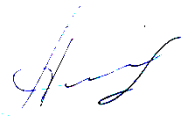
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

На правах рукописи



Гашевская Анна Сергеевна

Вольтамперометрические способы определения карбарила в зерновых культурах с использованием модифицированных графитовых электродов

1.4.2 Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

Кандидат химических наук

Дорожко Елена Владимировна

Томск – 2022

Содержание

ВВЕДЕНИЕ……..4

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР...……9

1.1 Классификация карбаматных пестицидов и их физико-химические свойства……..9

1.2 Методы определения карбарила в природных объектах …….20

1.2.1 Хроматографические методы определения карбарила …….21

1.2.2 Оптические методы определения карбарила……..24

1.2.3 Иммунохимические методы определения карбарила……....28

1.2.4 Электрохимические методы определения карбарила……34

1.2.5 Электрохимические биосенсоры для определения карбарила……..38

1.2.6 Электрохимические иммуносенсоры……...40

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ……43

2.1 Реактивы и материалы……..43

2.2 Разработка вольтамперометрической методики определения карбарила на модифицированном углеродными чернилами ГЭ……44

2.3 Разработка электрохимического иммуносенсора на основе гаптен-белкового конъюгата (Hap-Car-БСА@НЧCu) для определения карбарила……...44

2.3.1 Синтез НЧ Cu, стабилизированные хитозаном……..45

2.3.2 Синтез конъюгата Hap-Car-БСА@НЧCu.....46

2.3.3 Физико-химические методы исследования свойств НЧ Cu и конъюгата Hap-Car-БСА@НЧCu.....46

2.3.4 Методика иммобилизации моноклональных антител на поверхности ЗГЭ……46

2.3.5 Определение карбарила с использованием электрохимического иммуносенсора……48

2.4 Пробоподготовка зерновых культур……..50

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ…….……51

3.1 Вольтамперометрическое определение карбарила на модифицированном углеродными чернилами ГЭ……51

3.1.1 Исследование электродного процесса электроокисления карбарила на модифицированном углеродными чернилами ГЭ……56

3.1.2 Определение карбарила в образцах зерновых культур ……58

3.2 Разработка электрохимического иммуносенсора на основе конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu для определения карбарила в зерновых культурах…….62

3.2.1 Синтез и исследование НЧ Cu, стабилизированных хитозаном……..62

3.2.2 Исследование электрохимических свойств НЧ Cu, стабилизированных хитозаном на ЗГЭ…….67

3.2.3 Исследование свойств конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu для получения электрохимического иммуносенсора……70

3.3 Иммобилизация моноклональных антител на поверхность ЗГЭ……73

3.4 Градуировочная зависимость для определения карбарила с использованием конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu.....77

3.5 Метрологические характеристики электрохимического иммуносенсора для определения карбарила……78

3.6 Специфичность определения карбарила……80

ВЫВОДЫ……82

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ……..……84

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ……..……85

ПРИЛОЖЕНИЕ 1…….…98

ПРИЛОЖЕНИЕ 2….……....100

ВВЕДЕНИЕ

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 аппаратурного обеспечения, что затрудняет их использование их 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 относительном 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 Cu в присутствии аскорбиновой кислоты, стабилизированные 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 (Hap-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. Заданием «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.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Классификация карбаматных пестицидов и их физико-химические свойства

Проблема определение остатков карбаматных пестицидов в пищевых продуктах, питьевой воде и почве на сегодняшний день стоит актуальной. Даже незначительное содержание пестицидов в продуктах питания, воде и почве может нанести значительный вред здоровью человека. Поэтому мониторинг этих остатков представляет собой один из наиболее важных шагов по минимизации потенциальных опасностей для здоровья не только человека, но и животных [1].

По прогнозам, к 2050 году население мира вырастет с 6 миллиардов до 9 миллиардов, рост населения является движущей силой, за счет этого увеличивается спрос на сельскохозяйственную продукцию. Карбаматные пестициды используются в сельском хозяйстве в основном с целью увеличения продуктивности растений. Синтетические органические инсектициды, фунгициды и гербициды [2] – агрохимикаты, предназначенные для борьбы от различных вредителей на сельскохозяйственные культуры. Однако во многих случаях, в сельскохозяйственной продукции остаются остатки использованных пестицидов, которые со временем становятся постоянной опасностью для качества продуктов питания, окружающей среды и здоровья потребителей [3-8].

Карбаматы (или производные карбаминовой кислоты) – сложные эфиры карбаминовой кислоты, получившие широкое применение в сельском хозяйстве в качестве действующих веществ пестицидов. Биологическая активность карбаматов была обнаружена в 1923 году. Около 50 производных карбаминовой кислоты широко используются как инсектициды, фунгициды, гербициды и нематоциды. Первые производные карбаминовой кислоты, которые имеют свойства инсектицида, были синтезированы в 1947 году [9].

По химическому строению карбаматные соединения подразделяются на 4 группы: алкиловые эфиры арилкарбаминовых кислот, эфиры тиокарбаминовых

кислот, производные дитиокарбамиловых кислот и ариловые эфиры алкилкарбаминовых кислот.

К группе алкиловых эфиров арилкарбаминовых кислот относят: ИФК, карбин, хлор-ИФК (рис. 1).

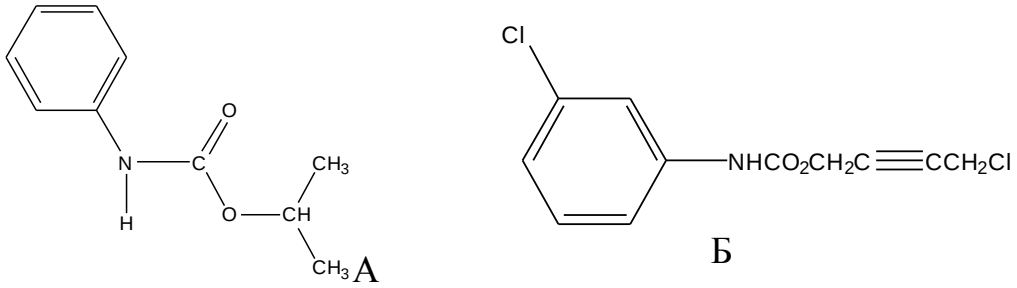


Рисунок 1 Структурные формулы: А-ИФК, Б-карбина

Все они активные гербициды. Механизм токсического действия этих препаратов определяется образованием метгемоглобина, развитием анемии, изменением лейкопоэза, угнетением активности холинэстераз [10].

ИФК (агермин, карбагран, профам) - изопропил-N-фенилкарбамат. Растворимость в воде до 100 мг/л. Растворяется в спирте, ацетоне, бензоле. Умеренно стоек - в почве сохраняется до двух месяцев. Выпускается в виде смачивающегося порошка или концентрата эмульсии. Применяется в качестве корневого гербицида в посевах моркови, свеклы, лука, хлопчатника и других культур. Малотоксичен. Остатки ИФК в кормах не допускаются [11].

Карбин (барбан, хлоринат, карин) - 4-хлорбутин-2-ил-N, М-хлорфенилкарбамат. Растворимость в воде 110 мг/л, растворяется в органических растворителях. На растениях разлагается в течение 1-1,5 мес. Выпускается в виде 12%-ного концентрата эмульсии. Применяется в качестве гербицида для борьбы с овсюгом в посевах зерновых культур. Среднетоксичен [12].

К эфирам тиокарбаминовой кислоты относят: триаллат, тиллан, эптам и ялан (рис. 2).

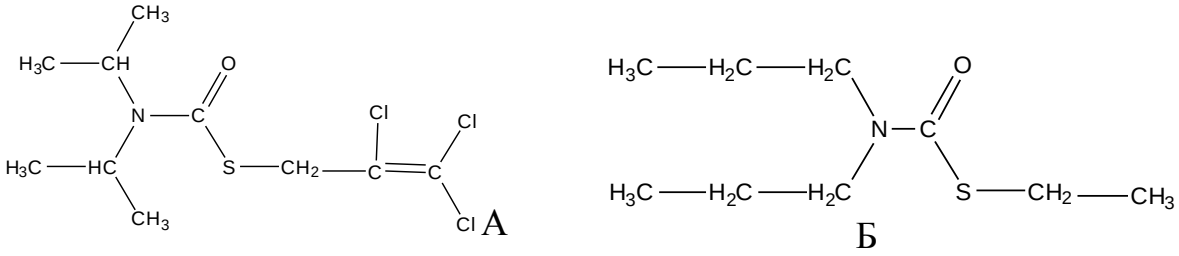


Рисунок 2 Структурные формулы: А-триаллата; Б-эптама.

Эти гербициды легко проникают в растения. Механизм токсического действия тиокарбаматов полностью не изучен. Эксперименты показывают, что в токсикодинамике определяющее значение имеют: угнетение в организме окислительно-восстановительных процессов, нарушение обмена нуклеиновых кислот, поражение желез внутренней секреции [13].

Триаллат (диптал, авадекс БВ) - S-2,3,3-трихлораллил-N, N-ди-(изопропил) тиокарбамат. Кристаллическое вещество светло-бурого цвета с неприятным запахом. Растворимость в воде 4 мг/л, растворяется в органических растворителях. Умеренно устойчив - в почве разрушается в течение 4-10 мес. Выпускается в виде концентрата эмульсии и гранул. Применяется в качестве гербицида против овсюга в посевах пшеницы, ячменя, льна, свеклы, гороха. Обладает слабовыраженным эмбриотоксическим действием, кумулятивные свойства выражены слабо.

Эптам – (ЭПТК, эптам-6-Е, эптам 5-Г) S-этил-N, N-ди(-н-пропил) тиокарбамат. Прозрачная жидкость с неприятным запахом, плохо растворяется в воде, смешивается с органическими растворителями. Умеренно стойкое вещество - в почве сохраняется около 3 мес. Выпускается в форме концентрата эмульсии и в виде гранул. Применяется в качестве предвсходового гербицида в посевах люцерны, фасоли, свеклы, моркови, капусты, картофеля, льна и других культур. Относится к препаратам средней токсичности со значительными колебаниями видовой чувствительности. Обладает слабовыраженным эмбриотоксическим действием [14].

Производные дитиокарбаминовой кислоты представляют большую группу пестицидов, которые применяют в качестве фунгицидов. Сюда относят: карбатион, цирам, цинеб, ТМТД, поликарбацин, а также комбинированные препараты, содержащие дитиокарбаматы (купроцин-1, купрозан, мильтокс-специаль, гексатиурам, гептатиурам, тигам, полимарцин, фентиурам, фентиураммолибдат) (рис. 3)

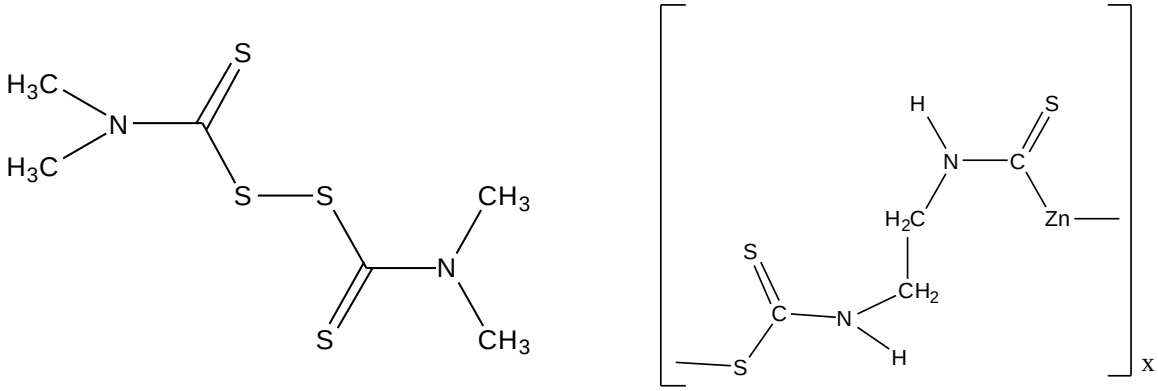


Рисунок 3 Структурные формулы: А-тетраметилтиурамдисульфида; Б-цинеба.

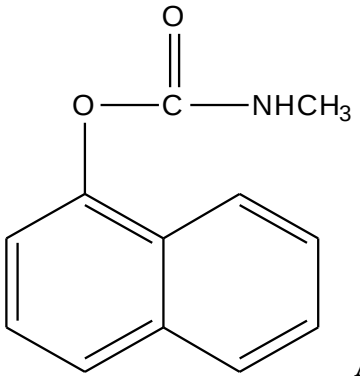
По токсичности для разных видов животных производные дитиокарбаминовой кислоты могут быть отнесены к различным группам гигиенической классификации. Многие из них в организме животных подвергаются деструкции с образованием более токсичных продуктов (сероуглерод, сероводород, диметиламин, метилгиозоцианат и др.). У препаратов (ТМТД, цирам) в значительной мере выражены кумулятивные свойства. Они обладают эмбрио- и гонадотоксическими, тератогенными, бластомогенными и мутагенными свойствами. Наиболее выражены эти свойства у манеба (применение в России запрещено), цирама и ТМТД (применение строго регламентируется). При длительном поступлении в организм животных дитиокарбаматы могут выделяться с молоком, накапливаться в органах [15].

Тетраметилтиурамдисульфид (ТМТД) (тиурам, арозан, тирам, терзан, тетратион А). Кристаллическое вещество белого или кремового цвета, не растворяется в воде, но хорошо растворимо в органических растворителях. Устойчив к действию окислителей и высоких температур. Во внешней среде

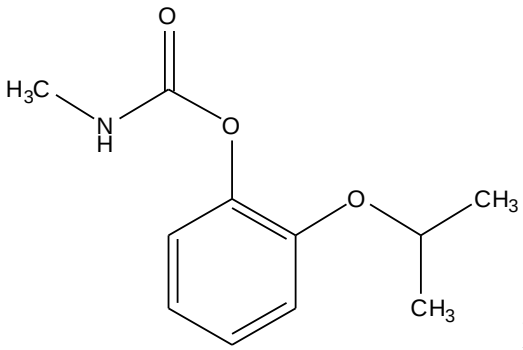
сохраняется около одного года. Выпускается в виде 50-80%-ных смачивающихся порошков, а также в комбинациях с другими препаратами. Применяется как протравитель семян зерновых, зернобобовых, технических, овощных культур, лекарственных и цветочных растений. Среднетоксичен для большинства видов животных.

Цинеб (аспор, дитан, новозир, парзат, цимикс) - этилен-1,2-бис-дитиокарбамат цинка. Белые или слегка желтоватые кристаллы с неприятным запахом. В воде не растворяется. Плохо растворяется в органических растворителях. Под действием тепла и влаги быстро разрушается. Длительное хранение в плохо проветриваемом помещении может привести к взрыву. Выпускается в форме смачивающегося порошка. Применяется в качестве фунгицида для обработок овощных, зерновых, технических, бахчевых и плодовых культур, виноградников и табака. Малотоксичен [16].

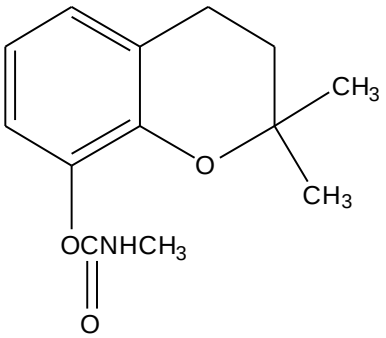
К ариловым эфирам алкилкарбаминовых кислот относятся: карбарил, пропоксур, карбофуран и др. (рис.4).



А



Б



В

Рисунок 4 Структурные формулы: А-карбарила; Б- пропоксура; В-карбофурана.

На основе данных соединений созданы перспективные препараты зарубежных фирм для сельскохозяйственных нужд такие, как: асулам (Shanghai Bosman Industrial, Шанхай, Китай), банол (ООО «Сингента», Москва, Россия), мезурол (Bayer, Мюнхен, Германия), цектран (ООО «Биоформатек», Москва, Россия), пиролан (ООО «АгроХим», Москва, Россия) и др. Асулам является гербицидом, остальные препараты - активные инсектициды. Препараты этой группы обладают антихолинэстеразной активностью, поражают эндокринные железы животных, нарушают окислительно-восстановительные процессы, обмен нуклеиновых кислот [17-19].

Карбарил (севин, карполин, арилат, севинокс, трикарнам) - 1-нафтил-N-метилкарбамат - белое кристаллическое вещество, растворимость в воде менее 0,1%, растворяется в большинстве органических растворителей. Устойчив к действию света и повышенной температуре. Относится к стойким препаратам, сохраняется в почве до одного года. В нейтральных, кислых и щелочных растворах карбарил гидролизуется. Одним из продуктов его гидролиза является 1-нафтол. Карбарил (1-нафтилметилкарбамат) - широкого спектра карбаматный инсектицид, используемый для контроля более 100 видов насекомых на посевах (цитрусовые и другие фрукты, хлопок, орехи и т. д.), на газонах, декоративных растениях и тенистых деревьях, в лесном хозяйстве и даже на животных (домашняя птица, домашний скот и домашние животные). Также используется как моллюскицид и акарицид [20]. Карбарил работает, попадая в желудок вредителя с пищей и поглощение происходит через телесный контакт. Хотя это ингибитор холинэстеразы, он имеет низкую токсичность для млекопитающих. Этот тип концепции обусловлен химическим гидролизом и биодеградацией метаболитов, продуцирующих карбарил, среди которых 1-нафтол, который является основным продуктом, не накапливается в организме, но выделяется с мочой и калом. Несмотря на эти достоинства, последние данные показывают, что некоторые побочные эффекты все же наступают. Измененяется микросомальные ферменты печени, появляется субхроническая нейротоксичность, изменяется

иммунологическая функция в культуре in vitro и комбинация цианобактерий с карбарилом и 1-нафтолом, проявляющими большую токсичность по сравнению с одними цианобактериями.

Карбарил получают недорогим способом прямой реакции метилизоцианата с 1-нафтолом:

$$C_{10}H_7OH+CH_3NCO\rightarrow C_{10}H_7OC(O)NHCH_3 \qquad 1$$

В качестве альтернативы, 1-нафтол можно обработать избытком фосгена с получением 1- нафтил хлорформиата, который затем превращают в карбарил путем реакции с метиламином. Карбарил- медленный обратимый ингибитор фермента ацетилхолинэстеразы. Он напоминает ацетилхолин, но карбамоилированный фермент очень медленно (минуты) подвергается заключительной стадии гидролиза по сравнению с ацетилированным ферментом, генерируемым ацетилхолином (микросекунды). Он влияет на холинергическую нервную систему и вызывают смерть, потому что действие нейротрансмиттера ацетилхолина не может быть прекращено карбамоилированной ацетилхолинэстеразой. При длительном воздействии карбарила на организм нарушаются функции печени. Также наблюдается тошнота, покраснение лица, саливация и потоотделение. Карбарил быстро всасывается из желудка. Через 5 мин после поступления карбарила в желудок он появляется в крови, а через 30 мин отмечается максимальное накопление его в органах. Через 2—3 суток после попадания в организм карбарил не обнаруживается в биоматериале [21].

Разработка карбаматных инсектицидов была названа крупным прорывом в области пестицидов. Карбаматы не обладают стойкостью хлорированных пестицидов. Хотя карбарил токсичен для насекомых, он быстро выводится из организма у позвоночных. Он не концентрируется в жире и не выделяется в молоке, поэтому его предпочитают для пищевых культур. Это активный ингредиент шампуня Carylderm, который используется для борьбы с головными вшами до тех пор, пока не будет устранено их заражение.

Карбарил убивает как целевых (например, малярийных комаров), так и полезных насекомых (например, пчел), а также ракообразных.

Хотя карбарил одобрен для выращивания более чем 100 сельскохозяйственных культур, он запрещен в Великобритании, Австрии, Дании, Швеции, Иране, Германии и Анголе.

Выпускают в форме смачивающихся порошков, дустов, гранул (50 и 85%). Токсичность карбарила для сельскохозяйственных животных колеблется в широких пределах. Наиболее чувствительны к нему лошади, около 50 мг/кг для крупного рогатого скота составляет около 150 мг/кг, овец 225, свиней 500, кроликов 800, кур около 2000 мг/кг. Специфической особенностью токсического действия карбарила является выраженное влияние на регенеративную функцию [22].

Карбофуран – широко распространенный системный инсектицид, который активно используется в сельском хозяйстве. Карбофурановые остатки в сельскохозяйственных продуктах и среда обитания являются потенциальной угрозой для здоровья человека и животных. Это потому, что карбофуран может изменить окислительный баланс и стабильность эритроцитов человека. Карбофуран, пестицид карбамат, был классифицирован как опасное вещество для человека, которое действует путем ингибирования ацетилхолинэстеразы, активность в центральной нервной системе [23]. Хотя карбофуран был запрещен в Канаде и Европейском союзе, он до сих пор используется во многих областях, особенно в развивающихся странах. Из-за его низкой стоимости и высокой эффективности, карбофуран широко применяется для полевых культур, таких как картофель, кукуруза и соя. Следовательно, обнаружение карбофурана имеет решающее значение в отношении вопросов здоровья потребителей и качества окружающей среды [24].

Пропоксур (байгон, байер 39007, блаттеникс, унден) - 2 изопропоксифенил-N-метилкарбамат. Эффективен против мух, комаров и других насекомых, а также против клещей, в том числе чесоточных. Выпускается в форме 50%-ного смачивающегося порошка, 20%-ного концентрата эмульсии, а также в виде дустов. Среднетоксичен [25].

Таким образом, обобщенные литературные данные по степени использования и вреда для организмов человека и животных ариловых эфиров алкилкарбаминовых кислот представлены в таблице 1.

Таблица 1

Обобщенные литературные данные для карбарила, карбофурана и пропоксура.

Пестицид	Объект в с/х	ПДК в воде, мг/дм^3	ПДК в продуктах питания, мг/кг	ПДК в почве, мг/кг	ПДК в воздухе, мг/м^3	Препараты на их основе	Вред организму
Карбарил	Продукты питания, животные	0,02	Миндаль в шелухе-50, спаржа-15, цитрусовые-0,05, свекла, кукуруза-0,1, морковь, перец чили-0,5, клюква, перец сладкий, томат-5, баклажаны, орехи, репа-1, мясо-170, молоко и молочные продукты-0,02, мука зерновых культур-0,2, картофель-0,05	0,05	0,002	Скорпион SC (Польша), Carylderm (США).	Тошнота, покраснение лица, саливация и потоотделение. Нарушение функции печени.

Продолжение таблицы 1

Карбофуран	Продукты питания, животные	0,02	Горчица-0,05, свекла-0,2, кукуруза-0,05, хмель-5, кофе-1, мясо-0,05, подсолнечник-0,1, рис-0,1, сахарный тростник- 0,1, цитрусовые-0,5, хлопчатник-0,1	0,01	0,001	Хинуфур, КС (Агро-Кеми, Венгрия)	Повышенное слюнотечение, тремор, атаксия, снижение активности, ринит, конъюктивит, цианоз, лихорадка, затрудненное дыхание, сужение зрачков. Поражение нервной системы
Пропоксур	Животные	-	В продуктах животноводства-0,01	-	-	Эффектив Ультра, МКС (Hallmark Chemicals B.V. (Нидерланды)	Поражение нервной системы

Из вышеперечисленных карбаматных пестицидов (ариловых эфиров алкилкарбаминовых кислот) был выбран карбарил, т.к. с каждым годом использование карбарила в сельском хозяйстве активно растет, а также именно карбарил из всех вышеперечисленных наиболее опасен для здоровья человека. Карбарил применяют против вредителей хлопчатника, а также плодовых, цитрусовых и овощных культур. Отличается от других пестицидов более продолжительным действием. Не обладает селективным (избирательным) действием. Таким образом, чувствительное обнаружение остатков карбарила в продуктах питания и в объектах окружающей среды имеет большое значение.

1.2 Методы определения карбарила в природных объектах

Решение задач экологического мониторинга и охраны здоровья населения невозможно без создания современных методов контроля содержания карбарила в воде, почве и сельскохозяйственной продукции. Среди требований, предъявляемых на сегодняшний день к новым аналитическим методам можно выделить следующие:

- оперативность получения результатов анализа;
- чувствительность, обусловленная низкими значениями предельно допустимых концентраций пестицидов;
- специфичность определения индивидуального пестицида или группы;
- Дешевизна и простота оборудования.

Многие методы используются для обнаружения карбарила в различных объектах, такие как газовая хроматография (ГХ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), тонкослойная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией, оптические, электрохимические методы исследования и т.д.

