

ПРОБЛЕМНАЯ СТАТЬЯ

ПОЛЯРИЗАЦИОННЫЙ ФЛУОРОИММУНОАНАЛИЗ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

POLARISATION FLUOROIMMUNOASSAYS OF PHYSIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

С.А. Еремин*
S.A. Eremin*

ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова, кафедра токсикологической химии,
МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Кафедра химической энзимологии
I.M. Sechenov Moscow Medical Academy, Department of Toxicological Chemistry
M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Department of chemical enzymology

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: поляризационный флуоресцентный иммуноанализ, ПФИА, продукты питания, лекарственные препараты, пестициды.

KEYWORDS: polarization fluoroimmunoassays, PFIA, food products, drugs, pesticides.

РЕЗЮМЕ: Необходимость контроля содержания в окружающей среде пестицидов, антибиотиков и лекарственных веществ становится все более очевидной. В настоящее время для этого часто используются методики на основе жидкостной хроматографии, имеющие ряд недостатков и ограничений. Вместе с тем, метод, используемый для первичного скрининга, должен быть технически прост, дешев и пригоден для рутинного анализа большого количества образцов.

В основе поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА) лежит свойство увеличения поляризации при флуоресценции небольших флуоресцентно меченных гаптен (меток) при связывании со специфичным антителом. Если образец содержит непомеченное определяемое вещество, метка связывается с антителом конкурентно, и поляризационный сигнал уменьшается. ПФИА не требует фракционирования образцов. В настоящее время разработано большое количество методик ПФИА для малых гаптен, таких как лекарственные препараты, гормоны, антибиотики, токсины, детергенты, пестициды и т.д. В МГУ им. М.В. Ломоносова созданы методики ПФИА для метамфетамина, эфедрина, фенобарбитала, гентамицина, сульфаметазина, сульфадиазина, хлорамфеникола и других препаратов. Подготовлены и опробованы флуоресцеиновые метки различной химической структуры. Использование химически родственных соединений в качестве основы для синтеза метки позволяет обеспечить большую чувствительность и специфичность анализа

по сравнению с производными, применяемыми для получения антител.

Имеющиеся методики ПФИА пригодны для рутинного анализа загрязнений в продуктах питания, а также для исследовательских целей. Общее время анализа составляет для одного образца 5 минут, для 20 образцов – 20 минут. Методики адаптированы для применения ТДх-анализатора Abbott в автоматическом и полуавтоматическом режимах.

SUMMARY: The need for a monitoring of contamination with pesticides, antibiotics and drugs is becoming more and more obvious. Present-day methods often use liquid chromatography, which have some disadvantages and limitations. The initial screening method should be technically simple, inexpensive and applicable to routine analysis of a large number of samples. These requirements are best met by polarization fluoroimmunoassays (PFIA).

PFIA is based on the increase in polarization of the fluorescence of a small fluorescent-labeled hapten (tracer) when bound by specific antibody. If the sample contains unlabelled analyte, tracer will compete for binding with antibody and the polarization signal will fall. No separation step is required for PFIA. A number of PFIA for small haptens like drugs, hormones, antibiotics, toxins, detergents, pesticides etc. have now been developed. In Moscow State University we have developed PFIA for Methamphetamine, Ephedrine, Phenobarbital, Barbiturate, Gentamicine, Sulfamethazine, Sulfadiazine, Chloramphenicol and another drugs. Fluorescein-labeled tracers with different chemical structures were prepared and evaluated. The use of chemically related compounds as the starting material for synthesis of tracer can give a more sensitive and more specific assay as compared

* Адрес для переписки:

Еремин С.А.
121019 Россия, г. Москва, Никитский бульвар д. 13
ММА им. И.М. Сеченова, кафедра токсикологической химии

with use of the derivatives employed for antibody production.

The present PFIAs are suitable for routine food contamination tests and for investigational studies. Total time of assay of one sample and of 20 samples is about 5 and 20 min, respectively. These methods have been adapted for use with the ABBOTT TDx-Analyzer running in automatic mode or in semi-automatic photo-check mode.

