

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА  
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*



БОРОДУЛЕВА Анна Юрьевна

**Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ для экспрессного  
определения пестицидов в зерне**

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание учёной степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:  
доктор химических наук,  
профессор Еремин С.А.

Москва – 2019

**Содержание**

Список используемых сокращений	5
Введение	6
<b>ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	<b>11</b>
1.1. Токсикологическое значение анализируемых соединений	11
1.2. Методы определения пестицидов	14
1.2.1. Хроматографические методы	14
1.2.1.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография	15
1.2.1.2. Газовая хроматография	16
1.2.2. Иммунохимические методы анализа пестицидов	18
1.2.2.1. Радиоактивные метки в иммуноанализе пестицидов	19
1.2.2.2. Ферментные метки в иммуноанализе пестицидов	19
1.2.2.2.1. Ферментные метки в иммуноанализе 2,4-Д	20
1.2.2.2.2. Ферментные метки в иммуноанализе триазофоса	20
1.2.2.2.3. Ферментные метки в иммуноанализе карбарила	23
1.2.2.2.4. Ферментные метки в иммуноанализе тиабендазола	26
1.2.2.2.5. Ферментные метки в иммуноанализе тетраконазола	27
1.2.2.3. Флуоресцентные метки в иммуноанализе пестицидов	30
1.2.2.3.1. Флуоресцентный иммуноанализ	30
1.2.2.3.2. Иммуноанализ, основанный на тушении флуоресценции	31
1.2.2.3.3. Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ	32
1.2.2.4. Наночастицы золота в иммуноанализе пестицидов	34
1.2.2.5. Наночастицы углерода в иммуноанализе пестицидов	36
1.2.3. Биосенсоры	36
<b>ГЛАВА II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b>	<b>41</b>
2.1. Оборудование и материалы	41
2.2. Методы исследования	43
2.2.1. Синтез иммунореагентов	43
2.2.1.1. Синтез ЭДФ	43
2.2.1.2. Синтез $(\text{CH}_2)_3\text{ДФ}$ , $(\text{CH}_2)_4\text{ДФ}$ , $(\text{CH}_2)_5\text{ДФ}$ , $(\text{CH}_2)_6\text{ДФ}$ , $(\text{CH}_2)_7\text{ДФ}$	43
2.2.1.3. Синтез трейсеров с ЭДФ	44
2.2.1.4. Синтез трейсеров с $(\text{CH}_2)_3\text{ДФ}$ , $(\text{CH}_2)_4\text{ДФ}$ , $(\text{CH}_2)_5\text{ДФ}$ , $(\text{CH}_2)_6\text{ДФ}$ , $(\text{CH}_2)_7\text{ДФ}$	44

2.2.1.5. Синтез трейсеров с АМФ	45
2.2.1.6. Синтез трейсеров с АФ	46
2.2.2. Техника эксперимента по проведению ПФИА	46
2.2.2.1. Титрование антител	46
2.2.2.2. Проведение конкурентного ПФИА	47
2.2.2.3. Кинетика ассоциации	47
2.2.2.4. Аналитические характеристики ПФИА	48
2.2.3. Условия ВЭЖХ-МС/МС анализа	49
2.2.3.1. Условия хроматографирования	49
2.2.3.2. Условия масс-спектрометрического определения	49
2.2.4. Приготовление контаминированных образцов	50
2.2.5. Подготовка проб	50
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	51
3.1.1. Синтез иммунореагентов	51
3.1.2. Подтверждение структур синтезированных соединений	53
3.1.2.1. ВЭЖХ-МС/МС анализ флуоресцентных меток	53
3.1.2.2. ВЭЖХ-МС/МС анализ трейсеров	54
3.2. Оптимизация ПФИА	63
3.2.1. Определение оптимальных концентраций иммунореагентов	63
3.2.2. Выбор иммунореагентов	64
3.2.2.1. ПФИА 2,4-Д	64
3.2.2.2. ПФИА триазофоса	67
3.2.2.3. ПФИА карбарила	70
3.2.2.4. ПФИА тиабендазола	73
3.2.2.5. ПФИА тетраконазола	75
3.2.3. Специфичность определения аналитов методом ПФИА	77
3.2.3.1. Специфичность определения 2,4-Д	77
3.2.3.2. Специфичность определения триазофоса	79
3.2.3.3. Специфичность определения карбарила	80
3.2.3.4. Специфичность определения тиабендазола	81
3.2.3.5. Специфичность определения тетраконазола	82

3.3. Выбор условий пробоподготовки	84
3.3.1. Влияние органических растворителей на аналитические характеристики ПФИА	85
3.3.2. Влияние состава экстрагента на степень извлечения пестицидов	89
3.3.3. Влияние соизвлеченных экстрагентом компонентов матрицы	89
3.3.4. Экстракция 2,4-Д	93
3.3.5. Определение оптимального разбавления экстрактов	94
3.4. Тестирование разработанных методик в варианте «введено-найдено»	97
3.5. Корреляция результатов ПФИА с результатами ВЭЖХ-МС/МС анализа зерна	100
3.6. Тестирование разработанных методик на коммерчески доступных образцах зерна	102
Выводы	104
Список литературы	105
Приложение	125

**Список используемых сокращений**

- 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота;
- 2,4,5-Т – 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота;
- 4-ХФУ – 4-хлорфеноксиуксусная кислота;
- (СН<sub>2</sub>)<sub>3</sub>ДФ – пропилендиаминфлуоресцеинтиокарбамат;
- (СН<sub>2</sub>)<sub>4</sub>ДФ – бутилендиаминфлуоресцеинтиокарбамат;
- (СН<sub>2</sub>)<sub>5</sub>ДФ – пентаметилендиаминфлуоресцеинтиокарбамат;
- (СН<sub>2</sub>)<sub>6</sub>ДФ – гексаметилендиаминфлуоресцеинтиокарбамат;
- (СН<sub>2</sub>)<sub>7</sub>ДФ – гептаметилендиаминфлуоресцеинтиокарбамат;
- АМФ – 4-аминометилфлуоресцеин;
- АФ – аминофлуоресцеин;
- БСА – бычий сывороточный альбумин;
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;
- ГХ – газовая хроматография;
- ЖЖЭ – жидкость-жидкостной экстракция;
- ИФА – иммуноферментный анализ;
- ИФиА – иммунофилтратионный анализ;
- ИЭР – ионизация электрораспылением;
- ЛПИА – латеральный проточный иммуноанализ;
- МДУ – максимальный допустимый уровень;
- МИП – молекулярно импринтированный полимер;
- МС – масс-спектрометрия;
- МС/МС – тандемная масс-спектрометрия;
- ПР – перекрестное реагирование;
- ПФИА – поляризационный флуоресцентный иммуноанализ;
- РИА – радиоиммуноанализ;
- ТФЭ – твердофазная экстракция;
- УФ – ультрафиолетовый детектор;
- ФИА – флуоресцентный иммуноанализ;
- ФИТЦ – флуоресцеинизотиоцианат;
- ЭДФ – этилендиаминфлуоресцеинтиокарбамат.

## Введение

**Актуальность темы.** Важной функцией общественного здравоохранения является обеспечение безопасности продуктов питания. С этой задачей становится все тяжелее справляться, поскольку увеличение объема сельскохозяйственного производства достигается благодаря использованию пестицидов. Пестициды обладают токсичностью в отношении организмов-мишеней – вредителей, сорных растений, возбудителей болезней растений, однако их действие не является узконаправленным. Применение пестицидов влечет за собой риски развития острых и хронических отравлений, расстройств различных органов и систем организма, генетических нарушений и онкологических заболеваний. Во многих странах существует нормативная документация, в которой регламентируются максимальные допустимые уровни (МДУ) пестицидов в различных объектах. В Российской Федерации Постановлением главного государственного санитарного врача утверждены «Гигиенические нормативы содержания пестицидов в объектах окружающей среды и продуктах питания».

Для определения пестицидов в продуктах питания наиболее распространенными методами являются газовая и жидкостная хроматография с различными способами детектирования. Однако хроматографический анализ длителен, требует сложной пробоподготовки и дорогостоящего оборудования, что ограничивает его применение для скрининга большого числа образцов. При проведении массового скрининга целесообразно проводить предварительный отбор образцов при помощи более экспрессных и менее дорогих методов анализа. Для целей предварительного скрининга наиболее часто применяются иммунохимические методы. Эти методы основаны на распознавании аналита (антигена) специфическими рецепторами (антителами) с образованием комплекса антиген-антитело и детектировании аналитического сигнала, производимого иммунохимической тест-системой в ответ на образование комплекса, что обуславливает высокую чувствительность и специфичность анализа.

Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ (ПФИА) является самым производительным среди иммунохимических методов. Принцип ПФИА состоит в конкуренции между антигеном и меченым флуоресцентной меткой антигеном – трейсером – за ограниченное число центров связывания антител. Метод ПФИА – гомогенный, включающий только одну стадию – смешивание реагентов, что делает анализ экспрессным и удобным в лабораторной практике. Однако отсутствие стадий отмывки предполагает необходимость в такой пробоподготовке, которая устраняла бы мешающее влияние компонентов матрицы, и при этом не была бы

трудоемкой и длительной, чтобы не утрачивалось основное преимущество скрининговых методов – экспрессность.

Таким образом, актуальной задачей является разработка способов определения пестицидов иммунохимическими методами в продуктах питания и продовольственном сырье. Разрабатываемые способы определения должны обладать не только высокой чувствительностью и специфичностью, но и быть экспрессными, причем как на стадии подготовки проб, так и на стадии анализа.

**Степень разработанности темы исследования.** В настоящее время существует множество разнообразных иммунохимических методов. Среди них наиболее полно разработаны и широко применяются методы иммуноферментного анализа (ИФА), однако эти методы длительные по времени. Существующая тенденция сокращать время и упрощать схему проведения анализа выражается в появлении новых, более экспрессных методов иммуноферментного анализа, а также в развитии и совершенствовании других иммунохимических методов. Самым быстрым среди количественных методов иммуноанализа является метод поляризационного флуоресцентного иммуноанализа. В литературе отсутствуют данные о поляризационном флуоресцентном иммуноанализе многих соединений, в том числе карбарила, тиабендазола и тетраконазола; отсутствуют данные о селективном поляризационном флуоресцентном иммуноанализе триазофоса. Кроме того, методики определения 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа разработаны лишь для воды и почвы.

**Цель и задачи исследования.** Целью данной работы являлась разработка экспрессных способов определения пестицидов методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа в зерне.

Для достижения поставленной цели требовалось решить следующие задачи:

- осуществить синтез иммунореагентов;
- оптимизировать поляризационный флуоресцентный иммуноанализ 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола;
- разработать экспрессные методики определения 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола в пищевых продуктах, в том числе, подобрать единые условия пробоподготовки для последующего определения нескольких пестицидов в одной пробе;

-апробировать разработанные методики на образцах пищевых продуктов и установить корреляцию между результатами поляризационного флуоресцентного иммуноанализа и результатами хромато-масс-спектрометрического анализа.

**Научная новизна и теоретическая значимость работы.** Впервые разработаны тест-системы для поляризационного флуоресцентного иммуноанализа карбарила, тетраконазола и тиабендазола. Впервые разработана специфичная тест-система для поляризационного флуоресцентного иммуноанализа триазофоса. Для оптимизации поляризационного флуоресцентного иммуноанализа синтезировано 29 трейсеров (из них 28 – впервые), различающихся по структуре антигенного и флуоресцентного фрагментов молекулы, а также фрагмента, соединяющего антигенную и флуоресцентную части молекулы. Предложены методики синтеза и выделения таких трейсеров. Структуры синтезированных соединений подтверждены методом тандемной масс-спектрометрии в сочетании с высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ-МС/МС). Изучены закономерности масс-спектрометрического распада трейсеров.

**Практическая значимость работы.** Разработаны методики количественного определения 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты, триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола в зерне методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа. Правильность определения пестицидов по разработанным методикам подтверждена данными тандемной масс-спектрометрии в сочетании с высокоэффективной жидкостной хроматографией. Выбраны условия экспрессной и простой в исполнении пробоподготовки зерна для последующего определения в нем четырех пестицидов. Длительность пробоподготовки составляет менее 1 часа.

**Методология и методы исследования.** Синтез флуоресцентно меченных соединений проводили карбодиимидным методом. Полученные в результате синтеза реакционные смеси разделяли методом тонкослойной хроматографии. Успешность синтезов и структуры флуоресцентно меченных соединений подтверждали методом тандемной масс-спектрометрии в сочетании с высокоэффективной жидкостной хроматографией. В качестве основного метода исследования использовали поляризационный флуоресцентный иммуноанализ. Оценку правильности разработанных способов определения проводили, анализируя искусственно контаминированные образцы методами поляризационного флуоресцентного иммуноанализа и тандемной масс-спектрометрии в сочетании с высокоэффективной жидкостной хроматографией.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Наилучшей чувствительности поляризационного флуоресцентного иммуноанализа триазофоса и карбарила позволяет добиться использование гомологичных трейсеров с меткой

этилендиаминфлуоресцеинтиокарбамат (ЭДФ), наилучшей чувствительности поляризационного флуоресцентного иммуноанализа 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты, тиабендазола и тетраконазола – использование гомологичных трейсеров с меткой 4-аминометилфлуоресцеин (АМФ).

2. Разработанные способы подготовки проб зерна обеспечивают высокие степени извлечения 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты, триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола и позволяют минимизировать матричный эффект при проведении поляризационного флуоресцентного иммуноанализа.

3. Разработанные способы подготовки проб и анализа позволяют проводить качественное и количественное определение 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты, триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола в зерне.

**Личный вклад диссертанта.** Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены автором лично или при непосредственном участии на всех этапах исследований, включая анализ научной литературы, планирование и выполнение экспериментов, обработку и интерпретацию данных, оформление рукописи диссертации и публикацию результатов исследования.

**Степень достоверности результатов.** Достоверность представленных в диссертационной работе данных обеспечивается использованием современных физико-химических методов исследования, использованием современных методик проведения расчетов и обработки информации, согласованностью данных, полученных при использовании различных методов исследования.

**Апробация работы.** Основные результаты исследования были представлены на VIII Московском международном конгрессе «Биотехнологии: состояние и перспективы развития» (Москва, 2015), IX Всероссийской конференции «Электрохимические методы анализа» (Екатеринбург, 2016), IX Московском международном конгрессе «Биотехнологии: состояние и перспективы развития» (Москва, 2017), XII конференции «Rapid Methods Europe» (Амстердам, Нидерланды, 2018).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в журналах, индексируемых базами данных Web of Science и Scopus, и тезисы 4 докладов всероссийских и международных конференций.

