

**ТОМСКИЙ
ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ**



На правах рукописи

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Анна Сергеевна', is positioned to the right of the author's name.

Гашевская Анна Сергеевна

**ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАРБАРИЛА В ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУРАХ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОДИФИЦИРОВАННЫХ
ГРАФИТОВЫХ ЭЛЕКТРОДОВ**

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

1.4.2 – Аналитическая химия

Томск – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

Научный руководитель:

Дорожко Елена Владимировна

к.х.н., доцент отделения химической инженерии
Инженерной школы природных ресурсов
национального исследовательского Томского
политехнического университета

Официальные оппоненты:

Шилова Инесса Владимировна

д. фарм. н., старший научный сотрудник
фармацевтической группы лаборатории
фитофармакологии и специального питания,
Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук,
НИИ фармакологии и регенеративной медицины
им.Е.Д. Гольдберга

Зиятдинова Гузель Камилевна

д.х.н., доцент, профессор кафедры аналитической
химии химического института им. А.М.
Бутлерова Казанского федерального
университета

Защита состоится «09» февраля 2023 года в «14:00»

на заседании диссертационного совета ДС.ТПУ.08 при федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина 43 а., офис 225

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» и на сайте: dis.tpu.ru

Автореферат разослан «01» декабря 2022 года

Ученый секретарь ДС.ТПУ.08

Е. В. Дорожко

Общая характеристика работы

Пестициды (гербициды, фунгициды или инсектициды) являются загрязнителями окружающей среды, часто содержащимися в почве, воде, атмосфере и сельскохозяйственной продукции, и могут создавать экологическую угрозу.

Карбарил является одним из карбаматных пестицидов, который широко применяется как действующее вещество для производства протравителей семян и гранулированных препаратов, предназначенный для борьбы с почвенными вредителями. Воздействия на организм человека и животных карбарила основан на обратимом карбамилировании ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в нейрональных синапсах и нервно-мышечных соединениях, ингибирующим ферментативную активность, необходимую для гидролиза ацетилхолина. Следовательно, регулярное, даже незначительное поступление карбарила в живые организмы, повышает риск воздействия на их здоровье. Повышенное употребление карбарила может привести к нарушению эндокринной деятельности, репродуктивным, цитотоксическим и генотоксическим расстройствам. В связи с этим, крайне необходимо использовать современные аналитические методы обнаружения и количественного определения карбарила для контроля экологической безопасности и качества пищевых продуктов. Традиционные аналитические методы, такие как высокоэффективная жидкостная хроматография, газовая хроматография, флуориметрия, спектрофотометрия и капиллярный электрофорез применяются для определения карбарила в природных объектах. Перечисленные методы заслуживают особого исследовательского интереса, однако являются дорогостоящими, требуют сложного аппаратного обеспечения, что затрудняет их использование в рутинных анализах. Данная работа посвящена разработке новых вольтамперометрических способов определения карбарила в зерновых культурах, которые обладают такими преимуществами, как экспрессность, низкая себестоимость и мобильность. Разработана методика определения карбарила в

некоторых зерновых культурах методом вольтамперометрии на модифицированном углеродными чернилами графитовом электроде (ГЭ). Для определения следовых количеств карбарила в зерновых культурах разработан электрохимический иммуносенсор с использованием конъюгата с медной электрохимической меткой (НЧ Cu), как альтернативный способ иммуноферментному анализу (ИФА). Введение наночастиц меди (НЧ Cu) в состав конъюгата имеет перед ферментными метками ряд преимуществ такие, как простота, доступность материалов. Кроме того, связывание НЧ Cu с гаптен-белковыми производными карбарила осуществляется щадящим способом с минимальными потерями. Полученные конъюгаты с НЧ Cu стабильны в относительно широком диапазоне физико-химических условий, НЧ Cu в качестве маркера более доступны, чем ферменты.

Цель исследования: разработать новые вольтамперометрические способы определения карбарила в зерновых культурах с использованием модифицированных графитовых электродов (ГЭ).

Для достижения поставленной цели следует решить следующие задачи:

1. Исследовать электрохимические свойства карбарила на модифицированном углеродными чернилами ГЭ;
2. Разработать методику определения карбарила в зерновых культурах методом вольтамперометрии на модифицированном углеродными чернилами ГЭ. Провести оценку метрологических характеристик методики;
3. Разработать электрохимический иммуносенсор с медной меткой для количественного определения карбарила в модельных растворах;
4. Синтезировать и исследовать НЧ Cu и гаптен-белковый конъюгат (Нар-Car-БСА@НЧ Cu) на их основе;
5. Модифицировать графитовые электроды золотом и антителами против карбарила для создания рецепторного слоя электрохимического иммуносенсора;

6. Разработать алгоритм проведения электрохимического иммуноанализа карбарила в зерновых культурах;

7. Провести оценку основных метрологических характеристик разработанного электрохимического иммуносенсора для количественного определения карбарила в зерновых культурах.

Научная новизна.

1. Впервые исследован механизм окисления карбарила на модифицированном углеродными чернилами ГЭ методом вольтамперометрии. Показано, что карбарил окисляется на электроде необратимо, с образованием нафтола-1 и метиламина.

2. Впервые подобраны условия получения НЧ Си в присутствии аскорбиновой кислоты, стабилизированных хитозаном. Определены способы получения и исследованы электрохимические свойства гаптен-белкового конъюгата с медной меткой для дальнейшего определения карбарила.

3. Впервые найден способ гетеробифункционального кросс-сшивания специфических иммуноглобулинов против карбарила на золотографитовом электроде (ЗГЭ).

4. Впервые разработан алгоритм определения карбарила в зерновых культурах с использованием электрохимического иммуносенсора, отличающийся селективностью, точностью, надежностью и удобством применения.

Практическая значимость.

Разработаны новые вольтамперометрические способы определения карбарила в зерновых культурах. Показано, что разработанный электрохимический иммуносенсор сочетает высокую чувствительность, селективность, надежность и позволяет исключить использование токсичных реагентов, а также сократить время анализа по сравнению с традиционным методом ИФА.

