

на правах рукописи



Маркина Наталья Евгеньевна

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ СУЛЬФАНИЛАМИДНЫХ
И ЦЕФАЛОСПОРИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ В МОЧЕ
МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ ГИГАНТСКОГО
КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ**

02.00.02 – аналитическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Саратов 2020

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

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Горячева Ирина Юрьевна

Официальные оппоненты: **Апяри Владимир Владимирович**,
доктор химических наук,
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,
старший научный сотрудник
кафедры аналитической химии

Панфилова Елизавета Викторовна,
кандидат химических наук,
ФГБУН «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук» (г. Саратов),
научный сотрудник
лаборатории нанобиотехнологии

Ведущая организация: **ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»**

Защита состоится 24 декабря в 14 часов на заседании диссертационного совета Д 212.243.07 по химическим наукам при ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского» по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83, корпус 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке имени В.А. Артисевич ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского» (410012, ул. Университетская, 42) и на сайте:

<https://www.sgu.ru/research/dissertation-council/d-212-243-07/kandidatskaya-dissertaciya-markinoy-natali-evgenevny>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2020 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор химических наук



Русанова Т.Ю.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния света (ГКР)¹ является относительно новым методом колебательной спектроскопии поверхности. Метод основан на регистрации усиленных спектров комбинационного рассеяния (КР) молекул, непосредственно адсорбированных на поверхности ГКР-активных материалов (ГКР подложек), таких как металлические наночастицы (НЧ) и различные наноструктурированные композитные материалы. Благодаря возможности идентификации аналитов по специфичным колебательным пикам в усиленных спектрах КР, низким пределам обнаружения (ПрО), небольшим затратам времени на проведение анализа и доступности портативных спектрометров, спектроскопия ГКР предложена в качестве перспективного метода для проведения химического и биохимического анализа.

В частности, весьма многообещающим направлением является применение ГКР для терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ), например, антибиотиков и противоопухолевых препаратов в крови и моче. Данное направление особенно важно при лечении людей с нарушением функций почек, у которых может происходить накопление лекарственных препаратов в организме, что приводит к усилению их побочных эффектов. Анализ мочи методом ГКР представляет особый интерес для ТЛМ, поскольку сбор образцов мочи не требует специальной квалификации, прост, неинвазивен и безболезнен по сравнению с забором крови.

Однако текущий уровень развития спектроскопии ГКР пока не позволяет использовать его в качестве рутинного метода для биоанализа. Так, основным недостатком метода ГКР является низкая селективность, вызванная конкурентными взаимодействиями между молекулами аналита и другими компонентами биожидкостей за адсорбционные центры на поверхности ГКР подложки. Данный недостаток приводит к тому, что в случае анализа мочи методом ГКР всегда присутствует сильный и меняющийся фоновый сигнал. К сожалению, в современных исследованиях по применению ГКР как в ТЛМ, так и других областях (био)анализа данному факту уделяется мало внимания, что существенно тормозит развитие аналитических приложений ГКР. Поэтому

¹ ГКР – гигантское комбинационное рассеяние света, КР – комбинационное рассеяние, НЧ – наночастицы, ПрО – предел обнаружения, ТЛМ – терапевтический лекарственный мониторинг, НТФЭ – неударживающая твердофазная экстракция, ЖЖЭ – жидкость-жидкостная экстракция, СНЧ – серебряные наночастицы, ТФЭ – твердофазная экстракция, КРН – креатинин, МК – мочевиная кислота, УБЛ – уробилин, ЦТР – цефтриаксон, ЦЗЛ – цефазолин, ЦПР – цефоперазон, СМЗ – сульфаметоксазол, СДМ – сульфадиметоксин, ПЕИ – полиэтиленмин, УМ – утренняя моча, ДМ – дневная моча, Р6Ж – родамин 6Ж, ФС – Фотосенс, ДОС – диапазон определяемых содержаний, КУ – коэффициент усиления, S – степень сорбции, R – степень извлечения, s_r – относительное стандартное отклонение

исследования по снижению уровня фонового сигнала и увеличению надежности анализа методом ГКР, а также созданию достаточно универсальных методик, пригодных для определения различных представителей антибиотиков одного класса, являются крайне актуальными.

Таким образом, **цель диссертационной работы** заключается в разработке подходов к контролю уровня фонового сигнала ГКР и надежному определению методом ГКР антибиотиков в моче на примере представителей сульфаниламидных и цефалоспориновых препаратов. Для достижения поставленной цели решали следующие **задачи**:

- установление компонентов мочи, обладающих интенсивным спектром ГКР и ответственных за формирование фонового сигнала ГКР мочи;
- изучение влияния величины рН и степени разбавления мочи на уровень фонового сигнала ГКР мочи и возможность определения антибиотиков в моче;
- разработка и оптимизация методики совмещения неударживающей твердофазной экстракции (НТФЭ) и ГКР с целью уменьшения фонового сигнала при определении некоторых цефалоспориновых антибиотиков в моче;
- разработка и оптимизация методики совмещения жидкость-жидкостной экстракции (ЖЖЭ) и ГКР с целью уменьшения фонового сигнала при определении некоторых сульфаниламидных антибиотиков в моче;
- синтез и характеристика ГКР-активного материала с улучшенной сорбционной способностью (ГКР-активный сорбент) на основе магнитоуправляемых микрочастиц карбоната кальция со встроенными серебряными наночастицами (СНЧ) для совмещения твердофазной экстракции (ТФЭ) и детектирования методом ГКР в одном материале;
- оценка возможности разработанного ГКР-активного сорбента концентрировать исследуемые сульфаниламидные и цефалоспориновые антибиотики и проводить их отделение от фонообразующих компонентов при определении в моче.

Методы и объекты исследования

Для решения поставленных задач применяли комплекс физических методов исследования: спектроскопия КР, спектрофотометрия, флуориметрия, метод динамического рассеяния света, сканирующая электронная микроскопия. В качестве объектов в исследовании использовали образцы мочи добровольцев, органические компоненты мочи (мочевина, креатинин (КРН), мочевая кислота (МК), уробилин (УБЛ)), цефалоспориновые антибиотики (цефтриаксон (ЦТР), цефазолин (ЦЗЛ), цефоперазон (ЦПР)), сульфаниламидные антибиотики (сульфаметоксазол (СМЗ), сульфадиметоксин (СДМ)).

Научная новизна работы

Установлены основные компоненты мочи, ответственные за формирование фонового сигнала ГКР, и изучено влияние величины рН и разбавления на интенсивность их сигнала.

Разработаны методики совмещения анализа методом ГКР с НТФЭ и ЖЖЭ для определения цефалоспоринов и сульфаниламидов в моче, соответственно. Показано, что оба варианта экстракции позволили исключить как фоновый сигнал, так и влияние компонентов мочи на интенсивность аналитического сигнала антибиотиков.

Синтезирован новый ГКР-активный сорбент на основе микрочастиц карбоната кальция со встроенными СНЧ, способный сорбировать как положительно, так и отрицательно заряженные аналиты благодаря модификации поверхности сорбента полиэлектролитом. Продемонстрировано снижение ПрО примерно на два порядка по сравнению с исходными СНЧ за счёт их встраивания в пористую матрицу и дополнительного концентрирования аналита.

Продемонстрирована возможность использования полученного ГКР-активного сорбента для определения в моче как цефалоспориновых, так и сульфаниламидных антибиотиков методом ГКР.

Практическая значимость работы

Выявлены основные фонообразующие компоненты мочи, препятствующие надёжному определению методом ГКР аналитов в моче. Предложены подходы по увеличению надёжности ТЛМ методом ГКР путём его совмещения с экстракционными методами (НТФЭ, ТФЭ, ЖЖЭ). Разработано несколько простых и быстрых методик определения цефалоспориновых и сульфаниламидных антибиотиков в моче в диапазоне концентраций, необходимом для проведения ТЛМ. Создан магнитоуправляемый ГКР-активный сорбент, позволяющий как концентрировать некоторые соединения, так и усиливать их спектры ГКР, что привело к сокращению времени анализа за счёт исключения этапа элюирования. Практическая применимость разработанных протоколов анализа подтверждена их тестированием с использованием образцов мочи добровольцев с различным содержанием фонообразующих компонентов (образцы утренней и дневной мочи).

