

Министерство образования и науки Российской Федерации

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

Кафедра общей и неорганической химии

**СОРБЕНТЫ ДЛЯ ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ НА ОСНОВЕ
ГКР-АКТИВНЫХ МИКРОЧАСТИЦ КАРБОНАТА КАЛЬЦИЯ СО
ВСТРОЕННЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студентки II курса 251 группы
направления 04.04.01 – Химия

Института химии

Маркиной Натальи Евгеньевны

Научный руководитель
доцент, к.х.н., доцент



дата, подпись

Н.А. Бурмистрова

Заведующий кафедрой
д.х.н., профессор



дата, подпись

С.П. Муштакова

Саратов 2016

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Гигантское комбинационное рассеяние (ГКР) света благодаря своим особым свойствам (высокая интенсивность ГКР-сигнала, возможность идентификации веществ по спектрам, возможность работы с водными растворами образцов) интенсивно исследуется в качестве перспективного метода для решения задач аналитической химии и биоанализа. ГКР имеет ряд недостатков, самым существенным из которых является отсутствие селективности. Совмещение ГКР с твердофазной экстракцией (ТФЭ) позволяет не только разделять сложные смеси веществ, но также проводить концентрирование аналитов, дополнительно увеличивая чувствительность метода. Создание ГКР-активных материалов, которые можно использовать в качестве сорбентов для ТФЭ, позволяет исключить шаг элюирования и проводить анализ непосредственно в объеме сорбента сразу после экстракции. Интерес к использованию карбоната кальция в качестве ГКР-активных сорбентов обусловлен низкой стоимостью, простотой синтеза, возможностью получения композитов со встроенными наночастицами (НЧ) металлов, например, серебряными НЧ, которые придают карбонату кальция ГКР-активные свойства.

Целью данной работы явилось совмещение ГКР и ТФЭ путем создания новых ГКР-активных сорбентов на основе карбоната кальция со встроенными НЧ серебра. Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. провести критический анализ литературы в области совмещения ТФЭ со спектроскопией ГКР;
2. синтезировать ГКР-активные сорбенты на основе микрочастиц карбоната кальция со встроенными НЧ серебра, охарактеризовать их физико-химическими методами;
3. изучить сорбционные свойства полученных ГКР-активных сорбентов с использованием модельных соединений, разработать методику совмещения

ТФЭ и ГКР с использованием данных сорбентов, определить аналитические характеристики (предел обнаружения, диапазон анализируемых концентраций);

4. апробировать ГКР-активные сорбенты для анализа антибиотиков в модельных растворах и реальных объектах.

Краткая характеристика материалов исследования. Для решения поставленных в работе задач применяли комплекс физических методов исследования: спектроскопия КР, флуориметрия, спектрофотометрия, сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Объектами исследования стали нано- и микроразмерные неорганические материалы (НЧ серебра, НЧ магнетита, микроядра карбоната кальция со встроенными НЧ серебра); объектами определения методом ГКР явились родамин 6Ж (Р6Ж), трисульфоталоцианина алюминия натриевая соль «Фотосенс» (ФС), сульфадиметоксин (СДМ) и энрофлоксацин (ЭФ).

Описание структуры работы. Работа состоит из введения, трех глав, заключения, инструктажа по охране труда и технике безопасности и списка использованных источников. В тексте работы содержатся таблицы, схемы и графические иллюстрации. Общий объем работы составляет 74 страниц, включая 37 рисунков и 6 таблиц. Всего проанализировано 141 литературных источника.

Научная значимость работы:

- синтезированы новые ГКР-активные платформы на основе микроядер карбоната кальция, содержащих НЧ серебра, с возможностью встраивания НЧ магнетита и покрытия полиэлектролитной оболочкой;
- изучено влияние условий синтеза (время хранения НЧ серебра перед встраиванием в микроядра, температура высушивания сорбентов) и этапов ТФЭ на сорбционные и усиливающие ГКР-сигнал свойства;
- продемонстрировано снижение предела обнаружения минимум на один порядок (на примере Р6Ж) за счет применения комбинации ГКР с ТФЭ;

- проведено ГКР-детектирование антибиотиков (СДМ и ЭФ) в молоке на уровнях их максимально допустимых концентраций.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** кратко описана актуальность темы исследования, раскрыта научная новизна работы, ее научно-практическая значимость, а также определены основные цели и задачи.