Электрохимический иммуносенсор рекомендован к использованию для определения пестицидов карбаматной природы в аналитических лабораториях пищевой промышленности и контроля объектов окружающей среды.

Личный вклад автора состоял в обобщении, систематизации литературных данных по разработке вольтамперометрических способов определения карбарила в зерновых культурах, а также в проведении экспериментальных исследований и интерпретации полученных данных.

Положения, выносимые на защиту:

1. Вольтамперометрический способ определения карбарила на модифицированном углеродными чернилами ГЭ. Результаты определения карбарила на модифицированном углеродными чернилами ГЭ в зерновых культурах;
2. Алгоритм создания электрохимического иммуносенсора с медной меткой для определения карбарила;
3. Методика получения и результаты исследования физико-химическими методами НЧ Cu, гаптен-белкового конъюгата (Нар-Car-БСА@НЧ Cu);
4. Методики иммобилизации антител против карбарила на ЗГЭ;
5. Результаты определения карбарила в зерновых культурах с использованием разработанного электрохимического иммуносенсора.

Степень достоверности и апробация результатов работы. Достоверность полученных данных обусловлена представительным объемом проведенных экспериментов, использованием современных аналитических методов и результатами, которые хорошо согласуются с литературными данными.

Апробация результатов работы: Основные результаты диссертации докладывались и обсуждались на XVIII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулёва «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2017-2020 г); XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых

«Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 2018 г), II Всероссийской школы-конференции, посвященной 100-летию Иркутского государственного университета и 85-летию химического факультета ИГУ (Иркутск, 2018 г), XIX Всероссийском совещании с международным участием «Электрохимия органических соединений» (ЭХОС-2018), (Новочеркасск, 2018 г), XXVIII Российской молодежной научной конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения профессора В.А. Кузнецова «Проблемы теоретической и экспериментальной химии» (Екатеринбург, 2018 г).

Публикации: Результаты проведенных исследований отражены в 4 статьях научных журналов, индексируемые базами Web of Science и Scopus.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-53-26001 Чехия_а, Гос. Задаaniem «Наука». Проект FSWW-2020-0022.

Структура и объём работы: Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора (глава 1), экспериментальной части (глава 2), результатов и их обсуждения (глава 3), выводов, списка литературы (100 источника), 2-х приложений, 111 страниц, 38 рисунков, 32 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность исследования, обозначена цель работы, сформулированы задачи исследования, отражена научная и практическая значимость исследований.

В первой главе представлена классификация карбаматных пестицидов, описаны их физико-химические свойства, проведен анализ литературных данных по различным методам определения карбаматных пестицидов в природных объектах, в том числе карбарил. Основное внимание в главе уделено электрохимическим методам определения карбарила, используемым электродным

материалам и способам модификации электродных поверхностей. Показаны перспективы применения электрохимических биосенсоров для определения карбарила в продуктах питания.

Вторая глава посвящена описанию реактивов и оборудования, необходимых для проведения исследований по разработке вольтамперометрических способов определения карбарила. Представлена характеристика объектов исследования. Описаны методики приготовления растворов и модификаторов, пробоподготовки зерновых культур по извлечению карбарила, проведению экспериментальных вольтамперометрических измерений.

Третья глава посвящена вольтамперометрическим способам определения карбарила в зерновых культурах.

Вольтамперометрический способ определения карбарила на модифицированном углеродными чернилами ГЭ.

В работе представлен вольтамперометрический способ определения карбарила на модифицированном углеродными чернилами ГЭ.

Модификатор представлял дисперсию 0,09 г микрокристаллического графита в 0,5 см³ 1,2-дихлорэтана, содержащего и 0,01 г полистирола. 5 мкл полученной суспензии наносили на поверхность рабочего электрода и высушивали в течение 1 минуты.

Изучение морфологии поверхности ГЭ до и после модификации проводили при помощи сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (рис. 1). Согласно рис. 1 можно отметить, что после нанесения углеродных чернил на поверхность ГЭ происходит выравнивание поверхности. Кроме того, видны мелкие включения частиц аморфного углерода. Эффективность модификации оценивали с использованием стандартной окислительно-восстановительной пары $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$. Электрохимическую активную площадь ГЭ до и после модификации углеродными чернилами оценивали по уравнению Рэндлса-Шевчика: $I_p = \pm 2,69 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot C \cdot \nu^{1/2}$, где: I_p -ток пика, А; z -число электронов

($n=1$); A -площадь электроактивной поверхности, см^2 ; D - коэффициент диффузии ($7,60 \cdot 10^{-6} \text{см}^2/\text{с}$); C -концентрация $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ в растворе ($1,0 \cdot 10^{-4} \text{моль/дм}^3$). Электроактивная площадь электрода до модификации углеродными чернилами составила $0,013 \text{см}^2$, после $0,103 \text{см}^2$. Модификация ГЭ углеродными чернилами способствовала увеличению электроактивной площади поверхности ГЭ в 10 раз и повышению чувствительности определения карбарила (диапазон определяемых концентрации карбарила составил от 0,04 до 0,32 мкг/кг).

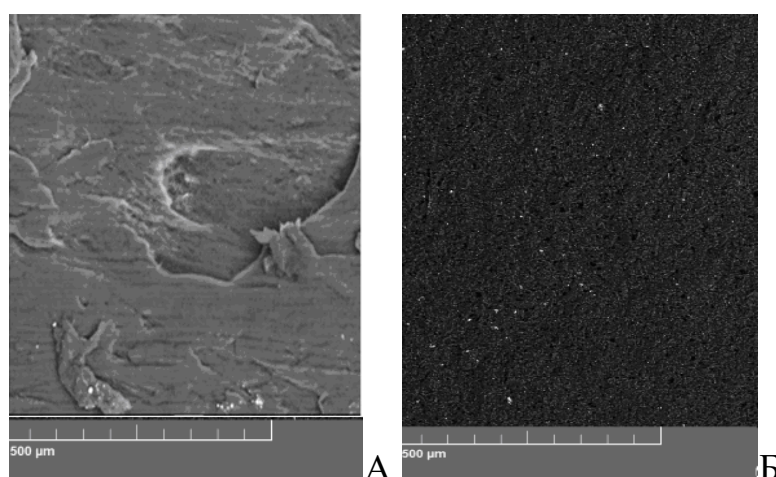


Рисунок 1. Сканирующая электронная микроскопия поверхности (СЭМ) ГЭ до (А) $S = 0,013 \text{см}^2$ и после модификации углеродными чернилами (Б) $S = 0,103 \text{см}^2$.

