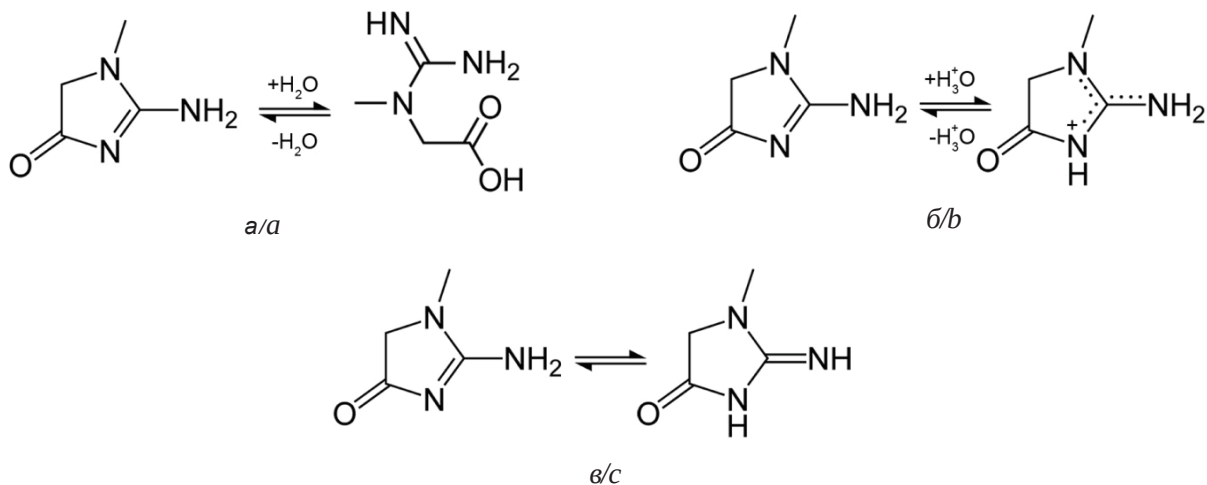


Рис. 5. Равновесные реакции, протекающие в растворах креатинина: а – гидролиз и образование креатина, б – протонирование, в – амин-иминная таутомерия

Fig. 5. Reactions taking place in the creatinine solutions: a – hydrolysis and formation of creatine, b – protonation, c – amin-imine tautomeric transformation



КРН (см. рис. 5, б). Несмотря на существование амин-иминного равновесия для КРН (см. рис. 5, в), его влиянием на профили спектров можно пренебречь, поскольку в водной среде данное равновесие сильно сдвинуто в сторону аминной формы [27, 28].

### Заключение

В ходе работы показано, что система, разработанная для проведения ЭХ-ГКР анализа, может быть адаптирована для количественного анализа рассмотренных эндогенных метаболитов в биожидкостях человека. Также использование поляризации ГКР активного электрода позволяет значительно усилить интенсивность ГКР сигнала аналитов и проводить очистку ГКР подложки. Последнее особенно важно с точки зрения создания схем, пригодных для проведения многократного и непрерывного анализа с использованием одного и того же ГКР активного электрода. Наконец применение ГКР подложки на основе меди (вместо серебра и золота) позволяет значительно снизить затраты как на создание самой установки, так и на проведение анализа.

