

Аналитические возможности определения аристолохиевой кислоты I амперометрическими биосенсорами и поляризационным флуоресцентным иммуноанализом

Р.М. Бейлинсон¹, *Н.Ю. Лопатко¹, К.А. Королькова¹, Э.П. Медянцева¹, С.А. Еремин², Л.И. Мухаметова², И.А. Шанин

¹ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Химический институт им. А.М. Бутлерова», 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18,

²ФГБОУ ВО «Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова», 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1

*Адрес для переписки: Лопатко Надежда Юрьевна, E-mail: nlopatko82@gmail.com

Поступила в редакцию 13 октября 2023 г., после доработки – 06 декабря 2023 г.

Для определения аристолохиевой кислоты I (АК I) разработаны тирозиназные амперометрические биосенсоры на основе графитовых печатных электродов, модифицированных восстановленным оксидом графена (ВОГ), многостенными углеродными нанотрубками (МУНТ) и нанокompозитом на основе ВОГ и наночастиц серебра (НЧ Ag), а также вариант поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА) с использованием трейсера на основе флуоресцеин-5(6)-карбоксамидогексановой кислоты. Установлено, что АК I является ингибитором тирозиназы в диапазоне концентраций 1×10^{-10} - 1×10^{-8} М, нижняя граница определяемых концентраций $c_n = 7 \times 10^{-11}$ М. Модификация поверхности электродов ВОГ и МУНТ позволила улучшить аналитические характеристики биосенсора: диапазон определяемых концентраций составил 1×10^{-11} - 1×10^{-6} М для ВОГ и 1×10^{-10} - 1×10^{-6} М для МУНТ. Коэффициент корреляции и нижняя граница определяемых концентраций c_n на уровне 0.9828 и 8×10^{-12} М и 0.9859 и 5×10^{-11} М в случае биосенсоров, модифицированных ВОГ и МУНТ соответственно. Разработан вариант конкурентного поляризационного флуоресцентного иммуноанализа, который позволил определять АК I в концентрационном диапазоне 1×10^{-11} - 1×10^{-7} М с $c_n = 7 \times 10^{-12}$ М. Концентрация антител – 1 мг/мл, время инкубации иммунного комплекса трейсер - антитело - 5 мин. Методики определения АК I апробированы в образцах травяных сборов, в корнях, листьях и стеблях копытня европейского, а также в сельскохозяйственных культурах, выращенных совместно с копытнем.

Ключевые слова: аристолохиевая кислота I, поляризационный флуоресцентный иммуноанализ, копытень европейский, амперометрические биосенсоры, восстановленный оксид графена, многостенные углеродные нанотрубки, наночастицы серебра.

For citation: Analitika i kontrol' [Analytics and Control], 2023, vol. 27, no. 4, pp. 230-240

DOI: 10.15826/analitika.2023.27.4.004

Analytical possibilities of determining aristolochic acid I using amperometric biosensors and polarizing fluorescent immunoanalysis

R.M. Beilinson¹, *N.Yu. Lopatko¹, K.A. Korolkova¹, E.P. Medyantseva¹, S.A. Eremin², L.I. Muhametova², I.A. Shanin

¹Kazan (Privolzhsky) Federal University, A.M. Butlerov Chemical Institute, 18 Kremlin Str., Kazan, 420008, Russian Federation

²Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory, Moscow, 119991, Russian Federation

*Corresponding author: Nadezhda Yu. Lopatko, E-mail: nlopatko82@gmail.com

Submitted 03 October 2023, received in revised form 06 December 2023

Tyrosinase amperometric biosensors based on graphite printed electrodes modified with reduced graphene oxide (RGO), multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs), and a nanocomposite based on RGO and silver nanoparticles (Ag NPs), as well as a variant of polarization fluorescence immunoanalysis (PFIA) using a tracer based on fluorescein-5(6)-carboxamidohexanoic acid for determining aristolochic acid I (AA) were developed. It has been found that AA I is a tyrosinase inhibitor in the concentration range of 1×10^{-10} – 1×10^{-8} M, with LOD of 7×10^{-11} M. Modifying the electrode surface by RGO and MWCNTs improved the analytical characteristics of the biosensor; analyzed concentration range increased to 1×10^{-11} – 1×10^{-6} M for RGO and 1×10^{-10} – 1×10^{-6} M for MWCNTs. The correlation coefficient and LOD were 0.9828 and 8×10^{-12} M, and 0.9859 and 5×10^{-11} M in the case of the biosensors modified with RGO and MWCNT, respectively. A variant of a competitive polarization fluorescent immunoanalysis was developed, which permitted determining AA I in the concentration range of 1×10^{-11} – 1×10^{-7} M with LOD of 7×10^{-12} M. The concentration of antibodies was 1 mg/ml, the time of incubation of the immune complex tracer-antibody was 5 min. Methods for determining AA I were tested using samples of herbal preparations, in roots, leaves, stems of European hoof, as well as in crops grown together with hoof.

Keywords: aristolochic acid I, polarization fluorescent immunoanalysis, European hoof, amperometric biosensors, reduced graphene oxide, multi-walled carbon nanotubes, silver nanoparticles.

ВВЕДЕНИЕ

Аristoloxиевая кислота I (рис. 1) – относится к группе родственных нитрофенантренкарбоновых кислот, из которых аristoloxиевая кислота I обладает канцерогенными, мутагенными и нефропатическими свойствами, генотоксичностью и гепатоксичностью, поэтому необходимо избегать попадания этого соединения в организм человека. Аristoloxиевые кислоты содержатся в растениях рода *Aristolochia* и *Asarum*, которые с древних времен применяют в традиционной медицине. Есть несколько источников попадания этого вещества в организм: из китайских БАД-ов, состав которых часто фальсифицирован [1], из продуктов питания, полученных из сельскохозяйственных культур, выращенных в почве, загрязненной сорняками, содержащими аristoloxиевые кислоты. Также известно, что такие растения могут входить в состав различных травяных отваров, которые используют в традиционной медицине, например, для лечения алкоголизма [2].

Существует гипотеза, что аristoloxиевые кислоты могут быть экологической причиной Балканской эндемической нефропатии, которая проявляется в сельскохозяйственных районах Сербии, Боснии, Хорватии, Болгарии и Румынии. В последние годы, эта гипотеза находит все большее подтверждение [3]. Кроме того, было доказано, что аristoloxиевые кислоты способны эффективно проникать из зараженной ими почвы через корни в полезные

сельскохозяйственные культуры, такие как кукуруза, огурцы, латук, помидоры, зеленый лук и др. [4, 5]. Они устойчивы по отношению к микробной активности и метаболизму растительных клеток, следовательно, способны накапливаться в пищевых продуктах [5].

В последние годы для обнаружения и количественного определения аristoloxиевых кислот используют хроматографические [6 - 9], оптические [10 - 12], электрохимические [13 - 15] методы и варианты иммуноанализа [16 - 19].

Большинство методов, применяемых для количественного определения аristoloxиевых кислот – хроматографические – требуют предварительной пробоподготовки, занимают продолжительное время и нуждаются в квалифицированном операторе, и, соответственно, имеют более высокую стоимость. По этой причине поиск новых простых, быстрых и чувствительных методов определения аristoloxиевых кислот является актуальной задачей, стоящей перед химиками-аналитиками.