**Объем и структура работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы, приложения. Материал изложен на 124 страницах (без учета приложения), содержит 35 таблиц и

33 рисунка. Список литературы включает 205 ссылок. Приложение включает 35 рисунков на 33 страницах.

## ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Токсикологическое значение анализируемых соединений

В настоящее время в сельском хозяйстве применяют пестициды различной природы – препараты растительного, бактериального и грибного происхождения, органические и неорганические соединения. Пестициды органической природы являются самой обширной и широко используемой группой среди всех пестицидов. Одними из первых органических соединений, введенных в применение в качестве пестицидов, были ДДТ и гексахлорциклогексан. Эти соединения продемонстрировали высокую инсектицидную эффективность, но оказались очень ядовитыми для человека и окружающей среды [5-7]. Современные препараты, разрешенные к применению для обработки растений, менее токсичные и быстрее разлагаются во внешней среде, чем те, которые применялись исторически первыми. Тем не менее, уровень содержания пестицидов в продовольственных культурах и продуктах питания необходимо контролировать. Целый ряд соединений представляет интерес при оценке безопасности пищевых продуктов; среди них 2,4-Д, триазофос, карбарил, тетраконазол, тиабендазол (рисунок 1).

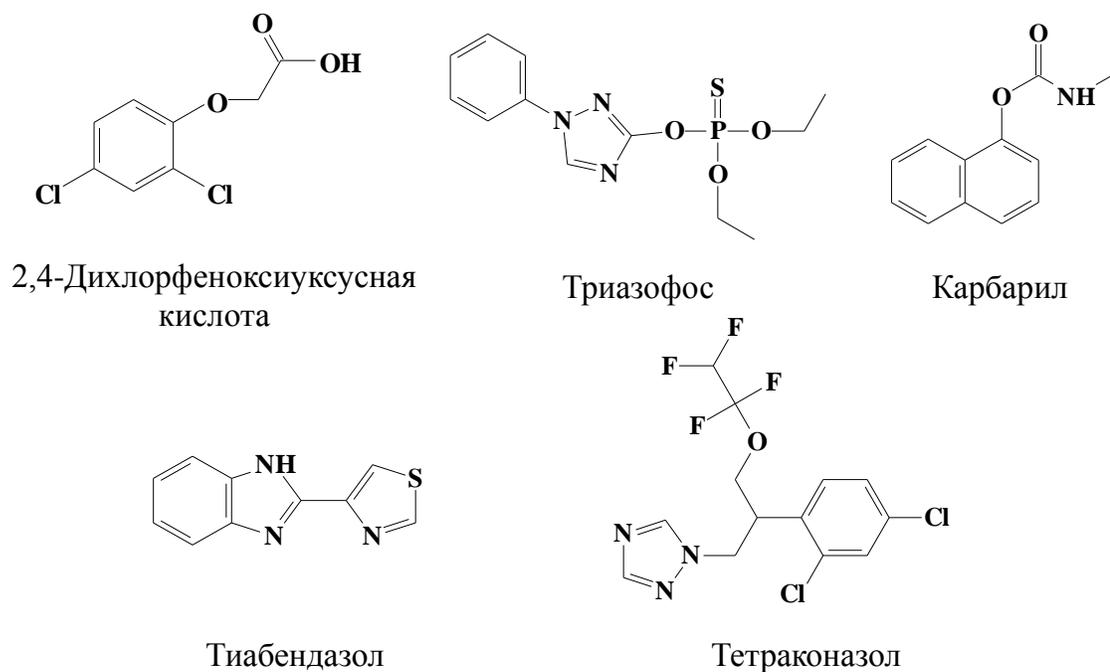


Рисунок 1 – Структурные формулы 2,4-Д, триазофоса, карбарила, тетраконазола и тиабендазола

**2,4-Д** – системный гербицид класса арилоксиалканкарбоновых кислот, используемый для борьбы с сорными растениями в посевах зерновых культур. 2,4-Д является гормоноподобным веществом – синтетическим ауксином; она вызывает разрастание тканей и деформацию клеток флоэмы и ксилемы [8]. Неконтролируемое деление клеток растения приводит к нарушению

метаболизма, в результате чего растение погибает. Препараты 2,4-Д тиреотоксичны, гепатотоксичны и нефротоксичны для млекопитающих, оказывают раздражающее действие на слизистые оболочки глаз, и относятся ко второму классу опасности для человека [9, 10]. В России разрешены к применению 20 препаратов, содержащих 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту, и 20 препаратов, содержащих ее производные – эфиры [11]. Законодательством РФ [4] установлены МДУ 2,4-Д в целом ряде продуктов питания, варьирующиеся от 10 мкг/кг в молоке, яйцах, пресноводной рыбе и др. до 1000 мкг/кг в цитрусовых и 2000 мкг/кг в зерне хлебных злаков.

**Триазофос** – фосфорорганическое соединение, используемое в сельском хозяйстве в качестве инсектицида, акарицида и нематоцида. Механизм действия триазофоса заключается в ингибировании ацетилхолинэстеразы – фермента, локализованного в синапсах нейронов участвующего в передаче нервного импульса [12]. Взаимодействие триазофоса с активным центром ацетилхолинэстеразы приводит к образованию ковалентной связи атома фосфора с ОН-группой серина. В результате ингибирования ацетилхолинэстеразы накапливающийся в синапсах ацетилхолин вызывает стойкое перевозбуждение холинэргических рецепторов. В основе инсектицидной активности фосфорорганических пестицидов, и в частности триазофоса, лежат эффекты накопления избытка ацетилхолина в синапсах, основным из которых является возникновение судорог мускулатуры, в том числе и дыхательной. В основе токсичности фосфорорганических соединений для человека также лежат эффекты ацетилхолина: при отравлениях наблюдаются тошнота, повышенное слюно- и потоотделение, слезотечение, головокружение, при более тяжелых отравлениях наблюдаются рвота, гипотония, брадикардия, судороги [13, 14]. Триазофос сравнительно медленно разлагается в окружающей среде (период полураспада составляет от 20 до 40 суток) [15, 16]. В соответствии с классификацией пестицидов ВОЗ по степени токсичности он относится к классу 1В – «очень опасные». Триазофос не входит в перечень пестицидов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации, а в гигиенических нормативах нормируется на низких уровнях: МДУ в зерне хлебных злаков составляет 50 мкг/кг, в семенах хлопчатника – 200 мкг/кг [4, 11].

**Карбарил** – инсектицид класса карбаматов, применяемый для борьбы с широким спектром вредителей сельскохозяйственных культур. По механизму действия карбарил является, как и триазофос, ингибитором ацетилхолинэстеразы [17]. При взаимодействии карбарила с ацетилхолинэстеразой происходит карбамоилирование активного центра фермента по ОН-группе остатка серина. Карбаматы, и в их числе карбарил, связываются с ацетилхолинэстеразой обратимо [18]. По этой причине они менее токсичны, чем фосфорорганические пестициды, которые связываются с ацетилхолинэстеразой необратимо. Симптомы отравления карбарилом

сходны с симптомами отравления фосфорорганическими соединениями. Однако вследствие того, что карбамоилированное производное ацетилхолинэстеразы гидролизуется сравнительно быстро и активность фермента восстанавливается, симптомы сохраняются не более 8 ч. Карбарил в соответствии с классификацией пестицидов ВОЗ по степени токсичности относится ко второму классу опасности – «умеренно опасные» [10]. Препараты пестицидов, имеющие в своем составе карбарил, не входят в список разрешенных к применению на территории Российской Федерации [11]. При обработке растений карбарил остается на месте нанесения, а в ткани растения проникает медленно. В связи с этим МДУ карбарила выше для необработанных продуктов, а также содержащих шелуху или кожуру [4]. МДУ карбарила, установленные для миндаля в шелухе и необработанного риса составляют соответственно 50000 и 170000 мкг/кг; МДУ карбарила в пшеничном зерне составляет 2000 мкг/кг, а в пшеничной муке 200 мкг/кг.

**Тиабендазол** – системный фунгицид класса бензимидазолов, применяемый для обработки плодовых, овощных и зерновых культур при закладке на хранение. Тиабендазол обладает широким спектром фунгицидной активности, хотя некоторые виды грибов, вызывающих болезни растений, все же резистентны к нему [19]. В грибных клетках тиабендазол нарушает многие метаболические процессы. Наиболее выражена способность тиабендазола подавлять процессы клеточного дыхания в митохондриях, в меньшей степени выражена его способность подавлять процессы синтеза белка и нуклеиновых кислот [20]. Согласно данным исследований, тиабендазол хорошо переносится животными;  $LD_{50}$  для крыс составляет 3300 мг/кг [21]. Тиабендазол относят к слаботоксичным соединениям, не представляющим острой опасности при нормальном использовании [10]. В медицине и ветеринарии тиабендазол применяют в качестве антигельминтного препарата. Тем не менее, в высоких дозах тиабендазол способен вызывать отравление, характеризующееся такими симптомами как головокружение, потеря аппетита, тошнота и рвота, зуд, сыпь, головная боль [22]. В России разрешен к применению монопрепарат тиабендазола, а также более 20 препаратов смесей тиабендазола с другими пестицидами [11]. В Гигиенических Нормативах тиабендазол нормируется на различных уровнях: от 100 мкг/кг в куриных яйцах до 200 мкг/кг в зерне хлебных злаков, 15000 мкг/кг в авокадо и картофеле и 60000 мкг/кг в грибах [4].

**Тетраконазол** – системный фунгицид класса триазолов. Механизм фунгицидного действия тетраконазола тот же, что и у остальных пестицидов его класса – блокирование биосинтеза эргостеролов на стадии 14-деметилирования [23]. Дефицит эргостерола, являющегося компонентом клеточных мембран грибов и участвующего в стимуляции роста и клеточного деления, приводит к гибели грибных клеток. Поскольку тетраконазол воздействует лишь на

фермент 14 $\alpha$ -стеролдеметилазу, высока вероятность возникновения резистентности у фитопатогенов за счет мутации гена, кодирующего этот фермент [24]. Во избежание возникновения резистентных штаммов фитопатогенов при повторных обработках растений тетраконазол применяют в сочетании с пестицидами, имеющими другой механизм действия. В России разрешен к применению монопрепарат тетраконазола и один препарат на основе смеси тетраконазола с пестицидом другого химического класса [11]. Препараты тетраконазола пользуются большим спросом, поскольку в отличие от многих пестицидов класса триазолов, нарушающих синтез гиббереллинов в растениях и приводящих к замедлению роста растений, тетраконазол не обладает фитотоксичными эффектами. Тетраконазол обладает также низкой токсичностью в отношении млекопитающих ( $LD_{50}$  для крыс составляет 1000-1200 мг/кг) [25] и относится ко второму классу опасности [10]. Однако в литературе встречаются данные о возможном наличии у тетраконазола канцерогенных свойств [26]. Тетраконазол применяют преимущественно для борьбы с болезнями зерновых культур и сахарной свеклы; МДУ тетраконазола, указанные в гигиенических нормативах, составляют 200 мкг/кг для зерна хлебных злаков и 50 мкг/кг для сахарной свеклы [4].

Присутствие пестицидов в остаточных количествах в продовольственных культурах и продуктах питания делает необходимым проведение мониторинга их содержания. В Российской Федерации согласно «Единым санитарно-эпидемиологическим и гигиеническим требованиям к продукции, подлежащей санитарно-эпидемиологическому надзору» [27], во всех продуктах питания необходимо определять гексахлорциклогексан и ДДТ, в зерне – также ртутьорганические пестициды, 2,4-Д, ее соли и эфиры. Определение остаточных количеств всех пестицидов, кроме гексахлорциклогексана и ДДТ, проводят на основании информации об их применении, предоставляемой производителем или поставщиком пищевых продуктов. Оценка уровней содержания остаточных количеств пестицидов, в том числе 2,4-Д, триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола, осуществляется в соответствии с «Гигиеническими нормативами содержания пестицидов в объектах окружающей среды» [4].

## **1.2. Методы определения пестицидов**

### **1.2.1. Хроматографические методы**

Для анализа пестицидов органической природы применяют преимущественно хроматографические методы – высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) и газовую хроматографию (ГХ) – в сочетании с различными способами детектирования.

### 1.2.1.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография

В ВЭЖХ для разделения пестицидов применяют обращено-фазовые системы с изократическим или градиентным элюированием. Подвижные фазы для элюирования 2,4-Д, триазофоса, карбарила, тетраконазола и тиабендазола имеют в составе либо воду и метанол, либо воду и ацетонитрил. В части случаев используют элюенты без добавок [28-31], однако в большинстве случаев в подвижную фазу добавляют небольшое количество кислоты и/или соли этой кислоты [32-48]. Для элюирования 2,4-Д, тиабендазола и тетраконазола используют подвижные фазы с кислыми [34, 35, 38, 40, 42], либо слабокислыми или нейтральными [37, 39, 41, 43-45, 47] значениями pH. Для разделения триазофоса и карбарила в большинстве случаев используют фазы на основе буферных растворов [33, 37, 41, 48], фазы, содержащие формиат или ацетат аммония [36, 46], а также фазы с добавлением только кислот [32, 40]. Авторы работы [46] отмечают большую стабильность триазофоса и карбарила в случае использования подвижной фазы с добавлением ацетата аммония по сравнению с тем, когда в качестве добавки использовали только муравьиную кислоту.

В большинстве случаев для хроматографирования пестицидов, в том числе, 2,4-Д, триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола, используются колонки на основе силикагеля с октадецильными привитыми группами. Для разделения энантиомеров тетраконазола применяют также хиральные колонки, в частности заполненные сорбентом на основе модифицированной целлюлозы [38, 42].

Разработано много методов ВЭЖХ с УФ-детектированием: оптическую плотность 2,4-Д регистрировали при 220 нм [47], триазофоса – при 212 нм [28], карбарила – при 221 и 224 нм [29, 32], тиабендазола – при 296 и 300 нм [30, 31], тетраконазола – при 221 нм [45]. В последние годы большую популярность приобрели методы ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. Эти методы были применены и в анализе пестицидов, в том числе 2,4-Д, триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола [33, 35-44, 46, 48]. Для масс-спектрометрического детектирования пестицидов наиболее часто применяют тройные квадрупольные масс-детекторы [33, 35-38, 40-42, 44, 46]. Тройные квадрупольные масс-детекторы позволяют идентифицировать соединение не только на основе данных о его времени удерживания и значения  $m/z$  в режиме сканирования, но и на основе данных о масс-спектрометрическом распаде соединения.

