

БИОФИЗИКА И МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА

Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2025. Т. 25, вып. 2. С. 189–200

Izvestiya of Saratov University. Physics, 2025, vol. 25, iss. 2, pp. 189–200

<https://fizika.sgu.ru> <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2025-25-2-189-200>, EDN: LPRHUT

Научная статья
УДК 535.243.1:004.89

Детектирование глюкозы с помощью ГКР-подложек и машинного обучения

В. А. Бакал, О. И. Гуслякова, Е. С. Приходженко[✉]

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

Бакал Виктория Александровна, лаборант лаборатории «Дистанционно управляемые системы для тераностики», bakalviktoriaa@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0008-6956-6762>

Гуслякова Ольга Игоревна, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории «Биомедицинская фотоакустика», olga.gusliakova17@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8387-0711>

Приходженко Екатерина Сергеевна, кандидат физико-математических наук, доцент кафедры инновации, prikhozhdenkoes@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2700-168X>

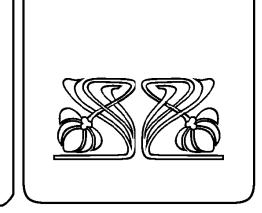
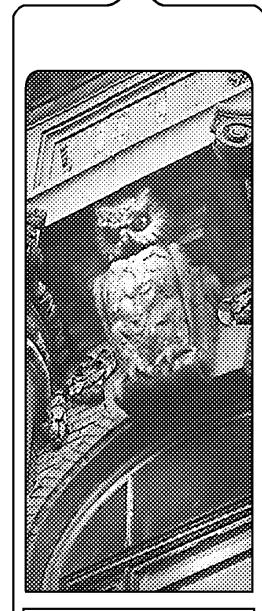
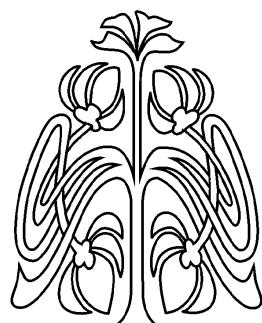
Аннотация. Оптические методы определения концентрации глюкозы в растворах являются предметом повышенного интереса благодаря их потенциальной экономичности, портативности и низкой инвазивности. Непосредственное обнаружение глюкозы с использованием гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) осложнено слабой адсорбцией глюкозы на металлических поверхностях и малым сечением её рассеяния. В настоящей работе реализована стратегия ферментативного определения концентрации глюкозы с помощью ГКР-подложек и машинного обучения, способная обеспечить высокую чувствительность. Были разработаны сенсоры на основе нетканого материала из поликарбоната и фильтровальной бумаги с восстановленными агрегатами серебряных наночастиц на поверхности. Для нетканого материала поликарбоната дополнительно проводилась процедура минерализации. Было определено оптимальное количество циклов (три) выращивания микрочастиц ватерита на поверхности. Увеличение количества циклов последовательной модификации поверхности поликарбоната микрочастицами ватерита позволяет получить более однородное заращивание, что наблюдалось на изображениях, даваемого сканирующим электронным микроскопом. Был произведен подбор оптимальных концентраций нитрата серебра и гидрата аммиака, используемых для модификации поверхности подложек серебряными наночастицами: 5 моль/л для поликарбоната, 2 моль/л для фильтровальной бумаги. Для всех типов сенсоров обучались модели классификации на основе случайного леса. Наиболее точной моделью при определении глюкозы в концентрации 1 ммоль/л оказался образец поликарбоната с тремя последовательными модификациями ватеритом и с серебряными наночастицами, восстановленными из растворов нитрата серебра и гидрата аммиака в концентрации 5 моль/л.

Ключевые слова: сенсор глюкозы, ГКР-спектроскопия, серебряное покрытие, машинное обучение, «случайный лес»

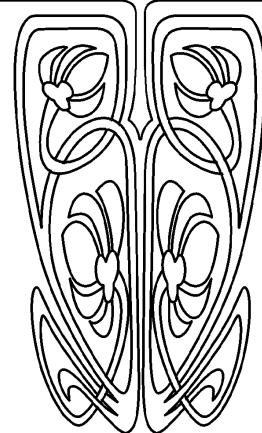
Благодарности: Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-79-10270 «Носимые сенсорные устройства на основе гибких подложек для детекции метаболитов и маркеров социально значимых заболеваний в биологических жидкостях», <https://rsrf.ru/project/22-79-10270/>).

Для цитирования: Бакал В. А., Гуслякова О. И., Приходженко Е. С. Детектирование глюкозы с помощью ГКР-подложек и машинного обучения // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2025. Т. 25, вып. 2. С. 189–200. <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2025-25-2-189-200>, EDN: LPRHUT

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



НАУЧНЫЙ
ОТДЕЛ



Article

Sensing using SERS-substrate and machine learning approaches

V. A. Bakal, O. I. Gusliakova, E. S. Prikhzhdenko[✉]

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

Victoria A. Bakal, bakalviktoriaa@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0008-6956-6762>

Olga I. Gusliakova, gusliakova17@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8387-0711>

Ekaterina S. Prikhzhdenko, prikzhdenkoes@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2700-168X>

Abstract. Background and Objectives: Accurate and duly determination of glucose levels is critical for the diagnosis and control of diabetes. Recently, optical methods for glucose determination have become the subject of increased interest due to their potential cost-effectiveness, portability, and low invasiveness. Raman spectroscopy coupled with surface-enhanced Raman scattering (SERS) substrates demonstrates outstanding sensitivity through signal amplification and high specificity due to the unique vibrational spectra of target molecules. However, direct detection of glucose using SERS is complicated by the weak adsorption of glucose on metal surfaces and its low scattering cross section. **Materials and Methods:** Glucose sensors were constructed on the basis of polycaprolactone (PCL) scaffolds which have been modified using vaterite microparticles or filter paper (FP), both of which were then decorated with silver nanoparticle aggregates. The surface of the created substrates was assessed using scanning electron microscopy (SEM) on a MIRA II (Tescan, Czech Republic). To make the sensors specific for glucose detection, they were coated with a layer of glucose oxidase (GOx). To analyze the SERS spectra obtained as a result of measurements of aqueous solutions of glucose with various concentrations on sensors, classification models developed using the ensemble method RandomForestClassifier were used. Confusion matrices were obtained to assess the ratio of truly classified spectra. **Results:** Carrying out three cycles of modifying the surface of PCL fibers with microparticles of calcium carbonate leads to uniform overgrowth of the entire treated area. Additional immobilization of glucose oxidase (GOx) onto the surface of a matrix of PCL fibers with grown vaterite particles and a reduced layer of silver aggregates has provided selectivity for glucose detection when examining samples using SERS spectroscopy. The highest sensitivity in determining low glucose concentrations (1 mM) has been obtained for substrates with three sequential modifications of PCL fibers with vaterite and the reduction of aggregates of Ag nanoparticles from 5 M solutions of silver nitrate and ammonia hydrate with overall accuracy of 92.2%. Filter paper was considered as an alternative to using PCL-based scaffold. The reduction of silver was carried out without vaterite particles growth by varying the concentration of the reagents used (AgNO_3 , $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Sensors based on filter paper after the reduction of silver on the surface from salt solutions with concentrations of 2 M have shown overall accuracy of 90.2% and the ratio of truly classified 1 mM glucose solution of 88%. **Conclusion:** Increasing the number of cycles of sequential modification of the polycaprolactone surface with vaterite microparticles makes it possible to obtain a more uniform overgrowth, which was observed in SEM images, and, as a consequence, greater ratio of truly classified spectra at lower glucose concentrations. The PCL-based sensor (PCL/ CaCO_3)₃/Ag (5 M) have outperformed FP/Ag (2 M) both with overall accuracy of classification (92.2% versus 90.2%) and 100% of truly classified spectra of 1 mM glucose solution.

