



На правах рукописи

ЮРАСОВ НИКОЛАЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

**ИММУНОАФФИННОЕ КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ
И ТЕСТ-ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ
ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ
УГЛЕВОДОРОДОВ И МИКОТОКСИНОВ**

02.00.02 – Аналитическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

1 0 Н О Я 2 0 1 1

Саратов 2011

Работа выполнена в Саратовском государственном университете
имени Н.Г. Чернышевского

Научный руководитель: доктор химических наук, доцент
Русанова Татьяна Юрьевна

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Бабкина Софья Сауловна

кандидат химических наук
Нестеренко Ирина Сергеевна

Ведущая организация: Владимирский государственный университет
имени А.Г. и Н.Г. Столетовых

Защита состоится 01 декабря 2011 года в 14 ч. 00 мин на заседании
диссертационного совета Д 212.243.07 по химическим наукам при Саратовском
государственном университете им. Н.Г. Чернышевского по адресу: 410012, г.
Саратов, ул. Астраханская 83, СГУ, Институт химии, I корпус.

С диссертацией можно ознакомиться в ЗНБ им. В.А. Артисевич Саратовского
государственного университета им. Н.Г. Чернышевского.

Автореферат разослан 31 октября 2011 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор химических наук



Русанова Т.Ю.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

Разработка простых и доступных широкому кругу потребителей методик, позволяющих осуществлять контроль качества окружающей среды, продуктов питания и кормов является в настоящее время одной из важнейших задач аналитической химии. В этом плане возможности иммунохимических методов разделения, концентрирования и определения токсикантов, характеризующихся высокой селективностью и чувствительностью, использованы не полностью.

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ¹) и микотоксины относятся к высокотоксичным и широко распространенным загрязнителям, которые содержатся в объектах окружающей среды и пищевых продуктах в следовых количествах. Чаще всего для их определения используют дорогостоящие и трудоемкие хроматографические методы анализа. В то же время актуальной является разработка доступных потребителю экспрессных методов их определения, а также способов выделения и концентрирования указанных токсикантов из объектов сложной природы. Все большую популярность в аналитической практике приобретают иммуноаффинные колонки для концентрирования токсикантов и иммуотесты для их обнаружения, основанные на специфическом взаимодействии антиген-антитела, построенном на принципе биологического распознавания. Одной из тенденций развития иммуноаффинного концентрирования является использование золь-гель технологии при иммобилизации иммунореагентов, позволяющей регулировать размер пор полимерной сетки и обеспечивать защитное окружение для биомолекул. Однако в литературе описаны лишь единичные примеры применения золь-гель материалов в качестве иммуноаффинных сорбентов и отсутствуют сведения о сравнении различных подходов к иммобилизации антител при концентрировании аналитов. Применение иммунофильтрационных тестов ограничено высоким матричным фоном для сложных объектов анализа и, как правило, определением индивидуальных токсикантов. Таким образом, изучение и применение в иммуноаффинном концентрировании новых материалов с иммобилизованными антителами, поиск подходов к снижению фонового сигнала и одновременному определению нескольких аналитов с использованием иммунофильтрационных тестов является актуальным.

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования является разработка и оптимизация простых, экспрессных иммунохимических методик

¹ IgG – вторичные кроличьи антигенные антитела; АН – ацетонитрил; Ат – антитела; БАП – бенз[а]пирен; ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием; ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием; ДОН – дезоксиинваленол; ДОН-ПХ, НТ-2-ПХ, – конъюгаты аналитов с пероксидазой хрена; ДС – декстран сульфат; ЗЕА – зеараленон; ИАК – иммуноаффинная колонка; ИФА – иммунофильтрационный анализ; КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза; КУ – контрольный уровень; МТ – микотоксин(ы); МТ-ЩФ, ЗЕА-ЩФ, ОТА-ЩФ – конъюгаты микотоксинов с щелочной фосфатазой; НТ-2 – НТ-2 токсин; ОТА – охратоксин А; ПАУ – полициклические ароматические углеводороды; ПХ – пероксидаза; ФУМ – фумонизин В1; хрена; ПЭГ – полиэтиленгликоль; ПЭПА – полиэтиленполиамины; Т-2 – Т-2 токсин; ТМОС – тетраметоксисилан; ТФЭ – твердофазная экстракция; ФБ – фосфатно-солевой буферный раствор; ЩФ – щелочная фосфатаза.

концентрирования и тест-определения представителей полициклических ароматических углеводов и микотоксинов.

Для достижения поставленной цели решены следующие задачи:

- изучены сорбционные свойства иммуносорбентов на основе золь-гель материала с инкапсулированными антителами (Ат) и сефарозного геля с ковалентно-связанными Ат специфичными к ПАУ и охратоксину А (ОТА);
- разработаны методики иммуноаффинного концентрирования ПАУ и ОТА из природных вод и красного вина, соответственно, с последующим хроматографическим или флуориметрическим определением;
- расширены возможности иммунофильтрационных мембранных тест-систем в плане одновременного анализа трех микотоксинов (ОТА, зеараленон (ЗЕА), фумонизин В1 (ФУМ)) при иммобилизации специфических антител на отдельных зонах мембраны;
- оценена возможность использования иммунофильтрационного тест-метода для определения микотоксинов на двух контрольных уровнях (КУ), показана применимость данного подхода при анализе реальных объектов;
- оптимизированы методики иммунофильтрационного тест-определения микотоксинов, что позволило уменьшить матричный эффект при использовании пероксидазы хрена (ПХ) в качестве ферментной метки;
- разработаны методики тест-определения микотоксинов (ОТА, ЗЕА, ФУМ, дезоксиниваленола (ДОН), суммы Т-2- и НТ-2-токсина (Т-2/НТ-2) в пшенице, кукурузе и силосе.

Методы и объекты. Для решения поставленных в работе задач применяли комплекс иммунохимических (иммуноаффинные колонки, иммунофильтрационные мембранные тесты) и физико-химических (флуориметрия, спектрофотометрия, ВЭЖХ, ГХ-МС) методов анализа и исследования. Объектами исследования явились следующие вещества: ПАУ – пирен, бенз[а]пирен (БАП); микотоксины – зеараленон, охратоксин А, фумонизин В1, Т-2 и НТ-2 токсины, дезоксиниваленол.

Научная новизна состоит в следующем:

- проведена сравнительная оценка сорбционных свойств золь-гель материалов и сефарозного геля с иммобилизованными антителами, специфичными к ПАУ и ОТА;
- показана возможность использования иммуноаффинных колонок на основе золь-гель материалов для выделения и концентрирования ПАУ из водных сред и колонок на основе сефарозного геля для выделения ОТА из красного вина;
- разработаны и оптимизированы иммунофильтрационные мембранные тесты для индивидуального определения микотоксинов (ЗЕА, ОТА, ФУМ, ДОН, Т-2/НТ-2) и одновременного определения двух-трех аналитов указанного ряда в пшенице, кукурузе, силосе;
- оценена возможность снижения матричного фона при одновременном определении микотоксинов в сложных матрицах (пшеница, кукуруза, силос)

методом иммунофилтрационного анализа с использованием ПХ в качестве ферментной метки путем введения добавок полимеров;

- разработана методика визуального определения микотоксинов на двух контрольных уровнях, позволяющая оценивать степень загрязненности анализируемых образцов выше или ниже установленных количественных пределов.

Практическая значимость работы.

