



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 33/5438 (2019.02)

(21)(22) Заявка: 2017147140, 29.12.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.12.2017

Дата регистрации:
16.05.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 29.12.2017

(45) Опубликовано: 16.05.2019 Бюл. № 14

Адрес для переписки:
398600, г. Липецк, ул. Московская, 30, ЛГТУ

(72) Автор(ы):

Ермолаева Татьяна Николаевна (RU),
Фарафонова Ольга Вячеславовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Липецкий государственный
технический университет" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: ВОРОНЕЖЦЕВА О.В. и др.
Безметочный пьезокварцевый иммуносенсор
для определения остаточных количеств
тетрациклинов в пищевых продуктах //
Материалы VIII Всероссийской
конференции по электрохимическим
методам анализа "ЭМА-2012", 2012, стр. 77.
RU 2419797 C1, 27.05.2011. DON E. et al. Use
of Piezoelectric Immunosensors for Detection
of (см. прод.)

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕТРАЦИКЛИНОВ С ПОМОЩЬЮ ПЬЕЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОГО СЕНСОРА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области аналитической химии и может быть рекомендовано для селективного суммарного определения тетрациклинов в пищевых продуктах и комбинированных препаратах с помощью пьезоэлектрического иммуносенсора. Раскрыт способ суммарного определения антибиотиков тетрациклинового ряда с помощью пьезоэлектрического иммуносенсора, характеризующийся тем, что на поверхности сенсора нанесена подложка на основе самоорганизующихся монослоев тиолов 11-меркаптоундеканола и 2-амино-5-меркапто-1,3,4-триазола, на которую иммобилизуют тетрациклин-белковый конъюгат, к пробе добавляют фиксированное количество поликлональных антител к тетрациклинам и

выдерживают в течение 2-3 мин до образования иммунокомплекса, вводят в ячейку для детектирования в фосфатном буферном растворе с рН 7,1-7,2 и регистрируют изменение частоты колебания сенсора в результате взаимодействия несвязавшихся антител с тетрациклин-белковым конъюгатом на поверхности электродов сенсора, аналитический сигнал обратно пропорционален суммарной концентрации тетрациклинов в анализируемой пробе, концентрацию определяют по градуировочному графику, регенерацию рецепторного покрытия осуществляют нанесением на поверхность 0,1 М раствор гидрохлорида диэтиламина. Изобретение обеспечивает снижение предела обнаружения тетрациклинов и увеличение чувствительности определения с высокой достоверностью

результатов, уменьшение времени анализа, расширение диапазона линейного определения, и проведение измерений с возможностью

регенерации сенсора в течение 30 циклов измерения. 1 табл., 8 пр.

(56) (продолжение):

Interferon-Gamma Interaction with Specific Antibodies in the Presence of Released-Active Forms of Antibodies to Interferon-Gamma // Sensors, 2016, V.16, pp.1-10. CONZUELO F. Disposable amperometric magneto-immunosensor for direct detection of tetracyclines antibiotics residues in milk // Analytica Chimica Acta, 2012, V.737, pp.29-36.

R U
2 6 8 7 7 4 2
C 1

R U
2 6 8 7 7 4 2
C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
G01N 33/5438 (2019.02)

(21)(22) Application: **2017147140, 29.12.2017**

(24) Effective date for property rights:
29.12.2017

Registration date:
16.05.2019

Priority:

(22) Date of filing: **29.12.2017**

(45) Date of publication: **16.05.2019** Bull. № 14

Mail address:
398600, g. Lipetsk, ul. Moskovskaya, 30, LGTU

(72) Inventor(s):

**Ermolaeva Tatyana Nikolaevna (RU),
Farafonova Olga Vyacheslavovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Lipetskij gosudarstvennyj
tehnicheskij universitet" (RU)**