В результате интенсивных антропогенных воздействий в биосфере циркулирует большое число различных чужеродных для человека и животных соединений, вызывающих существенные изменения в организме человека, в составе и качестве пищи, а также глобальные изменения в окружающей среде (Еремин, 1989; Калмыкова и др., 2004). Все эти явления следует контролировать, что требует развития аналитических методов по определению изменений состояния среды по многочисленным параметрам. Прежде всего необходимо определять содержание физиологически активных веществ, к которым относятся наркотики, лекарства, гормоны, пестициды, детергенты и другие соединения с низким молекулярным весом. Исключительная важность определения этих веществ связана с необходимостью быстрого, простого и достоверного анализа их влияния на организм человека и животных.

Достижения последних лет в определении низкомолекулярных физиологически активных веществ, главным образом, связаны с развитием иммунохимических методов анализа, в основе которых лежит высокоспецифическая и высокочувствительная реакция антигена с антителами. Для получения статистически верных результатов определения физиологически активных веществ необходимо проводить сотни, а иногда и тысячи анализов. Поэтому к современным иммунохимическим тест-системам предъявляются следующие основные требования:

- высокая чувствительность и специфичность определения веществ;
- простота и автоматизация выполнения методики;
- экспрессность анализа.

Этим требованиям более всего отвечают безразделительные (гомогенные) иммунохимические методы с люминесцентной детекцией, к которым относится и поляризационный флуоресцентный иммуноанализ (ПФИА) (Еремин, 1989; Eremin, Smith, 2003). В настоящее время этот метод еще не нашел широкого применения у нас в стране, но метод ПФИА разрабатывается, и все больше публикаций появляется в печати. Данный обзор посвящен работам, опубликованным нашей группой по методу ПФИА.

Принцип ПФИА заключается в конкуренции определяемого вещества и меченого флуоресцентной меткой за связывание с ограниченным количеством антител. Метод основан на возрастании поляризации флуоресценции меченого флуоресцеином антигена при его специфическом связывании с антителами. Метод ПФИА очень прост в постановке и заключа-

ется в добавлении к аликвоте образца (10–100 мкл) растворов меченого флуоресцеином гаптена и антител, и последующего измерения поляризации флуоресценции. Общее время анализа не превышает нескольких минут.

Особенности определения наркотиков методом ПФИА

Наркотики необходимо детектировать как качественно, так и количественно, или интерпретировать результаты по превышению контролируемого порогового уровня (Еремин и др., 1991). Нами была предложена стратегия получения производных наркотиков для синтеза иммуногенов и флуоресцеин-меченных антигенов (трейсеров) для определения наркотиков группы фенилалкиламинов (рис. 1).

Были разработаны методы синтеза производных и флуоресцеин-меченных трейсеров для ряда фенилалкиламинов (Eremin et al., 1988; Смирнов и др., 1994). Кроме того, были получены конъюгаты наркотиков с белками и проведена иммунизация подопытных животных для получения антител (Смирнов и др., 1993). Полученные антисыворотки были протестированы по титру, специфичности и чувствительности. Проведен выбор антисывороток для специфического и класс-специфического иммуноанализа наркотиков группы фенилалкиламинов; некоторые из антисывороток обладали даже стереоспецифичностью. Были проведены раститровки антисывороток против эфедрина и метамфетамина с различными трейсерами, и выбраны оптимальные пары иммунореагентов, позволившие разработать методики высокоспецифического определения наркотиков группы фенилалкиламинов (Choi et al., 1995).

Изучено влияние структуры флуоресцеин-меченого трейсера на чувствительность определения этих методик. Проведен выбор соответствующей пары трейсер-антисыворотка для определения как индивидуального наркотика, так и всего класса фенилалкиламинов (Eremin et al., 1989). Показано, что титр антител зависит от используемого трейсера

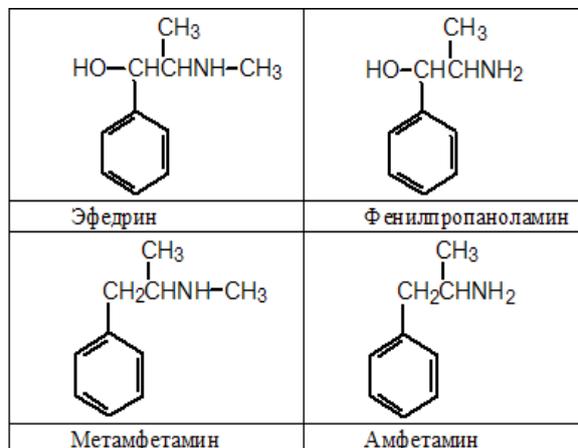


Рис. 1. Структура некоторых соединений группы фенилалкиламинов

и возрастает по мере удлинения так называемого «мостика» между антигеном и флуоресцеином в трейсере Meth-(CH₂)_n-NH-CS-NH-Fluor (рис.2). Однако трейсер с длинным мостиком между флуоресцеином и антигеном дает меньшую чувствительность определения, чем трейсер с коротким мостиком (рис.3) (Colbert et al., 1991).

