

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИАРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ И ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ МЕТОДОМ ПОЛЯРИЗАЦИОННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ИММУНОАНАЛИЗА
(Обзор литературы)

А.Ю.Лобанова¹, Е.А.Шуталева¹, И.Ю.Горячева¹, С.А.Еремин¹, М.Сучанек², Р.Нисснер², Д.Кноп²

¹ Химический факультет, Московский государственный университет им.М.В.Ломоносова, Россия

² Институт гидрохимии, Технический университет г.Мюнхен, Германия

Введение

Производственная деятельность человека привела к загрязнению окружающей среды токсичными веществами, одними из наиболее опасных для человека являются полициклические ароматические углеводороды (ПАУ). ПАУ - класс органических соединений, состоящих из двух или более конденсированных ароматических колец. Эти повсеместно распространенные загрязняющие вещества главным образом являются побочными продуктами, образующимися при сжигании ископаемых топлив, производствах химической, металлургической, целлюлозно-бумажной промышленности. Особую опасность этот класс представляет поскольку все ПАУ крайне устойчивы и многие из них обладают канцерогенной токсичностью и могут вызывать мутации. Среди 16 приоритетных загрязнителей ПАУ наиболее токсичным соединением является бенз(а)пирен, который можно обнаружить в табачном дыме, питьевой воде и продуктах питания. Сложность защиты окружающей среды и человека от ПАУ связана с малостью концентраций этих веществ. Помимо того они редко содержатся в пробах как индивидуальные соединения, чаще всего это сложная смесь, что делает детальный анализ затруднительным. Поскольку все соединения этого класса обладают гидрофобными свойствами, то они имеют тенденцию накапливаться в природных объектах, в продуктах питания и в человеческом организме, вызывая в дальнейшем нарушения его деятельности. ПАУ можно найти в воздушных, в водных фазах или адсорбированными на твердых поверхностях. Поэтому необходим строгий контроль содержания ПАУ в воздухе, питьевой воде и продуктах питания [1].

Источники ПАУ

Основной источник ПАУ - ископаемые топлива, типа сырой нефти или угля, и только малые количества ПАУ образуются на производстве красителей, пестицидов, фармацевтики. Загрязняющие вещества могут попадать в окружающую среду непосредственно, например в утечках масла и нефтепродуктов или при медленном растворении защитных покрытий, таких как рубероид на кораблях, обугливание креозота на берегах реки или гаванях, и покрытиях битума в трубах с питьевой водой. Подавляющее большинство ПАУ, однако, попадает в окружающую среду через атмосферу через процессы неполного сгорания. Промышленность выбрасывает большие количества ПАУ в процессе производства масла и обработки угля, производстве алюминия и стальной продукции, в двигательных установках и промышленном нагреве. Другие

общие источники ПАУ - продукты сгорания автомобильного топлива, отопление жилых помещений и приготовление продуктов питания. Курение табака - значительный источник ПАУ в закрытом помещении. Естественные источники - лесные пожары и вулканические действия. ПАУ может быть найден в различных местностях. Концентрации могут значительно измениться в зависимости от места осуществления выборки, матрикса и источника загрязнения.

ПАУ в воздухе

Вместе с другими продуктами сгорания нефтепродуктов, угля, дерева, мусора, пищи, табака ПАУ поступают в воздух, там они могут быть в виде молекул в паровой фазе или адсорбироваться к частицам аэрозоля. Меньшие и легкие соединения этого класса от двух до четырех ароматических колец имеют достаточную упругость пара, что позволяет им находиться в паровой фазе, а ПАУ с высокими молекулярными массами главным образом существуют адсорбированными к другим частицам в атмосфере. При комнатной температуре все ПАУ - твердые кристаллические вещества. Температуры их плавления близки к 200°C, а давление насыщенных паров очень мало. При охлаждении горячих газов, содержащих ПАУ, вещества эти должны конденсироваться и оседать в зоне их выбросов. На расстоянии нескольких километров от угольной ТЭС поверхность почвы загрязнена ПАУ. Но большая часть их уносится на дальние расстояния в виде аэрозолей. Прекрасным адсорбентом для ПАУ являются сажевые частицы. На 1 см² сажевой поверхности могут разместиться ~10¹⁴ молекул ПАУ. Это и приводит к тому, что загрязненный сажевым аэрозолем воздух городов содержит порой количества ПАУ большие, чем соответствующие давлению насыщенного пара этих веществ [2]. Вклад курильщиков в общее количество производящегося бенз(а)пирена невелик - 0,05 т/год. Но ошибочное мнение о малозначимости этого количества сменяется на противоположное при рассмотрении этих данных как о локальных концентрациях бенз(а)пирена. Некоторым утешением для некурящих служит то, что выпускаемый курильщиком табачный дым менее вреден, чем ими вдыхаемый. Аэрозольные частицы табачного дыма с адсорбированными на них молекулами бенз(а)пирена имеют различные размеры. Для организма особенно опасны частицы с размером 0,5-5 мкм. Частицы большего размера задерживаются на слизистых поверхностях курильщика, а частицы меньшего размера не задерживаются в легких. Таким образом, выдыхаемый курильщиком воздух частично отфильтрован от наиболее вредных дымовых частиц. Корреляция риска заболевания раком легких с годами курения очевидна. Высокие концентрации ПАУ можно найти около промышленных областей, а также и в областях с высокой плотностью грузового транспорта. Концентрация различных соединений ПАУ в воздухе может изменяться 0.1 - 100 нг/м³ [3].