В **первой главе** представлен критический анализ литературы, в котором рассмотрены основы метода спектроскопии ГКР, также представлены основные виды существующих ГКР-платформ с указанием их основных преимуществ и недостатков.

Отмечено, что одним из перспективных направлений развития спектроскопии ГКР является ее применение в комбинации с методами разделения и концентрирования. На данный момент имеются только отдельные публикации, посвященные совмещению ГКР с хроматографическими методами разделения (ТСХ, ВЭЖХ, ГХ), капиллярным электрофорезом. В качестве другого перспективного направления отмечено совмещение ГКР с ТФЭ путем создания ГКР-активных материалов, которые можно использовать в качестве твердофазных сорбентов, что позволит помимо концентрирования аналита, и как следствие увеличения чувствительности метода, исключить шаг элюирования и проводить анализ непосредственно в объеме сорбента.

Таким образом, по результатам анализа литературы обозначены основные направления работы – разработка материалов для совмещения спектроскопии ГКР с методами концентрирования и разделения и применение данных материалов для анализа пищевых продуктов.

Во **второй главе** приведена информация об используемых реагентах, материалах и оборудовании, методиках синтеза и модификации исследуемых ГКР-активных сорбентов, а также методиках проведения твердофазной и жидкостно-жидкостной экстракций. КР- и ГКР-спектры регистрировали с использованием конфокального микроскопа, совмещенного с лазерным КР-

спектрометром (Solar). В качестве источника возбуждения выбран твердотельный лазер 473 нм мощностью до 9 мВт.

Описано получение и характеристика НЧ серебра (рисунок 1а), которые далее встраивали в структуру микроядер карбоната кальция путем проведения синтеза ядер непосредственно в среде коллоидного раствора НЧ (рисунок 1б,в). Предложена методика покрытия синтезированных ГКР-активных микроядер слоем полиэлектролита для смены поверхностного заряда, а также показана возможность придания данным сорбентам магнитоуправляемых свойств за счет встраивания наряду с НЧ серебра НЧ магнетита.

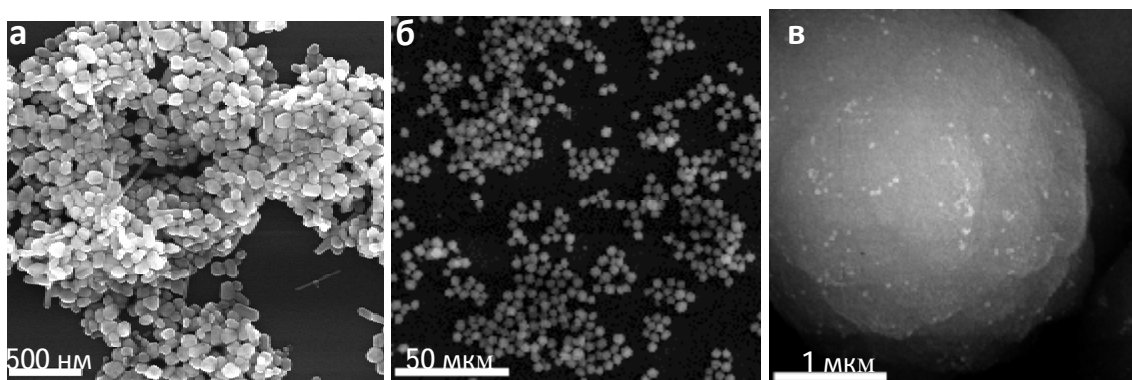


Рисунок 1 – СЭМ-изображения наночастиц серебра (а) и микрочастиц CaCO_3 со встроенными наночастицами серебра (б,в)

Для проведения ТФЭ к навеске (10 мг) синтезированного сорбента в микроцентрифужной пробирке добавляли раствор (0.5 мл) исследуемого органического вещества. После сорбции аналита и удаления его остатков центрифугированием проводили стадию растворения микроядер CaCO_3 соляной кислотой, способствующей также высвобождению аналита и НЧ серебра, со смеси которых далее производился ГКР-анализ.