(54) **METHOD OF DETERMINING TETRACYCLINES USING A PIEZOELECTRIC SENSOR**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to analytical chemistry and can be recommended for selective summary determination of tetracyclines in food products and combined preparations using a piezoelectric immunosensor. Disclosed is a method for total determination of tetracycline antibiotics using a piezoelectric immunosensor, characterized in that a sensor surface is coated with a substrate based on self-assembled monolayers of thiols 11-mercaptoundecanol and 2-amino-5-mercapto-1,3,4-triazole, on which tetracycline is immobilized protein-containing conjugate, a fixed amount of polyclonal antibodies to tetracyclines is added to the sample and held for 2–3 minutes until formation of an immunocomplex, is introduced into a cell for detection in a phosphate buffer solution with pH 7.1–7.2 and

recording a change in the sensor oscillation frequency as a result of interaction of unbound antibodies with a tetracycline-protein conjugate on the surface of sensor electrodes, analytical signal is inversely proportional to the total concentration of tetracyclines in the analysed sample, the concentration is determined from a calibration curve, regeneration of the receptor coating is carried out by applying 0.1 M solution of diethylamine hydrochloride on the surface.

EFFECT: invention provides reduced detection limit of tetracyclines and high sensitivity of detection with high reliability of results, shorter analysis time, wider range of linear determination, and performance of measurements with possibility of regeneration of sensor during 30 measurement cycles.

1 cl, 1 tbl, 8 ex

RU 2 687 742 C 1

RU 2 687 742 C 1

Изобретение относится к области аналитической химии и может быть рекомендовано для селективного суммарного определения тетрациклинов в пищевых продуктах и комбинированных препаратах с помощью пьезоэлектрического иммуносенсора.

В настоящее время для определения группы тетрациклина применяют методы:

5 микробиологические [Fagbamila I. Antimicrobial screening of commercial eggs and determination of tetracycline residue using two microbiological methods / I. Fagbamila, J. Kabir, P. Abdu, G. Omeiza, P. Ankeli, S. Ngulukun, M. Muhammad, J. Umoh // International Journal of Poultry Science. - 2010. - V. 9 (10). - P. 959-962; Khismatoullin R. Modification of microbiological detection of tetracycline in honey / R. Khismatoullin, R. Kuzyaev, Ya. Lyapunov, E. Elovikova // АРІАСТА. - 2003. - V. 38. - P. 246-248; Kirbis A. Microbiological screening method for detection of aminoglycosides, b-lactames, macrolides, tetracyclines and quinolones in meat samples / A. Kirbis // Slov Vet Res. - 2007. - V. 44 (1/2). - P. 8-11], недостатком таких методов является невысокая чувствительность (предел обнаружения равен 30-40 мкг/кг), хотя эти тесты считаются быстрыми, они занимают 3-24 часа для работы в

15 инкубаторе, бактериальные штаммы, должны постоянно контролироваться, чтобы убедиться, что они не стали устойчивыми к тетрациклинам, интерпретация результатов теста весьма субъективна и может привести к ложным отрицательным или положительным результатам; высоко-эффективной жидкостной хроматографии [Ahmadi F. Determination of tetracyclines in meat using two phases freezing extraction method and HPLC-DAD / Ahmadi F., Shahbazi Y., Karami N. // Food Analytical Methods. - 2015. - Volume 8, Issue 7, pp 1883-1891; Moats W.A. Rapid HPLC Determination of Tetracycline Antibiotics in Milk / W.A. Moats, R. Harik-Khan // J. Agric. Food Chem. - 1995. - V. 43 (4). - P. 931-934; Zhou J. Multiresidue determination of tetracycline antibiotics in propolis by using HPLC-UV detection with ultrasonic-assisted extraction and twostep solid phase extraction / J. Zhou, X. Xue, Yi Li, J. Zhang, F. Chen, L. Wu, L. Chen, J. Zhao // Food Chemistry. - 2009. - V. 115. - Is. 3. - P. 1074-1080; Moats W.A. Determination of tetracycline antibiotics in beef and pork tissues using ion-paired liquid chromatography / W.A. Moats // J. Agric Food Chem. - 2000. - V. 48(6). - P. 2244-2248; Pena A. Determination of tetracycline antibiotic residues in edible swine tissues by liquid chromatography with spectrofluorometric detection and confirmation by mass spectrometry / A. Pena, CM. Lino, R. Alonso, D.