Основные результаты исследований, выносимые на защиту:

- источники фонового сигнала ГКР мочи и факторы, влияющие на его интенсивность: присутствие определенных компонентов мочи и варьирование степени разбавления и значения рН мочи;
- методика устранения фонового сигнала ГКР мочи при определении представителей цефалоспориновых антибиотиков за счёт предварительного проведения НТФЭ;
- методика увеличения надёжности определения методом ГКР представителей сульфаниламидных антибиотиков в моче путём предварительного проведения ЖЖЭ;
- методика синтеза нового магнитоуправляемого ГКР-активного сорбента на основе микрочастиц карбоната кальция, содержащих СНЧ и НЧ магнетита;

- подход к одновременному концентрированию на ГКР-активном сорбенте представителей цефалоспориновых и сульфаниламидных антибиотиков, их отделению от компонентов мочи и определению методом спектроскопии ГКР.

Личный вклад соискателя заключался в постановке задач, а также в выполнении основных теоретических и экспериментальных работ по ключевым направлениям исследования. В диссертации обобщены результаты, полученные лично автором и совместно с соавторами публикаций.

Апробация работы. Основные результаты работы доложены на конференциях: XII Всероссийская интерактивная (с международным участием) конференция молодых ученых «Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии» (Россия, Саратов, 2017); IX научно-практическая конференция «Presenting Academic Achievements to the World» (Россия, Саратов, 2017), Всероссийская научная школа-семинар «Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине – 2018» (Россия, Саратов, 2018); IV, V и VI Международный Симпозиум по оптике и биофотонике (Россия, Саратов, 2016, 2017, 2018), VII Всероссийская научная школа-семинар «Взаимодействие СВЧ, терагерцового и оптического излучения с полупроводниковыми микро- и наноструктурами, метаматериалами и биообъектами» (Россия, Саратов, 2020).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 12 работ, включая 4 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК и библиографические базы данных Web of Science и Scopus, 5 статей в сборниках научных трудов, 3 тезисов докладов конференций.

Финансовая поддержка работы осуществлялась в рамках следующих проектов: гранты РНФ № 14-13-00229 и 18-13-00081, гранты Министерства образования и науки РФ № 4.1063.2017/4.6 и FSRR-2020-0002, совместный грант Германской службы академических обменов (DAAD) и Министерства образования и науки Российской Федерации № 20.9966.2017/5.2.

Объем, логика и структура работы обусловлены поставленной целью и сформулированными задачами исследования, а также требованиями, предъявляемыми к диссертационным работам. Диссертация состоит из введения, шести глав, заключения и списка использованных источников. В тексте работы содержатся таблицы, схемы и графические иллюстрации. Общий объем диссертации составляет 142 страницы, включая 55 рисунков и 10 таблиц.

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.

Первая глава посвящена критическому анализу литературы, в котором рассмотрены последние достижения в области применения спектроскопии ГКР для определения лекарств в биожидкостях человека. Проанализирована

зависимость аналитического и фонового сигналов от таких факторов, как образование «горячих точек» и состав используемого стабилизатора в ГКР подложках, природа аналита и заряд на поверхности ГКР подложки. Рассмотрены подходы к получению и применению ГКР-активных сорбентов для увеличения селективности и чувствительности анализа.

Во **второй главе** приведены сведения об используемых реагентах, материалах и оборудовании, методиках синтеза и проведения анализа методом ГКР.

ГКР подложки

В качестве ГКР подложек при совмещении НТФЭ и ЖЖЭ с ГКР для определения в моче цефалоспориновых и сульфаниламиновых антибиотиков (главы 3–5) использовали СНЧ, стабилизированные молекулами гидроксиламина (рисунок 1а; 44 ± 7 нм, ζ -потенциал ~ 0 мВ). Основными преимуществами данных СНЧ являются коллоидная стабильность (более 1 месяца), простота и высокая скорость синтеза (~ 5 мин), проводимого при комнатной температуре, а также отсутствие фонового сигнала от молекул стабилизатора, что увеличивает надежность анализа.

В качестве ГКР подложек при совмещении удерживающей ТФЭ и ГКР при определении представителей обоих классов антибиотиков (глава 6) использовали ГКР-активный сорбент на основе сферических микрочастиц CaCO_3 со встроенными СНЧ и НЧ магнетита ($\text{CaCO}_3\text{-Ag-Fe}$). Встраивание НЧ в CaCO_3 проводили простым и быстрым способом соосаждения, заключающимся в одновременном добавлении растворов прекурсоров CaCO_3 (Na_2CO_3 и CaCl_2) к раствору, содержащему НЧ магнетита (~ 50 нм, ζ -потенциал ~ -40 мВ) и СНЧ, стабилизированные цитрат-ионами (67 ± 16 нм, ζ -потенциал ~ -44 мВ). Сферическая форма микрочастиц композита (3.8 ± 0.8 мкм, рисунок 1б,в) свидетельствует о том, что матрица CaCO_3 имеет структуру ватерита и встраивание СНЧ и НЧ магнетита не влияет на кристаллическую решётку матрицы.

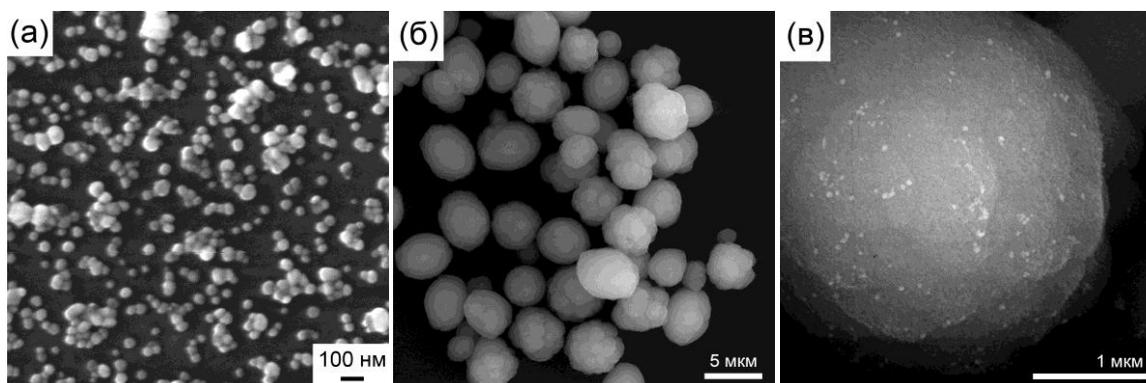


Рисунок 1. СЭМ изображения (а) наночастиц серебра, стабилизированных гидроксиламином, и (б,в) микрочастиц CaCO_3 со встроенными наночастицами серебра и магнетита.

Благодаря встроенным отрицательно заряженным НЧ значение ζ -потенциала микрочастиц $\text{CaCO}_3\text{-Ag-Fe}$ должно быть сдвинуто в сторону более отрицательных значений по сравнению с исходными микрочастицами CaCO_3 . Для придания поверхности сорбента положительного заряда проведено модифицирование поверхности микрочастиц путём нанесения слоя молекул положительно заряженного полиэлектролита полиэтиленimina (ПЭИ) ($(\text{CaCO}_3\text{-Ag-Fe})@\text{ПЭИ}$).

Измерения ГКР

Регистрацию спектров ГКР проводили с помощью спектрометров КР, совмещенных с оптическими микроскопами. Результаты, представленные в главах 3 и 5, получены с использованием спектрометра Alpha300 RS (WITec, Германия) с возбуждающим излучением 488 нм. Результаты, представленные в главах 4 и 6, получены на базе нанолаборатории Интегра-Спектра (NT-MDT, Россия) с использованием спектрометра КР (СОЛАР, Беларусь) с возбуждающим излучением 473 нм. Важно отметить, что СНЧ были выбраны в качестве основы ГКР подложек, поскольку длины волн эмиссии используемых источников возбуждения частично попадают в полосу поверхностного плазмонного резонанса в спектрах экстинкции СНЧ, что также способствует достижению максимального усиления сигнала КР.

Образцы мочи

Тестирование протоколов анализа проводили с использованием образцов мочи здоровых добровольцев (20–40 лет, 3 женщины, 8 мужчин). Для учета варьирования концентрации компонентов мочи использовали образцы собранные как в утреннее (УМ), так и в дневное (ДМ) время. В главе 5 использовали пять образцов мочи, предоставленных пациентами с онкологическими заболеваниями. Предварительный анализ образцов мочи, включавший измерение рН и содержания белка, кетонов и глюкозы, показал, что все указанные параметры не выходили за пределы нормальных значений во всех исследуемых образцах.