В настоящее время одним из актуальных направлений анализа веществ является использование различных био- и иммуносенсоров, а также вариантов поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА) благодаря их селективности, экспрессности, простоте использования и невысокой стоимости.

На сегодняшний день одним из направлений развития биосенсорных технологий является модификация поверхности электродов наноструктурированными материалами различной природы для улучшения аналитических характеристик разрабатываемых сенсоров. В настоящей работе в качестве модификатора поверхности электродов применяли восстановленный оксид графена (ВОГ), содержащий кислородсодержащие функциональные группы [20], многостенные углеродные нанотрубки (МУНТ), которые обладают высокой электропроводностью, способны увеличивать площадь поверхности электрода и аналитический сигнал и отлично подходят для электрохимических датчиков [21], а также на-

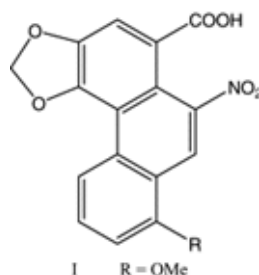


Рис. 1. Структурная формула АК I

Fig. 1. Structural formula of AA I

ночастицы серебра, которые способны улучшить воспроизводимость результатов, получаемых с помощью электрохимических сенсоров [22].

Целью данного исследования является разработка новых селективных чувствительных способов определения АК I с использованием биосенсорных технологий и поляризационного флуоресцентного иммуноанализа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и аппаратура

В основу разрабатываемых биосенсоров легла система, состоящая из рабочего и вспомогательного графитовых электродов и электрода сравнения, полученная на полимерной подложке методом печатных технологий (получены на кафедре аналитической химии КФУ (Казань, Россия)). Материалом поверхности рабочего и вспомогательного электродов являются графитовые чернила (фирма «GwentElectronicMaterials», США).

Измерения проводили с помощью потенциостата/гальваностата «204 N» с модулем FRA 32M (фирма «Autolab», Нидерланды), позволяющим работать в различных вариантах вольтамперометрии и спектроскопии электрохимического импеданса. Циклические вольтамперограммы получали в программе Nova в диапазоне потенциалов от 0.0 до 1.0 В при скорости 100 и 10 мВ/с соответственно.

Атомно-силовые изображения (АСМ-изображения) регистрировали на атомно-силовом микроскопе Titanium (НТ-МДТ, Россия) [23, 24]. Изображения обрабатывали и анализировали с помощью программы Image Analysis (НТ-МДТ, Россия). Погрешность составляет 5 % по латеральному размеру и менее 1 нм по высоте.

Для приготовления дисперсии ВОГ и МУНТ (Sigma Aldrich, США) использовали УЗ ванну модели «S30H» с частотой 37 КГц фирмы «Elmasonic» (Германия). Многофункциональный планшетный анализатор PolarStarOmega и 96-луночный планшет (BMGLabtech, Германия) применяли для измерения интенсивности флуоресценции и поляризации флуоресценции.

Источником тирозиназы служил гомогенат грибов шампиньонов, который использовали при разработке соответствующих биосенсоров. В качестве субстрата использовали фенол марки «х.ч.» (ООО НПО «Татхимпродукт»), растворы которого готовили по точной навеске в рабочем буферном растворе (фосфатный (рН=7.25±0.05) и боратный (рН 9.00±0.05) буферные растворы) и использовали в течение не более трех часов. Применяли 1 %-ный раствор глутарового альдегида фирмы «ICN» и бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы «Reanal» (Венгрия), тетраборат натрия (ООО НПО «Татхимпродукт»), нитрат серебра (ООО НПО «Татхимпродукт»). Раствор хитозана готовили в 2 %

ной (v/v) уксусной кислоте марки х. ч. (Sigma Aldrich, США).

Препарат АК I (Sigma Aldrich, США) использовали для приготовления рабочих растворов путем их разбавления в фосфатном (рН 7.25±0.05) или боратном (рН 9.00±0.05) буферных растворах.

Для синтеза трейсера использовали флуоресцеин-5(6)-карбоксамидогексановую кислоту (Sigma Aldrich, США), N-гидроксисукцинимид (NHS) (Sigma Aldrich, США), 1,3-дициклогексилкарбодиимид (Sigma Aldrich, США), N,N-диметилформамид (ДМФА) (Экрес-Аналитика, г. Санкт-Петербург, Россия), хлороформ и метанол («ТатХимПродукт», г. Казань, Россия). Применяли антитела (Ат) против АК I (ХЕМА, г. Москва).

Методики подготовки ВОГ и МУНТ для последующей модификации поверхности и получения фермента из гомогената шампиньонов описаны в работе [25].

Методика синтеза трейсера аристолохиевая кислота I - флуоресцеин

В качестве флуорофора для трейсера использовали флуоресцеин-5(6)-карбоксамидогексановую кислоту. Синтез трейсера основан на взаимодействии флуорофора с АК I в присутствии N-гидроксисукцинимиды и 1,3-дициклогексилкарбодиимида.

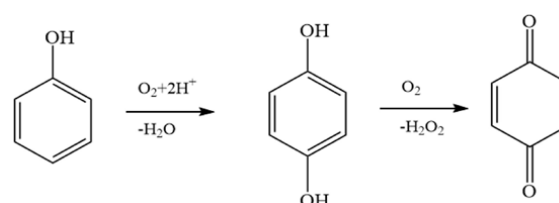
Растворы N-гидроксисукцинимиды и 1,3-дициклогексилкарбодиимида готовили в ДМФА, добавили раствор АК I в метаноле, затем полученную смесь помещали в центрифугу на 10 мин на скорости 8000 об/мин для получения однородного раствора. После этого в раствор добавляли флуоресцеин-5(6)-карбоксамидогексановую кислоту и оставляли в темном месте на сутки при комнатной температуре.

Разделение продуктов реакции проводили методом тонкослойной хроматографии с применением пластин «Silufol» (Чехия), элюент – смесь метанола и хлороформа (в объемном соотношении 1:4) [26].

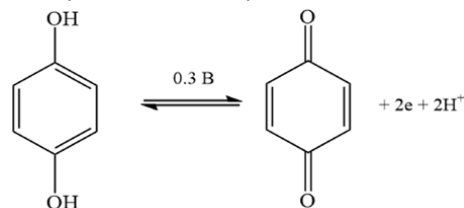
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Из литературных данных известно, что под действием тирозиназы фенол подвергается биокаталитическому превращению с образованием хинона по схеме:

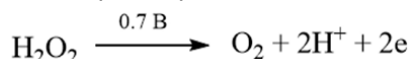
ферментативная реакция [27]:



электрохимическая реакция:



На тирозиназном биосенсоре в области потенциалов 0.70 - 0.75 В наблюдается дополнительный пик, который можно отнести к процессу окисления пероксида водорода (рис. 2). Согласно литературным данным [27], электрохимическое окисление пероксида водорода протекает по схеме:



Пик при потенциале 0.3 В относится, вероятнее всего, к электрохимическому окислению фенола до хинона.

Наибольший каталитический эффект для этого фермента наблюдается в среде фосфатного буферного раствора с pH 7.25±0.05 [28], поэтому этот фоновый электролит использовали для проведения измерений с применением тирозиназного биосенсора. Используемая концентрация субстрата тирозиназы - фенола составляет 1×10⁻³ моль/л.

