

УДК 543.424

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ СОДЕРЖАНИЯ ОБЩЕГО ГЕМОГЛОБИНА В КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

© 2025 г. А. Ю. Субекин<sup>1,2,\*</sup>, Т. Е. Пылаев<sup>3</sup>, В. И. Кукушкин<sup>2</sup>,  
Е. В. Рудакова<sup>4</sup>, Т. Д. Рудаков<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования  
«Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»,  
Долгопрудный, Россия

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физики твердого тела  
имени Ю.А. Осипяна Российской академии наук, Черноголовка, Россия

<sup>3</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский  
государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения  
Российской Федерации, Саратов, Россия

<sup>4</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологически активных веществ  
Российской академии наук, Черноголовка, Россия

\*E-mail: alexey.subekin@gmail.com

Поступила в редакцию 27.09.2024 г.

После доработки 18.10.2024 г.

Принята к публикации 28.10.2024 г.

Исследована возможность применения спектроскопии комбинационного рассеяния при определении общего содержания гемоглобина в крови. Установлено, что ряд линий КР-спектра линейно зависит от концентрации гемоглобина. Показано, что SERS с использованием коллоидов серебра также дает линейную концентрационную зависимость для интенсивности спектральных линий.

**Ключевые слова:** комбинационное рассеяние света, гемоглобин, наночастицы серебра.

**DOI:** 10.31857/S0367676525020169, **EDN:** CWPNUW

### ВВЕДЕНИЕ

Гемоглобин — хромопротеид, входящий в состав эритроцитов. Основной его функцией является транспорт кислорода и углекислого газа в крови. Определение общего содержания этого белка имеет важное клиническое значение в современной лабораторной диагностике. Норма у мужчин составляет 135–160 г/л, у женщин 120–140 г/л [1]. Превышение этих показателей может являться следствием физиологических изменений или патологических состояний организма. В качестве примера можно привести курение, пребывание на больших высотах, интоксикации различными патогенами, злокачественное заболевание костного мозга, синдром Кушинга и пороки сердца. Снижение концентрации гемоглобина может отмечаться при применении различных лекарственных препаратов, применении отравляющих веществ, дефиците железа, талассемии, серповидно-клеточной анемии и лейкозах [1, 2].

Настоящая работа посвящена исследованию применения спектроскопии комбинационного рассеяния (КР-спектроскопии, рамановской спектроскопии) при определении общего содержания гемоглобина крови. КР-спектры характеризуют химическую природу индивидуальных веществ и многокомпонентных смесей, индивидуальны для каждого вещества и, как правило, имеют количественную зависимость интенсивности сигнала от содержания для каждого компонента смеси [3–5]. Все это делает рамановскую спектроскопию одним из самых перспективных методов современной клинической лабораторной диагностики.

В более ранних работах проводились исследования гемоглобина с применением КР-спектроскопии и спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (SERS) с усилением сигнала плазмонными наночастицами [6–9]. Было показано, что вклад в характерный спектр белка вносят как белковые субъединицы, так и

гемовая часть молекулы. Однако соотношение линий спектра зависит от множества факторов. В первую очередь сюда следует отнести одновременное присутствие различных форм самого гемоглобина в крови: оксигемоглобин, дезоксигемоглобин, гликированный гемоглобин (HbA1c) и метгемоглобин [10]. Окси- и дезоксигемоглобин имеют различную интенсивность отдельных линий спектра, что затрудняет количественное определение белка оптическими методами, в том числе КР-спектроскопией. При гликировании гемоглобина происходят значительные конформационные изменения вторичной и третичной структур белка, выражающиеся, например, в изменении соотношения  $\beta$ -складок и  $\alpha$ -спиралей в пользу первых, а также увеличении поверхностного триптофана [2, 11]. С учетом того, что содержание HbA1c колеблется от 4 до 10 % от общего гемоглобина, эта форма гемоглобина также вносит существенный вклад в общий спектр белка. Другим немаловажным фактором является pH. Показано, что в щелочной среде интенсивность окраски гемоглобина лучше подчиняется закону Ламберта–Бэра, чем в кислой [11].

Из вышесказанного следует, что применение любого оптического метода, в том числе КР-спектроскопии, для количественного определения гемоглобина требует особой пробоподготовки, нивелирующей влияние различных факторов, связанных с самим белком. Кроме того, требуется исследование влияния физико-химических параметров наночастиц, таких как материал, геометрия, положение пика плазмонного резонанса (ПР), на аналитические показатели SERS-сигнала гемоглобина в условиях эксперимента.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### *Материалы*