Разработаны тест-методики для индивидуального и одновременного определения нескольких микотоксинов (ЗЕА, ОТА, ФУМ, ДОН, Т-2/НТ-2) в пшенице, кукурузе, кормовом силосе, а также методики концентрирования пирена, БАП и ОТА из водных сред. Методики могут быть использованы в экологическом контроле, контроле качества пищевых продуктов и кормов. Оптимизированы условия иммобилизации антител в золь-гель материалы на основе тетраметоксисилана (ТМОС). Разработан подход к обнаружению аналитов на нескольких контрольных уровнях с использованием иммунофилтрационных мембранных тест-систем и подход к количественной оценке результатов тестов с использованием офисной техники (компьютер и планшетный сканер).

Положения, выносимые на защиту:

Способы концентрирования пирена, БАП и ОТА с использованием иммуноаффинных колонок на основе двух типов сорбентов: золь-гель материала с инкапсулированными антителами и сефарозного геля с ковалентно-связанными антителами.

Подход к одновременному иммунофилтрационному тест-определению аналитов на двух контрольных уровнях, основанный на варьировании концентрации иммобилизованных антител.

Способ снижения матричного фона при использовании пероксидазы хрена в качестве ферментной метки путем введения добавок катионного полиэлектролита.

Оригинальные методики индивидуального и одновременного тест-определения микотоксинов (ОТА, ЗЕА, ФУМ, ДОН, Т-2/НТ-2) методом мембранного иммуоферментного анализа в пшенице, кукурузе, силосе.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы представлены на следующих конференциях: IV Всероссийская научно-практическая конференция «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (Барнаул, Россия, 2009); Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2011» (Москва, Россия, 2011); Всероссийская конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (Краснодар, Россия, 2010); Всероссийская молодежная выставка-конкурс прикладных исследований, изобретений и инноваций (Саратов, Россия, 2009); 1st Int. summer school “Nanomaterials and nanotechnologies in living systems” (Москва, Россия, 2009);

VII Всероссийская конференция по анализу объектов окружающей среды «Экоаналитика-2009» (Йошкар-Ола, Россия, 2009); Съезд аналитиков России «Аналитическая химия – новые методы и возможности» (Москва, Россия, 2010); IV Международная конференция «Экстракция органических соединений» (ЭОС-2010) (Воронеж, Россия, 2010); VI и VII Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием «Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии» (Саратов, Россия, 2010, 2011).

Публикации. По теме диссертационного исследования опубликовано 18 публикаций, в том числе 3 статьи в международном и российских журналах из списка ВАК, 6 – в сборниках статей, 9 тезисов докладов международных и всероссийских конференций.

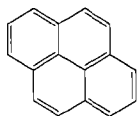
Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы, содержащего 175 ссылок, приложения. Работа изложена на 179 страницах, содержит 78 рисунков и 58 таблиц.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проекты №№ 08-03-00725а, 10-03-91168-ГФЕН_а, 11-03-93963-ЮАР_а.

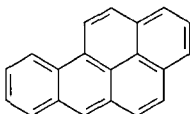
ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Литературный обзор. Рассмотрено применение иммунохимического взаимодействия антитело-антиген в методах разделения и концентрирования и тест-методах, развиваемых в диссертационной работе. Подробно описаны принципы иммуноаффинной экстракции, аналитические характеристики иммуноаффинных колонок, их преимущества по сравнению с традиционными экстракционными методами, достоинства новых золь-гель материалов, используемых в качестве сорбентов. Уделено внимание иммунофильтрационным мембранным тестам, их возможностям и ограничениям. Рассмотрены существующие подходы и принципы реализации тест-методик, их область применения в анализе реальных объектов.

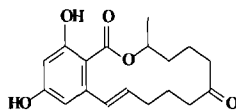
Глава 2. Экспериментальная часть. В качестве объектов исследования выступили представители групп ПАУ и микотоксинов:



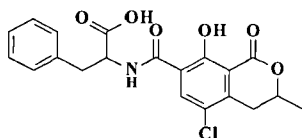
Пирен



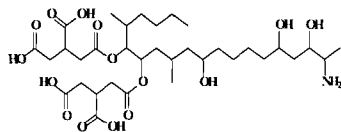
Бенз[а]пирен



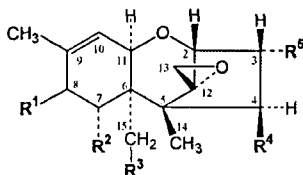
Зеараленон



Охратоксин А



Фумонизин В1



Токсин	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
Дезоксиниваленол	=O	OH	OH	H	OH
HT-2	-OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	OAc	OH	OH
T-2	-OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	OAc	OAc	OH

В работе использовали коммерческие антитела, специфичные к исследуемым токсикантам, и конъюгаты анализитов с ПХ. Конъюгаты анализитов с щелочной фосфатазой (ЩФ) синтезированы в Гентском университете².

Конструкция колонок для иммуоаффинной экстракции представлена на рис. 1. Между пористыми фильтрами (фритами) в колонку помещали 2 типа материалов: 1) золь-гель сорбент на основе ТМОС с инкапсулированными антителами, специфичными к ПАУ; 2) гель на основе бромцианактивированной сефарозы 4В с ковалентно иммобилизованными антителами, специфичными к ОТА. Концентрацию анализитов, элюированных из колонок, определяли методами флуориметрии (флуориметр RF-5301PC, «SHIMADZU», Япония) и ВЭЖХ со спектрофотометрическим и флуориметрическим детекторами (хроматографическая система «Стайер», Аквилон).

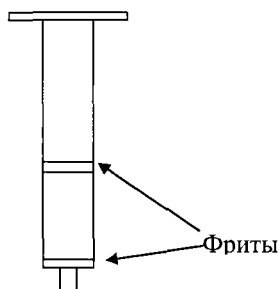


Рис. 1. Иммуоаффинная колонка для концентрирования или детектирования анализируемого компонента

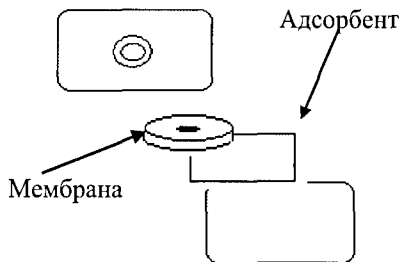


Рис. 2. Картридж многоразового использования для иммуофильтрационного анализа

² Автор выражает благодарность Prof. Sarah De Saeger (Гентский университет, Бельгия) за предоставленные иммуореагенты для определения микотоксинов и Prof. Dietmar Knopp (Мюнхенский технический университет, Германия) за предоставленные иммуореагенты для определения полициклических ароматических углеводородов.

Для тест-определения микотоксинов использовали устройство, показанное на рис. 2. На рабочий участок полимерной нейлоновой мембраны Immupodupe ABC (размер пор 0,45 мкм), размером 7x7 мм наносили 4 пятна вторичных антител (IgG) (по 1,5 мкл). Мембраны сушили 30 мин при 37°C, блокировали 30 мин в 2% растворе казеина в фосфатно-солевом буферном растворе (ФБ); сушили 45 мин при 37°C. Специфические антитела (разведенные в ФБ, 0,8 мкл) наносили в области иммобилизации IgG и сушили мембраны в течение 10 мин. Мембрану помещали в пластиковый картридж на адсорбент (ватный диск). Анализ включал в себя последовательное пропускание через мембрану экстракта анализируемого образца (600 мкл), конъюгата антитела с ферментом (60 мкл), промывочного раствора (3 раза по 60 мкл ФБ), субстрата (120 мкл). Каждую последующую стадию осуществляли после полного впитывания раствора адсорбентом. Ферментативную реакцию останавливали добавлением бидистиллированной воды (200 мкл).

