

ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЙ ИММУНОСЕНСОР С МЕДНОЙ МЕТКОЙ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАРБАРИЛА

А.С. Гашевская, Е.В. Дорожко, Е.И. Короткова

Анна Сергеевна Гашевская *, Елена Владимировна Дорожко, Елена Ивановна Короткова

Отделение химической инженерии Инженерной школы природных ресурсов, Национальный исследовательский Томский политехнический университет, пр. Ленина 30, Томск, Российская Федерация, 634050
E-mail: asg30@tpu.ru *, elena-dorozhko@yandex.ru, eikor@mail.ru

В работе был впервые синтезирован и исследован гаптен-белковый конъюгат с наночастицами меди, стабилизированными хитозаном для определения карбарила в различных объектах исследования. Наночастицы меди, стабилизированные хитозаном, синтезированные «зеленым» способом, использовались в качестве электрохимических меток в прямом твердофазном конкурентном анализе остатков карбарила в муке некоторых зерновых культур. Охарактеризованы наночастицы меди, стабилизированные хитозаном, и гаптен-белковый конъюгат с наночастицами меди, стабилизированными хитозаном методами УФ/ВИД-спектроскопии, просвечивающей электронной микроскопии и методом динамического рассеяния света. Для формирования распознающего рецепторного слоя моноклональных антител против карбарила на поверхности золотографитового электрода, в качестве ковалентных кросс-линкеров использовались 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодии-мид гидрохлорид /дициклогексилкарбодиимид, 1-гидрокси-2,5-пирролидиндион. При подборе условий электрохимического иммуносенсора для определения карбарила в муке некоторых зерновых культур подобраны разбавления моноклональных антител против карбарила и гаптен-белкового конъюгата с наночастицами меди, стабилизированными хитозаном против карбарила. Оценено влияние этилового спирта на работоспособность электрохимического иммуносенсора для определения карбарила в муке некоторых зерновых культур. Специфичность разработанного электрохимического иммуносенсора исследовали путем тестирования родственных по структуре соединений карбарила, результаты не превышали 7%. Разработанный электрохимический иммуносенсор позволяет сократить время проведения анализа определения карбарила по сравнению с традиционными иммуноферментными тест-системами. Новый электрохимический иммуносенсор может быть использован для высокочувствительного и экспрессного определения остатков карбарила в муке некоторых зерновых культур с пределом обнаружения 0,08 мкг/кг и диапазоном определяемых содержаний от 0,8 до 32,3 мкг/кг.

Ключевые слова: карбарил, наночастицы меди, гаптен-белковый конъюгат, электрохимический иммуносенсор, инверсионная вольтамперометрия

COPPER-LABELED VOLTAMMETRIC IMMUNOSENSOR FOR CARBARYL DETECTION

A.S. Gashevskaya, E.V. Dorozhko, E.I. Korotkova

Anna S. Gashevskaya *, Elena V. Dorozhko, Elena I. Korotkova

Division of Chemical Engineering of the School of Earth Sciences & Engineering, Tomsk Polytechnic University, Lenin ave. 30, Tomsk, 634050, Russia
E-mail: asg30@tpu.ru *, elena-dorozhko@yandex.ru, eikor@mail.ru

A hapten-protein conjugate for determining carbaryl using copper nanoparticles was first synthesized in the present work. The copper nanoparticles were used as electrochemical labels in the direct solid-phase competitive analysis of carbaryl residues in flour from some crops. Copper

nanoparticles stabilized by chitosan and a hapten-protein conjugate with copper nanoparticles stabilized by chitosan by UV/VIS - spectroscopy, transmission electron microscopy, and dynamic light scattering are characterized. To form a recognition receptor layer of monoclonal antibodies against the carbaryl on the surface of a gold-graphite electrode, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride, dicyclohexylcarbodiimide and 1-hydroxy-2,5-pyrrolidinedione were found to be the best covalent cross-linkers. When selection the electrochemical immunosensor conditions, working dilutions of the antibodies and the hapten-protein conjugate with copper nanoparticles copper nanoparticles stabilized by chitosan were selected to detect the carbaryl. The effect of ethyl alcohol on the performance of the electrochemical immunosensor for the determination of carbaryl was evaluated. The specificity of the developed electrochemical immunosensor was investigated by testing structurally related carbaryl compounds; the results did not exceed 7%. The electrochemical immunosensor can be used for highly sensitive determination of carbaryl residues in flour samples with a detection limit of 0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}$ within a range of detectable contents of 0.8-32.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Key words: carbaryl, copper nanoparticles, hapten-protein conjugate for carbaryl determination, electrochemical immunosensor, inversion voltammetry

Для цитирования:

Гашевская А.С., Дорожко Е.В., Короткова Е.И. Вольтамперометрический иммуносенсор с медной меткой для определения карбарила. *Изв. вузов. Химия и хим. технология*. 2021. Т. 64. Вып. 2. С. 26–33

For citation:

Gashevskaya A.S., Dorozhko E.V., Korotkova E.I. Copper-labeled voltammetric immunosensor for carbaryl detection. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol. [ChemChemTech]*. 2021. V. 64. N 2. P. 26–33

ВВЕДЕНИЕ

Карбарил (1-нафтил метилкарбамат, севин) является активным ингредиентом многих коммерческих составов пестицидов, широко используемых для борьбы с вредителями при выращивании зерновых культур [1]. Однако, остатки карбарила в пищевых продуктах, воде и окружающей среде представляют серьезную угрозу для здоровья человека из-за высокого токсичного действия на ацетилхолинэстеразу (АХЭ), которая необходима для центральной нервной системы [2, 3].