Keywords: glucose sensor, SERS spectroscopy, silver coating, machine learning, random forest

Acknowledgements: This study was supported by the Russian Science Foundation (project No. 22-79-10270 "Wearable sensor devices based on flexible substrates for detection of metabolites and markers of socially significant diseases in biological fluids", <https://rsrf.ru/project/22-79-10270/>).

For citation: Bakal V. A., Gusliakova O. I., Prikhzhdenko E. S. Sensing using SERS-substrate and machine learning approaches. *Izvestiya of Saratov University. Physics*, 2025, vol. 25, iss. 2, pp. 189–200 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2025-25-2-189-200>, EDN: LPRHUT

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

Введение

Обнаружение и точное определение глюкозы в биологических жидкостях имеет жизненно важное значение для диагностики, лечения и мониторинга диабета. Современное лечение диабета состоит из саморегуляции уровня глюкозы в крови посредством частого мониторинга и сочетания диеты, лекарств и инъекций инсулина, в зависимости от типа диабета. Большинство пациентов измеряют уровень глюкозы путем взятия небольших образцов крови «из пальца» с помощью специального устройства с последующим непрямым электрохимическим определением перекиси водорода, образующейся в результате ферментативного окисления глюкозы глюкозоок-

сидазой [1]. Отбор проб таким способом является одновременно болезненным и неудобным. В результате многие пациенты избегают своевременного проведения теста и не могут адекватно контролировать уровень глюкозы, рискуя получить вторичные осложнения. В настящее время электрохимическое обнаружение является наиболее точной технологией, доступной для регулярного использования. Более быстрый, простой и менее болезненный метод частого измерения уровня глюкозы принесет большую индивидуальную, клиническую и общественную пользу.

Оптические подходы к определению глюкозы в последние годы привлекли большое внимание из-за относительно низкой стоимости, портативности и малой инвазивности или неин-



вазивности. Применяемая нами спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) в сочетании с ГКР-подложками обеспечивают чрезвычайно высокую чувствительность благодаря, во-первых, усилинию сигналов и, во-вторых, специфичности уникальных спектров вибрационных связей анализируемых молекул. Однако прямое обнаружение глюкозы с помощью ГКР-подложек затруднено из-за плохой адсорбции глюкозы на чистую поверхность металлов и малого попреречного сечения рассеяния глюкозы [2]. В силу этого возникающее в результате комбинационное излучение глюкозы легко перекрывается сильными фоновыми шумами окружающей среды [3]. Для решения этих проблем нами было предложено и использовано несколько подходов к обнаружению глюкозы с помощью спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР-спектроскопии).

При прямом обнаружении (без химического взаимодействия) без использования метки получаются спектры комбинационного рассеяния света с пиками «отпечатков пальцев», уникальными для анализа (например, глюкозы). Разработка эффективных плазмонных материалов с улучшенными горячими точками или оптимизация техники комбинационного рассеяния света, которые могли бы увеличить коэффициент усиления, а, следовательно, сигналы комбинационного рассеяния глюкозы для ее непосредственной детекции, являются самыми простыми стратегиями. В работе [4] исследовали сборку наночастиц ядро/оболочка Au@SiO_2 в качестве ГКР-подложек для успешного обнаружения глюкозы. Концентрации глюкозы были оценены в полосах 935 и 1345 см^{-1} и продемонстрировали возможность детекции в достаточно широком диапазоне (10^{-13} – 10^{-12} моль/л; в дальнейшем значение молярной концентрации для упрощения записи будем снабжать символом М). Другая стратегия прямого обнаружения направлена на увеличение сродства связывания глюкозы с ГКР-подложками, уменьшение расстояния между глюкозой и поверхностью и, соответственно, увеличение ГКР-сигналов. Был предложен и исследован разделительный слой на поверхности подложек для концентрирования молекул глюкозы в тонком слое активной области ГКР [1]. Почти во всех исследованиях по обнаружению глюкозы на основе ГКР с помощью прямого обнаружения не участвуют никакие химические взаимодействия.

В методах непрямого обнаружения используется ГКР-«зондовая» молекула, связанная

с плазмонной поверхностью, которая химически реагирует или взаимодействует с интересующим аналитом. Химические изменения молекул-зондов, вызванные аналитом, приводят к измеримым различиям в сигналах комбинационного рассеяния света для некоторых или всех колебательных мод. Анализ глюкозы приводит к взаимодействию с молекулой-меткой и образованию их комплекса, что ведет к соответствующему изменению сигналов комбинационного рассеяния света.

Известны два общих метода непрямого обнаружения глюкозы. В одном из них при нанесении функционализированной поверхности распознавающих молекул на основе бороновой кислоты глюкоза обратимо образует боронатный эфир и захватывается на поверхности. Таким образом, молекулы бороновой кислоты используются как в качестве структур распознавания глюкозы, так и в качестве активных молекул комбинационного рассеяния света. 4-Меркаптофенилбороновая кислота (4-MPBA) является наиболее популярной бороновой кислотой для определения глюкозы методом ГКР, возможно, из-за ее сильной способности связываться как с металлической поверхностью, так и с глюкозой. В различных исследованиях представлены подложки, функционализированные 4-MPBA, позволяющие увеличить сигнал комбинационного рассеяния света глюкозы [5–7].

Другой подход – использование ферментативных реакций, в которых продукт (например, перекись водорода) влияет на ГКР сигналы зондов. Например, образование перекиси водорода превращало молекулу-зонд в ГКР детектируемый продукт, что было отражено в полученных спектрах и способствовало эффективному мониторингу глюкозы [8]. Исследователи также изучали ферментативные реакции травления Ag-подложек, которые изменяли ГКР сигналы зонда при различных концентрациях глюкозы [9].

Большой успех был достигнут при использовании ГКР-подложек для чувствительного и специфического обнаружения глюкозы. Для получения ГКР-сигнала от молекулы глюкозы могут быть использованы как прямые, так и непрямые стратегии зондирования. Популярное в первые годы прямое распознавание глюкозы было реализовано посредством разработки более эффективных плазмонных субстратов [10], методов, повышающих эффективность комбинационного рассеяния света [11], или с помощью стратегии функционализированного разделительного

слоя [12]. Получающиеся в результате сигналы комбинационного рассеяния глюкозы обычно слабы и легко перекрываются сильными фоновыми шумами окружающей среды. Этой стратегии обычно не хватает селективности по отношению к другим сахарам и чувствительности. Эти проблемы можно решить с помощью стратегии непрямого обнаружения, в которой используется ГКР активный зонд [13, 14]. Взаимодействие зонд-аналит приводит к заметным изменениям сигнала комбинационного рассеяния света. Подводя итог, можно сказать, что бороновая кислота и ферментативные реакции являются двумя популярными жизнеспособными стратегиями. Метод непрямой детекции может быть дополнительно улучшен за счет использования биомолекулярного распознавания для избирательного обнаружения.

Несмотря на значительный прогресс в области изготовления сенсоров глюкозы, основанных на анализе ГКР спектров образцов, разработка надежной, высокоселективной и высокочувствительной сенсорной технологии остается важной задаче, над которой работают многие научные группы, разрабатываются подходы для минимально инвазивного, биологически совместимого и количественного определения глюкозы. В качестве основы для сенсора могут выступать нетканые материалы, например поликапролактон (ПКЛ). ПКЛ, линейный синтетический биоразлагаемый алифатический полиэфир, относительно дешев, а его способность принимать различные формы отличает его от других биоматериалов, используемых при разработке каркасов [15]. Он обладает превосходной термической стабильностью и одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (США) в качестве полиэфира, пригодного для применения в биомедицине [16].