Третья глава посвящена определению сорбционных, усиливающих и аналитических характеристик ГКР-активных микрочастиц карбоната кальция с использованием модельных соединений (РБЖ и ФС) и апробации синтезированных сорбентов для анализа антибиотиков (СДМ и ЭФ) в молоке.

Количественно измерены с помощью флуориметрии сорбционные свойства сорбентов. Установлено, что для сорбции РБЖ достаточно 2 минут со степенью извлечения в области 70-80%. Степень извлечения ФС на исходном

сорбенте составила порядка 35%, а использование модификации позволило увеличить степень извлечения более чем в 2 раза (до 90% при времени сорбции равным 6 мин.).

Установлено, что добавление 20 мкл соляной кислоты (5 М) способствует наиболее стабильному и достаточно интенсивному (рисунок 2а) ГКР-сигналу, частично растворяя матрицу сорбента и высвобождая НЧ и аналит (рисунок 2в) и не приводя к полному растворению микроядер (рисунок 2г) или деградации НЧ под действием высокой ионной силы (рисунок 2а).

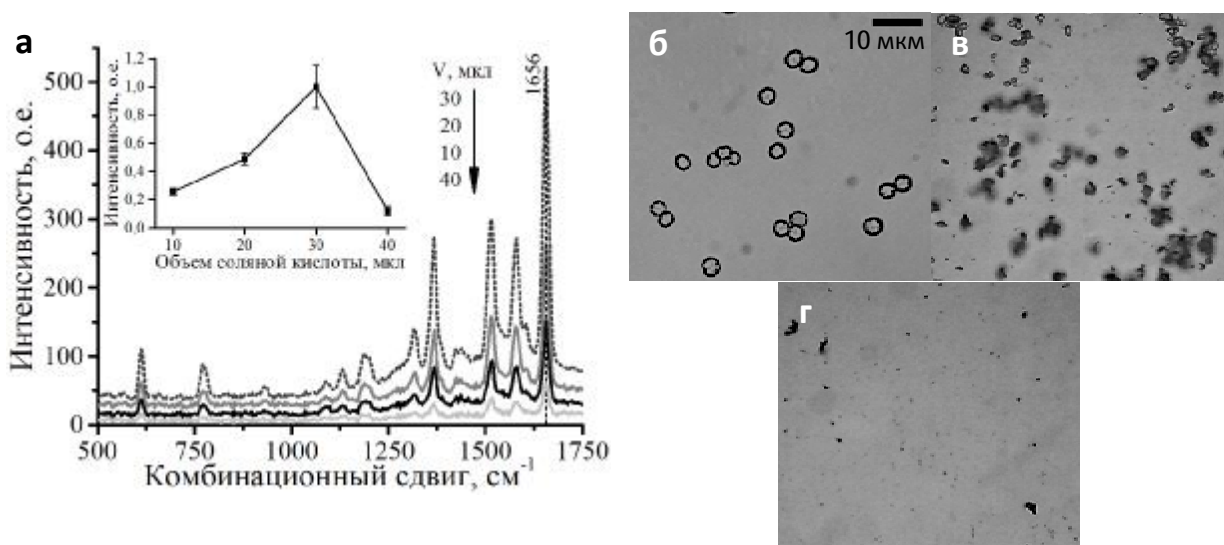


Рисунок 2 – (а) ГКР-спектры раствора Р6Ж (10^{-7} М) после его сорбции на ГКР-активном сорбенте и последующего добавления соляной кислоты (5М) (вставка: зависимость интенсивности пика Р6Ж при 1656 см^{-1} (приведены нормированные значения) от объема добавленной соляной кислоты); (б-г) фотографии микроядер карбоната кальция, полученные с использованием оптического микроскопа (800х), после добавления 5 М соляной кислоты объемом 10, 20 и 30 мкл, соответственно