В ходе работы проводили искусственное добавление растворов антибиотиков к образцам мочи (1% от общего объема), а образцы без добавки лекарств использовали в качестве контрольных. Правильность определения антибиотиков в моче с помощью разработанных методик оценивали методом «введено–найдено».

В **третьей главе** представлены результаты изучения спектров ГКР мочи и проведено определение основных фонообразующих компонентов мочи и условий, при которых достигается минимальный уровень сигнала от данных компонентов. Из литературных данных известно, что белки и неорганические компоненты мочи имеют слабый сигнал ГКР, поэтому в качестве основных фонообразующих компонентов рассмотрены такие органические соединения, как мочевины, КРН, МК и УБЛ. Для уменьшения интенсивности сигнала данных компонентов и фонового сигнала ГКР мочи предложено использование

разбавления мочи, приводящее к уменьшению конкурентных взаимодействий на поверхности СНЧ, и изменения величины рН, влияющей на адсорбцию молекул на поверхности СНЧ и, как следствие, интенсивность сигнала ГКР.

Установлено, что спектры индивидуальных компонентов мочи имеют максимальный сигнал в щелочной среде (рисунок 2). Данный факт обусловлен усилением донорно-акцепторных взаимодействий между неподелёнными электронными парами аминогрупп и депротонированных карбоксильных групп молекул с поверхностью СНЧ. В кислой среде спектры ГКР удалось зарегистрировать только в случае мочевины и УБЛ. Сигнал значительной интенсивности в случае мочевины предположительно вызван её очень высокой концентрацией в моче (25 мг/мл) и существенным вкладом сигнала КР в конечный спектр ГКР. В случае УБЛ сохранение спектров в кислой среде предположительно вызвано сильным гидрофобным взаимодействием УБЛ с поверхностью СНЧ за счёт большого размера молекулы и наличия в его структуре гидрофобных пиррольных фрагментов.

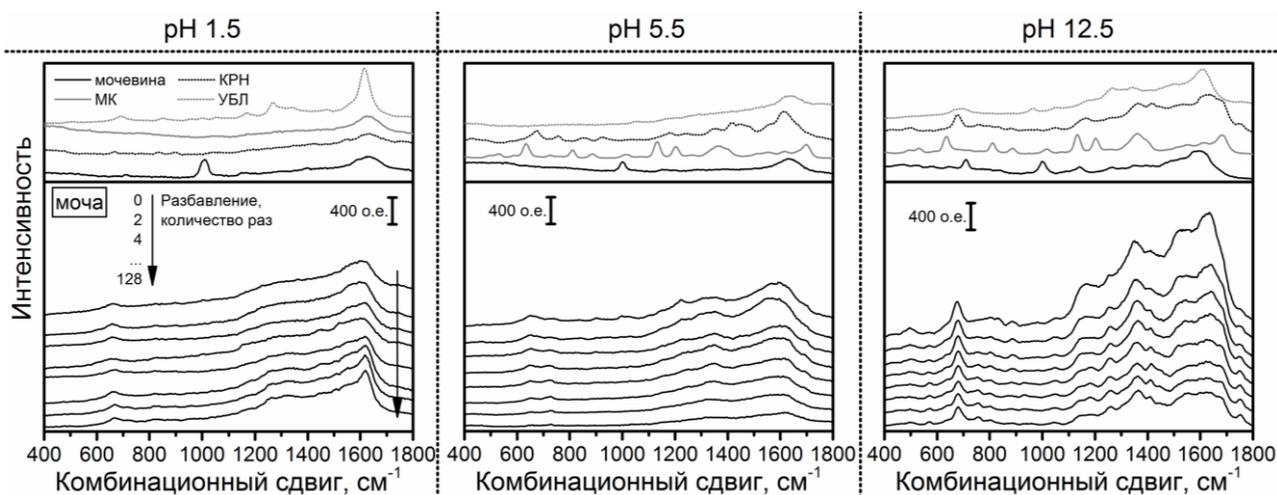


Рисунок 2. Влияние величины рН и степени разбавления мочи на спектры ГКР образцов мочи; результаты получены с использованием десяти образцов мочи. Профили спектров мочевины, креатинина (КРН), мочевой кислоты (МК) и уробилина (УБЛ) приведены в качестве контролей.

Анализ спектров ГКР образцов мочи (рисунок 2) показал, что в кислой и щелочной средах основными фонообразующими компонентами мочи являются УБЛ и КРН, соответственно, причём разбавление мочи не приводит к значительному уменьшению сигнала обоих компонентов. Данный результат свидетельствует как о высокой концентрации метаболитов по отношению к площади поверхности СНЧ, так и об их достаточно сильном взаимодействии с поверхностью СНЧ. С другой стороны, несмотря на высокую концентрацию в моче мочевины, величина её вклада незначительна и разбавление водой приводит к ещё большему снижению этого вклада, что связано со слабым взаимодействием мочевины с поверхностью ГКР подложки (по сравнению с другими компонентами мочи) и присущей ей низкой активности КР.

В нейтральной среде интенсивность фонового сигнала является наименьшей, а его профиль не обладает ярко выраженными пиками ГКР. Таким образом, наиболее надежное детектирование лекарств в моче ожидается при нейтральных значениях рН. Однако, в нейтральной среде сигнал ГКР как цефалоспориновых, так сульфаниламидных антибиотиков не достигает максимального значения (по сравнению с кислой или щелочной средами), что приводит к значениям ПрО, недостаточным для осуществления ТЛМ.

Четвёртая глава посвящена разработке методики определения некоторых представителей цефалоспориновых антибиотиков (ЦТР, ЦЗЛ, ЦПР) в моче методом ГКР при совмещении с НТФЭ. Методика анализа включает удаление мешающих компонентов путём пропускания образца мочи через слой сорбента (силикагель) и последующую регистрацию спектров ГКР очищенного раствора.

В ходе предварительных исследований установлено, что изменение рН среды приводит к изменению профилей спектров ГКР цефалоспоринов; максимальный сигнал ГКР наблюдается при высоких значениях рН (~12, рисунок 3а). Данный факт предположительно связан с гидролизом и раскрытием бета-лактамного цикла в щелочной среде, что приводит к образованию второй депротонированной карбоксильной группы и улучшению взаимодействия молекул цефалоспоринов с СНЧ. Однако в щелочной среде моча также имеет сильный фоновый сигнал (рисунок 2), что делает невозможным определение цефалоспоринов без предварительного этапа разделения.

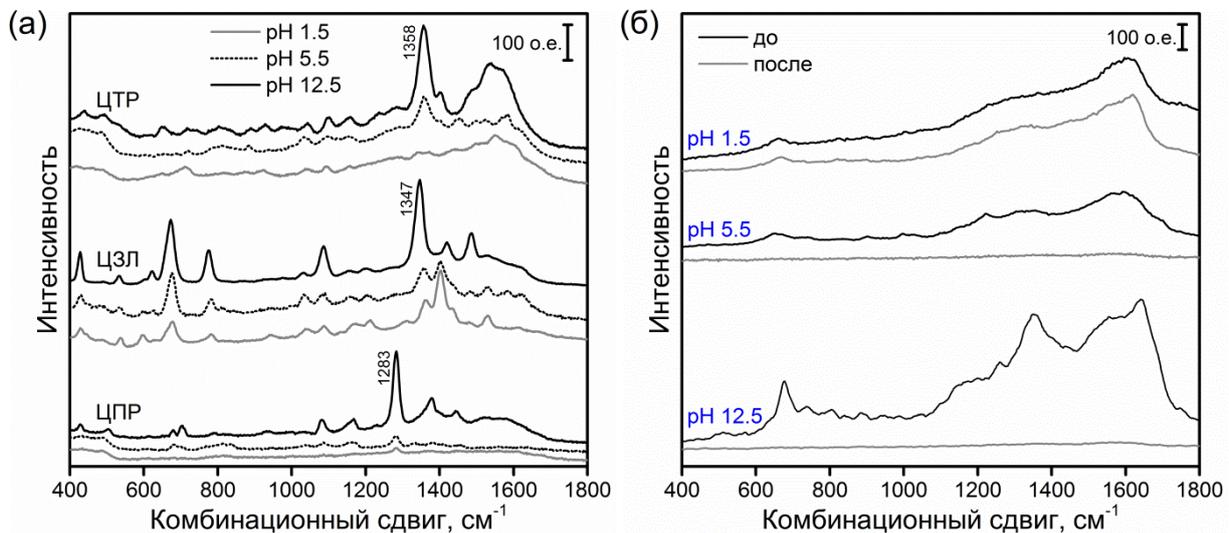


Рисунок 3. (а) Влияние величины рН на спектры ГКР цефтриаксона (ЦТР), цефазолина (ЦЗЛ) и цефоперазона (ЦПР) (25 мкг/мл). (б) Влияние величины рН мочи на спектры ГКР до и после пропускания через колонку с силикагелем.