Мониторинг остатков карбарила регулируется государственной властью во многих странах [4]. Таким образом, чувствительное обнаружение остатков карбарила в продуктах питания и в объектах окружающей среды имеет большое значение.

Для обнаружения карбарила в продуктах питания, напитках и воде используют такие методы, как газовая хроматография (ГХ) [5], высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [6-7], спектрофотометрия [8], флуориметрия [9], вольтамперометрия [10-11].

Альтернативой хроматографическим методам определения карбарила выступают иммунохимические, характеризующиеся относительной простотой выполнения и высокой селективностью. Среди иммунохимических методов следует выделить иммуноферментные методы анализа [12], а также метод поляризационного флуоресцентного иммуноанализа [13-17]. Карбарил, как большинство пестицидов, является моновалентным антиге-

ном, поэтому его детектируют, в основном, посредством конкурентных прямых схем иммуноферментного анализа с иммобилизованными на твердом носителе антителами против карбарила и пестицидом, меченным ферментом.

Несмотря на популярность иммуноферментных тест-систем для определения карбарила, они имеют ряд недостатков: сложность выделения и очистки фермента, стабильность фермента в отношении ряда физико-химических и биологических факторов, значительную потерю активности фермента в процессе их ковалентного связывания, влияние на результаты анализа наличия в исследуемом образце ферментных ингибиторов. Эти недостатки обуславливают высокую стоимость, недостаточную стабильность иммуноферментных тест-систем для определения карбарила и в основном связаны с биологическим характером маркера.

В данной работе предложено заменить ферментную метку на гаптен-белковый конъюгат карбарила с наночастицами меди (НЧ Cu), в связи с высокой стабильностью металла по сравнению с ферментом, дешевизной, биосовместимостью с антителами, иммобилизованными на твердой поверхности электрода, а также возможностью регистрации чувствительного электрохимического сигнала от медной метки НЧ в формате твердофазного конкурентного прямого анализа карбарила. При разработке электрохимического иммуносенсора особое внимание уделялось подбору условий синтеза гаптен-белкового конъюгата (*Hap-Car-BCA@HЧCu*). Новый электрохимический иммуносенсор был

апробирован для определения карбарила в муке некоторых зерновых культурах (пшеница, кукуруза и овес).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и материалы

Стандарт карбарила (ОСЧ), бычий сывороточный альбумин (ОСЧ), хитозан (ОСЧ), глутаровый альдегид (ОСЧ), цистамин (ОСЧ), тиогликолевая кислота (ОСЧ), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид гидрохлорид (EDC) (ОСЧ), дициклогексилкарбодиимид (DCC) (ОСЧ), 1-гидрокси-2,5-пирролидиндион (NHS) (ОСЧ), 96% – этиловый спирт-(C₂H₅OH) (ОСЧ) – все перечисленные вещества производства Sigma-Aldrich (США). Ацетат меди (CH₃COO)₂Cu ГОСТ 5852-79 (ХЧ), уксусная кислота (CH₃COOH) ГОСТ Р 55982-2014 (ХЧ), натрий фосфорноватистокислый 1-водный (NaH₂PO₂·H₂O) ГОСТ 200-76 (ХЧ), аскорбиновая кислота (C₆H₈O₆) ГОСТ Р 55517-2013 (ХЧ), гидроксид натрия (NaOH) ГОСТ 4328-77 (ХЧ) – все перечисленные вещества произведены в Российской Федерации.

Моноклональные антитела против карбарила (MAb anti-CNH 1В7) и гаптен карбарила, содержащий карбоксильную группу (Car 6С), приобретены в научно-исследовательском институте масличных культур Китайской сельскохозяйственной академии (г. Ухань, Китай) [14].

Синтез НЧ Cu и конъюгата *Nap-Car-BCSA@HЧCu*

Первоначально были синтезированы НЧ Cu, стабилизированные хитозаном, в соответствии с методикой [18].

После синтеза НЧ Cu для увеличения времени стабильности было изменено рН раствора с 2,0 на слабощелочную рН 7,2 при введении по каплям раствора 0,1 моль/дм³ NaOH с последующим центрифугированием при 0 °С в течение 20 мин. После центрифугирования осадок НЧ меди ресуспендировали в фосфатном буферном растворе (ФБР) с рН 7,0 объемом 1,0 см³.