Методика определения метамфетамина с трейсером АВА-ФИТС (рис.4), полученным на амфетамин, была более чувствительной, чем с трейсером, полученным на метамфетамин. Т.е. гетерологичная пара антитело-трейсер, в которой применяются высокоспецифичные антитела на антиген и трейсер с коротким мостиком, полученный на антиген с подобной структурой, позволяет разработать наиболее чувствительный метод ПФИА (рис.5) (Eremin et al.,

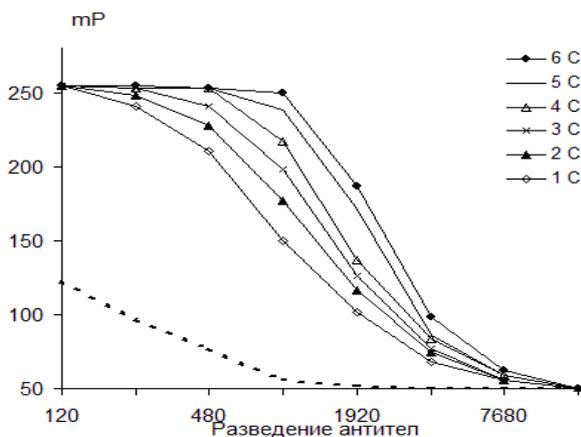


Рис.2. Кривые титрования антител к метамфетамину, полученных на аминокбутильное (n=4) производное метамфетамина Meth-(CH₂)_n-NH-CO-KLH, с трейсерами с различной длиной мостика Meth-(CH₂)_n-NH-CS-NH-Fluor (n=1-6).

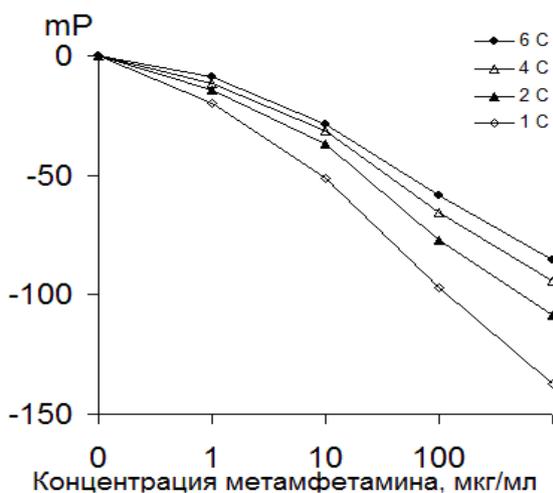


Рис.3. Градуировочные графики определения метамфетамина с антителами, полученными на аминокбутильное (n=4) производное метамфетамина Meth-(CH₂)_n-NH-CO-KLH, и с трейсерами с различной длиной мостика Meth-(CH₂)_n-NH-CS-NH-Fluor (n=1-6).

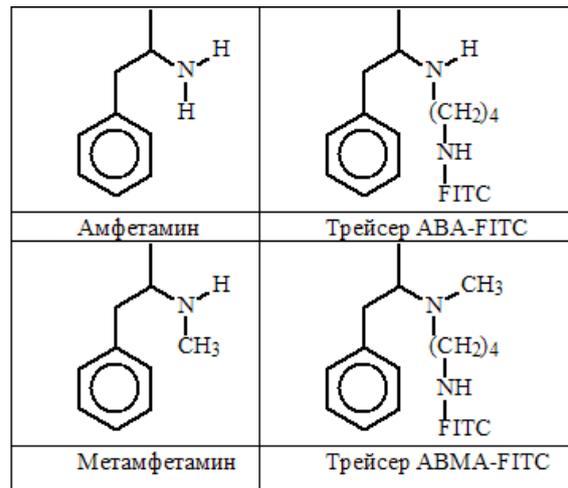


Рис.4. Структура амфетамина и метамфетамина, а также флуоресцеин-меченных трейсеров на основе их аминокбутильных производных с ФИТС.