Нередко для анализа данных спектроскопии КР и ГКР требуется применение техник машинного обучения. В частности, в случае проведения исследования с аналитами разной концентрации или определения наличия определенного компонента в смеси требуется обучение моделей классификации или регрессии [17]. Выбор модели определяется поставленной задачей в зависимости от того, необходимо ли проводить различие между несколькими классами или есть необходимость в построении калибровочной прямой по известным концентрациям аналита для последующего определения неизвестной концентрации. Также стоит различать

простые, одиночные оценщики (такие, как метод опорных векторов [18,19]) и ансамблевые модели [17]. Для последних характерно объединение нескольких одиночных оценщиков для решения одной задачи. Ансамблевые модели различают по координации одиночных оценщиков: параллельной или последовательной их работе; а также по природе используемых одиночных оценщиков: одинаковые или разные оценщики входят в ансамблевую модель.

Целью настоящей работы явилось увеличение точности определения концентрации глюкозы в растворе с помощью ГКР спектроскопии и последующего анализа получаемых спектров методами машинного обучения. В качестве сенсоров были рассмотрены нетканый материал из ПКЛ и фильтровальная бумага, дополнительно модифицированные серебряными наночастицами для усиления ГКР сигнала. Для придания специфичности к определению глюкозы получаемые подложки покрывали глюкозооксидазой (GOx). Анализ ГКР спектров, полученных при измерении водных растворов глюкозы разных концентраций, нанесенных на изучаемые сенсоры, был осуществлен с использованием ансамблевой модели классификации «случайный лес», основанной на параллельной работе одиночных деревьев принятия решений.

Материалы и методы

Получение нетканого материала на основе поликапролактона. В качестве основы для разрабатываемых сенсорных структур использовались нетканые материалы из поликапролактона (ПКЛ), а также фильтровальная бумага (ФБ). Для получения нетканого материала был приготовлен раствор ПКЛ (80 кДа, 9.4 массо-объемных%) в смеси дихлорметана и диметилформамида (массовое отношение 77:23), итоговую смесь перемешивали в течение 3 часов. Полученный раствор набирали в шприц и размещали в экспериментальной установке для электроформования. Скорость подачи раствора составляла 0.5 мл/ч, расстояние между электродами 25 см, ускоряющее напряжение 20 кВ.

Модификация ватерита нетканого материала на основе поликапролактона. Части нетканого материала, выполненного из поликапролактона, в первую очередь были модифицированы микронными частицами карбоната кальция в модификации ватерита для придания большей



гидрофильности, получения более развитой поверхности и обеспечения возможности иммобилизации различных агентов (серебряные/золотые наночастицы, глюкозооксидаза). Для этого были использованы эквимолярные (0.33 М) соли хлорида кальция (CaCl_2) и карбоната натрия (Na_2CO_3). Методика выращивания микронных частиц ватерита на волокнах нетканого материала аналогична описанной в работе [20] и заключается в размещении нетканого материала в одной из солей и последующего добавления другой соли. В объеме раствора начинает протекать процесс зародышеобразования и последующего созревания частиц ватерита, в том числе и на волокнах размещенного в растворе нетканого материала. Длительность выдерживания модифицируемого материала составляла 30 секунд, после чего осуществлялась промывка дважды путем погружения нетканого материала в деионизованную воду. На последнем этапе обрабатываемый материал помещали в этиловый спирт (99.9%), а затем сушили в сушильном шкафу при 40°C в течение 30 мин. Таким образом, были приготовлены образцы прошедшие однократную, двукратную и трехкратную процедуру модификации волокон ватеритом: ПКЛ/ $(\text{CaCO}_3)_1$, ПКЛ/ $(\text{CaCO}_3)_2$, ПКЛ/ $(\text{CaCO}_3)_3$. Процедуру покрытия подложек вторым и третьим слоем CaCO_3 проводили после полного высыхания.

Восстановление агрегатов серебряных наночастиц на поверхности волокон ПКЛ + CaCO_3 по реакции серебряного зеркала. Процедура восстановления агрегатов наночастиц серебра проводилась аналогично описанному ранее [21]. Образец ПКЛ/ $(\text{CaCO}_3)_n$ погружали в 1 мл раствора AgNO_3 на 5 мин в ультразвуковой ванне, затем приливали эквимолярный раствор $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$. После 30 с воздействия реакционную смесь удаляли, подложки промывали два раза деионизированной водой. В качестве восстановителя в реакции «серебряного зеркала» использовался водный раствор аскорбиновой кислоты (0.5 М, 2 мл), который добавлялся к реакционной смеси на 1 мин. Ионы Ag^+ восстанавливаются до металлического серебра из-за присутствия альдегидной группы в аскорбиновой кислоте. Полученные образцы вынимали, дважды промывали деионизированной водой и один раз этиловым спиртом, сушили в сушильном шкафу при 40°C в течение 30 мин. В серии было две молярности компонентов реакции (AgNO_3 , $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$): 1 М, 5 М. Таким образом, в ходе

эксперимента было получено 6 типов образцов с использованием двух молярностей AgNO_3 , $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ и одной, двумя и тремя модификациями поверхности волокон микрочастицами ватерита.

Восстановление агрегатов серебряных наночастиц на поверхности волокон фильтровальной бумаги. В данной части работы использовали методику восстановления агрегатов серебряных наночастиц на поверхности волокон, указанную выше, но с применением других концентраций нитрата серебра и гидроксида аммония: 1 М, 2 М и 3 М.

Иммобилизация глюкозоксидазы на поверхность разрабатываемых сенсоров. Для придания специфичности к определению глюкозы, получаемые подложки покрывали глюкозооксидазой (GOx). Образцы ПКЛ/ $(\text{CaCO}_3)_n$ /Ag(x М) и ФБ/Ag(y М), где x и y – концентрация AgNO_3 , $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$, размером 5×8 мм помещали на предметное стекло. По 30 мкл водного раствора GOx (1 мг/мл) добавляли на каждый образец. В этом случае раствор фермента полностью покрывал образцы подложек. Подготовленные таким образом подложки сушили при температуре 36°C. На подготовленных таким образом подложках проводили измерения ГКР-сигнала глюкозы (водные растворы, 1 мМ, 2 мМ и 5 мМ).

Сканирующая электронная микроскопия. Характеризация поверхности полученных подложек проводилась с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на микроскопе MIRA II (Tescan, Чехия) с использованием детектора обратно-отраженных электронов. В отличие от детектора вторичных электронов, детектор обратно-отраженных электронов позволяет видеть тяжелые элементы более яркими, и агрегаты серебряных частиц (белые скопления) лучше контрастируют с волокнами ПКЛ и ФБ (темно-серые нити) и видны на поверхности микрочастиц ватерита.

Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния. Измерение спектров гигантского комбинационного рассеяния проводилось на приборе Renishaw inVia (Renishaw, Великобритания). Для данных подложек использовался лазер 532 нм, объектив 50×/0.5 N.A. Для каждого типа подложек регистрировалась карта 10×10 точек с шагом 1 мкм, время накопления сигнала 5 с на спектр, мощность лазера 0.05% (15 мкВт на образце). Были приготовлены водные растворы глюкозы в концентрациях 1 мМ, 2 мМ и 5 мМ. По 1 мкл раствора глюкозы каждой концентрации добавляли на подложку. Проводились измерения для



следующих образцов: подложка $\text{ПКЛ}/(\text{CaCO}_3)_n/\text{Ag}(x \text{ M})$ или $\text{ФБ}/\text{Ag}(y \text{ M})$, подложка + GOx , подложка + GOx + глюкоза (1, 2 и 5 мМ). Регистрация спектров и предварительная обработка проводились с применением программного обеспечения (ПО) Renishaw WiRE с использованием инструментов Cosmic Ray Removal (для удаления случайно возникающих узких и интенсивных выбросов) и Subtract Baseline (для удаления полиномиального фона, аппроксимация проводилась с использованием полинома 4 степени). Далее обработка и анализ данных проводился в среде Jupyter Notebook на языке Python 3. Загрузка данных проводилась с помощью WDFReader из пакета renishawWiRE. Для анализа данных строились модели классификации с помощью ансамблевого метода RandomForestClassifier из библиотеки scikit learn. Для анализа данные делились на обучающую (train) и проверочную (test) выборки в соотношении 80 : 20 с помощью train_test_split, количество оптимальных деревьев решений в случайному лесе подбиралось с помощью решетчатого поиска (GridSearchCV) из sklearn.model_selection. Визуализация результата анализа проводилась с помощью seaborn.heatmap матрицы неточностей (confusion_matrix) для проверочной выборки данных. Для подложек обучалось 2 модели классификации: бинарная между подложкой и всеми остальными спектрами, характеризуемыми добавлением GOx ; многоклассовая между подложками с GOx в зависимости от концентрации водного раствора глюкозы: 0, 1, 2, 5 мМ. Для всех моделей определялась точность классификации методом accuracy_score.

Результаты и их обсуждение

В качестве основы для получения ГКР-подложек использовался нетканый материал ПКЛ. Такой тип подложки обладает гибкостью, ему с легкостью можно придать желаемую геометрию. Данные характеристики являются неоспоримыми достоинствами при разработке биологических сенсоров, которые планируются применять в тесном контакте живыми объектами, в том числе при создании «носимых» сенсоров. Однако, получаемый нетканый материал достаточно гидрофобен. Поэтому для придания большей гидрофильтрности данному материалу проводилась процедура минерализации его поверхности микрочастицами карбоната кальция. Методика выращивания микронных частиц ватерита на волокнах ПКЛ нетканого материала

продемонстрированная в работе [20] открывает возможность для дальнейшей модификации поверхности благодаря пористой структуре новообразованных поликристаллов ватерита.

На первом этапе работы был произведен подбор оптимальных концентраций используемых для модификации реагентов. Варьировались концентрации нитрата серебра и гидрата аммиака, а также количество циклов синтеза ватерита на волокнах (рис. 1).

Образцы $\text{ПКЛ}/(\text{CaCO}_3)_1/\text{Ag}(x \text{ M})$ характеризовались неравномерным заращиванием микрочастицами, а, следовательно, и неравномерным покрытием агрегатами наночастиц серебра при проведении реакции «серебряного зеркала». Поверхность $\text{ПКЛ}/(\text{CaCO}_3)_3/\text{Ag}(x \text{ M})$ равномерно покрыта микрочастицами карбоната кальция, в то время как поверхность образца $\text{ПКЛ}/(\text{CaCO}_3)_2/\text{Ag}(x \text{ M})$ представляет собой промежуточный вариант. Для дальнейших исследований подложки с одним циклом заращивания волокон микрочастицами ватерита не использовались ввиду неравномерности.

Дополнительная иммобилизация глюкозоксидазы (GOx) на поверхность матрицы из ПКЛ волокон с выращенными частицами ватерита и восстановленным слоем серебра, как ожидалось, будет способствовать селективному обнаружению глюкозы при исследовании образцов с помощью спектроскопии ГКР. Для такого определения характерно уменьшение сигнала GOx с ростом концентрации детектируемой глюкозы. Для анализа спектров, полученных после добавления капли глюкозы известной концентрации на разработанные подложки, строились модели классификации с помощью ансамблевого метода на основе деревьев принятия решений – случайногого леса (RandomForestClassifier).

Для каждого типа подложки были построены средние спектры по 100 измерениям (рис. 2, а, 3, а), картирование каждого образца проводилось по области 10×10 точек. Затем были построены 2 модели: бинарная, которая должны была различить образцы подложек без GOx и после добавления GOx (рис. 2, б, 3, б); многоклассовая, которая должна была различить подложки с GOx без глюкозы и с GOx с водным раствором глюкозы в концентрациях 1, 2 и 5 мМ (рис. 2, в, 3, в).

Так, для подложек $\text{ПКЛ}/(\text{CaCO}_3)_2/\text{Ag}(1 \text{ M})$ общая интенсивность сигнала ГКР была низкой (см. рис. 2, а), однако обученная модель классификатора обладала достаточной точностью (см. рис. 2, в). Аналогичные измерения и модели

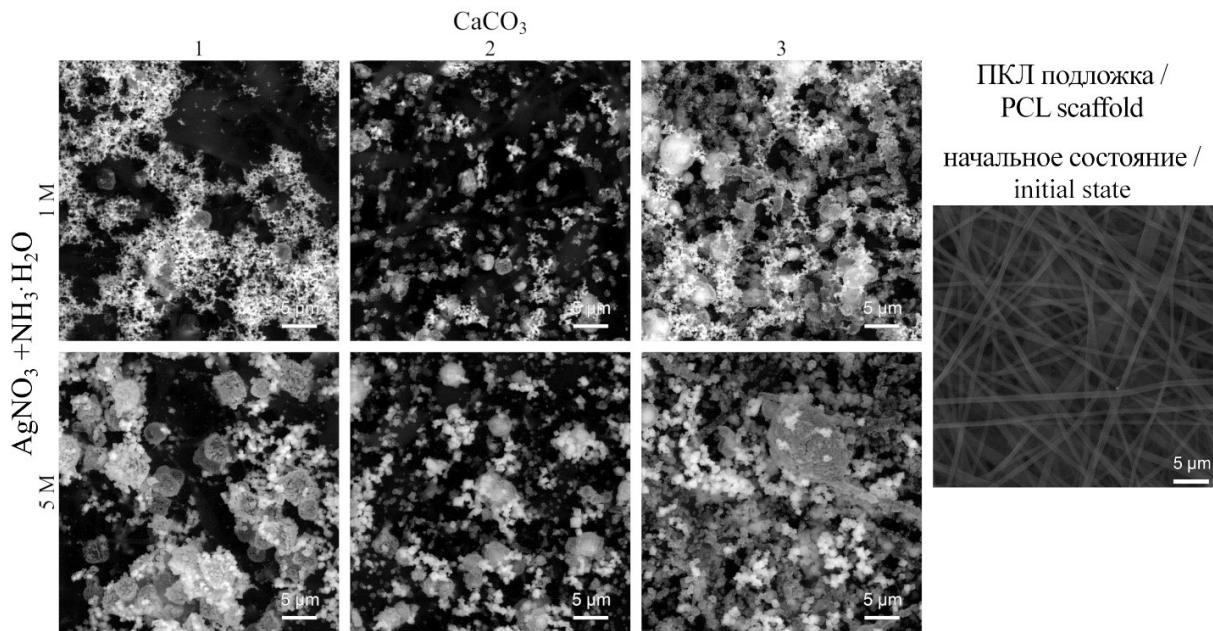


Рис. 1. Изображения СЭМ в режиме обратно-отраженных электронов образцов ПКЛ/(CaCO_3) _{n} /Ag(x М) с разным количеством циклов модификации ПКЛ ватеритом ($n = 1, 2, 3$) и разной концентрацией реагентов для восстановления серебряных агрегатов на поверхности волокон (1 М, 5 М). Изображение СЭМ исходного нетканого материала ПКЛ (справа). Масштабный отрезок 5 мкм