Подготовка проб для хроматографического анализа достаточно сложная, что обусловлено необходимостью избежать забивания колонки и снизить неспецифический сигнал компонентов матрицы. Она включает стадии экстракции, очистки экстракта и, в большинстве случаев, концентрирования экстракта. Очистку экстрактов осуществляют посредством твердофазной

экстракции (ТФЭ) [28, 33, 34, 39], реэкстракции целевых соединений в другой растворитель [29, 44], колоночной хроматографии [42], дисперсионной твердофазной экстракции [32, 35, 38, 40, 41, 44, 48]. Разработан метод анализа тиабендазола, в котором применяется разновидность ТФЭ – экстракция при помощи молекулярно импринтированного сорбента (МИП), что позволило значительно упростить и ускорить пробоподготовку перед последующим анализом методом ВЭЖХ-УФ [31].

Одно из основных направлений в хроматографическом анализе пестицидов – упрощение и унификация пробоподготовки для определения в пробах как можно большего числа аналитов. В 2003 г. Анастасиадес и соавторы [49] опубликовали методику определения остаточных количеств пестицидов, включающую простую и быструю пробоподготовку фруктов и овощей. Процедура пробоподготовки была названа QuEChERS (от англ. quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe – быстрая, простая, недорогая, эффективная, надежная и безопасная). Впоследствии процедуру пробоподготовки QuEChERS не раз изменяли и модифицировали. Различные варианты пробоподготовки QuEChERS включают, как правило, стадию экстракции и стадию дисперсионной ТФЭ. Условия пробоподготовки QuEChERS подбирают так, чтобы после нее пробы подходили и для ГХ-анализа, и для ВЭЖХ-анализа. Различные варианты пробоподготовки QuEChERS широко применяются для экстракции полярных, среднеполярных и неполярных пестицидов, в том числе, 2,4-Д [37], триазафоса [37, 46, 48], карбарила [37, 40, 41, 46], тиабендазола [40, 41] и тетраконазола [38, 44].

### 1.2.1.2. Газовая хроматография

В газовой хроматографии пестицидов используются преимущественно капиллярные колонки с нанесенной неподвижной фазой низкой полярности. В качестве газа-носителя используют гелий или азот.

Для газовой хроматографии, как и для ВЭЖХ, требуется тщательная пробоподготовка. При анализе воды экстракты, полученные методами жидкость-жидкостной экстракции (ЖЖЭ), дисперсионной ЖЖЭ, ТФЭ, микроэкстракции, зачастую анализируют без дополнительной очистки [50-55]. Экстракты из твердых матриц дополнительно очищают при помощи ТФЭ [56, 57], дисперсионной ТФЭ [58-64], гель-проникающей хроматографии и последующей ТФЭ [65], реэкстракции и последующей колоночной хроматографии [66], жидкость-жидкостной микроэкстракции [61]. Также для газовой хроматографии широко применяется пробоподготовка QuEChERS в различных вариантах [58- 60, 64].

Полярные нелетучие соединения, например, 2,4-Д, не могут быть напрямую проанализированы методами газовой хроматографии. Перед анализом требуется провести дериватизацию таких соединений. Для дериватизации 2,4-Д применяют диазометан,  $\text{BF}_3$ , БСТФА (N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамид), МТБСТФА (N-метил-N-третбутилдиметилсилилтрифторацетамид) [67]. Многие соединения можно анализировать и без дериватизации, как например триазофос, карбарил, тиабендазол и тетраконазол [50, 53, 56, 57, 59-66].

Для детектирования аналитов в газовой хроматографии пестицидов применяются различные детекторы: пламенный фотометрический, электрон-захватный, азотно-фосфорный [68]. Большинство публикаций последних лет посвящено газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС). Среди масс-спектрометров наиболее часто применяют квадруполь [51, 53, 56, 60, 65], тройные квадруполь [57, 58, 62, 63] и ионные ловушки [52, 54, 69], реже – другие виды масс-детекторов, например, квадрупольно-времяпролетный [64]. Использование тандемной масс-спектрометрии позволяет проводить определение пестицидов на основании данных о фрагментных ионах, что дополнительно повышает надежность детектирования.

Хроматографические методы позволяют проводить анализ большого количества соединений в одной пробе одновременно. В настоящее время многие исследования в области хроматографического анализа направлены на создание методик определения как можно большего количества соединений в одной пробе. Разработаны методики определения более чем 100 пестицидов в одной пробе методами газовой и жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием [70-73].

Надежность определения аналитов хроматографическими методами высока благодаря использованию двух параметров определения – времени удерживания аналита и специфического аналитического сигнала, регистрируемого детектором. При использовании масс-спектрометрических детекторов селективность определения выше, так как при анализе учитывается только специфический аналитический сигнал каждого из аналитов – значение  $m/z$ . Однако, из-за высокой стоимости оборудования и расходных материалов для хроматографического анализа, для многих лабораторий такие методы недоступны. Кроме того, для хроматографического анализа требуется сложная, трудоемкая и длительная пробоподготовка. Эти факторы ограничивают применение хроматографических методов для анализа большого числа образцов.

### 1.2.2. Иммунохимические методы анализа пестицидов

Иммунохимические методы основаны на распознавании аналита (антигена) специфическими рецепторами (антителами) с образованием комплекса антиген-антитело и детектировании аналитического сигнала, производимого иммунохимической тест-системой в ответ на образование комплекса. 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 [74, 75].

Необходимый реагент для иммунохимических методов анализа – антитела, специфичные к анализируемому соединению. Низкомолекулярные соединения, такие как пестициды, не способны сами по себе индуцировать иммунный ответ. К настоящему времени возможно получение антител как против высокомолекулярных соединений - белков, так и против низкомолекулярных соединений - лекарств, наркотических веществ, пестицидов. Для получения антител против низкомолекулярного соединения лабораторных животных иммунизируют иммуногеном, который представляет собой конъюгат белка с гаптеном. В иммуноанализе используют как моноклональные, так и поликлональные антитела [76]. Моноклональные антитела однородны по структуре, производятся гибридомой, жизнедеятельность которой можно поддерживать *in vitro* в течение многих лет. Поликлональные антитела, с одной стороны, неоднородны по структуре, но, с другой стороны, обладают теми свойствами, которые защищают животное – высокой аффинностью и специфичностью.

Антитела в иммуноанализе могут проявлять перекрестную реактивность – взаимодействовать не только с аналитом, но и с родственными по структуре соединениями, кроме того, возможны неспецифические взаимодействия антител с компонентами матрицы. По этим причинам результаты иммуноанализа должны быть подтверждены другими методами - газовой или жидкостной хроматографией с масс-спектрометрическим детектированием. Иммунохимические методы хорошо подходят для анализа большого числа образцов из-за их экспрессности, низкой стоимости и высокой чувствительности, поэтому их стоит применять для предварительного отбора положительных (содержащих пестициды) образцов перед хроматомасс-спектрометрическим анализом. Ввиду этого, исследования в области разработки иммунохимических методов анализа целесообразно проводить в направлении упрощения методик и сокращения времени анализа.

### **1.2.2.1. Радиоактивные метки в иммуноанализе пестицидов**

Метод радиоиммуноанализа (РИА) основан на конкуренции между антигеном и радиоактивно меченым антигеном за ограниченное число центров связывания антител. В ходе анализа фракцию антител, связанных с меченым или немеченым антигеном, отделяют и измеряют радиоактивность.

Методы РИА были применены для анализа пестицидов, в том числе, 2,4-Д [77, 78]. В работе [77] сообщается, что можно определять 2,4-Д методом РИА на уровне 10 нг/мл в стандартных образцах, а в образцах природной воды, с учетом пробоподготовки, включающей ТФЭ, упаривание и перерастворение экстракта, на уровне около 0,1 нг/мл. РИА проводили в несколько стадий: смешивание иммунореагенов, инкубация, центрифугирование после добавления реагентов, осаждающих иммунокомплекс, и отмывка преципитата. Для осаждения комплекса антиген-антитело использовали обезвреженные нагреванием клетки *Staphylococcus aureus*. Длительность анализа составляла около 1,5 ч, а пробоподготовка, предложенная авторами работы, также требует времени, что нивелирует такое важное качество скрининговых методов, как экспрессность.

В работе [78] 2,4-Д в речной воде и моче определяется на уровне 50 нг/мл, при этом пробоподготовка сводится к фильтрованию. Основные этапы РИА – те же, что и в работе [77], но для осаждения иммунокомплексов использован другой реагент – 90% насыщенный сульфат аммония, более доступный и удобный в применении. Однако длительность анализа составила около 3,5 часов за счет более продолжительной инкубации иммунореагентов и более продолжительной инкубации на стадии осаждения.

Метод РИА является высокочувствительным, однако для анализа контаминантов в окружающей среде он в настоящее время не применяется. Данный метод неудобен 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.

### **1.2.2.2. Ферментные метки в иммуноанализе пестицидов**

Среди всех методов иммуноанализа наиболее распространены методы с ферментным детектированием взаимодействия антигенов с антителами. Использование ферментов в качестве меток в иммуноанализе значительно усиливает аналитический сигнал, что позволяет

детектировать очень низкие концентрации меченого ферментом соединения. На практике это выражается в значительном возрастании чувствительности определения аналита.

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 к анализируемому соединению, и непрямой, в котором комплекс антигена со специфичными к нему антителами выявляют с помощью антивидовых антител, меченных ферментом.

#### **1.2.2.2.1. Ферментные метки в иммуноанализе 2,4-Д**

Для анализа 2,4-Д в воде и пищевых продуктах были разработаны методики прямого и непрямое гетерогенного твердофазного иммуноферментного анализа с колориметрическим и хемилюминесцентным детектированием (таблица 1). Использование для детектирования усиленной хемилюминесцентной реакции позволяет добиться более высокой чувствительности определения, что продемонстрировано в работе [77]: пределы обнаружения ИФА с колориметрическим и хемилюминесцентным детектированием различаются на порядок.

Существующие форматы ИФА не ограничиваются прямым и непрямым гетерогенным твердофазным иммуноанализом. В работах [78, 79] описано применение магнитных частиц в ИФА. Антитела были конъюгированы с магнитными частицами, а за связывание с антителами конкурировали 2,4-Д и конъюгат 2,4-Д с ферментом. Комплекс антител с конъюгатом 2,4-Д-пероксидаза отделяли при помощи магнита. ИФА был реализован также в варианте, где в качестве твердой фазы для иммобилизации антител использовали мембраны [77, 80]. Для проведения анализа небольшой фрагмент мембраны закрепляли на дне лунки и проводили далее анализ по схеме, аналогичной прямому гетерогенному твердофазному иммуноанализу. Использование мембран или конъюгатов антител с магнитными частицами упрощает проведение анализа – в случае с магнитными частицами сорбировать антитела на твердую фазу не требуется, а мембрана представляет собой готовую твердую фазу с нанесенными антителами, которую можно хранить в течение многих месяцев.

#### **1.2.2.2.2. Ферментные метки в иммуноанализе триазофоса**

Триазофос методами иммуноанализа можно определять селективно, используя антитела, не дающие перекрестной реактивности с другими фосфорорганическими соединениями, либо при помощи групп-специфичных антител, имеющих высокую аффинность в отношении нескольких или многих фосфорорганических соединений. Анализ триазофоса является групп-

специфичным, когда в качестве гаптена для иммунизации используют производные пестицидов, в которых неизменным остается фрагмент диэтилфосфотиоата, и селективным, если в гаптене остается неизменным фрагмент фенилтриазола (рисунок 2). Для определения триазофоса иммунохимическими методами с ферментным детектированием были получены как селективные [86-89], так и групп-специфичные [90, 91] антитела.

Таблица 1 – Методы иммуноанализа 2,4-Д с детектированием при помощи ферментных меток

Формат анализа	Продолжительность анализа	Предел обнаружения	Объект	Пробоподготовка	Литература
Прямой ИФА	3 ч	0,05 нг/мл	Речная вода	Без пробоподготовки	[77]
Прямой ИФА с хемилюминесцентным детектированием		0,005 нг/мл			
ИФА с иммобилизованными на мембранах антителами	50 мин	0,2 нг/мл			
ИФА с иммобилизованными на мембранах антителами с хемилюминесцентным детектированием		0,02 нг/мл			
ИФА с антителами конъюгированными с магнитными частицами	50 мин	0,7 нг/мл	Атмосферные осадки	ТФЭ, упаривание, перерастворение	[78]
			Речная вода	Фильтрование	
ИФА с антителами конъюгированными с магнитными частицами	50 мин	10 нг/мл	Яблоки, виноград, картофель, апельсины	Экстракция, фильтрование, ТФЭ, упаривание, перерастворение	[79]
Прямой ИФА	1,5 ч	0,02 нг/мл	Речная вода	Без пробоподготовки	[80]
			Моча	Экстракция, упаривание, перерастворение	
			Апельсины	Экстракция, фильтрование, жидкость-жидкостная экстракция, упаривание, перерастворение	
ИФА с иммобилизованными на мембранах антителами	1,5 ч	0,5 нг/мл	Речная вода	Без пробоподготовки	[80]
			Моча	Экстракция, упаривание, перерастворение	
			Апельсины	Экстракция, фильтрование, жидкость-жидкостная экстракция, упаривание, перерастворение	
Непрямой ИФА	2,5 ч	0,2 нг/мл	Кукуруза, земляника, овес, ячмень, яблоки, апельсины	Экстракция, фильтрование, жидкость-жидкостная экстракция, фильтрование, упаривание, перерастворение	[81]

Таблица 1 (продолжение) – Методы иммуноанализа 2,4-Д с детектированием при помощи ферментных меток.