Изучение действия АК I на каталитическую активность иммобилизованной тирозиназы

Изучение действия АК I на иммобилизованную тирозиназу, входящую в состав биочувствительной части амперометрического биосенсора на основе печатных электродов показало, что при потенциале 0.75 В в присутствии АК I наблюдается уменьшение аналитического сигнала в области концентраций 1×10⁻¹⁰ - 1×10⁻⁸ моль/л, т.е. АК I является ингибитором ферментативного превращения фенола (рис. 2).

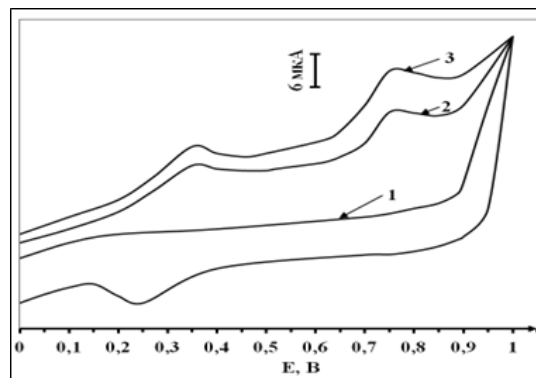


Рис. 2. Вольтамперограммы превращения субстрата тирозиназы фенола (1×10⁻³ М): в отсутствии (3) и в присутствии (2) аристолохиевой кислоты (1×10⁻⁸ М), фоновый электролит – фосфатный буферный раствор с pH 7.25±0.05 (1)

Fig. 2. Voltammograms of the transformation of the phenol tyrosinase substrate (1×10⁻³ M): in the absence (3) and in the presence (2) of aristolochic acid (1×10⁻⁸ M), the background electrolyte was phosphate buffer solution with pH of 7.25±0.05 (1)

Максимальная степень ингибирования (отношение силы тока в присутствии ингибитора к силе тока в его отсутствии) при действии на фермент – субстратную систему тирозиназа – фенол составляет для АК I (82 ± 2) % в изученной области концентраций (табл.1).

Правильность определения АК I в указанных диапазонах концентраций с помощью тирозиназного биосенсора оценена способом «введено-найдено» (табл. 2).

Из представленных результатов следует, что во всех случаях опорное значение находится в пределах доверительного интервала, т. е. систематическая погрешность измерения незначима.

Таблица 1

Аналитические характеристики определения аристолохиевой кислоты тирозиназными биосенсорами (n = 4, P = 0.95)

Table 1

Analytical characteristics of determination of aristolochic acid by tyrosinase biosensors (n = 4, P = 0.95)

Область рабочих концентраций, моль/л	Уравнение градуировочной зависимости, I* = (A±δ)×(-lgC)+(B±δ)			с _н , моль/л	Максимальная степень ингибирования, %
	(A±δ)	(B±δ)	Коэффициент корреляции - r		
Тирозиназный биосенсор (ингибирование)					
1×10 ⁻¹⁰ - 1×10 ⁻⁸	14.4±0.5	-126.5±0.7	0.9664	7×10 ⁻¹¹	82±2
Тирозиназный биосенсор, модифицированный УНТ (ингибирование)					
1×10 ⁻¹⁰ - 1×10 ⁻⁶	21.1±0.7	-148.2±0.7	0.9828	2×10 ⁻¹¹	83±1
Тирозиназный биосенсор, модифицированный ВОГ (ингибирование)					
1×10 ⁻¹¹ - 1×10 ⁻⁶	24.1±0.7	-179.3±0.7	0.9859	5×10 ⁻¹²	86±1
Тирозиназный биосенсор, модифицированный ВОГ/НЧАg (ингибирование)					
1×10 ⁻¹¹ - 1×10 ⁻⁶	26.9±0.8	-183.1±0.9	0.9972	2×10 ⁻¹²	89±3

I* = I_p/I_o × 100, (I_p = I_o - I_s), где I_s – сила тока в присутствии ингибитора, I_o – сила тока в отсутствии ингибитора

Таблица 2

Результаты определения АК I тирозиназными биосенсорами ($n = 4, P = 0.95$)

Table 2

Results of determination of AA I by tyrosinase biosensors ($n = 4, P = 0.95$)

Введено, моль/л	Найдено, моль/л	S_r	Процент открытия, %
Тирозиназный биосенсор			
3.0×10^{-9}	$(3.2 \pm 0.3) \times 10^{-9}$	0.038	91–109
7.0×10^{-10}	$(6.9 \pm 0.4) \times 10^{-10}$	0.023	94–106
Тирозиназный биосенсор, модифицированный УНТ			
5.0×10^{-9}	$(5.1 \pm 0.4) \times 10^{-9}$	0.031	92–108
5.0×10^{-10}	$(4.8 \pm 0.3) \times 10^{-10}$	0.025	94–106
Тирозиназный биосенсор, модифицированный ВОГ			
5.0×10^{-7}	$(5.3 \pm 0.5) \times 10^{-7}$	0.038	91–109
7.0×10^{-9}	$(6.8 \pm 0.4) \times 10^{-9}$	0.024	91–106
Тирозиназный биосенсор, модифицированный ВОГ/НЧAg			
3.0×10^{-8}	$(3.2 \pm 0.4) \times 10^{-8}$	0.050	89–114
5.0×10^{-9}	$(4.7 \pm 0.5) \times 10^{-9}$	0.043	89–111

Тирозиназные биосенсоры, модифицированные углеродными наноматериалами и НЧ Ag для определения АК I

Получение наночастиц серебра

Для получения наночастиц серебра смешивали нитрат серебра (0,05 М), 0,75 %-ный раствор хитозана и 0.2 М раствор тетрабората натрия. Далее полученный раствор обрабатывали ультразвуком при 30 °С в течении 30 мин.

Модифицированные тирозиназные биосенсоры для определения АК I

Применение наноуглеродных материалов в качестве модификаторов поверхности электродов позволит увеличить площадь поверхности рабочего

электрода, добиться лучшей фиксации фермента на поверхности за счет наличия кислородсодержащих групп как у МУНТ, так и для ВОГ, что положительно сказывается на процессе ковалентной иммобилизации фермента [17] (рис. 3, 4). Особенно наглядно это проявляется на примере использования ВОГ за счет его волнистой структуры (рис. 4).

Изучение действия АК I на тирозиназу, иммобилизованную на модифицированные электроды, показало, что характер действия этого соединения не изменился: АК I оказывает ингибирующее действие на тирозиназу.