ПАУ в воде

Концентрация ПАУ в воде варьируется в зависимости от типа водного источника: поверхностные воды, грунтовые воды и питьевая вода. Поверхностная вода, например, речная вода и прибрежная вода может быть сильно загрязнена ПАУ промышленностью или верфями. Масло и нефтепродукты могут загрязнять эти воды случайно, из-за недосточных мер предосторожности или в результате сброса производственных отходов [4]. В дополнение к прямому загрязнению ПАУ имеется постоянный вклад к уровням ПАУ в поверхностной воде множеством различных источников. Корабли часто обрабатываются битумом, чтобы предотвратить коррозию, и гавани или речные насыпи могут обрабатываться с креозотом. Эти противокоррозионные покрытия и агенты пропитки постоянно выщелачивают ПАУ в воду. ПАУ соединения могут также быть

найжены в грунтовых водах, но обычно в очень низких концентрациях. ПАУ являются липофильными молекулами и имеют плоскую структуру благодаря их ароматическому характеру. Следовательно, они имеют отчетливую тенденцию адсорбироваться к многим липофильным поверхностям, типа органических веществ в почве, помимо этого они также плохо водорастворимы. Эти свойства объясняют отсутствие высоких уровней ПАУ в грунтовых водах незагрязненных мест. ПАУ концентрации в грунтовых водах незагрязненных мест варьируется вокруг 0-5 нг/мл. При тяжело загрязненных местах, однако, уровни могут достигать до 10 мкг/мл [5]. Из-за канцерогенного характера некоторых ПАУ уровни легирования в питьевой воде должны быть настолько низки насколько это возможно. Основным источником ПАУ в питьевой воде - часто не вода, поданная в распределительную систему, а распределительная система непосредственно. Особенно в старых распределительных системах, битум - обычно используемое защитное покрытие против коррозии на водопроводных трубах. Это делает текущий контроль качества воды очень трудным. Даже, когда водные источники постоянно контролируются, вода, достигающая потребителя может быть загрязнена ПАУ соединениями. Регулярно находятся высокие уровни флуорантена, фенантрена и антрацена. Эти соединения находятся в рубероиде и имеют более высокую растворимость в воде чем более тяжелые соединения ПАУ. Высокие уровни легирования этих лучше растворимых соединений ПАУ допускают более раннее детектирование в случае полного увеличения уровней всех ПАУ. Они, следовательно, могут быть хорошими индикаторами для качества питьевой воды.

ПАУ уровни в питьевой воде значительно изменяются в пределах 1 нг/л - 11 мкг/л. По нормам Всемирной организации здравоохранения допустимый предел содержания всех ароматических веществ в питьевой воде составляет - 200 нг/л. Но основное количество приходится на относительно малотоксичный бензол (по сравнению с бенз(а)пиреном и другими ПАУ). Предельное же содержание бенз(а)пирена в питьевой воде составляет 0,3-2,0 нг/л.

ПАУ в продуктах питания

Другой важный ПАУ источник для людей - продукты питания. Известные процессы приготовления продуктов питания, которые могут загрязнять продукты питания: жарка, запекание, копчение. Сверхвысокие уровни могут быть найдены в продуктах пожаренных на решетке на открытом огне и копченой мясе и рыбе. Встречаются концентрации до 200 мкг/кг ПАУ в продуктах питания. В поджаренном хлебе, концентрации могут быть до 10 мкг/кг для отдельных соединений ПАУ [6]. ПАУ также обнаружены в непрigотовленных продуктах питания. Свежие плоды, овощи и хлебные злаки могут быть загрязнены, особенно, когда они вырастают около промышленных районов, поскольку ПАУ, содержащийся в воздухе, накапливаются на их поверхности. ПАУ также встречаются в морепродуктах: мидиях, улитках и рыбе, особенно, когда они обитают в загрязненной воде. Жиры и масло, особенно растительное масло и маргарин, содержат повышенные уровни ПАУ, которые обусловлены, главным образом, процессом обработки. Суммарное содержание ПАУ в масле - 2 г/кг [7]. Значительным отличием содержания ПАУ в масле и жирах по сравнению с другими видами продуктов питания является состав ПАУ смеси. Продукты типа даров моря, плодов, овощей и хлебных злаков содержат много различных соединений ПАУ, все из них в умеренно высоких уровнях. Фактор риска проявляется при завышенной суммарной концентрации соединений ПАУ. Жиры и масла часто содержат только один или несколько индивидуальных соединений ПАУ при очень высоких уровнях легирования.

ПАУ в почве и осадках

Поскольку ПАУ имеют сильную тенденцию адсорбироваться на органических веществах, они накапливаются в почве и осадках и представляют токсикологический риск для флоры и фауны. Превышение количества ПАУ в почве естественного фона обычно следует из индустриального загрязнения, связанного с процессами сгорания масла и угольных продуктов. В этих местах концентрация ПАУ доходит от 1000 до 3000 мкг/кг в сухой почве. Автомобильное движение - не главная составляющая (<1%) к вкладу в общее ПАУ загрязнение, но имеет серьезное воздействие в местах с высокой плотностью скоростных дорог [8]. Там найденная концентрация ПАУ была 3095 мкг/кг сухой почвой в глубине 5-15 см, сравнимая приблизительно с 100 мкг/кг для нормальной почвы. В почвенных слоях менее чем 4 см от поверхности, загрязнение было ровно в три раза выше. ПАУ может попадать в человеческий организм различными путями, например, при вдыхании воздуха или потреблении продуктов питания и питьевой воды, а так как уровни ПАУ в воде, продуктах питания и воздухе значительно варьируются в зависимости от ряда факторов, трудно оценить индивидуальный вклад этих источников к суммарной экспозиции людей к ПАУ. Принято считать, что главными маршрутами доставки ПАУ являются вдыхание воздуха и потребление продуктов питания [9]. Из продуктов питания для человека основные источники ПАУ - масла, жиры и хлебные злаки. Копченая рыба, мясные продукты содержат самый высокий уровень ПАУ, но они дают небольшой вклад в ПАУ вход, из-за относительно малых количеств этих продуктов, потребляемых в среднем человеком [10]. Питьевая вода с нормальным уровнем ПАУ дает менее чем 1% к диетическому входу, принимая суточное потребление около двух литров. Однако, в областях, где трубы с питьевой воды покрыты битумом, особенно, когда эти трубы повреждены, вклад питьевой воды к входу ПАУ может превышать 50% диетического входа. Максимальный суточный вход индивидуальных соединений ПАУ может измениться между 0.1 мкг и 10 мкг на человека, в зависимости от соединения ПАУ, персональных привычек и местоположения. Липофильный характер ПАУ вызывает их накопление не только в липофильных материях, но также и в людях. Накопление может наблюдаться для жиров тела и липидов, содержащихся в органах. Метаболические процессы ПАУ в живых организмах, главным образом, приводят к нетоксичным метаболитам, но при известных условиях, некоторые ПАУ могут образовывать разновидность ДНК-связывающих. Из организма бенз(а)пирен частично выводится в неизмененном виде, а частично окисляется, давая производные фенольного и хинонного типа. Некоторым из этих продуктов также присуща мутагенная активность, и поэтому ПАУ - типичные экотоксины.