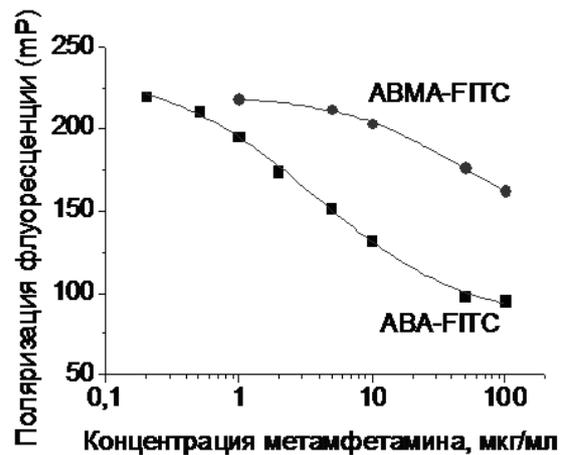


Рис.5. Градуировочные графики определения метамфетамина методом однореагентного ПФИА с использованием трейсеров флуоресцеин-меченного метамфетамина АВМА-ФИТС (●) или флуоресцеин-меченного амфетамина АВА-ФИТС (■).

1993; Смирнов и др., 1994).

Полученные иммунореагенты были адаптированы для производства набора реагентов, которые могут быть использованы для постановки ПФИА в автоматическом режиме на ТДх-анализаторе фирмы Abbott (США), имеющемся в оснащении многих российских диагностических центров (Eremin et al., 1989). Комплект иммунореагентов был использован для проведения массовых скрининговых тестов в нескольких наркотических центрах. Показано, что результаты определения метамфетамина, амфетамина и эфедрина методом ПФИА полностью коррелируют с данными других методов определения фенилалкиламинов.

На основании кинетических исследований были подобраны пары иммунореагентов антитело-трейсер

для проведения ПФИА в кинетическом режиме с использованием комбинированного реагента, который представляет собой иммунный комплекс трейсер-антитело. Такая однореагентная тест-система лишь немного уступает по чувствительности определения традиционному методу ПФИА, но дает значительно более воспроизводимые результаты. Особенно важно то, что однореагентная тест-система более стабильна при хранении. Полученный комбинированный реагент может храниться до нескольких месяцев в готовой к использованию форме (Egemin et al., 1987).

Методом ПФИА на примере наркотиков класса фенилалкиламинов были оценены константы аффинности антител с различными по структуре трейсерами (Еремин и др., 1991; Colbert et al., 1991). При тестировании антисывороток против метамфетамина установлено, что в ходе иммунизации животных величина константы аффинности ($K_{\text{афф}}$) возрастает. Наибольшие $K_{\text{афф}}$ отмечались у антисывороток после 1 года иммунизации. Однако при определении эфедрина высокоаффинные антитела вырабатывались уже после первого месяца иммунизации и были вполне пригодны для исследований. Рассчитанные по методу Скетчарда константы для антител на метамфетамин и трейсеров Meth-(CH₂)_n-NH-CS-NH-Fluor показали четкую закономерность: $K_{\text{афф}}$ минимальна для трейсера с одним атомом углерода в цепи ($9,0 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$) и максимальна для трейсера с 6 атомами углерода в цепи ($3,6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$). Найденные закономерности по синтезу трейсеров и разработке определения фенилалкиламинов были использованы для создания тест-систем ПФИА для определения наркотиков: бензфетамина (Choi et al., 1995), фенилпропаноламина (Egemin et al., 1993), опиатов (Еремин и др., 1995), бензодиазепинов (Уфимцева и др., 1994) и др. наркотических

веществ.