Электроды, модифицированные ВОГ, МУНТ и ВОГ/НЧ Ag, позволяют улучшить характеристики разработанных биосенсоров и расширить диапазон определяемых концентраций. Максимальная степень ингибирования АК I при действии на фермент – субстратную систему тирозиназа - фенол в этих

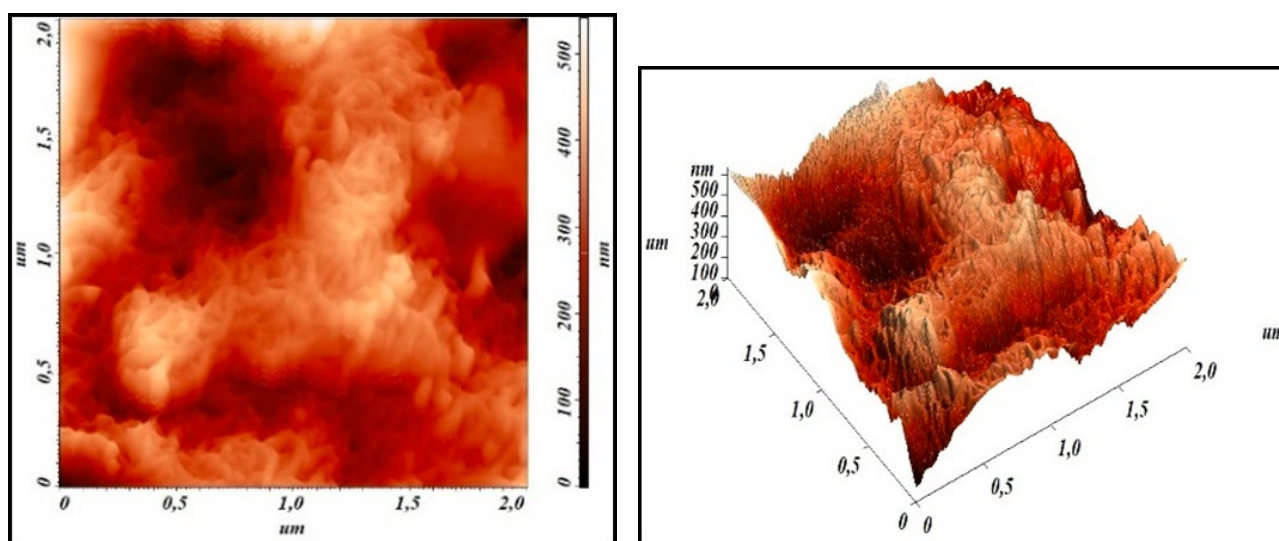


Рис. 3. АСМ - изображения в режиме топографии в 2D и 3D (а, б) проекциях поверхности электрода, модифицированного МУНТ в хитозане, размер 2.0x2.0 мкм

Fig. 3. AFM-images in the topography mode in 2D and 3D (a, b) projections of the surface of the electrode modified with MWCNTs in chitosan, 2.0x2.0 μm size

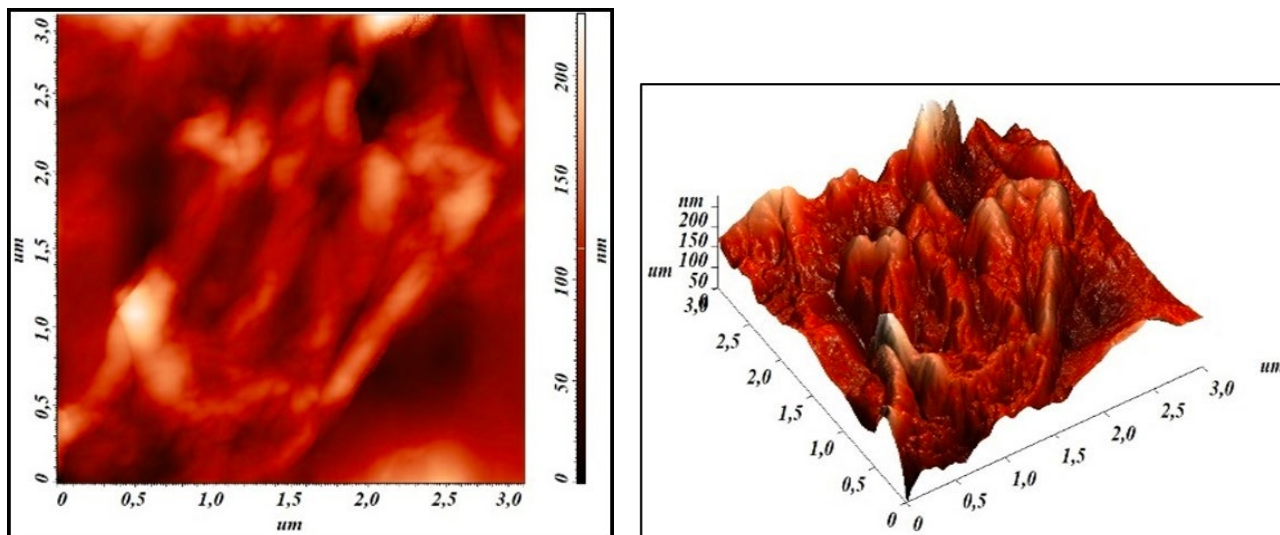


Рис. 4. АСМ - изображения в режиме топографии в 2D и 3D (а, б) проекциях поверхности электрода, модифицированного ВОГ в хитозане, размер 2.0×2.0 мкм

Fig. 4. AFM-images in the topography mode in 2D and 3D (a, b) projections of the surface of an electrode modified with RGO in chitosan, 2.0×2.0 μm size

условиях составила (83 ± 1) % для МУНТ, (86 ± 1) % для ВОГ и (89 ± 3) % для ВОГ/НЧ Ag в изученной области концентраций (табл. 1).

Правильность определения АК I в указанных диапазонах концентраций с помощью тирозиназных биосенсоров оценена способом «введено-найденно» (табл. 2).

Из представленных результатов следует, что систематическая погрешность измерения незначима, так как всех случаях опорное значение находится в пределах доверительного интервала.

Расчет кинетических параметров реакций ферментативных превращений

Для определения кинетических параметров реакции ферментативного процесса в присутствии или отсутствии АК I проводили интегральный анализ полной кинетической кривой зависимости тока от времени [29].

В исследуемых нами условиях при действии АК I на систему тирозиназа - фенол наблюдалось как двухпараметрически рассогласованное (бесконкурентное) ингибирование, так и двухпараметрически согласованная ингибирование (смешанное) (табл. 3), на что указывают соотношения кажущейся константы Михаэлиса в отсутствие (K_m (каж.)) и в присутствии (K'_m (каж.)) эффектора тирозиназы, а также максимальной скорости реакции (V_{max}) в отсутствие эффектора тирозиназы и в его присутствии (V'_{max}).

Полученные результаты показывают, что при нанесении модификатора на поверхность электродов меняется тип ингибирования с бесконкурентного на смешанное. Бесконкурентное ингибирование обычно связывают с действием эффекторов непосредственно на фермент-субстратный комплекс. В присутствии же модификаторов (МУНТ и ВОГ),

обладающих, с одной стороны, хорошей электропроводностью, а с другой - увеличивающих площадь рабочей поверхности электродов, АК I действует уже не только по гидрофобным участкам, находящимся вокруг активного центра фермента, но и по активному центру фермента, конкурируя с субстратом. Изменение морфологии поверхности электродов, возможно, приводит к такому расположению молекул фермента, что активный центр становится более доступен для действия эффекторов.

Возможности метода ПФИА в определении АК I

Разработанный способ поляризационного флуоресцентного иммуноанализа АК I основан на конкурентном взаимодействии антигена и меченого флуоресцентной меткой антигена (трейсера) за центр связывания антитела.

Согласно литературным данным, использование трейсеров на основе соответствующих меток обеспечивает высокую чувствительность анализа [30, 31]. Флуоресцеин-5(6)-карбоксамидогексановая кислота оказалась наиболее подходящим реагентом при разработке способа ПФИА АК I, обладая высокой интенсивностью флуоресценции, наличием функциональных групп для связывания с антигеном (Ag), отсутствием влияния на протекание иммунохимической реакции.