Обследование рабочих, которые постоянно подвергаются воздействию ПАУ, показало, что у многих из них с течением времени развивается рак легких. Такие же результаты были получены и при наблюдении заядлых курильщиков [11]. Обширные исследования были выполнены на животных в лаборатории, чтобы исследовать эффект действия индивидуальных соединений ПАУ, как отдельно так и в смесях. Даже, когда отдельные соединения ПАУ не являются канцерогенными, в смесях они могут действовать как активаторы для других опасных соединений. Флуорантен, например, не является канцерогеном при каждом применении, но действует как канцерогенное вещество в смеси с бензопиреном. Кожное воздействие обоих соединений вызвало двухкратное увеличение опухолей у мышей, по сравнению с отдельным действием бензопирена. Токсические свойства бенз(а)пирена изучены на мышах: обнаружено подавление популяции за счет гибели при рождении и уменьшения веса новорожденных животных. Показано, что возникновение раковых заболеваний происходит и при ингаляции и при введении бенз(а)пирена с пищей, а также при контакте с кожей. Однако эти результаты

получены при дозах бензопирена, в сотни и тысячи раз больших, чем получаемые людьми из окружающей среды [12]. 16 ПАУ соединений перечислены как основные загрязняющие вещества Управлением по охране окружающей среды США (US EPA). И только шесть ПАУ соединений, а именно бенз[а]пирен, бензо[б]флуорантен, бензо[g,h,i]перилен, бензо[к]флуорантен, флуорантен и индено[1,2,3-сd]пирен, включены в список наиболее опасных веществ в воде для питьевых целей в Европе [13].

Методы определения ПАУ

Поскольку полиароматические соединения являются очень распространенными загрязнителями различных объектов, таких как воздух, почва, питьевая вода, сточные и речные воды, продукты питания и масла, то для их определения на настоящий момент существует уже много различных методик. Большинство методик включают стадию пробоподготовки образца, такие как: жидкость-жидкстную экстракцию [14, 15], микроэкстракцию [16, 17], твердо-фазную экстракцию [18, 19] или суперкритическую жидкостную экстракцию [20, 21]. После пробоподготовки обычно ПАУ определяют методом газовой хроматографии (ГЖХ) [22, 23] или жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [24, 25], а также различными флуоресцентными оптическими сенсорами [26]. Подробно достоинства и ограничения этих методов определения ПАУ рассмотрены в ряде обзоров [27, 28].

Методы газовой и жидкостной хроматографии [29], а также оптические сенсоры хорошо подходят для точного определения веществ, т.к. обладают хорошей чувствительностью и точностью результатов. Предел обнаружения для многих из них меньше предельно допустимой концентрации бензопирена в питьевой воде (0,2 нг/мл). Однако они имеют и ряд существенных недостатков. Во-первых, традиционные методы анализа являются довольно дорогими (сложное оборудование); во-вторых, они требуют много времени на проведение одного анализа, т.к. необходима предварительная пробоподготовка (твёрдофазная или жидкостная экстракция, концентрирование); поскольку полиароматические углеводороды не являются летучими веществами, требуется их модифицирование для проведения ГХ; кроме того, идёт большой расход органических растворителей, в связи с чем возникает проблема их утилизации без ущерба для окружающей среды.

Поэтому наряду с чувствительными методами необходим и такой метод определения ПАУ, который бы не требовал бы столь трудоёмкой и долгой процедуры и был применим для быстрого анализа большого количества образцов. Среди различных требований, предъявляемых к современному биохимическому анализу, самым важным является специфичность, т.е. способность детектировать данное вещество в сложных многокомпонентных системах, таких, как сыворотка крови, соки растений, сточные воды. Это привело к разработке иммунохимических методов анализа. Иммунохимические методы анализа (ИХМ) следовых количеств органических соединений представляют собой быстроразвивающуюся область аналитической химии, которая использует достижения других наук и тесно связана с решением биологических, медицинских и экологических задач [30]. Первые работы в области аналитической иммунохимии принадлежат Ярлоу и Берсону. За развитие первых ИХМ им была присуждена Нобелевская премия в 1977 году. Иммунохимические методы анализа основаны на специфическом связывании определяемого соединения с соответствующими антителами. Выработка антител происходит в организме в ответ на попадание чужеродного тела (антигена). Благодаря возможности получения специфических антител против соединений разных классов, как высоко- так и низкомолекулярных соединений, клеток, вирусов, иммуноанализ нашёл широкое применение в аналитической практике, используется в клинической диагностике,

сельском хозяйстве, микробиологической и пищевой промышленности, для целей охраны окружающей среды. Поскольку антитела способны проявлять высокую специфичность и афинность по отношению к определяемому веществу, для иммуноанализа, как правило, не требуется предварительная подготовка образцов (экстракция, очистка или концентрирование). Иммунохимическая реакция между антителами (Ab) и антигеном (Ag) протекает с образованием иммунного комплекса состава Ab-Ag. Детектирование образовавшегося комплекса в растворе осуществляют введением метки в один из исходных компонентов реакционной системы. Метку же детектируют соответствующим высокочувствительным физико-химическим методом. Более подробно ИХМ методы рассмотрены в ряде обзоров [31, 32].

В отличие от хроматографических методов, преимуществами ИХМ являются простота проведения, быстрота, возможность автоматизации и использования для массовых анализов в полевых условиях, легкую подготовку образца (если она требуется), исключающую деградацию вещества. ИХМ обладают также хорошей чувствительностью и точностью. Недостатков ИХМ являются высокие требования к квалификации персонала и недостаточная специфичность анализа, что в ряде случаев делает проблематичным строгое количественное определение аналита. В настоящее время ИХМ широко вошли в аналитическую практику и используются в различных областях медицины, сельского хозяйства, микробиологической и пищевой промышленности, а также для экологического мониторинга. В частности, для определения ПАУ разработаны радиоиммунный анализ [33] и иммуноферментный анализ [34-37], а также различные иммуносенсоры с детекцией по принципу плазмонного резонанса [38, 39], флуоресценции [40] и электрохимической детекции [41, 42]. Более того, относительно дешевые иммуноферментные тест-системы стали коммерчески доступны и были успешно применены для определения ПАУ в почве [43-45], речной воде [46], маслах [47] и др. образцах [48].