На рис. 2 представлены ЦВА карбарила на модифицированном углеродными чернилами ГЭ.

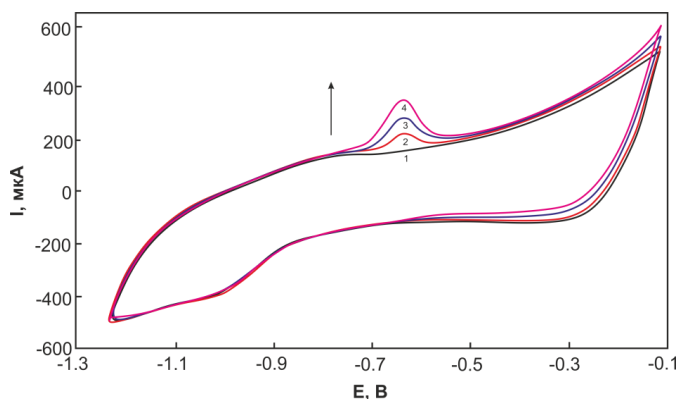


Рисунок 2. ЦВА карбарила на модифицированном углеродными чернилами ГЭ. 1–фоновый электролит $0,1 \text{моль/дм}^3$ спиртовой раствор (96%) NaClO_4 ; разные

добавки 96% спиртового раствора карбарила: 2– $0,4 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³; 3– $0,8 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³; 4– $1,2 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³; $v=70$ мВ/с.

Механизм электроокисления карбарила на модифицированном углеродными чернилами ГЭ.

Для установления механизма электроокисления карбарила на модифицированном углеродными чернилами ГЭ были построены зависимости тока (I , мкА) от $v^{1/2}$ в диапазоне скоростей развертки потенциала от 5 до 300 мВ/с (Рис.3).

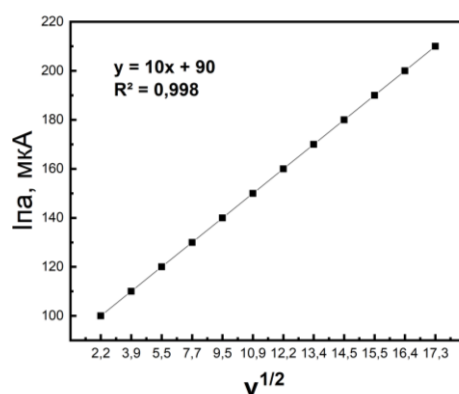


Рисунок 3. Зависимость интенсивности тока электроокисления карбарила ($0,4 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³) от $v^{1/2}$.

Линейная зависимость тока пика от $v^{1/2}$ характерна для обратимых и необратимых процессов (рис. 3). Однако на ЦВА (рис.2) наблюдался только пик окисления карбарила при -0,6 В и отсутствовал обратный пик его восстановления, что указывает на необратимость электродного процесса. Кроме того, для пика окисления соблюдалось условие равенства $|E_p - E_p/2| = 47,7/\beta n$, где β - эффективный коэффициент переноса анодного процесса ($\beta = 0,46$), n - число электронов ($n=1$).

Как известно, электрохимические реакции многих органических соединений могут быть осложнены процессами адсорбции на поверхности ГЭ. О наличии или отсутствии адсорбционного вклада в общий электрохимический процесс можно судить, изучив зависимость логарифма тока от логарифма

скорости развертки потенциала на модифицированном углеродными чернилами ГЭ (рис. 4).

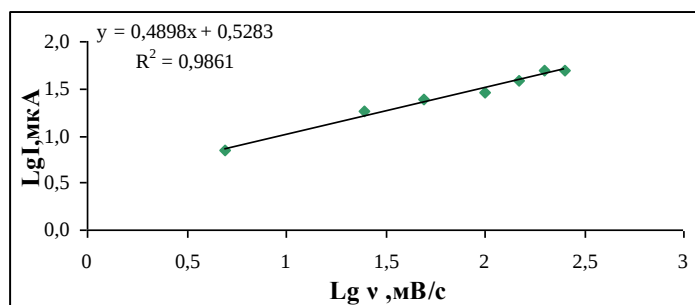


Рисунок 4. Зависимость логарифма тока окисления карбарила ($0,4 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³) от логарифма скорости развертки потенциала на модифицированном углеродными чернилами ГЭ.

По полученной зависимости был рассчитан критерий Семерано (тангенс угла наклона зависимости $\lg I$ от $\lg v$) равный 0,489, который свидетельствует о том, что в электрохимическом окислении карбарила на поверхности модифицированного углеродными чернилами ГЭ адсорбционная составляющая имеет минимальный вклад и не является лимитирующей стадией электродного процесса.

Предполагаемый механизм окисления карбарила с образованием нафтола-1 и метиламина на модифицированном углеродными чернилами ГЭ представлен на рисунке 5.

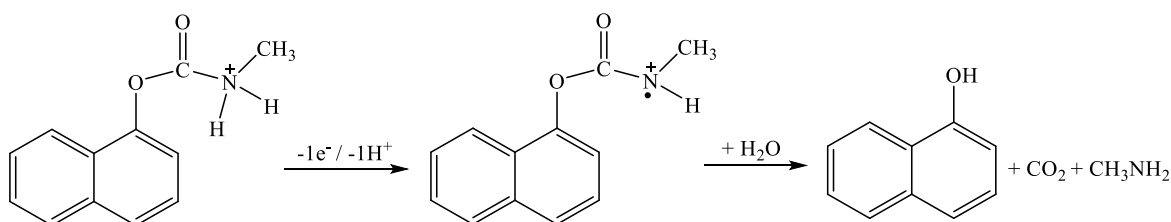


Рисунок 5. Механизм окисления карбарила на модифицированном углеродными чернилами ГЭ.