Формат анализа	Продолжительность анализа	Предел обнаружения	Объект	Пробоподготовка	Литература
Непрямой ИФА	2,5 ч	100 нг/мл	Речная вода и моча	Фильтрование	[82]
Непрямой ИФА с хемилюминесцентным детектированием	73,5 ч	0,1 нг/мл	Вода	Фильтрование	[83]
Непрямой ИФА	4,5 ч	10 нг/мл	Человеческая моча	Разбавление	[84]
Прямой ИФА с хемилюминесцентным детектированием	2,5 ч	2 нг/мл	Апельсины и мандарины	Экстракция, фильтрование, жидкость-жидкостная экстракция, выпаривание, перерастворение	[85]

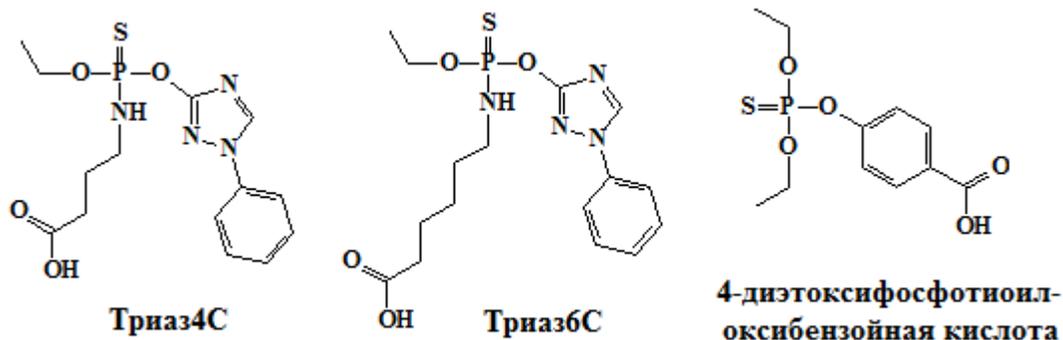


Рисунок 2 – Гаптены, используемые в синтезе иммуногенов для получения селективно-специфичных (Триаз4С и Триаз6С) и групп-специфичных (4-диэтоксифосфотиоилоксибензойная кислота) антител против триазофоса

Для анализа триазофоса были оптимизированы прямой и непрямой ИФА с колориметрическим детектированием, а также прямой ИФА с хемилюминесцентным детектированием (таблица 2). Был также оптимизирован формат ИФА триазофоса, в котором антитела иммобилизованы на поверхности магнитных частиц [92], что позволило незначительно улучшить чувствительность анализа и уменьшить его продолжительность. Тот же коллектив авторов впоследствии опубликовал формат анализа, в котором антитела и фермент иммобилизовали на поверхности золотых наночастиц, а триазофос конкурировал за связывание с антителами с коатинг-антигеном, иммобилизованным на поверхности магнитных частиц [93]. Сигнал в данном формате анализа усилен за счет того, что поверхность одной наночастицы золота модифицирована многими молекулами фермента. Это позволило в результате снизить предел обнаружения до 0,01 нг/мл.

Таблица 2 – Методы иммуноанализа триазофоса с детектированием при помощи ферментных меток

Формат анализа	Продолжительность анализа	Предел обнаружения	Объект	Пробоподготовка	Литература
Прямой ИФА	1,3 ч	0,02нг/мл	Проточная, озерная, речная и бутылированная вода	Фильтрация, разбавление	[86]
			Почва	Экстракция, центрифугирование, выпаривание, перерастворение	
Прямой ИФА	1,3 ч	0,07 нг/мл	Водопроводная, озерная, речная вода	Разбавление	[87]
Непрямой ИФА	2,5 ч	0,3 нг/мл			
Прямой ИФА	2,5 ч	0,4 нг/мл	Водопроводная, озерная, речная вода	Фильтрация	[88]
Прямой ИФА	10 мин	0,05 нг/мл	Водопроводная, озерная, речная вода	Фильтрация, разбавление	[89]
			Почва	Экстракция, разбавление	
Непрямой ИФА	1,5 ч	3 нг/мл	Озерная и речная вода	Фильтрация	[90]
Прямой ИФА с хемиллюминесцентным детектированием	1 ч	0,2 нг/мл	Речная, озерная, сточная вода	Фильтрация, ТФЭ, выпаривание, перерастворение	[91]
ИФА с антителами конъюгированными с магнитными частицами	50 мин	0,1 нг/мл	Яблоки, апельсины, личи, капуста, цуккини, рис	Экстракция, центрифугирование, выпаривание, перерастворение	[92]
Прямой ИФА	1,3 ч	0,2 нг/мл			
ИФА с использованием магнитных микросфер и золотых наночастиц	50 мин	0,01 нг/мл	Апельсины, капуста, яблоки, рис	Экстракция, центрифугирование, выпаривание, перерастворение	[93]
Прямой ИФА с хемиллюминесцентным детектированием	1,1ч	0,06 нг/мл	Салат-латук, морковь, яблоки, груши	Экстракция, центрифугирование, выпаривание, перерастворение	[94]
Прямой ИФА с хемиллюминесцентным детектированием	1,1 ч	0,2 нг/мл	Яблоки, апельсины, капуста, цуккини, рис	Экстракция, центрифугирование, выпаривание, перерастворение	[95]

### 1.2.2.2.3. Ферментные метки в иммуноанализе карбарила

Для анализа карбарила предложены методы прямого и непрямого гетерогенного твердофазного иммуноанализа с колориметрическим и хемиллюминесцентным детектированием

(таблица 3). Кроме этого, предложен также ИФА с антителами, иммобилизованными на поверхности магнитных частиц [96].

Таблица 3 – Методы иммуноанализа карбарила с детектированием при помощи ферментных меток

Метод	Продолжительность анализа	Предел обнаружения	Объект	Пробоподготовка	Литература
ИФА с антителами конъюгированными с магнитными частицами	50 мин	0,3 нг/мл	Вода	Без пробоподготовки	[96]
ИФА с иммобилизованными на мембранах антителами	10 мин	200 нг/мл	Перец, помидоры	Экстракция, фильтрование, разбавление	[97]
Иммунофильтрационный анализ с ферментным детектированием	5 мин	10 нг/мл	Капуста, яблоки, груши, рис, ячмень	Экстракция, разбавление	[98]
ИФА с иммобилизованными на мембранах антителами	15 мин	10 нг/мл			
Непрямой ИФА	2,5 ч	0,2 нг/мл	Вода	Без пробоподготовки	[99]
			Мед	Разбавление	
Прямой ИФА	1,5 ч	0,05 нг/мл	Моча	Разбавление	
			Почва	Экстракция, выпаривание, разбавление	
Непрямой ИФА	2,5 ч	0,1 нг/мл	Грунтовая вода	Фильтрование	[100]
Непрямой ИФА	3,5 ч	0,07 нг/мл	Яблочный и виноградный соки	Разбавление	[101]
Непрямой ИФА	3,5 ч	0,01 нг/мл	Водопроводная и колодезная вода	Подкисление до pH 4,0, добавление солевого раствора	[102]
Непрямой ИФА	14 ч	0,2 нг/мл	Бананы, морковь, апельсины, персики, картофель	Экстракция, фильтрование, жидкость-жидкостная экстракция, выпаривание, ТФЭ, выпаривание, перерастворение	[103]
Прямой ИФА	1,2 ч	0,03 нг/мл	Огурцы, клубника	Экстракция, центрифугирование, выпаривание, перерастворение	[104]
Непрямой ИФА	14 ч	0,5 нг/мл	Овощные и фруктовые соки	Разбавление	[105]
Прямой ИФА	1,2 ч	0,03 нг/мл	Перец, огурцы, клубника, помидоры, картофель, апельсины, яблоки	Экстракция, центрифугирование, выпаривание, перерастворение	[106]

Таблица 3 (продолжение) – Методы иммуноанализа карбарила с детектированием при помощи ферментных меток

Метод	Продолжительность анализа	Предел обнаружения	Объект	Пробоподготовка	Литература
Прямой ИФА	15 мин	5 нг/мл	Ячмень, сорго, пшеница	Экстракция, разбавление	[107]
Непрямой ИФА	3,5 ч	0,04 нг/мл	Детское питание	Экстракция, выпаривание, перерастворение	[108]
Непрямой ИФА с хемилюминесцентным детектированием	3,5 ч	0,007 нг/мл	Апельсиновый и томатный соки	Разбавление	[109]
			Детское питание	Экстракция, выпаривание, перерастворение	
Прямой ИФА	30 мин	0,7 нг/мл	Яблоки, груши, рис, ячмень, капуста	Экстракция, разбавление	[110]
Прямой ИФА	20 мин	0,5 нг/мл	Яблоки, рис, ячмень, капуста	Экстракция, разбавление	[111]
Прямой ИФА	1,5 ч	0,2 нг/мл	Яблочный сок	Разбавление	[112]
			Огурцы, капуста	Экстракция, центрифугирование, разбавление	
Прямой ИФА	2,5 ч	0,2 нг/мл	Яблочный сок, апельсиновый сок, миндальное молоко	Разбавление	[113]
Прямой ИФА с хемилюминесцентным детектированием	2 ч	0,04 нг/мл	Вишня, персики, огурцы, капуста	Экстракция, разбавление	
Прямой ИФА с хемилюминесцентным детектированием	1 ч	0,02 нг/мл	Апельсиновый сок, капуста, огурцы	Разбавление	[114]
				Экстракция, центрифугирование, разбавление	

Предложены методики ИФА, не требующие специальных инструментов для детектирования результатов [97, 98], что вкпе с небольшой длительностью анализа (от 5 до 15 мин) делает эти методы подходящими для проведения скрининга образцов в полевых условиях. В работе [97] предложен метод ИФА с иммобилизованными на мембранах антителами. Авторы сообщают, что возможна визуальная детекция результатов анализа на уровне около 200 нг/мл. В другой работе [98] ИФА с иммобилизованными на мембранах антителами позволяет проводить

визуальную детекцию триазофоса на уровне около 10 нг/мл, такого же предела обнаружения удалось достичь в иммунофильтрационном анализе, описанном в этой же работе.

#### 1.2.2.4. Ферментные метки в иммуноанализе тиабендазола

Для анализа тиабендазола оптимизированы методы непрямого и прямого гетерогенного твердофазного иммуноанализа с колориметрическим детектированием (таблица 4). Предложена также методика непрямого ИФА, в которой для определения тиабендазола используются рекомбинантные антитела [115]. В данном формате анализа на планшет сорбировали твердофазный антиген, на следующей стадии антиген в пробе и твердофазный антиген конкурировали за связывание с рекомбинантными антителами типа scFv, представляющими собой переменный фрагмент антитела, в котором фрагменты легкой и тяжелой цепи связаны пептидным линкером. Связавшиеся антитела детектировали посредством антител к пептидному линкеру и антивидовых антител, меченных пероксидазой хрена. Предложенный формат анализа усложнен относительно классического формата непрямого ИФА из-за необходимости проводить дополнительную стадию – реакцию scFv-фрагментов с соответствующими антителами, и длительность анализа (3,5 ч) выше, чем в остальных опубликованных методиках ИФА. Кроме того, аффинность рекомбинантных антител по отношению к определяемому антигену на порядок ниже, чем аффинность моноклональных. Тем не менее, получение рекомбинантных антител более экономически эффективно, чем получение моноклональных, так как их производят при помощи бактерий *E. coli*, для быстрого роста которых требуются простые недорогие среды, при этом масштаб производства может быть легко увеличен.

Таблица 4 – Методы иммуноанализа тиабендазола с детектированием при помощи ферментных меток

Метод	Продолжительность анализа	Предел обнаружения	Объект	Пробоподготовка	Литература
Прямой ИФА	1,5 ч	2 нг/мл	Печень	Экстракция, центрифугирование	[116, 117]
Непрямой ИФА	2,5 ч	1 нг/мл	Яблоки и картофель	Экстракция, центрифугирование, разбавление	[118]
Прямой ИФА	1,5 ч	0,2 нг/мл	Фруктовые соки, концентраты фруктовых соков	Экстракция, центрифугирование, выпаривание, перерастворение	[119]

Таблица 4 (продолжение) – Методы иммуноанализа тиабендазола с детектированием при помощи ферментных меток

Метод	Продолжительность анализа	Предел обнаружения	Объект	Пробоподготовка	Литература
Прямой ИФА	1,5 ч	1 нг/мл	Яблоки, картофель, апельсины, грейпфруты, бананы	Экстракция, фильтрование, разбавление	[120]
Прямой ИФА	30 мин	0,8 нг/мл	Картофель	Экстракция, центрифугирование, выпаривание, перерастворение	[121]
Непрямой ИФА	2,5 ч	0,05 нг/мл	Фруктовые соки	Разбавление	[122]
Непрямой ИФА с использованием моноклональных антител	2,5 ч	0,02 нг/мл	Яблочный и апельсиновый соки	Разбавление	[115]
Непрямой ИФА с использованием рекомбинантных антител	3,5 ч	0,1 нг/мл			
Непрямой ИФА	2 ч	0,005 нг/мл	Красное и белое вино	Фильтрование, разбавление	[123]
Непрямой ИФА	1,5 ч	0,06 нг/мл	Красное и белое вино, виноград	Экстракция, центрифугирование, разбавление, фильтрование	[7]

#### 1.2.2.2.5. Ферментные метки в иммуноанализе тетраконазола

Пестициды класса триазолов – это группа соединений, в значительной степени схожих между собой по структуре. Антитела, полученные против одной из таких структур, будут обладать высокой аффинностью в отношении нескольких триазолов, то есть анализ будет групп-специфичным.

Для анализа тетраконазола были оптимизированы прямой и непрямой форматы гетерогенного твердофазного иммуноанализа (таблица 5). В работе [125] для получения антител использовали гаптен Ткз6С, конъюгированный с бычьим сывороточным альбумином (БСА), в работе 4 иммуногеном был конъюгат Ткз4С-БСА (рисунок 3).

Антитела, полученные против Ткз6С-БСА, в ИФА перекрестно реагируют с пенконазолом (44%), ципроконазолом (32%) и миклобутанилом (14%). Для антител, полученных против Ткз4С-БСА, авторы не проводили обширных исследований перекрестной реактивности; приводятся данные, что полученные антитела перекрестно реагируют с пенконазолом (14%). Были получены рекомбинантные антитела с помощью гибридомы, продуцирующей моноклональные антитела против Ткз6С-БСА [115, 126]. Рекомбинантные антитела были еще менее селективны в

отношении тетраконазола, чем исходные моноклональные: перекрестная реактивность с пенконазолом, ципроконазолом и миклобутанилом составила 87, 63 и 33%, соответственно. Аффинность рекомбинантных антител, как и в случае с антителами против тиабендазола, была на порядок ниже.