В последнее время для определения загрязнителей в продуктах питания и окружающей среде все большее распространение получает поляризационный флуоресцентный иммуноанализ (ФПИА) [49-51]. Метод ФПИА относится к гомогенным методам иммуноанализа. Небольшие флуоресцентные молекулы в водной среде вращаются очень быстро и между поглощением и испусканием равновероятно принимают любую ориентацию, что приводит к полной деполаризации сигнала эмиссии. Большие молекулы и при эмиссии частично сохраняют ту же молекулярную ориентацию, которую они имели при поглощении света, поэтому их флуоресценция поляризована. Если такие молекулы ассоциированы в молекулярный комплекс, например иммунный комплекс антител с антигеном, меченным флуоресцентной меткой, то степень поляризации флуоресценции возрастает. Так как для поляризации флуоресценции важную роль играют молекулярный объем частицы и степень асимметрии молекул, то это явление может быть использовано для контроля реакции антиген-антитело. Принцип метода основан на конкурентном связывании со специфическими антителами определяемого антигена и антигена, меченного флуоресцентной меткой (трейсера). Поляризация флуоресценции трейсера обычно имеет небольшое значение, а при связывании трейсера с молекулой антитела поляризация флуоресценции такого комплекса увеличивается. Величина поляризации флуоресценции реакционной смеси отражает отношение связанной и свободной фракций трейсера и снижается при введении в среду немеченого антигена.

Измерение поляризации флуоресценции проводят на специальных высокоавтоматизированных ридерах. Флуоресцирующий раствор возбуждают светом, поляризованным в вертикальной плоскости, а эмиссию флуоресценции измеряют в перпендикулярном по отношению к лучу возбуждения направлении с помощью второго

поляризатора, у которого плоскость поляризации может быть расположена или вертикально, или горизонтально. Специфичность и чувствительность любого иммуноанализа в большей степени определяются качеством специфических антител. Тем не менее, структура трейсера во многих случаях оказывает заметное влияние на аналитические характеристики ФПИА. Структура используемого трейсера может значительно влиять на связывание со специфическими антителами и сказываться на чувствительности метода. Подбор подходящего трейсера с сопоставимым значением константы путем изменения его отдельных структурных элементов приводит к значительному улучшению чувствительности анализа.

Метод ФПИА обладает следующими достоинствами: не требуется разделения свободной и связанной фракций антигена; стадии отмывки отсутствуют; число дозирования реагентов минимально; реакция антиген-антитело протекает в растворе (гомогенная система), что уменьшает время, необходимое для достижения системой равновесия; в результате время анализа снижается до секунд или нескольких минут (в зависимости от антигена и концентрационного диапазона); исключается вариация сигнала, связанная с неоднородностями иммуносорбента; стабильность и время хранения иммунореагентов. Более детально метод ФПИА описан в ряде обзоров [52-53].

Надо отметить, что метод ФПИА уступает по чувствительности хроматографическим методам, но является более быстрым и простым в исполнении, что определило его возрастающее применение не только в медицине, но для анализа объектов окружающей среды и продуктов питания [54]. В данной работе кратко описан ФПИА для определения ПАУ в речной воде и продуктах питания.

Результаты и их обсуждение

Наиболее опасными среди множества токсичных веществ, образующихся при сжигании ископаемых топлив, производствах химической, металлургической, целлюлозно-бумажной промышленности, являются вещества группы полиароматических углеводородов (ПАУ). ПАУ-класс органических соединений, объединяющий десятки веществ, для которых характерно наличие в химической структуре двух и более конденсированных бензольных колец. Особую опасность этот класс веществ представляет для живых организмов, поскольку все соединения крайне устойчивы и многие из них обладают канцерогенной токсичностью и могут вызывать мутации. Поэтому уровень ПАУ должен постоянно контролироваться в продуктах питания и объектах окружающей среды. В настоящее время ПАУ определяют прежде всего хроматографическими методами с различными способами детекции. Эти методы удовлетворяют таким требованиям, как высокая чувствительность и специфичность. Однако их основным минусом является недостаточная экспрессность из-за длительности пробоподготовки и времени анализа. Для решения данной задачи за последние годы был разработан ряд иммунохимических методов анализа, таких как иммуноферментный анализ (ИФА) и флуоресцентный поляризационный иммуноанализ (ФПИА), которые наряду с высокой чувствительностью и специфичностью, обладают высокой проиводительностью. Наиболее часто применяют метод ИФА, однако это гетерогенный метод и проводится за 1,5-2 часа, так как требует проведения дополнительных стадий разделения и промывки. ФПИА относится к гомогенным методам иммуноанализа и проводится в течение нескольких минут. ФПИА уступает в чувствительности ИФА, но существенно превосходит его по экспрессности, что играет важную роль при работе с большим числом образцов.

Первым этапом работы для разработки ФПИА стал синтез флуоресцеин-меченных трейсеров на основе различных полиароматических соединений с флуоресцентными метками. Детальное описание синтеза трейсеров и характеристика поликлональных и моноклональных антител на ПАУ приведена в нашей предыдущей работе [55]. Для определения титра имеющихся антител были построены кривые разведения. Титр антител это способность трейсера исследуемой структуры к связыванию с различными антисыворотками. Все протестированные антитела дали специфическое связывание с синтезированными трейсерами. Поэтому были поверены все возможные комбинации трейсеров с антителами и найдены оптимальные комбинации иммунной пары трейсер-антитело, а также определены концентрации трейсеров и разведения растворов антител, которые позволили определять бензопирен с максимальной чувствительностью.