Кроме визуальной оценки результатов теста проводили цифровую обработку сканированного изображения мембран. Полученные изображения обрабатывали в программе "Adobe Photoshop CS3". Показано, что наибольший отклик на продукты ферментативной реакции дает цветовая модель RGB. В случае применения в качестве фермента ЩФ оптимальной цветовой компонентой является G (зеленый цвет), в случае фермента ПХ – R (красный цвет).

Глава 3. Иммуноаффинное концентрирование ПАУ и охратоксина А.

На первом этапе работы проведено сравнение двух типов сорбентов с иммобилизованными специфичными к пирену и ОТА антителами. Долю сорбированного токсиканта рассчитывали на основе площадей хроматографических пиков для растворов до и после колонки. Показано, что в случае пирена более эффективным сорбентом является золь-гель материал (табл. 1), а в случае охратоксина А – гель на основе бромцианактивированной сефарозы, что, вероятно, обусловлено малым размером пор золь-гель материала (средний радиус пор составил 1,6 нм) и затрудненной диффузией молекул ОТА. Далее изучали сорбционные характеристики выбранных материалов и оптимизировали условия сорбции токсикантов и их элюирования из колонки.

Концентрирование ПАУ с использованием золь-гель материалов.

После промывки колонки ФБ пирен элюировали органическим растворителем, приводящим к разрушению иммунокомплекса антиген-антитело. В качестве возможных элюентов апробированы ацетонитрил (АН) и этанол. Показано, что практически полная десорбция пирена из колонки достигалась при элюировании 2 мл АН, что и использовалось нами в дальнейшем. Используемые колонки регенерировали пропусканием избытка АН и ФБ и повторяли сорбцию. Установлено, что колонки позволяют проводить до 12 циклов сорбция-десорбция без потери сорбционной активности.

Таблица 1

Сорбция пирена сорбентами с иммобилизованными антителами ($n=3$, $P=0,95$)

Масса пирена, введенного в колонку, нг	Масса сорбированного пирена, нг	Доля сорбированного пирена, %	
		золь-гель материал	сефарозный гель
20	20 ± 1	101 ± 3	97 ± 3
50	50 ± 2	100 ± 2	97 ± 2
75	75 ± 1	100 ± 1	95 ± 2
100	100 ± 2	100 ± 2	93 ± 3
500	492 ± 3	98 ± 1	81 ± 4

Для оценки неспецифической сорбции пирена на золь-гель сорбенте проводили эксперименты с использованием золь-гель материала, приготовленном по такой же методике, но без введения Ат. Так, при пропускании 250 мл раствора пирена с концентрацией 0,5 нг/мл доля сорбции пирена на колонке с Ат и без Ат составила 96 и 47 % соответственно, что говорит о значительном вкладе иммунохимического взаимодействия в удерживание пирена на сорбенте.

Колонки с золь-гель материалами позволяют концентрировать пирен из растворов, содержащих до 125 нг с высокой степенью извлечения. При этом величина фактора концентрирования пирена из его растворов с концентрацией 0,5 нг/мл достигает 100 (при пропускании 250 мл раствора и его элюировании 2 мл растворителя) при степени извлечения 96 %. После предварительного выделения и концентрирования пирена из анализируемых водных растворов определяли его содержание методом ВЭЖХ или флуориметрии. Метрологические характеристики определения пирена с предварительным концентрированием на иммуноаффинной колонке и без концентрирования представлены в табл. 2.

Таблица 2

Метрологические характеристики определения пирена в модельных растворах

Метод		НГОС, нг/мл	ПрО, нг/мл	S_r
Флуориметрия	-	5	1,5	0,03
	с предварительным концентрированием	0,07	0,02	0,05
ВЭЖХ	-	10	3,5	0,02
	с предварительным концентрированием	0,1	0,03	0,04

Исследование влияния на сорбцию пирена гомологично сходных с ним веществ (бенз[а]пирен, хризен, фенантрен) показало, что при содержании в растворе 4-8 кратного избытка этих веществ пирен сорбируется практически полностью и степень извлечения R составляет не менее 96%.

Аналогично получали золь-гель сорбенты, содержащие Ат специфичные к БАП. Доля сорбированного БАП, рассчитанная на основе площадей хроматографических пиков для растворов до и после колонки, представлена в табл. 3. Фактор концентрирования БАП из модельных растворов объемом 250 мл и концентрацией 1,6 нг/мл (элюирование 2 мл АН) составил 98±5.

Разработанные методики концентрирования пирена и БАП апробировали на реальных объектах (табл. 4, 5).

Таблица 3

Сорбция бенз[а]пирена золь-гель сорбентом с иммобилизованными антителами

Масса БАП, введенного в колонку, нг	Масса сорбированного БАП, нг	Доля сорбированного БАП, %
200	196 ± 2	98 ± 1
500	485 ± 7	97 ± 1
800	736 ± 4	92 ± 1
1000	920 ± 7	92 ± 2

Таблица 4

Определение пирена в объектах окружающей среды методом ВЭЖХ с предварительным концентрированием на ИАК

Введено (нг/мл)	Водопродная вода		Талая вода	
	Найдено (нг/мл)	Открываемость, %	Найдено (нг/мл)	Открываемость, %
-	< 0,07	-	0,13	-
0,50	0,55 ± 0,08	110	0,6 ± 0,1	120
5,0	4,8 ± 0,6	96	5,2 ± 0,8	104

Таблица 5

Результаты анализа водных объектов на бенз[а]пирен

Объект	Найденное содержание, нг/мл
Водопродная вода	Не обнаружено
Волжская вода	Не обнаружено
Вода дорожных стоков	0,3 ± 0,1

Правильность методики концентрирования ПАУ из водных природных объектов с последующим ВЭЖХ определением подтверждена методом «введено-найденно». Таким образом, стадия иммуноаффинного концентрирования позволила определять пирен в водных растворах на уровне сотых долей нг. ИАК позволяют концентрировать ПАУ и обеспечивать снижение предела обнаружения аналита в десятки раз.

Концентрирование ОТА с использованием сефарозного геля. Для концентрирования ОТА его водные растворы пропускали через колонку, заполненную сефарозным гелем с ковалентно иммобилизованными специфичными антителами. После промывки колонки ФБ ОТА элюировали органическим растворителем. Показано, что оптимальным элюентом является смесь ацетонитрил : уксусная кислота (99:1 об. %), объем элюата – 2,5 мл

(табл. 6), при этом средняя степень извлечения ОТА из его растворов, содержащих 2,5-20 нг/мл составила 93 %.

Таблица 6

Сорбция ОТА на ИАК с сефарозным гелем при элюировании чистым ацетонитрилом и смесью ацетонитрил : уксусная кислота (99:1)

С, нг/мл (до колонки)	Степень извлечения R, %	
	ацетонитрил	ацетонитрил : уксусная кислота (99:1)
2,5	85 ± 2	96 ± 3
5,0	87 ± 4	95 ± 2
10	81 ± 3	93 ± 4
20	74 ± 5	89 ± 5

Разработанные колонки применены для извлечения ОТА из красного вина. Результаты определения ОТА в красном вине при использовании иммуноаффинных колонок и последующего ВЭЖХ-Фл детектирования представлены в табл. 7. Правильность определения подтверждена методом «введено-найдено».