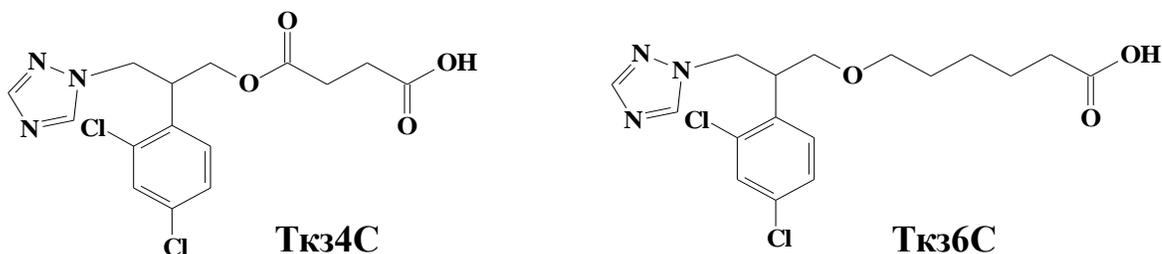


Рисунок 3 – Гаптены, используемые в синтезе иммуногенов для получения антител против тетраконазола

Таблица 5 – Методы иммуноанализа тетраконазола с детектированием при помощи ферментных меток

Метод	Продолжительность анализа	Предел обнаружения	Объект	Пробоподготовка	Литература
Непрямой ИФА с использованием моноклональных антител	2,5 ч	0,1 нг/мл	Яблочный и апельсиновый соки	Разбавление	[115]
Непрямой ИФА с использованием рекомбинантных антител	3,5 ч	2 нг/мл			
Прямой ИФА	2,5 ч	0,1 нг/мл	Яблочный, апельсиновый, томатный соки	Разбавление	[125]
Непрямой ИФА с использованием рекомбинантных антител	3,5 ч	1 нг/мл	Яблочный и апельсиновый соки	Разбавление	[126]
Прямой ИФА	12 ч	2 нг/мл	Яблоки, груши, персики, абрикосы, яблочный, грушевый, персиковый соки	Экстракция, фильтрование, выпаривание, перерастворение	[127]
				Разбавление	

Как видно из данных, приведенных в таблицах 1-5, в ИФА 2,4-Д, триазофоса, карбарила и тиабендазола удается достигнуть пределов обнаружения на уровне 0,01-0,1 нг/мл, а в ИФА тетраконазола 0,1-1 нг/мл. Продолжительность ИФА 2,4-Д, триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола составляет в среднем от 1 до 3,5 ч, однако разработаны и экспрессные методики.

Авторы работы [89] оптимизировали прямой ИФА для экспрессного определения триазофоса - продолжительность анализа составляет всего 10 мин. Подобраны условия проведения прямого ИФА для экспрессного определения карбарила – анализ занимает 15 [107] и 20 мин [111]. Затраты времени на проведение ИФА карбарила в предложенных методиках с визуальной детекцией составляют 5 мин в случае иммунофилтратсионного анализа и 15 мин в случае ИФА с иммобилизованными на мембранах антителами.

Пробоподготовка для ИФА, как правило, более простая, чем для хроматографического анализа, из-за наличия в ИФА стадий отмывки, на которых частично удаляются компоненты матрицы анализируемого образца. Для нивелирования матричного эффекта жидких образцов используют фильтрование, разбавление, добавляют солевые растворы. Пробоподготовка объектов с твердой матрицей включает экстракцию и очистку экстракта от мешающих соединений. Как правило, для очистки экстракта органический экстрагент заменяют на буферный раствор путем упаривания и последующего перерастворения экстракта. При этом происходит концентрирование аналита, так как экстракт обычно перерастворяют в меньшем объеме. Реже стадия очистки экстракта может включать ТФЭ или жидкость-жидкостную экстракцию. Подобные схемы пробоподготовки достаточно длительные из-за наличия стадии выпаривания растворителя, что делает их менее подходящими для скринингового анализа. Однако, разработки методик определения пестицидов в твердых матрицах методами ИФА ведутся также и в направлении упрощения и уменьшения затрат времени на пробоподготовку. Для ИФА триазофоса оптимизировали пробоподготовку почвы: матричный эффект экстракта устранили посредством разбавления [89]. Опубликованы работы, в которых в ходе пробоподготовки фруктов, овощей и зерна перед ИФА карбарила матричный эффект устранили посредством разбавления экстракта [97, 98, 107, 110-114]. В работах [116, 117] пробоподготовка печени перед ИФА тиабендазола включала только стадии экстракции и фильтрования, а в работах [118, 120] матричный эффект фруктов и картофеля устранили разбавлением экстракта.

Методики ИФА, описанные в перечисленных работах, характеризуются низкими пределами обнаружения, однако обладают недостатками, нежелательными для скринингового анализа: продолжительность анализа (в среднем от 1 до 3 ч) и его относительная трудоемкость, связанная с необходимостью постадийного добавления реагентов и проведения стадий отмывки. В большинстве работ при этом не уделяется должного внимания необходимости разрабатывать именно экспрессные методики, хотя основное назначение иммунохимических методов – скрининговый анализ.

### 1.2.2.3. Флуоресцентные метки в иммуноанализе пестицидов

Флуоресцентные метки нашли широкое применение в иммуноанализе. Аналитическим сигналом в тех иммунохимических методах, в которых используются флуоресцентные метки, 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.

#### 1.2.2.3.1. Флуоресцентный иммуноанализ

В флуоресцентном иммуноанализе (ФИА) измеряемым аналитическим сигналом является интенсивность флуоресценции. Флуоресцентный иммуноанализ может быть реализован различным образом – для проведения анализа могут быть использованы как пробирки и луночные планшеты, так и специальное приборное оснащение, например проточные системы или электрофорез.

Была оптимизирована методика проточного флуоресцентного иммуноанализа 2,4-Д в речной воде [128]. В предложенном авторами работы [128] формате коатинг-антиген был иммобилизован на поверхности полиметилметакрилатных шариков. На первой стадии в систему вводили антитела и стандартный образец или пробу, после этого вводили вторичные антитела, меченные флуоресцентной меткой ЭДФ. Предел обнаружения составил 0,1 нг/мл, что на порядок меньше, чем в ПФИА при использовании тех же моноклональных антител E2/G2. Наиболее вероятно, улучшение чувствительности объясняется усилением флуоресцентного сигнала за счет того, что на одну молекулу вторичных антител было пришито несколько флуоресцентных меток.

Для триазофоса был оптимизирован аналогичный формат иммуноанализа, с тем отличием, что анализ осуществляли не в проточной системе, а в лунках планшета [129, 130]. В этом варианте увеличиваются затраты времени на инкубацию после добавления каждого из реагентов – анализ длится более 2 ч, тогда как в проточной системе – 7 мин. Наличие стадий инкубации обеспечивает более глубокое протекание иммунохимических реакций, что повышает стабильность результатов и ведет к улучшению чувствительности. Предел обнаружения составил 0,02 нг/мл в стандартных образцах, что сопоставимо с методами ИФА.

Опубликован еще один вариант планшетного ФИА триазофоса [131]. В данном формате анализа на планшет наносили коатинг-антиген, на первой стадии добавляли триазофос и наночастицы золота, модифицированные антителами и флуоресцентной меткой 6-карбоксифлуоресцеин-ДНК, после отмывки отделяли 6-карбоксифлуоресцеин-ДНК от золотых наночастиц при помощи дитиотреитола, затем регистрировали аналитический сигнал.

Длительность такого анализа составляет 1 ч, предел обнаружения в стандартных образцах – 0,006 нг/мл. Столь высокая чувствительность анализа объясняется тем, что на каждой золотой наночастице было иммобилизовано около 170 молекул флуоресцентной метки.

Для анализа карбарила был разработан ФИА, основанный на капиллярном электрофорезе [132]. Антитела, антиген, меченный флуоресцентной меткой (трейсер) и аналит после инкубации вводили в капилляр и разделяли электрофоретически, при этом записывая электрофореграмму по значениям интенсивности флуоресценции. Площадь пика несвязавшегося трейсера была прямо пропорциональна логарифму концентрации карбарила в пробе. Такие характеристики метода, как предел обнаружения в стандартных образцах (0,05 нг/мл) и длительность анализа (инкубация длилась 30 мин, разделение – 8 мин) сопоставимы с ИФА, однако возможность применения такого метода ограничена необходимостью в специальном оборудовании для электрофореза.

Методы ФИА более удобные, чем методы ИФА, в том отношении, что для детектирования сигнала не требуется дополнительная стадия ферментативной реакции. Тем не менее, необходимость разделять связанную и несвязанную фракции флуоресцентно меченного соединения остается, что предполагает дополнительные затраты времени.

Поскольку методы ФИА включают стадию разделения продуктов иммунохимической реакции, они широко применяются как для анализа воды [128, 131], так и для анализа объектов с более сложной матрицей [129-132]. При пробоподготовке воды ограничиваются фильтрованием и разбавлением [128, 131], пробоподготовка твердых объектов может быть как достаточно длительной за счет стадии концентрирования [129-131], так и более экспрессной, когда матричный эффект устраняют посредством разбавления экстракта [132].

#### **1.2.2.3.2. Иммуноанализ, основанный на тушении флуоресценции**

Интенсивность флуоресценции также является аналитическим сигналом в анализе, основанном на тушении флуоресценции. Тушение флуоресценции часто происходит при связывании трейсера с антителами. Иммунохимический метод, в основе которого лежит это явление, был применен для анализа 2,4-Д [133]. В предложенной методике 2,4-Д анализируют в системе обращенных мицелл, используя моноклональные антитела E2/G2 и трейсер 2,4-Д-ЭДФ. Предел обнаружения составил 0,1 нг/мл как в ПФИА, так и в анализе, основанном на тушении флуоресценции. Недостатком анализа, основанного на тушении флуоресценции, является возможное влияние присутствующих в анализируемом образце флуоресцентных соединений. Работа [133] сосредоточена преимущественно на разработке анализа в обращенных мицеллах, анализ реальных образцов авторами не описан.

### 1.2.2.3.3. Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ

В ПФИА аналитическим сигналом является поляризация флуоресценции [134-136]. В ходе анализа растворы антител, анализируемого соединения и флуоресцентно меченного гаптена (трейсера) смешивают, облучают монохроматическим светом, поляризованным в вертикальной плоскости, после чего измеряют интенсивность испускания через поляризатор. Плоскость поляризации регистрирующего поляризатора может быть расположена вертикально или горизонтально. Поляризация флуоресценции представляет собой относительную величину, определяемую следующим образом:

$$P = (I_{(\parallel)} - I_{(\perp)}) / (I_{(\parallel)} + I_{(\perp)}),$$

где  $I_{(\parallel)}$  – интенсивность флуоресценции, измеренная в направлении, параллельном оси возбуждения;  $I_{(\perp)}$  – интенсивность флуоресценции, измеренная в направлении, перпендикулярном оси возбуждения. В расчетах используют величину mP – 1/1000 от значения P.

Свободный трейсер имеет большую скорость вращения в растворе, из-за чего значение  $I_{(\perp)}$  достаточно высокое, а поляризация флуоресценции низкая. Трейсер, связанный с антителами, имеет меньшую скорость вращения в растворе, и значение  $I_{(\perp)}$  для него ниже, чем для свободного трейсера, а значение поляризации флуоресценции выше. Метод ПФИА основан на конкуренции между свободным антигеном и гаптенем, меченным флуоресцентной меткой, за ограниченное число центров связывания антител (рисунок 4). При неизменных концентрациях антител и трейсера поляризация флуоресценции находится в обратной зависимости от концентрации антигена.

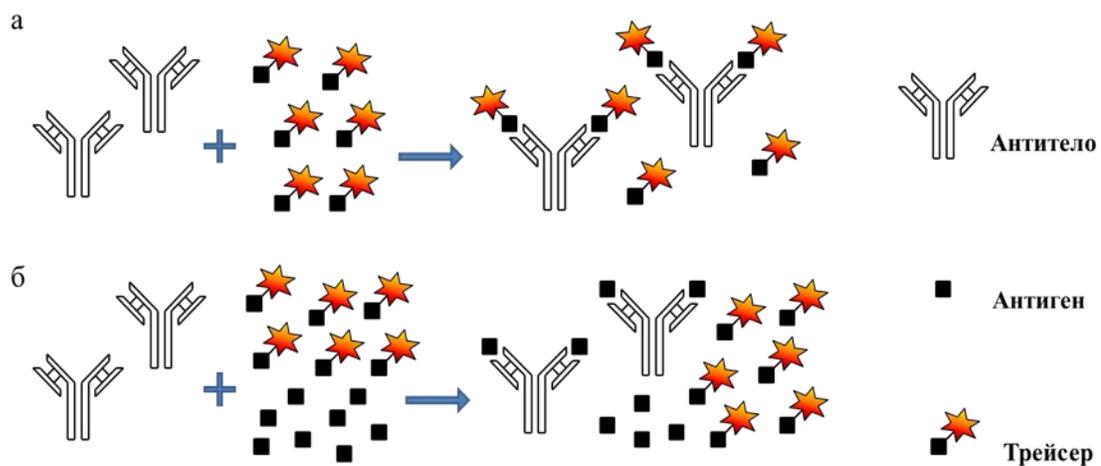


Рисунок 4 – Схема конкурентного ПФИА: в отсутствие антигена (а), в присутствии антигена (б)

Для анализа 2,4-Д были оптимизированы методики ПФИА в классическом формате с использованием поликлональных [137, 138] и моноклональных [139-142] антител, а также молекулярно импринтированных полимеров (МИП) [143] в качестве специфических рецепторов для 2,4-Д. В классическом формате смешивали антитела либо МИП, трейсеры и стандартный раствор либо пробу, после чего измеряли поляризацию флуоресценции. В качестве трейсера в МИП-анализе была применена метилкумариноксуксусная кислота. Предел обнаружения составил около 1000 нг/мл в стандартных образцах. В остальных опубликованных методиках ПФИА трейсеры представляли собой производные флуоресцеина, ковалентно сшитые с 2,4-Д или структурно родственными 2,4-Д соединениями. В качестве гаптена при синтезе трейсеров использовали 2,4-Д, 2,4,5-трихлорфеноксуксусную кислоту и 2-метил-4-хлорфеноксуксусную кислоту, в качестве флуоресцентных меток – аминифлуоресцеин (АФ) и флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ). В ряде случаев для соединения гаптена с флуоресцентной меткой использовали сшивающие реагенты - диамины или лизин. При использовании 2,4-Д-ЭДФ и поликлональных антител предел обнаружения в стандартных образцах составлял около 100 нг/мл, а при использовании 2,4-Д-ЭДФ и моноклональных антител клона E2/G2 – около 1 нг/мл. По итогам проведения более объемного эксперимента с моноклональными антителами по сравнению трейсеров был выбран трейсер 4-хлор-2-метилфеноксуксусная кислота-ЭДФ, с которым удалось достичь предела обнаружения 0,2 нг/мл [139]. В целом использование гетерологичных трейсеров позволило добиться большей чувствительности ПФИА 2,4-Д, чем использование гомологичных.