Продемонстрировано влияние ионной силы на размер НЧ серебра (рисунок 3а) с использованием метода динамического рассеяния света, поскольку при растворении карбоната кальция соляной кислотой образуется CaCl_2 . Установлено, что НЧ высвобождаются из матрицы сорбента с образованием агрегатов («горячих точек»), которые дополнительно способствуют усилению КР-сигнала (рисунок 3а). Использование систем с «горячими точками» приводит к 5-кратному увеличению ГКР-сигнала (при увеличении ионной силы раствора до 10^{-2} М).

Установлено, что использование НЧ серебра (с максимумом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) в области 415 нм) в случае имеющегося КР-спектрометра с лазером 473 нм является наиболее оптимальным, поскольку максимальное усиление КР-сигнала достигается при максимальном соответствии длины волны возбуждающего света и полосы ППР ГКР-активного материала (рисунок 3б). Кроме того показано, что агрегация НЧ приводит к уширению их полосы поглощения и позволяет использовать агрегаты сферических НЧ серебра для генерации ГКР-сигнала лазером с более длинноволновым излучением (например, 633 нм).

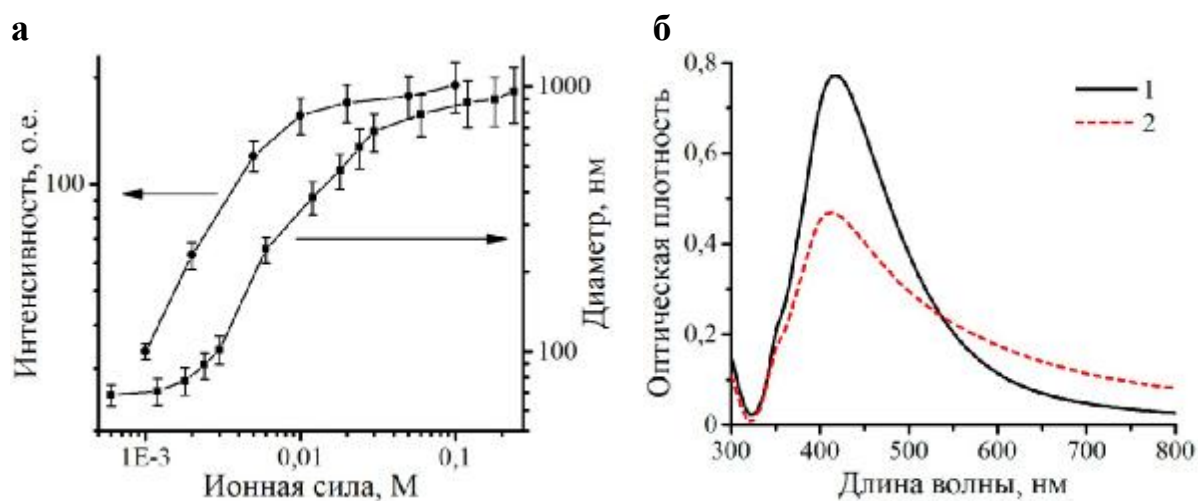


Рисунок 3 – (а) Влияние ионной силы на размер НЧ (гидродинамический диаметр) и интенсивность ГКР-сигнала РБЖ (пик 1656 см^{-1} , 10^{-7} М); (б) спектры поглощения исходных НЧ серебра (1) и агрегированных под воздействием ионной силы 0.05 М (2)

Определена оптимальная температура высушивания сорбентов (рисунок 4а). Показано, что при высушивании сорбента при 60°C обеспечивается необходимая степень извлечения аналита за счет высвобождения пор, также выбранная температура не приводит к уменьшению ГКР-сигнала аналита, поскольку известно, что при более высокой температуре (100°C) происходит температурная деградация встроенных НЧ (сплавление их в агрегаты). Также рассмотрено влияние времени хранения НЧ серебра перед встраиванием их в микроядра CaCO_3 на их усиливающие свойства (рисунок 4б). Установлено, что лучше всего встраивать в микроядра свежесинтезированные НЧ серебра, поскольку цитрат-ионы малопригодны для длительной стабилизации, и

стабилизированные ими НЧ начинают деградировать уже через несколько дней (агрегировать, снижать величину поверхностного заряда).