Конъюгат *Nap-Car-BCSA@HЧCu* синтезировали карбодиимидным методом. Для этого к 500 мкл 10 ммоль пестицидного производного Car 6С в диметилформамиде было добавлено по 100 мкл дициклогексилкарбодиимида (DCC) (20 ммоль) и 1-гидрокси-2,5-пирролидиндиона (NHS) (20 ммоль); смесь инкубировали в течение 12 ч при перемеши-

вании. После инкубации к активированному соединению добавили 1,0 см³ 0,6% раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 1 см³ раствора НЧ Cu. Продолжали инкубацию при комнатной температуре в течение 3 ч при постоянном перемешивании на высокоскоростном термешейкере (BioShake IQ, Германия), скорость перемешивания 600 об/мин.

Очистку конъюгата *Nap-Car-BCSA@HЧCu* от несвязанных компонентов осуществляли методом центрифугирования при скорости 25000 об/мин и температуре +4 °С, 30 мин. Надосадочную жидкость отделяли, осадок ресуспендировали в 1 см³ ФБР рН 7,0. Конъюгат *Nap-Car-BCSA@HЧCu* помещали для хранения в холодильник при температуре +4 °С.

Изготовление электрохимического иммуносенсора для определения карбарила

Электрохимический иммуносенсор для определения карбарила работал в формате прямого твердофазного конкурентного анализа по рис. 1.

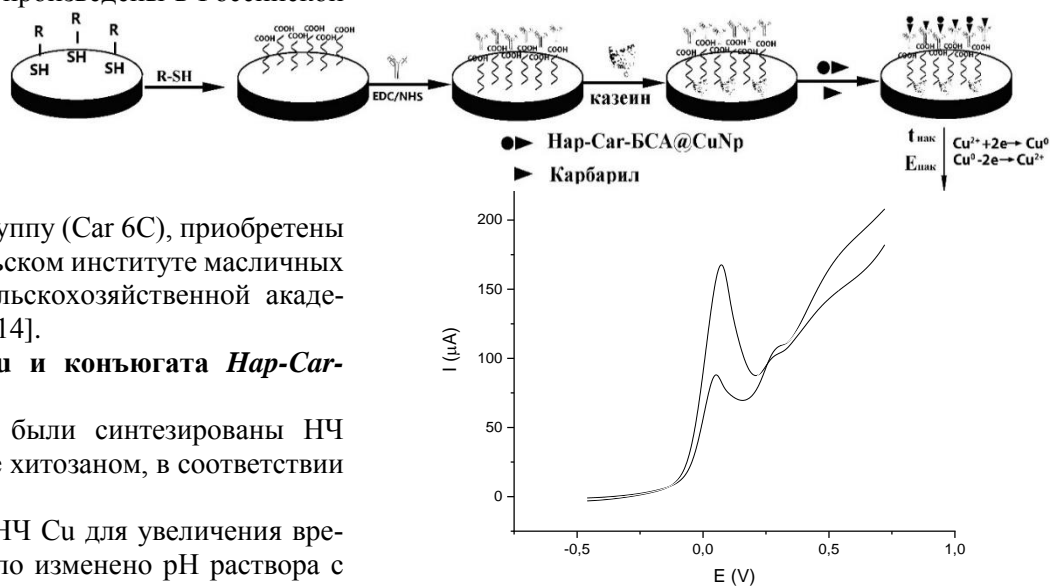


Рис. 1. Схема электрохимического иммуносенсора для определения карбарила

Fig. 1. An outline of the electrochemical sensor to determine the carbaryl

На первой стадии разработки электрохимического иммуносенсора осуществляли модификацию ЗГЭ захватывающими антителами. Для формирования распознающего рецепторного слоя моноклональных антител против карбарила на поверхности ЗГЭ применяли метод химической сорбции с использованием различных ковалентных кросс-линкеров. Кросс-сшивку антител осуществляли гомо- (способ 1) и гетеробифункциональными (способ 2) реагентами.

Способ 1. В качестве гомофункционального кросс-линкера использовали глутаровый альдегид (ГА). ЗГЭ тиолировали $1,0 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³ раствором цистамина дигидрохлорида в течение 8 ч, ополаскивали и опускали в раствор ГА $1,0 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³ рН 8,0 на 40 мин. Далее на поверхность электрода наносили раствор антител 200 мкл в разведении (18/45), инкубацию проводили в течение 60 мин при 22 °С. Электрод ополаскивали и блокировали 1% раствором казеина в течение 40 мин. После каждого этапа электрод трехкратно ополаскивали раствором ФБР рН 7,0.