Для анализа 2,4-Д был оптимизирован также ПФИА в режиме остановленной струи [142]. В этом формате измеряют начальную скорость иммунохимической реакции, смешивая 2 раствора: раствор антител и раствор антигена с трейсером. При использовании моноклональных антител клона E2/G2 и трейсера 2,4-Д-ЭДФ предел обнаружения был одного порядка с классическим форматом ПФИА при использовании тех же реагентов - 4 нг/мл. Преимуществом этого формата ПФИА является возможность в значительной степени снизить фоновый сигнал, как от матрицы образца, так и вызванный рассеянием света.

Был оптимизирован групп-специфичный ПФИА для анализа фосфорорганических пестицидов [144]. Предел обнаружения триазофоса в стандартных образцах составил 6 нг/мл. Для синтеза иммуногена использовали 4-диэтоксифосфотиоилоксибензойную кислоту (рисунок 2), для синтеза трейсеров – этот же гаптен, а также 2 других производных фосфорорганических пестицидов, у которых диэтилфосфотиоатный фрагмент молекулы оставался неизменным.

Наилучшей чувствительности удалось добиться используя трейсеры, синтезированные из ЭДФ и гетерологичных гаптеннов.

Поскольку ПФИА – это гомогенный метод, не содержащий стадий отмывки, к выбору условий пробоподготовки образцов, и в особенности образцов со сложной матрицей, следует подходить тщательно. Большинство исследователей оптимизирует ПФИА для анализа образцов с относительно простой матрицей – водой [138, 139, 142, 144], методики анализа объектов со сложной матрицей встречаются в литературе значительно реже [141, 144]. Описана экспрессная и несложная в исполнении пробоподготовка почвы для ПФИА 2,4-Д, включающая стадии микроволновой экстракции, центрифугирования и разбавления [141]. Воду анализируют методом ПФИА либо с минимальной пробоподготовкой (фильтрование), либо без пробоподготовки [138, 139, 142, 144]. При проведении ПФИА в режиме остановленной струи влияние матрицы значительно ниже, чем в классическом ПФИА, что позволяет значительно упростить пробоподготовку. В частности, 2,4-Д в вине и фруктовом соке анализировали методом ПФИА в режиме остановленной струи без пробоподготовки [142].

Метод ПФИА в классическом формате в отличие от ИФА содержит всего одну стадию – смешивание реагентов, что делает его удобным в лабораторной практике. Однако ПФИА проигрывает методам ИФА по чувствительности – значения пределов обнаружения в ПФИА в среднем на порядок выше.

#### **1.2.2.4. Наночастицы золота в иммуноанализе пестицидов**

Наночастицы золота являются наиболее часто используемой меткой в латеральном проточном иммуноанализе (ЛПИА) и иммунофилтрационном анализе (ИФиА) [145, 146]. Наночастицы золота имеют интенсивную окраску, что делает возможной визуальную детекцию результатов анализа. Количественно результаты анализа можно оценить, используя различные сканирующие устройства. Наночастицы золота были применены в качестве меток в ЛПИА 2,4-Д, триазофоса и карбарила и в ИФиА карбарила.

В большинстве случаев, ЛПИА проводят в следующем формате. На соответствующие зоны мембранной полоски наносят иммунореагенты: меченные коллоидным золотом антитела наносят на мембрану для конъюгата, выше наносят коатинг-антиген (тестовая зона), и еще выше – антивидовые антитела (контрольная зона). Полоску погружают нижним краем в анализируемую пробу, при этом содержащийся в пробе аналит под действием капиллярных сил перемещается вверх. ЛПИА в данном формате является наиболее простым в исполнении среди всех иммунохимических методов анализа. Этот формат был применен для анализа 2,4-Д и

триазофоса; предел обнаружения 2,4-Д составил 12 нг/мл [147], предел обнаружения триазофоса – 4 нг/мл [148].

В другом варианте ЛПИА меченные коллоидным золотом антитела не наносят на мембрану, а смешивают их предварительно с анализируемой пробой и инкубируют, после чего проводят анализ, используя полоску с нанесенными коатинг-антигеном и антивидовыми антителами в соответствующих зонах. Преимуществом данной методики является то, что за время инкубации устанавливается равновесие реакции образования комплекса антиген-антитело, что повышает воспроизводимость результатов анализа. Данный формат был применен для анализа 2,4-Д и карбарила. В стандартных образцах предел обнаружения 2,4-Д составил 20 нг/мл [149], предел обнаружения карбарила – 100 нг/мл [150, 151]. Аналогичный формат был использован в ИФиА карбарила [150, 151], при этом предел обнаружения составил 50 нг/мл в работе [150] и 100 нг/мл в работе [151].

В перечисленных работах пробоподготовка для ЛПИА и ИФиА проводится по наиболее простым схемам: пробоподготовка твердых матриц включает экстракцию и разбавление [150, 151], пробоподготовка воды сводится к минимуму или отсутствует [148]. Пробоподготовка для ЛПИА 2,4-Д авторами работ [147, 149] не предложена, однако в работе [149] упоминается, что для анализа проб воды может потребоваться разбавление.

К преимуществам определения пестицидов методами ЛПИА и ИФиА с использованием наночастиц золота в качестве метки относятся экспрессность (анализ занимает 3-7 мин), отсутствие необходимости в специальном оборудовании и достаточно высокая чувствительность определения, хотя и не такая высокая, как чувствительность методов ИФА. ЛПИА и ИФиА хорошо подходят для качественного определения аналита в пробе, тогда как количественная оценка содержания аналита в пробе такими методами затруднена.

Помимо ЛПИА и ИФиА, наночастицы золота могут быть применены в планшетных форматах анализа. Был разработан иммуноанализ триазофоса [152], в котором на первой стадии взаимодействовали триазофос, магнитные частицы, модифицированные конъюгатом гаптен-овальбумин, и золотые наночастицы, модифицированные антителами и одноцепочечной ДНК. Комплекс модифицированных магнитных частиц с модифицированными наночастицами золота выделяли при помощи магнита. ДНК отделяли от комплекса дитиотреитолом, иммобилизовали на лунках планшета с сорбированным стрептавидином при помощи биотинилированной полукомплементарной ДНК, и детектировали при помощи планшетного ридера, добавляя в качестве детектирующего реагента золотые наночастицы, модифицированные полукомплементарной ДНК. Предел обнаружения метода составил 0,02 нг/мл, что сопоставимо с

самыми чувствительными из разработанных методов ИФА триазофоса. К ограничениям метода относятся длительность анализа (около 3 ч) и необходимость применять реагенты, получать которые трудоемко и сложно. Данный метод был применен для анализа триазофоса в овощах и фруктах. Предложенная авторами пробоподготовка достаточно длительная, так как включает стадию концентрирования экстракта.

#### **1.2.2.5. Наночастицы углерода в иммуноанализе пестицидов**

Углеродные наночастицы успешно применяются в иммунохимических методах анализа из-за их интенсивной черной окраски, позволяющей обеспечивать высокое значение отношения сигнал/шум при детектировании на белом фоне [153]. Наночастицы углерода были применены в ЛПИИ карбарила и тиабендазола [154, 155]. В обеих работах ЛПИИ проводится в одном и том же формате: на первой стадии в пробирке преинкубируют аналит, мышинные антитела против аналита и свиные антивидовые антитела против мышинных антител, меченные наночастицами углерода. После инкубации в пробирку помещают тест-полоску с нанесенными на нее в тестовой и контрольной зонах соответственно конъюгатом гаптен-овальбумин и кроличьими антителами против свиных антител. Предел обнаружения карбарила составил 5 нг/мл, тиабендазола – 0,3 нг/мл, то есть, ЛПИИ с использованием наночастиц углерода получился более чувствительным в сравнении с ЛПИИ, в котором используются наночастицы золота. Это можно отнести, с одной стороны, на счет более интенсивной окраски наночастиц углерода в сравнении с наночастицами золота, и, с другой стороны, на счет формата анализа, в котором возможно более тщательно оптимизировать количество используемых первичных антител. Тест-системы [154, 155] были применены для анализа фруктовых соков, причем пробоподготовка соков заключалась в простом разбавлении буферным раствором.

Преимуществами тест-систем с использованием наночастиц углерода являются высокая чувствительность, простота получения и низкая стоимость меток. К недостаткам наночастиц углерода относятся неоднородность размера частиц и неспецифическая сорбция биомолекул на них.

#### **1.2.3. Биосенсоры**

Биосенсор – это устройство, в котором для распознавания аналита используются специфические химические реакции с биологическим материалом, а для детектирования этого взаимодействия – различные преобразователи (электрохимические, оптические, пьезоэлектрические и другие). В биосенсорном анализе пестицидов органической природы распознающим материалом наиболее часто являются ферменты и антитела [156-158]. Существует

также тенденция заменять биологический материал – ферменты и антитела – их миметиками. Методы биосенсорного анализа 2,4-Д, триазофоса, карбарила и тиабендазола систематизированы в таблице 6; биосенсорный анализ тетраконазола в литературе не описан.

Таблица 6 – Биосенсорные методы анализа 2,4-Д, триазофоса, карбарила и тиабендазола

Соединение	Распознающий материал	Преобразователь	Предел обнаружения	Ссылка
2,4-Д	Антитела	Импедансометрический	10 нг/мл	[159]
2,4-Д	Антитела	Оптический	0,1 нг/мл	[160]
2,4-Д	Щелочная фосфатаза	Электрохимический	0,3 нг/мл	[161]
2,4-Д	Антитела	Оптический	0,3 нг/мл	[162]
2,4-Д	Антитела	Электрохимический	10 нг/мл	[163]
2,4-Д	МИП	Электрохимический	200 нг/мл	[164]
2,4-Д	Антитела	Электрохимический	0,02 нг/мл	[165]
2,4-Д	МИП	Фотоэлектрохимический	2 нг/мл	[166]
2,4-Д	Миметик цитохрома P450	Электрохимический	400 нг/мл	[167]
2,4-Д	Антитела	Пьезоэлектрический	10 нг/мл	[168]
2,4-Д	МИП	Оптический	30 нг/мл	[169]
2,4-Д	МИП	Электрохимический	0,003 нг/мл	[170]
Триазофос	Ацетилхолинэстераза	Электрохимический	3 нг/мл	[171]
Триазофос	Ацетилхолинэстераза	Электрохимический	2 нг/мл	[172]
Триазофос	МИП	Оптический	0,8 нг/мл	[173]
Триазофос	МИП	Электрохимический	200 нг/мл	[174]
Триазофос	Ацетилхолинэстераза	Электрохимический	0,4 нг/мл	[175]
Триазофос	Антитела	Оптический	0,1 нг/мл	[176]
Триазофос	МИП	Оптический	0,02 нг/мл	[177]
Карбарил	Антитела	Оптический	1 нг/мл	[178]
Карбарил	Ацетилхолинэстераза	Электрохимический	3 нг/мл	[179]
Карбарил	Ацетилхолинэстераза	Электрохимический	400 нг/мл	[180]
Карбарил	Ацетилхолинэстераза	Электрохимический	4 нг/мл	[181]
Карбарил	Ацетилхолинэстераза	Электрохимический	11 нг/мл	[182]
Карбарил	Ацетилхолинэстераза	Электрохимический	30 нг/мл	[183]
Карбарил	Ацетилхолинэстераза	Электрохимический	10 <sup>-6</sup> нг/мл	[184]
Карбарил	Ацетилхолинэстераза	Электрохимический	0,4 нг/мл	[185]
Карбарил	Ацетилхолинэстераза	Электрохимический	1 нг/мл	[186]
Карбарил	Тирозиназа	Электрохимический	200 нг/мл	[187]
Карбарил	Ацетилхолинэстераза	Электрохимический	0,3 нг/мл	[188]
Карбарил	Ацетилхолинэстераза	Электрохимический	6 нг/мл	[189]
Карбарил	Ацетилхолинэстераза	Электрохимический	0,2 нг/мл	[190]
Тиабендазол	Антитела	Оптический	0,05 нг/мл	[191]
Тиабендазол	Антитела	Оптический	0,1 нг/мл	[192]

Антитела были применены в биосенсорном анализе 2,4-Д [159, 160, 162, 163, 165, 168], триазофоса [176], карбарила [178] и тиабендазола [191, 192]. Для детектирования взаимодействия

антигена с антителами использовали импедансометрический [159], пьезоэлектрический [168] и электрохимические [163, 165] преобразователи, а также оптические преобразователи, в основе работы которых лежат флуориметрия [162] спектроскопия поверхностного плазмонного резонанса [160, 176, 178, 191, 192]. В работах [164, 166, 169, 170, 173, 174, 177] антитела заменяли другим распознающим реагентом – молекулярно импринтированными полимерами. В сенсорах на основе МИП были применены оптические [169, 173] и электрохимические [164, 170, 174] преобразователи, сообщается также о разработке сенсорного анализа на основе МИП с фотоэлектрохимическим [166] и электрохемилюминесцентными [177] преобразователями.

В биосенсорном анализе фосфорорганических пестицидов и карбаматов, в том числе триазофоса и карбарила, распознающим материалом наиболее часто является фермент ацетилхолинэстераза [171, 172, 175, 179-186, 188-190]. Концентрацию пестицидов при этом оценивают по степени ингибирования активности фермента. Для детектирования взаимодействия аналита с ферментом применяют преимущественно электрохимические преобразователи. Для определения карбарила был разработан также биосенсор, в основе работы которого лежит ингибирование карбариллом тирозиназы [187]. В биосенсорном анализе 2,4-Д была применена щелочная фосфатаза [161], а также миметик активного центра фермента цитохрома Р450, представляющий собой металлопорфирин (5,10,15,20-тетракис(пентафторфенил)-21Н,23Н-порфирин железо (III) хлорид) [167]. Следует отметить, что перечисленные пестициды не являются единственными ингибиторами ферментов, используемых для их анализа. Ацетилхолинэстеразу, к примеру, ингибируют не только фосфорорганические соединения и карбаматы, но и ряд других соединений, в том числе тяжелые металлы и фториды. При использовании в анализе реакции ингибирования фермента, с одной стороны, возможно выявить присутствие в пробе соединений-ингибиторов, а с другой стороны, трудно идентифицировать конкретные соединения-ингибиторы.