Fig. 1. SEM images in the electron backscatter mode of PCL/(CaCO_3) _{n} /Ag(x M) samples with different numbers of PCL modification cycles with vaterite ($n = 1, 2, 3$) and different concentrations of reagents for the reduction of silver aggregates (1 M, 5 M) on the surface of the fibers. SEM image of the initial nonwoven PCL material (on the right). Scale bar is 5 μ m

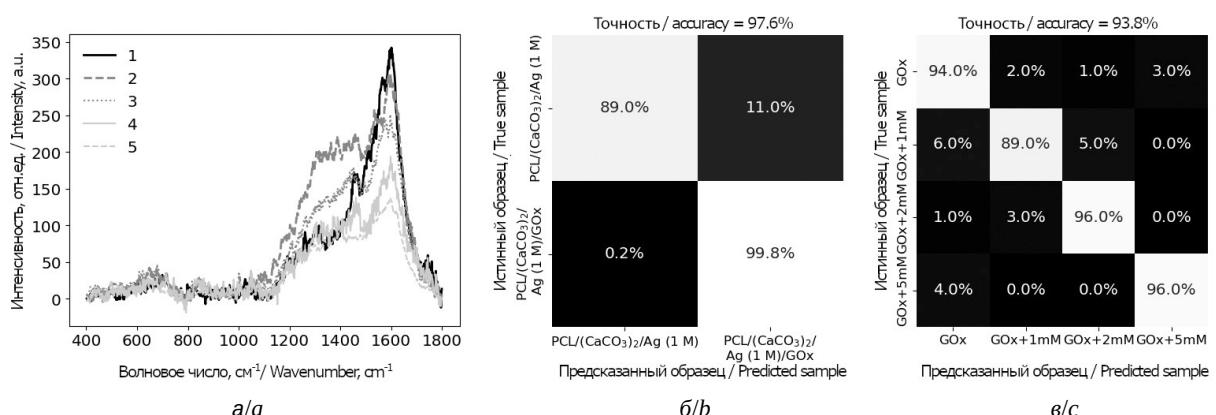


Рис. 2. Средние спектры ГКР по 100 измерениям (а): 1 – ПКЛ/(CaCO_3)₂/Ag (1 М), 2 – ПКЛ/(CaCO_3)₂/Ag (1 М)/GOx, 3 – ПКЛ/(CaCO_3)₂/Ag (1 М)/GOx + 1 мМ глюкозы, 4 – ПКЛ/(CaCO_3)₂/Ag (1 М)/GOx + 2 мМ глюкозы, 5 – ПКЛ/(CaCO_3)₂/Ag (1 М)/GOx + 5 мМ глюкозы; матрица неточностей для бинарного классификатора, сравнивающего спектры подложки без GOx и с GOx (б); матрица неточностей для многоклассового классификатора, сравнивающего спектры подложек ПКЛ/(CaCO_3)₂/Ag(1 M)/GOx с добавлением водного раствора глюкозы в разных концентрациях (в). Точность каждого классификатора указана над его матрицей неточностей

Fig. 2. Average SERS spectra for 100 measurements (a): 1 – PCL/(CaCO_3)₂/Ag (1 M), 2 – PCL/(CaCO_3)₂/Ag (1 M)/GOx, 3 – PCL/(CaCO_3)₂/Ag (1 M)/GOx + 1 mM glucose, 4 – PCL/(CaCO_3)₂/Ag (1 M)/GOx + 2 mM glucose, 5 – PCL/(CaCO_3)₂/Ag (1 M)/GOx + 5 mM glucose; confusion matrix for a binary classifier comparing the spectra of a substrate without GOx and with GOx (b); confusion matrix for a multiclass classifier comparing the spectra of PCL/(CaCO_3)₂/Ag(1 M)/GOx substrates with the addition of an aqueous glucose solution in different concentrations (c). The accuracy of each classifier is indicated above its confusion matrix

были обучены на измерениях подложек ПКЛ/(CaCO_3)₃/Ag(5 М) (рис. 3).

Два других образца из этой серии (ПКЛ/(CaCO_3)₂/Ag(5 М) и ПКЛ/(CaCO_3)₃/Ag(1 М)) продемонстрировали слабую способность для детектирования глюкозы. Уже на этапе добавления GOx и измерения сигнала ГКР с полученных подложек наблюдалось резкое снижение интенсивности сигнала по сравнению с подложками без GOx (ПКЛ/(CaCO_3)₂/Ag(5 М) (рис. 4, а)). Подложки ПКЛ/(CaCO_3)₃/Ag(1 М) характеризу-

ются изначально низкой интенсивностью ГКР-сигнала; добавление GOx привело к увеличению соотношения сигнал-шум в получаемых спектрах (рис. 4, б). Исходя из особенностей в ГКР-спектрах этих подложек, мониторинг водных растворов глюкозы с их помощью не проводилось.

При оценке возможности использования приготовленных подложек в качестве сенсоров на глюкозу, наибольший интерес представляет способность сенсора определять концентрацию 1 мМ. Эта концентрация является физио-

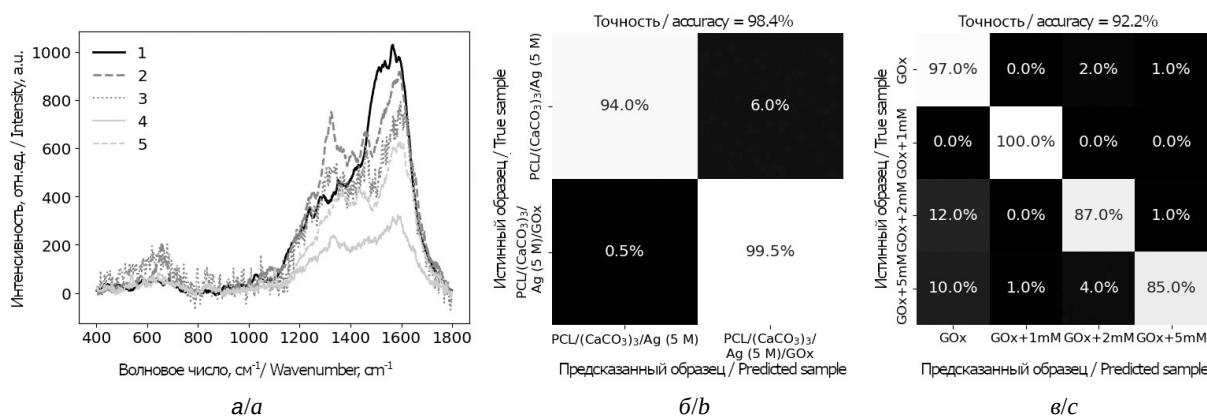


Рис. 3. Средние спектры ГКР по 100 измерениям (а): 1 – ПКЛ/(CaCO_3)₃/Ag (5 М), 2 – ПКЛ/(CaCO_3)₃/Ag (5 М)/GOx, 3 – ПКЛ/(CaCO_3)₃/Ag (5 М)/GOx + 1 мМ глюкоза, 4 – ПКЛ/(CaCO_3)₃/Ag (5 М)/GOx + 2 мМ глюкоза, 5 – ПКЛ/(CaCO_3)₃/Ag (5 М)/GOx + 5 мМ глюкоза; матрица неточностей для бинарного классификатора, сравнивающего спектры подложки без GOx и с GOx (б); матрица неточностей для многоклассового классификатора, сравнивающего спектры подложек ПКЛ/(CaCO_3)₃/Ag(5 М)/GOx с добавлением водного раствора глюкозы в разных концентрациях (в). Точность каждого классификатора указана над его матрицей неточностей