30 Barcelo // J. Agric. Food Chem. - 2007. - V. 55 (13). - P. 4973-4979; A.R. Shalaby Validation of HPLC method for determination of tetracycline residues in chicken meat and liver / A.R. Shalaby, Nadia A. Salama, S.H. Abou-Raya, Wafaa H. Emam, F.M. Mehaya // Food Chemistry. - V. 124, I. 4, 2011, P. 1660-1666], имеющие достаточно сложную процедуру

35 пробоподготовки с применением твердофазной экстракции и степень извлечения продуктов порядка 80%.

Наиболее близким по технике выполнения, является метод [F. Conzuelo, M. Gamella, S. Campuzano, A.J. Reviejo, and J.M. Pingarron. Disposable amperometric magneto-immunosensor for direct detection of tetracyclines antibiotics residues in milk. Analytica Chimica Acta 2012; 737, 29-36.] основанный на амперометрическом иммуносенсоре. Метод экспрессен, селективен, однако чувствительность данного метода не высока, пределы обнаружения составили 8,9 мкг/л для тетрациклина, 1,2 мкг/л для окситетрациклина, 66,8 мкг/л для хлортетрациклина.

Задачами настоящего изобретения являются возможность снижения предела обнаружения тетрациклинов и увеличение чувствительности определения с высокой достоверностью результатов, уменьшение времени анализа, расширение диапазона линейного определения, проведение измерений с возможностью регенерации сенсора в течение 30 циклов измерения.

Поставленные задачи решаются тем, что анализ проводят в конкурентном режиме анализа с помощью пьезоэлектрических иммуносенсоров, имеющих на своей поверхности специально подготовленную подложку на основе самоорганизующихся монослоев тиолов.

5 Для определения наноконцентраций тетрациклиновых антибиотиков (тетрациклин, окситетрациклин, тетрациклина гидрохлорид, хлортетрациклин) на поверхности электрода сенсора формировали высокоаффинное наноструктурированное распознающее покрытие на основе 11-меркаптоундеканола и 2-амино-5-меркапто-1,3,4-триазола, затем иммобилизовали конъюгат бычьего сывороточного альбумина с
10 тетрациклином, а в пробу, содержащую определяемые тетрациклины, вводили заранее установленное количество антител, соответствующее 50%-ному связыванию и выдерживали в течение 3 мин до завершения образования гомогенного иммунного комплекса определяемого соединения (тетрациклина) с антителами. Затем пробу вводили в поток раствора-носителя, и после попадания ее в ячейку детектирования, измеряли
15 аналитический сигнал сенсора в результате взаимодействия несвязавшихся антител с тетрациклин-белковым конъюгатом на поверхности электродов сенсора. Аналитический сигнал сенсора обратно пропорционален содержанию тетрациклинов в анализируемой пробе. После каждого измерения осуществляют регенерацию покрытия рецепторного покрытия, нанося на поверхность 0,1 М раствор
20 гидрохлорида диэтиламина.

Отличительными признаками предложенного способа являются:

- Высокая чувствительность способа, позволяющая осуществить определение суммарного количества тетрациклинов в пищевых продуктах в интервале концентраций 0,7-60,0 нг/мл, при этом предел обнаружения равен 0,21 нг/мл;
- 25 - Многократное (более 30 раз) использование иммуносенсора вследствие устойчивого покрытия, образованного методом самоорганизованных монослоев, а также регенерации биорецепторного покрытия после каждого цикла измерения;
- Высокая селективность определения тетрациклинов в сложных по составу смесях, в том числе, в присутствии антибиотиков, применяемых совместно с тетрациклинами
30 (ПР% < 5,00%);
- Относительно невысокая продолжительность анализа (15-20 мин).

Все это позволяет проводить определение антибиотиков группы тетрациклина в диапазоне концентраций 0,7-60,0 нг/мл в пищевых продуктах с помощью пьезоэлектрического иммуносенсора на основе самоорганизующихся монослоев тиолов.
35 Высокая селективность обеспечивается использованием групп-специфичных иммунореагентов - поликлональных антител к тетрациклинам (ПР% 87-95%) и соединениям родственного строения (ПР% < 5,00%). Многократное (более 30 раз) использование иммуносенсора после регенерации биорецепторного покрытия обеспечивает снижение затрат на осуществление анализа.