Способ 2. В качестве гетеробифункциональных кросс-линкеров использовали EDC/NHS. ЗГЭ тиолировали $1,0 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³ раствором тиогликолевой кислотой в течение 8 ч. Модифицированный электрод сушили в аргоне и активировали в ФБР (рН 7,0), содержащем 0,002 моль/дм³ EDC и 0,005 моль/дм³ NHS в течение 2 ч при 22 °С. Затем электрод промывали тем же раствором ФБР и сразу же наносили по каплям раствор антител 200 мкл в разведении (18/45) на 60 мин при 22 °С. Электрод трехкратно ополаскивали раствором ФБР рН 7,0.

После иммобилизации захватывающих антител на поверхность иммуносенсора раскапывали конъюгат *Hap-Car-BSA@CuNP* без аналита. Инкубирование проводили в течение 60 мин при 22 °С. После инкубирования электрод трижды ополаскивали ФБР и помещали в электрохимическую ячейку, регистрировали максимальный сигнал окисления медной метки конъюгата (I_{\max}). Для проведения конкурентного анализа карбарила осуществляли смешивание 20 мкл конъюгата *Hap-Car-BSA@CuNP* и 20 мкл стандартного раствора карбарила в рабочем разведении. Смесь наносили на поверхность сенсоров и проводили инкубирование в течение 60 мин при 22 °С. После инкубирования электрод трижды ополаскивали ФБР и помещали в электрохимическую ячейку и регистрировали сигнал окисления медной метки конъюгатов в присутствии конкурента – карбарила (I_s).

При оптимальных условиях градуировочная зависимость была построена путем построения средних значений степени ингибирования (%) сигнала окисления меди конъюгата для пяти повторений в зависимости от логарифма концентраций карбарила. Степень ингибирования рассчитывали:

$$\text{Inhibition} = \frac{(I_{\max} - I_{\min}) - (I_s - I_{\min})}{(I_{\max} - I_{\min})} \times 100\% \quad (1)$$

I_{\max} – интенсивность тока окисления меди конъюгата *Hap-Car-BSA@CuNP* в отсутствие карбарила; I_{\min} – ток окисления меди конъюгата *Hap-*

Car-BSA@CuNP без антител на поверхности электрода; I_s – интенсивность тока окисления меди конъюгата *Hap-Car-BSA@CuNP* в присутствии карбарила.

Электрохимические измерения

Все электрохимические измерения проводили на вольтамперометрическом анализаторе TA-Lab (производство НПП «Томьаналит», г. Томск). В качестве рабочего электрода использовался графитовый дисковый электрод (геометрической площадью $S = 112 \text{ мм}^2$), импрегнированный парафином. На поверхность графитового электрода наносилась пленка золота из раствора $1000 \text{ мг/дм}^3 \text{ HAuCl}_4$ методом анодной вольтамперометрии в диапазоне потенциалов от -0,1 В до +0,05 В при скорости развертки потенциала $v = 5 \text{ мВ/с}$.

Регистрацию электрохимического сигнала окисления меди конъюгата *Hap-Car-BSA@CuNP* осуществляли в режиме инверсионной анодной вольтамперометрии в диапазоне потенциалов -0,2 В до +0,65 В при скорости развертки 70 мВ/с ($v = 70 \text{ мВ/с}$). Потенциал накопления составил ($E_{\text{накоп.}}$) -1,2 В, время накопления ($t_{\text{накоп.}}$) 60 с. $\text{Ag}|\text{AgCl}$ (1М КСl) использовали как электрод сравнения, и платиновый электрод в качестве вспомогательного электрода. В качестве фонового электролита использовалась 0,2 моль/дм³ муравьиная кислота. Регенерацию поверхности электрода осуществляли механическим способом с использованием фильтровальной бумаги.

Пробоподготовка зерновых культур

Для апробации нового электрохимического иммуносенсора проведено определение карбарила в муке некоторых зерновых культурах – пшеница («Экофермер», производитель: г. Краснодар, Россия), овес в оболочке («Образ жизни» производитель г. Барнаул, Россия) и кукуруза (Regmarkets, производитель г. Москва, Россия). Зерно измельчали в гомогенизаторе. Навески образцов муки по 10 г заливали $200,0 \text{ см}^3$ 96%-ым этиловым спиртом и оставляли на ночь под вытяжным шкафом при постоянном перемешивании. Полученную массу фильтровали, фильтрат оставляли в вытяжном шкафу до полного испарения спирта. К сухому остатку приливали 96 %-го этилового спирта и воду, очищенную до концентрации спирта 10%.

Образцы муки искусственно контаминировали карбарилом в необходимых концентрациях. Предварительно образцы муки тестировали на отсутствие карбарила методом ВЭЖХ [6-7]. Процедуру экстрагирования карбарила проводили по одной методике, которая описана выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика НЧ меди и конъюгатов *Hap-Car-BSA@CuNP*

Синтезированные НЧ Cu и конъюгат *Hap-Car-BSA@CuNP* для электрохимического иммуноанализа карбарила были охарактеризованы методами УФ/ВИД-спектроскопии, ПЭМ и ДРС.