1.2.1 Хроматографические методы определения карбарила

ГХ является наиболее распространенным методом хроматографии, в котором соединения разделяются в зависимости от их летучести. Сообщалось о ряде исследований ГХ для анализа карбарила путем определения различными детекторами, такими как детектор захвата электронов (ECD), фотометрический детектор пламени (FPD), детектор азота-фосфора (NPD) и детектор пламенной ионизации (FID). Различные группы пестицидов могут быть обнаружены различными формами детекторов в зависимости от их функциональных групп. Детектор ионизации пламени, как правило, подходит для мониторинга всех классов пестицидов [26]. Ряд исследований на основе ГХ связан с детектором электронного захвата и ГХ с детектором азота и фосфора. Помимо традиционных детекторов, масс-детектор (МС) обладает большей чувствительностью, точностью, лучшей воспроизводимостью и большим эффектом в устранении помех [27]. В настоящее время возможна комбинация анализаторов MS, позволяющих выполнять тандем-MS (QqQ) [28]. Тандем МС позволяет определять карбарил при мониторинге селективных реакций, который является селективным режимом сбора данных, в котором устраняются потенциальные помехи матрицы, таким образом, достигая более низких пределов обнаружения.

Жидкостная хроматография (ЖХ) включает в себя разделение и обнаружение карбарила. ЖХ анализ включает использование классических детекторов, таких как УФ-детектор, флуоресцентный детектор и диодно-матричный детектор (DAD) [29]. В последние годы в связи с повышенной чувствительностью и селективностью МС-детектора, стало наиболее приемлемо и успешно использовать в многократном повторении [30]. Ионизация в ЖХ-МС обычно выполняется источниками ионизации атмосферного давления, в которых он имеет способность получать обильную неповрежденную протонированную молекулу. Наиболее используемым источником ионизации атмосферного давления является электрораспылительная ионизация в положительном режиме после разделения в стационарную фазу, такая как C_{18} [31]. ВЭЖХ является

наиболее используемым методом и относительно легко сочетается с различными детекторами [32-34].

Известен способ определенная карбарила в биологических субстратах с помощью метода тонкослойной хроматографии (ТСХ), который основан на экстрагировании препарата из анализируемого объекта н-гексаном (или хлороформом), упаривание и очистке водометаполных экстрактов петролейным эфиром, хроматографирование на пластинах «силуфол», гидролизе карбарила спиртовым раствором щелочи до 1 нафтола с образованием окрашенного соединения с солью диазония - прочный синий Б или прочный красный ГГ. При использовании этого способа из проб можно экстрагировать в среднем 75% содержащегося в тканях карбарила и определять пестицид [35].

Недостатком известного способа при анализе продуктов питания является неполная очистка экстрактов от примесей, так как на хроматограммах не достигается разделения карбарила от жиров и пигментов. На пластинке наряду с пятнами карбарила образуются пятна оранжевого цвета, которые накладываются и маскируют исследуемое вещество. Однако данный метод можно использовать для разделения и выделения карбарила из группы других пестицидов. В таблице 2 представлены аналитические показатели хроматографических методов определения карбарила.

Таблица 2

Хроматографические показатели определения карбарила

Метод определения карбарила	Детектор	Предел обнаружения	Диапазон линейности	Объекты исследования	Ссылки
ВЭЖХ	УФ- и хемилюминесцентный	0,17 мг/л	1,34–10,68 для уф детектора и 0,25–3,00 для хемилюминесцентного детектора	Образцы почвы	[36]
ГХ-МС	1Н-ЯМР	1,5 нг/мл	-	Плазма крови	[37]
ВЭЖХ с ионизацией электро-распыления	УФ	от 0,040 до 0,155 мкг/л	0,080-250 мкг/л	Сточные и поверхностные воды	[33]
ВЭЖХ с монолитной колонкой	DAD	0,4-7,0 мкг/л	2 до 5000 мкг/л	Фруктовый сок	[38]
ВЭЖХ	DAD	0,2 до 1,0 нг/г	1,0-100,0 нг/г	Образцы фруктов	[39]

На основании таблицы 2 можно сделать вывод, что хроматографические методы определения карбарила имеют высокую чувствительность, специфичность и достаточно оперативность получения результата. Однако хроматографические методы имеют ряд и недостатков: высокая стоимость оборудования, необходимость наличия высококвалифицированного персонала, а также необходима высокая чистота реагентов.

1.2.2 Оптические методы определения карбарила

Метод УФ-спектроскопии очень перспективен для качественного и количественного определения карбарила в различных объектах исследования. Наиболее часто используемый простой и чувствительный спектрофотометрический метод определения карбарила с использованием диазотированного 4-броманилин в качестве связующего агента. Механизм реакции представлен на рисунке 5 [40].

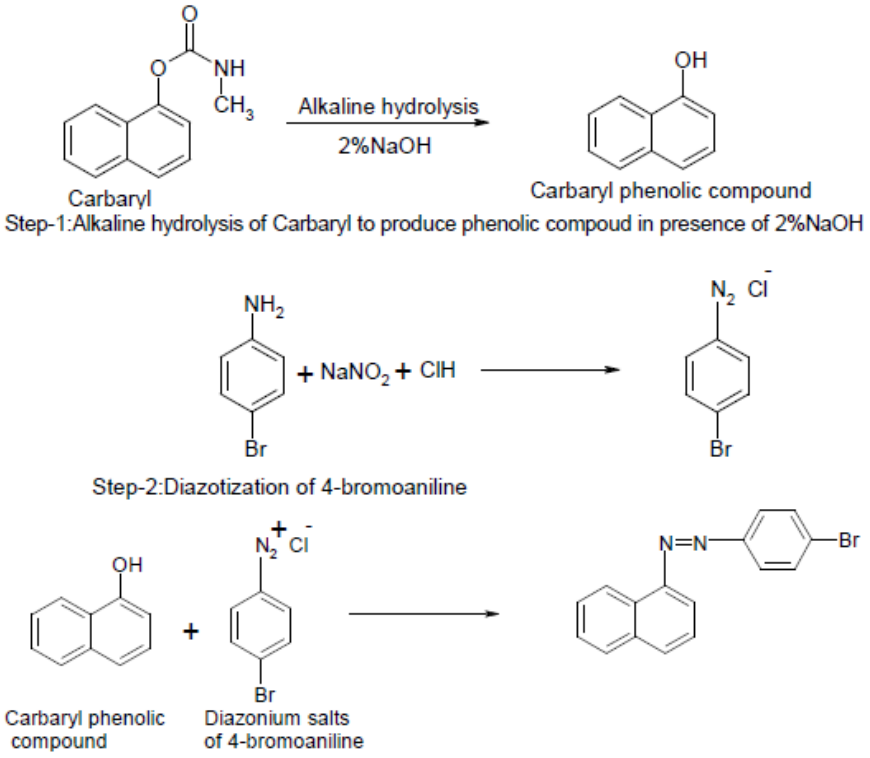


Рисунок 5. Механизм реакции определения карбарила

Описана методика одновременного кинетического спектрофотометрического определения аминокарба и карбарила в пробах овощей и воды. Метод основан на разной скорости окисления аминокарба и карбарила, когда они реагируют с окислителем, феррицианидом калия ($K_3Fe(CN)_6$), в подходящей щелочной среде. Оба вида мгновенно окислялись, что приводило к снижению концентрации феррицианида. Этот анион имеет максимальное спектральное поглощение около 420 нм [41].

Предложена методика инфракрасного спектрометрического определения карбарила в пестицидных препаратах с помощью преобразования Фурье. Метод основан на растворении карбарила в дихлорметане из твердых порошкообразных образцов и прямом измерении оптической плотности при 1747 $см^{-1}$ с использованием базовой спектральной линии, установленной от 1850 до 1650 $см^{-1}$. Измерения абсорбции можно проводить в режиме непрерывного или остановленного потока. В обоих случаях метод обеспечивает точные и воспроизводимые результаты, т.к. режим остановленного потока очень чувствителен [42].

Для обнаружения остатков карбарила в растительных тканях, фруктах, компотах, маринадах, мясе, органах животных и птицы известны колориметрические методы. Они основаны на гидролизе карбарила щелочью с последующим сочетанием продуктов гидролиза с диазотированным паранитроанилином или диобозензосульфокислотой [35].

Недостатками колориметрических методов при определении карбарила является неполная очистка экстрактов от жира, восков и других веществ, а также их низкая чувствительность. В колориметрических методах обнаружение осуществляется посредством изменения цвета, вызванного аналитом. Визуальная оценка или простой портативный спектрометр делают возможным потенциальное простое обнаружение на месте.

Для определения карбарила, карбендазима и 1-нафтола в высушенных цветках липы был предложен безраздельный, быстрый и недорогой спектрофлуориметрический метод, основанный на калибровке второго порядка матриц возбуждения-эмиссии флуоресценции (EEM). Свойство трилинейности трехфакторных данных использовалось для обработки собственной флуоресценции цветов липы и разницы в интенсивности флуоресценции каждого аналита. Это также позволило однозначно идентифицировать каждый аналит [43].

Был разработан колориметрический и флуоресцентный метод двойного считывания для определения карбарила. B, N-легированные углеродные квантовые точки (ККТ) с пиком эмиссии при 490 нм были получены

гидротермальным методом. Было обнаружено, что флуоресценцию ККТ можно эффективно тушить наночастицами Au (AuNP) с пиком поглощения при 520 нм. Тиохолин (TC), который был получен в результате гидролиза ацетилхолина (ACh), катализируемого ацетилхолинэстеразой (AChE), мог вызывать агрегацию AuNP вместе с падением поглощения при 520 нм и приводить к восстановлению тушенной флуоресценции CQD. Когда был введен карбарил, который обладал каталитической активностью AChE, агрегация AuNP и восстановление флуоресценции CQD уменьшались. Этот метод был использован для определения карбарила в образцах водопроводной и озерной воды с высокой точностью и чувствительностью, что указывает на использование данного метода в практических условиях [44].

Был разработан быстрый и чувствительный метод определения следов карбарила в воде с использованием диаллилфталата-европия (Eu^{3+}) в качестве флуоресцентного зонда. Взаимодействие между Eu^{3+}, диаллилфталатом и карбарилом было изучено с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения, а также исследовано изменение спектров флуоресценции комплексов до/после связывания с карбарилом. Результаты показали, что диаллилфталат образует комплекс с Eu^{3+} в молярном соотношении 2:1 с образованием стабильных комплексов. Карбарил также может взаимодействовать с этим зондом с образованием множества комплексов, которые значительно увеличивают флуоресцентную эффективность Eu^{3+} -диаллилфталатного зонда. Интенсивность флуоресценции показала хорошую линейную зависимость от концентрации карбарила при pH 9.0 с использованием 245 нм/615 нм в качестве длины волны возбуждения/излучения. Образцы воды экстрагировали ацетонитрилом, а затем детектировали с использованием Eu^{3+} -диаллилфталата в качестве флуоресцентных зондов. Степень извлечения по методу составляла 91,8–94,5% с RSD менее 6,1%. Метод пригоден для быстрого определения карбарила в пробах воды [45]. Все аналитические показатели оптических методов определения карбарила представлены в таблице 3.

Таблица 3

Оптические методы определения карбарила

Метод исследования	Предел обнаружения	Диапазон линейности	Объекты исследования	Ссылки
УФ-спектроскопия (щелочной гидролиз)	0,0305 мкг/см^2	0,5–10 мкг/мл	Рис, пшеница	[40]
УФ-спектроскопия с окислителем - феррицианидом калия ($K_3Fe(CN)_6$), в подходящей щелочной среде	0,04 мг/л	0,1-1,2 мг/л	Шпинат, картофель, речная вода, водопроводная вода и вода из озера	[41]
ИК-спектроскопия	1,6 мкг/мл	0,05-1,0 мкг/мл для режима непрерывного потока, 0,0125-1,0 мкг/мл для режима остановленного потока	Коммерческие препараты на основе карбарила	[42]
Колориметрический и флуоресцентный метод	0,06 мкг/л	0,20–150 мкг/л	Водопроводная и озерная вода	[43]

Продолжение таблицы 3

Флуоресцентный метод с использованием диаллилфталата-европия (Eu^{3+})	$9{,}6 \cdot 10^{-9}$ М	$25{,}0 \cdot 10^{-8}$-$25{,}0 \cdot 10^{-6}$ М	Пробы воды	[44]
Спектрофлуориметрический метод	4,34 мг/л	от 0,1 до 100 мг/л	Цветки липы	[45]

1.2.3 Иммунохимические методы определения карбарила

Иммунохимические методы основаны на распознавании аналита специфическими рецепторами (антителами) с образованием комплекса антиген-антитело и детектировании аналитического сигнала, производимого иммунохимической тест-системой в ответ на образование комплекса [46]. В большинстве форматов иммунохимических методов определения карбарила антитела иммобилизованы на твердой поверхности. В настоящее время популярны два формата, которые отличаются только твердой поверхностью, которая используется для иммобилизации. В одном формате используется поверхность с антителами (пробирки или лунки) (например, Millipore, ImmunoSystem, Ensys, Quantix и большинство лабораторных иммуноанализа). Другой формат состоит из ковалентно связанных антител с магнитными частицами размером 1 мкм, которые действуют как твердые опоры (системы Ohmicron). Стандартный объем образца составляет 100–250 мкл. Согласно закону действия масс, чем больше аналита в пробе, чем больше ферментного конъюгата он вытеснит из связывания и исходная концентрация аналита в образце можно определить путем измерения количества фермент-конъюгата, связанный с антителами [47]. Количественная оценка требует несвязанные (или свободные) конъюгаты и антигены удалить из раствора. Для первого формата, где пробирки или лунки покрыты антителами, этот шаг просто выполняется путем промывки.

При использовании магнитных частиц пробирка помещается в магнитном поле, которое притягивает магнитные частицы ко дну пробирки и промывка позволяет разделить связанные аналиты и конъюгаты от несвязанных. Затем, количество ферментных конъюгатов, связанных с антителами, измеряется путем добавления субстрата и хромогена для обнаружения фермента. Получаемый цвет пропорционален количеству связанных ферментных конъюгатов и, следовательно, обратно пропорционален количеству аналитов, присутствующих в пробе. Более темный цвет означает меньшее количество аналитов в образце, тогда как светлый цвет указывает на высокую концентрацию аналитов в пробе [48].

В большинстве случаев образование комплекса антиген- антитело детектируют, вводя метку в один из компонентов системы. В современном иммуноанализе применяются различные типы меток – ферменты, красители, квантовые точки, коллоидные частицы металлов и ряд других [49-50].

Радиоактивные метки в иммуноанализе карбарила

Радиоиммуный анализ был разработан в 50-х годах прошлого века R. S. Yalow и S. A. Berson (определение инсулина). Радиоиммуный анализ основан на конкуренции определяемого антигена из клинического материала с определенным количеством идентичного, меченного изотопом, антигена с ограниченным количеством антител.

Основные его преимущества — высокая чувствительность и специфичность. Применение изотопной метки и мечение антигена обеспечивают высокий уровень соотношения сигнал/шум и низкое неспецифическое связывание метки. Однако данный метод анализа почти не используется в лабораторной практике из-за необходимости применения радиоизотопов, время жизни которых ограничено, необходимости использования специального оборудования для работы с радиоактивными веществами, а также проблем, связанных с утилизацией радиоактивных отходов [51].

Флуоресцентные метки в иммуноанализе пестицидов

Флуоресцентные метки активно используются в иммуноанализе. Аналитическим сигналом могут быть интенсивность флуоресценции, поляризация

флуоресценции, тушение флуоресценции. В качестве флуоресцентных меток наиболее часто используют синтетические красители, в частности фикоэритрин и производные флуоресцеина, реже - квантовые точки.

Необходимый реагент для иммунохимических методов анализа – антитела, специфичные к анализируемому соединению. Низкомолекулярные соединения, такой как карбарил, не способны сами по себе индуцировать иммунный ответ. К настоящее время, возможно, получение антител как против высокомолекулярных соединений - белков, так и против низкомолекулярных соединений - лекарств, наркотических веществ, пестицидов. Для получения антител против карбарила иммунизируют иммуногеном, который представляет собой конъюгат белка с гаптеном [52].

Самый распространенный вариант иммуноферментного анализа (ИФА) – гетерогенный твердофазный иммуноанализ – был применен для анализа многих пестицидов. Существует 2 основных формата гетерогенного твердофазного ИФА – прямой, в котором ферментная метка соединена либо с конкурирующим антигеном, либо с антителами, специфичными анализируемому соединению, и непрямой, в котором комплекс антигена со специфичными к нему антителами выявляют с помощью антивидовых антител, меченных ферментом (рис 6).

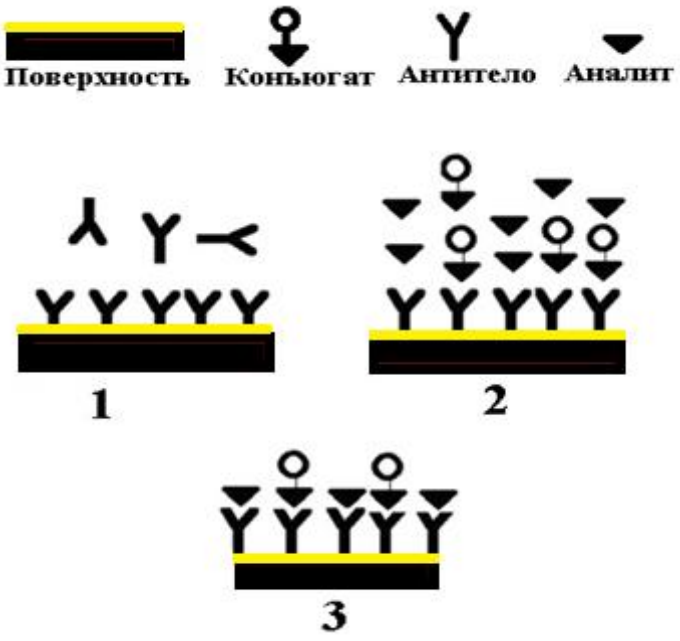


Рисунок 6. Схема конкурентного иммуноферментного анализа для определения карбарила

Карбарил, как большинство пестицидов является моновалентным антигеном, поэтому его детектируют, в основном, посредством конкурентных прямых схем ИФА с иммобилизованными на твердом носителе антителами против карбарила и пестицидом, меченным ферментом (таблица 4). IC_{50} , или концентрация полумаксимального ингибирования, — показатель эффективности лиганда-ингибитора при ингибирующем биохимическом или биологическом взаимодействии. IC_{50} является количественным индикатором, который показывает, сколько нужно лиганда-ингибитора для ингибирования биологического процесса на 50 %. IC_{10}-(предел обнаружения) - является количественным индикатором, который показывает, сколько нужно лиганда-ингибитора для ингибирования биологического процесса на 10 % (рис. 7) [53].

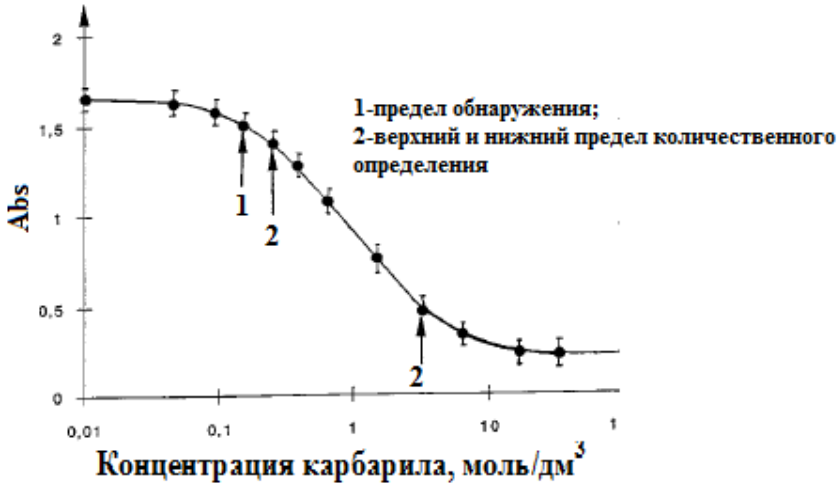


Рисунок 7. Наглядное изображение IC_{50} и IC_{10}.

В данной работе предложено заменить ферментную на металлическую медную метку, в связи с высокой стабильностью металла, дешевизной, а также возможностью одновременной регистрации оптических и электрохимических сигналов от данной метки.

Благодаря своим уникальным физическим и химическим свойствам НЧ Cu обладают широким спектром возможностей практического применения,

следовательно, они способны заменить более дорогие благородные металлы [54].Однако имеются и недостатки, связанные с быстрой деградацией в условиях получения биоконьюгатов, но путем введения дополнительных стабилизаторов решают данную проблему.

Таблица 4.

Обзор иммунохимических способов определения карбарила в различных объектах

Метод/Конъюгат	IC50	Диапазон линейности	Предел обнаружения IC10	Объект исследования	Ссылка
Конкурентный прямой ИФА/Конъюгат гаптена карбарила с пероксидазой хрена	2,0 мкг/кг	0,01-50 мкг/кг	0,16 мкг/кг	Яблочный и апельсиновый соки	[55]
Конкурентный прямой ИФА/Конъюгат гаптена карбарила с периоксидазой хрена	2,0 мкг/л	0,5-20,0 мкг/л	0,15 мкг/л	Фруктовые соки	[56]
Конкурентный прямой ИФА/Моноклональные антикарбарильные антитела и конъюгат гаптена с флуоресцентными трассерами	0,00005 мкг/л	60,0-650,0 мкг/кг	20,0 мкг/кг	Овощи	[57]

Продолжение таблицы 4

Конкурентный анализ/ Конъюгат гаптена карбарила с щелочной фосфатазой	15,0 мкг/л	3,5–76,0 мкг/л	1,6 мкг/л	Яблоко, груша	[58]
Конкурентный непрямой анализ / пьезоэлектрический иммуносенсор с гаптен-белковым конъюгатом	0,41 мкг/л	0,11–1,44 мкг/л	0,05 мкг/л	Мёд	[59]
Конкурентный непрямой анализ / пьезоэлектрический иммуносенсор с гаптен-белковым конъюгатом	1,15 мкг/л	0,11-11,68 мкг/л	0,03 мкг/л	Модельные растворы	[60]
Конкурентный прямой ИФА / молекулярно-отпечатанные полимеры на бумаге с гаптен-белковым конъюгатом	116,0 мкг/л	1,0-1000,0 мкг/л	7,0 мкг/л	Рис и пекинская капуста	[61]

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.

1.2.4 Электрохимические методы определения карбарила

Карбарил и его продукты, полученные в результате разложения или метаболизма, образуют остатки, которые могут распространяться в окружающей среде и особенно часто являются загрязнителями в поверхностных и грунтовых водах, в почве, а также в сельскохозяйственных и пищевых продуктах. Электрохимические методы активно используется для определения процессов окисление карбарила. Кроме того, использование электрохимических методов анализа в сочетании со спектроскопическими методами может предоставить важную информацию для определения путей разложения пестицидов в водных растворах и, таким образом, для имитации процессов в окружающей среде.

Существует широкий спектр исследований, связанных с аналитическими методами определения карбарила в пробах продуктах питания и окружающей среды. Большинство применений химического анализа карбарила включают методы с высокой чувствительностью и точностью. При выборе метода стоимость оборудования и возможность проведения измерений на месте отбора пробы, также являются важными факторами, которые следует учитывать. Поскольку электрохимические методы удовлетворяют большинству вышеперечисленным критериям, они были хорошим выбором для анализа и контроля карбарила в окружающей среде.

Четыре карбамата были гидролизованы в слабощелочных водных растворах, что привело к образованию 2-втор-бутилфенола, 2-изопропилфенола, м-крезола и 1-нафтола, что можно было определить амперометрическим методом после капиллярного электрофоретического разделения. В выбранных оптимальных условиях четыре аналита могут быть полностью разделены за 23 мин. Линейные диапазоны для 2-втор-бутилфенола, 2-изопропилфенола и м-

крезола составляли от $1{,}0\cdot10^{-7}$ до $2{,}0\cdot10^{-5}$ моль $л^{-1}$, а для α-нафтола - от $2{,}0\cdot10^{-7}$ до $2{,}0\cdot10^{-5}$ моль $л^{-1}$ и их пределы обнаружения составляли $3{,}0\cdot10^{-8}$, $3{,}0\cdot10^{-8}$, $3{,}0\cdot10^{-8}$ и $6{,}0\cdot10^{-8}$ моль $л^{-1}$, соответственно (S/N = 3) [62].