В работе использовали коммерческие реагенты без дополнительной очистки: 25% водный раствор цетилтриметиламмония хлорида (ЦТАХ), цетилтриметиламмония бромид (ЦТАБ), L-аскорбиновая кислота (AA), нитрат серебра ( $\text{AgNO}_3$ ), гидроксиламина гидрохлорид, боргидрид натрия ( $\text{NaBH}_4$ ), олеат натрия ( $\text{NaOL}$ , 86%), дигидрат тринатрийцитрата  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , поливинилпирролидон (ПВП, мол. масса 24 кДа), (Sigma-Aldrich, США); тригидрат тетрахлораурата водорода ( $\text{HAuCl}_4$ ), (ALFA Aesar, США); N,N-диметилформамид  $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$  (ДМФ), (AppliChem, Испания); тиолированный полиэтиленгликоль (ПЭГ, мол. масса 5 кДа), (Creative PEGWorks, США); 37%-водный раствор перекиси водорода ( $\text{H}_2\text{O}_{2\text{водн}}$ ), соляная кислота (HCl), азотная кислота ( $\text{HNO}_3$ ), едкий натр (NaOH), Карбонат калия ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) и 25%-водный раствор аммиака ( $\text{NH}_{3\text{водн}}$ ) (Ленреактив,

Россия); калибраторы гемоглобина ГК 1-3 (ООО «Агат-Мед», Россия). Все эксперименты проводили с использованием деионизированной воды, полученной на системе Milli-Q Integral 5 systems.

### *Синтез наночастиц*

Приготовление зольей наночастиц осуществлялось методами жидкофазной химии. Для удобства изложения материала будут использоваться сокращенные названия образцов, обозначающие тип наночастиц и положение максимума ПР синтезированных коллоидов, например, ЗНЗ-800 — золотые нанозвезды с ПР в области 800 нм. Синтез осуществляли в термостойкой стеклянной посуде, тщательно отмытой царской водкой (смесь концентрированной азотной и соляной кислот в объемном соотношении 1:3).

### *Синтез сферических наночастиц серебра с ПР в области 416 нм*

Наночастицы серебра ( $\text{AgNP416}$ ) были получены по методу Леопольда–Лэндла [12]. При комнатной температуре и интенсивном перемешивании к 90 мл водного раствора едкого натра и гидроксиламина гидрохлорида концентраций  $1.67 \cdot 10^{-3}$  и  $3.33 \cdot 10^{-3}$  М, соответственно, добавляли по каплям 10 мл  $10^{-2}$  М водного раствора  $\text{AgNO}_3$ . Реакцию проводили в течение 30 мин, после чего готовый коллоид центрифугировали при 5000 g и ресуспендировали в 10 мл деионизированной воды.

### *Синтез кубических наночастиц серебра с ПР в области 517 нм*

Наночастицы серебра ( $\text{AgNP517}$ ) были получены по двухстадийному зародышевому протоколу, описанному в [13]. На первом этапе получали 40 нм Ag наночастицы на 10 нм Au зародышах следующим образом. В полипропиленовой пробирке с резьбовой крышкой смешивали 50 мл 0.02 М ЦТАХ, 0.5 мл 10 нм Au зародышей, 0.5 мл 0.1 М  $\text{AgNO}_3$  и 2.5 мл 0.1 М AA. Далее инкубировали полученную смесь при 70°C в течение 2 ч. Полученные наночастицы дважды центрифугировали при 8000g по 15 мин, ресуспендировали осадок в 50 мл 0.01 М ЦТАХ, и фильтровали через шприцевые нейлонные фильтры с диаметром пор 0.22 мкм. На втором этапе полученные 40-нм Ag наночастицы использовали в качестве зародышей. В 50 мл пробирке смешивали 8 мл 0.02 М ЦТАХ, 1 мл 40-нм Ag зародышей, 0.1 мл 0.1 М  $\text{AgNO}_3$  и 0.4 мл 0.1 М AA. Далее инкубировали полученную смесь при 70°C в течение 2 ч. Полученные наночастицы дважды центрифугировали при 4000g в течение 20 мин, ресуспендировали осадок в 1 мл 0.01 М ЦТАХ, и фильтровали через шприцевые нейлонные фильтры с диаметром пор 0.22 мкм.

### *Синтез полигональных наночастиц золота с ПР в области 533 нм*

Наночастицы золота (AuNP533) были получены по двухстадийному зародышевому протоколу [14] с нашими незначительными модификациями [13]. На первом этапе Au нанокластеры готовили путем смешивания 5 мл водного раствора ЦТАБ (0.2 М), 5 мл  $\text{HAuCl}_4$  (1 мМ) с 600 мкл  $\text{NaBH}_4$  (0.01 М). Затем были приготовлены 10-нм Au зародыши путем смешивания на магнитной мешалке 20 мл 0.1 М ЦТАХ, 15 мл 0.1 М аскорбиновой кислоты, 0.5 мл Au нанокластеров и 20 мл 0.5 мМ  $\text{HAuCl}_4$ . Полученные наночастицы трижды центрифугировали при 20000g по 60 мин, финальный препарат Au зародышей ресуспендировали в 10 мл 0.01 М ЦТАХ. На втором этапе 10 нм Au зародыши доращивали до необходимых размеров по следующей методике. В стеклянной колбе смешивали 40 мл 0.1 М ЦТАХ, 2.6 мл 0.01 М АА и 160 мкл Au зародышей размером 10 нм, после чего добавляли по каплям 10 мл 2 мМ  $\text{HAuCl}_4$ . Полученные наночастицы центрифугировали при 6000g в течение 20 мин и ресуспендировали полученные осадки в 5 мл воды.