УФ/ВИД спектры НЧ Cu и конъюгата *Hap-Car-BSA@CuNP* были записаны в диапазоне длин волн 500-650 нм. Максимум поглощения при 578 ± 2 нм наблюдали из-за поверхностных плазмонных свойств НЧ Cu, в то время как более широкий максимум поглощения при 588 ± 2 нм, смещенный в более длинноволновую область по сравнению с пиком НЧ Cu, косвенно указывает на связывание НЧ Cu с гаптен-белковым конъюгатом карбарила.

Гидродинамический диаметр НЧ Cu, стабилизированных хитозаном, соответствует значениям 410 ± 10 нм. Однако, средний размер НЧ Cu, согласно изображению ПЭМ, имеют размер 5 ± 2 нм. Полученные данные свидетельствуют об образовании коллоидных систем, представляющих собой крупные частицы хитозана, на поверхности которого равномерно распределены более мелкие НЧ Cu. Наблюдалось увеличение гидродинамического диаметра конъюгата *Hap-Car-BSA@CuNP* до 750 ± 10 нм, что подтверждает связывание НЧ Cu с гаптен-белковым конъюгатом карбарила. На основании полученных данных видно, что после синтеза и очистки конъюгата *Hap-Car-BSA@CuNP* в его состав включен БСА. БСА имеет белый контраст, тогда как НЧ Cu имеют темный цветовой контраст.

Подбор условий электрохимического иммуносенсора для определения карбарила

В работе предложено 2 способа иммобилизации антител на поверхности ЗГЭ с использованием ковалентных кросс-линкеров, которые позволяют увеличить чувствительность иммуносенсора и сохранить рецепторный слой антител после многократного ополаскивания [21, 22]. Для улучшения чувствительности электрохимического иммуносенсора определения карбарила были изучены условия формирования распознающего слоя моноклональных антител на поверхности электрода с использованием различных способов ковалентной модификации (способы 1 и 2). Предварительно экспериментальным путем выбрано рабочее разбавление антител к карбарилу, используемых в прямом конкурентном формате анализа (рис. 2).

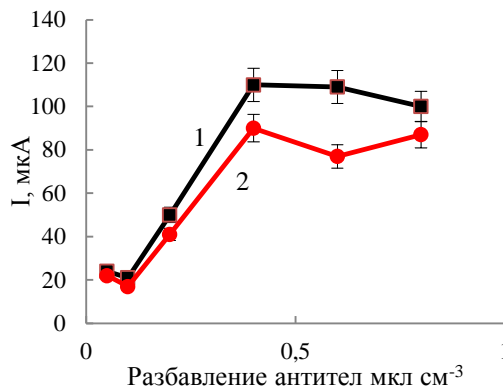


Рис. 2. Разбавление антител, иммобилизованных на поверхности ЗГЭ различными способами в прямом твердофазном конкурентном анализе карбарила
Fig. 2. Dilution of the antibodies immobilized on the GGE surface using various methods of the carbaryl direct solid-phase competitive analysis

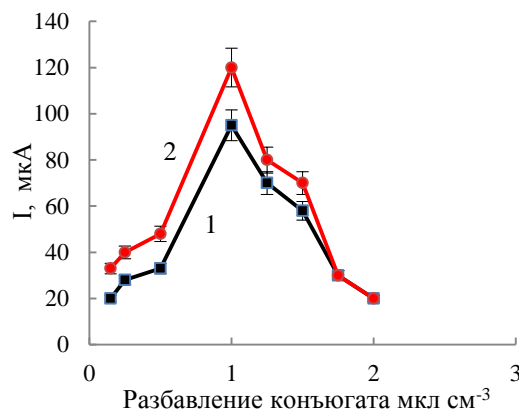


Рис. 3 Разбавление концентрации конъюгата *Hap-Car-BSA@CuNP* в прямом твердофазном конкурентном анализе карбарила
Fig. 3 Dilution of the *Hap-Car-BSA@CuNP*s conjugate concentration in the carbaryl direct solid state competitive analysis of carbaryl

На рис. 2 представлены зависимости аналитического сигнала окисления меди конъюгата *Hap-Car-BSA@CuNP* (1 мкл/см³) от степени разбавления антител, иммобилизованных на поверхности ЗГЭ различными способами. Максимальному значению тока окисления конъюгата *Hap-Car-BSA@CuNP* соответствует степень разбавления антител 18/45 для методов 1 и 2. Однако, при использовании ковалентных кросс-линкеров EDC/NHS (метод 2) сигнал окисления меди конъюгата *Hap-Car-BSA@CuNP* значительно выше, чем в случае использования ГА (метод 1). Очевидно, что природа кросс-линкера и способ ковалентной «пришивки» антител к поверхности электрода при создании рецепторного слоя определяет их пространственную ориентацию, что влияет на чувствительность определения аналита [21-23].