При использовании биосенсоров во многих случаях удается достичь достаточно низких пределов обнаружения, сопоставимых с пределами обнаружения методов ИФА или еще более низких (таблица 6). Время анализа составляет в среднем от 2 до 20 мин, что быстрее, чем большинство опубликованных методов ИФА. Кроме того, в биосенсорном анализе возможно определять аналит в сложных матрицах после простейшей пробоподготовки. Пробоподготовка 2,4-Д, триазофоса и карбарила в сложных матрицах (почва, овощи), описанная в работах [163, 167, 173, 185], включала единственную стадию – экстракцию. В работе [182] определяли содержание карбарила непосредственно в измельченных апельсинах, а в работе [180] содержание карбарила в томатах определяли, погружая датчик в цельный томат, разрезанный на половинки.

Применение биосенсоров, тем не менее, имеет ряд ограничений: плохая воспроизводимость, невысокая селективность биосенсоров на основе ферментов, необходимость строго соблюдать условия хранения, сложности с иммобилизацией распознающих реагентов на преобразователе и небольшое количество одновременно проводимых анализов.

\*\*\*

Проведенный обзор позволяет сделать следующие обобщенные выводы. Методы анализа пестицидов можно подразделить на 2 группы: скрининговые и подтверждающие. В качестве подтверждающих методов используют преимущественно хроматографию с масс-спектрометрическим детектированием. Однако для такого анализа требуются дорогостоящие оборудование, расходные материалы и растворители высокой чистоты, а кроме этого – тщательная пробоподготовка образца, что подразумевает и затраты времени, и затраты расходных материалов.

Чтобы сделать быстрее и дешевле анализ большого числа образцов, необходимо проводить предварительный скрининг образцов перед хроматографическим анализом. Основной целью проведения предварительного скрининга является уменьшение числа образцов для подтверждающего (хроматографического) анализа. Для скринингового анализа конкретных соединений, например, контаминантов, типичных для данной территории или выявленных выше по течению, либо контаминантов, примененных в процессе производства и переработки продукции, применяют преимущественно иммунохимические методы анализа и биосенсоры.

Наилучшей селективностью характеризуются те скрининговые методы, в которых в качестве распознающих элементов используются антитела. Тем не менее, применение биосенсоров, в том числе иммуносенсоров, ограничено из-за низкой воспроизводимости. Существует большое разнообразие иммунохимических методов. Среди них наиболее полно разработаны и широко применяются методы ИФА, однако эти методы одни из наиболее длительных по времени. Существующая тенденция сокращать время и упрощать схему проведения анализа выражается в появлении новых, более экспрессных методов ИФА, а также в развитии и совершенствовании других иммунохимических методов. Самым быстрым среди количественных методов иммуноанализа является метод ПФИА. В литературе отсутствуют данные о ПФИА многих соединений, в том числе карбарила, тиабендазола и тетраконазола; отсутствуют данные о селективном ПФИА триазофоса. Кроме того, методики определения 2,4-Д методом ПФИА разработаны лишь для воды и почвы. Таким образом, актуальной является как

оптимизация ПФИА пестицидов, так и разработка методик определения пестицидов в сложных матрицах, а именно в пищевых продуктах, что и являлось целью данной работы.

## ГЛАВА II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1. Оборудование и материалы

Измерения интенсивности и поляризации флуоресценции осуществляли с помощью прибора Sentry 200 («Ellie», США). Результаты иммунохимического анализа обрабатывали в программе Origin 8.5.1. Масс-спектры получали с помощью тандемного масс-спектрометра Q-Exactive, соединенного с высокоэффективным жидкостным хроматографом Ultimate 3000; ионизацию проб осуществляли электрораспылением в источнике ионизации HESI-II («Thermo Scientific», США). Для хроматографии использовали колонку Hypersil Gold aQ (150 мм × 2,1 мм, диаметр зерна сорбента 3 мкм) с предколонкой Hypersil Gold aQ (10 мм × 2,1 мм, диаметр зерна сорбента 3 мкм). Обработку масс-спектрометрических данных проводили с использованием программного обеспечения Xcalibur 3.0 («Thermo Scientific», США). Предполагаемые структуры фрагментных ионов трейсеров получали с помощью программы HighChem Mass Frontier 7.0.

В работе использовали общелабораторное оборудование: ультразвуковую ванну СВО-28 («ПСБ-Галс», Россия), ротатор Multi RS-60 («Biosan», Латвия), вортекс Wizard («Velp Scientifica», Латвия), центрифугу Mini Spin («Eppendorf AG», Германия).

Для выделения трейсеров из реакционных смесей методом тонкослойной хроматографии использовали пластинки Silica gel 60 F<sub>254</sub> («Merck», Германия).

В работе использовали следующие стандартные образцы: 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д), 4-хлорфеноксиуксусная кислота (4-ХФУ), 2,4-дихлор-5-фторфеноксиуксусная кислота, 2-хлор-4-фторфеноксиуксусная кислота, 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота, 2,3,4,5,6-пентахлорфеноксиуксусная кислота, триклопир, мекопроп, 3,5-дихлорфенол, 2,3,6-трихлорфенол, триазофос, паратион, паратион-метил, диметоат, метидатион, хлорпирифос, изокарбофос, карбарил, дикуран, изопротурон, карбофуран, пропанил, диурон, беналаксил, тиабендазол, карбендазим, беномил, тетраконазол, пенконазол, триадимефон, ципроконазол, пропиконазол, дифеноконазол, тебуконазол, триадименол, тритиконазол (Sigma Aldrich, США). Для синтеза трейсеров использовали флуоресцеинизотиоцианат изомер I (ФИТЦ), 4-аминометилфлуоресцеин (АМФ), аминифлуоресцеин (АФ), дициклогексилкарбодиимид, N-гидроксисукцинимид, дигидрохлорид этилендиамина, пропилендиамин, бутилендиамин, пентаметилендиамин, гексаметилендиамин, гептаметилендиамин (Sigma Aldrich, США). В работе использовали следующие органические растворители и химические реагенты: диметилформамид («ХимМед», Россия), метанол («FisherChemical», Великобритания), хлороформ («Merck»,

Германия), муравьиная кислота, уксусная кислота, формиат аммония («Fluka», Германия),  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$  («ХимМед», Россия).

Для приготовления водных растворов использовали деионизованную воду после очистки системой NanoPure (Thermo Scientific, США) с удельным сопротивлением 18,2 МОм×см. Боратный буферный раствор (0,05 М, рН 8,0) с добавлением  $\text{NaN}_3$  (0,01%) использовали в качестве разбавителя для иммунореагентов при проведении ПФИА.

При проведении предварительных исследований использовали градуировочные растворы с концентрациями от 1 до 10000 нг/мл в смеси метанола с водой (1:9). При проведении анализа образцов зерна градуировочные растворы готовили в смеси метанола с водой, причем соотношение метанола и воды было то же, что и в анализируемой пробе.

Моноклональные антитела против 2,4-Д (Р6/С10) предоставлены Миланом Франеком (Институт Ветеринарии, Брно, Чехия).

Моноклональные антитела против триазофоса (анти-Триаз4С 0А1-8С10) и гаптен Триаз4С (О-этил О-(1-фенил-1Н-1,2,4-триазол-3-ил) N-(3-карбоксыпропил) фосфорамидотиоат) были предоставлены коллегами из Китайского Института Пестицидов и Экологической Токсикологии (Университет Чжэцзян, Ханчжоу, Китай).

Моноклональные антитела против карбарила (анти- КарбС 1В7) и гаптен КарбС (6-[(1-нафтилокси)карбонил-амино] гексановая кислота) были предоставлены коллегами из Китайского Научно-Исследовательского Института Масличных Культур (Китайская Академия Сельскохозяйственных Наук, Ухань, Китай).

Моноклональные антитела против тиабендазола (LIV- Тбз3С-13) и гаптены Тбз3С (3-[2-(1,3-тиазол-4-ил)-1Н-бензимидазол-1-ил]пропановая кислота) и Тбз6С (3-[2-(1,3-тиазол-4-ил)-1Н-бензимидазол-1-ил]гексановая кислота), а также моноклональные антитела против тетраконазола (LIV-Ткз6С-41) и гаптен Ткз6С (6-[2-(2,4-дихлорофенил)-3-(1Н-1,2,4-триазол-1-ил)пропокси]гексановая кислота) предоставлены Ангелом Монтойя (Политехнический Университет Валенсии, Валенсия, Испания).

## 2.2. Методы исследования

### 2.2.1. Синтез иммунореагентов

Для синтеза трейсеров использовали метки аминфлуоресцеин (АФ), 4-аминометилфлуоресцеин (АМФ), этилендиаминфлуоресцеинтиокарбамат (ЭДФ), пропилендиаминфлуоресцеинтиокарбамат ((СН<sub>2</sub>)<sub>3</sub>ДФ), бутилендиаминфлуоресцеинтиокарбамат ((СН<sub>2</sub>)<sub>4</sub>ДФ), пентаметилендиаминфлуоресцеинтиокарбамат ((СН<sub>2</sub>)<sub>5</sub>ДФ), гексаметилендиаминфлуоресцеинтиокарбамат ((СН<sub>2</sub>)<sub>6</sub>ДФ), гептаметилендиаминфлуоресцеинтиокарбамат ((СН<sub>2</sub>)<sub>7</sub>ДФ). В синтезе трейсеров использовали метки АФ и АМФ фирмы Sigma; метки ЭДФ, (СН<sub>2</sub>)<sub>3</sub>ДФ, (СН<sub>2</sub>)<sub>4</sub>ДФ, (СН<sub>2</sub>)<sub>5</sub>ДФ, (СН<sub>2</sub>)<sub>6</sub>ДФ, (СН<sub>2</sub>)<sub>7</sub>ДФ синтезировали из флуоресцеинизотиоцианата (ФИТЦ) и пропилендиамина, тетраметилендиамина, пентаметилендиамина, гексаметилендиамина и гептаметилендиамина, соответственно. Успешность синтезов и структуры трейсеров подтверждали методом ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения.

#### 2.2.1.1. Синтез ЭДФ

ЭДФ синтезировали по следующей методике [193]. Растворяли 200 мг (1,5 ммоль) дигидрохлорида этилендиамина в 50 мл метанола, содержащего 1% триэтиламина. Растворяли 117 мг (300 мкмоль) ФИТЦ в 10 мл того же растворителя и добавляли по каплям при перемешивании в течение 30 мин к первому раствору, затем перемешивали еще 1 ч. Реакционную смесь фильтровали, затем промывали образовавшийся оранжевый осадок метанолом и высушивали на воздухе.

#### 2.2.1.2. Синтез (СН<sub>2</sub>)<sub>3</sub>ДФ, (СН<sub>2</sub>)<sub>4</sub>ДФ, (СН<sub>2</sub>)<sub>5</sub>ДФ, (СН<sub>2</sub>)<sub>6</sub>ДФ, (СН<sub>2</sub>)<sub>7</sub>ДФ

Метки (СН<sub>2</sub>)<sub>3</sub>ДФ, (СН<sub>2</sub>)<sub>4</sub>ДФ, (СН<sub>2</sub>)<sub>5</sub>ДФ, (СН<sub>2</sub>)<sub>6</sub>ДФ и (СН<sub>2</sub>)<sub>7</sub>ДФ синтезировали по методике, описанной для получения ЭДФ, с некоторыми изменениями. Вместо дигидрохлорида этилендиамина для синтеза (СН<sub>2</sub>)<sub>3</sub>ДФ, (СН<sub>2</sub>)<sub>4</sub>ДФ, (СН<sub>2</sub>)<sub>5</sub>ДФ, (СН<sub>2</sub>)<sub>6</sub>ДФ и (СН<sub>2</sub>)<sub>7</sub>ДФ использовали пропилендиамин, тетраметилендиамин, пентаметилендиамин, гексаметилендиамин и гептаметилендиамин, соответственно. Растворяли 0,5 ммоль соответствующего диамина в 15 мл метанола, содержащего 1% триэтиламина. Растворяли 39 мг (100 мкмоль) ФИТЦ в 4 мл того же растворителя и добавляли по каплям при перемешивании в течение 30 мин к первому раствору, затем перемешивали еще 1 ч. После добавления раствора ФИТЦ к раствору диамина и последующего перемешивания осадок не выпадал; далее для синтеза трейсеров использовали реакционные смеси. Схема реакции диаминоалканов с ФИТЦ приведена на рисунке 5.

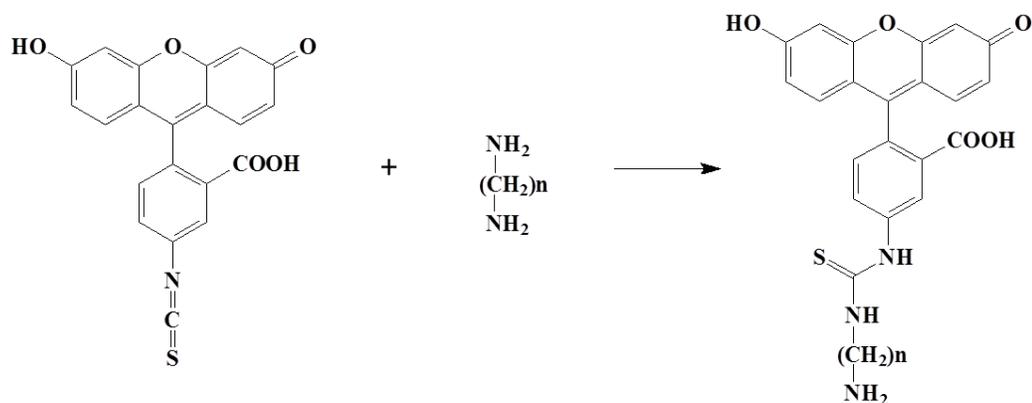


Рисунок 5 – Схема синтеза флуоресцентных меток ЭДФ,  $(\text{CH}_2)_3\text{ДФ}$ ,  $(\text{CH}_2)_4\text{ДФ}$ ,  $(\text{CH}_2)_5\text{ДФ}$ ,  $(\text{CH}_2)_6\text{ДФ}$ ,  $(\text{CH}_2)_7\text{ДФ}$  ( $n=2, 3, 4, 5, 6, 7$ , соответственно)

### 2.2.1.3. Синтез трейсеров с ЭДФ

Трейсеры с меткой ЭДФ синтезировали из 2,4-Д, 4-ХФУ, производных триазофоса (Триаз4С), карбарила (КарбС), тиабендазола (Тбз3С и Тбз6С) и тетраконазола (Ткз6С). Для активации карбоксильной группы 10 мкмоль гаптена растворяли в диметилформамиде, добавляли к полученному раствору 4,3 мг дициклогексилкарбодиимида (20 мкмоль) и 2,3 мг N-гидроксисукцинимид (20 мкмоль). Реакционную смесь инкубировали 12 часов при перемешивании. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием. К супернатанту добавляли 5 мкмоль ЭДФ, перемешивали и инкубировали 24 ч. Из реакционных смесей трейсеры выделяли методом тонкослойной хроматографии в системе растворителей  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{COOH} = 80:16:1$  (об.). Полосы трейсеров с  $R_f$  0,8 элюировали с хроматографической пластинки метанолом. Выделенные трейсеры очищали дополнительно, повторно хроматографируя в системе растворителей  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{COOH} = 80:14:1$  и элюируя с пластинки полосы трейсеров с  $R_f$  0,7.