### *Синтез зародышевых наносфер золота (НСф)*

НСф со средним диаметром около 15 нм были получены восстановлением  $\text{HAuCl}_4$  цитратом натрия, как описано в [15]. К 250 мл 1 мМ кипящего водного раствора  $\text{HAuCl}_4$  быстро добавляли 25 мл 38.8 мМ водного раствора цитрата натрия, что приводило к изменению цвета раствора от бледно-желтого до темно-красного.

### *Синтез звездообразных наночастиц золота с ПР в области 762 нм*

Золотые нанозвезды (AuNP762) были изготовлены с помощью двухстадийного зародышевого способа, предложенного группой Liz-Marzan [16]. В реакционную смесь при постоянном перемешивании на магнитной мешалке без нагревания последовательно вводили: 85 мкл 50 мМ водного раствора  $\text{HAuCl}_4$ ; 15 мл 10 мМ раствора ПВП в ДМФ; затем быстро добавляли 45 мкл спиртового раствора 15-нм зародышей НСф, покрытых ПВП, как описано в [17]. В течение 15 мин перемешивания цвет раствора меняется от розоватого до бесцветно, далее, становится синим, указывая на формирование золотых нанозвезд. Полученный коллоид освобождали от ростового раствора двукратным ЦФ при 6000 об/мин в течение 20 мин и ресуспендировали в воде.

### *Синтез звездообразных наночастиц золота с ПР в области 800 нм*

Золотые нанозвезды (AuNP800) были изготовлены с помощью двухстадийного зародышевого способа, предложенного в [18], с небольшо-

ми модификациями [19]. К 50 мл 0.75 мМ раствора  $\text{HAuCl}_4$  последовательно добавляли при постоянном интенсивном перемешивании на магнитной мешалке без нагревания следующие растворы: 1.5 мл свежеприготовленного раствора зародышей 15-нм НСф, полученных по вышеописанной методике [15]; 150 мкл 1 М  $\text{HCl}$ ; 1.5 мл 2 мМ  $\text{AgNO}_3$ . Затем добавили 750 мкл 100 мМ раствора аскорбиновой кислоты и остановили перемешивание через 30 с, наблюдая за изменением цвета коллоида от светло-красного до серовато-голубого. Полученный коллоид освобождали от ростового раствора двукратным ЦФ при 6000 об/мин в течение 20 мин и ресуспендировали в воде. Далее стабилизировали поверхность наночастиц тиолированным ПЭГ. Для этого титровали 10 мл раствора коллоида 200 мМ раствором  $\text{K}_2\text{CO}_3$  до 9 pH с последующим добавлением раствора тиолированного ПЭГ до финальной концентрации 10 нМ и инкубировали в течение 24 ч при комнатной температуре. Для удаления неспецифически связанных молекул ПЭГ образцы дважды ЦФ при 6000 об/мин в течение 20 мин и ресуспендировали в воде.

### *Синтез стержнеобразных наночастиц золота с ПР в области 1000 нм*

Наностержни (AuNP1000) были изготовлены с помощью двухстадийного зародышевого метода на мицеллярных матрицах смеси двух ПАВ, предложенного в [20], с небольшими модификациями [21]. Комбинированный раствор ПАВ готовили в 250 мл теплой воды ( $\approx 50^\circ\text{C}$ ) растворением ЦТАБ и NaOI до достижения финальной концентрации 37 мМ и 47 мМ, соответственно. Затем раствор охлаждали до  $30^\circ\text{C}$  и добавляли 18 мл 4 мМ раствора  $\text{AgNO}_3$ , через 30 мин добавляли 250 мл 1 мМ раствора  $\text{HAuCl}_4$  и перемешивали при 700 об/мин в течение 90 мин при  $30^\circ\text{C}$ . Раствор при этом становился прозрачным. Далее вводили 2.1 мл 12.1 М  $\text{HCl}$  и перемешивали в течение 15 минут при 400 об/мин. Затем добавляли аскорбиновую кислоту до финальной концентрации 64 мМ, энергично перемешивали в течение 30 с, добавляли 800 мкл зародышевого раствора Au нанокластеров (приготовленных аналогичным образом, как для синтеза ЗНЧ-533, см. выше) через 30 с останавливали перемешивание и инкубировали в течение 12 ч при  $30^\circ\text{C}$ . Затем освобождали от ростового раствора двукратным ЦФ при 9000 об/мин в течение 30 мин и ресуспендировали в воде.

### *Характеристика наночастиц*

Спектры экстинкции измеряли на спектрофотометре MULTISKAN Skyhigh TC CUV (Thermo, США). Изображения просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) получали на микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss, Германия) в Центре коллективного пользования

исследовательским оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» ФИЦ СЦ РАН, Саратов. Для измерений с помощью ПЭМ наночастицы дважды центрифугировали и повторно диспергировали в воде. 10 мкл отмытых наночастиц наносили на медную микроскопическую сеточку для ПЭМ с формваровой подложкой, изображения получали при напряжении 120 кВ.