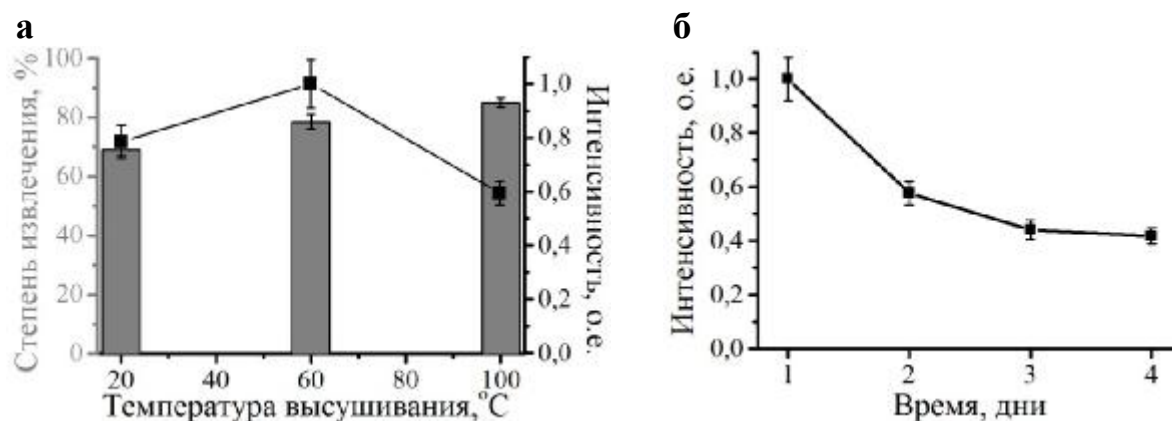


Рисунок 4 – (а) Зависимость степени извлечения и интенсивности ГКР-сигнала (пик 1656 см^{-1} , приведены нормированные значения) раствора РБЖ от температуры высушивания сорбента; (б) зависимость интенсивности ГКР-сигнала раствора РБЖ (пик 1656 см^{-1}) от времени хранения НЧ серебра перед встраиванием их в микродроза карбоната кальция (приведены нормированные значения)

Проведен ГКР-анализ модельных веществ для оценки усиливающих свойств полученных сорбентов и определения чувствительности метода. ГКР-детектирование РБЖ проведено с использованием немодифицированного сорбента и контрольного ГКР-активного материала (агрегаты НЧ серебра). Установлено, что предел обнаружения РБЖ с использованием исследуемых сорбентов ($6.1 \cdot 10^{-10}\text{ М}$) более чем на один порядок ниже по сравнению с контрольным образцом ($3.0 \cdot 10^{-8}\text{ М}$) благодаря добавлению этапа концентрирования молекул аналита сорбентом и удерживания его в матрице сорбента.

Предел обнаружения ФС с использованием модифицированного сорбента составляет $2.4 \cdot 10^{-8}\text{ М}$. Также показано, что модификация молекулами ПДДА приводит не только к увеличению сорбции путем усиления электростатического взаимодействия с аналитом (возрастание степени извлечения с 35 до 90%), но также приводит к усилению интенсивность ГКР-спектра ФС (10^{-6} М) примерно в 6 раз. При этом модификатор не вносит существенных помех в спектр ФС, поскольку пик ПДДА не перекрывается с основными пиками ФС.

Установлено, что в связи с тем, что возбуждающий лазер (473 нм) попадает в область поглощения молекул РБЖ, приводя к частичной реализации резонансного ГКР-сигнала РБЖ, и практически не поглощается молекулами ФС, предел обнаружения РБЖ по сравнению с ФС почти на два порядка ниже.