Все дальнейшие исследования электрохимических свойств карбарила осуществляли на модифицированном углеродными чернилами ГЭ с использованием анодной вольтамперометрии в режиме первой производной в

диапазоне потенциалов от -1,5 до +1,5 В при скорости развертки потенциала 70 мВ/с. (рис. 6).

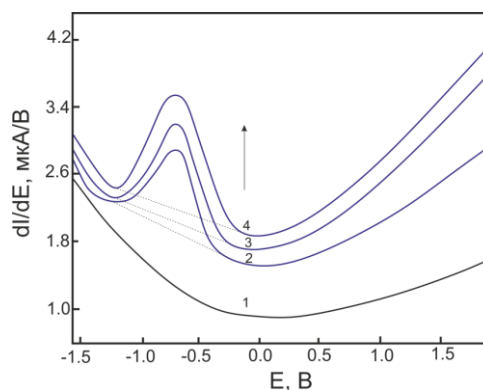


Рисунок 6. Анодные вольтамперограммы карбарила 1 – фоновая кривая спиртового раствора NaClO_4 0,1 моль/дм³, разные добавки 96% спиртового раствора карбарила: 2– $0,4 \cdot 10^{-7}$ моль/дм³ (0,08 мкг/кг), 3– $0,6 \cdot 10^{-7}$ моль/дм³ (0,12 мкг/кг); 4– $0,8 \cdot 10^{-7}$ моль/дм³ (0,16 мкг/кг). Рабочий электрод – модифицированный углеродными чернилами ГЭ; $\nu=70$ мВ/с.

Из рисунка 6 видно, что электрохимический сигнал окисления карбарила наблюдается при -0,6 В, при этом происходит увеличение его интенсивности от концентрации вводимого раствора. На рис. 7 представлена градуировочная зависимость карбарила в диапазоне концентраций от 0,04 до 0,32 мкг/кг на модифицированном углеродными чернилами ГЭ.

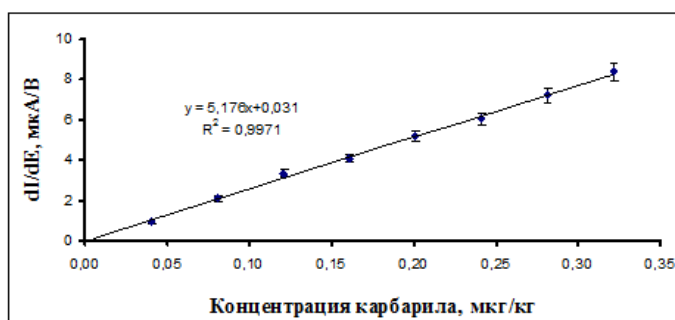


Рисунок 7. Градуировочная зависимость карбарила в диапазоне концентраций от 0,04 до 0,32 мкг/кг на модифицированном углеродными чернилами ГЭ.

Для извлечения карбарила из образцов зерновых культур проводили пробоподготовку согласно схеме, представленной на рис. 8.



Рисунок 8. Схема пробоподготовки зерновых культур для вольтамперометрического определения карбарила.

Количественное определение карбарила разработанным вольтамперометрическим способом проводили в смывах с ТСХ-пластины после разделения компонентов пробы. Определение карбарила в образцах кукурузы, овса и пшеницы предварительно проводили методом ВЭЖХ для установления точной концентрации. Затем исследуемые образцы искусственно контаминировали карбарилом на 3х уровнях концентраций. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты определения карбарила в образцах зерновых культур вольтамперометрическим способом ($n=3$, $p=0.95$)

Образец	Содержание карбарила		
	В пробе (ВЭЖХ) мкг/кг	Введено, мкг/кг	Найдено, мкг/кг
Кукуруза	$14,9 \cdot 10^{-4}$	0,040	$0,034 \pm 0,007$
		0,200	$0,189 \pm 0,038$
		0,320	$0,314 \pm 0,063$
Овес	$11,9 \cdot 10^{-5}$	0,040	$0,036 \pm 0,007$

Пшеница		0,200	0,183±0,037
		0,320	0,318±0,064
	23,3·10 ⁻³	0,040	0,034±0,007
		0,200	0,187±0,037
		0,320	0,312±0,062

Основные метрологические характеристики (в соответствии с РМГ 61-2010) вольтамперометрического способа определения карбарила на модифицированном углеродными чернилами ГЭ в зерновых культурах представлены в таблице 2.

Таблица 2

Метрологические характеристики вольтамперометрического способа определения карбарила на модифицированном углеродными чернилами ГЭ

Диапазон концентраций, мкг/кг	Показатель повторяемости, %	Показатель внутрилабораторной прецизионности, %	Показатель точности, %
0,04-0,32	8,0	16,0	20,0

Показатель точности для диапазона концентраций карбарила от 0,04 до 0,32 мкг/кг не превышал 20%. Данный способ без предварительного разделения пестицидов позволяет определить общую карбаматную загрязненность в зерновых культурах в пересчете на карбарил. Для селективного вольтамперометрического определения карбарила подбираются условия хроматографирования на ТСХ пластине, обеспечивающие разделение карбаматных пестицидов. Существенным преимуществом данной методики является легкость приготовления модификатора и простота его нанесения на поверхность ГЭ. Обновление поверхности ГЭ осуществляется механическим трением о фильтр «синяя лента» или срезанием тонкого слоя специальным резакон для углеродистых электродов (НПП «Томьяналит»).

Разработка электрохимического иммуносенсора для определения карбарила

В работе впервые разработан электрохимический иммуносенсор для определения карбарила без предварительного разделения в зерновых культурах, отличающийся селективностью, точностью, надежностью и удобством определения карбарила.