#### *Определение гемоглобина аммиачным методом*

В результате гемолиза эритроцитов разведенным раствором аммиака образуется оксигемоглобин, отличающийся относительно стойкой окраской [22]. Для опытов всегда готовили свежий 0.04%-водный раствор аммиака путем разведения его 25%-раствора деионизированной водой. Забор крови у добровольцев осуществляли стандартной венепункцией из локтевой вены в вакуумные пробирки, содержащие антикоагулянты К<sub>3</sub>-ЭДТА и цитрат натрия. Гемолиз образцов крови проводили путем разведения образцов крови 0.04% раствором аммиака и выдерживанием их при 4°C в течение 5 мин с последующим центрифугированием при 14000 об/мин в течение 20 мин.

#### *Запись КР-спектров*

КР-спектры были записаны на оптическом сканирующем микроскопе Olympus BX51 (Olympus Corporation, Япония) на базе спектрометров Фотон-Био («Фотон-Био», Россия) с длиной волны лазера 532 нм (при мощности 30 мВт). Диаметр лазерного пятна для источника излучения составлял 10 мкм. В результате измерений получены спектры гемоглобина. Для всех измерений рассчитывали средние значения и ошибки.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Типичные спектры экстинкции свежесинтезированных коллоидов, используемых в экспериментах по определению уровня общего гемоглобина методом SERS, показаны на рис. 1а. На рис. 1б–1ж показаны ПЭМ-изображения наночастиц, иллюстрирующие их геометрию. Средние размеры частиц, определенные путем обра-

ботки ПЭМ-изображений, и значения максимумов ПР, приведены в табл. 1. Представленный набор коллоидов с охватом всего оптического диапазона в видимой и ближней ИК-областях спектра, был выбран для исследования эффектов геометрии и ПР частиц на SERS-отклик от гемоглобина в резонансном и нерезонансном режимах, при облучении лазером с длиной волны 532 нм.

В первой серии экспериментов оценивали корреляцию линий спектра в зависимости от концентрации гемоглобина, подготовленного аммиачным методом. Для этого брали калибраторы для фотоколориметрического определения белка с известным содержанием гемоглобина: 70, 120 и 165 г/л. Опыт проводили в 10 повторениях для каждой концентрации белка. КР-спектры показаны на рис. 2.

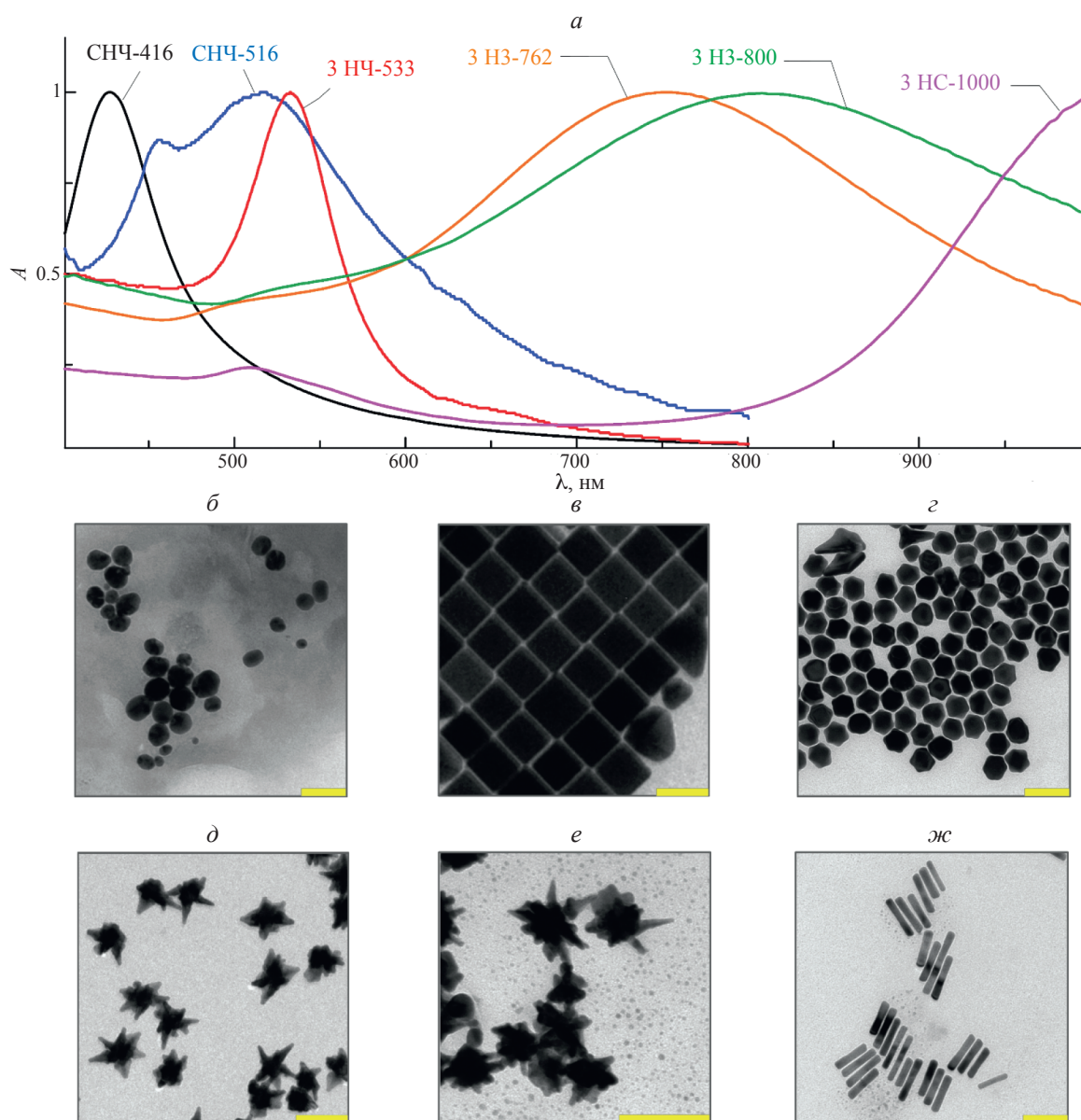
В результате анализа спектров установлено, что не все линии гемоглобина обладают хорошей корреляцией сигнала от концентрации белка. Результаты анализа средних значений интенсивности сигнала представлены в табл. 2. Из представленных данных видно, что многие линии КР-спектра калибраторов гемоглобина напрямую зависят от его концентрации. Минимальный коэффициент линейной корреляции для этой выборки составил 0.9790. Из этого следует, что аммиачный метод в дальнейшем может быть использован для определения общего гемоглобина крови.