Таблица 7

Оценка правильности методики определения ОТА в красном вине с предварительным концентрированием на ИАК с сефарозным гелем (n=3)

Введено, нг/мл	Найдено, нг/мл	Критерий Стьюдента, табл.	Критерий Стьюдента, расч.
1,0	0,94 ± 0,08	4,3	3,2
2,0	2,03 ± 0,07	4,3	1,6
3,5	3,42 ± 0,09	4,3	3,8

Глава 4. Мембранные иммунофилтрационные тесты для одновременного определения зеараленона, ократоксина А, фумонизина В1. К настоящему времени накоплен опыт создания иммунофилтрационных тест-систем для индивидуального определения целого ряда микотоксинов. В то же время интерес представляет разработка методик их одновременного определения, что связано с вероятным присутствием нескольких микотоксинов в природных матрицах. Широкие возможности с этой точки зрения представляют мембранные иммунофилтрационные тесты, позволяющие иммобилизовать специфические антитела на отдельных зонах мембраны. Принцип действия таких тестов заключается в конкуренции за места связывания специфических Ат между аналитом и его конъюгатом с ферментом. В отсутствии аналита в пробе со специфическими антителами связывается конъюгат, обеспечивая протекание ферментативной реакции после добавления субстрата, приводящее к возникновению окраски. Присутствие аналита в пробе выше определенной концентрации (контрольного уровня, КУ) приводит к отсутствию окраски.

В качестве объектов для исследования возможности одновременного определения нескольких аналитов нами выбраны широко распространенные загрязнители зерновых культур – ЗЕА, ОТА и ФУМ. В качестве ферментной метки использовали ЩФ, так как она обеспечивает, как правило, меньший фоновый сигнал.

Разработка методики иммунофильтрационного анализа (ИФА) включала: 1) выбор оптимальных условий приготовления мембран (концентрации вторичных антивидовых антител (IgG) и специфичных к аналиту Ат) и проведения иммуноанализа в модельных растворах (объемов и состава промывочных растворов, концентрации конъюгата аналита с ферментом, цветовой компоненты, времени детектирования окраски); 2) выбор способа пробоподготовки объекта анализа и условий проведения иммуноанализа в реальных объектах.

Выбор оптимальных условий определения микотоксинов в модельных растворах. В иммунофильтрационных тестах поверхность мембран предварительно модифицируют вторичными IgG, что позволяет иммобилизовать первичные (специфичные к аналиту) Ат с определенной ориентацией. Ранее использовали неразбавленные коммерческие препараты IgG, при этом влияние их концентрации на аналитический сигнал не изучалось. Нами оценена возможность уменьшения их концентрации с целью снижения себестоимости анализа. Показано, что при определении ЗЕА и ОТА оптимальным является 50-кратное разбавление IgG, которое заметно не влияет на визуальное определение пятен при различных разведениях Ат и конъюгата. Значение цветовой компоненты G, (выбранной как наиболее оптимальной при использовании в качестве фермента ЩФ) незначительно возрастает при увеличении разведения IgG (~ на 10 ед. при уменьшении концентрации в 50 раз) и более чувствительно к разведению специфических антител (возрастание ~ на 30 ед. при уменьшении концентрации в 2,5 раза) и в любом случае значительно ниже порога восприятия окраски 245 ед. Для определения ФУМ разбавление IgG приводило к заметному уменьшению сигнала, поэтому в дальнейшей работе использовали их без разбавления.

Оптимальные разведения антител и конъюгатов выбирали таким образом, чтобы, с одной стороны, при пропускании растворов, не содержащих микотоксинов, наблюдались яркие визуально детектируемые пятна, а с другой стороны, в присутствии микотоксинов на КУ пятна не проявлялись. Влияние концентрации иммунореагентов на примере определения ЗЕА представлено на рис. 3. В качестве оптимальных выбраны разведения анти-ЗЕА Ат 1:1500 и конъюгата ЗЕА-ЩФ 1:5000, которые удовлетворяют ранее приведенным требованиям и обеспечивают наибольшую чувствительность анализа за счет наименьшей концентрации специфических антител. Аналогично выбраны оптимальные концентрации иммунореагентов при определении ОТА и ФУМ (табл. 8). При регистрации изменения параметра G от времени после добавления субстрата выбрано оптимальное время детектирования, составившее 6 мин (рис. 4).

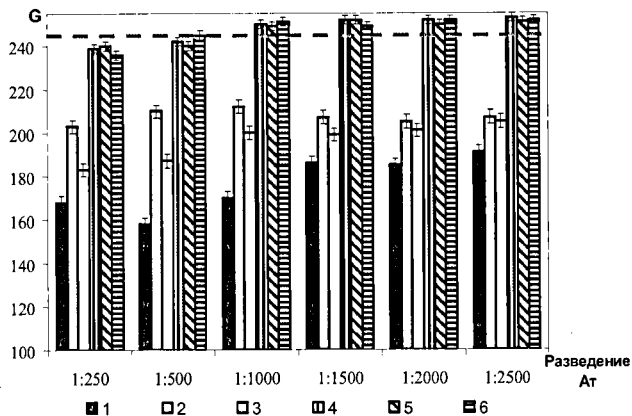


Рис. 3. Влияние разведения анти-ЗЕА Ат и конъюгата ЗЕА-ЩФ на величину параметра G в отсутствие (1-3) и присутствии (4-6) ЗЕА (20 нг/мл) в модельном растворе. Разведение конъюгата ЗЕА-ЩФ: 1:1000 (1,4), 1:2000 (2,5), 1:5000 (3,6). Время развития окраски 10 мин ($n=3$)

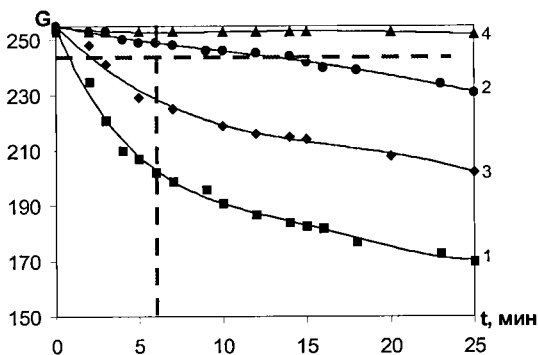
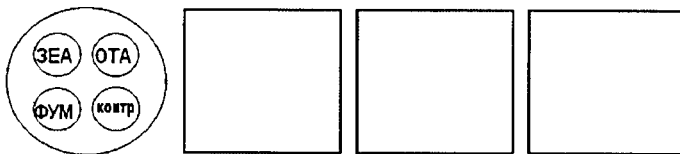


Рис. 4. Изменение координаты G во времени при определении ЗЕА в модельных растворах (1,2) и экстракте пшеницы (3,4) в отсутствие (1,3) и присутствии (2,4) аналита. Концентрация добавки ЗЕА 10 нг/мл. Разведение анти-ЗЕА Ат и конъюгата ЗЕА-ЩФ 1:1500 и 1:5000 соответственно ($n=3$)

Выбор оптимальных условий определения микотоксинов в пшенице, кукурузе и силосе. Из искусственно загрязненной пшеницы и кукурузы микотоксины экстрагировали раствором АН/Н₂О (70:30) с последующим центрифугированием, фильтрованием и разбавлением ФБ в 3 раза (силос в 4,2 раза). Контрольный уровень выбирали согласно требованиям ИЮПАК, как 50 % от установленного ЕС максимально допустимого содержания микотоксинов в зерновых культурах. Установлено, что оптимальные условия индивидуального определения ЗЕА, ОТА и ФУМ в пшенице и кукурузе существенно не отличались от ранее выбранных для модельных смесей. При определении силоса пропускание экстракта приводило к заметному матричному эффекту, что потребовало увеличения концентраций иммунореагентов (табл. 8). В качестве примера на рис. 5 представлен вид мембран при определении микотоксинов в силосе. Т.о., разработанные иммунофильтрационные тесты позволяют определять МТ при совместном присутствии на выбранных контрольных уровнях (табл. 9). Правильность разработанного тест-метода подтверждена методом «введено-найдено», а также методом ВЭЖХ-МС/МС. Результаты определения микотоксинов в образцах загрязненной кукурузы представлены в табл. 10.