Для определения карбаматных пестицидов использовался потенциометрический биосенсор инъекционного типа. Принцип действия биосенсора основан на ингибировании фермента пестицидами, которое зависит от концентрации присутствующих пестицидов. Сенсорная система состояла из реактора с ацетилхолинэстеразой, иммобилизованной на стекле с контролируемыми порами, и детектора с трубчатым H + -селективным мембранным электродом. Установленный протокол датчика был применен к анализу девяти карбаматных пестицидов. Все пестициды в концентрации 10^{-6} М подавляли сенсорный фермент, что свидетельствует о полезности разработанного метода. Обработка ингибированного фермента пиридин-2-альдоксимом восстанавливала почти всю активность фермента, что позволяло многократно использовать датчик. Были получены калибровочные кривые для карбарила и карбофурана в диапазоне концентраций 10^{-11}-10^{-4} М. Нижние пределы обнаружения составили 10^{-10} М и 10^{-11} М соответственно [63].

Наиболее широкую группу электрохимических методов по определению карбарила составляет вольтамперометрия. При этом известны вольтамперометрические способы регистрации прямых окислительных сигналов карбарила на разных электродных материалов, которые представлены в таблице 5.

Таблица 5

Вольтамперометрические способы определения карбарила в различных объектах.

Материал электрода/ модификатор	Метод определения	Диапазон линейности, моль/дм^3	Предел обнаружения, моль/дм^3	Объект исследования	Ссылка
Прямое электрохимическое определение карбарила					
Алмазный электрод легированный бором	ЦВА	2,5–30,0·10^{-6} моль/дм^3	24,52·10^{-6} моль/дм^3	Природные воды	[64]
Графеновый электрод, модифицированный нанотрубками оксида титана	ЦВА	20,0– 40,0·10^{-6} моль/дм^3	1,27·10^{-6} моль/дм^3	Природные воды	[65]
Трафаретные электроды, модифицированные наночастицами золота и оксидом графена	ЦВА и дифференциальные импульсные вольтамперометрия	1,0–250,0·10^{-3} моль/дм^3	0,22·10^{-3} моль/дм^3	Огурец и рис	[66]
Углеродный электрод, модифицированный нанотрубками и фталоцианином кобальта	Вольтамперометрия с прямоугольной разверткой поткенциала	0,33 до 6,61 моль/дм^3	5,46·10^{-9} моль/дм^3	Природная вода	[67]

Продолжение таблицы 5

Стеклоуглеродный электрод, модифицированный оксидно-ионным жидким композитом	ЦВА	0,10–12.0 10^{-3} моль/дм^3	0,02·10^{-3} моль/дм^3	Фрукты	[68]
Графитовый электрод с обновляемой поверхностью, модифицированный наночастицами золота, хитозана и ионной жидкостью	ЦВА	0,89–44,6 10^{-9} моль/дм^3	0,68·10^{-9} моль/дм^3	Капуста и яблоки	[69]
Графитовый электрод, модифицированный частицами оксидами кобальта (II) и графена	ЦВА и дифференциально импульсная вольтамперометрия	0,5 –200,0·10^{-6} моль/дм^3	7,5·10^{-6} моль/дм^3	Овощи, фрукты	[70]

Из проведенного литературного обзора следует, что существующие прямые способы вольтамперометрического определения карбарила происходит с использованием рабочих электродов, в состав которых включены наночастицы металлов (Cu, Ag, CoO, Au, TiO_2 и др.). Кроме того, авторами предложены в качестве электродных модификаторов углеродные нанотрубки, роль которых заключается в увеличении электроактивной площади поверхности электродов и участие микропримесей металлов и/или их оксидов в окислении пестицидов. Зачастую способы модификации индикаторных электродов сложны и многостадийны и не позволяют получить воспроизводимые аналитические сигналы от карбарила, что влияет на результаты его определения в разных объектах при рутинном анализе. Для прямого вольтамперометрического определения карбарила необходима сложная пробоподготовка выделения карбарила из объектов исследования и многоэтапная процедура модификации электродов [64-70].

1.2.5 Электрохимические биосенсоры для определения карбарила

Ферментные электрохимические сенсоры

Альтернативным методом для определения карбарила является ферментные электрохимические сенсоры для определения карбарила в объектах окружающей среды, в пищевых и клинических образцах [71]. Косвенные ферментные электрохимические способы на основе ацетилхолиэстеразы для обнаружения карбаматных пестицидов появились в 1980 году для преодоления некоторых ограничений традиционного анализа. В течение последних двух десятилетий постоянно разрабатываются новые косвенные методы для обнаружения этих загрязнителей. Например, для определения карбаматных пестицидов в различных объектах были разработаны мембранные, золь-гелевые, квантово-точечные биосенсоры на основе AchE и наночастиц металов с амперометрической детекцией [72-74].

Немало работ посвящено косвенным способам определения карбарила методом вольтамперометрии, основанные на ингибировани сигналов от ферментов, каких как бутирилхолинэстеразы и ацетилхолинэстеразы. В таблице 6 представлены вольтамперометрические методы определения карбарила с использованием ферментных биосенсоров, которые основаны на косвенной регистрации электрохимического сигнала от продуктов или исходного субстрата ферментных реакций.

Таблица 6

Ферментные электрохимические сенсоры для определение карбарила

Материал электрода/ модификатор	Метод определения	Диапазон линейности, моль/дм^3	Предел обнаружения, моль/дм^3	Объект исследования	Ссылка
Платиновый электрод, модифицированный композитом полианилина и оксида графена электрохимическим способом. На поверхность иммобилизован фермент AchE	Дифференциальная импульсная вольтамперометрия	0,01–0,3·10^{-3}	0,136·10^{-3}	Апельсин, груша и виноград	[75]
Углеродный электрод с использованием медиатора соли рутения (III). Основано на ингибировани и и окислении тиохолина	ЦВА	1,0·10^{-13} до 1,0·10^{-6}	0,3·10^{-12}	Вода, почва	[76]

Продолжение таблицы 6

Золотой электрод с иммобилизацией фермента AchE	ЦВА	2,0 до $30,0 \cdot 10^{-6}$	$9,0 \cdot 10^{-6}$	Природная вода, томаты и яблоки	[77]
Модифицированный электрод оксидом графена и золота на основе 3-карбоксифенилбороновой кислоты с использованием фермента AchE	ЦВА	$0,1–100,0 \cdot 10^{-6}$	$0,05 \cdot 10^{-6}$	Продукты питания	[78]
Трафаретный электрод, модифицированный дисперсией углерода/ с использованием BChE	ЦВА	до $30,0 \cdot 10^{-6}$	$5,0 \cdot 10^{-6}$	Сточные воды	[79]

Косвенное электрохимическое определение карбарила с использованием ферментов имеют ряд недостатков, связанных с низкой селективностью определения, т.к. все карбаматные пестициды оказывают ингибирующее действие на AChE и BChE. Кроме того, выбранные ферменты малостабильны и имеют высокую стоимость.

1.2.6 Электрохимические иммуносенсоры

Сочетание современных высокочувствительных методов обнаружения с иммуноанализом привело к созданию иммуносенсоров [80]. Преобразование сигнала в иммуносенсорах может осуществляться – изменением свойств или

генерацией сигналов, которые происходят после формирования комплекса антиген-антитело. Антитела - белки, произведенные иммунной системой, чтобы определить наличие карбарила. Между антителами и антигенами возникают межмолекулярные связи нековалентной природы. При использовании прямого метода определения предполагается введение метки в антиген или антитела. В качестве меток могут выступать ферменты, нанокомпоненты, флуоресецнтные соединения. Непрямые методы имеют такие преимущества как, менее жесткие требования к подготовке и очистке чувствительного элемента и большой потенциал для последующей модификации [81].

Используя моноклональные антитела и подходящие конъюгаты для анализа в качестве специфических иммунореагентов, были разработаны иммуносенсоры для анализа остатков пестицидов в экологических и агропродовольственных матрицах с использованием поверхностого плазмонного резонанса (SPR) и пьезоэлектрических кварцевых микровесов (QCM). Оба типа иммуносенсоров были основаны на конкурентных форматах ИФА. Иммуносенсоры поверхностного плазмонного резонанса были разработаны для загрязняющих веществ, принадлежащих к разным химическим семействам: N-метилкарбамат (Карбарил), фосфорорганические (хлорпирифос) и хлорорганические (ДДТ) инсектициды, метаболит 3,5,6-трихлор-2-пиридинол (TCP), фунгицид тиабендазол. (TBZ) и пластификатор бисфенол А (BPA). Большинство иммуносенсоров поверхностного плазмонного резонанса обладают чрезвычайно высокой чувствительностью, что позволяет применять их для прямого анализа проб овощей или упакованных пищевых продуктов, и даже проб воды на нормативных уровнях. Также были разработаны пьезоэлектрические иммуносенсоры для карбарила. Несмотря на то, что пьезоэлектрические иммуносенсоры менее чувствительны, чем иммуносенсоры поверхностного плазмонного резонанса, они позволяют точно определять целевые соединения во фруктовых соках на уровне ПДК. Для иммуносенсора поверхностного плазмонного резонанса для определения карбаматных пестицидов линейный диапазон равен от 0,06 до 0,8 мкг·л$^{-1}$, IC_{50}- 0,38 мкг·л$^{-1}$, для пьезоэлектрического

иммуносенсора для определения карбаматных пестицидов линейный диапазон равен от 1,0 до 11,0 мкг·л$^{-1}$, IC_{50}- 30,0 мкг·л$^{-1}$ [82]. На сегодняшний день в литературе не найдены вольтамперометрические иммуносенсоры для определения карбаматных пестицидов, включая карбарил.

На основании вышеизложенного можно сделать вывод, что ферментные биосенсоры обладают высокой чувствительность и простотой в использовании, однако, не обладают селективностью, малой стабильностью фермента, а также высокой стоимостью реагентов для получения биосенсора. Электрохимические биосенсоры используют различные модификаторы поверхности для определения карбарила. Однако данные биосенсоры имеют ряд значительных недостатков: высокая стоимость, сложная пробоподготовка и нанесения этих модификаторов на поверхность электрода. Вольтамперометрические способы определения карбарила имеют ряд преимуществ, такие как, дешевизна, простота использования, возможность определения в полевых условиях. Однако данный способ имеет низкую селективность, необходимость использования дорогостоящих модификаторов поверхности для повышения чувствительности, а также необходимость предварительного разделения карбаматных пестицидов. Иммуносенсоры обладают высокой селективностью, чувствительностью, но также имеется ряд недостатков – высокая стоимость реагентов и низкая стабильность. В связи с этим поиск и разработка чувствительных, селективных и недорогих вольтамперометрических способов определения карбарила на сегодняшний день является актуальной исследовательской задачей.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Реактивы и материалы

Для исследования электрохимических свойств карбарила использовались следующие реактивы: серная кислота H_2SO_4 (ГОСТ 4204-77, х.ч.), спирт этиловый очищенный 96% C_2H_5OH (ГОСТ Р 51723-2001, х.ч.), хлорид калия KCI (ГОСТ 4568-95, х.ч), перхлорат натрия $NaClO_4$ (ГОСТ Р 12257-93, х.ч), карбарил $C_{12}H_{11}NO_2$ (ГСО 7709), графит микрокристаллический (<20μm, Sigma-Aldrich, США), полистирол C_8H_8 (Sigma-Aldrich, США), 1,2-дихлорэтан $C_2H_4Cl_2$ (Sigma-Aldrich, США). Для исследования электрохимических свойств тиоловых соединений использовались следующие реактивы: серная кислота H_2SO_4 (ГОСТ 4204-77, х.ч.), спирт этиловый очищенный 96 % C_2H_5OH (ГОСТ Р 51723-2001, х.ч.), L-Глутатион 98 % $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ (окисленный GSH, восстановленный GSSG) (Sigma-Aldrich), боратный буферный раствор pH 9,18 (стандарт-титр для приготовления образцовых буферных растворов для pH-метрии), хлорид калия KCI (ГОСТ 4568-95, х.ч). Стандарт карбарила, бычий сывороточный альбумин (БСА), хитозан, глутаровый альдегид (ГА), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид гидрохлорид (EDC), дициклогексилкарбодиимид (DCC), 1-гидрокси-2,5-пирролидиндион (NHS), этиловый спирт 96 % – все перечисленные вещества производства Sigma-Aldrich (США). Ацетат меди $(CH_3COO)_2Cu$ (ГОСТ 5852-79), уксусная кислота CH_3COOH (ГОСТ Р 55982-2014), натрий фосфорноватистокислый 1-водный $NaH_2PO_2 \cdot H_2O$ (ГОСТ 200-76), аскорбиновая кислота $C_6H_8O_6$ (ГОСТ Р 55517-2013), н-гексан C_6H_{14} (ХЧ) (ТУ 2-008-06), гидроокись натрия NaOH (ГОСТ 4328-77) – все перечисленные вещества произведены в Российской Федерации. Моноклональные антитела против карбарила (MAb anti-CNH 1B7) и гаптен карбарила, содержащий карбоксильную группу (Car 6C), предоставил проф. Чжан Ци из Научно-исследовательского института масличных культур Китайской сельскохозяйственной академии

(г.Ухань, Китай). Все растворы, использованные в данном эксперименте, были приготовлены с использованием деионизированной воды.

2.2 Разработка вольтамперометрической методики определения карбарила на модифицированном углеродными чернилами ГЭ

В работе исследованы электрохимические свойства карбарила методом вольтамперометрии на немодифицированном и модифицированном углеродными чернилами ГЭ. Все необходимые эксперименты проводились на вольтамперометрическом анализаторе ТА–Lab (производство НПП «Томьаналит» г. Томск). Аналитические сигналы, регистрируемые в виде волны тока, преобразовывались в режиме первой производной dI/dE – E, где аналитические сигналы наблюдались в форме пиков. В качестве фонового электролита использовали спиртовой раствор перхлората натрия 0,1 М. В качестве рабочего электрода использовали импрегнированный графитовый электрод, который получают путем пропитки под вакуумом заготовок из спектрального угля эпоксидными смолами, предоставленный лабораторией микропримесей Томского политехнического университета, а вспомогательный и электрод сравнения представляли собой хлоридсеребряные электроды. Рабочий раствор карбарила готовили путем растворения определенной навески ГСО в этиловом спирте. Модификатор представлял собой дисперсию 0,09 г микрокристаллического графита в 0,5 $см^3$ 1,2-дихлорэтана и 0,01 г полистирола. Для создания гомогенной суспензии необходимо в течение 3 мин интенсивно перемешивать при помощи шейкера ElmySkyline. 5 мкл полученной суспензии наносили на поверхность рабочего электрода и высушивали в течение 1 минуты.

Исследование электрохимических свойств карбарила на немодифицированном и модифицированном углеродными чернилами ГЭ проводилось в диапазоне потенциалов от -1,5 до +1,5 В при ν=70 мВ/с. Контрольные эксперименты по доказательству правильности подобранных

условий включали введение в электрохимическую ячейку этилового спирта в объемах, соответствующих объемам раствора исследуемого карбарила.

2.3 Разработка электрохимического иммуносенсора на основе гаптен-белкового конъюгата (Нар-Car-БСА@НЧCu) для определения карбарила

2.3.1 Синтез НЧ Cu, стабилизированные хитозаном

Первоначально были синтезированы НЧ Cu, стабилизированные хитозаном, в соответствии с протоколом [83]. Восстановление моногидрата ацетата меди (II) $(CH_3COO)_2Cu \cdot H_2O$ проводили в присутствии 1%-ного раствора хитозана, который предварительно разбавляли в 0,5 моль/дм^3 уксусной кислоте CH_3COOH. Смесь соли меди и хитозана интенсивно перемешивали и нагревали с обратным холодильником при температуре 140°C в течение 3 часов. Впоследствии, добавляли по каплям к начальному реакционному раствору 5 мл 1,0 моль/дм^3 раствора гипофосфита натрия и 5 мл 0,42 моль/дм^3 аскорбиновой кислоты и перемешивали 30 минут. Этапы синтеза представлены на рисунке 8.

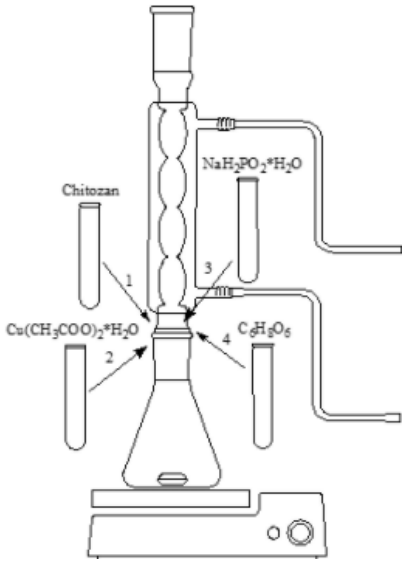


Рисунок 8. Этапы синтеза НЧ меди, стабилизированных хитозаном: 1 – добавление в колбу раствора хитозана, 2 – добавление водного раствора моногидрата ацетата меди (II) в колбу, 3 – добавление гипофосфита натрия, 4 – добавление аскорбиновой кислоты.

После синтеза НЧ Cu для увеличения времени стабильности было изменено pH раствора с 2,0 на слабощелочную pH 7,2. Для получения слабощелочной среды вводили раствор NaOH 0,1 моль/дм^3 по каплям с последующим центрифугированием при 0°C, 14000 об/мин, в течение 20 мин. После центрифугирования осадок НЧ меди ресуспендировали в фосфатном буферном растворе (ФБР) с pH 7,0 объемом 1,0 см^3 [84-85].

2.3.2 Синтез конъюгата Нар-Car-БСА@CuNP

Конъюгат Нар-Car-BSA@CuNP синтезировали карбодиимидным методом. Для этого к 500 мкл 10 ммоль пестицидного производного Car 6C в диметилформамиде добавили по 100 мкл DCC (20 ммоль) и NHS (20 ммоль); смесь инкубировали в течение 12 ч при перемешивании. После инкубации, к активированному соединению добавили 1,0 см^3 0,6 % раствора БСА и 1,0 см^3 раствора НЧ Cu. Продолжили инкубацию при комнатной температуре в течение 3 часов, при постоянном перемешивании на высокоскоростном термошейкере (BioShake IQ, Германия), скорость перемешивания 600 об/мин.

Очистку конъюгата Нар-Car-БСА@CuNP от несвязанных компонентов осуществляли методом центрифугирования при скорости 25000 об/мин и температуре +4°C, 30 минут. Надосадочную жидкость отделяли, осадок ресуспендировали в 1 см^3 ФБР pH 7.0. Конъюгат Нар-Car-БСА@CuNP помещали для хранения в холодильник при температуре +4°C.

2.3.3 Физико-химические методы исследования свойств НЧ Cu и конъюгата Нар-Car-БСА@CuNP

Морфологию НЧ Cu и конъюгата Нар-Car-БСА@CuNP определяли с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с контрастированием белков 1,0% раствором молибденовокислого аммония на просвечивающем электронном микроскопе Philips CM12 (FEI Electron Optics, Нидерланды), предоставленном ТПУ (Томск, Россия). Расчеты средних размеров НЧ Cu и конъюгата Нар-Car-BCA@CuNP по изображениям ПЭМ были выполнены с помощью программного обеспечения Fiji (www.fiji.sc) и Origin Pro 8.0 (OriginLab, США). Для каждого образца взяли не менее десяти

репрезентативных изображений. Распределение частиц по размерам получали путем подсчета по меньшей мере 100 частиц для каждого образца.

Запись спектров поглощения НЧ меди и конъюгата Нар-Car-БСА@CuNP осуществляли на спектрофотометре Agilent Cary 60 (США). Запись спектров динамического рассеяния света (ДРС) НЧ Cu и конъюгата Нар-Car-БСА@CuNP осуществляли с помощью системы определения размеров частиц Nicomp 380ZLS (Particle Sizing Systems, Флорида, США), оснащенной зеленым лазерным источником возбуждения при 532 нм / 50 мВт.

2.3.4 Методика иммобилизации моноклональных антител на поверхности ЗГЭ

На первой стадии разработки электрохимического иммуносенсора осуществляли модификацию золотографитового электрода (ЗГЭ) захватывающими антителами. Электрод в виде золотых микроэлектродных ансамблей на графитовой подложке готовили путем электролиза раствора золотохлористоводородной кислоты концентрации 0,005 моль/дм^3 в режиме электрохимического транзиента при скорости изменения потенциала 5 мВ/с, в диапазоне потенциалов от -0,55 В до +0,05 В [86]. 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. Схема иммобилизации антител на поверхности ЗГЭ представлена на рисунке 9.

Рисунок 9. Схема модификации поверхности ЗГЭ захватывающими антителами

Способ 1. В качестве гомофункционального кросс-линкера использовали глутаровый альдегид (ГА). ЗГЭ тиолировали $1{,}0 \cdot 10^{-2}$ моль/дм^3 раствором глутатиона (GSH) в течение 8 часов, ополаскивали и опускали в раствор ГА $1{,}0 \cdot 10^{-2}$ моль/дм^3 pH 8,0 на 40 мин. Далее на поверхность ГЭ наносили раствор антител 200 мкл в разведении (18/45), инкубацию проводили в течение 60 минут при 22 °С. Электрод ополаскивали и блокировали 1,0 % раствором казеина в течение 40 минут. После каждого этапа электрод трехкратно ополаскивали раствором ФБР pH 7,0.

Способ 2. В качестве гетеробифункциональных кросс-линкеров использовали смесь EDC/NHS. ЗГЭ тиолировали $1{,}0 \cdot 10^{-2}$ моль/дм^3 раствором GSH в течение 8 часов. ГЭ сушили в аргоне и активировали в ФБР (pH 7,0), содержащем 0,002 моль/дм^3 EDC и 0,005 моль/дм^3 NHS в течение 2 часов 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 минут при 22°С. Электрод трехкратно ополаскивали раствором ФБР pH 7,0 [87-88].

2.3.5 Определение карбарила с использованием электрохимического иммуносенсора

После иммобилизации захватывающих антител на поверхность ЗГЭ раскапывали конъюгат Hap-Car-BSA@CuNP без аналита. Инкубирование проводили в течение 60 минут при 22°С. После инкубирования электрод трижды

ополаскивали ФБР и помещали в э/х ячейку для регистрации максимального сигнала окисления медной метки конъюгата (I_{max}). Для проведения конкурентного анализа карбарила осуществляли смешивание 20 мкл конъюгата Нар-Car-BSA@CuNP и 20 мкл стандартного раствора карбарила в рабочем разведении. Смесь наносили на поверхность ГЭ и проводили инкубирование в течение 60 минут при 22°С. После инкубирования электрод трижды ополаскивали ФБР и помещали в э/х ячейку и регистрировали сигнал окисления медной метки конъюгатов в присутствии конкурента – карбарила (I_s).

Все электрохимические измерения проводили на вольтамперометрическом анализаторе ТА-Lab (производство НПП «Томьаналит», г.Томск). В качестве индикаторного электрода использовали ЗГЭ. Регистрацию электрохимического сигнала окисления меди конъюгата Нар-Car-BSA@CuNP осуществляли в режиме инверсионной анодной вольтамперометрии в диапазоне потенциалов -0,2 В до +0,65 В при υ=70 мВ/с. Потенциал накопления составил $E_{накоп}$.= -1,3 В, время накопление $t_{накоп}$=70 сек. В качестве вспомогательного и электрода сравнения использовали Ag|AgCl (1М KCl). В качестве фонового электролита использовали 0,2 моль/дм^3 муравьиновую кислоту. Регенерацию поверхности ГЭ осуществляли механическим способом с использованием фильтровальной бумаги.

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:

$$Inhibition = \frac{(I_{max} - I_{\min}) - (I_s - I_{\min})}{(I_{max} - I_{\min})} \times 100\% \qquad 2$$

I_{max} – интенсивность тока окисления меди конъюгата Нар-Car-BSA@CuNP в отсутствие карбарила; I_{min} – ток окисления меди конъюгата Нар-Car-BSA@CuNP без антител на поверхности электрода; I_s - интенсивность тока окисления меди конъюгата Нар-Car-BSA@CuNP в присутствии карбарила [89]. IC_{50} является количественным индикатором, который показывает, сколько нужно карбарила для ингибирования сигнала окисления меди конъюгата на 50 %. IC_{10}-(предел

обнаружения) - является количественным индикатором, который показывает, сколько нужно карбарила для ингибирования сигнала окисления меди конъюгата на 10 % [53].