Концентрацию конъюгата *Нар-Car-BSA@CuNP* устанавливали на основе зависимости аналитического сигнала окисления меди конъюгата от его концентрации в интервале 0,1-2,00 мкл/см³. Максимальные аналитические сигналы сенсора при применении раствора конъюгата соответствовали концентрациям 1,0 мкл/см³ для сенсора, сформированного по методу 1 и 2 (рис. 3).

Поскольку карбарил экстрагируют из муки некоторых зерновых культур спиртосодержащими растворителями, необходимо оценить влияние содержания этилового спирта (%) в экстрактах на работоспособность иммуносенсора для определения карбарила. Различные концентрации этилового спирта могут повлиять на активность распознающего слоя антител. IC₅₀, или концентрация полумаксимального ингибирования, — показатель эффективности лиганда-ингибитора при ингибирующем биохимическом или биологическом взаимодействии. IC₅₀ является количественным индикатором, который показывает, сколько нужно лиганда-ингибитора для ингибирования биологического процесса на 50%. IC₁₀ (предел обнаружения) является количественным индикатором, который показывает, сколько нужно лиганда-ингибитора для ингибирования биологического процесса на 10%.

Самое низкое значение IC₅₀ (3,75 мкг/кг) достигалось для ФБР pH 7,0, содержащего 10% этилового спирта.

Процентное содержание этилового спирта отображает зависимость концентрации IC₅₀ от электрохимической медной метки. Ингибирование достигает 50% (3,75 мкг/кг) при концентрации этилового спирта 10%. Концентрация этилового спирта выше 25% приводит к разрушению рецепторного слоя. Концентрация этилового спирта 10% не влияет на работоспособность сенсора и учитывалась при пробоподготовке зерновых культур и построении градуировочных растворов.

Градуировочная зависимость определения карбарила с использованием конъюгата *Нар-Car-BSA@HЧCu*

Для построения градуировочной зависимости степени ингибирования от логарифма концентрации карбарила была приготовлена серия растворов карбарила (0,05 мкг/л, 0,1 мкг/л, 0,5 мкг/л, 1,0 мкг/л, 2,5 мкг/л, 5,0 мкг/л, 7,5 мкг/л, 10,0 мкг/л, 20,0 мкг/л, 100,0 мкг/л, 500 мкг/л, 1000 мкг/л). Все растворы были приготовлены в соответствии с рабочими условиями электрохимического иммуноанализа: растворитель ФБР, содержащий 10% этилового спирта; к стандартным растворам карбарила добавляли 1 мкл/см³ раствора конъюгата *Нар-*

Car-BSA@HЧCu. На рис. 4 так же представлены вольтамперограммы окисления меди конъюгатов *Нар-Car-BSA@HЧCu* при разных концентрациях карбарила в растворе.

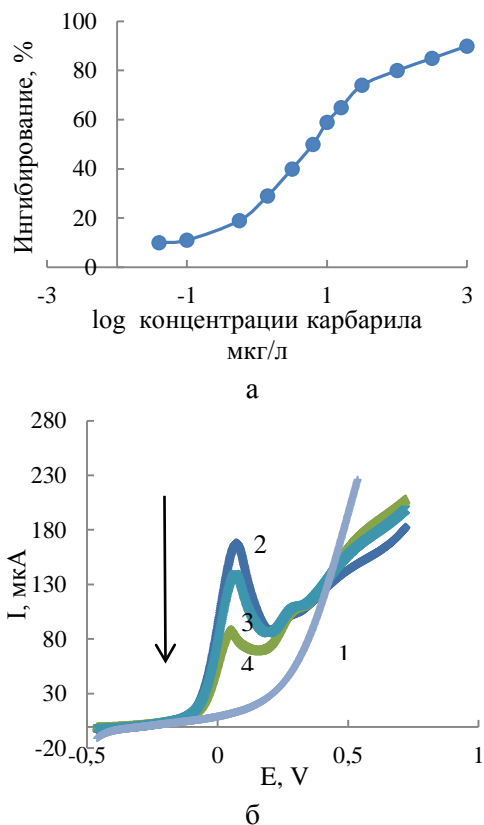


Рис. 4. (А) Градуировочная зависимость степени ингибирования сигнала окисления меди конъюгата *Нар-Car-BSA@HЧCu* от логарифма концентрации карбарила ($y=38,6+30,5 \cdot R^2=0,997$); (В) вольтамперограммы окисления меди конъюгата *Нар-Car-BSA@HЧCu* с увеличением концентрации карбарила в растворе; 1-фоновый электролит (HCOOH-0,2 M); 2-аналитический сигнал гаптен-белкового конъюгата; 3-концентрация карбарила 0,5 мкг/дм³; 4-концентрация карбарила 2 мкг/дм³

Fig. 4. (A) A calibration dependence of the degree of inhibition of the oxidation signal of the *Нар-Car-BSA@CuNPs* conjugate copper on the logarithm of the carbaryl concentration; and (B) Voltammograms of the oxidation of the conjugate copper when increasing the carbaryl concentration in solution; 1-background electrolyte (HCOOH-0.2 M); 2-analytical signal of the *Нар-Car-BSA@CuNPs*; 3-carbaryl concentration is 0.5 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$; 4- carbaryl concentration is 2.0 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$

Линейный диапазон концентраций карбарила, в котором наблюдалось ингибирование вольтамперометрического сигнала окисления меди конъюгата *Нар-Car-BSA@HЧCu* от 20 до 80%, составил 0,5-20,0 мкг/дм³. IC₅₀, который является важным критерием для оценки чувствительности иммуноанализа, составил 3,75 мкг/дм³. Предел обнаружения (IC₁₀) составил 0,05 мкг/дм³.