Методика проведения флуоресцентного поляризационного иммуноанализа состояла в следующем: в кювету вносили 50 мкл анализируемой пробы или стандартного раствора, затем добавляли 100 мкл раствора трейсера и 350 мкл антисыворотки в рабочем разведении. Реакционную смесь перемешивали и проводили измерение поляризации флуоресценции. Измерение поляризации флуоресценции проводили на программируемом поляризационных флуориметрах Beacon 2000, Panvera (США) и TDx Analyzer фирмы "Abbott" (США), снабженном термостатической ячейкой и программным обеспечением. Для измерений использовали боросиликатные стеклянные кюветы 10x75мм. На основании параллельных результатов измерения стандартных растворов строили градуировочный график - зависимость концентрации стандартных растворов ПАУ (логарифмическая шкала) от поляризации флуоресценции (в единицах mP) - и определяли по этому графику концентрацию ПАУ в исследуемых образцах. Время измерения аналитического сигнала 1 образца составляет 5-7 с.

Из градуировочных графиков были рассчитаны их количественные характеристики – точка 50% связывания трейсера, предел обнаружения и диапазон определяемых концентраций. Пределы обнаружения ПАУ для бензопирена, нафталина и антрацена были 0.9, 1.1 и 3.4 нг/мл, соответственно. И хотя эта величина превышает ПДК (0.2 нг/мл для суммы всех ПАУ и 0.3-2.0 нг/л для бензопирена), данный метод может быть применим для быстрого скрининга природных образцов, т.к. в речной воде количества ПАУ часто превышают допустимые концентрации в десятки и сотни раз.

С целью апробации данного метода на реальных образцах были приготовлены растворы бензопирена как наиболее опасного соединения в речной воде р. Дон и р. Воронеж. После чего проводили тест на открытие методом введено-найденно. Найденно, что % открытия варьировался от 92 до 120%. На основании этих данных можно утверждать о незначительном влиянии матрикса при определении бензопирена в воде, хотя при малых концентрациях ошибка велика, и определить точное количество сложно. Однако нашей целью является не точное определение концентрации, а выявление загрязненных регионов, а для этого полученные результаты вполне пригодны.

Так как в загрязненных объектах окружающей среды ПАУ чаще всего находятся в смеси важно знать специфичность метода. В целях выяснения специфичности исследованы перекрестные реакции для целого ряда ПАУ и рассчитаны коэффициенты перекрестного реагирования. Исходя из данных можно выделить три случая: 1) с использованием трейсера на бензопирен и поликлональных антител можно определять практически весь класс полиароматических углеводородов, то есть возможно проведение групп-специфического анализа на ПАУ; 2) с использованием такого же трейсера на бензопирен и моноклональных антител можно определять ПАУ с четырьмя и более ароматическими кольцами, то есть специфически

определять бензопирен, так как другие высокоядерные ПАУ редко встречаются в реальных образцах; 3) с использованием трейсера на основе нафталина и поликлональных антител можно определять небольшие ПАУ с двумя-тремя кольцами типа нафталина или антрацена.

Выводы

Были синтезированы флуоресцеин-меченные трейсеры и разработан поляризационный флуоресцентный иммуноанализ для определения полиароматических углеводов. Предел обнаружения для бензапирена составил 0.9 нг/мл, что позволяет определять ПАУ в сточных и сильнозагрязненных водах в течение 1 мин. Разработанный метод ФПИА на ПАУ был апробирован на образцах речной воды. Тест «введено-найдено» показал, что бензопирен может быть определен без проведения пробоподготовки так как влияние матрикса незначительно. Изучение перекрестной реактивности показало, что при варьировании пар трейсер-антисыворотка метод может является либо высокоспецифичным к отдельным полиароматическим соединениям, либо определять весь класс веществ в целом. Метод ФПИА может быть использован для быстрого скрининга продуктов питания и объектов окружающей среды на загрязнение ПАУ.

Благодарности

Данная работа была выполнена при финансовой поддержке гранта «Разработка экспрессного определения полиароматических углеводов методом флуоресцентного поляриационного иммуноанализа» (NATO EST.CLG.978618).

Литература

- [1] Kielhorn J., Boehncke A. // World Health Organisation (WHO): Geneva. 1998. P. 123-152.
- [2] Johansson I., Van Baven B. // Chemosphere. 2003. V. 53. P. 123-128.
- [3] Vasconcellos P.C., Zacarias D., Pires M.A.F., Pool C.S., Carvalho L.R.F. // Atmospheric Environment. 2003. V. 37. № 21. P. 3009-3018.
- [4] Groner M., Muroski A.R., Myrick M.L. // Marine Pollution Bulletin. 2001. V. 42. P. 935-941.
- [5] Davi M.L. // Life Chemistry Reports. 1994. V. 10. P. 181-188.
- [6] Kayali-Sayadi M.N., Rubio-Barroso S., Garcia-Iranzo R., Polo-Diez L.M. // J. Liquid Chromatogr. Related Tech. 2000. V. 23. P. 1913-1025.
- [7] Moret S., Conte L.S. // J. Chromatogr. A. 2000. V. 882. P. 245-253.
- [8] Crépineau C., Rychen G., Feidt C., Le Roux Y., Lichtfouse E., Laurent F. // J. Agric. Food Chem. 2003. V. 51. № 16. P. 4841-4845.
- [9] Liguori L., Heggstad K., Hove H.T., Julshamn K. // Anal. Chim. Acta. 2006. V. 573-574. P. 181-188.
- [10] Dennis M.J. // Food and Chem. Toxicology. 1983. V. 21. P. 569-574.
- [11] Rupert S., Palme S., Anklam E. // J. Chromatogr. A. 2006. V. 1103. № 2. P. 307-313.
- [12] Bruni C. // J. Theor. Biology. 1984. V. 109. Part 1. P. 71-76.
- [13] Tilton F., Benson W.H., Schlenk D. // Env. Toxic. Pharm. 2001. V. 9. P. 169-172.
- [14] Song Y.F., Jing X., Fleischmann S., Wilke B.-M. // Chemosphere. 2002. V. 48. P. 993-1001.
- [15] Luthje K., Hyotylainen T., Riekkola M.-L. // Anal. Bioanal. Chem. 2004. V. 378. P. 1991-1998.
- [16] Shariati-Feizabadi S., Yamini Y., Bahramifar N. // Anal. Chim. Acta. 2003. V. 489. P. 21-31.