2.4 Пробоподготовка зерновых культур

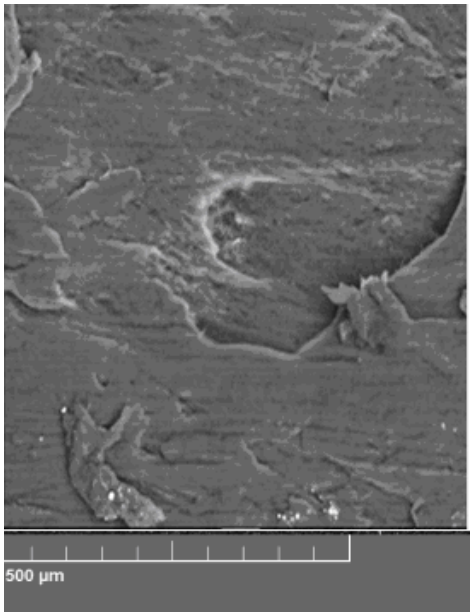
Для апробации новых вольтамперометрических способов определения карбарила проводили его определение в некоторых зерновых культурах−пшеница (производитель «Экофермер», г. Краснодар, Россия), овёс в оболочке (производитель «Образ жизни», г. Барнаул, Россия) и кукуруза (производитель Regmarkets, г. Москва, Россия). Зерно измельчали в гомогенизаторе. Навески образцов зерновых культур по 10,0 г заливали 200,0 $см^3$ 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 % этиловый спирт и очищенную воду до концентрации спирта 10 %.

Определение карбарила в образцах кукурузы, овса и пшеницы предварительно проводили методом ВЭЖХ [33] для установления точной концентрации. Процедуру экстрагирования карбарила проводили по схожему протоколу, описанному выше. Для оценки правильности методики определения карбарила образцы некоторых зерновых культур искусственно контаминировали карбарилом на 3х уровнях концентрации.

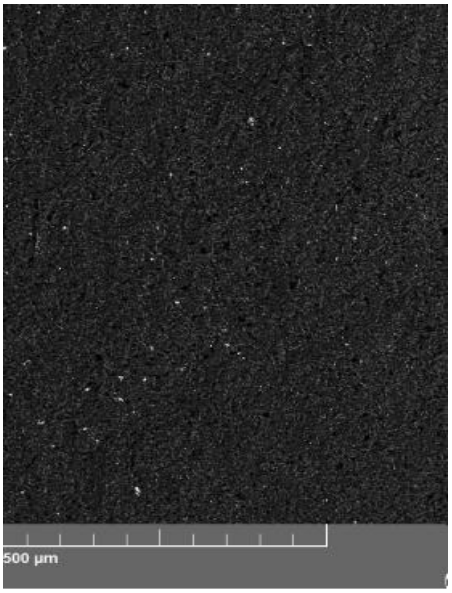
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Вольтамперометрическое определение карбарила на модифицированном углеродными чернилами ГЭ

Для улучшения чувствительности определения карбарила, увеличения диапазона его определяемых концентраций проведены исследования по электрохимическому поведению карбарила на немодифицированном и модифицированном углеродными чернилами ГЭ. Поверхности ГЭ до и после модификации углеродными чернилами была исследована методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (рис. 10)



А



Б

Рисунок 10. СЭМ ГЭ до (А) S= 0,013 $см^3$ и после модификации углеродными чернилами (Б) S= 0,103 $см^3$.

Образец А представляет собой поверхность чистого ГЭ, на которой наблюдалась выборочная микропористость и шероховатость (рис. 10А). На микроскопическом снимке (рис. 10Б) наблюдался прочный однородный слой углеродных чернил в качестве модификатора на поверхности ГЭ.

Для исследования электропроводящих свойств поверхностей ГЭ до и после модификации использовали стандартный прием записи циклических вольтамперограмм окислительно-восстановительной пары

$K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (рис. 11), а для расчета электроактивных площадей поверхностей электродов использовали уравнение Рэндлса-Шевчика [90] (3):

$$Ip = \pm 2,69 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot C \cdot \nu^{1/2} \qquad 3$$

где: Ip-ток пика, А;

z-число электронов (n=1);

А-площадь электроактивной поверхности, $см^2$;

D - коэффициент диффузии ($7,60 \cdot 10^{-6} см^2/с$);

С - концентрация $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ в растворе ($1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/$дм^3$).

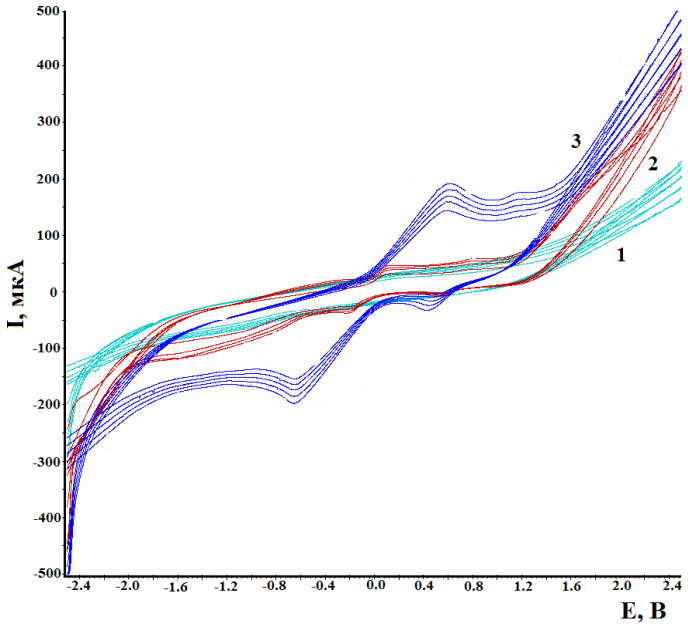


Рисунок 11. Циклические вольтамперограммы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/$дм^3$ на немодифицированном (2) и модифицированном углеродными чернилами ГЭ (3) в фосфатном буферном растворе при pH=6,86, ν=70мВ/с (1) – фоновая кривая.

Согласно рис. 11 модификация углеродными чернилами ГЭ способствует увеличению сигналов окисления-восстановления $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$, а рассчитанная площадь поверхности ГЭ без модификации составляла 0,013 $см^2$, в то время как после модификации в 10 раз больше 0,103 $см^2$. Таким образом, на стандартной окислительно-восстановительной системе $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ показана эффективность применения модификатора за счет увеличения

электроактивной площади поверхности. Для дальнейших исследований электрохимических свойств карбарила использовали модифицированный углеродными чернилами ГЭ.

На рис. 12 представлены циклические вольтамперограммы окисления-восстановления карбарила на модифицированном углеродными чернилами ГЭ. На немодифицированном ГЭ сигнал от карбарила не наблюдался.

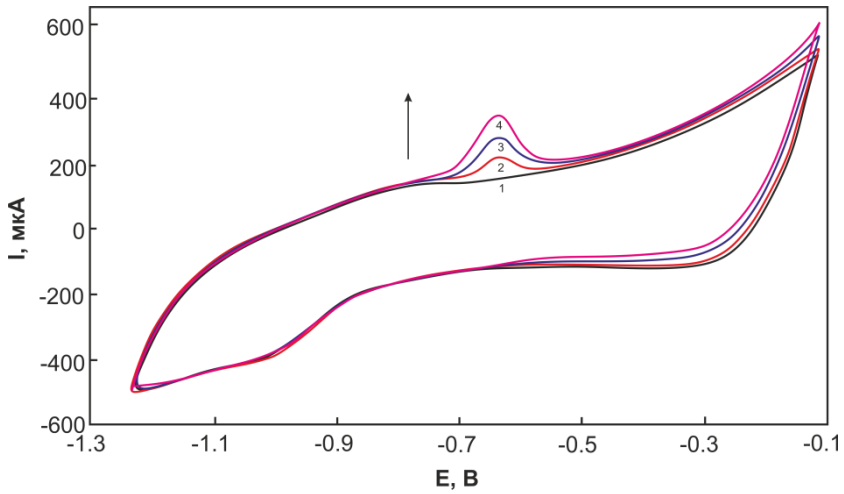


Рисунок 12. ЦВА карбарила на модифицированном углеродными чернилами ГЭ. 1–фоновый электролит 0,1 моль/дм^3 спиртовой раствор (96%) $NaClO_4$; разные добавки 96% спиртового раствора карбарила: 2–$0{,}4\cdot10^{-6}$ моль/дм^3; 3–$0{,}8\cdot10^{-6}$ моль/дм^3; 4–$1{,}2\cdot10^{-6}$ моль/дм^3; ν=70 мВ/с.

На циклических вольтамперограммах наблюдается пик окисления карбарила при -0,6 В, который увеличивался от вводимой концентрации карбарила и отсутствует обратный пик восстановления карбарила, что указывает на необратимость электродного процесса окисления карбарила в диапазоне потенциалов от -1,5 до +1,5 В (рис. 12). Все дальнейшие исследования электрохимических свойств карбарила проводились с использованием анодной вольтамперометрии в режиме первой производной.

На рис. 13 представлены вольтамперограммы окисления карбарила на модифицированном углеродными чернилами ГЭ.

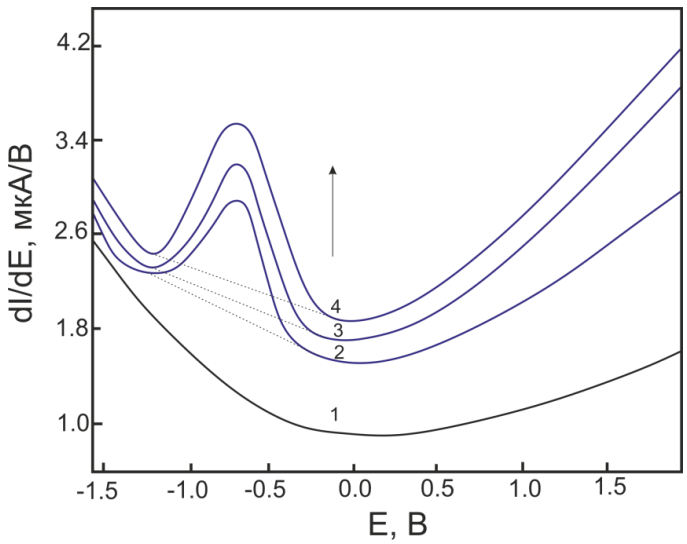


Рисунок 13. Анодные вольтамперограммы карбарила 1 – фоновая кривая спиртового раствора $NaClO_4$ 0,1 моль/дм^3, разные добавки 96% спиртового раствора карбарила: 2–0,4·10^{-7} моль/дм^3 (0,08 мкг/кг), 3–0,6·10^{-7} моль/дм^3 (0,12 мкг/кг); 4–0,8·10^{-7} моль/дм^3 (0,16 мкг/кг). Рабочий электрод – модифицированный углеродными чернилами ГЭ; ν=70 мВ/с.

На рис. 14 представлена градуировочная зависимость карбарила в диапазоне от 0,04 до 0,32 мкг/кг на модифицированном углеродными чернилами ГЭ.

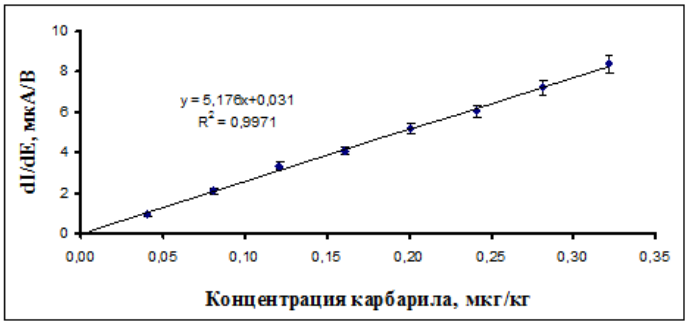


Рисунок 14. Градуировочная зависимость карбарила в диапазоне концентраций от 0,04 до 0,32 мкг/кг на модифицированном углеродными чернилами ГЭ.

Для проверки правильности рабочих условий вольтамперометрического определения карбарила в модельных растворах использовали метод «введено-найдено». Результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7

Проверка правильности определения карбарила методом «введено-найдено» методом вольтамперометрии.

№	Введено, мкг/кг	Найдено, мкг/кг	Δ, %
1	0,080±0,004	0,076±0,003	±5,00
2	0,161±0,008	0,155±0,007	±5,00
3	0,24±0,01	0,23±0,01	±5,00

На основании полученных результатов определение карбарила на модифицированном углеродными чернилами ГЭ в модельных растворах методом вольтамперометрии возможна при соблюдении следующих условий: фоновый электролит-спиртовой раствор $NaClO_4$ 0,1 моль/дм^3, диапазон потенциалов от -1,5 до +1,5 В, градуировочная зависимость карбарила наблюдается от 0,04 до 0,32 мкг/кг.

3.1.1 Исследование электродного процесса электроокисления карбарила на модифицированном углеродными чернилами ГЭ

Для изучения механизма электроокисления карбарила было исследовано влияние скорости развертки потенциала на сигнал окисления в интервале от 5 до 100 мВ/с. Как видно из рисунка 15, с увеличением скорости развертки потенциала происходит увеличение тока окисления карбарила.

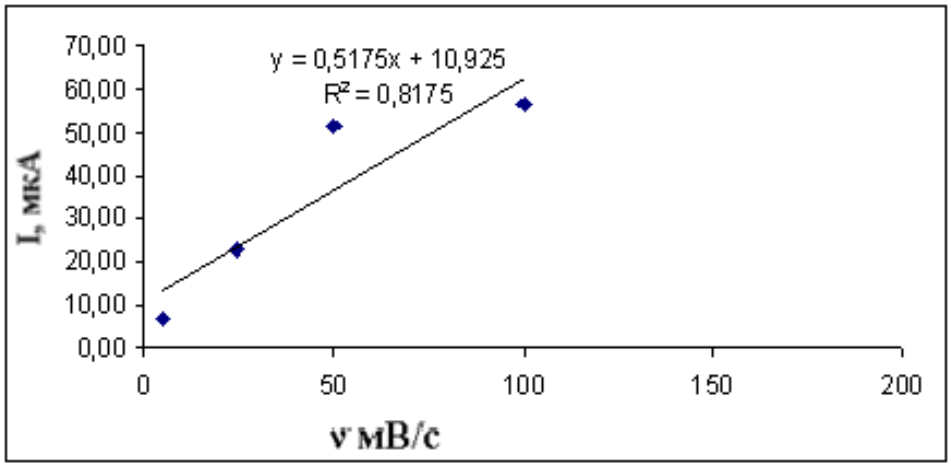


Рисунок 15. Зависимость тока окисления карбарила от скорости развертки потенциала на модифицированном углеродными чернилами ГЭ.

В вольтамперометрии одним из критериев обратимости электродных процессов является линейная зависимость тока от скорости развертки потенциала в степени 1/2 для обратимых и необратимых процессов, кроме квазиобратимого процесса [90-91]. При изучении физико-химических закономерностей установлено, что кривая зависимости тока окисления карбарила от квадратного корня скорости развертки потенциала ($\nu^{1/2}$) от 5 до 300 мВ/с линейная (рис. 16), что указывает на то, что электродный процесс не квазиобратимый.

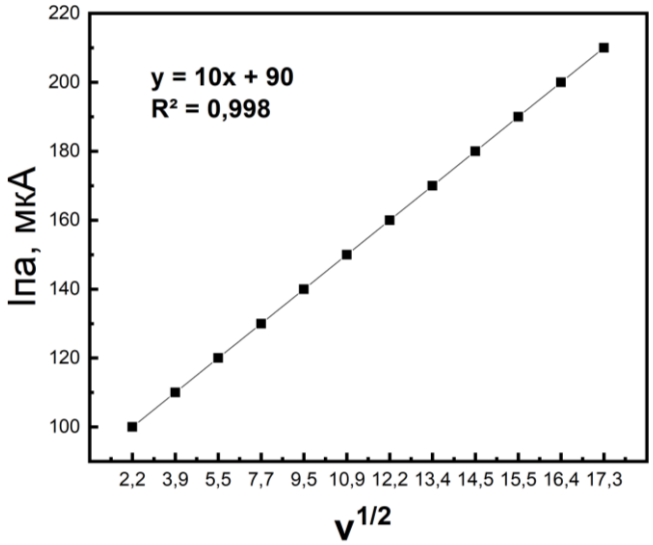


Рисунок 16. Зависимость интенсивности тока электроокисления карбарила ($0{,}4 \cdot 10^{-6}$ моль/дм^3) от $\nu^{1/2}$.

Кроме того, на необратимость электродного окисления карбарила указывает факт отсутствия обратного пика восстановления карбарила на ЦВА в диапазоне потенциалов от -1,5 до +1,5 (рис. 12). Из Тафелевской зависимости значений потенциалов кинетической ветки анодного окисления карбарила от логарифма тока был определен эффективный коэффициент переноса анодного процесса β – 0,46. Кроме того, на основании диагностического критерия [90-92] соблюдается равенство $|Ep - Ep/2| = 47,7/\beta n$, указывающий на необратимый электродный механизм окисления карбарила на модифицированном углеродными чернилами ГЭ. Эти признаки свидетельствуют о необратимости электродного процесса окисления карбарила.

Было предположено, что в ходе электрохимической реакции окисление карбарила происходит по карбаматной группе с участием одного протона и одного электрона. Предположительный механизм окисления карбарила представлен на рисунке 17, что согласуется с литературными данными [93].

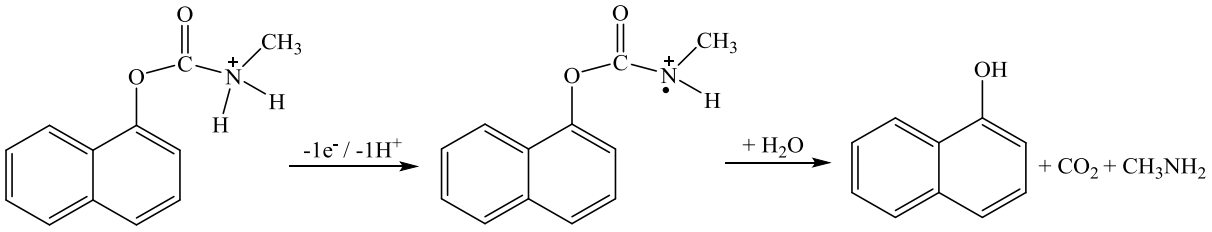


Рисунок 17. Механизм окисления карбарила на модифицированном углеродными чернилами ГЭ.

Согласно рис. 17 карбарил окисляется на электроде необратимо, с образованием нафтола-1 и метиламина.

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 окисления карбарила

от логарифма скорости развертки потенциала на модифицированном углеродными чернилами ГЭ (рис. 18).

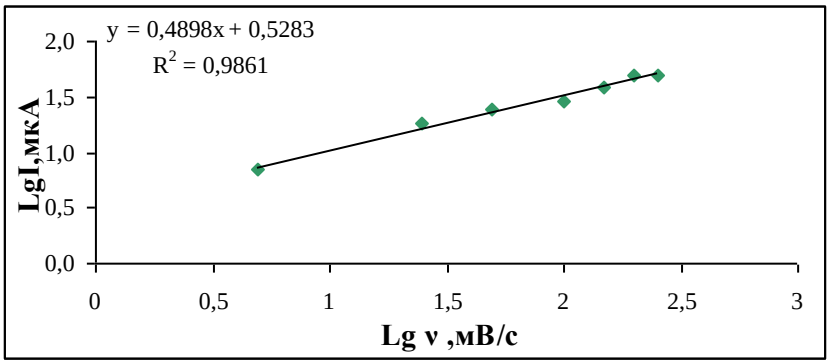


Рисунок 18. Зависимость логарифма тока окисления карбарила ($0{,}4 \cdot 10^{-6}$ моль/дм^3) от логарифма скорости развертки потенциала на модифицированном углеродными чернилами ГЭ.

По полученной зависимости был рассчитан критерий Семерано (тангенс угла наклона зависимости lgI от lgv) 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.

3.1.2 Определение карбарила в образцах зерновых культур

Поэтапная методика выделение карбарила из некоторых зерновых культур представлена в разделе 2.6. Алгоритм подготовки зерновых культур для разделения смеси пестицидов карбаматной природы и вольтамперометрического определения карбарила представлен на рис.19. Для разделения смеси пестицидов карбаматной природы использовали метод тонкослойной хроматографии (рис. 19). В качестве подвижной фазы использовали хлороформ (ГОСТ 20015-88, хч).

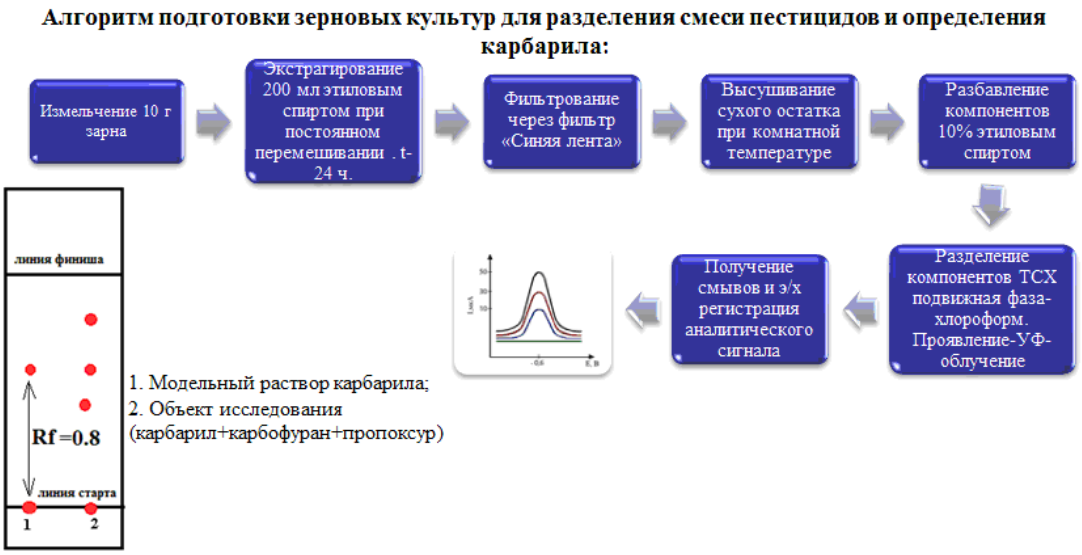


Рисунок 19. Схема пробоподготовки зерновых культур для вольтамперометрического определения карбарила.

Количественное определение карбарила разработанным вольтамперометрическим способом проводили в смывах 96% этиловым спиртом с ТСХ-пластины после разделения компонентов пробы. Определение карбарила в образцах кукурузы, овса и пшеницы предварительно проводили методом ВЭЖХ [33] для установления точной концентрации карбарила. Затем исследуемые образцы искусственно контаминировали карбарилом на 3х уровнях концентраций.

Результаты определения карбарила в зерновых культурах представлены в таблице 8.

Таблица 8

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±0,007
		0,200	0,189±0,038
		0,320	0,314±0,063
Овес	$11{,}9 \cdot 10^{-5}$	0,040	0,036±0,007
		0,200	0,183±0,037
		0,320	0,318±0,064
Пшеница	$23{,}3 \cdot 10^{-3}$	0,040	0,034±0,007
		0,200	0,187±0,037
		0,320	0,312±0,062

Проведены расчеты по подготовке метода определения карбарила к метрологической аттестации с оценкой следующих метрологических характеристик: показатель повторяемости, показатель внутрилабораторной прецизионности, показатель точности методики (приложение 2) [94]. Обобщенные результаты показателей качества методики определения карбарила в зерновых культурах методом вольтамперометрии представлены в таблице 9.

Таблица 9

Метрологические характеристики показателей качества методики определения карбарила на модифицированном углеродными чернилами ГЭ

Диапазон измерений, мкг/кг	Показатель повторяемости, %	Показатель внутрилабораторной прецизионности, %	Показатель точности, %
0,040-0,320	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 вольтамперометричсеского 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 резаком для углеродистых электродов (НПП «Томьаналит).

В качестве селективного определения карбарила в образцах зерновых культур без разделения пестицидов был предложен и разработан электрохимический иммуносенсор, отличающийся селективностью, чувствительностью по сравнению с ранее известными вольтамперометрическими методами. Электрохимический иммуносенсор так же отличается надежностью и высокой стабильностью металлической метки, по сравнению с ферментами. Подробные этапы разработки электрохимического иммуносенсора для определения карбарила представлены в разделе 2.3

3.2 Разработка электрохимического иммуносенсора на основе конъюгата Hap-Car-БСА@НЧCu для определения карбарила в зерновых культурах

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 Hap-Car-БСА@НЧCu; 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 Hap-Car-БСА@НЧCu; 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 Hap-Car-БСА@НЧCu с электрохимической меткой использовали НЧ Cu. Схема получения электрохимического иммуносенсора представлена на рисунке 20.