В качестве метода разделения предложено использование НТФЭ на силикагеле как простого и быстрого подхода. Установлено, что настройка рН мочи перед пропусканием её через колонку влияет на эффективность удерживания силикагелем фонообразующих компонентов мочи (рисунок 3б). Так, профиль спектра подкисленного образца мочи остаётся неизменным до и

после пропускания через силикагель, что говорит о беспрепятственном прохождении УБЛ через сорбент и неэффективности данных условий НТФЭ для снижения фонового сигнала. С другой стороны, фоновый сигнал мочи в нейтральной и щелочной средах полностью исчезает после стадии НТФЭ. Предварительные исследования методом спектрофотометрии показали, что в щелочной среде цефалоспорины демонстрируют минимальную сорбцию на силикагеле (45–50%), в то время как адсорбция КРН максимальна (80–90%) (рисунок 4а). Данные результаты объясняют высокую эффективность настройки рН мочи до щелочных значений перед её пропусканием через силикагель и достижение максимальной эффективности НТФЭ за счёт устранения сигнала фонообразующих компонентов мочи (в первую очередь КРН; рисунок 4б).

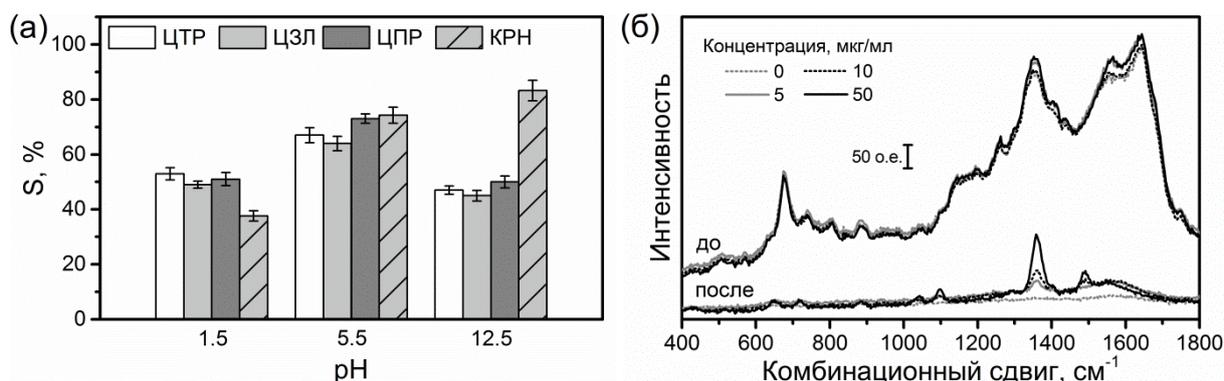


Рисунок 4. (а) Влияние рН среды на степень сорбции (S) на силикагеле анализатов (20 мкг/мл; ЦТР – цефтриаксон, ЦЗЛ – цефазолин, ЦПР – цефоперазон) и креатинина (КРН; 2 мг/мл). (б) Спектры ГКР образца мочи с добавкой ЦТР разной концентрации до и после пропускания через колонку с силикагелем.

Итоговый протокол определения цефалоспоринов в моче методом ГКР занимает не более 15 мин (включая этап пробоподготовки) и включает: (1) доведение рН мочи до 12.5 для максимизации как интенсивности сигнала ГКР, так и эффективности очистки от фонообразующих компонентов мочи; (2) очистку анализатов от компонентов мочи путём проведения НТФЭ с использованием колонки с силикагелем; (3) определение концентрации очищенных анализатов методом ГКР с использованием СНЧ.

С учетом фармакокинетических данных по концентрации исследуемых антибиотиков в моче людей, страдающих от почечной недостаточности, определение цефалоспоринов методом ГКР проводили в диапазоне концентраций 5–200 мкг/мл. Поскольку ГКР подразумевает адсорбцию молекул анализата на поверхности ГКР подложки, то построение конечных градуировочных зависимостей проводили в логарифмических координатах, т.е. в виде изотерм адсорбции Фрейндлиха (адсорбция на энергетически гетерогенных поверхностях), которые имеют линейный вид внутри исследуемого диапазона концентраций.

Согласно метрологическим характеристикам методики НТФЭ-ГКР определения цефалоспоринов в моче (таблице 1), надежность определения ЦПР

уступает таковой для ЦТР и ЦЗЛ, что, возможно, обусловлено более слабым взаимодействием ЦПР с поверхностью СНЧ (рисунок 3а). Поэтому изменение матрицы мочи (например, повышение концентрации внутренних компонентов мочи) будет максимально влиять на надежность определения именно ЦПР, о чем также свидетельствует повышение погрешности сигнала ЦПР (s_r).

Таблица 1. Метрологические характеристики НТФЭ-ГКР определения цефалоспоринов в моче; диапазон определяемых содержаний 5–200 мкг/мл. Результаты получены с использованием пяти образцов мочи.

| Аналит, пик ГКР | Уравнение градуировочного графика | s_r , % | ПрО, мкг/мл | Правильность, % |
|-------------------------------|--|-----------|----------------|--------------------|
| ЦТР, 1358 см^{-1} | $\lg(y) = 0.56 \cdot \lg(x) + 1.13$ $R^2 = 0.997$ | 16–22 | 0.4 | 94–102 |
| ЦЗЛ, 1347 см^{-1} | $\lg(y) = 0.85 \cdot \lg(x) + 0.48$ $R^2 = 0.997$ | 17–24 | 1.8 | 94–106 |
| ЦПР, 1283 см^{-1} | $\lg(y) = 0.95 \cdot \lg(x) + 0.17$ $R^2 = 0.996$ | 16–31 | 6.3 | 96–104 |

Пятая глава посвящена разработке и оптимизации методики совмещения ЖЖЭ и ГКР с целью уменьшения фонового сигнала при определении некоторых сульфаниламидных антибиотиков в моче.

В качестве аналитов использовали два представителя сульфаниламидных антибиотиков (СМЗ и СДМ), которые имеют интенсивные спектры как в кислой, так и в щелочной средах (рисунок 5), однако их сигнал ГКР в нейтральной среде отсутствует. Согласно литературным данным, сорбция СМЗ и СДМ на поверхности НЧ происходит с участием сульфонильной группы и π -электронов бензольного кольца, что приводит к доминированию пиков этих групп в спектрах: пики при 1076 и 1110 см^{-1} соответствуют сульфонильной группе, а пики при 1590 см^{-1} соответствуют колебаниям бензольного кольца (рисунок 5).

Важно отметить, что в кислой среде оба вещества имеют одинаковые профили и интенсивности спектров ГКР. Это свидетельствует об идентичном механизме генерации аналитического сигнала и преимущественном включении сульфаниламидного фрагмента в генерацию сигнала ГКР, независимо от дополнительной функциональной группы, присоединенной через сульфонамидную связь (рисунок 5а). Данный факт делает использование подкисленных растворов аналитов более предпочтительным для анализа, поскольку это позволяет создать более универсальную методику определения и снизить фоновый сигнал мочи, обусловленный КРН (рисунок 2). Также определены оптимальные концентрации добавок NaOH и HCl для настройки pH, при которых интенсивность сигнала ГКР достигает максимального значения; в щелочной среде интенсивность сигнала больше примерно в два раза. С помощью метода динамического рассеяния света установлено, что степень агрегации СНЧ достигает максимального значения при оптимальных значениях pH, что говорит о

высоком вкладе «горячих точек» между агрегированными СНЧ в формирование сигнала ГКР.