40 Способ осуществляется следующим образом:

Для создания иммуносенсора используется пьезоэлектрический массчувствительный резонатор АТ-среза с золотыми электродами диаметром 8 мм и собственной частотой колебаний (8-10 МГц) ± 1 Гц.

После тщательной очистки и обезжиривания ацетоном поверхность электрода
45 обрабатывают 10 мкл смеси 0,06% и 0,03%-ных растворов 11-меркаптоундеканола и 2-амино-5-меркапто-1,3,4-триазола, высушивают на воздухе и выдерживают 60 мин при 80°C. Затем наносят 5 мкл 5% свежеприготовленного раствора глутарового альдегида, через 15-20 мин сенсор промывают бидистиллированной водой и закрепляют

5 мкл 0,05%-го раствора тетрациклин-белкового конъюгата, на поверхности резонатора происходит прочное закрепление биослоя. Сенсор выдерживают 10-12 часов при 4°С во влажной камере.

5 Перед началом первого измерения пьезоэлектрический иммуносенсор выдерживают в фосфатным буферным растворе (рН=7,2) в течение 30 мин до стабилизации сигнала сенсора. В пробу для определения антибиотика вводили фиксированное количество антител (100 мкл) и выдерживали в течение 2-3 минут до завершения образования гомогенного иммунного комплекса определяемого соединения тетрациклинового ряда с соответствующими групп-специфичными антителами. Затем пробу вводили в поток 10 раствора-носителя, и после попадания ее в ячейку детектирования, измеряли аналитический сигнал сенсора в результате взаимодействия несвязавшихся антител с тетрациклин-белковым конъюгатом на поверхности электродов сенсора.

15 После измерения аналитического сигнала сенсора осуществляли разрушение образовавшегося иммунокомплекса и регенерацию биослоя. Частота колебаний сенсора при этом возвращается к исходному значению. После предварительной проподготовки, описанной выше, определяли концентрацию тетрациклина в пробе по предварительно построенному градуировочному графику.

20 Для построения градуировочного графика к 50 мл анализируемого раствора с концентрацией тетрациклина 0,5; 0,7; 1,0; 10,0; 20,0; 30,0; 50,0; 60,0 нг/мл прибавляют раствор антител, соответствующий 50%-ному связыванию, смесь доводят фосфатным буферным раствором до 1 мл и выдерживают до завершения реакции.

Значение аналитического сигнала обратно пропорционально содержанию аналита в пробе.

25 Градуировочный график для определения тетрациклинов линеен в диапазоне концентраций 0,7-60,0 нг/мл: $\Delta f = -17c + 1247$, где Δf - аналитический сигнал, Гц; c - концентрация тетрациклина в пробе, нг/мл.

30 Пример 1. Пробу, содержащую раствор тетрациклина с концентрацией 0,5 нг/мл, объемом 200 мкл вводили в ячейку в фосфатном буферном растворе (рН=7,1-7,2) и регистрировали изменение аналитического сигнала, в результате образования комплекса. Предварительно к пробе добавляли фиксированное количество антител к группе тетрациклиновых антибиотиков и выдержали в течение 3 минут до образования иммунокомплекса. Аналитический отклик сенсора обратно пропорционален содержанию тетрациклинов в растворе.

35 Регенерацию биочувствительного покрытия пьезоэлектрического сенсора осуществляли нанесением на поверхность раствора 0,1 М гидрохлорида диэтиламина. Определение концентрации тетрациклина осуществляли по градуировочному графику, построенному с применением стандартных образцов.

Аналитический сигнал $\Delta f = 1238,5$ Гц.

40 Пример 2. Пробу, содержащую раствор тетрациклина с концентрацией 0,7 нг/мл, объемом 200 мкл вводили в ячейку в фосфатном буферном растворе (рН=7,1-7,2) и регистрировали изменение аналитического сигнала, в результате образования комплекса. Предварительно к пробе добавляли фиксированное количество антител к группе тетрациклиновых антибиотиков и выдержали в течение 3 минут до образования иммунокомплекса. Аналитический отклик сенсора обратно пропорционален содержанию тетрациклинов в растворе.