Получение иммунореагентов и оптимизация условий определения лекарств и гормонов методом ПФИА

Исключительная важность определения лекарственных соединений, наркотиков и гормонов связана с необходимостью быстрого, простого и точного контроля их влияния на организм человека и животных. Совместное обсуждение иммунохимического определения лекарств и наркотиков объясняется их общей природой как органических веществ, оказывающих воздействие на организм. В ряде случаев одно и то же органическое вещество может быть лекарственным соединением или наркотиком, и даже вызывать токсический эффект. Для достоверного определения наличия наркотиков в организме человека была введена величина пороговой концентрации наркотика (threshold), показывающая содержание наркотика, по крайней мере, в три раза превышающее предел обнаружения используемого метода анализа. Если для определения наркотиков необходимо узнать, есть ли в организме какие-либо наркотические вещества или нет, то в случае определения лекарств и гормонов важно знать их точную концентрацию. Лекарства оказывают влияние на организм в узком диапазоне концентраций, ниже которого они не вызывают воздействия, а выше – могут приводить к побочным токсическим эффектам. Физиологически нормальное содержание гормонов в организме также находится в узком диапазоне концентраций, а отклонения как выше, так и ниже нормы свидетельствуют о каких-либо болезнях. Терапевтический диапазон действия большинства лекарств и гормонов очень небольшой. Более того, концентрация гормонов очень мала и

Таблица 1. Перекрестные реакции с барбитуратами и близкими по структуре веществами для определения барбитала, фенобарбитала и барбитуратов методом ПФИА.

Исследуемое соединение	Перекрестные реакции, %		
	Барбитал	Фенобарбитал	Барбитураты
Фенобарбитал	1,4	100	100
Барбитал	100	7,2	500
Апробарбитал	0,7	1,2	
Барбитал	0,2	0,9	200
Барбитуровая кислота	<0,1	<0,1	
Бутобарбитал	1,5	3,5	500
Гексобарбитал	<0,1	<0,1	
Гексамидин	<0,1	<0,1	
Дифенин	<0,1	<0,1	
п-Гидроксифенобарбитал	<0,1	2,3	
3-Гидроксибарбитал	2,8	<0,1	
Метилфенобарбитал	<0,1	<0,1	
Секобарбитал	8,0	3,2	800
Этаминал-натрий	4,7	3,4	760

находится на уровне нг/мл и ниже. Поэтому эти вещества необходимо определять с высокой точностью и чувствительностью, что возможно сделать лишь иммунохимическими методами анализа, как например, методом ПФИА.

Были предложены методы синтеза производных с активными функциональными группами для барбамила (Ермаков и др., 1993; Еремин и др., 1996) и фенобарбитала (Еремин и др., 1991), которые относятся как к наркотическим, так и лекарственным соединениям. Способ получения производных и трейсер на барбамил были запатентованы. Иммунореагенты были получены таким образом, что удалось разработать как специфический (Ермаков и др., 1993), так и групповой ПФИА барбитуратов (табл. 1) (Дзгоев и др., 1993). Были синтезированы различные трейсеры на фенобарбитал, определены константы аффинности антител, полученных на различные иммуногены, и рассчитаны аналитические характеристики методик определения фенобарбитала. Показано, что изменяя структуру трейсера, возможно изменять и специфичность иммуноанализа, используя одни и те же антитела (Дзгоев и др., 1991).

Получены иммунореагенты и разработаны методики определения ряда антибиотиков: гентамицина (Гаврилов и др., 1992), канамицина, стрептомицина, бензилпенициллина (Еремин et al., 1992), хлорамфеникола (Еремин et al., 1992). На примере определения гентамицина показано, что, используя те же самые иммунореагенты, как для ПФИА, возможно проводить флуоресцентный иммуноанализ по тушению флуоресценции для определения антибиотика. В этом методе не требуется специального прибора для измерения поляризации флуоресценции, а можно использовать обычный флуориметр, который может быть очень простым и миниатюрным (Гаврилов и др., 1992).

Впервые были разработаны методики определения сульфаниламидных препаратов: сульфаметазина (Еремин et al., 1994), сульфадиазина (Муртазина et al., 1987), сульфаниламида (Еремин et al., 2005) и др. методом ПФИА, позволяющие специфически определять один сульфаниламид из большого числа соединений со сходной структурой $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_2\text{-NH-R}$. Ведутся исследования, и получены предварительные результаты по созданию мульти-ПФИА и других иммунохимических методов, т.е. одновременного определения нескольких соединений, близких по структуре (Муртазина и др., 2005). Для этого рассматриваются несколько подходов:

- 1) получение мультиспецифических антител;
- 2) использование смеси нескольких специфических антител на разные сульфаниламиды;
- 3) выбор универсального трейсера, который обеспечит широкую специфичность иммуноанализа;
- 4) проведение параллельного определения нескольких соединений и др.