С (ЗЕА), мкг/кг:	0	62,5	125
С (ОТА), мкг/кг:	0	12,5	25
С (ФУМ), мкг/кг:	0	1250	2500

Рис. 5. Вид мембран при определении ЗЕА, ОТА и ФУМ в экстракте силоса.
Время развития окраски 6 мин

Таблица 8

Оптимальные разведения специфических Ат и конъюгатов (МТ-ЩФ) для детектирования микотоксинов в исследуемых объектах

Микотоксин	Модельные растворы		Пшеница		Кукуруза		Силос	
	Ат	МТ-ЩФ	Ат	МТ-ЩФ	Ат	МТ-ЩФ	Ат	МТ-ЩФ
ЗЕА	1:2500	1:5000	1:1500	1:5000	1:2000	1:5000	1:250	1:5000
ОТА	1:100	1:500	1:100	1:500	1:150	1:500	1:50	1:500
ФУМ	1:50	1:100	1:40	1:100	1:40	1:100	1:25	1:100

Таблица 9

Контрольные уровни определения микотоксинов в объектах

Микотоксин	Модельные растворы, мкг/л	Пшеница, мкг/кг (нг/мл)	Кукуруза, мкг/кг (нг/мл)	Силос, мкг/кг (нг/мл)
ЗЕА	5	50 (5)	100 (10)	125 (10)
ОТА	0,25	2,5 (0,25)	2,5 (0,25)	25 (2)
ФУМ	50	500 (50)	500 (50)	2500 (200)

Таблица 10

Результаты определения микотоксинов в образцах кукурузы

Объект	ЗЕА		ОТА		Фумонизины В1, В2, В3	
	тест-метод	ВЭЖХ-МС/МС С, мкг/кг	тест-метод	ВЭЖХ-МС/МС С, мкг/кг	тест-метод	ВЭЖХ-МС/МС С, мкг/кг
№ 1	- - - -	н.о.	- - - -	н.о.	- - - -	н.о.
№ 2	- - - -	н.о.	+ + + +	11 ± 1	± ± ± -	В1 (3,1 ± 0,3)·10 ² В2 93 ± 7
№ 3	- - - -	н.о.	- - - -	н.о.	- - - -	В1 33 ± 4
№ 4	+ + + +	(1,7 ± 0,5)·10 ²	- - - -	н.о.	+ + + +	В1 (7,4 ± 0,9)·10 ² В2 (2,5 ± 0,2)·10 ² В3 52 ± 8

(-) – отрицательный результат – развитие интенсивной пурпурной окраски пятна на мембране при концентрации микотоксина < 100 (ЗЕА); 2,5 (ОТА); 500 (ФУМ) мкг/кг;

(±) – отрицательный результат – развитие малоинтенсивной пурпурной окраски пятна на мембране при концентрации микотоксина < 100 (ЗЕА); 2,5 (ОТА); 500 (ФУМ) мкг/кг;

(+) – положительный результат – отсутствие пурпурной окраски пятна на мембране при концентрации микотоксинов ≥ 100 (ЗЕА); 2,5 (ОТА); 500 (ФУМ) мкг/кг.

н.о. – микотоксин не обнаружен.

Рассчитанные в соответствии с рекомендациями ИЮПАК аналитические характеристики разработанных тест-систем приведены в табл. 11. Согласно рекомендациям ИЮПАК, метод может быть рекомендован для скрининга, т.к. правильность (отношение суммарного количества правильных результатов к общему числу анализов) составляет более 95 % и процент ложноотрицательных результатов не превышает 5%.

Таблица 11

Аналитические характеристики одновременного тест-определения ЗЕА, ОТА и ФУМ в образцах искусственно загрязненной пшеницы и кукурузы

Пшеница						
Параметр	ЗЕА		ОТА		ФУМ	
	< 5	≥ 5	< 0,25	≥ 0,25	< 50	≥ 50
Введено микотоксина, нг/мл	< 5	≥ 5	< 0,25	≥ 0,25	< 50	≥ 50
Число положительных результатов ($N_{\text{полож.}}$)	1	43	2	43	2	44
Число отрицательных результатов ($N_{\text{отриц.}}$)	39	2	38	2	38	1
Общее число образцов (N)	40	45	40	45	40	45
Процент ложноположительных результатов	2,5		5		5	
Процент ложноотрицательных результатов	4,4		4,4		2,3	
Правильность, %	96,5		95,3		96,5	
Специфичность, %	97,5		95,0		95,0	
Чувствительность, %	95,6		95,6		97,7	
Кукуруза						
Параметр	ЗЕА		ОТА		ФУМ	
	< 10	≥ 10	< 0,25	≥ 0,25	< 50	≥ 50
Введено микотоксина, нг/мл	< 10	≥ 10	< 0,25	≥ 0,25	< 50	≥ 50
Число положительных результатов ($N_{\text{полож.}}$)	1	34	1	34	0	35
Число отрицательных результатов ($N_{\text{отриц.}}$)	23	2	23	2	24	1
Общее число образцов (N)	24	36	24	36	24	36
Процент ложноположительных результатов	4,2		4,2		0	
Процент ложноотрицательных результатов	5,0		5,0		2,8	
Правильность, %	95,0		95,0		98,3	
Специфичность, %	95,8		95,8		100	
Чувствительность, %	94,4		94,4		97,2	

Определение микотоксинов на двух контрольных уровнях иммунофилтративным мембранным тест-методом. Предложен подход к тест-определению микотоксинов на двух концентрационных контрольных уровнях, основанный на варьировании разведения специфических Ат, иммобилизуемых на различных зонах мембраны. Подход апробирован при определении ЗЕА и ОТА в модельных растворах и экстрактах пшеницы и кукурузы. В качестве контрольных уровней выбраны концентрации, соответствующие $\frac{1}{2}$ и 2 ПДК для каждого из анализов. Присутствие микотоксина в пробе выше 2 ПДК приводит к подавлению окраски обоих пятен с различной концентрацией антител, присутствие микотоксина в пробе в концентрации между $\frac{1}{2}$ и 2 ПДК приводит к подавлению только одного из пятен. Таким образом, при использовании таких тест-систем потребитель может судить о степени загрязненности объекта анализа микотоксином. Кроме того, такой подход повышает надежность обнаружения токсиканта в пробе.

Подобраны оптимальные разведения антител для полного подавления окраски пятна при соответствующей концентрации микотоксина, время детектирования окраски на модельных системах и в объектах для каждого МТ (ЗЕА, ОТА), а также для их смеси (рис. 6, табл. 12).