Fig. 3. Average SERS spectra for 100 measurements (a): 1 – PCL/(CaCO_3)₃/Ag (5 M), 2 – PCL/(CaCO_3)₃/Ag (5 M)/GOx, 3 – PCL/(CaCO_3)₃/Ag (5 M)/GOx + 1 mM glucose, 4 – PCL/(CaCO_3)₃/Ag (5 M)/GOx + 2 mM glucose, 5 – PCL/(CaCO_3)₃/Ag (5 M)/GOx + 5 mM glucose; confusion matrix for a binary classifier comparing the spectra of a substrate without GOx and with GOx (b); confusion matrix for a multiclass classifier comparing the spectra of PCL/(CaCO_3)₃/Ag(5 M)/GOx substrates with the addition of an aqueous glucose solution in different concentrations (c). The accuracy of each classifier is indicated above its confusion matrix

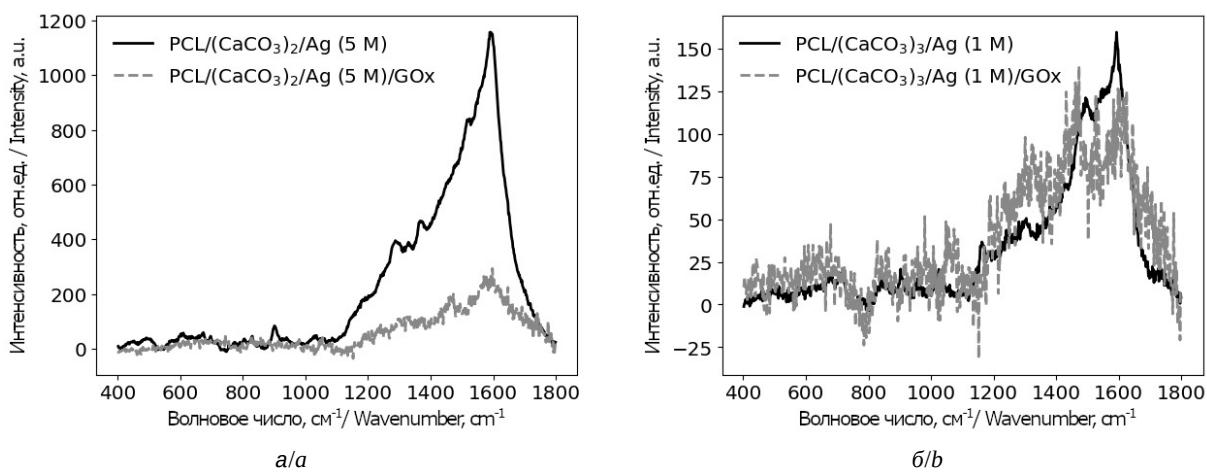


Рис. 4. Средние спектры ГКР по 100 измерениям для подложек: ПКЛ/(CaCO_3)₂/Ag(5 М) (а), ПКЛ/(CaCO_3)₃/Ag(1 М) (б)
Fig. 4. Average SERS spectra for 100 measurements of the following substrates: PCL/(CaCO_3)₂/Ag(5 M) (a), PCL/(CaCO_3)₃/Ag(1 M) (b)



логической, может встречаться в поту при повышенной концентрации глюкозы в крови [22]. Концентрация глюкозы в поту коррелирует с ее концентрацией в крови, что может использоваться для неинвазивного измерения биомаркера. Если в дальнейшем планируется использовать подложки для детектирования глюкозы в поту, то важно убедиться, что концентрация 1 мМ является детектируемой, и затем тестировать образцы в диапазоне концентраций 0.05–1.0 мМ.

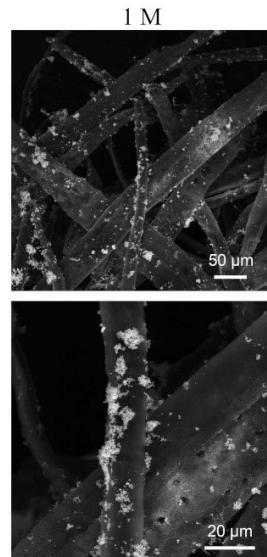
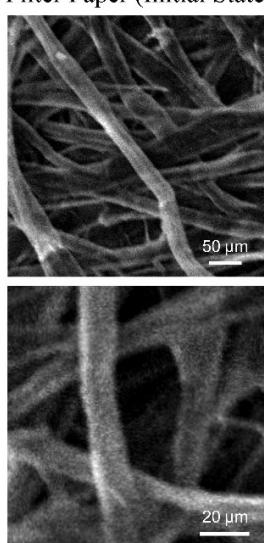
В серии образцов ПКЛ/(CaCO₃)_n/Ag(x M) наиболее интересным с этой точки зрения является образец ПКЛ/(CaCO₃)₃/Ag(5 M) (см. рис. 3). Этот образец демонстрирует более высокую интенсивность ГКР сигнала (см. рис. 3, а) по сравнению с образцом ПКЛ/(CaCO₃)₂/Ag(1 M) (см. рис. 2, а). Несмотря на то, что общая точность классификации (см. рис. 3, в) ниже, чем у образца ПКЛ/(CaCO₃)₂/Ag(1 M) (см. рис. 2, в) (92.2% по сравнению с 93.8%), стоит обратить внимание на долю правильной классификации для спектров GOx + глюкоза (1 мМ). Для тестовой выборки образцов, было верно классифицировано 100%, в то время как для подложек ПКЛ/(CaCO₃)₂/Ag(1 M) этот показатель был равен 89%; 5% были неверно классифицированы как

GOx + глюкоза (концентрация глюкозы 2 мМ) и 6% как GOx (концентрация глюкозы 0 мМ).

Таким образом, увеличение количества циклов последовательной модификации поверхности поликарбоната микрочастицами ватерита позволяет получить более однородное заращивание, что наблюдалось на изображениях СЭМ, и, как следствие, большую точность определения малых концентраций глюкозы.

В качестве альтернативы использованию нетканого материала на основе ПКЛ была рассмотрена фильтровальная бумага. Поскольку этот материал изначально гидрофильный, для модификации его поверхности серебряными наночастицами не требуется проводить дополнительную процедуру минерализации – покрытие поверхности микрочастицами карбоната кальция. Восстановление серебра на поверхности проводилось аналогично образцам ПКЛ/(CaCO₃)_n (рис. 5). При концентрации используемых реагентов (AgNO₃, NH₃·H₂O) 1 М, наблюдается неравномерное покрытие агрегатами серебряных наночастиц. При увеличении концентрации нитрата серебра и гидроксида аммония до 2 М получаемое покрытие становится более равномерным. Когда концентрации реагентов достигают 3 М, наблюдается заметное сниже-

Фильтровальная бумага
(начальное состояние) /
Filter Paper (Initial State)



AgNO₃ + NH₃·H₂O

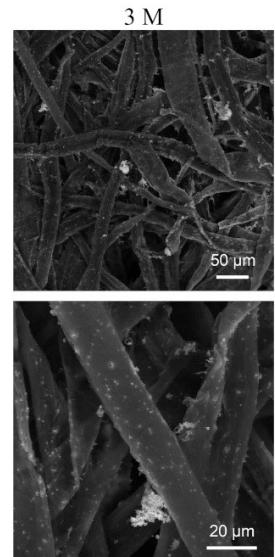
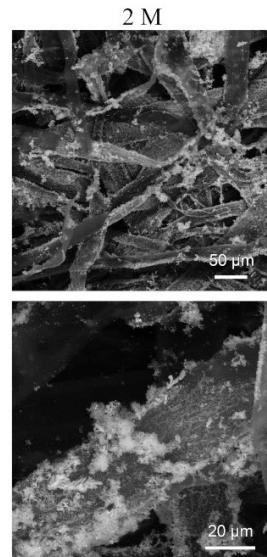