Выбор концентрации трейсера

Исходные растворы трейсера были разбавлены боратным буфером для получения серии растворов разной концентрации. Варьировали разведение трейсера АК I – флуоресцеин-5(6)-карбоксамидогексановая кислота в интервале от 1 : 400 до 1 : 625000.

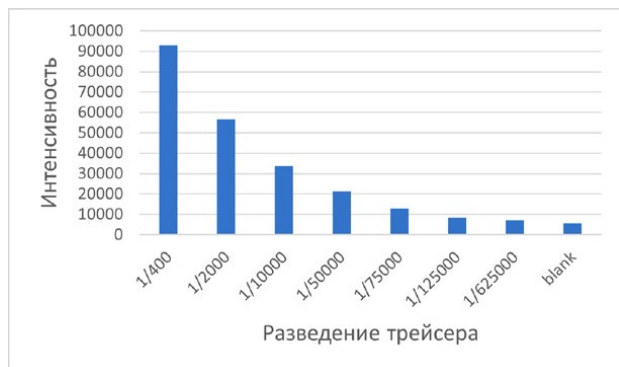


Рис. 5. Диаграмма зависимости интенсивности флуоресценции от разведения трейсера АК 1- флуоресцеин-5(6)-карбоксамидогексановая кислота

Fig. 5. A diagram of the dependence of fluorescence intensity on dilution of AK 1-fluorescein-5(6)-carboxamidohexanoic acid tracer

В качестве сигнала фона выступает интенсивность рабочего буферного раствора. Разведение трейсера считается оптимальным для ПФИА, если интенсивность флуоресценции такого раствора превышает сигнал фона в 10 - 15 раз [31]. Таким образом было выбрано разведение трейсера – 1 : 10000 (рис. 5). Поляризация флуоресценции раствора трейсера АК I - флуоресцеин-5(6)-карбоксамидогексановая кислота составила $mP=35\pm 3$.

Определение рабочего разведения Ат

Для получения оптимального аналитического сигнала поляризации флуоресценции при образовании иммунного комплекса трейсер - антитело варьировали разведение Ат в диапазоне от 1/50 до 1/3200.

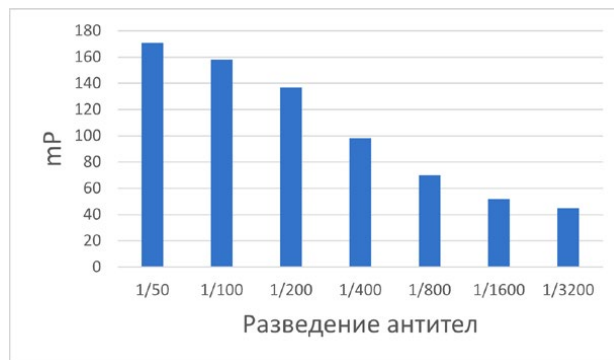


Рис. 6. Зависимость поляризации флуоресценции от разведения Ат

Fig. 6. Dependence of fluorescence polarization on Ab dilution

Рабочее разведение Ат выбирали как концентрацию, соответствующую 80 %-ному связыванию с трейсером, при этом обеспечиваются достаточные конкуренция между трейсером и АК I и чувствительность определения. Это достигается при разведении Ат 1/200 для АК I (рис. 6).

Аналитические возможности ПФИА в определении АК I.

Разработанный способ ПФИА позволил определять АК I в линейном диапазоне концентраций 10^{-11} - 10^{-7} моль/л. Градуировочный график строили в координатах mP/mP_0 от $\lg C$, где mP_0 – поляризация флуоресценции в отсутствие АК I. Уравнение регрессии, отражающее зависимость между относительной поляризацией флуоресценции и логарифмом концентрации АК I: $y=5.27x+32.85$,

Таблица 3

Кинетические параметры реакции тирозиназного превращения фенола в присутствии аристолохиевой кислоты, $C_{\text{фенола}} = 1 \times 10^{-3}$ М, pH = 7.25, n = 3

Table 3

Kinetic parameters of the reaction of tyrosinase conversion of phenol in the presence of aristolochic acid, $C_{\text{phenol}} = 1 \times 10^{-3}$ М, pH = 7.25, n = 3

$C_{\text{АКI}}$, моль/л	$K_m \times 10^5$, моль/л	$V_{\text{max}} \times 10^{-7}$, моль/(л·с)	Соотношение параметров K_m и V_{max}	Тип ингибирования	K_i , моль ⁻¹
Тирозиназный биосенсор					
0	2.2±0.5	7.5±0.5	$K'm < K_m$ $V'max < Vmax$	Двухпараметрически рассогласованное ингибирование (бесконкурентное)	6.2×10 ⁻⁹ 4.3×10 ⁻⁷
1×10 ⁻⁸	1.5±0.2	4.3±0.3			
1×10 ⁻⁶	1.6±0.2	3.1±0.3			
Тирозиназный биосенсор (модификатор ВОГ)					
0	4.3±0.3	4.0±0.3	$K'm > K_m$ $V'max < Vmax$	Двухпараметрически согласованное ингибирование (смешанное)	9.4×10 ⁻⁷
1×10 ⁻⁶	7.7±0.1	3.4±0.3			
Тирозиназный биосенсор (модификатор УНТ)					
0	1.7±0.5	3.5±0.2	$K'm > K_m$ $V'max < Vmax$	Двухпараметрически согласованное ингибирование (смешанное)	2.1×10 ⁻⁹ 1.1×10 ⁻⁷
1×10 ⁻⁸	7.8±0.2	2.8±0.3			
1×10 ⁻⁶	6.5±0.2	1.3±0.4			

Таблица 4

Результаты определения аристолохиевой кислоты с помощью ПФИА (n=3, P=0.95)

Table 4

Results of determination of aristolochic acid using PFIA (n=3, P=0.95)

Введено, моль/л	Найдено, моль/л	Sr	Процент открытия, %
5.0×10^{-9}	$(5.1 \pm 0.4) \cdot 10^{-9}$	0.032	92–108
5.0×10^{-10}	$(4.8 \pm 0.3) \cdot 10^{-10}$	0.024	94–106

где $y = mP/mP_0$, $x = \lg C$. Достоверность аппроксимации - R^2 на уровне 0.9998, $s_{\text{н}}$ составляет 7×10^{-12} М.

Правильность определения АК I в указанных диапазонах концентраций с помощью ПФИА оценена способом «введено-найдено». Процент открытия составил 94 -106 % (табл.4.).

Определение АК I в растительном материале и травяных сборах

Известно, что одним из растений, содержащим в своем составе аристолохиевую кислоту, является копытень европейский, который часто используют в народной медицине для лечения от алкоголизма, а также в качестве слабительного, мочегонного, отхаркивающего средства [2].

В качестве объекта анализа нами были выбраны: сборы побегов и корня копытня европейского; чайный напиток, одним из компонентов которого является копытень европейский; копытень европейский (*Asarum europaeum*), (образцы собраны на территории Ельниковской рощи, г. Новочебоксарск,

Чувашская Республика), помидоры, выращенные в почве совместно с копытнем.