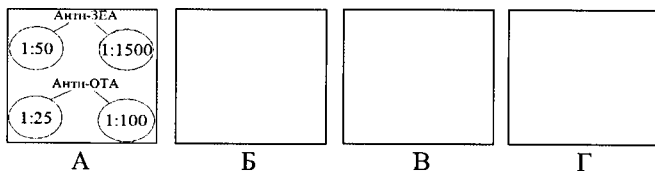


Рис. 6. Расположение зон иммобилизации антител, специфичных к соответствующему анализу (А) и вид мембран при одновременном определении ЗЕА и ОТА на двух контрольных уровнях в экстракте пшеницы; концентрации ЗЕА и ОТА: 0; 0,25; 20; 1 (Г) нг/мл, соответственно

Таблица 12

Оптимальные параметры определения микотоксинов на двух контрольных уровнях в пшенице и кукурузе

Параметр	Пшеница		Кукуруза	
	ЗЕА	ОТА	ЗЕА	ОТА
Разведение IgG	1:50			
Разведение Ат для определения микотоксинов на уровнях 2 ПДК / ½ ПДК	1:50 / 1:1500	1:25 / 1:100	1:50 / 1:2000	1:25 / 1:150
Разведение конъюгата МТ-ЩФ	1:5000	1:500	1:5000	1:500
Время развития окраски	6 мин			

Правильность предложенного подхода и результатов тест-определения подтверждена методом добавок (рис. 7) и независимым методом (ВЭЖХ-МС/МС). Данный подход может быть расширен в плане повышения количества контрольных уровней и их различного выбора.

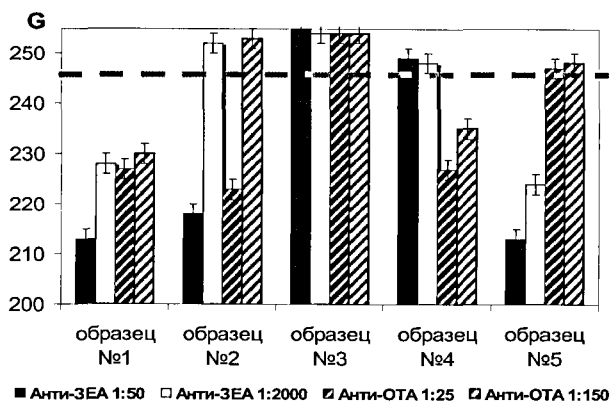


Рис. 7. Результаты определения ЗЕА и ОТА в экстрактах незагрязненной (объект 1), искусственно загрязненной (объекты 2, 3) и естественно загрязненной кукурузы (объекты 4, 5). Концентрации ЗЕА и ОТА составляют 0 и 0 (1), 10 и 0,25 (2), 40 и 1 (3), 19 и 0 (4), 0 и 1,2 (5) нг/мл соответственно. (n=3)

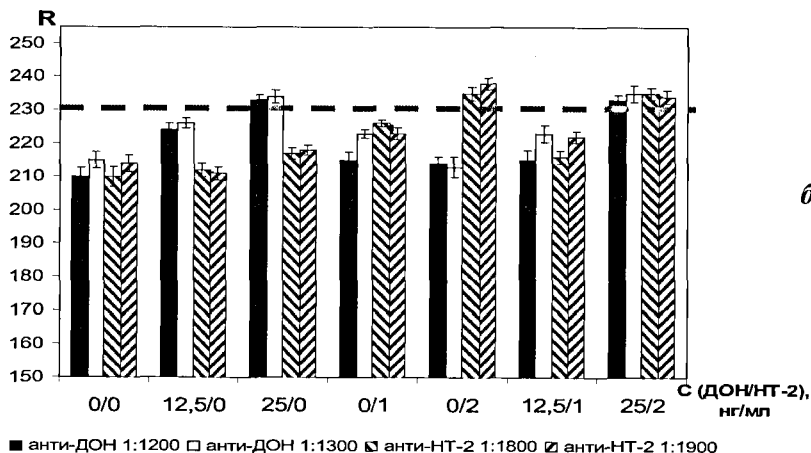
Глава 5. Снижение фонового сигнала в иммунофильтрационных тестах при использовании в качестве фермента пероксидазы хрена. Традиционно в качестве ферментной метки в иммунофильтрационных тестах применяют пероксидазу хрена. Это обусловлено ее коммерческой доступностью, относительной дешевизной и стабильностью. Однако при анализе сложных матриц (кукуруза, корма, перец, какао и т.д.) ее использование ограничено значительным матричным фоном. Причиной этого эффекта может являться адсорбция экстрагируемых из образца веществ белковой природы на поверхности мембраны, что приводит к неспецифическому окислению субстрата и возникновению окраски по всей площади рабочей зоны мембраны. В связи с этим, поиск путей снижения матричного фона образца в мембранном ИФА при использовании ПХ в качестве метки является актуальной задачей. С этой целью, как правило, проводят дополнительную стадию очистки экстракта, что существенно усложняет процедуру анализа. В данной работе исследована возможность снижения фонового сигнала путем варьирования состава и объема промывочных растворов, а также использования добавок полимеров различной природы при проведении ферментативной реакции. Исследования проводили на примере тест-определения микотоксинов трихотеценовой группы (ДОН, Т-2/НТ-2), являющихся широко распространенными природными загрязнителями зерновых культур и кормов для животных.

Предварительно подбирали оптимальные условия (концентрации иммунореагентов, цветовую компоненту, время детектирования окраски) индивидуального и одновременного определения ДОН и НТ-2 в модельных системах. Установлено, что наиболее чувствительной цветовой компонентой для тест-систем с использованием ПХ-метки является R (красный цвет). Результаты определения ДОН и НТ-2 токсина в модельных растворах при выбранных оптимальных условиях (табл. 13), представлены на рис. 8 и показывают принципиальную возможность одновременного определения аналитов иммунофильтрационным мембранным тест-методом.

Оптимизация методики пробоподготовки пшеницы, кукурузы и силоса. Установлено, что использование описанных в литературе методик пробоподготовки (экстракция ФБ и АН/Н₂О, 40/60 об.%) приводит к высокому матричному фону (окрашиванию всей рабочей зоны мембраны) и не позволяет детектировать аналитический сигнал при анализе кукурузы и силоса, а также снижает воспроизводимость при анализе пшеницы. Отмечено, что разбавление полученного водно-органического экстракта пшеницы и кукурузы в 10 раз, силоса – в 17 раз, а также последующее фильтрование приводят только к незначительному снижению фонового сигнала. Дополнительное центрифугирование экстракта также не даст положительного результата и не является целесообразным.

0 нг/мл	12,5 нг/мл ДОН	25 нг/мл ДОН	1 нг/мл НТ-2	2 нг/мл НТ-2	12,5 нг/мл ДОН + 1 нг/мл НТ-2	25 нг/мл ДОН + 2 нг/мл НТ-2

a)



b)

Рис. 8. Результаты одновременного определения НТ-2 и ДОН в модельных системах: а) вид мембран при различной концентрации токсинов в анализируемом растворе; б) изменение параметра R. Для НТ-2 и ДОН разбавление IgG 1:0 и 1:50 соответственно. Время развития окраски 4 мин ($n=4$)

Изучение влияния состава промывочных растворов на результаты тест-определения показало, что растворы казеина (0,1-0,5%) в ФБ, обладающие блокирующим действием, незначительно снижают матричный фон лишь в начальный момент времени.