### Список литературы

1. Fleischmann M., Hendra P. J., McQuillan A. J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode // *Chem. Phys. Lett.* 1974. Vol. 26. P. 163–166. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(74\)85388-1](https://doi.org/10.1016/0009-2614(74)85388-1)
2. Moldovan R., Vereshchagina E., Milenko K., Iacob B. C., Bodoki A.E., Falamas A., Tosa N., Muntean C. M., Farcău C., Bodoki E. Review on combining surface-enhanced Raman spectroscopy and electrochemistry for analytical applications // *Anal. Chim. Acta.* 2021. Vol. 1209. P. 339250. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339250>
3. Zaleski S., Wilson A. J., Mattei M., Chen X., Goubert G., Cardinal M. F., Willets K. A., Van Duyne R. P. Investigating nanoscale electrochemistry with surface- and tip-enhanced Raman spectroscopy // *Acc. Chem. Res.* 2016. Vol. 49. P. 2023–2030. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00327>
4. Sabanés N. M., Domke K. F. Raman under water – non-linear and nearfield approaches for electrochemical surface science // *Chem. Electro. Chem.* 2017. Vol. 4, iss. 8. P. 1814–1823. <https://doi.org/10.1002/celec.201700293>
5. Wain A. J., O'Connell M. A. Advances in surface-enhanced vibrational spectroscopy at electrochemical interfaces // *Adv. Phys.-X.* 2017. Vol. 2, iss. 1. P. 188–209. <https://doi.org/10.1080/23746149.2016.1268931>
6. Willets K. A. Probing nanoscale interfaces with electrochemical surface-enhanced Raman scattering // *Curr. Opin. Electrochem.* 2019. Vol. 13. P. 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2018.10.005>
7. Li D., Li D. W., Fossey J. S., Long Y. T. Portable surface-enhanced Raman scattering sensor for rapid detection of aniline and phenol derivatives by on-site electrostatic preconcentration // *Anal. Chem.* 2010. Vol. 82. P. 9299–9305. <https://doi.org/10.1021/ac101812x>
8. Ibáñez D., González-García M. B., Hernández-Santos D., Fanjul-Bolado P. Detection of dithiocarbamate, chloronicotyl and organophosphate pesticides by electrochemical activation of SERS features of screen-printed electrodes // *Spectrochim. Acta A.* 2021. Vol. 248. P. 119174. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119174>
9. 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. Vol. 108. P. 247–259. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.09.004>
10. Pockrand I. Raman spectroscopy of pyridine-exposed Ag, Cu and Au films in UHV. A comparative study // *Chem. Phys. Lett.* 1982. Vol. 85. P. 37–42. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(82\)83456-8](https://doi.org/10.1016/0009-2614(82)83456-8)
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. Vol. 1138. P. 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.09.016>
12. Halouzka V., Halouzková B., Jirovsky D., Hemzal D., Ondra P., Siranidi E., Kontos A.G., Falaras P., Hrbac J. Copper nanowire coated carbon fibers as efficient substrates for detecting designer drugs using SERS // *Talanta.* 2017. Vol. 165. P. 384–390. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.12.084>
13. 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. Vol. 185. P. 481. <https://doi.org/10.1007/s00604-018-3018-9>
14. Pothier N. J., Force R. K. Surface-enhanced Raman spectroscopy at a silver electrode as a real-time detector in flowing streams // *Appl. Spectrosc.* 1992. Vol. 46, iss. 1. P. 147–151. <https://doi.org/10.1366/0003702924444533>
15. Zhao L., Blackburn J., Brosseau C. L. Quantitative detection of uric acid by electrochemical-surface enhanced Raman spectroscopy using a multilayered Au/Ag substrate // *Anal. Chem.* 2015. Vol. 87, iss. 1. P. 441–447. <https://doi.org/10.1021/ac503967s>
16. Hernandez S., Perales-Rondon J. V., Heras A., Colina A. Determination of uric acid in synthetic urine by using electrochemical surface oxidation enhanced Raman scattering // *Anal. Chim. Acta.* 2019. Vol. 1085. P. 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.07.057>
17. Huang C. Y., Hsiao H. C. Integrated EC-SERS chip with uniform nanostructured EC-SERS active working electrode for rapid detection of uric acid // *Sensors.* 2020. Vol. 20, iss. 24. P. 7066. <https://doi.org/10.3390/s20247066>
18. Krebs H. A. Chemical composition of blood plasma and serum // *Annu. Rev. Biochem.* 1950. Vol. 19. P. 409–430.