Описано применение синтезированных ГКР-активных сорбентов для определения двух видов антибиотиков в молоке (положительно заряженного СДМ и отрицательно заряженного ЭФ с использованием исходных и модифицированных микроядер, соответственно). Чтобы доказать потенциал ГКР-активных сорбентов в анализе, проведены аналогичные измерения спектрофотометрическим методом (СФМ). Результаты измерений свидетельствуют о большей чувствительности ГКР-метода по сравнению со СФМ.

Показана необходимость проведения процедуры жидкостно-жидкостной экстракции (ЖЖЭ) перед анализом молока, поскольку содержащиеся в молоке белки и жиры создают фоновый сигнал, который даже после проведения высаливания белков не позволяет регистрировать спектры антибиотиков (рисунок 5а). А после проведения ЖЖЭ любым из используемых растворителей (хлороформ, тетрахлорметан, диэтиловый эфир, этилацетат) профиль ГКР-спектра антибиотиков появляется (рисунок 5б).

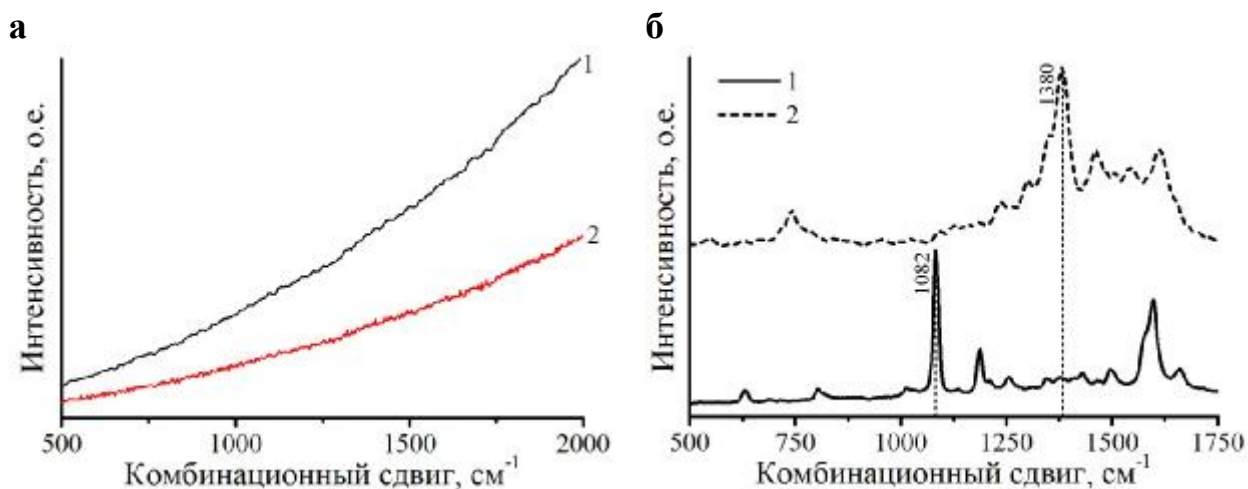


Рисунок 5 – (а) ГКР-спектры «загрязненного» антибиотиками молока до (1) и после (2) высаливания белков; (б) профили ГКР-спектров СДМ (1) и ЭФ (2) после проведения жидкостно-жидкостной экстракции хлороформом

Далее методом «введено-найдено» определена оставшаяся концентрация антибиотиков после этапов ТФЭ и ЖЖЭ по данным СФМ и ГКР, а также результаты двух параллельных экспериментов, проводимых различными методами, были сопоставлены с использованием критерия Фишера и Стьюдента (таблица 1).

Установлено, что наиболее подходящим растворителем для экстракции как СДМ, так и ЭФ является хлороформ (таблица 1). Кроме того, статистическая обработка данных также подтвердила возможность использования ГКР-метода в качестве аналитического инструмента наравне со СФМ. Однако, среднеквадратичное отклонение ГКР-метода более чем в 2 раза больше, чем в случае СФМ метода. Большая погрешность ГКР-метода объясняется не прямым детектирование аналита (в случае СФМ), а через его сорбцию на наноструктурированном объекте. Данная погрешность различается для различных ГКР-платформ, в процессе измерений ее легко определить и учитывать при интерпретации результатов.