Работа электрохимического иммуносенсора основана на твердофазном конкурентном прямом определении карбарила по аналогии с ИФА и включает следующие стадии: 1) получение конъюгата с электрохимически-активной медной меткой НЧ Cu; 2) модификация поверхности электрода захватывающими моноклональными антителами против карбарила; 3) получение э/х сигнала от НЧ Cu при связывании захватывающих антител на поверхности ЗГЭ с конъюгатом НЧ Cu с конъюгатом НЧ Cu; 4) введение низкомолекулярного аналита-карбарила, которые являются конкурентом по связыванию с захватывающими антителами на поверхности ЗГЭ с последующей регистрацией степени ингибирования э/х сигнала от НЧ Cu. Для получения конъюгата НЧ Cu с электрохимической меткой использовали НЧ Cu. Схема получения электрохимического иммуносенсора представлена на рисунке 9.

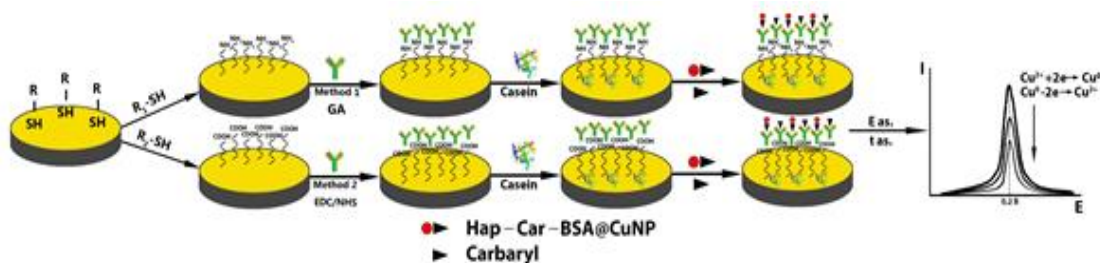


Рисунок 9. Схематическое изображение электрохимического иммуносенсора для определения карбарила.

Для синтеза НЧ Cu был выбран «зеленый» способ, в котором использовали ацетат меди (II) в качестве субстрата, гипохлорит натрия (1 моль/дм³) в качестве восстановителя, хитозан (1%) и аскорбиновую кислоту (0,42 моль/дм³) в качестве стабилизаторов. Размер полученных НЧ Cu определяли методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), результаты представлены на рисунке 10.

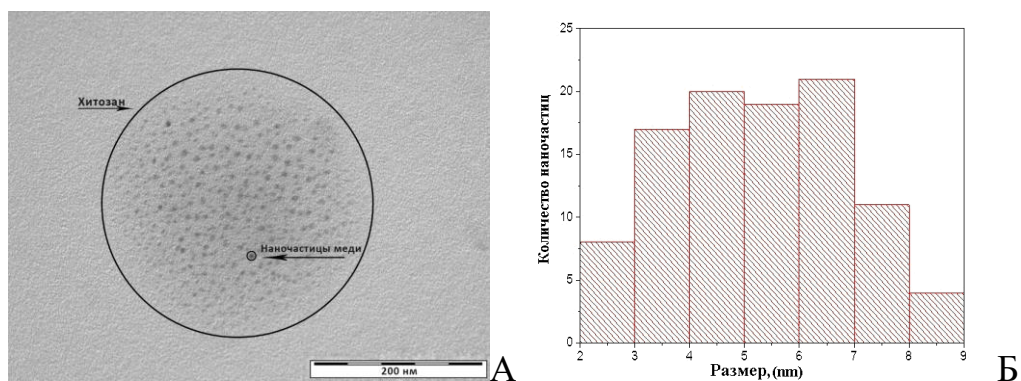


Рисунок 10. А–ПЭМ-изображение НЧ Cu, стабилизированных хитозаном, с приближением 200 нм, Б–гистограмма распределения НЧ Cu, стабилизированных хитозаном по размерам.

На основании полученных данных (рис. 10) можно сделать вывод о том, что коллоидные частицы представляют собой полимерный хитозан сферической формы на площади которого равномерно распределены НЧ Cu размером от 4 до 6 нм.

Конъюгат Нар-Car-БСА@НЧCu получали методом ковалентного сшивания производного гаптена карбарила Car 6 (г. Ухань, Китай) с бычьим сывороточным альбумином (БСА). Синтезированный конъюгат Нар-Car-БСА@НЧCu для электрохимического иммуноанализа карбарила характеризовали методами УФ/ВИД-спектроскопией, ПЭМ и динамического рассеяния света (ДРС). УФ/ВИД спектры НЧ Cu и конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu записывали в диапазоне длин волн 500 – 650 нм (рис. 11А). 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 конъюгатом Нар-Car-БСА@НЧCu карбарила. Гидродинамический диаметр НЧ Cu, стабилизированных хитозаном, соответствовал значениям 128 ± 10 нм (рис. 11В). Наблюдалось увеличение гидродинамического диаметра конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu до 750 ± 10 нм, что подтверждает связывание НЧ Cu с гаптенем при получении конъюгата Нар-

Car-БСА@НЧСи карбарила (рис. 11В). На рисунке 11С можно увидеть, что после синтеза и очистки конъюгата Нар-Car-БСА@НЧСи в его состав включен БСА, который имеет белый контраст, тогда как НЧ Си имеют темный цветовой контраст.