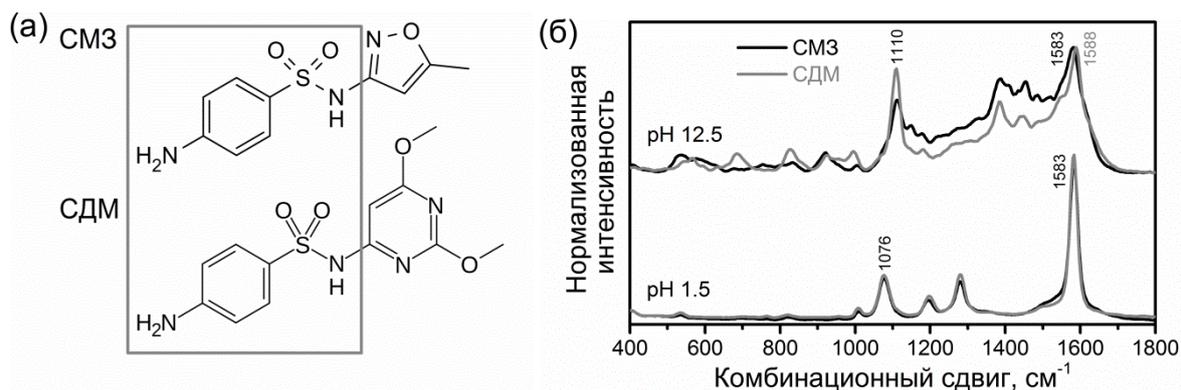


Рисунок 5. (а) Структурные формулы сульфаметоксазола (СМЗ) и сульфадиметоксина (СДМ). (б) Профили спектров ГКР растворов СМЗ и СДМ в щелочной и кислой средах.

Предварительные исследования по определению СМЗ и СДМ в образцах УМ и ДМ показали возможность регистрации спектров ГКР аналитов в подкисленных образцах мочи. Однако уровни фонового сигнала в спектрах УМ и ДМ существенно различаются; использование разбавления мочи не позволяет устранить влияния матрицы мочи с разной концентрацией внутренних компонентов. Таким образом, разработка протокола для определения сульфаниламидов в моче методом ГКР требует проведения дополнительной пробоподготовки образцов, в качестве которой предложена ЖЖЭ.

Оптимальные условия проведения ЖЖЭ определены путём измерения спектров поглощения водных растворов СМЗ. Тестирование эффективности экстракции СМЗ с помощью нескольких не смешивающихся с водой органических растворителей (гептан, гексан, дихлорметан, хлороформ, тетрахлорметан) показало максимальную степень извлечения СМЗ с использованием хлороформа. Добавление различных солей (NaCl, Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄) в водную фазу не повлияло на эффективность экстракции, что позволяет пренебречь возможным влиянием ионной силы разных образцов мочи на воспроизводимость ЖЖЭ.

Поскольку значение pH мочи может значительно варьироваться даже у здоровых людей, проведено изучение зависимости эффективности ЖЖЭ от этой величины. Обнаружено резкое снижение переноса СМЗ в хлороформ из водной фазы с pH больше 5.5 (рисунок 6а). Уменьшение pH до значений 3–4 позволяет достичь максимальной эффективности экстракции, а дальнейшее снижение pH снова приводит к падению эффективности экстракции. Полученные результаты предположительно объясняются образованием димеров между частично протонированными молекулами СМЗ за счёт межмолекулярных водородных связей (рисунок 6б), которые обладают более гидрофобными свойствами по сравнению с единичными молекулами; в сильно кислой и в нейтральной/щелочной средах происходит разрушение димеров за счёт

электростатического отталкивания (де)протонированных аминогрупп. Также проведение экстракции в течение 5 мин является достаточным для достижения равновесия и завершения экстракции.

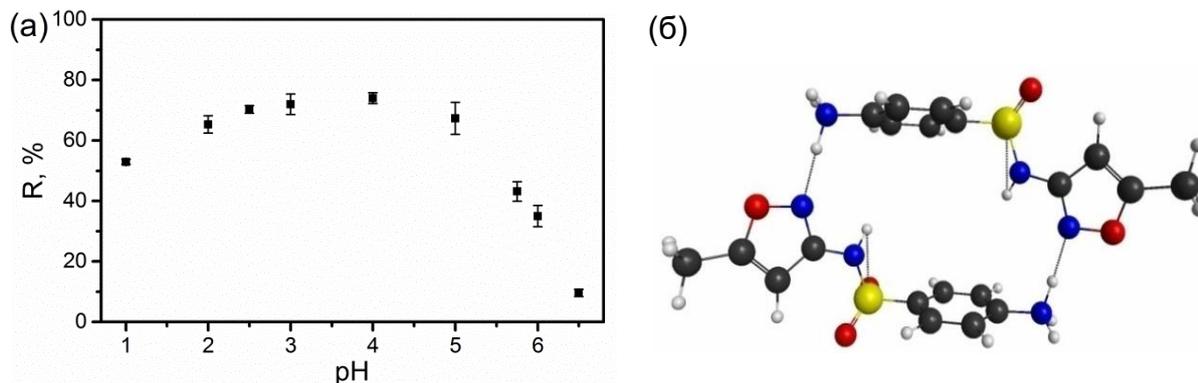


Рисунок 6. (а) Влияние значения рН водного раствора сульфаметоксазола (СМЗ, 50 мкг/мл) на степень извлечения (R) СМЗ с использованием хлороформа в качестве экстрагирующего растворителя. (б) Схематическое изображение димера СМЗ, образованного частично протонированными молекулами.

Поскольку компоненты мочи имеют максимальный сигнал ГКР в щелочной среде, измерения спектров ГКР экстрактов с добавкой NaOH использовали для проверки степени отделения СМЗ от компонентов мочи (рисунок 7а). Результаты показали, что применение ЖЖЭ не обеспечивает полного отделения СМЗ от соединений мочи (наблюдается сильный сигнал КРН). Однако спектры ГКР подкисленных экстрактов демонстрируют существенное снижение уровня фонового сигнала (рисунок 7б), а разбавление мочи перед этапом ЖЖЭ позволяет минимизировать разницу между спектрами УМ и ДМ. Также, разбавление уменьшает собственную буферную емкость мочи, что облегчает корректировку рН мочи, упрощает протокол анализа и делает его более универсальным.

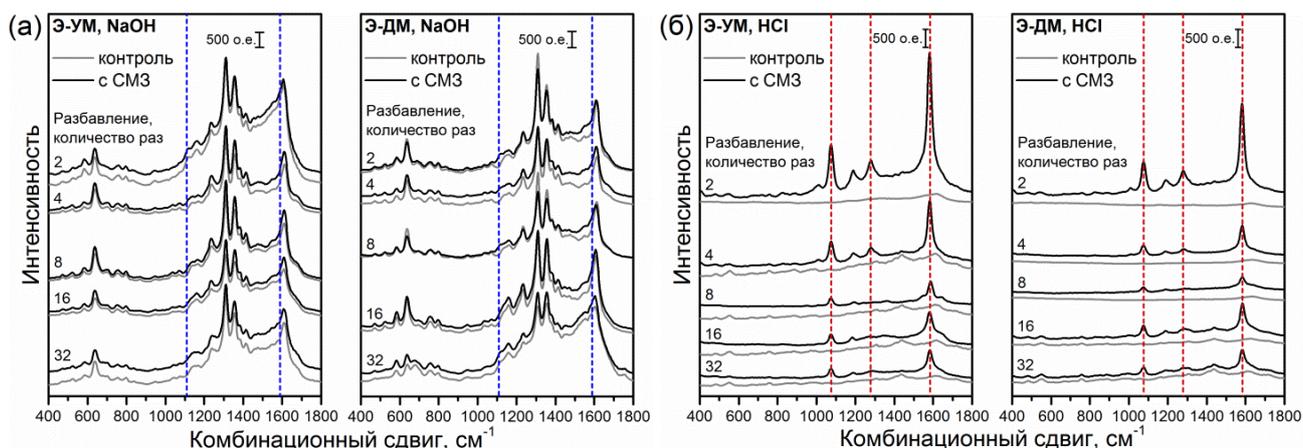


Рисунок 7. Влияние разбавления мочи перед экстракцией, а также добавления NaOH (а) и HCl (б) к экстрактам на сигнал ГКР сульфаметоксазола (СМЗ), экстрагированного из мочи с помощью ЖЖЭ. Экстракты получены из образцов мочи, собранных утром (Э-УМ) и днём (Э-ДМ). Концентрация СМЗ в образцах мочи составляла 10 мкг/мл. Вертикальные линии соответствуют положению наиболее интенсивных пиков СМЗ.