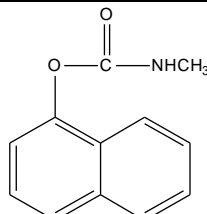
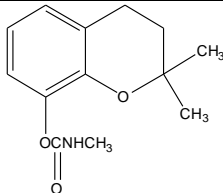
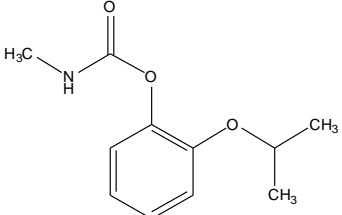
Специфичность определения карбарила

Специфичность разработанного электрохимического иммуносенсора оценивали путем тестирования карбофурана (Crf) и пропоксура (Prs) в отношении иммуносенсора. Значение CR рассчитывали по формуле $CR (\%) = (IC_{50} \text{ Car}) / (IC_{50} \text{ Crf, Prs}) \cdot 100\%$. Согласно данным из таблицы карбарил можно специфично определять в реальных образцах с помощью разработанного электрохимического иммуносенсора.

Таблица

Данные по перекрестному реагированию родственных по структуре соединений карбарила

Table. Cross-reaction data for structurally related carbaryl compounds

Соединение	Структурная формула	CR, %
Карбарил		100
Карбофуран		5,7
Пропоксур		2,4

Перекрестное определение не превышало 7%, то есть, моноклональные антитела распознают структуру нафтилкарбамата карбарила.

ВЫВОДЫ

В работе впервые синтезирован конъюгат с медной меткой *Nap-Car-BCA@HCSu*, который имеет преимущества перед ферментными конъюгатами в отношении большей дешевизны и стабильности. Разработанный электрохимический иммуносенсор позволяет сократить время проведения анализа карбарила на 30 мин по сравнению с традиционными ИФА тест-системами, т.к. не требуется дополнительных стадий введения субстратов и стоп-реагентов. Конъюгат и электрохимический иммуносенсор может быть использован в формате прямого твердофазного конкурентного анализа для

высококчувствительного определения остатков карбарила в муке некоторых зерновых культур с пределом обнаружения 0,08 мкг/кг и диапазоном определяемых содержаний от 0,8 до 32,3 мкг/кг. При исследовании специфичности электрохимического иммуносенсора показана отрицательная специфичность к другим пестицидам ($CR < 7\%$) со структурно родственными соединениями карбарила.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Aktar W., Sengupta D., Chowdhury A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplin. Toxicol.* 2009. V. 2. N 1. P. 1 – 12. DOI: 10.2478/v10102-009-0001-7.
2. Brown J. Handbook of Pesticide Toxicology. 2001. V. 1. P. 515-530. DOI: 10.1093/ae/37.4.244.
3. Sharma R.P. In: Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds. 2006. Academic Press Inc/Elsevier. P. 768. DOI: 10.1016/B978-0-12-088523-7.X5000-5.
4. Постановление главного государственного санитарного врача Российской Федерации «Об утверждении гигиенических нормативов ГН 1.2.3539-18 «Гигиенические нормативы содержания пестицидов в объектах окружающей среды (перечень)». Resolution of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation "On approval of hygienic standards GN 1.2.3539-18" Hygienic standards for the content of pesticides in environmental objects (list)".
5. Chowdhury A., Fakhruddin A., Islam N., Gan M., Khorshed S. Detection of the residues of nineteen pesticides in fresh vegetable samples using gas chromatography-mass spectrometry. *Food Control.* 2013. V. 34. P. 457-465. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.05.006.
6. Bogioli S., Curini R., Di Corcia A., Nazzari M., Tamburro D. A simple and Rapid Assay for Analyzing Residues of Carbamate Insecticides in Vegetables and Fruits: Hot Water Extraction Followed by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2004. V. 52. P. 665-671. DOI: 10.1021/jf035195j.
7. Shen F., Wang L., Zhou Q., Dai X., Xu Y. Simultaneous Determination of Aniline, Benzidine, Microcystins, and Carbaryl in Water Using Ultra-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Water Air Soil Pollut.* 2017. V. 228. N 69. P. 1-10. DOI: 10.1007/s11270-017-3260-5.
8. Murthy P., Sulochana M., Naidu N. A novel spectrophotometric method for the determination of Carbaryl in Environmental samples. *Der Pharmacia Sinica.* 2012. V. 3. N 2. P. 224-228.
9. Wang Y., Cui L., Wang S., Li Y. Study on the determination of multicomponent pesticide residual based on synchronous-derivative fluorimetry. *Spectrosc. Spectral Anal.* 2006. V. 26. N 11. P. 2085-2088.
10. Fischer J., Dejmekova H., Barek J. Electrochemistry of Pesticides and its Analytical Applications. *Curr. Org. Chem.* 2011. V. 15. P. 2923-2935. DOI: 10.2174/138527211798357146.
11. Codognoto, L., Tanimoto S., Pedrosa V., Machado S., Avaca L. Electroanalytical Determination of Carbaryl in Natural Waters on Boron Doped Diamond Electrode. *Electroanalysis.* 2006. V. 18. N 3. P. 253-258. DOI: 10.1002/elan.200503396.