Во второй серии экспериментов оценивали возможность применения SERS для определения концентрации гемоглобина. Для этого смешивали аликвоты калибраторов, подготовленных аналогично предыдущей серии экспериментов, но без использования аммиака, с растворами коллоидов с нормализованной числовой концентрацией до эквивалентных значений частиц в пределах 1010–1012 шт./мл (в зависимости от размера частиц каждого типа) в объемных соотношениях 1:9. Типичные спектры белка представлены на рис. 3.

Из представленных данных видно, что все коллоиды усиливают линии КР-спектра на диапазоне 400–1200 см<sup>-1</sup> и тушат линии 1200–1800 см<sup>-1</sup>. Это обстоятельство может послужить в дальнейшем при исследовании различных конформационных изменений гемоглобина, в частности, определения его

**Таблица 1.** Характеристики коллоидов Au и Ag наночастиц

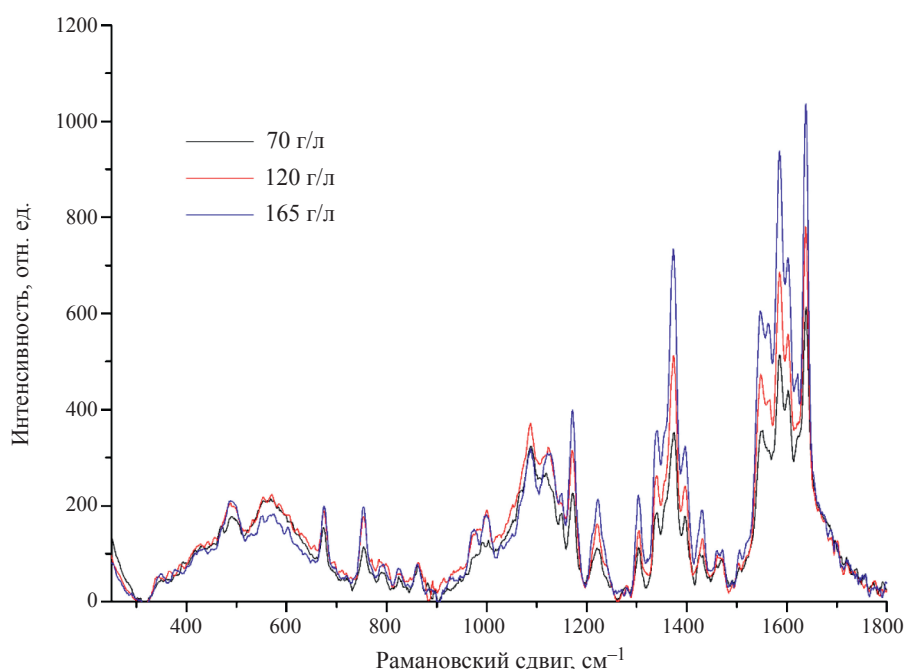
Образец	Тип геометрии	$\lambda_{\max}$ , нм	Размер, нм
AgNP416	сферический	416	20.0 ± 4.6
AgNP517	кубический	517	98.9 ± 9.7
AuNP533	полигональный	533	56.4 ± 7.2
AuNP762	звездообразный	762	82.4 ± 9.6
AuNP800	звездообразный	800	95.8 ± 16.4
AuNP1000	стержнеобразный	1000	(67.3 ± 7.1) × (12.4 ± 2.2)



**Рис. 1.** Спектры экстинкции (а). Типичные ПЭМ-изображения свежеприготовленных коллоидов наночастиц серебра и золота: наносферы AgNP416 (б); нанокубоиды AgNP516 (в); полигональные AuNP533 (г); нанозвезды AuNP762 (д); нанозвезды AuNP800 (е); наностержни AuNP1000 (ж). Масштабные штрихи составляют 100 нм.