Таким образом, конечный протокол ЖЖЭ-ГКР включает: (1) уменьшение буферных свойств мочи и влияния внутренних компонентов мочи путём разбавления мочи, (2) увеличение эффективности экстракции аналитов путём подкисления образцов мочи до рН 4, (3) отделение аналитов от матрицы мочи с помощью ЖЖЭ и последующий перевод экстрагированного аналита в водную фазу, (4) подавление остаточного фоновых сигнала ГКР подкислением экстракта и (5) детектирование аналитов с использованием СНЧ. Тестирование протокола анализа проводили с помощью образцов мочи с содержанием сульфаниламидов, удовлетворяющем требованиям ТЛМ (10–200 мкг/мл). Важно отметить, что, благодаря структурной родственности и одинаковому механизму генерации сигнала ГКР, градуировочные зависимости для определения в моче СМЗ и СДМ практически совпадают, что делает разработанный протокол достаточно универсальным. Также все рассчитанные ПрО находятся ниже диапазона концентраций, необходимого для ТЛМ и погрешность анализа в моче здоровых добровольцев не превышает 20% (таблица 2).

Дополнительно проведена проверка методики (на примере СМЗ) с использованием образцов мочи пациентов с онкологическими заболеваниями. Показано, что происходит снижение точности анализа, проявляющееся в увеличении погрешности сигнала и уменьшении правильности, что обусловлено бóльшим отклонением фонового сигнала мочи пациентов, поскольку их моча содержит метаболиты и остатки противоопухолевых лекарств. Тем не менее, расхождение между результатами для мочи здоровых добровольцев и пациентов невелико, и фоновый сигнал не содержит интенсивных пиков КР в области регистрации сульфаниламидов, что делает возможным определение сульфаниламидов по разработанной методике в моче более сложного состава.

Таблица 2. Метрологические характеристики протокола ЖЖЭ-ГКР определения СМЗ и СДМ в моче; диапазон определяемых содержаний 10–200 мкг/мл.

| Аналит, пик ГКР | Матрица | Количество образцов | Уравнение градуировочного графика | s_r , % | ПрО, мкг/мл | Правильность, % |
|----------------------------|----------------------------|---------------------|--|-----------|-------------|-----------------|
| СМЗ, 1076 см ⁻¹ | моча здоровых добровольцев | 8 | $\lg(y) = 0.83 \cdot \lg(x) + 1.65$ $R^2 = 0.993$ | 11–18 | 1.7 | 91–109 |
| | моча пациентов больницы | 5 | | 14–27 | 2.1 | 84–118 |
| СДМ, 1076 см ⁻¹ | моча здоровых добровольцев | 6 | $\lg(y) = 0.81 \cdot \lg(x) + 1.69$ $R^2 = 0.990$ | 9–16 | 1.8 | 89–109 |

Шестая глава посвящена описанию нового ГКР-активного сорбента для ТФЭ на основе сферических микрочастиц карбоната кальция со встроенными СНЧ и НЧ магнетита (CaCO₃-Ag-Fe), разработке и тестированию ТФЭ-ГКР

методики определения антибиотиков в моче с использованием данного сорбента. Предложенный сорбент способен сохранять ГКР активность при хранении в течение длительного времени (более 4 месяцев) благодаря защите СНЧ от окисления матрицей CaCO_3 . Также встраивание НЧ магнетита позволяет проводить отделение сорбента с адсорбированным анализом от раствора с помощью постоянного магнита вместо центрифугирования при проведении ТФЭ.

Разработанная процедура ТФЭ-ГКР с использованием ГКР-активного сорбента включает (1) сорбцию молекул анализата (10 мин) и отделение сорбента от раствора с помощью магнита, (2) высвобождение анализата и СНЧ растворением матрицы CaCO_3 с помощью HCl и (3) проведение измерений ГКР (рисунок 8). Высвобождение СНЧ и молекул анализата является обязательным условием для уменьшения расстояния между ними и генерации сигнала ГКР, поскольку большая часть СНЧ находится в объеме микрочастиц CaCO_3 , недоступном для взаимодействия с анализатом и регистрации спектров ГКР. Установлено, что полное растворение микрочастиц $\text{CaCO}_3\text{-Ag-Fe}$ приводит к неприемлемому увеличению погрешности сигнала, в то время как частичное растворение способствует получению наиболее стабильного и достаточно интенсивного сигнала ГКР. Также, несмотря на низкое содержание СНЧ в $\text{CaCO}_3\text{-Ag-Fe}$ (~0.3% масс.), концентрация высвобожденных СНЧ в конечной смеси составляет примерно 5 мМ, т.е. в 5 раз выше, чем в растворе СНЧ, использованном для синтеза, что увеличивает интенсивность сигнала ГКР за счёт большего количества светорассеивающих частиц.



Рисунок 8. Схема проведения анализа, основанного на совмещении твердофазной экстракции и ГКР (ТФЭ-ГКР).

Исследование сорбционных и усиливающих свойств

Предварительную оценку сорбционных и усиливающих свойств полученного сорбента проводили путём детектирования модельных соединений: флуоресцентный краситель родамин 6Ж (Р6Ж) и краситель для фотодинамической терапии «Фотосенс» (ФС), которые в растворе приобретают положительный и отрицательный заряд, соответственно. Изучение сорбционных свойств показало, что степень сорбции Р6Ж на $\text{CaCO}_3\text{-Ag-Fe}$ достигает 75–80%; электростатическое отталкивание между Р6Ж и $(\text{CaCO}_3\text{-Ag-Fe})@\text{ПЭИ}$ приводит к

снижению сорбции примерно в 4 раза (рисунок 9а). Как и ожидалось, противоположный результат получен при исследовании взаимодействия ФС с $\text{CaCO}_3\text{-Ag-Fe}$ и $(\text{CaCO}_3\text{-Ag-Fe})@\text{ПЭИ}$, степень сорбции на которых составила 35–40% и 85–90%, соответственно.

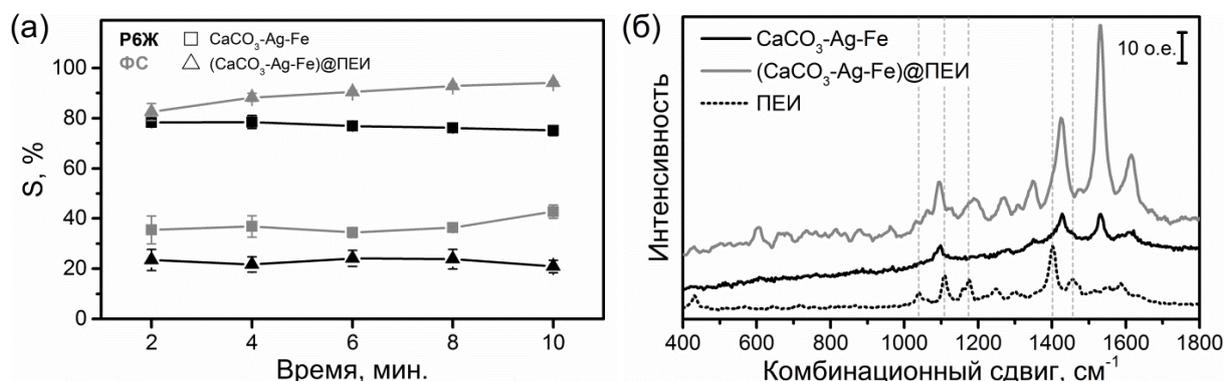


Рисунок 9. (а) Зависимость степени сорбции родамина 6Ж (Р6Ж, 1 мкМ) и Фотосенса (ФС, 10 мкМ) от времени контакта аналита с сорбентами. (б) ГКР спектры ФС (1 мкМ), полученные с помощью немодифицированного и модифицированного сорбентов; спектр ГКР чистого ПЭИ приведен в качестве контроля, его основные пики помечены линиями.

Сравнение ГКР спектров ФС, полученных с использованием $\text{CaCO}_3\text{-Ag-Fe}$ и $(\text{CaCO}_3\text{-Ag-Fe})@\text{ПЭИ}$ (рисунок 9б), показало, что модификация молекулами ПЭИ приводит к усилению интенсивности сигнала ФС примерно в 6 раз. Поскольку степень сорбции ФС увеличивается только в 2.5 раза, можно предположить, что ПЭИ также способствует увеличению усиления сигнала КР благодаря лучшему взаимодействию молекул ФС с поверхностью высвобожденных агрегатов СНЧ. Важно отметить отсутствие ГКР сигнала ПЭИ в спектре ФС, что объясняется простотой молекулярной структуры ПЭИ.

Анализ градуировочных графиков, полученных для Р6Ж, показал, что ПрО Р6Ж с использованием $\text{CaCO}_3\text{-Ag-Fe}$ примерно на 2 порядка ниже, чем с использованием контрольной ГКР подложки (СНЧ, активированные агрегацией) (таблица 3), что обусловлено концентрированием и удерживанием молекул Р6Ж в матрице сорбента.