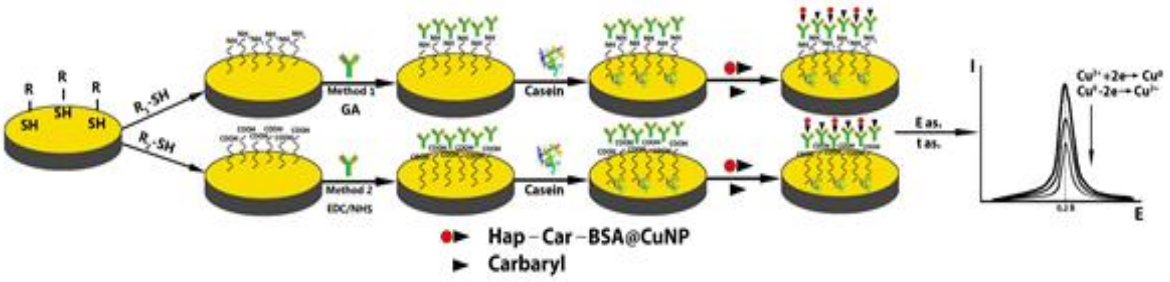


Рисунок 20. Схематическое изображение электрохимического иммуносенсора для определения карбарила.

3.2.1 Синтез и исследование НЧ Cu, стабилизированных хитозаном

Синтез НЧ Cu, стабилизированных хитозаном осуществляли в соответствии с методикой, описанной в разделе 2.3.1.

Для синтезирования НЧ Cu был выбран «зеленый» способ, в котором использовали ацетат меди (II) в качестве субстрата, гипофосфит натрия (1 моль/дм^3) в качестве восстановителя, хитозан (1%) и аскорбиновая кислота (0,42 моль/дм^3) – в качестве стабилизаторов (раздел [83]. НЧ Cu были стабильны в течение одного месяца.

На рисунке 21 представлен УФ-спектр видимой области поглощения полученных НЧ Cu, стабилизированных хитозаном.

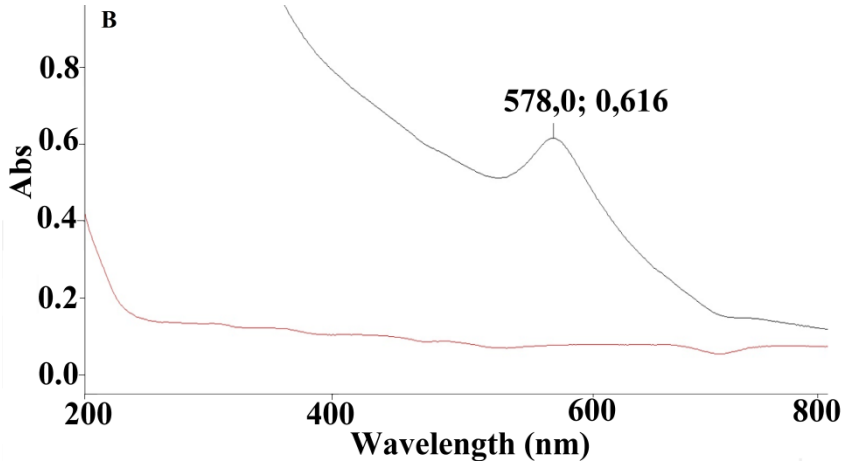


Рисунок 21. УФ/ВИД спектр поглощения НЧ Cu, стабилизированных хитозаном, раствор сравнение – вода.

На рисунке 21 наблюдается максимум поглощения при λ_{max} = 578 нм, что согласуется с образованием НЧ Cu в данном растворе [83].

Для определения гидродинамического радиуса полученных НЧ Cu, стабилизированных хитозаном, был использован метод динамического рассеяния света (ДРС). Исследованию подвергались НЧ Cu, стабилизированных хитозаном сразу после синтеза и фракционирования методом центрифугирования при 14000 об/мин с разным временем центрифугирования. Анализу подвергался осадок в эпиндорфе после центрифугирования. Наглядные спектры ДРС по распределению НЧ Cu, стабилизированных хитозаном по гидродинамическому радиусу в зависимости от условий пробоподготовки образов представлены в приложении 1. Результаты по распределению НЧ Cu, стабилизированных хитозаном по

гидродинамическому радиусу в зависимости от условий пробоподготовки образов представлены в таблице 10.

Таблица 10

Распределение НЧ меди, стабилизированных хитозаном по гидродинамическому радиусу в зависимости от пробоподготовки образцов.

Образец/условия пробоподготовки	Распределение по размерам, %	Радиус, нм
Образец 1 НЧ Cu без центрифугирования	74,1	317,1±15,9
	22,6	60,1±3,0
	3,3	Не достоверный сигнал
Образец 2 НЧ Cu после центрифугирования в течение 10 минут	78,3	128,0±6,4
	15,3	28,2±1,4
	6,4	Не достоверный сигнал
Образец 3 НЧ Cu после центрифугирования в течение 20 минут.	85,3	128,0±6,4
	8,8	15,4±0,8
	5,9	Не достоверный сигнал

Процесс центрифугирования в данном эксперименте необходим для фракционирования НЧ Cu, стабилизированных хитозаном, а также для очистки от несвязанных компонентов после синтеза. Контроль диапазона размеров НЧ Cu, стабилизированных хитозаном по средствам метода ДРС показал, что в первом образце основной вклад в рассеяние происходит от частиц гидродинамического радиуса 317,0 нм и 60,0 нм. Во втором образце основной вклад в рассеяние вносят, исходя из корреляционной функции, частицы с размерами (радиусами) 128,0 нм и 28,0 нм. Характерный размер частиц в третьем образце – 128,0 нм. В незначительном количестве присутствуют частицы размером 15,4 нм.

На основании полученных данных методом ДРС, можно сделать вывод, что после центрифугирования образцов НЧ Cu в течение 20 минут при 14000 об/мин

фракция становится гомогенной, 85,3% которой составляют НЧ Cu с гидродинамическим радиусом 128,0 нм (диаметром 256,0 нм). Фракция 3образца использовалась для синтеза гаптен-белкового конъюгата (Нар-Car-БСА@НЧ Cu).

Для уточнения результатов метода ДРС и выявления размеров полученных НЧ Cu, стабилизированных хитозаном во фракциях после центрифугирования 20 минут 14000 об/мин был применен альтернативный метод анализа–ПЭМ (просвечивающая электронная микроскопия).

На рисунках 22 и 23 представлены ПЭМ–изображения НЧ Cu, стабилизированных хитозаном с различным масштабом изображений.

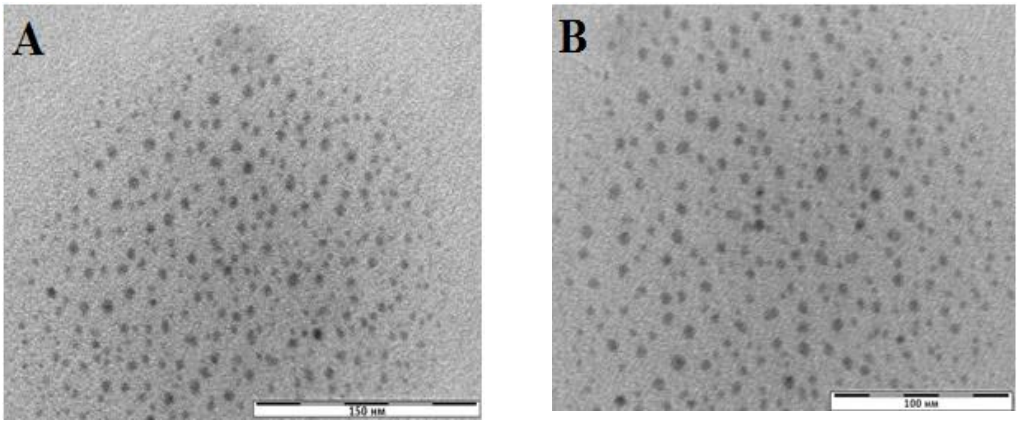
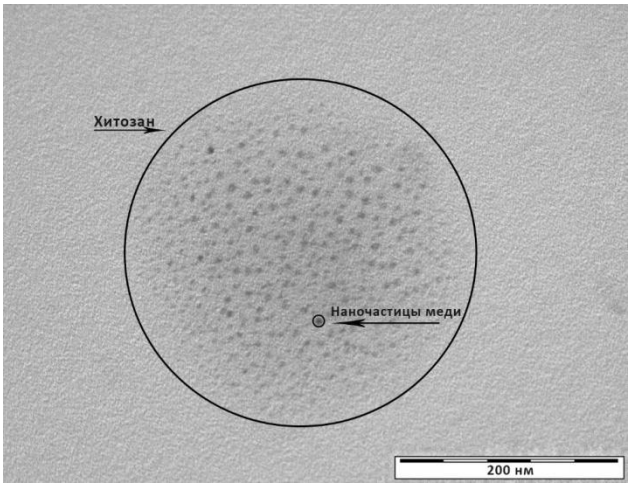
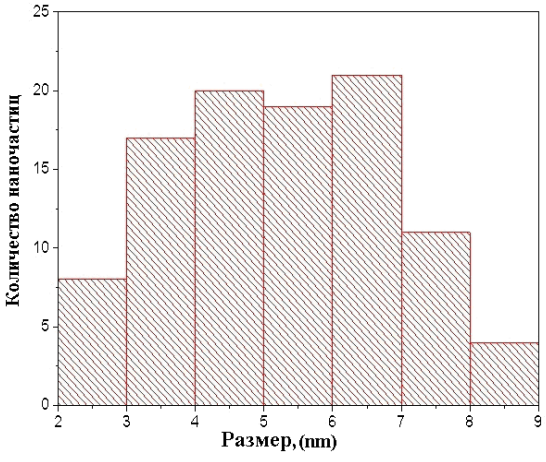


Рисунок 22. ПЭМ-изображения НЧ Cu, стабилизированных хитозаном с приближением 150 нм (А) и 100 нм (В)



А



Б

Рисунок 23. А: ПЭМ-изображение НЧ Cu, стабилизированных хитозаном, с приближением 200 нм, Б: гистограмма распределения НЧ Cu, стабилизированных хитозаном по размерам.

На основании экспериментальных данных, можно сделать вывод о том, что полученная коллоидная система представляет собой полимерный хитозан сферической формы с размером около 200±10 нм, на площади которого равномерно распределены НЧ Cu с размером от 4 до 7 нм.

Для определения заряда НЧ Cu, стабилизированных хитозаном и их величину электрокинетического ζ (дзета) потенциала, возникающего на границе скольжения, использовали метод горизонтального гель электрофореза (рис. 24).

Рисунок 24. Горизонтальный гель электрофорез для определения электрического заряда НЧ Cu, стабилизированных хитозаном.

Согласно полученным данным горизонтального гель электрофореза, НЧ Cu, стабилизированных хитозаном имеют положительный заряд, т.к. направление движения НЧ Cu от линии старта происходит к катоду, что подтверждается расчетами по уравнению Гельмгольца – Смолуховского [95]. Полученное значение ζ =2,05 мВ, является низким, следовательно, раствор НЧ Cu, стабилизированные хитозаном слабозаряжен положительно.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что полученые НЧ Cu, стабилизированные хитозаном можно использовать в качестве сигналобразующих меток в электрохимическом иммуносенсоре. Коллоидные

частицы исследованы методами УФ/ВИД спектроскопией, ПЭМ, ДРС и гель-электрофорезом. НЧ Cu, стабилизированные хитозаном представляют собой систему из полимерного хитозана сферической формы с размером около 200±10 нм, на площади которого равномерно распределены НЧ Cu с размером от 4 до 7 нм. Для синтеза гаптен-белкового конъюгата (Нар-Car-БСА@НЧCu) необходимо использовать осадок НЧ Cu после центрифугирования образцов в течение 20 минут при 14000 об/мин.

3.2.2 Исследование электрохимических свойств НЧ Cu, стабилизированных хитозаном на ЗГЭ

В качестве электрохимического метода был выбран метод анодной инверсионной вольтамперометрии. ЗГЭ использовался в качестве рабочего электрода для иммобилизации моноклональных антител против карбарила, в качестве вспомогательного и электрода сравнения–хлоридсеребрянные электроды. Исследование проводилось в диапазоне потенциалов от -0,9 В до +0,4 В, потенциал накопления $E_{нак}$=-1,3 В, время накопления $t_{нак}$=70 с, скорость разветки потенциала составила ν=100 мВ/с.

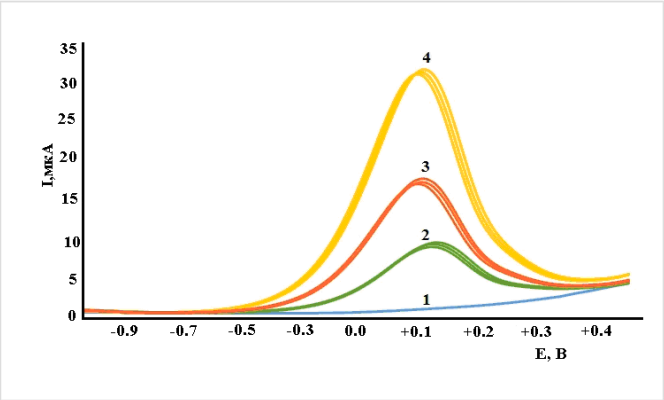


Рисунок 25. Анодные вольтамперограммы НЧ Cu, стабилизированные хитозаном от введенного объема в электрохимическую ячейку на ЗГЭ: 1–фоновый электролит 0,2 моль/дм^3 HCOOH; 2–0,005 см^3; 3–0,010 см^3; 4–0,020 см^3; $E_{нак}$=-1,3 В, $t_{нак}$=70 с., ν=100 мВ/с.

Из литературных данных известно [83], что НЧ Cu, стабилизированных хитозаном плохо разряжаются на поверхности рабочего электрода из-за пассивирующего влияния хитозана. В качестве фонового электролита использовали муравьиную кислоту, которая растворяет НЧ Cu, стабилизированных хитозаном до ионов Cu^{2+}, облегчая процесс накопления меди на поверхности ЗГЭ в режиме инверсионной анодной вольтамперометрии. Кроме того, муравьиную кислоту использовали в качестве дезактиватора кислорода в электрохимической ячейке с УФ-облучением при 200 нм в течение 120с перед каждым измерением тока меди. Необходимо оценить влияние концентрации муравьиной кислоты на интенсивность аналитического сигнала от ионов меди (табл. 11).

Таблица 11

Зависимость тока окисления НЧ Cu без разрушения и с разрушением в растворах муравьиной кислоты разной концентрации.

V (НЧ Cu),$см^3$	без HCOOH	C_{HCOOH} =0,05 моль/$дм^3$	C_{HCOOH} =0,1 моль/$дм^3$	C_{HCOOH} =0,2 моль/$дм^3$
	I, мкА			
0,005	2,22±0,11	2,40±0,12	2,76±0,14	8,26±0,41
0,01	4,73±0,24	5,74±0,29	6,17±0,31	17,24±0,86
0,02	7,38±0,37	10,25±0,51	11,34±0,57	32,09±1,61
0,03	11,53±0,58	14,31±0,72	15,76±0,79	39,15±1,96
0,04	13,73±0,69	18,81±0,94	19,55±0,98	44,69±2,24
0,05	15,15±0,76	21,63±1,08	22,80±1,14	59,68±2,98

На основании данных из таблицы 13 наибольшие значения тока окисления НЧ Cu, стабилизированных хитозаном наблюдались при концентрации муравьиной кислоты 0,2 моль/$дм^3$.

Необходимыми этапами по подбору рабочих условий регистрации аналитического сигнала от НЧ Cu, стабилизированных хитозаном методом

анодной вольтамперометрии являются: потенциал накопления ($E_{нак}$) и время накопления ($t_{нак}$) меди.

На рисунке 26 представлена зависимость тока окисления НЧ Cu, стабилизированных хитозаном от потенциала накопления.

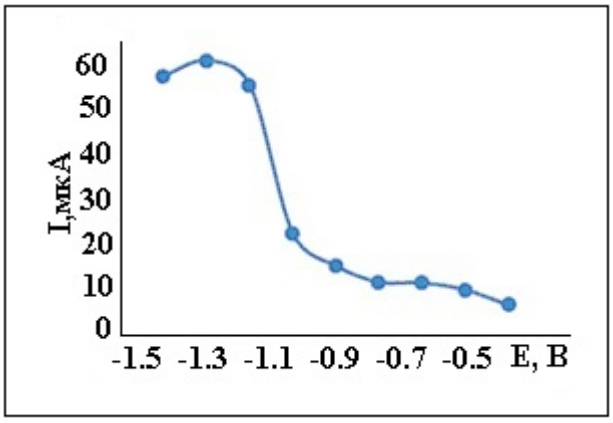


Рисунок 26. Зависимость тока окисления НЧ Cu, стабилизированных хитозаном от потенциала накопления при $t_{нак}$=70 с., ν=100 мВ/с, V (НЧ Cu)= 0,035 $см^3$.

Согласно данным рисунка 26 можно сделать вывод, что увеличение тока окисления НЧ Cu, стабилизированных хитозаном происходит до значения $E_{нак}$=-1,3 В, затем он снижается. Поэтому для дальнейших исследований был выбран $E_{нак}$=-1,3 В.

На рисунке 27 представлена зависимость величины тока окисления НЧ Cu, стабилизированных хитозаном от времени накопления при $E_{нак}$ = -1,3 В.

Рисунок 27. Зависимость величины тока окисления НЧ Cu, стабилизированных хитозаном от времени накопления, $E_{нак}$ = -1,3 В, ν=100 мВ/с, V (НЧ Cu)= 0,035 $см^3$

На рисунке 27 видно, что при увеличении $t_{нак}$, происходит пропорциональное увеличение тока окисления НЧ Cu, стабилизированных хитозаном. Для дальнейших исследований был выбран $t_{нак}$= 70 с.

Окисление НЧ Cu, стабилизированных хитозаном происходит по следующему предположительному механизму, представленный на рисунке 28.

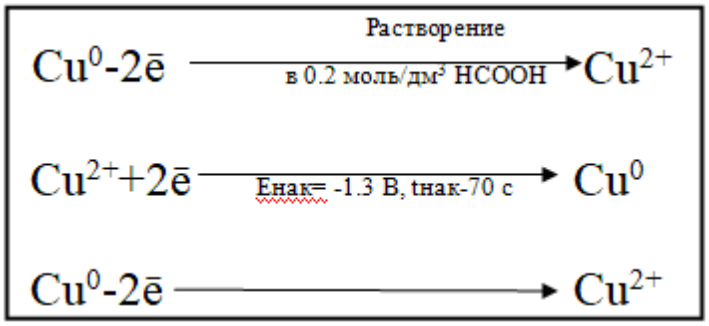


Рисунок 28. Механизм окисления НЧ Cu, стабилизированных хитозаном на ЗГЭ

Таким образом, в работе подобраны рабочие условия регистрации аналитического сигнала от НЧ Cu, стабилизированных хитозаном: фоновый электролит 0,2 моль/$дм^3$ HCOOH; $E_{нак}$=-1,3 В, $t_{нак}$=70 с.

3.2.3 Исследование свойств конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu для получения электрохимического иммуносенсора

Синтез гаптен белкового конъюгата (Нар-Car-БСА@НЧCu) осуществляли в соответствии с методикой, описанной в разделе 2.3.2.

Конъюгат Нар-Car-БСА@НЧCu для электрохимического иммуноанализа карбарила был охарактеризован методами УФ/ВИД спектроскопией, ПЭМ и ДРС в соответствии с разделом 2.3.3.

УФ/ВИД спектры НЧ Cu и конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu были записаны в диапазоне длин волн 500 - 650 нм (рис. 29А). Максимум поглощения при 578 ± 2 нм наблюдали из-за поверхностных плазмонных свойств НЧ Cu, стабилизированных хитозаном, в то время как более широкий максимум поглощения при 588 ± 2 нм, смешенный в более длинноволновую область, по сравнения с пиком НЧ Cu, косвенно указывал на связывание НЧ Cu с БСА с образованием конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu карбарила. Гидродинамический диаметр НЧ Cu, стабилизированных хитозаном, соответствует значению 128 ± 10 нм (рис. 29В). Наблюдалось увеличение гидродинамического диаметра конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu до 750 ± 10 нм, что подтверждает связывание НЧ Cu, стабилизированных хитозаном с БСА с образованием конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu (рис. 29В). На рисунке 29С представлена ПЭМ поверхности конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu. БСА имеет белый контраст, тогда как НЧ Cu имеют темный цветовой контраст.

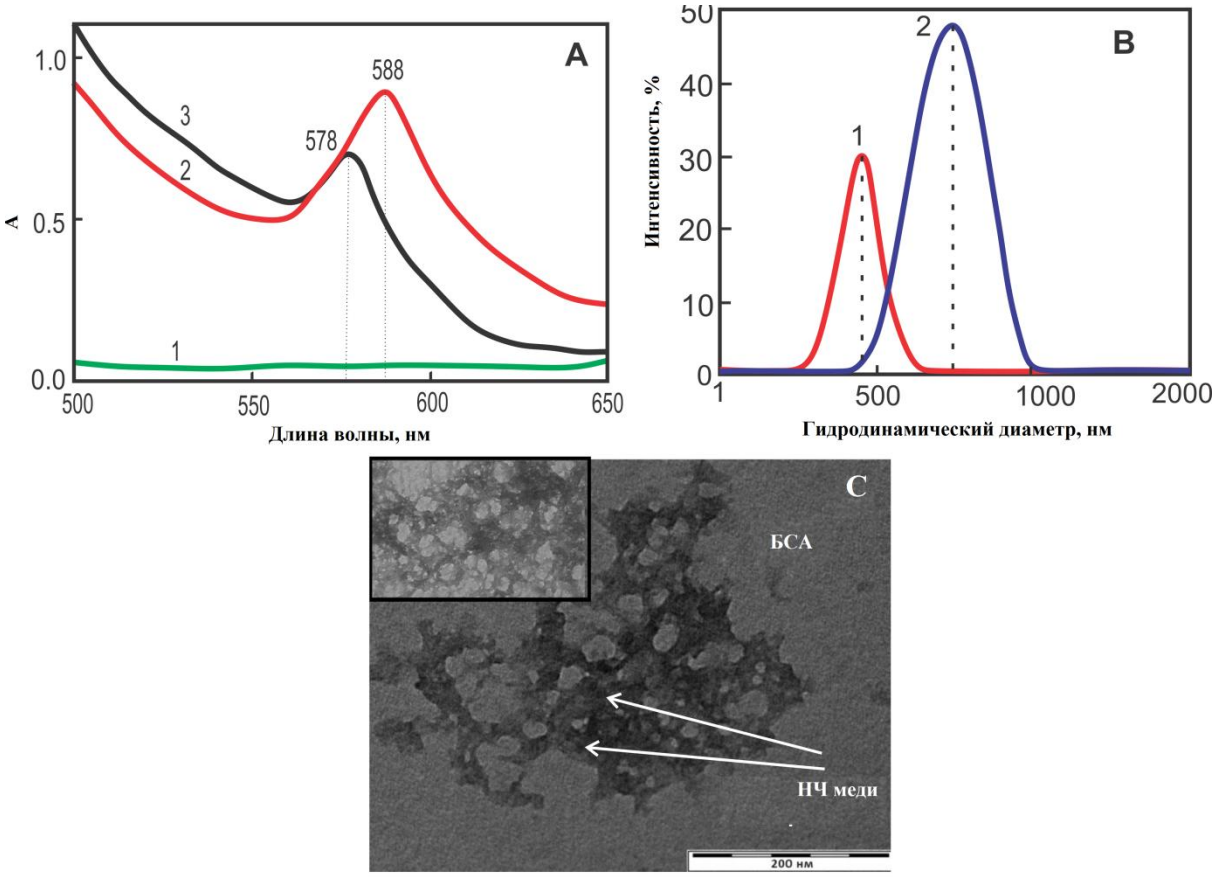
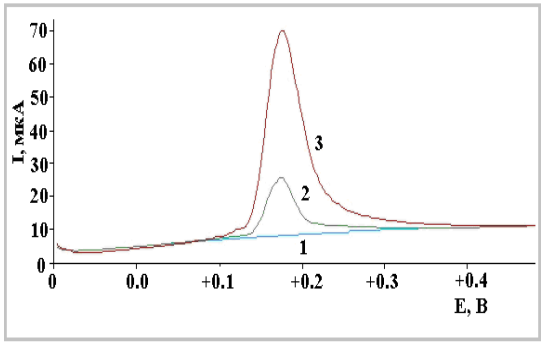


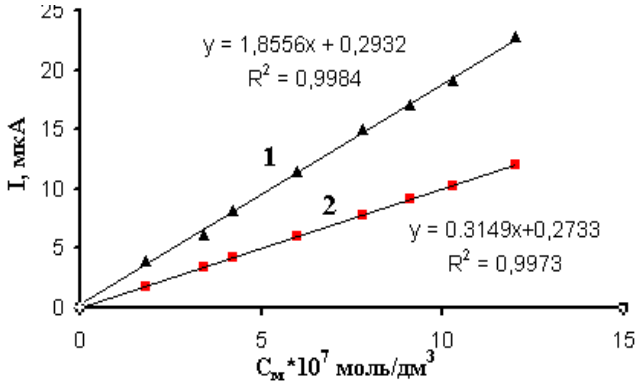
Рисунок 29. А–УФ/ВИД спектры НЧ Cu и конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu; В–гидродинамический диаметр НЧ Cu, стабилизированных хитозаном (1) и

конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu карбарила (2); С–ПЭМ–изображение конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu карбарила с контрастированием белков 1,0 % раствором молибденовокислого аммония.