Согласно данным литературы³ добавки полимеров улучшают аналитические характеристики иммунохимических систем на основе ПХ. Нами изучено влияние добавок полимеров катионной (полиэтиленполиамины (ПЭПА), хитозан 87 кДа и 200 кДа), анионной (карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ), декстран сульфат (ДС)) и неионогенной (полиэтиленгликоль 6000 (ПЭГ)) природы в диапазоне концентраций (0,05–1%) на развитие фонового сигнала. При проведении анализа через мембрану пропускали экстракты пшеницы, кукурузы и силоса, мембрану промывали ФБ, а затем пропускали раствор полимера и субстрата (последовательное пропускание) или добавляли полимер одновременно с субстратом. Установлено, что добавки растворов КМЦ, ДС и ПЭГ 6000 не дают положительных результатов. В то же время использование хитозана различной степени полимеризации и ПЭПА позволяет снизить матричный фон как при последовательном, так и при одновременном

³ Веселова И.А., Кирейко А.В., Шеховцова Т.Н. // Прикл. биохим. и микробиол. 2009. Т. 45. № 2. С. 143-148.

пропускании с субстратом (пример вида мембран представлен на рис. 9). Наибольшее снижение фонового сигнала наблюдалось при применении растворов ПЭПА 0,5% (пшеница), 1% (кукуруза) и 0,1% (силос), что использовано в дальнейшей работе. Значения параметра R фона лежат в пределах 235 ± 5 ед. (окраска визуально не детектируется), что позволяет наблюдать четкие пятна в отсутствии микотоксинов в пробе.

Без добавки	ПЭПА 0,5 %	ПЭПА 1 %

Рис. 9. Влияние добавок ПЭПА на вид мембран при определении НТ-2 токсина в экстракте кукурузы (разбавленном в 10 раз и фильтрованном). Раствор ПЭПА пропущен перед субстратом, время развития окраски 7 мин.

Положительное действие полиэлектролитов катионной природы (ПЭПА и хитозана), вероятно, объясняется тем, что они способны образовывать полиэлектролитные комплексы с веществами белковой и углеводной природы, адсорбированными на поверхности мембран и преимущественно отрицательно заряженными при данных экспериментальных условиях.

Выбранные условия пробоподготовки и уменьшения фонового сигнала применены для определения ДОН и Т-2/НТ-2 в образцах пшеницы и кукурузы, КУ определения аналитов представлены в табл. 13 и соответствуют требованиям ЕС и РФ к содержанию микотоксинов в продуктах и кормах. Разработанные методики применяли для анализа контаминированных и искусственно загрязненных образцов пшеницы, кукурузы, силоса. Правильность определения ДОН и суммы Т-2/НТ-2 подтверждены независимым методом ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием и методом добавок. Примеры результатов тест-определения представлены на рис. 10 и в табл. 14. Таким образом, предложенный подход позволил разработать иммунофильтрационные тесты с ПХ в качестве ферментной метки для определения микотоксинов в сложных матрицах.

Таблица 13

Оптимальные условия определения ДОН и суммы НТ-2 и Т-2 в зерновых культурах и силосе методом иммунофильтрационного тест-анализа

Параметр	Модельные растворы		Пшеница, кукуруза		Силос	
	Т-2/НТ-2	ДОН	Т-2/НТ-2	ДОН	Т-2/НТ-2	ДОН
Разведение антител	1:1800	1:1200	1:1800	1:1200	1:1200	1:1000
Разведение конъюгатов	1:4000	1:700	1:4000	1:700	1:4000	1:700
Концентрация ПЭПА, %	0		0,5-1		0,1	
Контрольный уровень, мкг/кг (нг/мл)	(2)	(25)	100 (2)	1250 (25)	500 (10)	1000 (20)

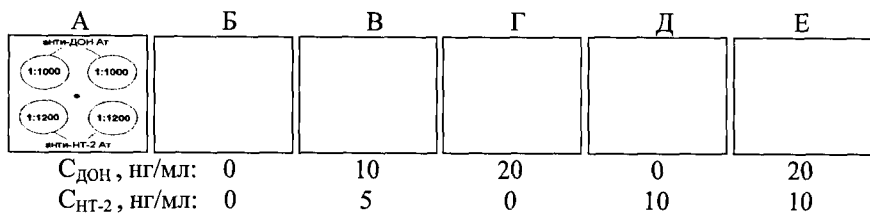


Рис. 10. Вид мембран при анализе экстракта силоса с введенными добавками микотоксинов (Б – Е), А - расположение зон антител на мембране и их разведение

Таблица 14

Результаты определения микотоксинов в контаминированных образцах кукурузы

Объект	ДОН		Т-2/НТ-2	
	Тест-метод	ВЭЖХ-МС/МС, С, мкг/кг	Тест-метод	ВЭЖХ-МС/МС, С, мкг/кг
№ 1	± ± ± ± - -	$(8 \pm 2) \cdot 10^2$	- - - - -	НТ-2 20 ± 8
№ 2	- - - - -	0	+ + + + +	НТ-2 9 ± 3 Т-2 $(1,5 \pm 0,6) \cdot 10^2$
№ 3	- - - - -	$(1,4 \pm 0,4) \cdot 10^2$	+ + + + +	НТ-2 $(1,5 \pm 0,6) \cdot 10^2$ Т-2 $(1,5 \pm 0,5) \cdot 10^2$
№ 4	± ± - - - ±	$(7 \pm 2) \cdot 10^2$	- - - - -	0

(-) – отрицательный результат – развитие интенсивной голубой окраски пятна на мембране при концентрации микотоксина < 1250 (ДОН); 100 (суммы НТ-2 и Т-2) мкг/кг;
 (±) – отрицательный результат – развитие малоинтенсивной голубой окраски пятна на мембране при концентрации микотоксина < 1250 (ДОН); 100 (суммы НТ-2 и Т-2) мкг/кг;
 (+) – положительный результат – отсутствие голубой окраски пятна на мембране при концентрации микотоксинов ≥ 1250 (ДОН); 100 (суммы НТ-2 и Т-2), мкг/кг.

ВЫВОДЫ:

- Предложены новые варианты использования взаимодействия «антиген-антитело» в иммуноаффинных колонках для концентрирования и иммунофильтрационных мембранных тестах для экспрессного определения некоторых представителей полициклических ароматических углеводов и микотоксинов.
- Получены иммуносорбенты на основе двух типов материалов (золь-гель сорбенты на основе тетраметоксисилана с инкапсулированными антителами и сефарозный гель с ковалентно-связанными антителами) для выделения и концентрирования пирена, бенз[а]пирена и охратоксина А из жидких сред. При выбранных оптимальных сорбентах и условиях сорбции степень извлечения указанных токсикантов составила не менее 92 %. Разработанные иммуноаффинные колонки применены при определении указанных ПАУ в объектах окружающей среды (образцы природных вод и ливневых стоков) и охратоксина А в красном вине.

3. Разработаны методики одновременного тест-определения микотоксинов – охратоксина А, зеараленона и фузариолизина В1 – методом мембранного иммунофилтрационного анализа с использованием щелочной фосфатазы в качестве ферментной метки. Оптимизирована процедура приготовления мембран и выбраны условия определения микотоксинов в модельных смесях, экстрактах пшеницы, кукурузы и силоса. Контрольные уровни обнаружения ЗЕА, ОТА и ФУМ в пшенице составили 50; 2,5 и 500 мкг/кг, соответственно, в кукурузе 100; 2,5 и 500 мкг/кг, и в силосе 125; 25 и 1250 мкг/кг. Методики отличаются экспрессностью (25 мин для 10 образцов), простотой процедуры пробоподготовки и выполнения анализа, возможностью внелабораторного использования.