Разработан ПФИА в автоматическом режиме для экспрессного определения котинина, являющегося основным метаболитом никотина. Для проведения

анализа достаточно 10 мкл мочи, и через минуту по результатам теста можно провести дискриминацию курильщиков и некурящих, а также определить «степень курения» (Еремин et al., 1992).

Обсуждены особенности получения иммунореагентов и их применимость для определения некоторых гормонов: тироксина (Еремин и др., 1991), триодтиронина, кортизола, тестостерона, эстрадиола, прогестерона (Колосова и др., 1994; Choi et al., 1997), 17-оксипрогестерона (El-Gamal et al., 1988; Еремин, Egofov, 1991) и др. гормонов. Предложены подходы к оптимизации используемых антител и трейсеров и их различные гомологические и гетерологические комбинации для повышения чувствительности определения гормонов. Для определения прогестерона и 17-оксипрогестерона в сыворотке крови человека удалось достичь нужной чувствительности для определения гормона в сыворотке крови пациента, но для большинства других гормонов метод ПФИА в настоящее время не может быть применим из-за низкой чувствительности и влияния матрицы образца. Дальнейшее совершенствование иммунореагентов и приборной базы позволит решить проблему чувствительности для экспрессного и прямого определения гормонов методом ПФИА. В настоящее время метод ПФИА оптимален для тестирования антител, определения аффинности и стратегии по выбору иммунореагентов для определения гормонов и лекарств.

Выводы

Получены иммунореагенты, специфичные для определения как индивидуальных соединений, так и целого класса близких по структуре физиологически активных соединений. Разработаны экспресс-методики качественного обнаружения и количественного определения различных низкомолекулярных соединений: наркотиков, лекарств и гормонов. Ниже в табл. 2 приводится список физиологически активных веществ, для определения которых нами были разработаны методики ПФИА, и даны ссылки на наши публикации.

Список литературы

- Гаврилов В.Б., Еремин С.А., Егоров А.М. 1992. Сравнительный анализ иммунохимического определения гентамицина по поляризации и тушению флуоресценции // Антибиотики и химиотерапия. Т.37. №9. С.36-39.
- Дзгоев А.Б., Еремин С.А., Данилова Н.П., Егоров А.М., Васильев Р.Г. 1991. Количественное определение фенобарбитала в сыворотке крови человека методом поляризационного флуороиммуноанализа // Вопр. мед. химии. Т.37. №3. С.85-86.
- Дзгоев А.Б., Еремин С.А., Карпов М.В., Данилова Н.П., Васильев Р.Г., Егоров А.М. 1993. Определение фенобарбитала методом поляризационного флуороиммуноанализа. Влияние структуры иммуногена и трейсера на специфичность и предел детекции // Биоорг. химия. Т.19. №7. С.713-721.
- Еремин С.А. 1989. Иммунохимический анализ лекарств и

Таблица 2. Список физиологически активных веществ, для определения которых в нашей лаборатории были разработаны методики ПФИА.

№	Название	Предел обнаружения, кг/мл	Диапазон определяемых концентраций, мкг/мл	Ссылка на список публикаций
Наркотики:				
1	Метамфетамин	0,06	0,2-100	Eremin et al., 1987 Eremin et al., 1988
2	Амфетамин	0,03	0,1-10	Eremin et al., 1992
3	Бензфетамин	0,05	0,05-1	Choi et al., 1995
4	Эфедрин	0,01	0,1-10	Eremin et al., 1993 Смирнов и др., 1993 Смирнов и др., 1994
5	Барбамил	0,05	0,1-10	Ермаков и др., 1993 Еремин и др., 1996
6	Опиаты (морфин)	0,12	0,2-1	Еремин и др., 1995
7	Бензодиазепины (диазепам)	0,15	0,25-5	Уфимцева и др., 1994
Лекарства:				
8	Фенобарбитал в сыворотке	2,6	5-100	Дзгоев и др., 1991 Дзгоев и др., 1993
9	Фенобарбитал в моче	0,4	0,5-100	Еремин и др., 1991 Ермаков и др., 1993
10	Гентамицин	0,005	0,02-0,3	Гаврилов и др., 1992
11	Бензилпеницилин	0,1	0,1-10	Eremin et al., 1992
12	Хлорамфеникол	0,1	0,1-10	Eremin et al., 1992
13	Сульфаметазин	0,01	0,05-1	Eremin et al., 1994
14	Сульфадиазин	0,0002	0,0005-0,032	Myrtazina et al., 2004
15	Сульфаниламид			Eremin et al., 2005
16	Котинин	0,03	0,1-10	Eremin et al., 19
Гормоны:				
17	Прогестерон	0,003	0,01-1	Колосова и др., 1994 Choi et al., 1997
18	17-Окспрогестерон	0,5 нМ	1-500 нМ	El-Gamal et al., 1988 Eremin & Egorov, 1991
19	Тироксин			Еремин и др., 1991