На рисунке 30 представлены анодные вольтамперограммы НЧ Cu, стабилизированных хитозаном и конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu и градуировочные зависимости.



А



Б

Рисунок 30. А – Вольтамперограммы окисления НЧ Cu: 1–фоновый электролит 0,2 моль/дм^3 HCOOH, ν=100 мВ/с; Енак=-1,3В; tнак=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.

Согласно рисунку 30, ток окисления меди конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu меньше, чем ток окисления НЧ Cu. Возможно, белки конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu закрывают поверхность ЗГЭ 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 $2{,}0\cdot10^{-7}$ до $12{,}0\cdot10^{-7}$ моль/дм^3 (рис 30 Б), что делает возможным использовать конъюгат Нар-Car-БСА@НЧCu для аналитических задач количественного определения карбарила с использованием электрохимического иммуносенсора.

3.3Иммобилизация антител на поверхность ЗГЭ

Методики иммобилизации моноклональных аннтител на поврхности ЗГЭ представлены в разделе 2.3.4.

Для формирования распознающего рецепторного слоя моноклональных антител против карбарила на поверхности ЗГЭ применяли метод ковалентного сшивания с использованием различных кросс-линкеров. 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 [96]. В качестве ковалентных кросс-линкеров было предложено использовать соединения тиоловой природы, такие как восстановленный глутатион (GSH) и окисленный глутатион (GSSG) для иммобилизации антител на поверхность электрода. Для исследования стабильности тиолов на ЗГЭ исследовалось электрохимическое поведение GSH и GSSG на ЗГЭ методом ЦВА в диапазоне потенциалов от +2,0 В до -1,8 В, при скорости развертки потенциала 100 мВ/с. Исследование электрохимических свойств проводилось с удалением кислорода деаэрацией азотом. Было выявлено, что сигнал окисления GSH накладывался на ток оксида золота при потенциале +1,2 В. В данной области потенциалов GSSG оказался электрохимическим не активным. Поэтому все дальнейшие исследования электрохимических свойств GSSG и GSH на ЗГЭ проводились в катодной области потенциалов от 0 до -1,8 В.

На рис. 31 А представлены катодные вольтамперограммы GSSG в боратном буферном растворе (pH 9,18) при предварительном удалении кислорода из э/х ячейки деаэрацией азотом. На рис. 31 В представлена линейная зависимость тока восстановления GSSG от его концентрации в растворе.

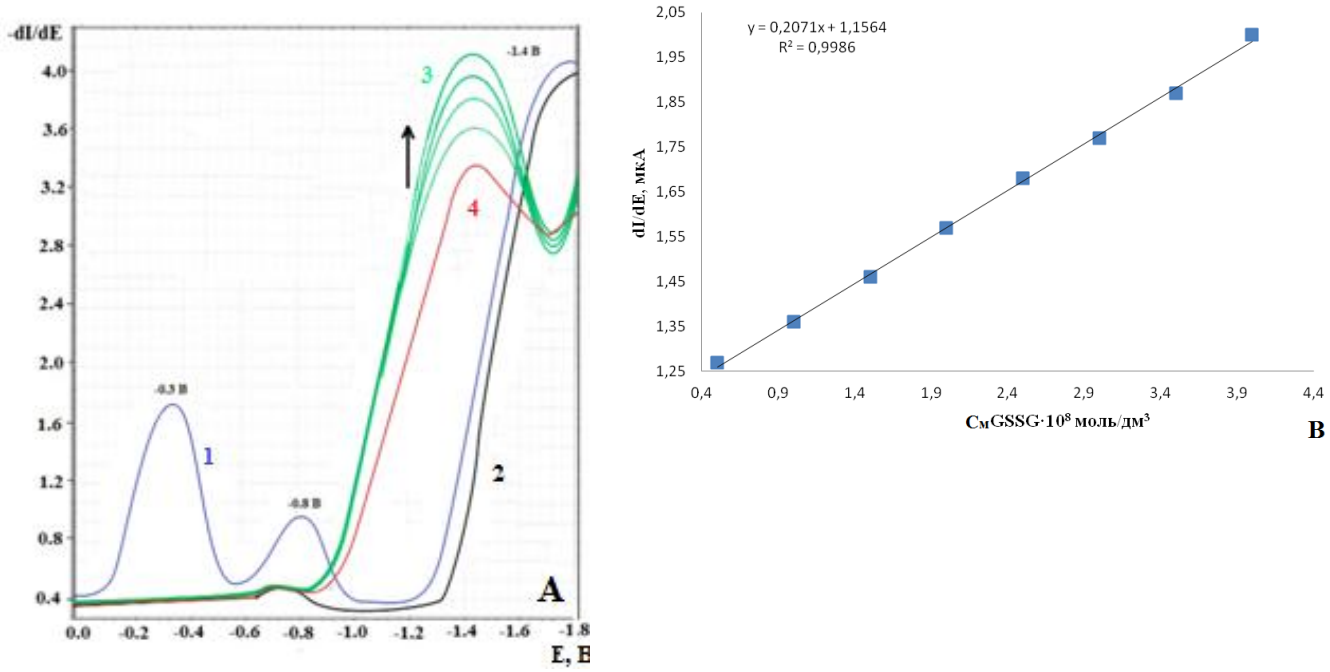


Рисунок 31. А- Катодные вольтамперограммы GSSG на ЗГЭ в фоновом электролите (боратный буферный раствор pH 9,18). 1- фоновый электролит; 2 – фоновый электролит после деаэрации азотом в течение 30 мин; 3 – в присутствии GSSG в разных концентрациях (от $0{,}4\cdot10^{-8}$ моль/дм^3 до $4{,}0\cdot10^{-8}$ моль/дм^3); 4 – в присутствии GSH* (*Эксперимент осуществлялся отдельно при схожих условиях, что и для GSSG).

В – Градуировочная зависимость тока восстановления GSSG от его концентрации в диапазоне от $0{,}4\cdot10^{-8}$ до $4{,}0\cdot10^{-8}$ моль/дм^3

Ток восстановления GSSG увеличивался пропорционально его концентрации в э/х ячейке (рис. 31 А кривые 3, рис. 31Б). Выявлено, что при введении в э/х ячейку GSH появляется катодный пик (рис. 31А, кривая 4), потенциал которого совпадает с потенциалом восстановления GSSG -1,4 В, но значение тока не увеличивается при увеличении концентрации GSH.

На основании экспериментальных исследований, нами было сделано предположение, что существенную роль в формировании GSSG играют остатки H_2O_2, окисляющая GSH до дисульфида [97].

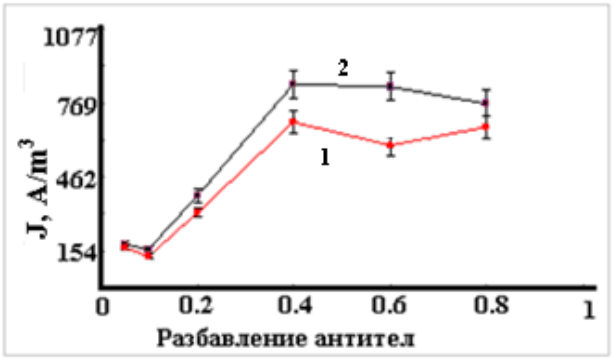
Так как сигнал окисления GSH формируется в катодной области при потенциале +1,2 В, а сигнал GSSG при -1,4 В, то в случае использование данных

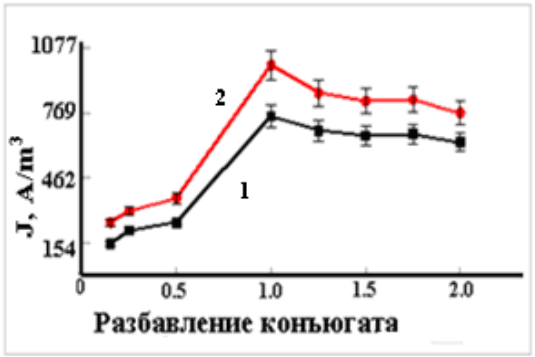
тиоловых соединений в качестве ковалентных кросс-линкеров при иммобилизации антилел на поверхности ЗГЭ и регистрация сигнала окисления меди конъюгата Нар-Car-BSA@CuNP при потенциале +0,3В в режиме инверсионной вольтамперометрии ($E_{нак}$=-1,3 В, $t_{нак}$=70 с) возможна только на электроде модифицированном GSH, т.к. он позволяет получить устойчивые монослои тиоловых соединений на поверхности ЗГЭ [98]. Кроме того, нами выявленно, что использование $E_{нак}$=-1,3 В при накоплении меди способствует десорбции тиоловых соединений с поверхности ЗГЭ, что существенно облегчает регистрацию анодного тока меди в качестве аналитического сигнала [99].

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 были выбраны оптимальные разбавления антител и конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu к карбарилу, используемых в прямом конкурентном формате анализа (рис. 32).

А





В

Рисунок 32. А - разбавление антител, иммобилизованных на поверхности ЗГЭ различными способами в прямом твердофазном конкурентном анализе карбарила; В - разбавление конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu в прямом твердофазном конкурентном анализе карбарила.

На рис. 32 А представлены зависимости аналитического сигнала окисления меди конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu (1 мкл/см^3) от степени разбавления антител, иммобилизованных на поверхности ЗГЭ различными способами.

Максимальному значению тока окисления конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu соответствует степень разбавления антител 0,4 мкл·см$^{-1}$ для методов 1 и 2 (рис. 32 А). Однако, при использовании ковалентных кросс-линкеров EDC/NHS (способ 2) сигнал окисления меди конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu значительно выше, чем в случае использования ГА (способ 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 [96, 100].

Оптимальную концентрацию конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu устанавливали на основе зависимости аналитического сигнала окисления меди конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu от его концентрации, которая соответствовала значению 1,0 мкл·см$^{-1}$. (рис. 32 В).

Поскольку карбарил экстрагируют из зерновых культур этиловым спиртом, 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. На рисунке 33 представлена зависимость IC50 (мкг/кг) от концентрации этилового спирта.

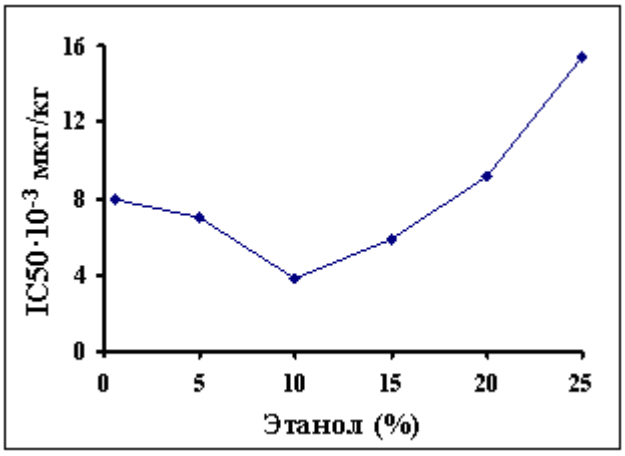


Рисунок 33. Зависимость IC50 (мкг/кг) от концентрации этилового спирта.

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

3.4Градуировочная зависимость для определения карбарила с использованием конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu

Для построения градуировочной зависимости степени ингибирования от логарифма концентрации карбарила была приготовлена серия растворов карбарила от $5{,}0 \cdot 10^{-4}$ до $2{,}0 \cdot 10^{-2}$ мкг/кг (рис. 34). Все растворы были приготовлены в соответствии с условиями электрохимического иммуноанализа: растворитель ФБР, содержащий 10 % этилового спирта; к стандартным растворам карбарила добавляли 1,0 мкл/см^3 раствора конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu.

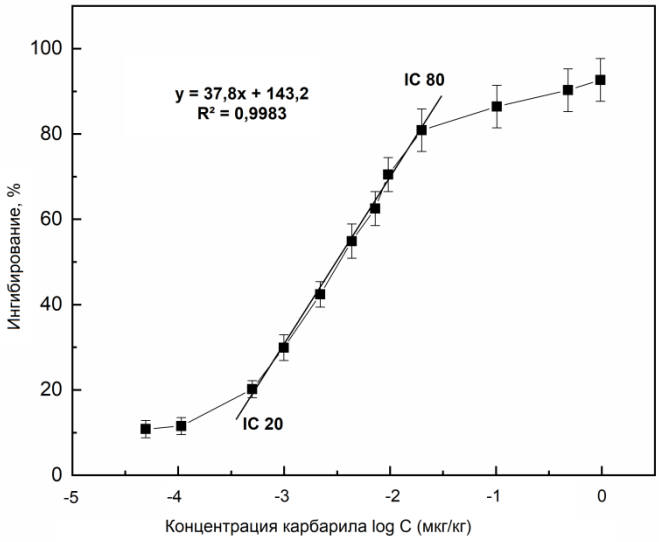


Рисунок 34. Градуировочная зависимость степени ингибирования сигнала окисления меди конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu от логарифма концентрации карбарила в диапазоне концентрации от $5{,}0 \cdot 10^{-4}$ до $2{,}0 \cdot 10^{-2}$ мкг/кг.

На рис. 35 представлены вольтамперограммы окисления меди конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu при разных концентрациях карбарила в растворе.

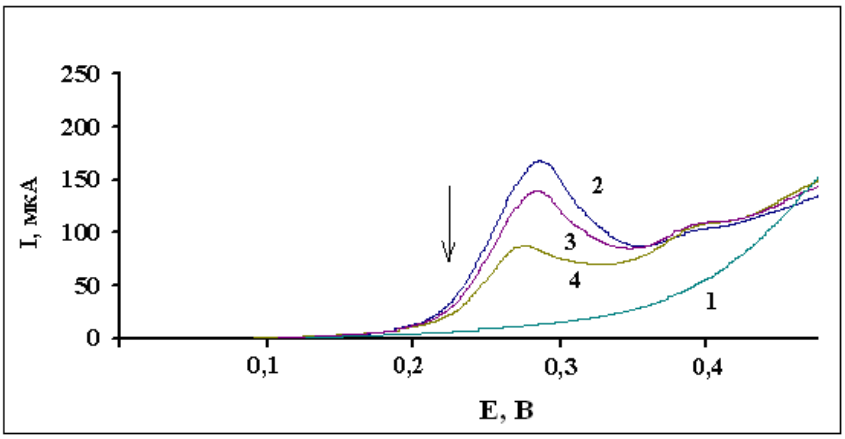


Рисунок 35. Вольтамперограммы окисления меди конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu с увеличением концентрации карбарила в растворе. 1–фоновый электролит HCOOH 0,2 моль/дм^3, 2–электрохимический сигнал конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu без добавления карбарила; 3–концентрация карбарила $5{,}0\cdot10^{-4}$ мкг/кг, 4–концентрация карбарила $10{,}0\cdot10^{-4}$ мкг/кг.

Как показано на рис. 34 уравнение линейной регрессии соответствует y=37,8x+143,2; R^2=0,9983. Линейный диапазон концентраций карбарила, в котором наблюдалось ингибирование вольтамперометрического сигнала окисления меди конъюгата Нар-Car-БСА@НЧCu от 20 до 80 %, составил $5{,}0\cdot10^{-4}$ до $2{,}0\cdot10^{-2}$ мкг/кг. IC_{50}, который является важным критерием для оценки чувствительности иммуноанализа составил $3{,}75\cdot10^{-3}$ мкг/кг. Предел обнаружения (IC_{10}) составил $5{,}0\cdot10^{-5}$ мкг/кг.

3.5 Метрологические характеристики электрохимического иммуносенсора для определения карбарила

Правильность электрохимического иммуносенсора для карбарила оценивали по методу «введено-найдено», используя образцы кукурузы, овса и пшеницы искусственно контаминированные карбарилом (табл.12).

Таблица 12

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·10^{-2} мкг/кг	Найдено·10^{-2} мкг/кг	Степень извлечения, %
Кукуруза	14,9·10^{-4}	0,05	0,046±0,006	98±2
		1,00	0,95±0,13	95±2
		2,00	1,86±0,26	93±2
Овес	11,9·10^{-5}	0,05	0,045±0,006	98±3
		1,00	0,93±0,13	96±3
		2,00	1,87±0,26	95±2
Пшеница	23,3·10^{-3}	0,05	0,048±0,007	96±3
		1,00	0,94±0,13	94±2
		2,00	1,86±0,26	93±2

Основные метрологические характеристики электрохимического иммуносенсора для определения карбарила в зерновых культурах представлены в таблице 13.

Таблица 13

Метрологические характеристики электрохимического иммуносенсора для определения карбарила по РМГ 61-2010.

Диапазон измерений, ·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 0,05 до 2,00·10^{-2} мкг/кг не превышала 14 %. На основании полученных данных, можно сделать

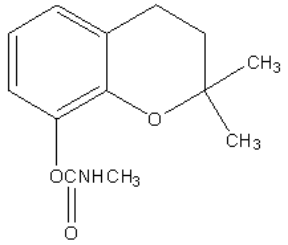
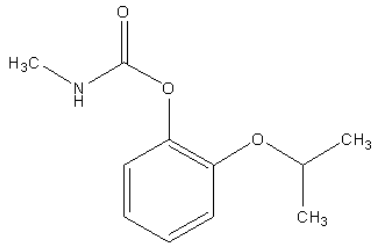
вывод, что новый электрохимический иммуносенсор пригоден для определения карбарила в образцах зерновых культур. Методика определения карбарила в образцах зерновых культур при помощи иммуносенсора имеет предел обнаружения $5{,}0 \cdot 10^{-5}$ мкг/кг и диапазон определяемых содержаний от $5{,}0 \cdot 10^{-4}$ до $2{,}0 \cdot 10^{-2}$ мкг/кг. По сравнению с иммуноферментными методами определения карбарила (табл. 6), в которых используются ферментные конъюгаты, в электрохимическом иммуносенсоре с конъюгатом Нар-Car-БСА@НЧCu значения IC_{50} и IC_{10} очевидно ниже.

3.6 Специфичность определения карбарила

Специфичность разработанного электрохимического иммуносенсора оценивали путем тестирования перекрестной реактивности (CR) других карбаматных пестицидов (карбофурана, пропоксура и карбосульфана) в отношении иммуносенсора. Значение CR рассчитывали в соответствии с формулой CR (%) = (IC_{50} Car) / (IC_{50} аналогов) × 100% (таб. 14). Карбарил можно специфично определять в реальных образцах с помощью разработанного электрохимического иммуносенсора.

Таблица 14

Специфичность электрохимического иммуносенсора для определения карбарила

Название	Структурная формула	Специфичность
Карбофуран		≤7%
Пропоксур		≤7%

Перекрестное реагирование структурно родственных аналиту соединений не превышало 7 %, то есть, моноклональные антитела 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/дм^3, 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 $E_{нак}$ =-1.3 В, $t_{нак}$ =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 $IC_{50}=3,75\cdot10^{-3}$ мкг/кг и $IC_{10}=5,0\cdot10^{-5}$ мкг/кг, диапазон определяемых содержаний от $5,0\cdot10^{-4}$ до $2,0\cdot10^{-2}$ мкг/кг, погрешность в диапазоне от $5,0\cdot10^{-4}$ до $2,0\cdot10^{-2}$ мкг/кг составила 14 %, показатель повторяемости 4%, показатель внутрилабораторной прецизионности 9%. специфичность $\leq$ 7%).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

НЧ Cu – наночастицы меди;

ГЭ – графитовый электрод;

ЗГЭ – золотоуглеродсодержащий электрод;

ИФА – иммуноферментный анализ;

БСА – бычий сывороточный альбумин;

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия;

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия;

CR – перекрестная реактивность;

Hap-Car-БСА@CuNP – гаптен-белковый конъюгат;

ГХ – газовая хроматография;

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;

ТСХ – тонкослойная хроматография;

ГА – глутаровый альдегид;

ФБР – фосфатный буферный раствор;

EDC – 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид;

NHS – N-Гидроксисукцинимид;

ДРС – динамическое рассеяние света;

ЦВА – циклическая вольтамперограмма;

GSH – восстановленный глутатион;

GSSG – окисленный глутатион;

CV – коэффициент вариации;

DCC – дициклогексилкарбодиимид;

AchE – ацетилхолинэстераза;

BChE – бутиринхолинэстераза.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aktar W. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards / Sengupta D., Chowdhury A. // Interdisciplinary Toxicology. – 2009. – V. 2. – № 1. – P. 1 – 12. DOI:10.2478/v10102-009-0001-7

2. Brown J. Handbook of Pesticide Toxicology (Second Edition). – 2001. – V. 1. – P. 515-530. DOI: 10.1093/ae/37.4.244

3. ГН 1.2.1323-03 Гигиенические нормативы содержания пестицидов в объектах окружающей среды. 2013. – 36 с.

4. ГОСТ Р 51247-99 Пестициды. Общие технические условия. М.: ИПК Издательство стандартов, 1999. – 12 с.

5. ГОСТ 14189-81 Пестициды. Правила приемки, методы отбора проб, упаковка, маркировка, транспортирование и хранение. М.: ИПК Издательство стандартов, 1996. – 40 с.

6. Гигиеническая классификация пестицидов по степени опасности. Методические рекомендации. №2001/26. М.: ИПК Издательство стандартов, 2001. – 19 с.

7. Федеральный закон № 109-ФЗ «О безопасном обращении с пестицидами и агрохимикатами». 1997. – 27 с.

8. Методические указания по диагностике и профилактике отравления сельскохозяйственных животных карбаматными пестицидами. Сборник методических указаний. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России,1977. – Вып. 1. – Ч. 2. –29с.

9. Sharma R.P. In Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds. Academic Press Inc Elsevier, 2006. – P. 768. DOI: 10.1016/B978-0-12-088523-7.X5000-5

10. Van Toan P. Pesticide management and their residues in sediments and surface and drinking water in the Mekong Delta, Vietnam / Sebesvari Z, Bläsing M, Rosendahl I, Renaud FG // Sci Total Environ. – 2013. – № 452. – P. 28–39. DOI:10.1016/j.scitotenv.2013.02.026

11. Park J-Y. Simultaneous multiresidue analysis of 41 pesticide residues in cooked foodstuff using QuEChERS: comparison with classical method / Choi JH, Abd el-Aty AM, Kim BM, Oh JH, Do JA, Kwon KS, Shim KH, Choi OJ, Shin SC, Shim JH // Food Chem. – 2011. – №128. – P. 241–253. DOI:10.1016/j.foodchem.2011.02.065

12. Srivastava A.K. Monitoring of pesticide residues in market basket samples of vegetable from Lucknow City, India: QuEChERS method / Trivedi P, Srivastava M, Lohani M, Srivastava L.P. // Environ Monit Assess. – 2011. – № 176. –P. 465–472. DOI:10.1007/s10661-010-1597-y

13. Van Dyk J.S. Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment / Pletschke B. // Chemosphere. – 2011. – № 82. – P. 291–307. DOI:10.1016/j.chemosphere.2010.10.033

14. Dogheim S. Monitoring of pesticide residues in Egyptian fruits and vegetables during / El-Marsafy A, Salama E, Gadalla S, Nabil Y. // Food Addit Contam. – 2002. – № 19. – P. 1015–1027. DOI:10.1080/02652030210157655

15. Soliman K. Changes in concentration of pesticide residues in potatoes during washing and home preparation. / Soliman K. // Food Chem Toxicol. – 2001. – № 39. – P. 887–891. DOI:10.1016/S0278-6915(00)00177-0

16. Mei Liu. Aptasensors for pesticide detection. / Arshad Khan, Zhifei Wang, Yuan Liu, Gaojian Yang, Yan Deng, and Nongyue He // Biosensors and Bioelectronic. – 2018. – P. 1-50. DOI:10.1016/j.bios.2019.01.006

17. Wei H. Rapid hydrolysis and electrochemical detection of trace carbofuran at a disposable heated screen-printed carbon electrode / Sun J.J, Wang Y.M, Li X., Chen G.N. // Analyst. – 2008. – № 133. – P. 1619-1624. DOI:10.1039/b806750c

18. P.O. Otieno. Carbofuran and its toxic metabolites provide forensic evidence for furadan exposure in vultures (Gyps africanus) in Kenya, Bull / J.O. Lalah, M. Virani, I.O. Jondiko, K.W. Schramm // Environ. Contam. Toxicol. – 2010. – V. 84. – №5. – P. 536–544. DOI:10.1007/s00128-010-9956-5

19. C.F. Ramos. New method for the determination of carbamate and pyrethroid insecticides in water samples using on-line SPE fused core column

chromatography / D. Satinsky, P. Solich // Talanta. – 2014. – V. 129. – P. 579–585. DOI:10.1016/j.talanta.2014.06.037

20. Hashemi P. Reduced graphene oxide decorated on Cu/CuO-Ag nanocomposite as a highperformance material for the construction of a non-enzymatic sensor: Application to the determination of carbaryl and fenamiphos pesticides / Karimian N., Khoshsafar H., Arduini F., Mesri M, Afkhami A., Bagheri H. // Materials Science & Engineering C. – 2019. – № 102. – P. 764-772. DOI:10.1016/j.msec.2019.05.010

21. Garrido E. M. Electrochemical Methods in Pesticides Control / Delerue-Matos C., Lima J. L. F. C., and Brett A. M. O. // Anal. Lett. – 2004. – V. 37. – № 9. – P. 1755–1791. DOI: 10.1081/AL-120039425

22. Li Y. Electrochemical biosensing of carbaryl based on acetylcholinesterase immobilized onto electrochemically inducing porous graphene oxide network / Shi L, Han G, Xiao Y, ZhouW. // Sensors Actuators B Chem. – 2017. – № 238. – P. 945–953. DOI:10.1016/j.snb.2016.07.152

23. Jirasirichote A. Voltammetric detection of carbofuran determination using screen-printed carbon electrodes modified with gold nanoparticles and graphene oxide / Punrat E., Suea-Ngam A., Chailapakul O., Chuanuwatanakul S. // Talanta. – 2017. – № 175. – P. 331-337. DOI:10.1016/j.talanta.2017.07.050

24. Методические указания 4.1.1392-03. Определение остаточных количеств карбофурана в воде, почве, корнеплодах и зеленой массе сахарной свеклы, семенах и масле рапса (горчицы) методом газожидкостной хроматографии. Сборник методических указаний. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – Вып. 3. – Ч. 2. – 60 с.