- [17] Charalabaki M., Psillakis E., Mantzavinos D., Kalogerakis N. // *Chemosphere*. 2005. V. 60. № 5. P. 690-698.
- [18] Chen H.-W. // *Anal. Sci.* 2004. V. 20. № 10. P. 1383.
- [19] Oleszczuk P., Baran S. J. // *Hazard. Materials*. 2004. V. 113. P. 237-245.
- [20] Lage-Yusty M.A., Cortizo-Davina J.L. // *Food Control*. 2005. V. 16. P. 59-64.
- [21] Librando V., Hutzinger O., Tringali G., Aresta M. // *Chemosphere*. 2003. V. 54. P. 1189-1197.
- [22] King A.J., Readman J.W., Zhou J.L. // *Anal. Chim. Acta*. 2004. V. 523. P. 259-267.
- [23] Helaleh M.I.H., Al-Omair A., Nisar A., Gevao B. // *J. Chromatogr. A*. 2005. V. 1083. P. 153-160.
- [24] Janska M., Tomaniova M., Hajlova J., Kocourek V. // *Anal. Chim. Acta*. 2004. V. 520. P. 93-103.
- [25] Yusa V., Quintas G., Pardo O., Pastor A., de la Guardia M. // *Talanta*. 2006. V. 69. № 4. P. 807-815.
- [26] Горячева И.Ю., Федоренко Е.В., Панкин К.Е. // *Журн. аналит. химии*. 2006. Т. 61. № 8. С. 876-879.
- [27] Дмитриенко С.Г., Шаповалова Е.Н., Гурарий Е.Я., Кочетова М.В., Шпигун О.А., Золотов Ю.А. // *Журн. аналит. химии*. 2002. Т. 57. № 11. С. 1189-1196.
- [28] Нестеренко П.Н., Рыбалко М.А. // *Журн. аналит. химии*. 2005. Т. 60. № 4. С. 349-354.
- [29] Ravindra K., Godoi A.F.L., Bencs L., Van Grieken R. // *J. Chromatogr. A*. 2006. V. 1114. № 2. P. 278-281.
- [30] Beier R.C., Stanker L.H. // *Recent Res. Develop. Agric. Food Chem*. 2000. V. 4. P. 59-93.
- [31] Морозова В.С., Левашова А.И., Еремин С.А. // *Журн. аналит. химии*. 2005. Т. 60. № 3. С. 230-246.
- [32] Hennion M., Barcelo D. // *Anal. Chim. Acta*. 1998. V. 362. P. 3-34.
- [33] Herikstad B.V., Ovrebø S., Haugen A., Hagen I. // *Carcinogenesis*. 1993. V. 14. P. 307-309.
- [34] Székács A., Le H.M., Knopp D., Niessner R. // *Anal. Chim. Acta*. 1999. V. 399. P. 127-134.
- [35] Scharnweber T., Fisher M., Suchánek M., Knopp D., Niessner R. // *Fresenius J. Anal. Chem*. 2001. V. 371. P. 578-585.
- [36] Li K., Woodward L.A., Karu A.E., Li Q.X. // *Anal. Chim. Acta*. 2000. V. 419. P. 1-8.
- [37] Matschulat D., Deng A., Niessner R., Knopp D. // *Analyst*. 2005. V. 130. № 7. P. 1078-1086.
- [38] Gobi K.V., Sasaki M., Shoyama Y., Miura N. // *Sens. Actuators B: Chem*. 2003. V. 89. P. 137-143.
- [39] Kim S.J., Gobi K.V., Harada R., Shankaran D.R., Miura N. // *Sens. Actuators B: Chem*. 2006. V. 115. № 1. P. 349-356.
- [40] Yadavalli V.K., Pishko M.V. // *Anal. Chim. Acta*. 2004. V. 507. P. 123-128.
- [41] Fähnrich K.A., Pravda M., Guilbault G.G. // *Biosens. Bioelectron*. 2003. V. 18. P. 73-82.
- [42] Nording M., Frech K., Persson Y., Forsman M., Haglund P. // *Anal. Chim. Acta*. 2006. V. 555. № 1. P. 107-113.
- [43] Chuang J.C., Van Emon J.M., Chou Y.-L., Junod N., Finegold J.K., Wilson N.K. // *Anal. Chim. Acta*. 2003. V. 486. № 1. P. 31-39.
- [44] Chuang J.C., Pollard M.A., Chou Y.L., Menton R.G., Wilson N.K. // *Sci. Total Environ*. 1998. V. 224. № 1-3. P. 189-199.
- [45] Nording M., Haglund P. // *Anal. Chim. Acta*. 2003. V. 487. № 1. P. 43-50.
- [46] Martinez E., Gros M., Lacorte S., Barcelo D. // *J. Chromat. A*. 2004. V. 1047. № 2. P. 181-188.
- [47] Kim J.H., Moon J.K., Li Q.X., Cho J.Y. // *Anal. Chim. Acta*. 2003. V. 498. № 1-2. P. 55-60.
- [48] Ghiasvand A.R., Hosseinzadeh S., Pawliszyn J. // *J. Chromatogr. A*. 2006. V. 1124. № 1-2. P. 35-42.
- [49] Krikunova V.S., Eremin S.A., Smith D.S., Landon J. // *Intern. J. Environ. Anal. Chem*. 2003. V. 83. № 7-8. P. 585-595.
- [50] Yakovleva J.N., Lobanova A.Yu., Shutaleva E.A., Kourkina M.A., Mart'ianov A.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B., Eremin S.A. // *Anal. Bioanal. Chem*. 2004. V. 378. № 3. P. 634-641.

- [51] Eremin S.A., Knopp D., Niessner R., Hong J.Y., Park S.-J., Ja C.M. // Environ. Chem. 2005. V. 2. P. 227-234.
- [52] Еремин С.А. // Микроэлементы в медицине. 2005. Т. 6. № 3. P. 44–50.
- [53] Eremin S.A., Smith D.S. // Comb. Chem. High T. SCR. 2003. V. 6. № 3. P. 257-266.
- [54] Eremin S.A., Ryabova I.A., Yakovleva J.N., Yazynina E.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // 2002. Anal. Chim. Acta. V. 468. P. 229-236.
- [55] Goryacheva I.Y., Shutaleva E.A., Suchanek M., Niessner R., Knopp D., Eremin S.A. // Anal. Lett. 2007. V. 40. № 4. P. 39-42.