4. Предложен подход к одновременному определению микотоксинов на двух контрольных уровнях, основанный на варьировании концентрации иммобилизованных на мембране специфичных антител. Подход применен для определения охратоксина и зеараленона в образцах пшеницы и кукурузы на уровнях ½ и 2 ПДК.

5. Установлена возможность снижения матричного фона в иммунофилтрационных тестах при использовании в качестве метки традиционного фермента – пероксидазы хрена – путем введения добавок катионных полиэлектролитов. Наибольший эффект при определении микотоксинов в экстрактах пшеницы, кукурузы и силоса достигается при использовании растворов полиэтиленполиаминов при концентрации 0,5 %, 1% и 0,1 % соответственно.

6. Разработаны методики иммунофилтрационного индивидуального и одновременного тест-определения ДОН и суммы Т-2/НТ-2 токсинов (фермент – пероксидаза хрена) в экстрактах пшеницы, кукурузы (силоса) на контрольных уровнях 25 (20) нг/мл и 2 (10) нг/мл, соответственно. Методики апробированы при анализе искусственно и природно-загрязненных образцов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Русанова Т.Ю., Левина Н.А., Юрасов Н.А., Горячева И.Ю. Нанопористые золь-гель материалы с иммобилизованными антителами для иммуноаффинного концентрирования пирена // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2009. Т. 9, вып. 3. С. 391-398.
2. Beloglazova N.V., Goryacheva I.Yu., Rusanova T.Yu., Yurasov N.A., Galve R., Marco M.-P., De Saeger S. Gel-based immunotest for simultaneous detection of 2,4,6-trichlorophenol and ochratoxin A in red wine // *Anal. Chim. Acta*. 2010. Vol. 672. P. 3–8.
3. Юрасов Н.А., Бурмистрова Н.А., Русанова Т.Ю. Одновременное определение зеараленона и охратоксина А в пшенице иммунофилтрационным тест-методом // *Известия Саратовского университета. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология*. 2011. Вып. 2. С. 13-18.
4. Горячева И.Ю., Русанова Т.Ю., Басова Е.Ю., Юрасов Н.А. Новые тест-системы для контроля содержания микотоксинов в продуктах растительного

- происхождения // Матер. IV Всеросс. конф. "Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья", Барнаул, 2009. Кн. 2. С. 138-139.
5. Левина Н.А., Юрасов Н.А., Русанова Т.Ю. Флуориметрическое определение пирена с предварительным иммуноаффинным концентрированием // Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии: Межвуз. сборник науч. трудов VII Всеросс. конф. молодых ученых с межд. участием. Саратов: Изд-во «КУБиК», 2010. С. 178-180.
 6. Малышева И.В., Буланова Т.Ю., Юрасов Н.А. Определение дезоксиниваленола и НТ-2 токсина в пшенице и кукурузе иммунофилтрационным тест-методом // Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии: Межвуз. сборник науч. трудов VIII Всерос. конф. молодых ученых с межд. участием. Саратов: Изд-во «КУБиК». 2011. С. 121-123.
 7. Юрасов Н.А., Бурмистрова Н.А., Русанова Т.Ю. Новый подход для полуколичественного определения микотоксинов иммунохимическим тест-методом // Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии: Межвуз. сборник науч. трудов VIII Всерос. конф. молодых ученых с межд. участием. Саратов: Изд-во «КУБиК». 2011. С. 153-155.
 8. Потанина С.Г., Юрасов Н.А., Русанова Т.Ю., Горячева И.Ю. Флуориметрическое определение охратоксина А с предварительным иммуноаффинным концентрированием // Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии: межвуз. сборник науч. трудов VIII Всерос. конф. молодых ученых с межд. участием. Саратов: Изд-во «КУБиК». 2011. С. 177-179.
 9. Юрасов Н.А., Потанина С.Г., Русанова Т.Ю. Иммуноаффинное концентрирование и флуориметрическое определение охратоксина А // XIII межд. научная конф. «Физико-химические основы ионообменных и хроматографических процессов (ИОНИТЫ-2011)», Воронеж, 16-22 октября 2011. Изд-во «Научная книга». С. 433-435.
 10. Русанова Т.Ю., Юрасов Н.А., Гришанина Е.В. Технология Ленгмюра-Блоджетт в пьезоэлектрических иммуносенсорах // Всероссийская школа-конференция «Супрамолекулярные системы на поверхности раздела», посв. 175-летию со дня рождения Д.И.Менделеева, 25-27 мая 2009 г., Москва. С. 78.
 11. Levina N., Rusanova T., Yurasov N., Goryacheva I. Nanostructured sol-gel materials with immobilized antibodies for immunoaffinity preconcentration of trace organic contaminants // 1st Int. summer school "Nanomaterials and nanotechnologies in living systems", June 29 – July 4, Moscow, 2009. P. 271-273.
 12. Русанова Т.Ю., Таранов В.А., Юрасов Н.А., Штыков С.Н., Горячева И.Ю. Определение пирена в водных средах методом пьезокварцевого микровзвешивания // VII Всеросс. конф. по анализу объектов окружающей среды «Экоаналитика-2009», 21-27 июня 2009 г.: тезисы докладов. Мар. гос. ун-т., Йошкар-Ола, 2009. С. 185-186.

13. Юрасов Н.А., Левина Н.А., Русанова Т.Ю. Иммуноаффинные колонки для концентрирования пирена из водных растворов // Всеросс. молодежная выставка-конкурс прикладных исследований, изобретений и инноваций. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2009. С. 92.
14. Юрасов Н.А., Русанова Т.Ю. Иммунофильтрационный тест-метод определения Охратоксина А в кормах для животных // Всеросс. молодежная выставка-конкурс прикладных исследований, изобретений и инноваций. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2009. С. 93.
15. Русанова Т.Ю., Горячева И.Ю., Левина Н.А., Юрасов Н.А. Флуориметрическое определение пирена с предварительным иммуноаффинным концентрированием на золь-гель сорбентах // Съезд аналитиков России «Аналитическая химия – новые методы и возможности», 26-30 апреля 2010 г.: тезисы докладов. М., 2010. С. 248-249.
16. Юрасов Н.А., Русанова Т.Ю., Горячева И.Ю. Масс-спектрометрическое определение 2,4,6-трихлорфенола в красном вине // Тезисы докладов Всеросс. конф. «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез». Краснодар, 26 сентября – 01 октября 2010 г. Краснодар, 2010. С. 153.
17. Русанова Т.Ю., Левина Н.А., Юрасов Н.А., Горячева И.Ю. Твердофазная экстракция полициклических ароматических углеводородов золь-гель материалами с иммобилизованными антителами // Тезисы докладов IV межд. конф. «Экстракция органических соединений» (ЭОС-2010). Воронеж, сентябрь 2010 г. С. 105.
18. Буланова Т.Ю., Малышева И.В., Юрасов Н.А. Иммунофильтрационные мембранные тесты для определения микотоксинов // Материалы межд. молодежного форума «Ломоносов-2011». Секция «Химия», 11-15 апреля 2011 г., Москва, 2011. С. 80.

Подписано в печать 26.10.2011.
Формат 60x84 ¹/₁₆. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Объем 1,5 печ. л. Тираж 120 экз. Заказ № 227-Г

Типография СГУ
г. Саратов, ул. Б. Казачья 112а
тел.: (845-2) 27-33-85

13