45 Регенерацию биочувствительного покрытия пьезоэлектрического сенсора осуществляли нанесением на поверхность раствора 0,1 М гидрохлорида диэтиламина. Определение концентрации тетрациклина осуществляли по градуировочному графику,

построенному с применением стандартных образцов.

Аналитический сигнал $\Delta f=1235,1$ Гц.

5 Пример 3. Пробу, содержащую раствор тетрациклина с концентрацией 1,0 нг/мл, объемом 200 мкл вводили в ячейку в фосфатном буферном растворе ($pH=7,1-7,2$) и регистрировали изменение аналитического сигнала, в результате образования комплекса. Предварительно к пробе добавляли фиксированное количество антител к группе тетрациклиновых антибиотиков и выдержали в течение 3 минут до образования иммунокомплекса. Аналитический отклик сенсора обратно пропорционален содержанию тетрациклинов в растворе.

10 Регенерацию биочувствительного покрытия пьезокварцевого сенсора осуществляли нанесением на поверхность раствора 0,1 М гидрохлорида диэтиламина. Определение концентрации тетрациклина осуществляли по градуировочному графику, построенному с применением стандартных образцов.

Аналитический сигнал $\Delta f=1230,0$ Гц.

15 Пример 4. Пробу, содержащую раствор тетрациклина с концентрацией 10,0 нг/мл, объемом 200 мкл вводили в ячейку в фосфатном буферном растворе ($pH=7,1-7,2$) и регистрировали изменение аналитического сигнала, в результате образования комплекса. Предварительно к пробе добавляли фиксированное количество антител к группе тетрациклиновых антибиотиков и выдержали в течение 3 минут до образования

20 иммунокомплекса.

Аналитический отклик сенсора обратно пропорционален содержанию тетрациклинов в растворе.

Регенерацию биочувствительного покрытия пьезокварцевого сенсора осуществляли нанесением на поверхность раствора 0,1 М гидрохлорида диэтиламина. Определение

25 концентрации тетрациклина осуществляли по градуировочному графику, построенному с применением стандартных образцов.

Аналитический сигнал $\Delta f=1077$ Гц.

30 Пример 5. Пробу, содержащую раствор тетрациклина с концентрацией 20,0 нг/мл, объемом 200 мкл вводили в ячейку в фосфатном буферном растворе ($pH=7,1-7,2$) и регистрировали изменение аналитического сигнала, в результате образования комплекса. Предварительно к пробе добавляли фиксированное количество антител к группе тетрациклиновых антибиотиков и выдержали в течение 3 минут до образования иммунокомплекса. Аналитический отклик сенсора обратно пропорционален содержанию тетрациклинов в растворе.

35 Регенерацию биочувствительного покрытия пьезокварцевого сенсора осуществляли нанесением на поверхность раствора 0,1 М гидрохлорида диэтиламина. Определение концентрации тетрациклина осуществляли по градуировочному графику, построенному с применением стандартных образцов.

Аналитический сигнал $\Delta f=907$ Гц.

40 Пример 6. Пробу, содержащую раствор тетрациклина с концентрацией 30,0 нг/мл, объемом 200 мкл вводили в ячейку в фосфатном буферном растворе ($pH=7,1-7,2$) и регистрировали изменение аналитического сигнала, в результате образования комплекса. Предварительно к пробе добавляли фиксированное количество антител к группе тетрациклиновых антибиотиков и выдержали в течение 3 минут до образования

45 иммунокомплекса. Аналитический отклик сенсора обратно пропорционален содержанию тетрациклинов в растворе.

Регенерацию биочувствительного покрытия пьезокварцевого сенсора осуществляли нанесением на поверхность раствора 0,1 М гидрохлорида диэтиламина. Определение

концентрации тетрациклина осуществляли по градуировочному графику, построенному с применением стандартных образцов.

Аналитический сигнал $\Delta f=737$ Гц.