Литература (with title)

- [1] Kielhorn J., Boehncke A. // World Health Organisation (WHO): Geneva. 1998. P.
- [2] Johansson I., Van Baven B. // Chemosphere. 2003. V. 53. P. 123-128.
- [3] Perola C. Vasconcellos, Davi Zacarias, Maria A. F. Pires, Cristina S. Pool and Lilian R. F. Carvalho. Measurements of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particles from the metropolitan area of Sao Paulo City, Brazil, Pages 3009-3018. Atmospheric Environment Volume 37, Issue 21, July 2003, Pages 3009-3018
- [4] Groner M., Muroski A.R., Myrick M.L. // Marine Pollution Bulletin. 2001. V. 42. P. 935-941.
- [5] Davi M.L. // Life Chemistry Reports. 1994. V. 10. P. 181-188.
- [6] Kayali-Sayadi M.N., Rubio-Barroso S., Garcia-Iranzo R., Polo-Diez L.M. // J. Liquid Chromatogr. Related Tech. 2000. V. 23. P. 1913-1025.
- [7] Moret S., Conte L.S. // J. Chromatogr. A. 2000. V. 882. P. 245-253.
- [8] J. Agric. Food Chem. 2003, 51(16), pp 4841 - 4845;
Contamination of Pastures by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Vicinity of a Highway. Cécile Crépineau, G. Rychen, C. Feidt, Y. Le Roux, E. Lichtfouse, and F. Laurent.
- [9] Lucia Liguori, Karstein Heggstad, Helge T. Hove and Kåre Julshamn. An automated extraction approach for isolation of 24 polyaromatic hydrocarbons (PAHs) from various marine matrixes. Anal. Chim. Acta, Vol. 573-574, №. 181-188 (2006).
- [10] Dennis M.J. // Food and Chem. Toxicology. 1983. V. 21. P. 569-574.
- [11] Rupert Simon, Sonja Palme and Elke Anklam. Single-laboratory validation of a gas chromatography-mass spectrometry method for quantitation of 15 European priority polycyclic aromatic hydrocarbons in spiked smoke flavourings. J. Chromatogr. A, Vol. 1103 (№2) 307-313 (2006).
- [12] Bruni C. // J. Theor. Biology. 1984. V. 109. Part 1. P. 71-76.
- [13] Tilton F., Benson W.H., Schlenk D. // Env. Toxic. Pharm. 2001. V. 9. P. 169-172.
- [14] Song, Y.F., Jing, X., Fleischmann, S. and Wilke, B.-M. 2002. Comparative study of extraction methods for the determination of PAHs from contaminated soils and sediments. Chemosphere, 48: № 993-1001.
- [15] Luthje, K., Hyotylainen, T. and Riekkola, M.-L. 2004. On-line coupling of microporous membrane liquid-liquid extraction and gas chromatography in the analysis of organic pollutants in water. Anal. Bioanal. Chem., 378: № 1991-1998.
- [16] Shariati-Feizabadi, S., Yamini, Y. and Bahramifar, N. 2003. Headspace solvent microextraction and gas chromatographic determination of some polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. Anal. Chim. Acta, 489: 21-31.
- [17] Magdalini Charalabaki, Elefteria Psillakis, Dionissios Mantzavinos and Nicolas Kalogerakis. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater treatment plant effluents using hollow fibre liquid-phase microextraction Chemosphere, Vol. 60 (№5) 2005 Pages 690-698.
- [18] Hong-Wen CHEN. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water by Solid-Phase Microextraction and Liquid Chromatography. Analytical Sciences, 2004, 20 (№10), 1383.
- [19] Oleszczuk, P. and Baran S. 2004. Application of solid-phase extraction to determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge extracts. J. Hazard. Materials, 113: 237-245.
- [20] Lage Yusty, M.A. and Cortizo Davina, J.L. 2005. Supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection method for polycyclic aromatic hydrocarbons investigation in vegetable oil. Food Control, 16: № 59-64.

- [21] Librando, V., Hutzinger, O., Tringali, G. and Aresta, M. 2003. Supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from marine sediments and soil samples. *Chemosphere*, 54: №1189-1197.
- [22] King, A.J., Readman, J.W. and Zhou, J.L. 2004. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water by solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 523: № 259-267.
- [23] Helaleh, M.I.H., Al-Omair, A., Nisar, A. and Gevao, B. 2005. Validation of various extraction techniques for the quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges using gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1083: № 153-160.
- [24] Janska, M., Tomaniova, M., Hajlova, J. and Kocourek, V. 2004. Appraisal of "classic" and "novel" extraction procedure efficiencies for the isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives from biotic matrices. *Anal. Chim. Acta*, 520: № 93-103.
- [25] V. Yusa, G. Quintas, O. Pardo, A. Pastor and M. de la Guardia. Determination of PAHs in airborne particles by accelerated solvent extraction and large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, Vol. 69(№4), 807-815 (2006).
- [26] И. Ю. Горячева, Е. В. Федоренко, К. Е. Панкин. Фосфориметрическое определение пирена в бензине и образцах почвы, загрязненных бензином. // *Журн. аналит. химии*. 2006. Т. 61, № 8. С. 876-879.
- [27] Дмитриенко С.Г., Шаповалова Е.Н., Гурарий Е.Я., Кочетова М.В., Шпигун О.А., Золотов Ю.А. Концентрирование полициклических ароматических углеводородов на пенополиуретанах и их определение в водах с использованием люминесценции и высокоэффективной жидкостной хроматографии. // *Журн. аналит. химии*. 2002. Т. 57. № 11. С. 1189-1196.
- [28] P. N. Nesterenko and M. A. Rybalko. Separation of homologues of organic compounds using the gradient of the eluent flow rate on a monolithic porous column. *ZAX60(№4)*, (2005) 349 – 354. 398–403.
- [29] Khaiwal Ravindra, Ana F.L. Godoi, Laszlo Bencs and Rene Van Grieken. Low-pressure gas chromatography-ion trap mass spectrometry for the fast determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in air samples. *J. Chromatogr. A*, Vol. 1114 (№2) 278-281 (2006).
- [30] Beier, R.C. and Stanker, L.H. Application of Immunoassay for Detection of Antibiotics in Foods and Feed: A Review. *Recent Res. Develop. Agric. Food Chem.* 4: 59-93. 2000.
- [31] Морозова В.С., Левашова А.И., Еремин С.А. Определение пестицидов методом иммуноферментного анализа. // *Журн. аналит. химии*. 2005. Т. 60, № 3. С. 230-246.
- [32] Hennion, M. and Barcelo D. 1998. Strengths and limitations of immunoassays for effective and efficient use for pesticide analysis in water samples: A review. *Anal. Chim. Acta*, 362: 3-34.
- [33] Herikstad, B.V., Ovrebo, S., Haugen, A. and Hagen, I. 1993. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine from coke-oven workers with a radioimmunoassay. *Carcinogenesis*, 14: № 307-309.
- [34] Székács, A., Le, H.M., Knopp, D. and Niessner, R. 1999. A modified enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for polyaromatic hydrocarbons. *Anal. Chim. Acta*, 399: № 127-134.
- [35] Scharnweber, T., Fisher, M., Suchánek, M., Knopp, D. and Niessner, R. 2001. Monoclonal antibody to polycyclic aromatic hydrocarbons based on a new benzo[a]pyrene immunogen. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 371: № 578-585.
- [36] Li, K., Woodward, L.A., Karu, A.E. and Li, Q.X. 2000. Immunochemical detection of polycyclic aromatic hydrocarbons and 1-hydroxypyrene in water and sediment samples. *Anal. Chim. Acta*, 419: № 1-8.