25. Методические указания № 1565-76 Определение пропоксура и фенеткарба в молоке и мясе методом тонкослойной хроматографии. Под ред. М.А. Клисенко. – М.: Колос, 1983. – 304 с.

26. Alamgir Zaman Chowdhury. Detection of the residues of nineteen pesticides in fresh vegetable samples using gas chromatography-mass spectrometry / M., Fakhruddin, A. N. M., Nazrul Islam, M., Moniruzzaman, M., Gan, S. H., &

Khorshed Alam, M. // Food Control. – 2013. – V. 34. – №2. – P. 457–465. DOI:10.1016/j.foodcont.2013.05.006

27. Tobin R. Detection of pesticide residues in organic and conventional fruits and vegetables available in Ireland using gas chromotography/tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) and liquid chromotography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) detection / Walsh T, Garvey J, Larkin T // J Nutrition Health Food Sci. – 2014). – P. 2-7. DOI:10.15226/jnhfs.2014.00113

28. J.J. Vreuls. Automated on-line gel permeation chromatography-gas chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in olive oil / R.J. Swen, V.P. Goudriaan, M.A. Kerkhoff, G.A. Jongenotter, U.A. Brinkman // J. Chromatogr. A. – 1996). – V. 750. – P. 275–286. DOI: 10.1016/0021-9673(96)00581-x

29. Moral A. Determination of benzimidazolic fungicides in fruits and vegetables by supramolecular solvent-based microextraction/liquid chromatography/fluorescence detection / Sicilia MD, Rubio S. // Anal Chim Acta. – 2009. – V. 650. – P. 207–213. DOI:10.1016/j.aca.2009.07.056

30. Liu M. Simultaneous determination of carbamate and organophosphorus pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography–mass spectrometry / Hashi Y, Song Y, Lin J-M. // J Chromatogr A. –2005. – V. 1097. – P. 183–187. DOI:10.1016/j.chroma.2005.10.022

31. Goto T. The high throughput analysis of N-methyl carbamate pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry using a short column / Ito Y, Yamada S, Matsumoto H, Oka H, Nagase H. // Anal Chim Acta. – 2006. – V. 555. – P. 225–232. DOI:10.1016/j.aca.2005.09.055

32. S. Mukdasai. Two-step microextraction combined with high performance liquid chromatographic analysis of pyrethroids in water and vegetable samples / C. Thomas, S. Srijaranai // Talanta. – 2014. – V. 120. – P. 289–296. DOI:10.1016/j.talanta.2013.12.005c

33. Shen, F. Simultaneous Determination of Aniline, Benzidine, Microcystins, and Carbaryl in Water Using Ultra-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry / Wang, L. H., Zhou, Q., Huang, X. H., Zhang,

J. Z., Zhu, P. Y., Dai, X. L., & Xu, Y. J. // Water, Air, and Soil Pollution. – 2017. – V. 228. – №2. DOI:10.1007/s11270-017-3260-5

34. Bogialli S. Simple and Rapid Assay for Analyzing Residues of Carbamate Insecticides in Vegetables and Fruits: Hot Water Extraction Followed by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry / Curini R., Corcia A.D., Nazzari M., and Tamburro D. // J. Agric. Food Chem. – 2004. – V. 52. – P. 665-671. DOI: 10.1021/jf035195j

35. Патент № 958963. Способ определения карбарила. Куликовская А. П. Вербицкая Р.П., Гнеушева Л.П. – 1982. – 5 с.

36. Jose A. Determination of carbamates in soils by liquid chromatography coupled with on-line post column UV irradiation and chemiluminescence detection. / Pulgarı M., Luisa F. Bermejo G., Carrasquero Dura A. // Department of Analytical Chemistry and Foods Technology. – 2018. – P. 15-23. DOI:10.1016/j.arabjc.2018.07.008

37. F.T. De Souza. Method validation for HS-SPME/GC-MS for determination of carbaryl in blood plasma / De Souza, A.L., De Araújo Marques, R., Filho, L,Pinheiro, R.F., Longhinotti, E., Becker, H. // Química Nova. – 2017. – V. 40. – №5. – P. 586-593, DOI: 10.21577/0100-4042.20170026

38. Vichapong, J. Development and validation of an ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction method for liquid chromatographic determination of carbamate residues in fruit juices. / Burakham, R. // Acta Chromatographica. – 2015. – V. 27. – №1. – P. 127–145. DOI :10.1556/achrom.27.2015.1.10

39. Ma, X. Extraction of carbamate pesticides in fruit samples by graphene reinforced hollow fibre liquid microextraction followed by high performance liquid chromatographic detection / Wang, J., Wu, Q., Wang, C., & Wang, Z. // Food Chemistry. – 2014. – V. 157. – P. 119–124. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.02.007

40. Murthy P.K. A novel spectrophotometric method for the determination of Carbaryl in Environmental samples / Sulochana M. and Naidu N.V. // Der Pharmacia Sinica. – 2012. – V.3. – №2. – P. 224-228. www.researchgate.net

41. Ni, Y. Application of chemometrics methods for the simultaneous kinetic spectrophotometric determination of aminocarb and carbaryl in vegetable and water samples / Xiao, W., & Kokot, S. // Journal of Hazardous Materials. – 2009. – V.168. – №2-3. – P. 1239–1245. DOI:10.1016/j.jhazmat.2009.03.003

42. Gallignani, M. Determination of carbaryl in pesticide formulations by Fourier transform infrared spectrometry with flow analysis / Garrigues, S., Martínez-Vado, A., & de la Guardia, M. // The Analyst. – 1993. – V. 118. – №8. – P. 1043–1048. DOI:10.1039/an9931801043

43. Rubio, L. Identification and quantification of carbamate pesticides in dried lime tree flowers by means of excitation-emission molecular fluorescence and parallel factor analysis when quenching effect exists / Ortiz, M. C., & Sarabia, L. A. // Analytica Chimica Acta. – 2014. – V. 820. – P. 9–22. DOI:10.1016/j.aca.2014.02.008

44. Chen, Y. Double responsive analysis of carbaryl pesticide based on carbon quantum dots and Au nanoparticles / Qin, X., Yuan, C., Shi, R., & Wang, Y. // Dyes and Pigments. – 2020. – V. 10. – P. 17-25. DOI:10.1016/j.dyepig.2020.108529

45. -Xie, D.-D. Determination of Trace Carbaryl in Water Using Europium-Diallyl Phthalate as Fluorescent Probe / Han, R.-Y., Shen, J.-C., Xiao, C.-G., Zheng, Z.-K., & Wang, Z.-W. // Chinese Journal of Analytical Chemistry. – 2015. – V. 43. – №7. – P. 1069–1074. DOI:10.1016/s1872-2040(15)60841-6

46. Pei, X. X. Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: a review / Pei, B. Zhang, J. Tang, B. Liu, W. Lai, D. Tang // Analytica Chimica Acta. – 2013. – V. 758. – P.1-18. DOI:10.1016/j.aca.2012.10.060

47. Пивень, Н. В. Методы иммунохимического анализа с использованием меченых реагентов / А. И. Бураковский // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2012. – Т.1. – С. 93-102.

48. Bengten, E. Immunoglobulin Isotypes: Structure, Function, and Genetics. In Origin and Evolution of the Vertebrate Immune System. / Wilson, M., Miller, N., Clem, L. W., Pilstrom, L., Warr, G. W.; Du Pasquier, L., Littman // Current Topics in Microbiology and Immunology. – 2000. – V. 248. – P. 189.

49. Suo, Z. Antibody Selection for Immobilizing Living Bacteria / Yang, X., Avci, R., Deliorman, M., Rugheimer, P., Pascual, D. W., Idzerda, Y. // Anal. Chem. – 2009. – V. 81. – P. 7571−7578. DOI:10.1021/ac9014484

50. Cho, I.-H. Current technologies of electrochemical immunosensors: Perspective on signal amplification / Lee, J., Kim, J., Kang, M., Paik, J.K., Ku, S., Cho, H.-M., Irudayaraj, J., Kim, D.-H. // Sensors. – 2018. – V. 18. – P. 207. DOI:10.3390/s18010207

51. Sharma, S. Antibodies and Antibody-Derived Analytical Biosensors / Byrne, H.; O'Kennedy, R. J. // Essays Biochem. – 2016. – V. 60. – P. 9−18. DOI:10.1042/EBC20150002

52. Borrebaeck, C. A. Antibodies in diagnostics–from immunoassays to protein chips / Borrebaeck, C. A. // Immunology today. – 2000. – V. 21. – № 8. – P. 379-382. DOI:10.1016/S0167-5699(00)01683-2

53. Hennion M. C. Applications and validation of immunoassays for pesticides analysis / Hennion M. C. // Analusis magazine. – 1998. – V. 26. – № 6. – P. 149-155. DOI:10.1051/analusis:199826060149

54. Luleka Luzi-Thafeni. Graphene-Polyaniline Biosensor for Carbamate Pesticide Determination in Fruit Samples / B. Silwana, E. Iwuoha and V. Somerset // Biosensors - Micro and Nanoscale Applications. – 2015. – P. 405-423. DOI:10.5772/61220

55. Dong, T. Development of a sensitivity-improved immunoassay for the determination of carbaryl in food samples / Sun, J., Liu, B., Zhang, Y., Song, Y., & Wang, S // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2010. – V. 90. – №7. – P. 1106–1112. DOI:10.1002/jsfa.3917

56. Sun, J. Development of enzyme linked immunoassay for the simultaneous detection of carbaryl and metolcarb in different agricultural products / Dong, T., Zhang, Y., & Wang, S. // Analytica Chimica Acta. – 2010. – V. 666. – №1–2. – P. 76–82. DOI:10.1016/j.aca.2010.03.051

57. Boroduleva, A. Y. Development of fluorescence polarization immunoassays for parallel detection of pesticides carbaryl and triazophos in wheat

grains / Wu, J., Yang, Q., Li, H., Zhang, Q., Li, P., & Eremin, S. A. // Analytical Methods. – 2017. – V. 9. – №48. – P. 6814–6822. DOI:10.1039/c7ay02091k

58. He, J. One-step immunoassay for the insecticide carbaryl using a chicken single-chain variable fragment (scFv) fused to alkaline phosphatase / Tao, X., Wang, K., Ding, G., Li, J., Li, Q. X., Gee, S. J., Hammock, B. D., & Xu, T. // Analytical Biochemistry. – 2019. – T. 572. – P. 9–15. DOI:10.1016/j.ab.2019.02.022

59. Cervera-Chiner, L. Detection of DDT and carbaryl pesticides in honey by means of immunosensors based on high fundamental frequency quartz crystal microbalance (HFF-QCM) / March, C., Arnau, A., Jiménez, Y., & Montoya, Á. // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2020. – V. 100. – №6. – P. 2468–2472. DOI:10.1002/jsfa.10267

60. Fernandez-Benavides, D. A. A novel bismuth-based lead-free piezoelectric transducer immunosensor for carbaryl quantification / Cervera-Chiner, L., Jiménez, Y., de Fuentes, O. A., Montoya, A., & Muñoz-Saldaña, J. // Sensors and Actuators, B: Chemical. – 2019. – V. 285. – №1. – P. 423–430. DOI:10.1016/j.snb.2019.01.081

61. Zhang, C. Development of a biomimetic enzyme-linked immunosorbent assay based on molecularly imprinted polymers on paper for the detection of carbaryl / Cui, H., Han, Y., Yu, F., & Shi, X. // Food Chemistry. – 2018. – T. 240. – №7. – P. 893–897. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.07.109

62. Cheng, X. Determination of four kinds of carbamate pesticides by capillary zone electrophoresis with amperometric detection at a polyamide-modified carbon paste electrode / Wang, Q., Zhang, S., Zhang, W., He, P., & Fang, Y. // Talanta. – 2007. – V. 71. – №3. – P. 1083–1087. DOI:10.1016/j.talanta.2006.06.001

63. Lee, H.-S. Determination of carbamate pesticides by a cholinesterase-based flow injection biosensor / Kim, Y.-A., Chung, D. H., & Lee, Y. T. // International Journal of Food Science and Technology. – 2001. – V. 36. – №3. – P. 263–269. DOI:10.1046/j.1365-2621.2001.00453.x

64. Çelebi M.S. Electrochemical oxidation of carbaryl on platinum and boron-doped diamond anodes using electro-Fenton technology / Oturan N., Zazou H.,

Hamdani M., Oturan M.A. // Separation and Purification Technology. – 2015. – V. 156. – P. 996–1002. DOI:10.1016/j.seppur.2015.07.025

65. Qingxiang Zhou. Graphene-modified TiO2 nanotube arrays as an adsorbent in micro-solid phase extraction for determination of carbamate pesticides in water samples / Zhi Fang // Analytica Chimica Acta. – 2015. – P. 1-31. DOI:10.1016/j.aca.2015.02.019

66. Benzhi Liu. Electrochemical analysis of carbaryl in fruit samples on grapheme oxide-ionic liquid composite modified electrode / Bo Xiao, Liqiang Cui // Journal of Food Composition and Analysis. – 2015. – V. 40. – P. 14-18. DOI:10.1016/j.jfca.2014.12.010

67. Fernando C. Moraes. Direct electrochemical determination of carbaryl using a multi-walled carbon nanotube/cobalt phthalocyanine modified electrode / Lucia H. Mascaro, Sergio A.S. Machado, Christopher M.A. Brett. // Talanta. – 2009. – V. 79. – P. 1406-1411. DOI:10.1016/j.talanta.2009.06.013

68. Benzhi Liu. Electrochemical analysis of carbaryl in fruit samples on grapheme oxide-ionic liquid composite modified electrode / Bo Xiao, Liqiang Cui // Journal of Food Composition and Analysis. – 2015. – V. 40. – P. 14-18. DOI:10.1016/j.jfca.2014.12.010

69. Lijuan Zhao. Electrochemical Determination of Carbaryl by Using a Molecularly Imprinted Polymer/Graphene-Ionic Liquid-Nano Au/chitosan-AuPt Alloy Nanoparticles Composite Film Modified Electrode / Faqiong Zhao, Baizhao Zeng // Int. J. Electrochem. Sci. – 2014. – V. 9. – P. 1366 – 1377

70. MingYan Wang. Electrochemical nonenzymatic sensor based on CoO decorated reduced graphene oxide for the simultaneous determination of carbofuran and carbaryl in fruits and vegetables / JunRao Huang, Meng Wang, DongEn Zhang, Jun Chen // Food Chemistry. – 2014. – V. 151. – P. 191–197. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.11.046

71. Duffy, G. Electrochemical immunosensors for food analysis: A review of recent developments / Moore, E. // Anal. Lett. – 2017. – V. 50. – P. 1–32. DOI:10.1080/00032719.2016.1167900

72. Zhao, G. Advances in biosensor-based instruments for pesticide residues rapid detection / Wang, H.; Liu, G. // Int. J. Electrochem. Sci. – 2015. – V. 10. – P. 9790–9807

73. Zhang, C. A simple and sensitive competitive bio-barcode immunoassay for triazophos based on multi-modified gold nanoparticlesand fluorescent signal amplification / Du, P.; Jiang, Z.; Jin, M.; Chen, G.; Cao, X.; Cui, X.; Zhang, Y.; Li, R.; El-Aty, A.A. // Anal. Chim. Acta. – 2018. – V. 999. – P. 123–131. DOI:10.1016/j.aca.2017.10.032

74. Arugula, M.A. Novel trends in affinity biosensors: Current challenges and perspectives / Simonian, A. // Meas. Sci. Technol. – 2014. – V. 25. – №3. – P. 1-8. DOI:10.1088/0957-0233/25/3/032001

75. V.G. Andreou. A portable fiber-optic pesticide biosensor based on immobilized cholinesterase and sol–gel entrapped bromcresol purple for in-field use / Y.D. Clonis // Biosens. Bioelectron. – 2002. – V. 17. – P. 61–69. DOI:10.1016/S0956-5663(01)00261-5

76. Chiew San Fang. Rapid and Sensitive Electrochemical Detection of Carbaryl Based on Enzyme Inhibition and Thiocholine Oxidation Mediated by a Ruthenium(III) Complex / Kyung Hwan Oh, Jin Kyoon Park, and Haesik Yang // Electroanalysis. – 2017. – V. 29. – P. 339 – 344. DOI:10.1002/elan.201600308

77. Pedrosa V. Determination of Parathion and Carbaryl Pesticides in Water and Food Samples Using a Self Assembled Monolayer Acetylcholinesterase Electrochemical Biosensor / Caetano J., Machado S. and Bertotti M. // Sensors. – 2008. – V. 8. – P. 4600-4610. DOI: 10.3390/s8084600

78. Liu T. Acetylcholinesterase biosensor based on 3-carboxyphenylboronic acid/reduced graphene oxide–gold nanocomposites modified electrode for amperometric detection of organophosphorus and carbamate pesticides / Su H., Qu X., Ju P., Cui L., Ai S. // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2011. – T. 160. – №1. – P. 1255-1261. DOI:10.1016/j.snb.2011.09.059

79. Pérez-Fernández B. Electrochemical (Bio)Sensors for Pesticides Detection Using Screen-Printed Electrodes / Costa-García A., Escosura- Muñiz A. // Biosensors. – 2020. – V. 10. – №4. – P. 32. DOI:10.3390/bios10040032

80. Mollarasouli F. The Role of Electrochemical Immunosensors in Clinical Analysis / Kurbanoglu S., A. Ozkan S. // Biosensor. – 2019. – V. 9. – №3. – P. 86. DOI:10.3390/bios9030086

81. Barek. J. How to Improve the Performance of Electrochemical Sensors via Minimization of Electrode Passivation // Chemosensors. – 2021. – V. 9. – №1. – P. 12. DOI:10.3390/chemosensors9010012

82. Mitchell J. Small Molecule Immunosensing Using Surface Plasmon Resonance // Sensors. – 2019. – V. 10. – №8. – P. 7323-7346. DOI:10.3390/s100807323

83. Katarzyna Tokarek. Green Synthesis of Chitosan-Stabilized CopperNanoparticles / Jose L Hueso, Piotr Kus´trowski, Graz˙yna Stochel, and Agnieszka Kyziol // Eur. J. Inorg. Chem. – 2013. – P. 4940–4947. DOI:10.1002/ejic.201300594

84. Montoya, A. Immunosensors for pesticide analysis in food and the environment, and enzymatic biosensors for sweat ions control during sport practice / Manclús, J.J., Moreno, M.J., Saiz, J., Arnau, A., March, C. // IFMBE proceedings. – 2011. – V. 33. – P. 172-175. DOI:10.1007/978-3-642-21198-0_44

85. Abad, A. Production of Monoclonal Antibodies for Carbaryl from a Hapten Preserving the Carbamate Group / Montoya, A. // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 1994. – V. 42. – №8. – P. 1818–1823. DOI:10.1021/jf00044a047

86. Noskova G. N. Properties and application of gold-carbon composite electrodes in electrochemical analysis methods / Zakharova E. A., Chernov V. I., et al. // Izv. Tomsk. Politekh. Univ. Inzh. Georesurs. – 2012. – T. 320. – № 3. – C. 109 – 115

87. C. Karunakaran. Biosensors and Bioelectronics / Pandiaraj, P. Santharaman //M: Elsevier, – 2015. – P. 205–245

88. Rinken T. Biosensors - Micro and Nanoscale Application: InTech, – 2015. – P. 466

89. ГОСТ Р 52842-2007. Методы иммунологического или бактериально-рецепторного анализа для определения остатков антибактериальных веществ и пестицидов

90. Комптон Р.Г. Постигая вольтамперомерию / Бэнкс К. Е. // Издательство Томского политехнического университета. – 2015. – 509 с.

91. Шольц Ф. Электроаналитические методы теория и практика. – М .: Бином. Лаборатория знаний, 2006. – 326 с.

92. Галюс З. Теоретические основы электрохимического анализа. – М.: Мир, 1974. – 552 с.

93. Lucia H. Direct electrochemical determination of carbaryl using a multi-walled carbon nanotube/cobalt phthalocyanine modified electrode / Mascaroa Fernando C. Moraesa, Sergio A.S. Machadob, Christopher M.A. Brett. // Talanta. – 2009. – V. 79. – P. 1406–1411. DOI:10.1016/j.talanta.2009.06.013

94. РМГ 61-2010. Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. – 2013. – 53 с.

95. Михеева Е.В. Определение электрокинетического потенциала методом электрофореза / Пикула Н.П. // Методические указания к выполнению лабораторных работ по дисциплинам «Поверхностные явления и дисперсные системы» и «Коллоидная химия» для студентов ХТФ, ФТФ, ЭЛТИ, ИГНД. – Издательство Томского политехнического университета. – 2009. – Томск. – С.56

96. Hermanson G.T. Bioconjugate Techniques. 2nd Edition. – 2008. Part II. – P. 215-334

97. 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. – С. 28-34. DOI:10.26896/1028-6861-2019-85-1-I-28-34

98. Shinichi Enami. OH-Radical Specific Addition to Glutathione S-Atom at the Air-Water Interface: Relevance to the Redox Balance of the Lung Epithelial Lining

Fluid / Hoffmann M. R., Colussi A. J. // J. Phys. Chem. Lett. – 2015. – V. 6. – №19. – P. 3935 – 3943. DOI:10.1021/acs.jpclett.5b01819

99. Flohe L. The fairytale of the GSSG/GSH redox potential // Biochim. Biophys. Acta. – 2016. – V. 1830. – № 5. – P. 3139–3142. DOI:10.1016/j.bbagen.2012.10.020

100. J.W. Sun. Development of enzyme linked immunoassay for the simultaneous detection of carbaryl and metolcarb in different agricultural products / T.T. Dong, Y. Zhang, S.O. Wang. // Anal. Chim. Acta. – 2010. – V. 666. – P. 76-82. DOI:10.1016/j.aca.2010.03.051

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

На рисунках 36-38 представлены диаграммы распределения НЧ Cu в зависимости от гидродинамического радиуса частиц при различных условиях пробоподготовки.