Методики определения аристолохиевой кислоты

Подготовка образцов:

- 1) чайный напиток - 10 г чайного напитка заливали 200 мл кипятка. Настаивали согласно инструкции на упаковке.
 - 2) 50 г побегов копытня европейского измельчали с помощью мясорубки и отфильтровывали через тройной марлевый слой.
 - 3) корни копытня европейского (100 г.) измельчали с помощью мясорубки, затем растирали в ступке, заливали рабочим буферным раствором и отфильтровывали через тройной марлевый слой
 - 4) плоды томатов (40 г) растирали в ступке и отфильтровывали через тройной марлевый слой.
- Полученные гомогенаты разбавляли в 50 мл рабочего буферного раствора.

Определение аристолохиевой кислоты

А) тирозиназным биосенсором, модифицированным ВОГ/Нч Ag. Использовали раствор фенола (0.1 М), раствор исследуемого образца, и фосфатный буферный раствор (рН 7.25) Растворы инкубировали в течение 15 мин, затем измеряли значение тока при потенциале 0.75 В. Содержание АК I в образцах определяли по соответствующему градуировочному графику (табл. 1).

Б) ПФИА. Измерения поляризации флуоресценции проводили в растворе, содержащем раствор трейсера, образец отвара, боратный буферный раствор (рН 9.00) и рабочий раствор Ат. Содержание АК I в

Таблица 5

Определение АК I в образцах с помощью тирозиназного биосенсора (модификатор – ВОГ/НЧAg) и метода ПФИА (n=3, P=0.95), $t_{\text{табл.}} = 4.30$, $F_{\text{табл.}} = 19$

Table 5

Determination of AA I in samples using a tyrosinase biosensor (RGO/NPAG modifier) and PFIA method (n=3, P=0.95), $t_{\text{табл.}} = 4.30$, $F_{\text{табл.}} = 19$

Образец	Найдено, моль/л (мг/кг)	Sr	Найдено, моль/л	Sr	t	F
	ПФИА		Биосенсор			
Отвар копытня европейского	$(8.2 \pm 0.6) \times 10^{-11}$	0.030	$(5.3 \pm 0.5) \times 10^{-11}$	0.038	2.1	1.44
Отвар сбора трав	**		$(7.6 \pm 0.6) \times 10^{-9}$	0.032	-	-
Листья копытня европейского	$(5.1 \pm 0.4) \times 10^{-3}$	0.031			-	-
Корни копытня европейского	$(3.4 \pm 0.4) \times 10^{-2}$	0.047			-	-
Листья помидоров	$(4.3 \pm 0.5) \times 10^{-6}$	0.047	$(2.9 \pm 0.3) \times 10^{-6}$	0.048	2.2	2.78
Зеленые помидоры	$(2.5 \pm 0.3) \times 10^{-6}$	0.048	$(3.7 \pm 0.4) \times 10^{-6}$	0.043	1.6	1.79
Красные помидоры	$(4.2 \pm 0.5) \times 10^{-5}$	0.048	$(2.5 \pm 0.3) \times 10^{-5}$	0.048	1.9	2.76

** < C_н

образцах определяли по соответствующему градуировочному графику. Результаты определения АК I в анализируемых образцах приведены в табл. 5.

Согласно результатам, полученным ПФИА, в листьях и корнях копытня европейского были обнаружены достаточные большие концентрации АК I. В различных частях помидоров (корни, листья, стебли) АК была обнаружена в области концентраций 10^{-6} - 10^{-4} М (1.4 – 136 мг/кг). Было установлено, что содержание АК I в зеленых помидорах на порядок меньше, чем в красных. Полученные результаты могут служить основой для рекомендаций по выбору почв для выращивания культурных растений, используемых с целью получения безопасных продуктов питания.

Поскольку найденные значения t- и F-критериев не превышают табличных, полученные результаты равноточны и систематическая погрешность незначима.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования позволяют сделать заключение о том, что предлагаемые тирозиназные биосенсоры на основе печатных графитовых электродов и модификации их поверхности ВОГ, УНТ и ВОГ/НЧАг, а также вариант поляризационного флуоресцентного иммуноанализа позволяют определять АК I в следовых количествах и использовать эти разработки как инструмент контроля качества различных биологических объектов, включая сельскохозяйственную продукцию, а также отдельных БАД-ов. Полученные результаты могут служить основой для рекомендаций по выбору почв для выращивания культурных растений, используемых для получения безопасных продуктов питания, что становится актуальным для сельскохозяйственных районов.

ЛИТЕРАТУРА

- Jordan S. A., Perwaiz S. Aristolochic Acids. Encyclopedia of Toxicology (Third Edition), 2014. P. 298–301.
- Щуревич Н.Н., Маркарян А.А. Копытень европейский. Химический состав, фармакологические свойства и применение в медицине // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2009. №4. С. 175–179.
- Jonge H., Vanrenterghem Y. Aristolochic acid: the common culprit of Chinese herbs nephropathy and Balkan endemic nephropathy // Nephrol. Dial. Transpl. 2008 Jan, V. 23, №1. P. 39–41.
- Possible health impacts of naturally occurring uptake of aristolochic acids by maize and cucumber roots: Links to the etiology of endemic (balkan) nephropathy/ N.M. Pavlović [et al.]// Environ. Geochem. Hlth. 2013. V. 35. P. 215–226.
- Li W., Hu Q., Chan W. Uptake and accumulation of nephrotoxic and carcinogenic aristolochic acids in food crops grown in Aristolochia clematitis-contaminated soil and water // J. Agric. Food Chem. 2016. V. 64. P. 107–112.
- Chan C., Pavlović N. M., Chan W. Development of a novel liquid chromatography-tandem mass spectrometric

method for aristolochic acids detection: Application in food and agricultural soil analyses // Food Chemistry. 2019. V. 289. P. 673–679.

- Hongjian Ji, Gaole Zhang, Xiaohua Zhou. Rapid simultaneous determination of thirteen aristolochic acids analogs in Aristolochiaceae plants by Ultra-High-Performance liquid Chromatography-tandem mass spectrometry in dynamic multiple reaction monitoring mode // J. Chromatogr. B. 2023. V. 1225. 123753.
- Fast determination of aristolochic acid I (AAI) in traditional Chinese medicine soup with magnetic solid-phase extraction by high performance liquid chromatography / Ji Fen-qi [et al.] // J. Chromatogr. A. 2020. V.1609. 460455
- Chan C.-K., Pan G., Chan W. Analysis of aristolochic acids in Houttuynia cordata by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // J. Mass Spectrom.. 2021. V. 56. Issue 4.
- Study of the Contents of Analogues of Aristolochic Acid in Houttuynia cordata by Ultra-High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry/ Yu Xuan [et al.]// Foods. 2022. V. 11 Issue 3.
- Rapid and robust analysis of aristolochic acid I in Chinese medicinal herbal preparations by surface-enhanced Raman spectroscopy/ Xiao Meng [et al.]// Spectrochim. Acta A. 2023. V. 285. 121880.
- Rapid identification and detection of aristolochic acids in the herbal extracts by Raman spectroscopy / Chin-Chung Lin [et al.]// Spectrochim. Acta A. V. 300. 122918.
- A dispersive solid-phase extraction method for the determination of Aristolochic acids in Houttuynia cordata based on MIL-101(Fe): An analytes-oriented adsorbent selection design / Rui Cheng [et al.] // Food Chem. 2023. V. 407. 135074.
- In-line formation and identification of toxic reductive metabolites of aristolochic acid using electrochemistry mass spectrometry coupling / Ugo Bussy [et al.] // Anal. Bioanal. Chem. 2022. V. 414. P. 2363–2370.
- Soft-templated mesoporous carbon-modified glassy carbon electrode for sensitive and selective detection of aristolochic acids / Ying Wang [et al.] // J. Hazard. Mater. 2020. Vol. 385. 121550.
- Development of two immunochromatographic test strips based on gold nanospheres and gold nanoflowers for the rapid and simultaneous detection of aflatoxin B1 and aristolochic acid a in dual-use medicinal and food ingredients / Xianrui Chen [et al.] // Microchem. J. 2023. V. 186. 108307.
- Preparation of Anti-Aristolochic Acid I Monoclonal Antibody and Development of Chemiluminescent Immunoassay and Carbon Dot-Based Fluoroimmunoassay for Sensitive Detection of Aristolochic Acid I / Ai-Fen Ou [et al.] // Foods. 2021. V. 10 Issue 11. 2647.
- Определение аристолохиевой кислоты с помощью пьезоэлектрического иммуносенсора на основе магнитных углеродных нанокомпозитов / Бизина Е.В.[и др.] // Заводская лаборатория, 2023. Т. 89, № 8. С. 23–30.
- Novel monoclonal antibody-based sensitive enzyme-linked immunosorbent assay and rapid immunochromatographic strip for sensitive detecting aristolochic acid I in herbal remedies / Chang-Lun Huang [et al.]// Microchem. J. 2023. V. 191. 108884.
- Li Q., Chen H. Synthesis of nanocomposite of bimetal oxide of Ni and Co and multi-wall carbon nanotube modified electrode as a sensitive electrochemical sensor to measure the amount of uric acid in human biological fluid // Int. J. Electrochem. Sci. 2023. V. 18. Issue 8. 100206.
- Brito C. L., Ferreira E. I., La-Scalea M. A. Application of multi-walled carbon nanotubes functionalized with hemin