12. **Hatefi-Mehrjardi A., Faiazi R.** Immobilization of Acetylcholinesterase and Cholineoxidase on Mercapto-Carboxylic Acid Self-Assembled Monolayer on the Gold Electrode. *Adv. Analyt. Chem.* 2015. V. 5. N 3A. P. 1-8. DOI: 10.5923/s.aac.201501.01.
13. **Dong T., Sun J., Liu B., Zhang Y., Song Y., Wang S.** Development of a sensitivity-improved immunoassay for the determination of carbaryl in food samples. *J. Sci. Food Agric.* 2010. V. 90. P. 1106–1112. DOI: 10.1002/jsfa.3917.
14. **Boroduleva A., Wu J., Yang Q., Li H., Zhang Q., Li P., Eremin S.** Development of fluorescence polarization immunoassays for parallel detection of pesticides carbaryl and triazophos in wheat grains. *Anal. Methods.* 2017. V. 9. P. 6814-6822. DOI: 10.1039/c7ay02091k.
15. **Sun J., Dong T., Zhang Y., Wang S.** Development of enzyme linked immunoassay for the simultaneous detection of carbaryl and metolcarb in different agricultural products. *Analyt. Chim. Acta.* 2010. V. 666. P. 76–82. DOI: 10.1016/j.aca.2010.03.051.
16. **Penalva J., Gabaldon J., Maquieira A., Puchades R.** Determination of Carbaryl in Vegetables Using an Immunosensor Working in Organic Media. *Food Agric. Immunol.* 2010. V. 12. N 2. P. 101-114. DOI: 10.1080/095401000404058.
17. **He J., Tao H., Wang K., Ding G., Li J., Li Q.X., Gee J.S., Hammock B.D., Xu T.** One-step immunoassay for the insecticide carbaryl using a chicken singlechain variable fragment (scFv) fused to alkaline phosphatase. *Analyt. Biochem.* 2019. V. 572. P. 9–15. DOI: 10.1016/j.ab.2019.02.022.
18. **Tokarek K.** Green Synthesis of Chitosan-Stabilized Copper Nanoparticles. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2013. P. 4940–4947. DOI: 10.1002/ejic.201300594.
19. **Hermanson G.** Bioconjugate Techniques. 2008. Part II. P. 215-334. DOI: 10.1016/B978-0-12-370501-3.00021-7.
20. **Егоров Н.С., Самуилов В.Д., Олескин А.В.** Биотехнология. Проблемы и перспективы. М.: Высш. шк. 1987. 197 с.
21. **Zhang C., Cui H., Han Y., Yu F., Shi X.** Development of a biomimetic enzyme-linked immunosorbent assay based on molecularly imprinted polymers on paper for the detection of carbaryl. *Food Chem.* 2018. V. 240. P. 893-897. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.07.109.
22. **Abad A., Montoya A.** Production of monoclonal antibodies for carbaryl from a hapten preserving the carbamate group. *J. Agric. Food Chem.* 1994. V. 42. I. 8. P. 1818-1823. DOI: 10.1021/jf00044a047.
23. **Буймова С.А., Бубнов А.Г., Царев Ю.В., Семенов А.О.** Оценка риска и ущерба здоровью населения при употреблении воды и продовольствия, содержащих химические загрязнения. *Изв. вузов. Химия и хим. технология.* 2019. V. 62. Вып. 6. С. 119-130. DOI: 10.6060/ivkkt.20196206.5816.
- Буимова С.А., Бубнов А.Г., Тсарев Ю.В., Семенов А.О.** Assessment of risk and damage to population health in the consumption of water and food containing chemical pollutions. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol. [ChemChemTech].* 2019. V. 62. N 6. P. 119-130. DOI: 10.6060/ivkkt.20196206.5816.

Поступила в редакцию 07.05.2020
 Принята к опубликованию 10.12.2020

Received 07.05.2020
 Accepted 10.12.2020