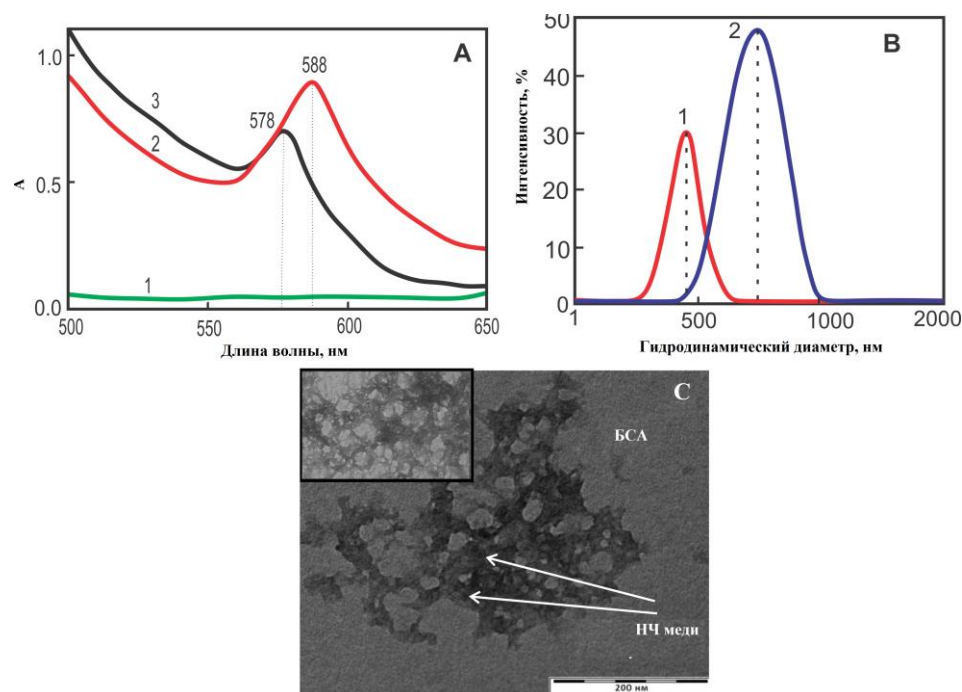


Рисунок 11. А–УФ/ВИД спектры НЧ Си и конъюгата Нар-Car-БСА@НЧСи; В–гидродинамический диаметр НЧ Си, стабилизированных хитозаном (1) и конъюгата Нар-Car-БСА@НЧСи карбарила (2); С–ПЭМ–изображение конъюгата Нар-Car-БСА@НЧСи карбарила с контрастированием белков 1,0 % раствором молибденовокислого аммония.

На рисунке 12 представлены анодные вольтамперограммы НЧ Си и конъюгата Нар-Car-БСА@НЧСи (А) и их градуировочные зависимости (Б).

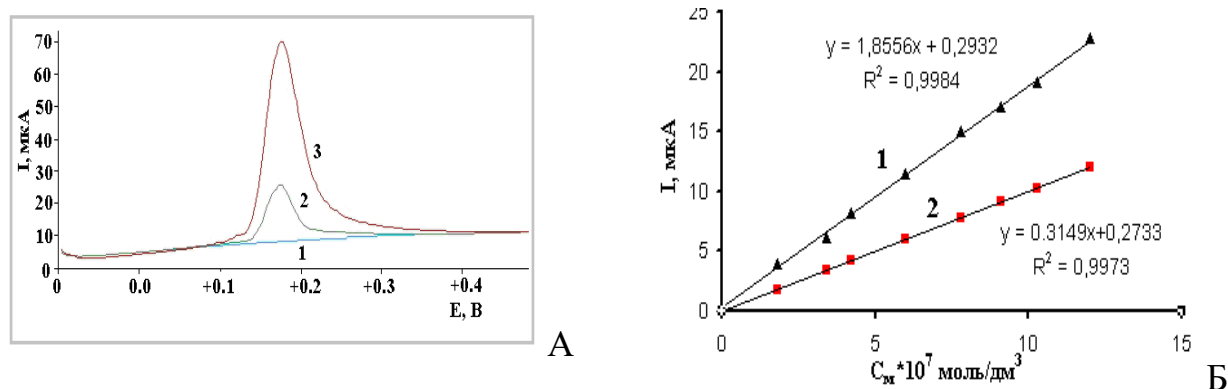


Рисунок 12. А–Вольтамперограммы окисления НЧ Cu: 1–фоновый электролит 0,2 моль/дм³ HCOOH, $v=100$ мВ/с; $E_{нак}=-1,3В$; $t_{нак}=70с$; 2–50 мкл конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu карбарила; 3–50 мкл НЧ Cu. Б–градуировочная зависимость НЧ Cu (1) и конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu карбарила (2) на ЗГЭ.

При исследовании электрохимических свойств конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu карбарила методом инверсионной вольтамперометрии выявили, что ток окисления меди конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu меньше, чем ток окисления НЧ Cu (рис. 12А). Возможно, белки конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu закрывают поверхность ГЭ и количество осадка меди на электроде при стадии накопления меньше, чем от НЧ Cu. Однако, градуировочная зависимость тока от концентрации конъюгата в пересчете на Cu^{2+} имеет линейную зависимость в диапазоне от $2,0 \cdot 10^{-7}$ до $12,0 \cdot 10^{-7}$ моль/дм³ (рис. 12Б), что делает возможным применение конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu для аналитических задач количественного определения карбарила с использованием электрохимического иммуносенсора.

Для формирования распознающего рецепторного слоя антител (г. Ухань. Китай) на поверхности ЗГЭ применяли метод ковалентного сшивания с использованием различных кросс-линкеров. В работе предложено 2 способа иммобилизации антител на поверхности ЗГЭ. Схема иммобилизации представлена на рисунке 13.



Рисунок 13. Схема модификации поверхности ЗГЭ захватывающими антителами

При использовании 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид гидрохлорид/1-гидрокси-2,5-пирролидиндион (EDC/NHS) (метод 2) был получен сигнал окисления меди конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu, который значительно выше, чем в случае использования глутарового альдегида (ГА) (метод 1). Таким образом, в дальнейшей работе для иммобилизации антител на поверхности ЗГЭ использовали метод 2.

Предварительно экспериментальным путем выбрано оптимальное разбавление антител к карбарилу, используемых в прямом конкурентном формате анализа. Максимальному значению тока окисления конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu карбарила соответствует степень разбавления антител $0,4 \text{ мкл} \cdot \text{см}^{-1}$. Оптимальную концентрацию конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu карбарила устанавливали на основе зависимости аналитического сигнала окисления меди конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu от его концентрации, которая соответствовала значению $1,0 \text{ мкл} \cdot \text{см}^{-1}$. Поскольку карбарил экстрагируют из муки этиловым спиртом, необходимо оценить влияние этилового спирта на работоспособность иммуносенсора с использованием общепринятого критерия IC_{50} . На рисунке 14 представлена зависимость IC_{50} (мкг/кг) от концентрации этилового спирта.