to evaluate the electrochemical behavior of nitrofurazone in aqueous media // *Electrochim. Acta*. 2023. V. 459. 142486.

22. Thermally induced self-assembly and cyclization of L-leucyl-L-leucine in solid state / M.A. Ziganshin [et al.] // *J. Phys. Chem. B*. 2017. V. 121, N. 36. P. 8603-8610.

23. Additive and antagonistic effects of substrate and vapors on self-assembly of glycyl-glycine in thin films / M.A. Ziganshin [et al.] // *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 2019. V. 690, N. 1. P. 67-83.

24. Beck F., Loessl M., Baeumner A. J.. Signaling strategies of silver nanoparticles in optical and electrochemical biosensors: considering their potential for the point-of-care // *Microchim. Acta*. 2023. V. 190. Article number: 91

25. Бейлинсон Р.М., Явишева А.А., Лопатко Н.Ю., Медянцева Э.П. Амперометрические биосенсоры для определения тетрациклина. // *Заводская лаборатория. Диагностика материалов*. 2022. Т. 88, №11, С. 5-13.

26. Мальцева Л.Н., Мухаметова Л.И., Еремин С.А. Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ для количественного определения органических соединений // *Лаборатория и производство*. 2020. № 6 (15), С. 78-86.

27. Кулис Ю.Ю. Аналитические системы на основе иммобилизованных ферментов. Вильнюс: Мокслас., 1981. 200 с.

28. Zhao Q., Zhuang Q.K. Determination of Phenolic Compounds Based on the Tyrosinase- Single Walled Carbon Nanotubes Sensor // *Electroanal.* 2005. V. 17, Issue 1. P. 85–88.

29. Бондаренко А.П., Еремин С.А. Определение микотоксинов зеараленона и ократоксина а в зерне методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа // *Ж. аналит. химии*. 2012. Т. 67, № 9. С. 878-883.

30. Березин И.В. Клёсов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М.: Наука, 1976. 320 с.

31. Beloglazova N.V., Eremin S.A. Rapid screening of aflatoxin B1 in beer by fluorescence polarization immunoassay // *Talanta*. 2015. V. 142. P. 170-175.

REFERENCES

1. Jordan S. A., Perwaiz S. Aristolochic Acids. *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, 2014, pp. 298–301.

2. Shchurevich N.N., Markaryan A.A. [Asarum europeum. Chemical compounds, pharmacological properties and application in medicine]. *Vestnik Rossijskogo universiteta druzhby narodov. [Bulletin of the Peoples' Friendship University of Russia, Series: Medicine]*, 2009, no. 4, pp. 175-179.

3. Jonge H., Vanrenterghem Y. Aristolochic acid: the common culprit of Chinese herbs nephropathy and Balkan endemic nephropathy. *Nephrol. Dial. Transpl.*, 2008, vol. 23, no. 1, pp. 39-41. doi: 10.1093/ndt/gfm667

4. Pavlović N.M., Maksimović V., Maksimović J. D., Orem W. H., Tatu C. A., Lerch H. E., Bunnell J. E., Kostić E. N., Szilagyi D. N., Paunescu V. Possible health impacts of naturally occurring uptake of aristolochic acids by maize and cucumber roots: Links to the etiology of endemic (balkan) nephropathy, *Environ. Geochem. Hlth.*, 2013, vol. 35, pp. 215–226. doi: 10.1007/s10653-012-9477-8

5. Li W., Hu Q., Chan W. Uptake and accumulation of nephrotoxic and carcinogenic aristolochic acids in food crops grown in Aristolochia clematitis-contaminated soil and water, *J. Agric. Food Chem.*, 2016, Vol. 64, pp. 107–112. doi: 10.1021/acs.jafc.5b05089

6. Chan C., Pavlović N. M., Chan W. Development of a novel liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for aristolochic acids detection: Application in food and agricultural soil analyses, *Food Chem.*, 2019, Vol. 289, pp.673–679. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.03.073/

7. Ji H., Zhang G, Zhou X. Rapid simultaneous determination of thirteen aristolochic acids analogs in Aristolochiaceae plants by Ultra-High-Performance liquid Chromatography-tandem mass spectrometry in dynamic multiple reaction monitoring mode, *J. Chromatogr. B*, 2023, Vol. 1225, 123753. doi: 10.1016/j.jchromb.2023.123753.

8. Ji F., Jin R., Luo Ch., Den Ch, Hu Ya/, Wang L/, Wang R., Zhang Ji., Song G. Fast determination of aristolochic acid I (AAI) in traditional Chinese medicine soup with magnetic solid-phase extraction by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 2020, vol.1609, 460455. doi: 10.1016/j.chroma.2019.460455.

9. Chan Ch-K., Pan G., Chan W. Analysis of aristolochic acids in *Houttuynia cordata* by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 2021, vol. 56, issue 4. doi: 10.1002/jms.4652.

10. Yu X., Gao Yu., Xu Y., Guo X., Guo L., Tan T., Liu F., Wan Y. Study of the Contents of Analogues of Aristolochic Acid in *Houttuynia cordata* by Ultra-High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Foods*, 2022, vol. 11, issue 3. doi: 10.3390/foods11030302

11. Meng X., Zhang M., Liu L., Du Ji., Li N., Zou W., Wang C., Chen W., Wei H., Liu R., Jia Q., Shao H., Lai Y. Rapid and robust analysis of aristolochic acid I in Chinese medicinal herbal preparations by surface-enhanced Raman spectroscopy/ *Spectrochim. Acta A*, 2023, vol. 285, 121880. doi: 10.1016/j.saa.2022.121880.