Рис. 5. Изображения СЭМ образцов фильтровальной бумаги до и после восстановления агрегатов серебряных наночастиц по реакции серебряного зеркала с использованием реагентов разной концентрации. Верхний ряд – общий вид, масштабный отрезок 50 мкм. Нижний ряд – приближенные изображения, масштабный отрезок 20 мкм

Fig. 5. SEM images of filter paper samples before and after reduction of silver nanoparticle aggregates by the silver mirror reaction using reagents of different concentrations. Top row: general view, scale bar is 50 μm. Bottom row: close-up images, scale bar is 20 μm

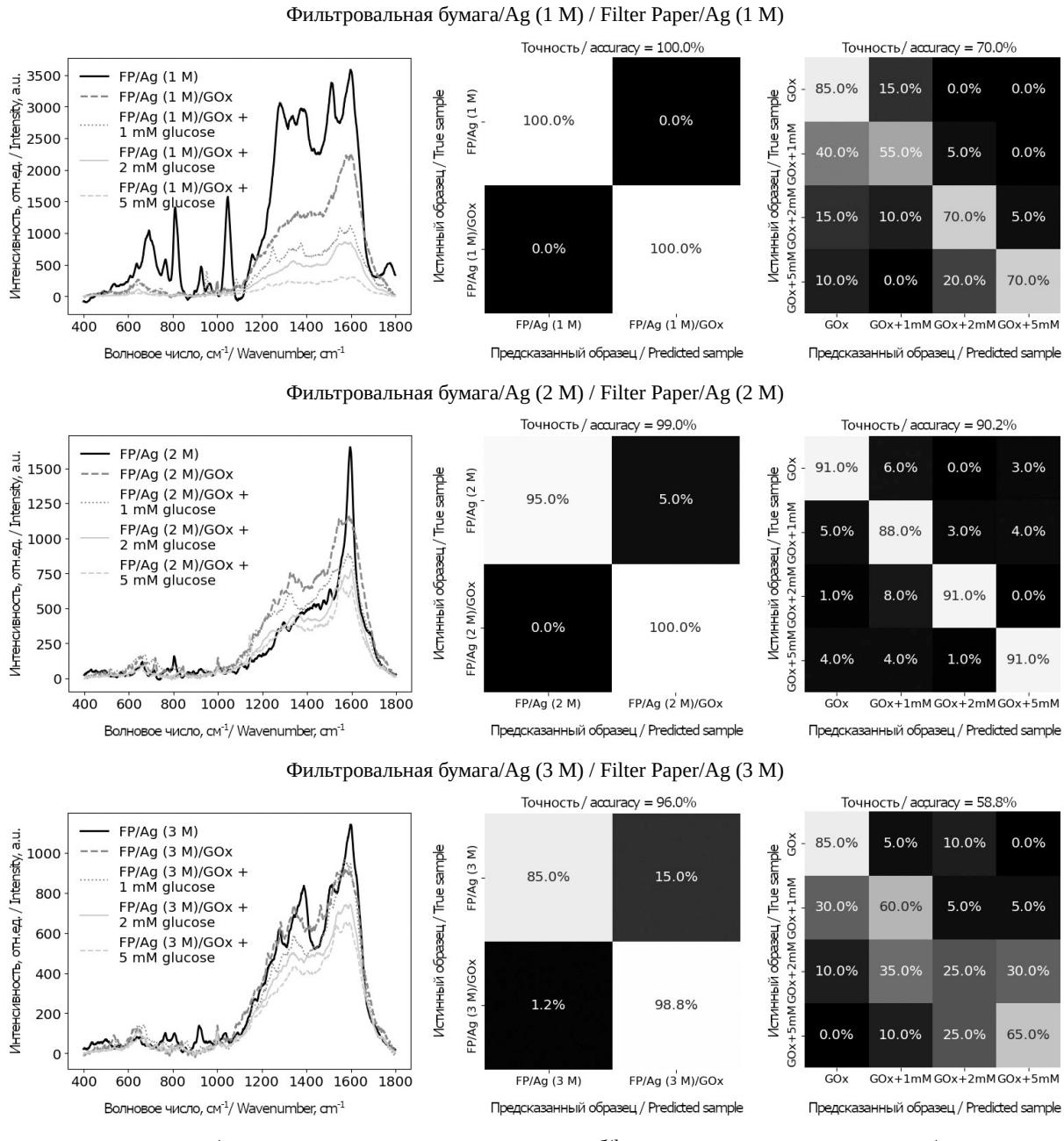

a/a
b/b
c/c

Рис. 6. Результаты измерений ГКР и обученных классификаторов для подложек: средние спектры ГКР по 100 измерениям (а); матрица неточностей для бинарного классификатора, сравнивающего спектры подложки без GOx и с GOx (б); матрица неточностей многоклассового классификатора, сравнивающего спектры подложек с добавлением водного раствора глюкозы в разных концентрациях (в). Точность каждого классификатора указана над его матрицей неточностей

Fig. 6. Results of SERS measurements and fitted classifiers of the following substrates: Average SERS spectra for 100 measurements (a); a binary classifier comparing the spectra of a substrate without GOx and with GOx (b); a multiclass classifier comparing the spectra of substrates with the addition of an aqueous glucose solution in different concentrations (c). The accuracy of each classifier is indicated above its confusion matrix

ние количества восстановленных наночастиц. Предположительно, при такой концентрации образуются очень большие кластеры наночастиц серебра, слабо связанные с поверхностью волокон фильтровальной бумаги. Это приводит

к тому, что агрегаты серебряных наночастиц остаются в воде и/или в спирте на одном из этапов промывки.

Затем для последующего детектирования глюкозы к полученным подложкам добавляли



GOx, и исследовали изменение сигнала ГКР, измеренного от подложки, подложки+GOx и подложки+GOx + глюкоза в концентрациях 1, 2 и 5 мМ. Аналогично с образцами ПКЛ/(CaCO₃)_n/Ag(x M) на полученных данных обучали ансамблевую модель классификации – случайный лес (рис. 6).

Классификатор, обученный на данных с подложки ФБ/Ag (2 М), показал не только лучшую общую точность (90.2% против 70% для ФБ/Ag (1 М) и 58.8% для ФБ/Ag (3 М)), но и более точное определение глюкозы в концентрации 1 мМ: 88% верных классификаций, 5%, 3% и 4% ложно классифицированы как GOx, GOx+2 мМ, GOx+5 мМ, соответственно.

Заключение

Проведение трех циклов модификации поверхности волокон ПКЛ микрочастицами карбоната кальция приводят к равномерному заращиванию всей обрабатываемой области. Дополнительная иммобилизация глюкозоксидазы (GOx) на поверхность матрицы из ПКЛ волокон с выращенными частицами ватерита и восстановленным слоем серебра обеспечила селективность обнаружению глюкозы при исследовании образцов с помощью спектроскопии ГКР. Наибольшая чувствительность в определении низких концентраций глюкозы (1 мМ) была получена для подложек с тремя последовательными модификациями волокон ПКЛ ватеритом и восстановлением агрегатов Ag наночастиц из 5 М растворов нитрата серебра и гидрата аммиака. Несмотря на более низкую общую точность модели классификации (92.2% по сравнению с 93.8% для образца с 2 циклами минерализации и использовании 1 М растворов нитрата серебра гидрата аммиака), образец ПКЛ/(CaCO₃)₃/Ag(5 М) показал отсутствие ложных классификаций для спектров, измеренных для водного раствора глюкозы в концентрации 1 мМ.