Таблица 1 – Результаты определения антибиотиков в молоке методом «введено-найдено» после проведения жидкостно-жидкостной экстракции ($n_1=5$, $n_2=5$, $f=8$, $P=0.95$, $t_{\text{табл.}}=2.31$, $F_{\text{табл.}}=6.39$)

Растворитель для ЖЖЭ	Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл				$t_{\text{эксп.}}$	$F_{\text{эксп.}}$
		СФМ		ГКР			
		$x_{\text{ср.}} \pm \Delta x$	$s_r, \%$	$x_{\text{ср.}} \pm \Delta x$	$s_r, \%$		
Сульфадиметоксин							
Тетрахлорметан	200	87±3	3.2	91±9	7.7	1.19	6.32
Хлороформ		149±5	2.6	154±11	5.8	1.06	5.47
Диэтиловый эфир		47±2	3.0	49±4	6.4	1.11	4.73
Этилацетат		119±6	3.8	124±11	7.3	1.06	4.03
Энрофлоксацин							
Тетрахлорметан	10	2.7±0.1	3.9	2.9±0.3	8.9	1.32	5.81
Хлороформ		8.3±0.3	2.5	8.6±0.6	5.8	1.24	6.02
Диэтиловый эфир		3.1±0.1	3.3	3.2±0.3	7.2	0.81	4.93
Этилацетат		8.0±0.3	3.0	8.1±0.7	6.5	0.61	4.96

Найдены пределы обнаружения исследуемых антибиотиков в молоке ГКР-методом с использованием синтезированных сорбентов. Предел

обнаружения ЭФ составляет 0.08 мкг/мл, что ниже максимально допустимой концентрации (0.1 мкг/мл^{*}). Однако предел обнаружения СДМ (0.17 мкг/мл) превышает допустимый предел (0.025 мкг/мл^{*}), следовательно, исследуемые ГКР-платформы могут быть использованы только для предварительного определения содержания данного антибиотика в молоке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработана методика синтеза ГКР-активных микрочастиц карбоната кальция со встроенными НЧ серебра и методика покрытия синтезированных ГКР-активных микроядер слоем полиэлектrolита для смены поверхностного заряда. Продемонстрирована возможность придания данным сорбентам магнитоуправляемых свойств за счет встраивания наряду с НЧ серебра НЧ магнетита.

2. Изучены сорбционные характеристики полученных сорбентов на примере извлечения модельных веществ (ФС и РБЖ). Показано, что модификация ГКР-активных сорбентов молекулами катионного полиэлектrolита приводит к увеличению (более чем в 2 раза) селективности концентрирования анионного аналита ФС из пробы. Определены оптимальные параметры растворения сорбента. Показаны преимущества высвобождения агрегатов НЧ серебра с точки зрения увеличения интенсивности ГКР-сигнала (на примере РБЖ) и возможности ГКР-детектирования более длинноволновыми лазерами за счет уширения ППП. Продемонстрировано влияние температуры высушивания на сорбционные и усиливающие свойства, а также влияние старения НЧ серебра на сигнал ГКР.

3. Синтезированные ГКР-активные сорбенты использовали для одновременного проведения твердофазной экстракции и детектирования

* Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю). М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. 707 с.

спектров ГКР аналитов непосредственно в объеме сорбента. Представлены преимущества предложенной комбинации: простота подготовки сорбента, исключение процедуры элюирования, одновременное извлечение и обнаружение, а также возможность снижения предела обнаружения минимум на один порядок (на примере РБЖ).

4. Разработана методика жидкостно-жидкостной экстракции антибиотиков из молока различными неполярными растворителями перед ГКР-анализом для устранения фонового сигнала от компонентов молока. Показано, что совмещение ТФЭ и ГКР, в отличие от спектрофотометрии, позволяет детектировать антибиотики (сульфадиметоксин и энрофлоксацин) в молоке на уровне максимально допустимых концентраций, указанных в нормативных документах.