12. Lin Ch.-Ch., Lin P.-Y., Han Z., Tsai Ch.-Yu., Beck D. E., Hsieh Sh. Rapid identification and detection of aristolochic acids in the herbal extracts by Raman spectroscopy, *Spectrochim. Acta A*, 2023, vol. 300, 122918. doi.org/10.1016/j.saa.2023.122918

13. Cheng R., Mao X., Yu J., Liu F., Guo L., Luo D., Wan Y. A dispersive solid-phase extraction method for the determination of Aristolochic acids in *Houttuynia cordata* based on MIL-101(Fe): An analytes-oriented adsorbent selection design, *Food Chem.*, 2023, vol. 407, 135074. doi:10.1016/j.foodchem.2022.135074

14. Busy U., Boisseau R., Croyal M., Temgoua R. C. T., Boujtita M. In-line formation and identification of toxic reductive metabolites of aristolochic acid using electrochemistry mass spectrometry coupling. *Anal Bioanal Chem*, 2022, vol. 414, pp. 2363–2370. doi: 10.1007/s006-022-03874-2.

15. Wang Y., Qiao M., Baikeli Y., Mamat X., XunHuc L., Dongd Y., Chang F., Zhang H., Hu G. Soft-templated mesoporous carbon-modified glassy carbon electrode for sensitive and selective detection of aristolochic acids. *J. Hazard. Mater.* 2020, vol. 385, 121550. doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.121550.

16. Chen X., Zhang J., Xie J., Huang Z. Development of two immunochromatographic test strips based on gold nanospheres and gold nanoflowers for the rapid and simultaneous detection of aflatoxin B1 and aristolochic acid a in dual-use medicinal and food ingredients, *Microchem. J.* 2023, vol. 186, 108307. doi: 10.1016/j.microc.2022.108307

17. Ou A.-F., Chen Z.-J., Zhang Y.-F., He Q.-Y., Xu Z.-L., Zhao S.-Q. Preparation of Anti-Aristolochic Acid I Monoclonal Antibody and Development of Chemiluminescent Immunoassay and Carbon Dot-Based Fluoroimmunoassay for Sensitive Detection of Aristolochic Acid I. *Foods*. 2021, vol. 10, issue 11, 2647. doi:10.3390/foods10112647.

18. Bizina E.V., Polosina A.A., Farafonova O. V., Eremin S. A. Ermolaeva T. N. Opredelenie aristolohievoj kisloty s pomoshch'yu p'ezoelektricheskogo immunosensora na osnove magnitnyh uglerodnyh nanokompozitov. [Determination of aristolochic acid using a piezoelectric immunosensor based on magnetic carbon nanocomposites]. *Zavodskaya laboratoriya. Diagnostika materialov [Factory laboratory. Material di-*

- agnostics*. 2023, vol. 89, no. 8, pp. 23-30. (in Russian). doi.org/10.26896/1028-6861-2023-89-8-23-30/
19. Huang C.-L., Wu S.-W., Hsu T.-C., Yang C.-Y., Chung W.-H., Lin X.-J., Liu B.-H., Yu F.-Y.. Novel monoclonal antibody-based sensitive enzyme-linked immunosorbent assay and rapid immunochromatographic strip for sensitive detecting aristolochic acid I in herbal remedies. *Microchem. J.* 2023, vol. 191, 108884. doi.org/10.1016/j.microc.2023.108884.
20. Li Q., Chen H. Synthesis of nanocomposite of bimetal oxide of Ni and Co and multi-wall carbon nanotube modified electrode as a sensitive electrochemical sensor to measure the amount of uric acid in human biological fluid. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2023, vol. 18, issue 8, 100206. doi:doi.org/10.1016/j.ijoes.2023.100206
21. Brito C. L., Ferreira E. I., La-Scalea M. A. Application of multi-walled carbon nanotubes functionalized with hemin to evaluate the electrochemical behavior of nitrofurazone in aqueous media. *Electrochim. Acta.* 2023, vol. 459, 142486 doi.org/10.1016/j.electacta.2023.142486
22. Ziganshin M.A., Safiullina A.S., Gerasimov A.V., Ziganshina S.A., Klimovitskii A.E., Khayarov K.R., Gorbachuk V.V. Thermally induced self-assembly and cyclization of L-leucyl-L-leucine in solid state. *J. Phys. Chem. B.* 2017, vol. 121, no. 36, pp. 8603-8610. doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b06759.
23. Ziganshin M.A., Morozova A.S., Ziganshina S.A., Vorobev V.V., Suwińska K., Bukharaev A.A., Gorbachuk V.V. Additive and antagonistic effects of substrate and vapors on self-assembly of glycyl-glycine in thin films. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 2019, vol. 690, no. 1, pp. 67-83. doi.org/10.1080/15421406.2019.1683311.
24. Beck F., Loessl M., Baeumner A. J. Signaling strategies of silver nanoparticles in optical and electrochemical biosensors: considering their potential for the point-of-care. *Microchim. Acta.* 2023, vol.190, Article number: 91. doi:10.1007/s00604-023-05666-6
25. Bejlinson R.M., Yavisheva A.A., Lopatko N.Yu., Medyancheva E.P. Amperometric biosensory dlya opredeleniya tetraciklina. [Amperometric biosensors for the determination of tetracycline]. *Zavodskaya laboratoriya. Diagnostika materialov [Factory laboratory. Material diagnostics]*. 2022, vol. 88, no. 11, pp. 5-13. (in Russian). doi:10.26896/1028-6861-2022-88-11-5-13
26. Mal'ceva L.N., Muhametova L.I., Eremin S.A. Poliarizacionnyj fluorescentnyj immunoanaliz dlya kolichestvennogo opredeleniya organicheskikh soedinenij. [Polarization fluorescence immunoassay for quantitative determination of organic compounds]. *Laboratory and production*, 2020, vol.6 no.15, 78-86 pp. (in Russian). doi: 10.32757/2619-0923.2020.6.15.78.86
27. Kulis Yu.Yu. Analiticheskie sistemy na osnove immobilizovannyh fermentov [Analytical systems based on immobilized enzymes]. Vilnius: Mokslas., 1981, 200 p. (in Russian).
28. Zhao Q., Zhuang Q.K. Determination of Phenolic Compounds Based on the Tyrosinase - Single Walled Carbon Nanotubes Sensor, *Electroanal.* 2005, vol. 17, issue 1, pp. 85-88. doi:10.1002/elan.200403123
29. Bondarenko A.P., Eremin S.A. Opredelenie mikotoksinov zearalenona i ohratoksinov a v zerne metodom poliarizacionnogo fluorescentnogo immunoanaliza. [Determination of mycotoxins zearalenone and ochratoxin a in grain by polarization fluorescence immunoassay]. *[J. Analyt. Chem.]* 2012, vol. 67, no. 9, pp. 878-883. (in Russian).
30. Berezin I.V., Klyosov A.A. *Prakticheskij kurs himicheskij i fermentativnoj kinetiki [Practical course in chemical and enzymatic kinetics]*. M.: Science, 1976. 320 p. (in Russian).
31. Beloglazova N.V., Eremin S.A. Rapid screening of aflatoxin B1 in beer by fluorescence polarization immunoassay. *Talanta.* 2015, no. 142, pp. 170-175. doi: 10.1016/j.talanta.2015.04.027