органических соединений // Журн. Всес. хим. о-ва им. Д.И.Менделеева. Т.34. №1. С.46-51.

Еремин С.А., Смирнов А.В., Ермаков А.Н., Изотов Б.Н., Егоров А.М. 1991. Определение первитина в моче с помощью поляризационного флуоресцентного иммуноанализа // Вопр. наркологии. Т.1. С.28-30.

Еремин С.А., Ермаков А.Н., Смирнов А.В., Миронова Н.А., Колосова А.Ю., Ефимова Ю.А., Дзгоев А.Б., Кузьмина Н.С. 1991. Применение метода поляризации флуоресценции для экспресс-тестирования антисывороток к гаптенам // Сб. трудов ЦНИИВС им.И.И.Мечникова "Иммунохимические и молекулярно-биологические методы диагностики в медицине". М. С.27-32.

Еремин С.А., Ермаков А.Н., Изотов Б.Н. 1992. Определение фенобарбитала поляризационным флуороиммуноанализом // Вопр. наркологии. Т.2. С.25-27.

Еремин С.А., Уфимцева Е.В., Изотов Б.Н. 1995.

Поляризационный флуороиммуноанализ опиатов в моче // Вопр. наркологии. №3. С.31-36.

Еремин С.А., Щеголев А.А., Егоров А.М., Ермаков А.Н., Изотов Б.Н. Способ получения конъюгированных производных барбитуровой кислоты для иммунохимического анализа барбамилла // Патент РФ 1832122 от 29.03.1996. По заявке 4906444 от 31.01.91.

Ермаков А.Н., Изотов Б.Н., Еремин С.А., Щеголев А.А., Егоров А.М. В-Аминофлуоресцеинтиокарбамилэтила мид-5-изоамил-5-(5'-карбокисептил) барбитуровой кислоты в качестве реагента для поляризационного флуороиммуноанализа барбамилла // Патент РФ 1825793 от 05.05.1993. По заявке 4913450, приоритет от 31.01.91.

Ермаков А.Н., Бобрин Д.Э., Изотов Б.Н., Егоров А.М., Еремин С.А. 1993. Поляризационный флуороиммуноанализ фенобарбитала с использованием ТДх анализатора фирмы "Abbott" // Вопр. мед. химии. Т.39. №4. С.59-63.