19. Rose C., Parker A., Jefferson B., Cartmell E. The characterization of feces and urine: A review of the literature to inform advanced treatment technology // *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 2015. Vol. 45, iss. 17. P. 1827–1879. <https://doi.org/10.1080/10643389.2014.1000761>
20. Laufer G., Schaaf T. F., Huneke J. T. Surface enhanced Raman scattering from cyanide adsorbed on copper // *J. Chem. Phys.* 1980. Vol. 73. P. 2973–2976. <https://doi.org/10.1063/1.440428>
21. Kudelski A., Janik-Czachor M., Bukowska J., Pisarek M., Szummer A. Effect of ageing in air on morphology and surface-enhanced Raman scattering (SERS) activity of Cu-based amorphous alloys // *Mater. Sci. Eng. A.* 2002. Vol. 326. P. 364–369. [https://doi.org/10.1016/S0921-5093\(01\)01798-1](https://doi.org/10.1016/S0921-5093(01)01798-1)
22. Kudelski A., Janik-Czachor M., Pisarek M., Bukowska J., Mack P., Dolata M., Szummer A. Local characterisation of inhomogeneous Cu surfaces by surface-enhanced Raman scattering // *Surf. Sci.* 2002. Vol. 507–510. P. 441–446. [https://doi.org/10.1016/S0039-6028\(02\)01283-9](https://doi.org/10.1016/S0039-6028(02)01283-9)
23. Pothier N. J., Forcé R. K. Detection of biologically important compounds in flowing aqueous streams by surface-enhanced Raman spectroscopy at a silver electrode // *Appl. Spectrosc.* 1994. Vol. 48, iss. 4. P. 421–425. <https://doi.org/10.1366/000370294775269009>
24. Markina N. E., Goryacheva I. Yu., Markin A. V. Sample pretreatment and SERS-based detection of ceftriaxone in urine // *Anal. Bioanal. Chem.* 2018. Vol. 410. P. 2221–2227. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0888-y>
25. Markina N. E., Zakharevich A. M., Markin A. V. Determination of methotrexate in spiked human urine using SERS-active sorbent // *Anal. Bioanal. Chem.* 2020. Vol. 412. P. 7757–7766. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02932-x>
26. Gangopadhyay D., Sharma P., Singh S. K., Singh P., Tarcea N., Deckert V., Popp J., Singh R. K. Raman spectroscopic approach to monitor the *in vitro* cyclization of creatine → creatinine // *Chem. Phys. Lett.* 2015. Vol. 618. P. 225–230. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2014.11.021>
27. Craw J. S., Greatbanks S. P., Hillier I. H., Harrison M. J., Burton N. A. Solvation and solid state effects on the structure and energetics of the tautomers of creatinine // *J. Chem. Phys.* 1997. Vol. 106. P. 6612–6617. <https://doi.org/10.1063/1.473650>
28. Gao J., Hu Y., Li S., Zhang Y., Chen X. Tautomeric equilibrium of creatinine and creatininium cation in aqueous solutions explored by Raman spectroscopy and density functional theory calculations // *Chem. Phys.* 2013. Vol. 410. P. 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2012.11.002>
29. Pockrand I. Raman spectroscopy of pyridine-exposed Ag, Cu and Au films in UHV. A comparative study. *Chem. Phys. Lett.*, 1982, vol. 85, pp. 37–42. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(82\)83456-8](https://doi.org/10.1016/0009-2614(82)83456-8)
30. Moldovan R., Vereshchagina E., Milenko K., Iacob B. C., Bodoki A. E., Falamas A., Tosa N., Muntean C. M., Farcău C., Bodoki E. Review on combining surface-enhanced Raman spectroscopy and electrochemistry for analytical applications. *Anal. Chim. Acta*, 2021, vol. 1209, pp. 339250. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339250>
31. Zaleski S., Wilson A. J., Mattei M., Chen X., Goubert G., Cardinal M. F., Willets K. A., Van Duyne R. P. Investigating nanoscale electrochemistry with surface- and tip-enhanced Raman spectroscopy. *Acc. Chem. Res.*, 2016, vol. 49, pp. 2023–2030. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00327>
32. Sabanés N. M., Domke K. F. Raman under water – nonlinear and nearfield approaches for electrochemical surface science. *Chem. Electro. Chem.*, 2017, vol. 4, iss. 8, pp. 1814–1823. <https://doi.org/10.1002/celec.201700293>
33. Wain A. J., O’Connell M. A. Advances in surface-enhanced vibrational spectroscopy at electrochemical interfaces. *Adv. Phys.-X*, 2017, vol. 2, iss. 1, pp. 188–209. <https://doi.org/10.1080/23746149.2016.1268931>
34. Willets K. A. Probing nanoscale interfaces with electrochemical surface-enhanced Raman scattering. *Curr. Opin. Electrochem.*, 2019, vol. 13, pp. 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2018.10.005>
35. Li D., Li D. W., Fossey J. S., Long Y. T. Portable surface-enhanced Raman scattering sensor for rapid detection of aniline and phenol derivatives by on-site electrostatic preconcentration. *Anal. Chem.*, 2010, vol. 82, pp. 9299–9305. <https://doi.org/10.1021/ac101812x>
36. Ibáñez D., González-García M. B., Hernández-Santos D., Fanjul-Bolado P. Detection of dithiocarbamate, chloronicotiny and organophosphate pesticides by electrochemical activation of SERS features of screen-printed electrodes. *Spectrochim. Acta A*, 2021, vol. 248, pp. 119174. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119174>
37. Markin A. V., Markina N. E., Popp J., Ciolla-May D. Copper nanostructures for chemical analysis using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Trends Anal. Chem.*, 2018, vol. 108, pp. 247–259. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.09.004>
38. Pockrand I. Raman spectroscopy of pyridine-exposed Ag, Cu and Au films in UHV. A comparative study. *Chem. Phys. Lett.*, 1982, vol. 85, pp. 37–42. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(82\)83456-8](https://doi.org/10.1016/0009-2614(82)83456-8)
39. 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, vol. 1138, pp. 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.09.016>
40. Halouzka V., Halouzкова B., Jirovsky D., Hemzal D., Ondra P., Siranidi E., Kontos A.G., Falaras P., Hrbac J. Copper nanowire coated carbon fibers as efficient substrates for detecting designer drugs using SERS. *Talanta*, 2017, vol. 165, pp. 384–390. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.12.084>