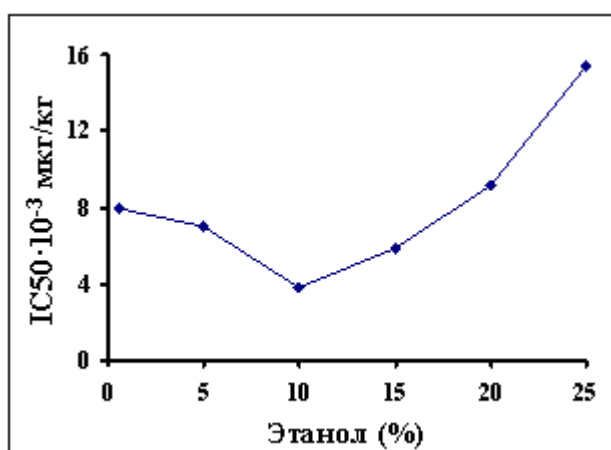


Рисунок 14. Зависимость IC_{50} (мкг/кг) от концентрации этилового спирта.

Этиловый спирт в концентрации 10% не оказывает влияние на работоспособность электрохимического иммуносенсора и считается оптимальной, при концентрации выше 25 % происходит разрушение рецепторного слоя на поверхности электрода.

На рисунке 15 представлена градуировочная зависимость степени ингибирования сигнала окисления меди конъюгата Нар-Сар-БСА@НЧСи от логарифма концентрации карбарила в диапазоне от IC₂₀ до IC₈₀.

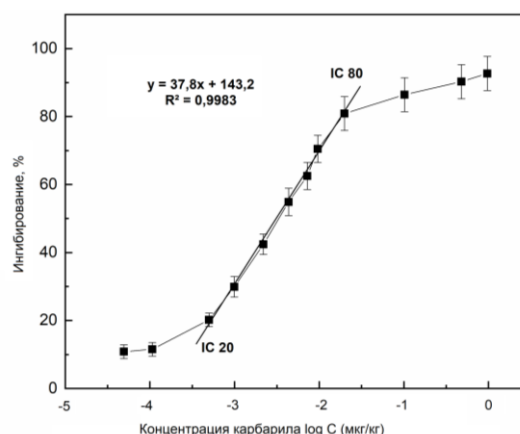


Рисунок 15. Градуировочная зависимость степени ингибирования сигнала окисления меди конъюгата Нар-Сар-БСА@НЧСи от логарифма концентрации карбарила в диапазоне концентрации от $5,0 \cdot 10^{-4}$ до $2,0 \cdot 10^{-2}$ мкг/кг.

На рисунке 16 представлены вольтамперограммы окисления меди конъюгата Нар-Сар-БСА@НЧСи при разных концентрациях карбарила в растворе.

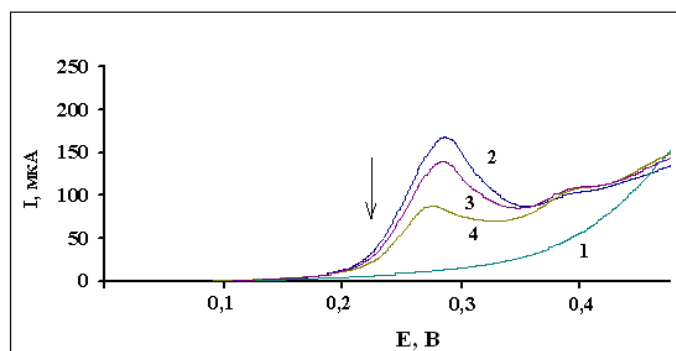


Рисунок 16. Вольтамперограммы окисления меди конъюгата Нар-Сар-БСА@НЧСи с увеличением концентрации карбарила в растворе. 1–фоновый электролит НСООН 0,2 моль/дм³, 2–электрохимический сигнал конъюгата Нар-

Сar-БСА@НЧСи без добавления карбарила; 3–концентрация карбарила $5,0 \cdot 10^{-4}$ мкг/кг, 4–концентрация карбарила $10,0 \cdot 10^{-4}$ мкг/кг.

Чувствительность или концентрация полумаксимального ингибирования (IC_{50}) составила $3,75 \cdot 10^{-3}$ мкг/кг. Предел обнаружения (IC_{10}) составил $5,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/кг.

Правильность определения карбарила с использованием электрохимического иммуносенсора оценивали по методу «введено-найдено», используя образцы кукурузы, овса и пшеницы, которые искусственно контаминировали карбарилем. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3

Результаты определения карбарила в образцах зерновых культур с использованием электрохимического иммуносенсора ($n=3$, $p=0,95$)

Образец	Содержание карбарила			
	В пробе (ВЭЖХ) мкг/кг	Введено $\cdot 10^{-2}$ мкг/кг	Найдено $\cdot 10^{-2}$ мкг/кг	Степень извлечения, %
Кукуруза	$14,9 \cdot 10^{-4}$	0,05	$0,046 \pm 0,006$	98 ± 2
		1,00	$0,95 \pm 0,13$	95 ± 2
		2,00	$1,86 \pm 0,26$	93 ± 2
Овес	$11,9 \cdot 10^{-5}$	0,05	$0,045 \pm 0,006$	98 ± 3
		1,00	$0,93 \pm 0,13$	96 ± 3
		2,00	$1,87 \pm 0,26$	95 ± 2
Пшеница	$23,3 \cdot 10^{-3}$	0,05	$0,048 \pm 0,007$	96 ± 3
		1,00	$0,94 \pm 0,13$	94 ± 2
		2,00	$1,86 \pm 0,26$	93 ± 2

Основные метрологические характеристики электрохимического иммуносенсора для определения карбарила в зерновых культурах представлены в таблице 4.