- [37] Matschulat, D., Deng, A., Niessner R. and Knopp, D. 2005. Development of a highly sensitive monoclonal antibody based ELISA for detection of benzo[a]pyrene in potable water. *Analyst*, 130 (№7): 1078-1086.
- [38] Gobi, K.V., Sasaki, M., Shoyama, Y. and Miura, N. 2003. Highly sensitive detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and association constants of the interaction between PAHs and antibodies using surface plasmon resonance immunosensor. *Sens. Actuators, B: Chem.*, 89 №: 137-143.
- [39] Sook Jin Kim, K. Vengatajalabathy Gobi, Ryohei Harada, D. Ravi Shankaran and Norio Miura. Miniaturized portable surface plasmon resonance immunosensor applicable for on-site detection of low-molecular-weight analytes. *Sensors and Actuators B: Chemical*. Volume 115(№1) 349-356 (2006).
- [40] Yadavalli, V.K. and Pishko M.V. 2004. Biosensing in microfluidic channels using fluorescence polarization. *Anal. Chim. Acta*, 507 №: 123-128.
- [41] Fähnrich, K.A., Pravda, M. and Guilbault G.G. 2003. Disposable amperometric immunosensor for the detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using screen-printed electrodes. *Biosens. Bioelectron.*, 18: 73-82.
- [42] Malin Nording, Kristina Frech, Ylva Persson, Mats Forsman and Peter Haglund. On the semi-quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil by an enzyme-linked immunosorbent assay kit. *Analytica Chimica Acta*, Volume 555, Issue №1, 5 January 2006, Pages 107-113.
- [43] Chuang J.C., Van Emon J.M., Chou Y.-L., Junod N., Finegold J.K., Wilson N.K. Comparison of immunoassay and gas chromatography-mass spectrometry for measurement of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil // *Anal. Chim. Acta*. 2003. V. 486. № 1. P. 31-39.
- [44] Chuang J.C., Pollard M.A., Chou Y.L., Menton R.G., Wilson N.K. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in house dust and residential soil. // *Sci. Total Environ*. 1998. V. 224. № 1-3. P. 189-199.
- [45] Nording M., Haglund P. Evaluation of the structure/cross-reactivity relationship of polycyclic aromatic compounds using an enzyme-linked immunosorbent assay kit // *Anal. Chim. Acta*. 2003. V. 487. № 1. P. 43-50.
- [46] Elena Martinez, Meritxell Gros, S^oxed;lvia Lacorte and Damia Barcelo. Simplified procedures for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediments and mussels. *J. Chromat. A*, 1047 (№ 2) (2004) Pages 181-188
- [47] Kim J.H., Moon J.K., Li Q.X., Cho J.Y. One-step pressurized liquid extraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons. // *Anal. Chim. Acta*. 2003. V. 498. № 1-2. P. 55-60.
- [48] Ali Reza Ghiasvand, Shokouh Hosseinzadeh and Janusz Pawliszyn. New cold-fiber headspace solid-phase microextraction device for quantitative extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment. *J. Chromatogr. A*, Vol. 1124 (№1-2) 35-42 (2006).
- [49] Krikunova V.S., Eremin S.A., Smith D.S., Landon J. Dioxin Contamination Using Polarization Fluoroimmunoassay for Chlorinated Phenoxyacid Pesticides. // *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 2003. V. 83. № 7-8. P. 585 – 595.
- [50] Yakovleva J.N., Lobanova A.Yu., Shutaleva E.A. Kourkina M.A., Mart'ianov A.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B., Eremin S.A. Express detection of nonylphenol in water samples by fluorescence polarization immunoassay. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2004. V. 378. № 3. P. 634-641.

- [51] Eremin S.A., Knopp D., Niessner R., Hong J.Y., Park S.-J., Ja C.M. High throughput determination of ВТЕХ by one-step fluorescence polarization immunoassay. // Environ. Chem. 2005. V. 2. P. 227-234.
- [52] С.А. Еремин. ПОЛЯРИЗАЦИОННЫЙ ФЛУОРОИММУНОАНАЛИЗ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ. Микроэлементы в медицине 6 (3): 44–50 (2005).
- [53] Eremin, S.A. and Smith, D.S. 2003. Fluorescence polarization immunoassays for pesticides. Comb. Chem. High T. SCR. V. 6. № 3. P. 257-266.
- [54] Eremin, S.A., Ryabova, I.A., Yakovleva, J.N., Yazynina, E.V., Zherdev, A.V. and Dzantiev, B.B. 2002. Development of a rapid, specific fluorescence polarization immunoassay for the herbicide chlorsulfuron. Anal. Chim. Acta, 468: 229-236.
- [55] Goryacheva I.Y., Shutaleva E.A., Suchanek M., Niessner R., Knopp D., Eremin S.A. Development of A fluorescence polarization immunoassay for polycyclic aromatic hydrocarbons. Accepted for publication in Anal. Lett., Vol. 40, Issue 4, registration number AL3942 (2007).