гликированной формы. Сравнительный анализ показал, что хорошей корреляцией с концентрацией гемоглобина обладает только линия  $1375\text{ см}^{-1}$  КР-спектров, полученных с использованием коллоидов серебра (коэффициент линейной корреляции составил 0.9998), что говорит о возможности использования этого метода при определении гемоглобина. Варьирование соотношений объемов калибраторов и коллоидов не привело к улучшению результатов по другим линиям спектра. Таким образом для дальнейших экспериментов в качестве более целесообразного был выбран аммиачный способ определения гемоглобина.

Определение общего гемоглобина представляет собой, как правило, лабораторный метод анализа, что подразумевает отбор образцов крови их хранение и транспортировку. Для этих целей в современной практике используют антикоагулянты такие как ЭДТА и цитрат натрия. Здесь следует отметить, что их влияние на воспроизводимость КР-спектров гемоглобина до сих пор остается малоизученным. Поэтому в следующей серии экспериментов проводили сравнение корреляций интенсивности сигнала от содержания общего гемоглобина образцов крови в зависимости от используемого антикоагулянта.



**Рис. 2.** КР-спектры гемоглобина, подготовленного аммиачным методом.

**Таблица 2.** Корреляция средних значений интенсивности линий КР-спектра гемоглобина в зависимости от его концентрации

Линия спектра, см <sup>-1</sup>	Средняя интенсивность линии спектра			Коэффициент линейной корреляции
	70 г/л	120 г/л	165 г/л	
1173	198	280	384	0.9903
1221	104	177	223	0.9901
1338	210	280	374	0.9869
1373	385	546	756	0.9887
1397	185	256	328	0.9988
1429	95	150	205	0.9991
1547	300	415	530	0.9991
1587	460	620	860	0.9790
1602	347	466	610	0.9928
1637	530	730	990	0.9889

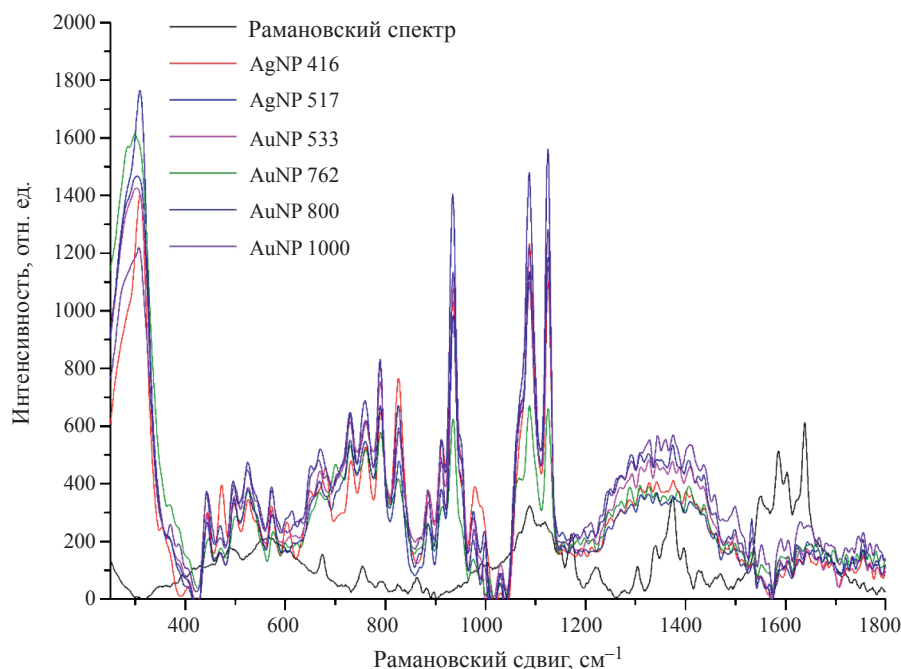
Исследовано две серии по 5 образцов крови испытуемых добровольцев с ЭДТА и цитратом натрия. Значения концентрации белка усредняли по 10 измерениям для каждой линии спектра и проводили сравнения с данными клинического анализа. Полученные результаты представлены в табл. 3.

Из представленных данных видно, что данные КР-спектроскопии показывают более слабую корреляцию с данными клинического анализа образцов крови с ЭДТА. Ни одна из линий спектра, показавшая ранее хорошую линейную зависимость сигнала от концентрации белка на калибраторах, не подтвердила данную зависимость на исследованных образцах. Во многих

случаях результаты для более высоких концентраций получались ниже, чем для более низких. Это говорит о сильном влиянии ЭДТА на конечный результат. В случае цитрата натрия все линии, наоборот, показали неплохую корреляцию с данными клинического анализа. Все значения концентрации белка показывали закономерный рост для каждой линии спектра.

Для подтверждения полученных данных для цитрата натрия исследовали 50 образцов крови. Значения концентрации белка усредняли по 10 измерениям для каждой линии спектра и проводили сравнения с данными клинического анализа. Полученные результаты представлены на рис. 4.





**Рис. 3.** SERS-спектры гемоглобина, полученные с использованием коллоидов AgNP416, AgNP517, AuNP533, AuNP762, AuNP800, AuNP1000, в сравнении с КР-спектром белка (концентрация 70 г/л).