Таблица 4

Метрологические характеристики электрохимического иммуносенсора для определения карбарила

Диапазон измерений, $\cdot 10^{-2}$ мкг/кг	Показатель повторяемости, %	Показатель внутрилабораторной прецизионности, %	Показатель точности, %
0,05-2,00	4,0	9,0	14,0

Погрешность для диапазона концентраций карбарила от $5,0 \cdot 10^{-4}$ до $2,00 \cdot 10^{-2}$ мкг/кг не превышала 14 %.

Специфичность разработанного электрохимического иммуносенсора оценивали путем тестирования перекрестной реактивности других карбаматных пестицидов (карбофурана, карбосульфана, пропоксура). Перекрестное реагирование родственных аналиту соединений не превышало 7%, то есть, моноклональные антитела селективно распознают структуру нафтилкарбамата.

Электрохимический иммуносенсор можно использовать для селективного определения следовых количеств карбарила в образцах зерновых культур с погрешностью не более 14 %. Достоинствами данного метода является селективность, экспрессность, возможность проведения анализа в полевых условиях, простота техники измерений, надежность и низкая стоимость оборудования.

Выводы:

1. Исследованы электрохимические свойства карбарила на модифицированном углеродными чернилами ГЭ в диапазоне потенциалов от -1,5 до +1,5 В. Аналитический сигнал наблюдали при -0,6 В, линейная зависимость тока окисления карбарила соблюдалась в диапазоне концентраций от 0,04 до 0,32 мкг/кг. Показано, что карбарил окисляется на электроде необратимо, с образованием нафтола-1 и метиламина.

2. Разработана методика определения карбарила в зерновых культурах методом вольтамперометрии на модифицированном углеродными чернилами ГЭ.

Фоновый электролит-перхлорат натрия 0,1 моль/дм³, диапазон потенциалов от -1,5 до +1,5 В. Проведена оценка метрологических характеристик методики. Выявлено, что для диапазона концентраций карбарила от 0,04 до 0,32 мкг/кг погрешность составила 20 %, показатель повторяемости 8 %, показатель внутрилабораторной прецизионности 16 %.

3. Разработан электрохимический иммуносенсор с медной меткой для количественного определения карбарила в модельных растворах;

4. Синтезированы и исследованы НЧ Cu и конъюгат Нар-Car-БСА@НЧCu на их основе. Полученные НЧ Cu имеют максимум поглощения при 578 нм; размер от 4–6 нм. Аналитический сигнал от НЧ Cu на ЗГЭ, полученный с помощью инверсионной вольтамперометрии наблюдали при потенциале +0,1 В, при $E_{\text{нак}} = -1.3$ В, $t_{\text{нак}} = 70$ с. Конъюгат Нар-Car-БСА@НЧCu имеет максимум поглощения при 588 нм и гидродинамический диаметр 750 ± 10 нм. Сигнал электрохимического окисления конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu, полученный методом инверсионной вольтамперометрии наблюдается при +0,2 В;

5. Найден способ гетеробифункционального кросс-сшивания специфических иммуноглобулинов против карбарила на поверхности ЗГЭ;

6. Разработан алгоритм проведения электрохимического иммуноанализа для определения карбарила в зерновых культурах;

7. Проведена оценка основных метрологических характеристик разработанного электрохимического иммуносенсора для количественного определения карбарила в зерновых культурах (критерии $IC_{50} = 3,75 \cdot 10^{-3}$ мкг/кг и $IC_{10} = 5,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/кг, диапазон определяемых содержаний от $5,0 \cdot 10^{-4}$ до $2,0 \cdot 10^{-2}$ мкг/кг, погрешность в диапазоне от $5,0 \cdot 10^{-4}$ до $2,0 \cdot 10^{-2}$ мкг/кг составила 14 %, показатель повторяемости 4%, показатель внутрилабораторной прецизионности 9%. специфичность $\leq 7\%$).

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. Gashevskaya, A.S., Dorozhko, E.V., Korotkova, E.I. Copper-labeled Voltammetric Immunosensor for Carbaryl Detection // ChemChemTech, 2021, 64(2), стр. 26–33

2. Dorozhko Elena. A copper nanoparticle-based electrochemical immunosensor for carbaryl detection / Gashevskay Anna, Korotkova Elena, Barek Jiri, Vyskocil Vlastimil, Eremin Sergei, Galunin Evgeny, Saqib Muhammad // Talanta. – 2021. – Vol. 228. – P. 1–8. doi:10.1016/j.talanta.2021.122174

3. Гашевская А.С. Вольтамперометрический способ определения глутатиона на золотоуглеродсодержащем электроде / Дорожко Е.В., Короткова Е.И., Пашковская Э.А., Воронова О.А., Плотников Е.В., Дёрина К.В., Липских О.И. // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. –2019. – Т.85. – №1-1. – С. 28–34. doi:10.26896/1028-6861-2019-85-1-I-28-34

4. Gashevskaya A. S. Voltammetric determination of carbaryl in some cereals on an impregnated graphite electrode modified with carbon ink / Dorozhko Ye. V., Derina K. V., Gusar A.O. // Вестник Карагандинского университета. Серия Химия. – 2019. – Т. 2. – №94. – С. 45-50. doi:10.31489/2019Ch2/45-50

5. Гашевская А.С. Вольтамперометрическое определение карбарила на импрегнированном электроде, модифицированный углеродными чернилами / А. С. Гашевская, М. А. Малова // Химия и химическая технология в XXI веке материалы XX Международной научно-практической конференции имени профессора Л. П. Кулёва. – Томск: Изд-во ТПУ, 2019. – С. 234-235.

6. Гашевская А.С. Исследование электрохимических свойств карбарила на модифицированном углеродными чернилами электроде методом анодной / Короткова Е. И., Дорожко Е. В., Гашевская А. С., Михеева Е. В. // Современные технологии, экономика и образование сборник трудов Всероссийской научно-методической конференции. – Томск: Изд-во ТПУ, 2019. – С. 46-48.