В качестве альтернативы использованию нетканого материала на основе ПКЛ была рассмотренная фильтровальная бумага. Восстановление серебра было произведено без создания ватеритных частиц с варьированием концентрации используемых реагентов (AgNO₃, NH₃·H₂O). Сенсоры на основе фильтровальной бумаги после восстановления серебра на поверхности из растворов солей с концентраций 2 М показали наибольшую точность (90.2%), а также долю верных классификаций (88%) к результатам измерения растворов глюкозы в малой

концентрации (1 мМ). При сравнении лучших представителей исследованных серий образцов, самым перспективным может считаться образец ПКЛ/(CaCO₃)₃/Ag(5 М).

Список литературы / References

1. Shafer-Peltier K. E., Haynes C. L., Glucksberg M. R., Van Duyne R. P. Toward a glucose biosensor based on surface-enhanced Raman scattering. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, vol. 125, iss. 2, pp. 588–593. <https://doi.org/10.1021/ja028255v>
2. Sun X. Glucose detection through surface-enhanced Raman spectroscopy: A review. *Anal. Chim. Acta*, 2022, vol. 1206, art. 339226. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339226>
3. Yang D., Afroosheh S., Lee J. O., Cho H., Kumar S., Siddique R. H., Narasimhan V., Yoon Y. Z., Zayak A. T., Choo H. Glucose sensing using surface-enhanced Raman-mode constraining. *Anal. Chem.*, 2018, vol. 90, iss. 24, pp. 14269–14278. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03420>
4. Quyen T. T. B., Su W. N., Chen K. J., Pan C. J., Rick J., Chang C. C., Hwang B. J. Au@SiO₂ core/shell nanoparticle assemblage used for highly sensitive SERS-based determination of glucose and uric acid. *J. Raman Spectrosc.*, 2013, vol. 44, iss. 12, pp. 1671–1677. <https://doi.org/10.1002/jrs.4400>
5. Sun X., Stagon S., Huang H., Chen J., Lei Y. Functionalized aligned silver nanorod arrays for glucose sensing through surface enhanced Raman. *RSC Adv.*, 2014, vol. 4, iss. 45, pp. 23382–23388. <https://doi.org/10.1039/C4RA02423K>
6. Pham X., Shim S., Kim T., Hahm E., Kim H., Rho W., Jeong D., Lee Y., Jun B. Glucose detection using 4-mercaptophenyl boronic acid-incorporated silver nanoparticles-embedded silica-coated graphene oxide as a SERS substrate. *BioChip J.*, 2017, vol. 11, pp. 46–56. <https://doi.org/10.1007/s13206-016-1107-6>
7. Wallace G. Q., Tabatabaei M., Zuin M. S., Workentin M. S., Lagugné-Labarthe F. A nanoaggregate-on-mirror platform for molecular and biomolecular detection by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, vol. 408, pp. 609–618. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9142-z>
8. Guo W., Hu Y., Wei H. Enzymatically activated reduction-caged SERS reporters for versatile bioassays. *Analyst*, 2017, vol. 142, iss. 13, pp. 2322–2326. <https://doi.org/10.1039/C7AN00552K>
9. Fu C., Jin S., Oh J., Xu S., Jung Y. M. Facile detection of glucose in human serum employing silver-ion-guided surface-enhanced Raman spectroscopy signal amplification. *Analyst*, 2017, vol. 142, iss. 16, pp. 2887–2891. <https://doi.org/10.1039/C7AN00604G>
10. Ju J., Liu W., Perlaki C. M., Chen K., Feng C., Liu Q. Sustained and cost effective silver substrate for surface enhanced Raman Spectroscopy based biosensing. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7, iss. 1, art. 6917. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07186-9>

11. Kwon J. A., Jin C. M., Shin Y., Kim H. Y., Kim Y., Kang T., Choi I. Tunable plasmonic cavity for label-free detection of small molecules. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2018, vol. 10, iss. 15, pp. 13226–13235. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b01550>
12. Yonzon C. R., Haynes C. L., Zhang X., Walsh J. T., Van Duyne R. P. A glucose biosensor based on surface-enhanced Raman scattering: Improved partition layer, temporal stability, reversibility, and resistance to serum protein interference. *Anal. Chem.*, 2004, vol. 76, iss. 1, pp. 78–85. <https://doi.org/10.1021/ac035134k>
13. Chen Q., Fu Y., Zhang W., Ye S., Zhang H., Xie F., Gong L., Wei Z., Jin H., Chen J. Highly sensitive detection of glucose: A quantitative approach employing nanorods assembled plasmonic substrate. *Talanta*, 2017, vol. 165, pp. 516–521. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.12.076>
14. Hu S., Jiang Y., Wu Y., Guo X., Ying Y., Wen Y., Yang H. Enzyme-free tandem reaction strategy for surface-enhanced Raman scattering detection of glucose by using the composite of Au nanoparticles and Porphyrin-based metal – organic framework. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2020, vol. 12, iss. 49, pp. 55324–55330. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c12988>
15. Heang S., Park I. K., Kim J. M., Lee J. H. In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. *Biomaterials*, 2007, vol. 28, iss. 9, pp. 1664–1671. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.11.024>
16. Abedalwafa M., Wang F., Wang L., Li C. Biodegradable poly-epsilon-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: A review. *Rev. Adv. Mater. Sci.*, 2013, vol. 34, iss. 2, pp. 123–140.
17. Mayorova O. A., Saveleva M. S., Bratashov D. N., Prikhozhdenco E. S. Combination of machine learning and Raman spectroscopy for determination of the complex of whey protein isolate with hyaluronic acid. *Polymers*, 2024, vol. 16, iss. 5, art. 666. <https://doi.org/10.3390/polym16050666>
18. Lussier F., Thibault V., Charron B., Wallace G. Q., Masson J. F. Deep learning and artificial intelligence methods for Raman and surface-enhanced Raman scattering. *TrAC*, 2020, vol. 124, art. 115796. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115796>
19. Ralovsky N. M., Lednev I. K. Towards development of a novel universal medical diagnostic method: Raman spectroscopy and machine learning. *Chem. Soc. Rev.*, 2020, vol. 49, iss. 20, pp. 7428–7453. <https://doi.org/10.1039/D0CS01019G>
20. Saveleva M. S., Ivanov A. N., Chibrikova J. A., Abalymov A. A., Surneneva M. A., Surnenev R. A., Parakhonskiy B. P., Lomova M. V., Skirtach A. G., Norkin I. A. Osteogenic capability of vaterite-coated nonwoven polycaprolactone scaffolds for *in vivo* bone tissue regeneration. *Macromol. Biosci.*, 2021, vol. 21, iss. 12, art. 2100266. <https://doi.org/10.1002/mabi.202100266>
21. Prikhozhdenco E. S., Atkin V. S., Parakhonskiy B. V., Rybkin I. A., Lapanje A., Sukhorukov G. B., Gorin D. A., Yashchenok A. M. New post-processing method of preparing nanofibrous SERS substrates with a high density of silver nanoparticles. *RSC Adv.*, 2016, vol. 6, iss. 87, pp. 84505–84511. <https://doi.org/10.1039/C6RA18636J>
22. Baker L. B., Wolfe A. S. Physiological mechanisms determining eccrine sweat composition. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 2020, vol. 120, iss. 4, pp. 719–752. <https://doi.org/10.1007/s00421-020-04323-7>

Поступила в редакцию 10.05.2024; одобрена после рецензирования 28.01.2025;
принята к публикации 17.02.2025; опубликована 30.06.2025

The article was submitted 10.05.2024; approved after reviewing 28.01.2025;
accepted for publication 17.02.2025; published 30.06.2025