Таблица 3. Метрологические характеристики ТФЭ-ГКР определения модельных аналитов.

| Аналит, пик ГКР | ГКР подложка | ДОС*, мкМ | S, % | Уравнение градуировочного графика | s_r , % | ПрО, М | Правильность, % |
|----------------------------|---|-----------|------|--|-----------|----------------------|-----------------|
| Р6Ж, 1656 cm^{-1} | $\text{CaCO}_3\text{-Ag-Fe}$ | 0.01–10 | 78 | $\lg(y) = 0.36 \cdot \lg(x) + 2.82$ $R^2 = 0.991$ | 12–23 | $6.1 \cdot 10^{-10}$ | 90–112 |
| | агрегаты СНЧ | 0.1–50 | – | $\lg(y) = 0.62 \cdot \lg(x) + 2.83$ $R^2 = 0.992$ | 10–22 | $3.0 \cdot 10^{-8}$ | 88–104 |
| ФС, 1527 cm^{-1} | $(\text{CaCO}_3\text{-Ag-Fe})@\text{ПЭИ}$ | 0.1–100 | 92 | $\lg(y) = 0.17 \cdot \lg(x) + 1.49$ $R^2 = 0.975$ | 9–27 | $2.4 \cdot 10^{-8}$ | 89–107 |

* диапазон определяемых содержаний

Следует отметить, что ПрО Р6Ж по сравнению с ФС более чем на порядок ниже, несмотря на то, что условия регистрации спектров одинаковы и степень сорбции на сорбентах составляет 92% для ФС против 78% для Р6Ж. Данный факт можно объяснить тем, что возбуждающий лазер (473 нм) попадает в область поглощения молекул Р6Ж, что приводит к частичной реализации резонансного ГКР. В то же время, используемое лазерное излучение практически не поглощается молекулами ФС, что приводит к столь значительной разнице в интенсивности сигналов ГКР и, как следствие, в величинах ПрО. Коэффициенты усиления (КУ) сигнала КР для $\text{CaCO}_3\text{-Ag-Fe}$ и $(\text{CaCO}_3\text{-Ag-Fe})@\text{ПЭИ}$ составили 10^9 и $5.8 \cdot 10^7$, соответственно. Полученные значения КУ демонстрируют конкурентоспособность разработанных ГКР-активных сорбентов и ТФЭ-ГКР анализа по сравнению с другими ГКР подложками на основе серебра.

Определение сульфаниламидных и цефалоспориновых антибиотиков в моче

Определение сульфаниламидных (СМЗ и СДМ; 10–200 мкг/мл) и цефалоспориновых (ЦТР, ЦЗЛ и ЦПР; 5–200 мкг/мл) антибиотиков проводили с использованием $\text{CaCO}_3\text{-Ag-Fe}$ и $(\text{CaCO}_3\text{-Ag-Fe})@\text{ПЭИ}$, соответственно. При определении СМЗ/СДМ использовали избыток соляной кислоты при растворении матрицы CaCO_3 , что необходимо для установления рН анализируемой смеси на уровне, оптимальном для проведения анализа сульфаниламидов (рН ~1.5) (рисунок 5). С другой стороны, при определении цефалоспоринов использовали недостаток кислоты при растворении матрицы сорбента, поскольку в кислой среде интенсивность сигнала ГКР цефалоспоринов минимальна (рисунок 3а).

В методиках определения антибиотиков обоих классов использовали разбавление образцов мочи с аналитом перед проведением ТФЭ-ГКР анализа: в 100 и 50 раз для сульфаниламидов и цефалоспоринов, соответственно. Данный этап позволил снизить влияние фонового сигнала мочи, уменьшить разницу между образцами УМ и ДМ и провести количественное определение аналитов в требуемом диапазоне концентраций без насыщения сигнала ГКР (рисунок 10).

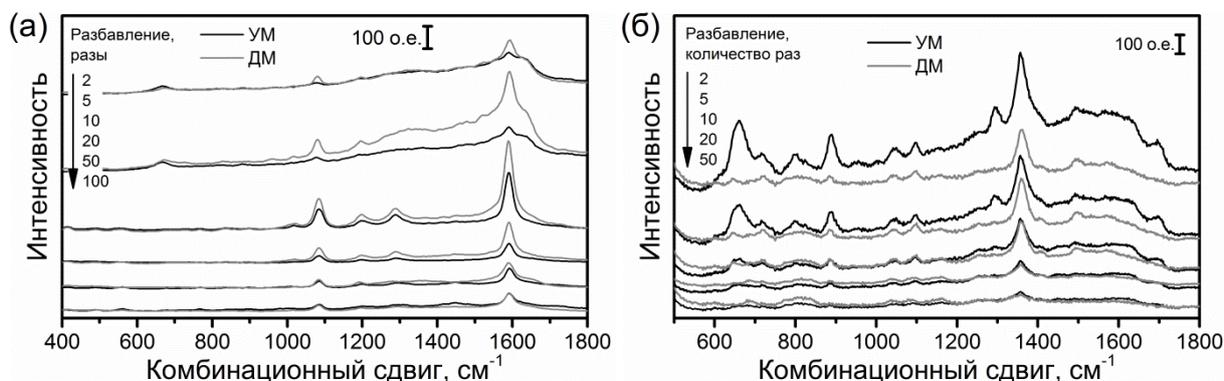


Рисунок 10. Влияние разбавления образцов утренней (УМ) и дневной (ДМ) мочи с добавкой (а) сульфадиметоксина (10 мкг/мл) и (б) цефтриаксона (5 мкг/мл) перед проведением ТФЭ на спектр ГКР.

Полученные градуировочные зависимости для ТФЭ-ГКР определения антибиотиков охватывают значения концентраций, необходимые для проведения ТЛМ (таблица 4). Примечательно, что хотя профили спектров СДМ и СМЗ полностью совпадают (рисунок 5), их определение невозможно проводить с использованием единой градуировочной зависимости из-за разной степени сорбции аналитов на ГКР-активном сорбенте (55 и 41% для СМЗ и СДМ, соответственно). Метрологические характеристики ТФЭ-ГКР определения сульфаниламидов и цефалоспоринов в моче (таблица 4) не уступают таковым, полученным при использовании ЖЖЭ-ГКР и НФТЭ-ГКР методик. Более того, данную методику отличает универсальность для определения представителей обоих классов антибиотиков. Отметим, что ТФЭ-ГКР протокол определения СДМ/СЗМ имеет лучшую правильность по сравнению ЖЖЭ-ГКР, что, возможно, связано с отсутствием потерь аналитов, которые возникают при проведении ЖЖЭ. Также разработанный протокол ТФЭ-ГКР с использованием ГКР-активного сорбента быстрее и не требует использования органических растворителей. В случае определения цефалоспоринов нужно отметить, что появляется возможность увеличить чувствительность определения ЦПР путём использования меньшей степени разбавления мочи (например, в 20 раз) перед проведением ТФЭ (в отличие от методики НТФЭ-ГКР). Предпосылкой для приемлемости такой коррекции протокола является отсутствие чувствительности сигнала при ТФЭ-ГКР анализе к изменяющемуся составу мочи при разбавлении более чем в 10 раз (рисунок 10б). Также нужно отметить, что значения s_r для всех разработанных методик анализа сравнимы со значениями, представленными в других работах, посвященных определению лекарств методом ГКР, однако предложенные процедуры анализа быстрее (10–30 мин включая этап пробоподготовки) и проще.

Таблица 4. Метрологические характеристики ТФЭ-ГКР определения некоторых сульфаниламидных и цефалоспориновых антибиотиков в моче в диапазоне определяемых содержаний 10–200 и 5–200 мкг/мл, соответственно. Результаты получены с использованием шести образцов мочи.

| Аналит, пик ГКР | ГКР-активный сорбент | S, % | Уравнение градуировочного графика | s_r , % | ПрО, мкг/мл | Правильность, % |
|----------------------------|--------------------------------|------|--|-----------|-------------|-----------------|
| СМЗ, 1082 см^{-1} | CaCO ₃ -Ag-Fe | 55 | $y = 3.38 \cdot x + 13.22$ $R^2 = 0.996$ | 14–21 | 4.1 | 93–105 |
| СДМ, 1082 см^{-1} | | 41 | $y = 1.75 \cdot x + 17.87$ $R^2 = 0.995$ | 16–23 | 5.2 | 95–105 |
| ЦТР, 1358 см^{-1} | (CaCO ₃ -Ag-Fe)@ПЕИ | 70 | $\lg(y) = 0.37 \cdot \lg(x) + 1.43$ $R^2 = 0.991$ | 16–22 | 3.5 | 95–105 |
| ЦЗЛ, 1354 см^{-1} | | 66 | $\lg(y) = 0.41 \cdot \lg(x) + 1.64$ $R^2 = 0.988$ | 14–20 | 0.8 | 95–109 |
| ЦПР, 1283 см^{-1} | | 56 | $\lg(y) = 0.49 \cdot \lg(x) + 1.03$ $R^2 = 0.985$ | 18–27 | 7.0 | 91–107 |

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Проведена оценка возможности применения метода ГКР для количественного определения некоторых антибиотиков в моче. Разработаны подходы, позволяющие контролировать уровень фонового сигнала ГКР и проводить надежное (правильность 89–109%), точное (s_r 9–27%) и быстрое (10–30 мин) определение представителей сульфаниламидных и цефалоспориновых антибиотиков в образцах реальной мочи методом ГКР.