## References

1. Fleischmann M., Hendra P. J., McQuillan A. J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chem.*



13. Markina N. E., Volkova E. K., Zakharevich A. M., Goryacheva I. Yu., Markin A. V. SERS detection of ceftriaxone and sulfadimethoxine using copper nanoparticles temporarily protected by porous calcium carbonate. *Microchim. Acta*, 2018, vol. 185, pp. 481. <https://doi.org/10.1007/s00604-018-3018-9>
14. Pothier N. J., Force R. K. Surface-enhanced Raman spectroscopy at a silver electrode as a real-time detector in flowing streams. *Appl. Spectrosc.*, 1992, vol. 46, iss. 1, pp. 147–151. <https://doi.org/10.1366/0003702924444533>
15. Zhao L., Blackburn J., Brosseau C. L. Quantitative detection of uric acid by electrochemical-surface enhanced Raman spectroscopy using a multilayered Au/Ag substrate. *Anal. Chem.*, 2015, vol. 87, iss. 1, pp. 441–447. <https://doi.org/10.1021/ac503967s>
16. Hernandez S., Perales-Rondon J. V., Heras A., Colina A. Determination of uric acid in synthetic urine by using electrochemical surface oxidation enhanced Raman scattering. *Anal. Chim. Acta*, 2019, vol. 1085, pp. 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.07.057>
17. Huang C. Y., Hsiao H. C. Integrated EC-SERS chip with uniform nanostructured EC-SERS active working electrode for rapid detection of uric acid. *Sensors*, 2020, vol. 20, iss. 24, pp. 7066. <https://doi.org/10.3390/s20247066>
18. Krebs H. A. Chemical composition of blood plasma and serum. *Annu. Rev. Biochem.*, 1950, vol. 19, pp. 409–430.
19. Rose C., Parker A., Jefferson B., Cartmell E. The characterization of feces and urine: a review of the literature to inform advanced treatment technology. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 2015, vol. 45, iss. 17, pp. 1827–1879. <https://doi.org/10.1080/10643389.2014.1000761>
20. Laufer G., Schaaf T. F., Huneke J. T. Surface enhanced Raman scattering from cyanide adsorbed on copper. *J. Chem. Phys.*, 1980, vol. 73, pp. 2973–2976. <https://doi.org/10.1063/1.440428>
21. Kudelski A., Janik-Czachor M., Bukowska J., Pisarek M., Szummer A. Effect of ageing in air on morphology and surface-enhanced Raman scattering (SERS) activity of Cu-based amorphous alloys. *Mater. Sci. Eng. A*, 2002, vol. 326, pp. 364–369. [https://doi.org/10.1016/S0921-5093\(01\)01798-1](https://doi.org/10.1016/S0921-5093(01)01798-1)
22. Kudelski A., Janik-Czachor M., Pisarek M., Bukowska J., Mack P., Dolata M., Szummer A. Local characterisation of inhomogeneous Cu surfaces by surface-enhanced Raman scattering. *Surf. Sci.*, 2002, vol. 507–510, pp. 441–446. [https://doi.org/10.1016/S0039-6028\(02\)01283-9](https://doi.org/10.1016/S0039-6028(02)01283-9)
23. Pothier N. J., Forcé R. K. Detection of biologically important compounds in flowing aqueous streams by surface-enhanced Raman spectroscopy at a silver electrode. *Appl. Spectrosc.*, 1994, vol. 48, iss. 4, pp. 421–425. <https://doi.org/10.1366/000370294775269009>
24. Markina N. E., Goryacheva I. Yu., Markin A. V. Sample pretreatment and SERS-based detection of ceftriaxone in urine. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2018, vol. 410, pp. 2221–2227. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0888-y>
25. Markina N. E., Zakharevich A. M., Markin A. V. Determination of methotrexate in spiked human urine using SERS-active sorbent. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2020, vol. 412, pp. 7757–7766. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02932-x>
26. Gangopadhyay D., Sharma P., Singh S. K., Singh P., Tarcea N., Deckert V., Popp J., Singh R. K. Raman spectroscopic approach to monitor the *in vitro* cyclization of creatine → creatinine. *Chem. Phys. Lett.*, 2015, vol. 618, pp. 225–230. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2014.11.021>
27. Craw J. S., Greatbanks S. P., Hillier I. H., Harrison M. J., Burton N. A. Solvation and solid state effects on the structure and energetics of the tautomers of creatinine. *J. Chem. Phys.*, 1997, vol. 106, pp. 6612–6617. <https://doi.org/10.1063/1.473650>
28. Gao J., Hu Y., Li S., Zhang Y., Chen X. Tautomeric equilibrium of creatinine and creatinium cation in aqueous solutions explored by Raman spectroscopy and density functional theory calculations. *Chem. Phys.*, 2013, vol. 410, pp. 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2012.11.002>

Поступила в редакцию 29.03.2022; одобрена после рецензирования 08.04.2022; принята к публикации 09.04.2022  
The article was submitted 29.03.2022; approved after reviewing 08.04.2022; accepted for publication 09.04.2022