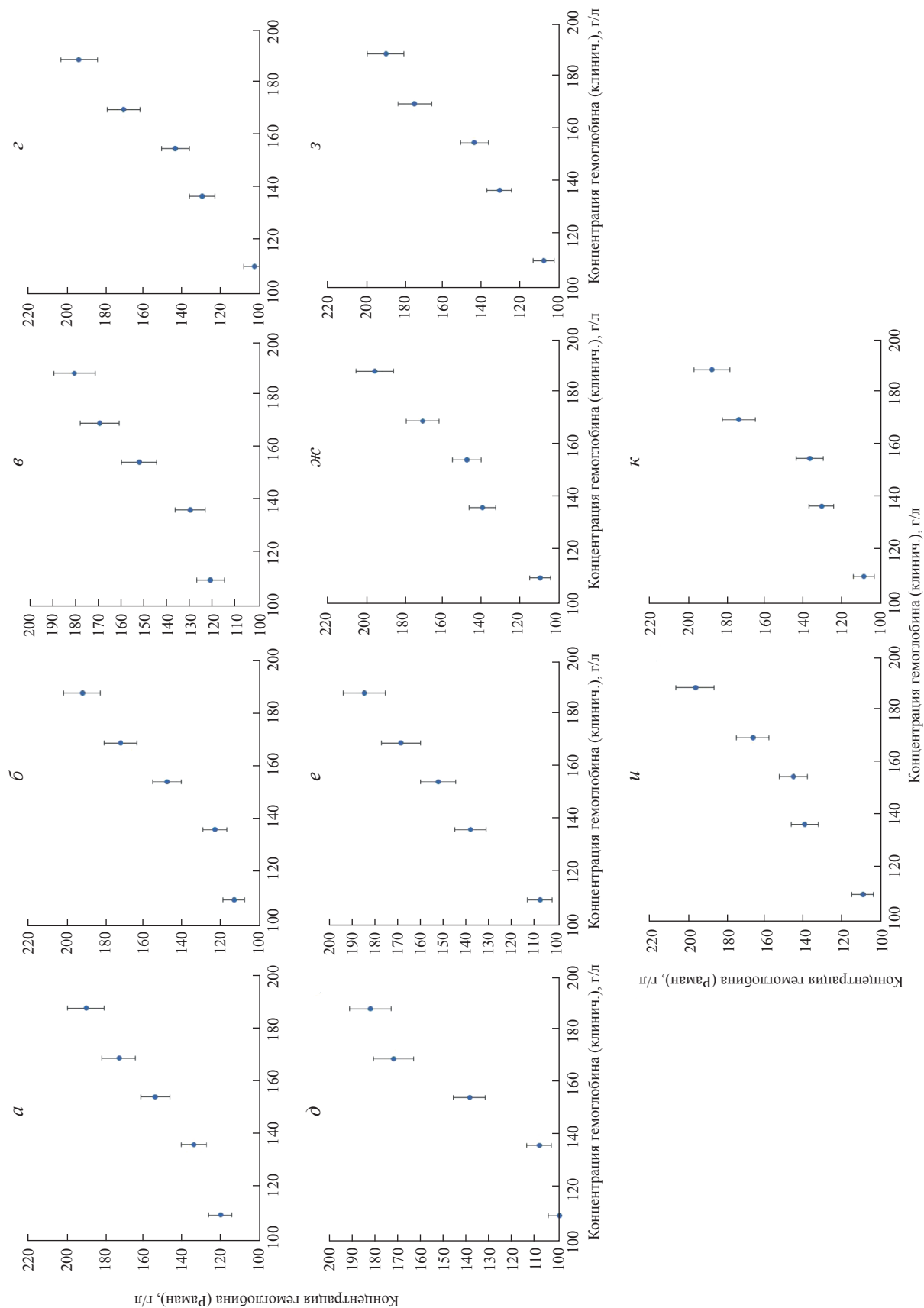
**Таблица 3.** Зависимость корреляции содержания гемоглобина в крови от используемого антикоагулянта

Концентрация общего гемоглобина крови, г/л										
Клини- ческий анализ	КР-спектроскопия									
	Линия спектра, см <sup>-1</sup>									
	1173	1221	1338	1373	1397	1429	1547	1587	1602	1637
ЭДТА										
137	120	127	115	114	113	129	115	115	111	109
138	131	139	140	125	136	134	138	132	137	130
140	139	139	135	132	119	139	132	129	139	141
145	137	132	134	129	129	138	131	130	130	128
189	145	158	146	169	160	149	120	166	140	175
Цитрат натрия										
110	122	113	120	103	101	108	109	108	109	108
133	132	123	127	116	109	120	115	117	112	120
137	134	142	144	130	141	138	140	131	140	131
155	154	148	152	138	144	139	152	135	146	137
189	190	192	190	187	192	184	197	190	197	188

Как видно из представленных данных, результаты КР-спектроскопии хорошо коррелируют с результатами клинического анализа при определении общего гемоглобина крови. В ряде случаев, для линий 1397, 1602 и 1637 см<sup>-1</sup>, наблюдаются существенные отклонения от линейной зависимости, при сохранении общей тенденции к росту сигнала. Такие отклонения могут быть исполь-

зованы в дальнейшем при исследовании различных конформационных изменений молекулы гемоглобина, связанных с индивидуальными особенностями организма.