2. Установлено, что основными фонообразующими компонентами в спектре ГКР мочи в кислой и щелочной средах являются уробилин и креатинин, соответственно, вклад которых незначительно уменьшается при разбавлении мочи. В нейтральной среде интенсивность фонового сигнала является наименьшей, а его профиль не имеет ярко выраженных пиков ГКР. Показано, что варьирование pH и степени разбавления (2–128 раз) образцов мочи в качестве простых методик пробоподготовки не позволяет полностью устранить фоновый сигнал ГКР мочи, генерируемый её внутренними компонентами.

3. Разработана методика совмещения НТФЭ со спектроскопией ГКР для количественного определения цефалоспориновых антибиотиков (ЦТР, ЦЗЛ и ЦПР) в моче в диапазоне 5–200 мкг/мл и со значениями ПрО равными 0.4, 1.8 и 6.3 мкг/мл, соответственно. Установлено, что увеличение pH мочи до ~12.5 позволяет максимально увеличить сигнал ГКР антибиотиков и обеспечить максимальную сорбцию на силикагеле креатинина, ответственного за фоновый сигнал мочи.

4. Разработана методика совмещения ЖЖЭ со спектроскопией ГКР для количественного определения сульфаниламидных антибиотиков (СМЗ и СДМ) в моче в диапазоне 10–200 мкг/мл и со значениями ПрО равными 1.7 и 1.8 мкг/мл, соответственно. Подобраны оптимальные условия для проведения экстракции лекарств из мочи (растворитель, pH и время экстракции) и их детектирования методом ГКР. Дополнительное использование предварительного разбавления мочи (16 раз) перед проведением ЖЖЭ позволило свести уровень фонового сигнала ГКР к минимуму.

5. Синтезирован новый магнитоуправляемый ГКР-активный сорбент на основе микрочастиц карбоната кальция со встроенными СНЧ и НЧ магнетита. Данный сорбент предложен для совмещения детектирования методом ГКР и ТФЭ в одном материале. Показана высокая сорбционная способность сорбента по отношению к положительно заряженным анализам (степень сорбции 70–80%). Высокая сорбционная способность сорбента к отрицательно заряженным анализам (степень сорбции 80–90%) достигнута благодаря модификации поверхности микрочастиц молекулами катионного полиэлектролита. С использованием модельного анализа продемонстрировано снижение ПрО примерно на два порядка (с 30 до 0.61 нМ) по сравнению с исходными СНЧ за

счёт их встраивания в пористую матрицу и дополнительного концентрирования аналита.

6. Предложена методика ТФЭ-ГКР определения в моче как сульфаниламидных, так и цефалоспориновых антибиотиков с использованием полученного ГКР-активного сорбента в диапазоне концентраций 10–200 мкг/мл и со значениями ПрО в диапазоне 0.8–7.0 мкг/мл. Дополнительная стадия разбавления мочи перед проведением ТФЭ позволила снизить фоновый сигнал и нивелировать разницу между образцами мочи с разной концентрацией компонентов, в то время как чувствительность ГКР анализа обеспечила надежное определение антибиотиков в требуемом для ТЛМ диапазоне.

Список публикаций

Статьи в журналах, входящих в перечень ВАК и библиографические базы данных Web of Science и Scopus:

1. Markina N.E., Markin A.V., Weber K., Popp J., Cialla-May D. Liquid-liquid extraction-assisted SERS-based determination of sulfamethoxazole in spiked human urine // *Anal. Chim. Acta*, 2020, Vol. 1109, P. 61-68.
2. Markina N.E., Goryacheva I.Yu., Markin A.V. Sample pretreatment and SERS-based detection of ceftriaxone in urine // *Anal. Bioanal. Chem.*, 2018, Vol. 410, P. 2221-2227.
3. Markina N.E., Markin A.V., Zakharevich A.M., Goryacheva I.Yu. Calcium carbonate microparticles with embedded silver and magnetite nanoparticles as new SERS-active sorbent for solid phase extraction // *Microchim. Acta*, 2017, Vol. 184, P. 3937-3944.
4. Маркина Н.Е., Пожаров М.В., Захаревич А.М., Бурмистрова Н.А., Маркин А.В. Детектирование лекарственных веществ магнитоуправляемыми ГКР-активными структурами «ядро-оболочка» // *Известия Саратовского университета. Новая сер. Сер. Химия. Биология. Экология*, 2016, Т. 16, Вып. 1, С. 52-58.

Статьи в научных сборниках:

1. Маркина Н.Е., Маркин А.В. Исследование сигнала гигантского комбинационного рассеяния света мочи человека // *Взаимодействие сверхвысокоочастотного, терагерцового и оптического излучения с полупроводниковыми микро- и наноструктурами, метаматериалами и биообъектами: Сборник статей седьмой Всероссийской научной школы-семинара – Саратов: «Саратовский источник», 2020. С. 89-92.*
2. Markina N.E., Burmistrova N.A. Detection of sulfadimethoxine in milk using SERS-active calcium carbonate microspheres with embedded silver nanoparticles // *Представляем научные достижения миру. Естественные науки: Материалы IX научной конференции молодых ученых. – Саратов: «Саратовский источник», 2019, С. 108-114.*
3. Маркина Н.Е., Данчук А.И., Маркин А.В. Спектроскопия ГКР для терапевтического лекарственного мониторинга цефтриаксона в моче // *Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине – 2018: Сборник статей Всероссийской школы-семинара. – Саратов: «Саратовский источник», 2018, С. 110-113.*
4. Маркина Н.Е., Горбачев И.А., Захаревич А.М., Маркин А.В. Влияние окисления наночастиц меди на ГКР активность // *Современные проблемы теоретической и*

экспериментальной химии: Межвузовский сборник научных трудов XII Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием. – Саратов: «Саратовский источник», 2017, С. 13-16.

5. Markina N.E., Shalabay V.V., Zakharevich A.M., Markin A.V. Detection of sulfonamide drug in urine using liquid-liquid extraction and surface-enhanced Raman spectroscopy // Proc. SPIE, 2016, Vol. 9917, P. 99170X.

Тезисы докладов конференций:

1. Markina N.E., Zakharevich A.M., Markin A.V. Creatinine SERS detection using molecularly imprinted silica gel // VI Symposium on Optics & Biophotonics, Saratov, September 24–29, 2018.

2. Markina N.E., Gorbachev I.A., Zakharevich A.M., Markin A.V. Copper nanoparticles for SERS detection of small analytes // V Symposium on Optics & Biophotonics, Saratov, September 26–29, 2017.

3. Shalabay V.V., Markina N.E., Zakharevich A.M., Markin A.V., Goryacheva I.Yu. Detection of Rhodamine 6G in blood and urine using combination of surface-enhanced Raman spectroscopy and liquid-liquid extraction // IV Symposium on Optics & Biophotonics, Saratov, September 27–30, 2016.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность Dr. Dana Cialla-May из Института фотонных технологий (г. Йена, Германия) за плодотворное сотрудничество, доступ к различным спектрометрам КР и помощь в организации и проведении исследований по анализу методом ГКР образцов мочи (в том числе пациентов).

Автор благодарит д.х.н. Горина Д.А. за возможность проведения исследований на зондовой нанолаборатории Интегра Спектра, а также к.ф.-м.н. Захаревича А.М. за проведение электронной микроскопии ГКР подложек.

Автор благодарит д.х.н. Бурмистрову Н.А., д.х.н. Русанову Т.Ю., к.х.н. Абрамову А.М. и к.х.н. Маркина А.В. за постоянное внимание к работе, ценные советы и помощь на различных этапах обучения в аспирантуре.