- Калмыкова Е.Н., Мелихова Е.В., Еремин С.А., Ермолаева Т.Н. 2004. Определение сульфаметоксазола с помощью пьезокварцевого иммуносенсора // *Антибиотики и химиотер.* Т.49. №1. С.8-13.
- Колосова А.Ю., Еремин С.А., Гаврилова Е.М., Егоров А.М. 1994. Поляризационный флуороиммуноанализ прогестерона // *Проблемы эндокринологии.* №4. С.48-51.
- Муртазина Н.Р., Медянцева Э.П., Писарев В.В., Еремин С.А. 2005. Иммунохимическое определение сульфаметазина в речной воде и лекарственных препаратах // *Химико-фармацевтический журнал.* Т.39. №8. С.93-97.
- Смирнов А.В., Еремин С.А., Егоров А.М., Изотов Б.Н. 1994. Поляризационный флуороиммуноанализ эфедрина в моче // *Хим.-фарм. журнал.* №1. С.54-60.
- Смирнов А.В., Еремин С.А., Егоров А.М., Изотов Б.Н. ?-Аминофлуоресцеинтиокарбамил-N-(4-аминобутил)-2-амино-1-фенил-(L)-пропанол в качестве реагента для поляризационного флуороиммуноанализа (L)-эфедрина // Патент РФ 2004543 от 15.12.1993. По заявке 5019159, приоритет от 27.12.91.
- Уфимцева Е.В., Смирнов А.В., Изотов Б.Н., Еремин С.А. 1994. Определение диазепема в моче методом поляризационного флуороиммуноанализа // *Вопр. наркологии.* №1. С.72-75.
- Choi M.J., Choi J., Park J., Eremin S.A. 1995. Localization of the epitope in methamphetamine and its antibody use for the detection of methamphetamine and benzphetamine by polarization fluoroimmunoassay // *Journal of Immunoassay.* 16(3), P.263-278.
- Choi M.J., Choi J., Yoon D.Y., Park J., Eremin S.A. 1997. Fluorescence polarization immunoassay of progesterone // *Biol. Pharm. Bull.* 20(4). P.309-314.
- Colbert D.L., Eremin S.A., Landon J. 1991. The effect of fluorescein labels on the affinity of antisera to small haptens // *J. Immunol. Meth.* 140. P.227-233.
- El-Gamal B.A., Eremin S.A., Smith D.S., Landon J. 1988. Development of a direct fluoroimmunoassay for serum levels of 17-hydroxyprogesterone // *Ann. Clin. Biochem.* 25. P.35-41.
- Eremin S.A., Gallacher G., Lotey H., Smith D.S., Landon J. 1987. Single-Reagent polarization fluoroimmunoassay of methamphetamine in urine // *Clin. Chem.* 33(10) P.1903-1906.
- Eremin S.A., Schiavetta D.E., Lotey H., Smith D.S., Landon J. 1988. Design and development of single-reagent polarization fluoroimmunoassay for methamphetamine // *Ther. Drug Monit.* 10. P.327-332.
- Eremin S.A., Zaitchev S.V., Egorov A.M., Ermakov A.N., Smirnov A.V., Izotov B.N. 1989. Polarization fluoroimmunoassays for the specific determination of amphetamine and methamphetamine in urine with the Abbott TDx-analyzer. // *Anal. Chim. Acta.* 227. P.287-290.
- Eremin S.A., Egorov A.M. 1991. Polarization fluoroimmunoassay for 17-hydroxyprogesterone // In: "Advances in Steroid Analysis '90" Ed.S.Gorog, Akademiai Kiado. Budapest. P.113-119.
- Eremin S.A., Landon J., Smith D.S., Jackman R. 1992. Polarisation fluoroimmunoassays for food contamination // In: "Food safety and quality assurance: applications of immunoassay systems". M.R.A. Morgan, C.J. Smith, P.A. Williams. (eds.) Elsevier applied science. London and N.Y.
- Eremin S.A., Coxon R.E., Colbert D.L., Landon J., Smith D.S. 1992. Urinary cotinine fluoroimmunoassay for smoking screening adapted to an automated analyzer // *Analyst* 117 (4). P.697-699.
- Eremin S.A., Smirnov A.V., Gallacher G., Smith D.S., Colbert D.L. 1993. Detection of ephedrine and phenylpropanolamine in urine, using a polarization fluoroimmunoassay // *Analyst*, 118. P.1325-1328.
- Eremin S.A., Landon J., Smith D.S., Jackman R. 1994. Development of a Polarisation fluoroimmunoassay for sulphamethazine on an automated analyzer // *Analyst.* 119. P.2723-2726.
- Eremin S.A., Smith D.S. 2003. Fluorescence polarization immunoassays for pesticides // *Comb. Chem. High T. SCR.* 6(3). P.257-266.
- Eremin S.A., Murtazina N.R., Ermolenko D.N., Zherdev A.V., Mart'ianov A.A., Yazynina E.V., Michura I.V., Formanovsky A.A., Dzantiev B.B. 2005. Production of polyclonal antibodies and development of fluorescence polarization immunoassay for sulfanilamide // *Anal. Lett.* 38. P.951-969.
- Myrtazina N.R., Eremin S.A., Mozoleva O.V., Everest S.J., Brown A.J., Jackman R. 2004. Polarization fluoroimmunoassay for sulfadiazine using a high specificity antibody // *Intern. J. Food Sci. Tech.* Vol.39. No.10. P.879-891.