SERS-измерения и интерпретация результатов выполнены при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-72-30003). Работы по синтезу и характеристике коллоидных



**Рис. 4.** Корреляция данных концентрации общего гемоглобина в крови для линий: 1173 (а), 1221 (б), 1338 (в), 1397 (г), 1429 (е), 1547 (ж), 1587 (з), 1602 (и) и 1637  $\text{cm}^{-1}$  (к).



растворов наночастиц выполнены в рамках государственного задания ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России «Разработка технологии создания перспективных тест-систем на основе высокоразрешающих флуоресцирующих ДНК-нанометок для молекулярно-цитогенетической диагностики хромосомных болезней» (регистрационный номер 124020300001-9).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кишкун А.А. Клиническая лабораторная диагностика: учебное пособие. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. 837 с.
2. Лифшиц В.М., Сидельникова В.И. Биохимические анализы в клинике, Справочник. М.: Мед. информ. агент., 2001. 303 с.
3. Еремина О.Е., Семенова А.А., Сергеева Е.А. и др. // Усп. химии. 2018. Т. 8. С. 741; Eremina O.E., Semenova A.A., Sergeeva E.A. et al. // Russ. Chem. Rev. 2018. V. 87. No. 8. P. 741.
4. Шлюкер С. Поверхностно-усиленная рамановская спектроскопия: аналитические, биофизические и биомедицинские приложения. М.: Техносфера, 2017. 332 с.
5. Blazej D.C., Petricolas W.L. // J. Chem. Phys. 1980. V. 72. No. 5. P. 3134.
6. Gonzales-Viveros N., Castro-Ramos J., Gomez-Gil P., Cerecedo-Nunez H.H. // Spectrochim. Acta. 2021. V. 247. No. 2. Art. No. 119077.
7. Barman I., Dingari N.C., Kang J.W. et al. // Analyt. Chem. 2012. V. 84. No. 5. P. 2474.
8. Wood B.R., Kochan K., Marzec K.M. // In: Vibrational spectroscopy in protein research. Acad. Press, 2020. P. 375.
9. Pandey R. // PostDoc J. 2015. V. 3. No. 2. P. 8.
10. Аблаев Н.П. // Химия и жизнь. 2010. № 10. С. 19.
11. Балаховский С.Д., Балаховский И.С. Методы химического анализа крови. Изд. Медгиз, 1953. 746 с.
12. Leopold N., Lendl B. // J. Phys. Chem. B. 2003. V. 107. P. 5723.
13. Субекин А.Ю., Пылаев Т.Е., Кукушкин В.И. и др. // Изв. РАН. Сер. физ. 2024. Т. 88. № 2. С. 211; Subekin A.Y., Pylaev T.E., Kukushkin V.I. et al. // Bull. Russ. Acad. Sci. Phys. 2024. V. 88. No. 2. P. 178.
14. Zheng Y., Zhong X., Li Zh., Xia Y. // Part. Part. Syst. Charact. 2014. V. 31. P. 266.
15. Grabar C.R., Freeman G., Hommer M.B., Natan M.J. // Analyt. Chem. 1995. V. 67. P. 735.
16. Kumar S.P., Pastoriza-Santos I., Rodriguez-Gonzalez B. et al. // Nanotechnology. 2008. V. 19. No. 1. Art. No. 015606.
17. Graf C., Vossen D.L.J., Imhof A., van Blaaderen A. // Langmuir. 2003. V. 19. P. 6693.
18. Yuan H., Khoury C.G., Hwang H. et al. // Nanotechnology. 2012. V. 23. Art. No. 07510.
19. Khlebtsov B.N., Khanadeev V.A., Panfilova E.V., Khlebtsov N.G. // J. Nanopart. Res. 2014. V. 16. Art. No. 2623.
20. Ye X., Zheng Ch., Chen J. et al. // Nano Lett. 2013. V. 13. P. 765.
21. Khlebtsov B.N., Khanadeev V.A., Ye J. et al. // Langmuir. 2014. V. 30. P. 1696.
22. Лопатина Н.И., Геронимус А.Л. // Лаб. дело. 1976. № 6. С. 328.

## Study of the capabilities of Raman spectroscopy in identifying the content of total hemoglobin in human blood

A. Yu. Subekin<sup>a,b,\*</sup>, T. E. Pylaev<sup>c</sup>, V. I. Kukushkin<sup>b</sup>, E. V. Rudakova<sup>d</sup>, T. D. Rudakov<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, 141701 Russia

<sup>b</sup> Osipyan Institute of Solid-State Physics of the Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, 142432 Russia

<sup>c</sup> Razumovsky Saratov State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saratov, 410000 Russia

<sup>d</sup> Institute of Physiologically Active Compounds at Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, 142432 Russia

\*e-mail: alexey.subekin@gmail.com

The possibility of using Raman spectroscopy in determining the total hemoglobin content in the blood was investigated. It has been established that a few lines in the Raman spectrum linearly depend on the hemoglobin concentration. It has been shown that SERS using silver colloids also gives a linear concentration dependence on the intensity of spectral lines

**Keywords:** Raman scattering, hemoglobin, silver nanoparticles.