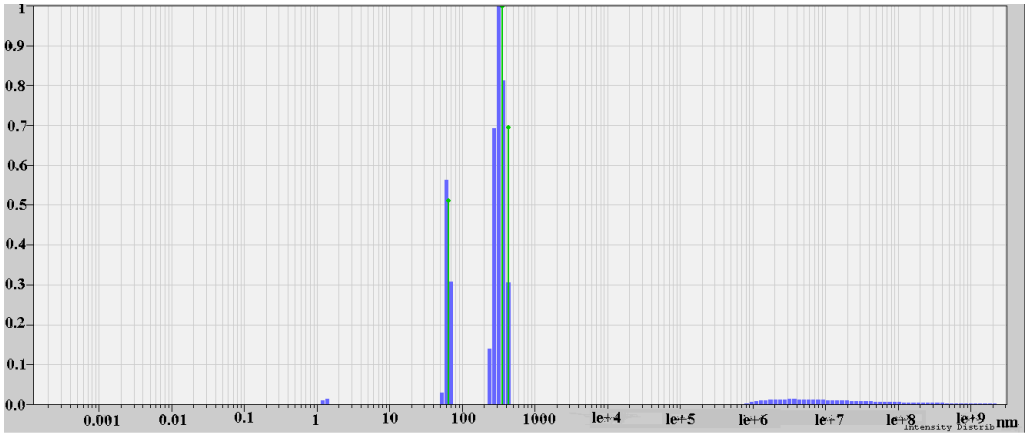


Рисунок 36 Диаграмма распределения НЧ Cu в зависимости от гидродинамического радиуса частиц (образец 1)

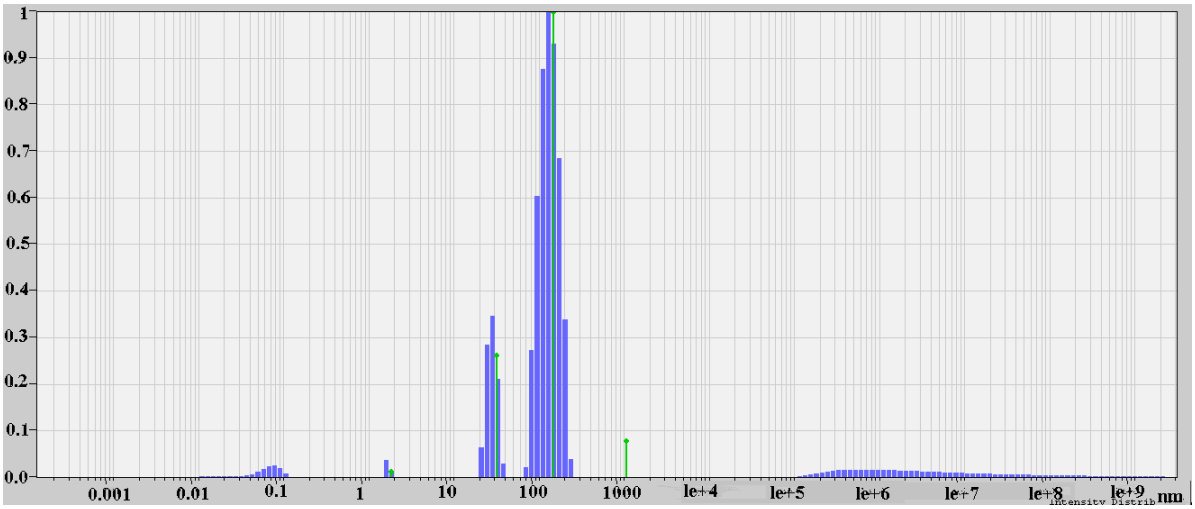


Рисунок 37 Диаграмма распределения НЧ Cu в зависимости от гидродинамического радиуса частиц (образец 2)

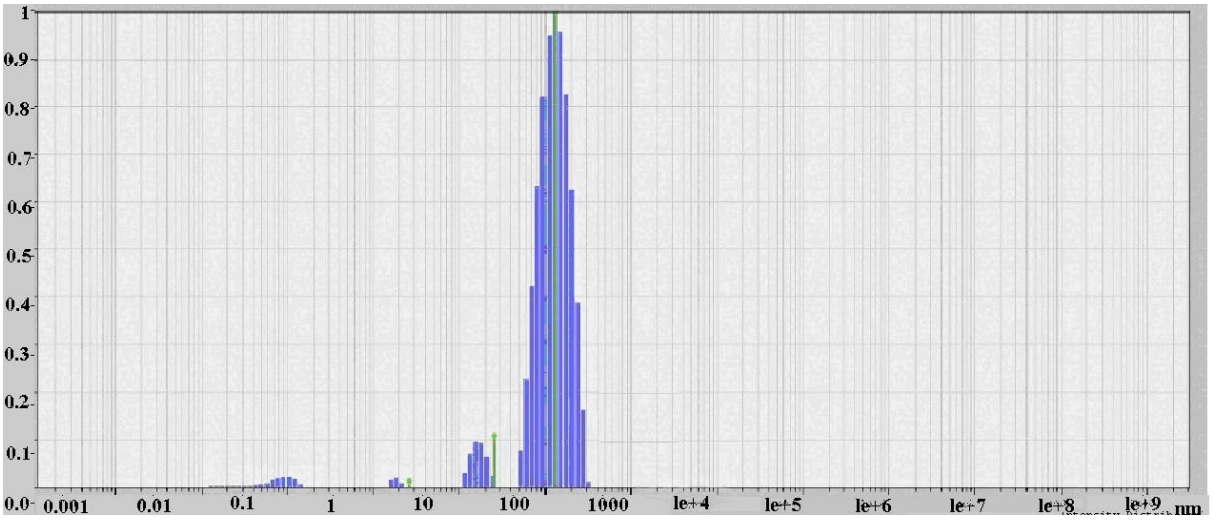


Рисунок 38 Диаграмма распределения НЧ Cu в зависимости от гидродинамического радиуса частиц (образец 3).

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

1 Оценка показателей прецизионности (повторяемости и воспроизводимости) методики анализа

1.1Оценка показателя повторяемости методики анализа

1.1.1 Рассчитывают среднее арифметическое X_{ml} и выборочную дисперсию S_{ml}^2 результатов единичного анализа содержания компонента в m-м ОО, полученных в условиях повторяемости (параллельных определений):

$$X_{ml} = \frac{\sum_{i=1}^{N} X_{mli}}{N}, \qquad 4$$

$$S_{ml}^2 = \frac{\sum_{i=1}^{N} (X_{mli} - X_{ml})^2}{N-1}, \qquad 5$$

$$m = 1,\ldots, M\ ;\ l = 1,\ldots, L.$$

1.1.2 На основе полученных значений выборочных дисперсий $S_{m1}^2,\ldots, S_{mL}^2$ в m-м ОО проверяют гипотезу о равенстве генеральных дисперсий*, используя критерий Кохрена.

Значение критерия Кохрена $G_{m(\max)}$ рассчитывают по формуле

$$G_{m(\max)} = \frac{(S_{ml}^2)_{\max}}{\sum_{l=1}^{L} S_{ml}^2} \qquad 6$$

и сравнивают его с табличным значением этого критерия $G_{\text{табл}}$ для числа степеней свободы $\nu = N-1$, соответствующего максимальной дисперсии, и $f = L$, соответствующего числу суммируемых дисперсий, и принятой доверительной вероятности $P = 0{,}95$ (значения $G_{\text{табл}}$) приведены в приложении 2.

Если $G_{m(\max)} > G_{\text{табл}}$, то соответствующее $(S_{ml}^2)_{\max}$ из дальнейших расчетов исключают и процедуру повторяют до следующего по значению S_{ml}^2 и т.д. до тех пор, пока $G_{m(\max)}$ не станет меньше либо равно $G_{\text{табл}}$.

1.1.3 Не исключенные из расчетов S_{ml}^2 считают однородными и по ним оценивают средние квадратические отклонения (далее - СКО), характеризующие

повторяемость результатов единичного анализа (параллельных определений), полученных для содержания, соответствующего содержанию компонента в m-м ОО. Эти СКО - S_{rm} рассчитывают по формуле

$$S_{rm} = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^{L} S_{ml}^2}{L}}, \qquad 7$$

где в числе слагаемых нет отброшенных значений.

1.1.4 Показатель повторяемости методики анализа в виде СКО повторяемости - σ_{rm} для содержания, соответствующего содержанию компонента в m-м ОО, устанавливают, принимая равным S_{rm}

$$\sigma_{rm} \approx S_{rm}. \qquad 8$$

1.1.5 Показатель повторяемости методики анализа в виде предела повторяемости* - r_{nm} для содержания, соответствующего содержанию компонента в m-м ОО, рассчитывают по формуле

$$r_{nm} = Q(P, n)\sigma_{rm}, \qquad 9$$

где n - число параллельных определений, предусмотренных методикой анализа для получения результата анализа,

$Q(P, n) = 3{,}31$ при $n = 3$, $P = 0{,}95$;

1.2 Оценка показателя воспроизводимости методики анализа

1.2.1 Рассчитывают выборочное СКО результатов анализа m-го ОО, полученных в условиях воспроизводимости, - S_{Rm} по формуле

$$S_{Rm} = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^{L}(X_{ml} - X_m)^2}{L-1} + \left(\frac{1}{n} - \frac{1}{N}\right)S_{rm}^2}, \quad m = 1, \ldots, M, \qquad 10$$

где X_m - общее среднее значение результатов анализа, полученных в условиях воспроизводимости.

X_m рассчитывают по формуле

$$X_m = \frac{\sum_{l=1}^{L} X_{ml}}{L}. \qquad 11$$

1.2.2Оценка показателя воспроизводимости методики анализа

Показатель воспроизводимости методики анализа в виде СКО воспроизводимости - σ_{Rm} для содержания, соответствующего содержанию компонента в m-м ОО, устанавливают, принимая равным S_{Rm}:

$$\sigma_{Rm} \approx S_{Rm}. \qquad 12$$

Показатель воспроизводимости методики анализа в виде предела воспроизводимости* - R_m для содержания, соответствующего содержанию компонента в m-м ОО, рассчитывают по формуле

$$R_m = Q(P, 2)\,\sigma_{Rm}, \qquad 13$$

где $Q(P, 2) = 2{,}77$ при $P = 0{,}95$.

Значение предела воспроизводимости используют при проверке приемлемости результатов анализа, полученных в условиях воспроизводимости.

Примечание - В случае невозможности организации эксперимента в разных лабораториях экспериментальные данные получают в одной лаборатории в условиях внутрилабораторной прецизионности (серии результатов единичного анализа получают в разное время, разные операторы, используя разные партии реактивов одного типа, разные наборы мерной посуды и т.п.). Результаты единичного анализа внутри каждой серии получают в условиях повторяемости. В этом случае показатель воспроизводимости методики анализа в виде СКО рассчитывают по формуле

$$\sigma_{Rm} \approx kS_{R_n m}, \qquad 14$$

где $S_{R_n m}$ - выборочное СКО результатов анализа, рассчитанное в соответствии с 1.2.1 на основе результатов, полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности;

k - коэффициент, учитывающий условия проведения эксперимента. k может принимать значения от 1,2 до 2,0.

1.3 Оценка показателя правильности методики анализа

1.3.1 Рассчитывают оценку математического ожидания систематической погрешности методики анализа - Θ_m как разность между средним значением результатов анализа X_m и аттестованным значением m-го ОО (СО или АС) - C_m

$$\Theta_m = X_m - C_m, \quad m = 1, \ldots, M. \qquad 15$$

1.3.2 Проверяют значимость вычисленных значений Θ_m по критерию Стьюдента. Для этого рассчитывают значение t-критерия для m-го ОО - t_m:

$$t_m = \frac{|\Theta_m|}{\sqrt{\frac{S_m^2}{L} + \frac{\Delta_{om}^2}{3}}}, \qquad 16$$

где $S_m^2 = \frac{\sum_{l=1}^{L}(X_{ml} - X_m)^2}{L-1}$ - дисперсия, характеризующая разброс средних арифметических значений результатов единичного анализа X_{ml}, полученных в l-й лаборатории, относительного среднего значения результатов анализа X_m;

Δ_{om} - погрешность аттестованного значения m-го ОО.

1.3.3 Полученное значение t_m сравнивают с $t_{\text{табл}}$ при числе степеней свободы $f = L - 1$ для доверительной вероятности $P = 0{,}95$.

1.3.4 Если $t_m \le t_{\text{табл}}$, то оценка систематической погрешности незначима на фоне случайного разброса, и в этом случае ее принимают равной нулю ($\Theta_m = 0$).

1.3.5 Если $t_m > t_{\text{табл}}$, то оценка систематической погрешности значима на фоне случайного разброса и для принятия решения о приемлемости методики анализа вводят еще один дополнительный критерий:

$$|\Theta_m| \le \xi \sigma_{Rm} \qquad 17$$

где ξ может принимать значения от 0,5 до 1 в зависимости от используемых в методике анализа метода, условий, средств измерений и т.п., а также характеристик объекта анализа.

При выполнении данного критерия может быть принято решение (с учетом примечания к 6.4) о введении в результаты анализа, получаемые при реализации данной методики, поправки на значение Θ, т.е. значение Θ, соответствующее содержанию $C - \Theta(C)$, вычитают из любого результата анализа, полученного по методике.

Если данный критерий не выполняется, принимают решение о доработке методики.

1.3.6 При незначимости Θ или при принятом для методики анализа решении о введении в результаты анализа поправки показатель правильности методики анализа [верхнюю ($\Delta_{с.в\,m}$) и нижнюю ($\Delta_{с.н\,m}$) границы, в которых неисключенная систематическая погрешность методики анализа (для содержания, соответствующего содержанию определяемого компонента в m-м ОО) находится с принятой вероятностью $P = 0{,}95$ рассчитывают по формуле

$$\Delta_{с.в\,m} = |\Delta_{с.н\,m}| = \Delta_{с\,m} = 1{,}96 * \sqrt{\frac{S_m^2}{L} + \frac{\Delta_{0m}^2}{3}} = 1{,}96\sigma_{с\,m}. \qquad 18$$

1.4 Оценка показателя точности методики анализа

Верхнюю ($\Delta_{в\,m}$) и нижнюю ($\Delta_{н\,m}$) границы, в которых погрешность результата анализа* (для содержания, соответствующего содержанию определяемого компонента в m-м ОО) находится с принятой вероятностью $P = 0{,}95$, рассчитывают по формуле

$$\Delta_{в\,m} = |\Delta_{н\,m}| = \Delta_m = 1{,}96\sqrt{\sigma_{Rm}^2 + \sigma_{с\,m}^2} = 1{,}96\sigma_m(\Delta). \qquad 19$$

Примечания

1. при выполнении условия $\frac{\Delta_{с\,m}}{\sigma_{Rm}} < 0{,}8$

показатель точности методики анализа может быть рассчитан по формуле

$$\Delta_{в(н)m} = \pm 1{,}96\sigma_{Rm}. \qquad 20$$

2. В случае, если учет $\Theta(C)$ при вычислении показателя правильности методики анализа

$$\Delta_{с.в(н)m} = \Theta_m \pm 1{,}96\sigma_{с\,m}, \qquad 21$$

где $\Delta_{с.в(н)m}$ - верхняя и нижняя границы, в которых систематическая погрешность методики анализа находится с принятой вероятностью $P = 0{,}95$, не приводит к превышению приписанной характеристики погрешности результата анализа над нормой погрешности, поправку в результат на значение $\Theta(C)$ можно не вносить.

В этом случае показатель точности методики анализа (для содержания, соответствующего содержанию определяемого компонента в m-м ОО) рассчитывают по формуле:

$$\Delta_{в(н)m} = \Theta_m \pm 1{,}96\sigma_m(\Delta)\,. \qquad 22$$

1. Вольтамперометрическая методика определения карбарила с использованием модифицированного углеродными чернилами ГЭ

Таблица 15

Расчетные значения для концентрации 0,04 мкг/кг

Испытания	X_1 (мкг/кг)	X_2(мкг/кг)	$X_{ср}$ (мкг/кг)	S^2_2
1	0,024	0,028	0,02600	0,0000080
2	0,028	0,026	0,02700	0,00000200
3	0,028	0,024	0,02600	0,00000800
4	0,032	0,034	0,03300	0,00000200
5	0,034	0,038	0,03600	0,0000080

Таблица 16

Оценка показателей повторяемости и воспроизводимости

Gрасч	S_{rm}	X_m	S_{Rm}
0,285	0,0024	0,0296	0,0046
G табл=0,841			

Таблица 17

Оценка показателя правильности, точности

См [мкг/кг]	Q=Xm-Cm	$t_{расч}$	$t_{табл}$	±Δc	σc	±Δ	σ(Δ)
0,04	0,0104	0,359	2,57	0,0069	0,0035	0,0114	0,0058

Т.к. tрасч.≤tтабл., значит систематическая погрешность Θ* незначима на фоне случайного разброса и её можно не нужно учитывать в дальнейших расчетах.

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентрации карбарила 0,04 мкг/кг по 5 результатам испытаний:

σr*, мкг/кг	σr*, %	σRл*, мкг/кг	σRл*, %	±Δ*c, мкг/кг	±Δ*c, %	±Δ*, мкг/кг	±Δ*, %
0,00234	7,99	0,0046	15,59	0,0069	23,49	0,0058	19,67

Таблица 18

Расчетные значения для концентрации 0,2 мкг/кг

Испытания	X_1 (мкг/кг)	X_2(мкг/кг)	$X_{ср}$ (мкг/кг)	S^2
1	0,182	0,178	0,18000	0,000008
2	0,186	0,18	0,18300	0,000018
3	0,186	0,18	0,18300	0,000018
4	0,176	0,172	0,17400	0,0000080
5	0,172	0,176	0,17400	0,000008

Таблица 19

Оценка показателей повторяемости и воспроизводимости

Gрасч	S_{rm}	X_m	S_{Rm}
0,3	0,0035	0,1788	0,0045
G табл=0,841			

Таблица 20

Оценка показателя правильности, точности

См [мкг/кг]	Q=Xm-Cm	$t_{расч}$	$t_{табл}$	±Δc	σc	±Δ	σ(Δ)
0,2	0,0212	0,074	2,57	0,057	0,029	0,057	0,029

Т.к. tрасч.≤tтабл., значит систематическая погрешность Θ* незначима на фоне случайного разброса и её можно не нужно учитывать в дальнейших расчетах.

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентрации карбарила 0,2 мкг/кг по 5 результатам испытаний:

σr*, мкг/кг	σr*, %	σRл*, мкг/кг	σRл*, %	±Δ*c, мкг/кг	±Δ*c, %	±Δ*, мкг/кг	±Δ*, %
0,0035	1,94	0,0045	2,54	0,057	31,72	0,029	16,38

Таблица 21

Расчетные значения для концентрации 0,32 мкг/кг

Испытания	X_1 (мкг/кг)	X_2(мкг/кг)	$X_{ср}$ (мкг/кг)	S^2
1	0,318	0,316	0,31700	0,000002
2	0,316	0,314	0,31500	0,000002
3	0,314	0,31	0,31200	0,000008
4	0,32	0,318	0,31900	0,000002
5	0,32	0,322	0,32100	0,000002

Таблица 22

Оценка показателей повторяемости и воспроизводимости

Gрасч	S_{rm}	X_m	S_{Rm}
0,5	0,0018	0,3168	0,0035
G табл=0,841			

Таблица 23

Оценка показателя правильности, точности

См [мкг/кг]	Q=Xm-Cm	$t_{расч}$	$t_{табл}$	±Δc	σc	±Δ	σ(Δ)
0,32	0,0032	0,011	2,57	0,057	0,029	0,057	0,029

Т.к. tрасч.≤tтабл., значит систематическая погрешность Θ* незначима на фоне случайного разброса и её можно не нужно учитывать в дальнейших расчетах.

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентрации карбарила 0,32 мкг/кг по 5 результатам испытаний:

σr*, мкг/кг	σr*, %	σRл*, мкг/кг	σRл*, %	±Δ*c, мкг/кг	±Δ*c, %	±Δ*, мкг/кг	±Δ*, %
0,0018	0,056	0,0035	1,10	0,057	17,89	0,029	9,19

2. Определение карбарила с использованием электрохимического иммуносенсора

Таблица 24

Расчетные значения для концентрации $0,05 \cdot 10^{-2}$ мкг/кг

Испытание	X_1 [мкг/кг]	X_2 [мкг/кг]	$X_{ср}$ [мкг/кг]	S^2
1	0,032	0,03	0,03100	0,000002
2	0,033	0,032	0,03250	0,000001

3	0,032	0,03	0,03100	0,000002
4	0,034	0,032	0,03300	0,000002
5	0,039	0,038	0,03850	0,000001

Таблица 25

Оценка показателей повторяемости и воспроизводимости

Gрасч	S_{rm}	X_m	S_{Rm}
0,29	0,0012	0,03220	0,0031
G табл=0,8412			

Таблица 26

Оценка показателя правильности, точности

См [мкг/кг]	Q=Xm-Cm	$t_{расч}$	$t_{табл}$	±Δc	σc	±Δ	σ(Δ)
$0,05 \cdot 10^{-2}$	0,0168	0,058	2,57	0,0063	0,0032	0,0087	0,0045

Т.к. tрасч.≤tтабл., значит систематическая погрешность Θ* незначима на фоне случайного разброса и её можно не нужно учитывать в дальнейших расчетах.

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентрации карбарила $0,05 \cdot 10^{-2}$ мкг/кг по 5 результатам испытаний:

σr*, мкг/кг	σr*, %	σRл*, мкг/кг	σRл*, %	±Δ*c, мкг/кг	±Δ*c, %	±Δ*, мкг/кг	±Δ*, %
0,0012	3,56	0,0031	9,32	0,0063	18,89	0,0045	13,41

Таблица 27

Расчетные значения для концентрации $1{,}0 \cdot 10^{-2}$ мкг/кг

Испытание	X_1 [мкг/кг]	X_2 [мкг/кг]	$X_{ср}$ [мкг/кг]	S^2
1	0,92	0,919	0,91950	0,000001
2	0,918	0,918	0,91800	0,000000
3	0,92	0,919	0,91950	0,000001
4	0,916	0,915	0,91550	0,000001
5	0,958	0,955	0,95650	0,000005

Таблица 28

Оценка показателей повторяемости и воспроизводимости

Gрасч	S_{rm}	X_m	S_{Rm}
0,75	0,0011	0,9258	0,017
G табл=0,841			

Таблица 29

Оценка показателя правильности, точности

См [мкг/кг]	Q=Xm-Cm	$t_{расч}$	$t_{табл}$	±Δc	σc	±Δ	σ(Δ)
$1{,}0 \cdot 10^{-2}$	0,0742	0,26	2,57	0,059	0,030	0,068	0,035

Т.к. tрасч.≤tтабл., значит систематическая погрешность Θ* незначима на фоне случайного разброса и её можно не нужно учитывать в дальнейших расчетах.

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентрации карбарила $1{,}0 \cdot 10^{-2}$ мкг/кг по 5 результатам испытаний:

σr*,	σr*, %	σRл*,	σRл*, %	±Δ*c,	±Δ*c, %	±Δ*,	±Δ*, %

мкг/кг		мкг/кг		мкг/кг		мкг/кг	
0,0011	0,12	0,017	1,86	0,059	6,33	0,035	3,73

Таблица 30

Расчетные значения для концентрации $2{,}0 \cdot 10^{-2}$ мкг/кг

Испытание	X_1 [мкг/кг]	X_2 [мкг/кг]	$X_{ср}$ [мкг/кг]	S^2
1	1,948	1,941	1,94450	0,00002
2	1,946	1,942	1,94400	0,00001
3	1,95	1,944	1,94700	0,00002
4	1,948	1,944	1,94600	0,00001
5	1,918	1,908	1,91300	0,00005

Таблица 31

Оценка показателей повторяемости и воспроизводимости

Gрасч	S_{rm}	X_m	S_{Rm}
0,46	0,0047	1,9389	0,015
G табл=0,8412			

Таблица 32

Оценка показателя правильности, точности

См [мкг/кг]	Q=Xm-Cm	$t_{расч}$	$t_{табл}$	±Δc	σc	±Δ	σ(Δ)
$2{,}0 \cdot 10^{-2}$	0,0611	0,212	2,57	0,058	0,03	0,065	0,033

Т.к. tрасч.≤tтабл., значит систематическая погрешность Θ* незначима на фоне случайного разброса и её можно не нужно учитывать в дальнейших расчетах.

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентрации карбарила $2{,}0 \cdot 10^{-2}$ мкг/кг по 5 результатам испытаний:

σr*, мкг/кг	σr*, %	σRл*, мкг/кг	σRл*, %	±Δ*c, мкг/кг	±Δ*c, %	±Δ*, мкг/кг	±Δ*, %
0,0047	0,24	0,015	0,75	0,058	2,99	0,033	1,70

Установлены основные метрологические характеристики определения карбарила как вольтамперометрическим определением на модифицированном углеродными чернилами ГЭ, так и электрохимическим иммуносенсором.