5 Пример 7. Пробу, содержащую раствор тетрациклина с концентрацией 50,0 нг/мл, объемом 200 мкл вводили в ячейку в фосфатном буферном растворе (рН=7,1-7,2) и регистрировали изменение аналитического сигнала, в

результате образования комплекса. Предварительно к пробе добавляли фиксированное количество антител к группе тетрациклиновых антибиотиков и выдержали в течение 3 минут до образования иммунокомплекса. Аналитический отклик
10 сенсора обратно пропорционален содержанию тетрациклинов в растворе.

Регенерацию биочувствительного покрытия пьезокварцевого сенсора осуществляли нанесением на поверхность раствора 0,1 М гидрохлорида диэтиламина. Определение концентрации тетрациклина осуществляли по градуировочному графику, построенному с применением стандартных образцов.

15 Аналитический сигнал $\Delta f=397$ Гц.

Пример 8. Пробу, содержащую раствор тетрациклина с концентрацией 60,0 нг/мл, объемом 200 мкл вводили в ячейку в фосфатном буферном растворе (рН=7,1-7,2) и регистрировали изменение аналитического сигнала, в результате образования комплекса. Предварительно к пробе добавляли фиксированное количество антител к группе
20 тетрациклиновых антибиотиков и выдержали в течение 3 минут до образования иммунокомплекса. Аналитический отклик сенсора обратно пропорционален содержанию тетрациклинов в растворе.

Регенерацию биочувствительного покрытия пьезокварцевого сенсора осуществляли нанесением на поверхность раствора 0,1 М гидрохлорида диэтиламина. Определение
25 концентрации тетрациклина осуществляли по градуировочному графику, построенному с применением стандартных образцов.

Аналитический сигнал $\Delta f=227$ Гц.

Данный способ позволяет существенно увеличить чувствительность определения тетрациклинов в пищевых продуктах, а также обеспечивает многократное использование
30 иммуносенсора после регенерации биорецепторного покрытия, что снижает затраты на осуществление анализа.

Сравнительная характеристика известного и предлагаемого способа определения тетрациклинов приведена в таблице.

35

40

45

Сравнительная характеристика известного и предлагаемого способа
детектирования тетрациклинов

Показатели	Известный способ	Предлагаемый способ
Диапазон определяемых содержаний тетрациклина	10,0-70,0 нг/мл	0,7-60,0 нг/мл
Предел обнаружения тетрациклина	8,9 нг/мл	0,21 нг/мл
Вид антител	Поликлональные к тетрациклину	Поликлональные к тетрациклину
Применение дополнительных меток	Требуется	Не требуется
Вид анализа	Конкурентный	Конкурентный
Регенерация иммунореагентов	Отсутствует	После каждого цикла измерения
Продолжительность измерения аналитического сигнала, мин	1 ч	15-20 мин
Кратность использования иммунореагентов	1	30
Суммарное определение группы тетрациклиновых антибиотиков	Возможно (60-81%)	Возможно (80-105%)

(57) Формула изобретения

Способ суммарного определения антибиотиков тетрациклинового ряда с помощью пьезоэлектрического иммуносенсора, отличающийся тем, что на поверхности сенсора нанесена подложка на основе самоорганизующихся монослоев тиолов 11-меркаптоундеканола и 2-амино-5-меркапто-1,3,4-триазола, на которую иммобилизуют тетрациклин-белковый конъюгат, к пробе добавляют фиксированное количество поликлональных антител к тетрациклинам и выдерживают в течение 2-3 мин до образования иммунокомплекса, вводят в ячейку для детектирования в фосфатном буферном растворе с pH 7,1-7,2 и регистрируют изменение частоты колебания сенсора

в результате взаимодействия несвязавшихся антител с тетрациклин-белковым конъюгатом на поверхности электродов сенсора, аналитический сигнал обратно пропорционален суммарной концентрации тетрациклинов в анализируемой пробе, концентрацию определяют по градуировочному графику, регенерацию рецепторного
5 покрытия осуществляют нанесением на поверхность 0,1 М раствор гидрохлорида диэтиламина.

10

15

20

25

30

35

40

45