### 2.2.1.4. Синтез трейсеров с $(\text{CH}_2)_3\text{ДФ}$ , $(\text{CH}_2)_4\text{ДФ}$ , $(\text{CH}_2)_5\text{ДФ}$ , $(\text{CH}_2)_6\text{ДФ}$ , $(\text{CH}_2)_7\text{ДФ}$

Трейсеры с метками  $(\text{CH}_2)_3\text{ДФ}$ ,  $(\text{CH}_2)_4\text{ДФ}$ ,  $(\text{CH}_2)_5\text{ДФ}$ ,  $(\text{CH}_2)_6\text{ДФ}$ ,  $(\text{CH}_2)_7\text{ДФ}$  синтезировали из производных триазофоса (Триаз4С) и карбарила (КарбС). Из производного тетраконазола (Ткз6С) синтезировали трейсеры с метками  $(\text{CH}_2)_4\text{ДФ}$ ,  $(\text{CH}_2)_6\text{ДФ}$ . Молярное соотношение реагентов гаптен / дициклогексилкарбодиимид / N-гидроксисукцинимид / флуоресцентная метка и методика синтеза были те же, что и при синтезе трейсеров с ЭДФ. Из реакционных смесей трейсеры выделяли методом тонкослойной хроматографии и дополнительно очищали так же, как и трейсеры с меткой ЭДФ. Схема синтеза трейсеров с диаминофлуоресцеинтиокарбаматными метками представлена на рисунке 6.

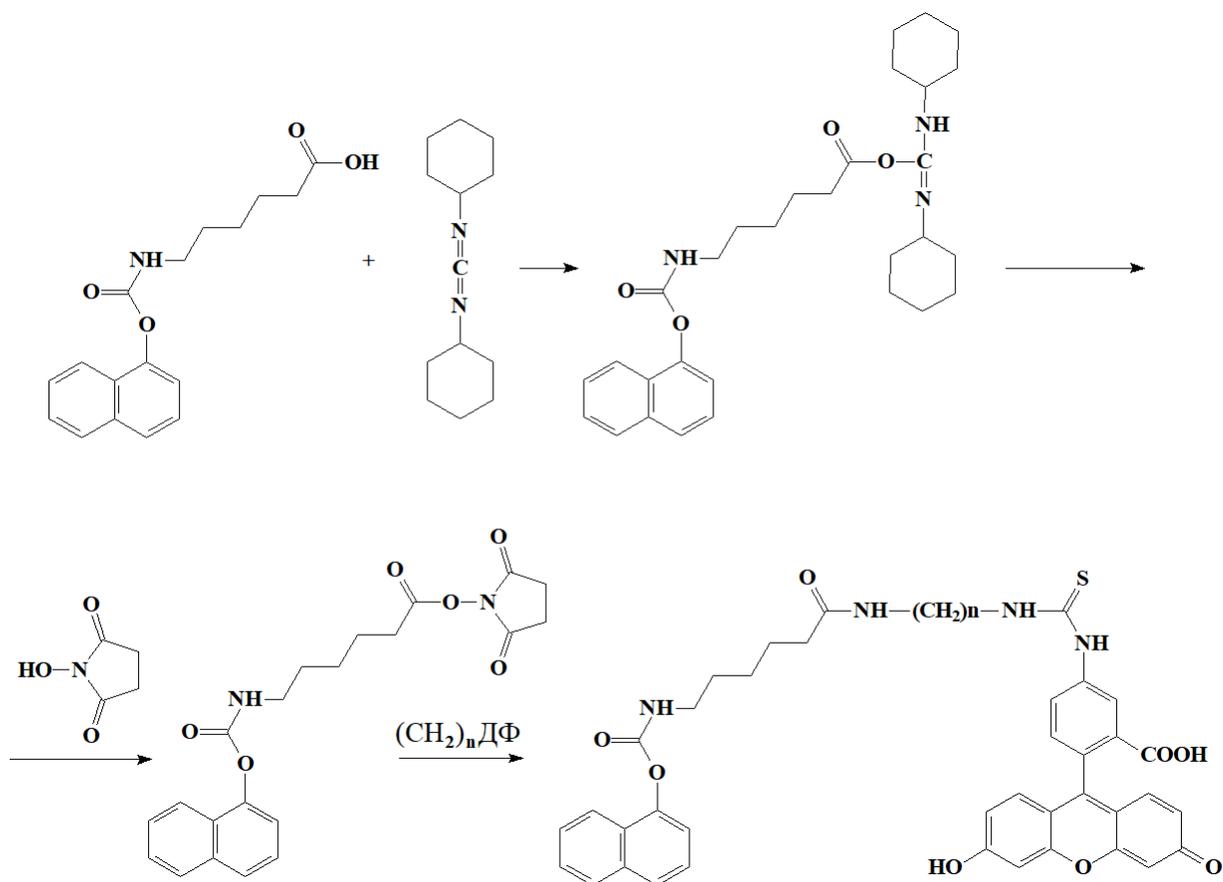


Рисунок 6 – Схема синтеза трейсеров с диаминофлуоресцентнокарбаматными метками на примере трейсеров на основе гаптена КарбС ( $n$  от 2 до 7)

### 2.2.1.5. Синтез трейсеров с АМФ

Трейсеры с меткой АМФ синтезировали из 2,4-Д, 4-ХФУ, производных триазофоса (Триаз4С), карбарила (КарбС), тиабендазола (Тбз3С и Тбз6С) и тетраконазола (Ткз6С). Молярное соотношение реагентов гаптен / дициклогексилкарбодиимид / N-гидроксисукцинимид / флуоресцентная метка и методика синтеза были те же, что и при синтезе трейсеров с ЭДФ. Из реакционных смесей трейсеры выделяли методом тонкослойной хроматографии в системе растворителей  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH} = 8:1$  (об.). Полосы трейсеров с  $R_f$  0,5 элюировали с хроматографической пластинки метанолом. Выделенные трейсеры очищали дополнительно, повторно хроматографируя в системе растворителей  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH} = 10:1$  (об.) и элюируя с пластинки полосы трейсеров с  $R_f$  0,4. Схема синтеза трейсеров с меткой АМФ представлена на рисунке 7.

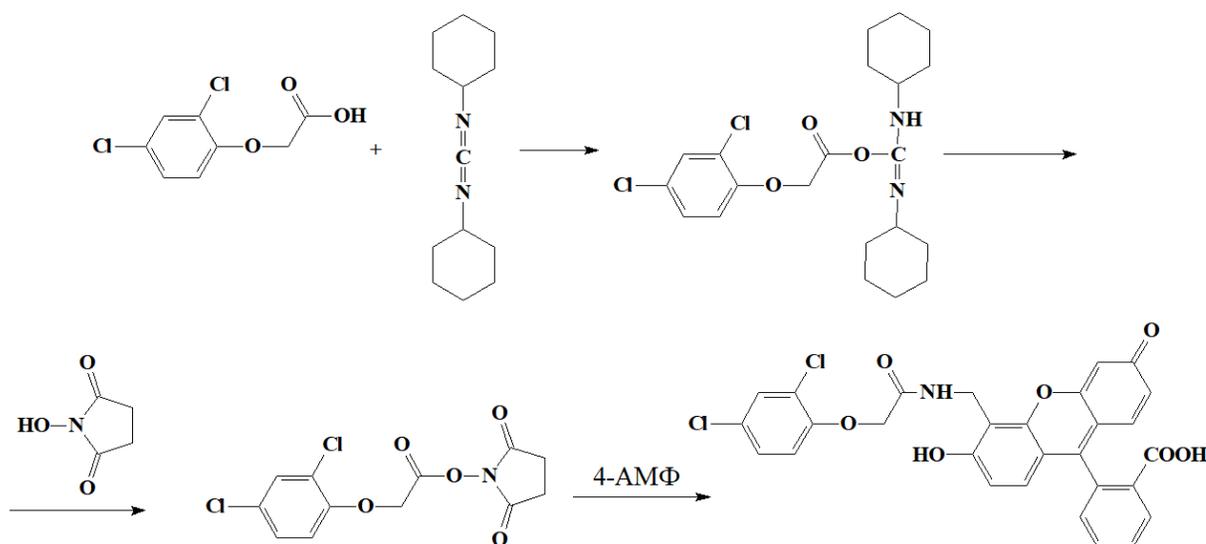


Рисунок 7 – Схема синтеза трейсеров с АМФ на примере 2,4-Д–АМФ

### 2.2.1.6. Синтез трейсеров с АФ

Трейсеры с меткой АФ синтезировали из производных тиабендазола (Тбз3С и Тбз6С) и тетраконазола (Ткз6С). Молярное соотношение реагентов и методика синтеза были те же, что и при синтезе трейсеров с ЭДФ и АМФ. Из реакционных смесей трейсеры выделяли методом тонкослойной хроматографии в системе растворителей  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH} = 5:1$  (об.). Полосы трейсеров с  $R_f$  0,4 элюировали с хроматографической пластинки метанолом. Выделенные трейсеры очищали дополнительно, повторно хроматографируя в системе растворителей  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{COOH} = 80:16:1$  (об.) и элюируя с пластинки полосы трейсеров с  $R_f$  0,5. Схема синтеза трейсеров с меткой АФ представлена на рисунке 8.

## 2.2.2. Техника эксперимента по проведению ПФИА

### 2.2.2.1. Титрование антител

В серию кювет вносили по 500 мкл боратного буферного раствора. В первую кювету серии вносили 10 мкл исходного раствора антител и 500 мкл боратного буферного раствора и перемешивали. Затем последовательно переносили 500 мкл разбавленного раствора антител из предыдущей кюветы в следующую. 500 мкл из последней кюветы отбрасывали. Получали серию растворов антител, последовательно разведенных в 2 раза. В каждую кювету вносили 500 мкл рабочего раствора трейсера, инкубировали и проводили измерение поляризации флуоресценции. Кривые титрования строили в координатах «логарифм концентрации антител – поляризация флуоресценции». Титр антител определяли как концентрацию антител, дающую 50% связывание с меченым антигеном.

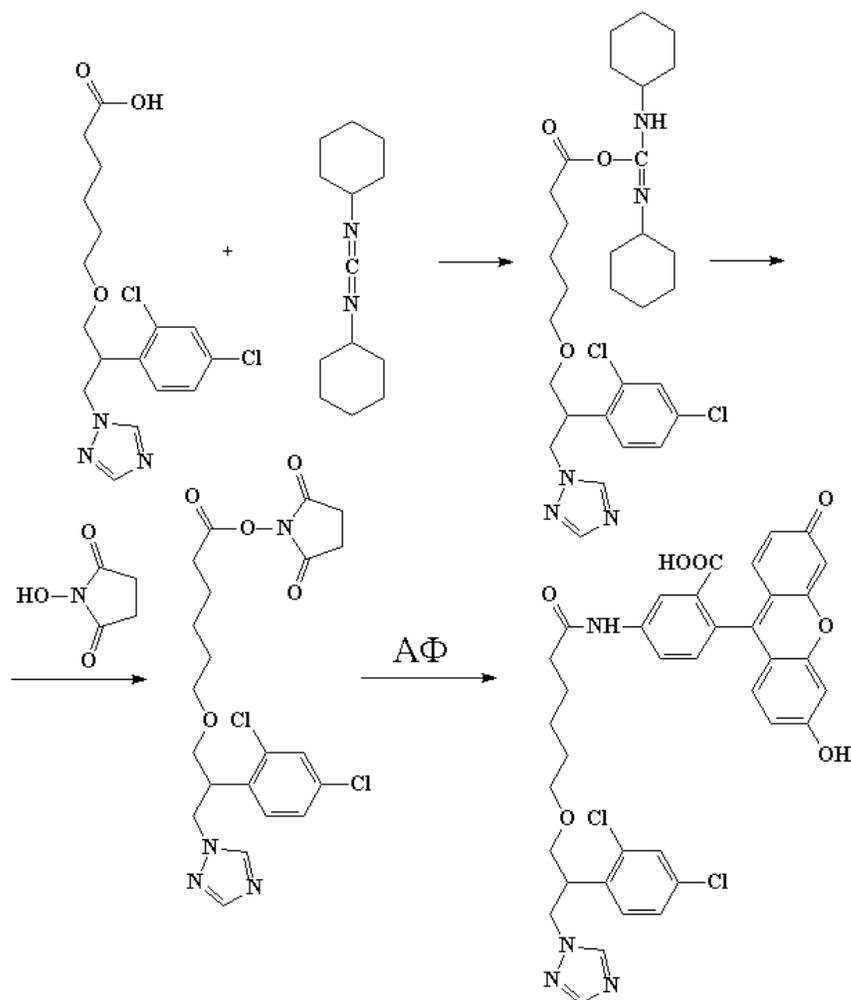


Рисунок 8 – Схема синтеза трейсеров с АФ на примере ТкзбС-АФ

### 2.2.2.2. Проведение конкурентного ПФИА

Конкурентный ПФИА проводили следующим образом: 50 мкл стандартного раствора или пробы смешивали в кювете с 500 мкл рабочего раствора трейсера, после чего добавляли 500 мкл рабочего раствора антител и проводили измерение поляризации флуоресценции. Для построения градуировочного графика проводили 3 параллельных измерения каждой концентрации вещества. Градуировочные графики строили в координатах «логарифм концентрации вещества - поляризация флуоресценции». Время, затраченное на измерение сигнала одного образца, составляет 2-4 с.

### 2.2.2.3. Кинетика ассоциации

Исследование кинетики ассоциации антител и трейсеров проводили для определения оптимального времени инкубации. Значение поляризации флуоресценции в нулевой момент времени измеряли, используя рабочий раствор трейсера до добавления антител. К рабочему

раствору трейсера объемом 500 мкл добавляли 50 мкл стандартного раствора, затем 500 мкл рабочего раствора антител и измеряли поляризацию флуоресценции через равные промежутки времени. Кинетические кривые строили в координатах «поляризация флуоресценции – время».

#### 2.2.2.4. Аналитические характеристики ПФИА

**Предел обнаружения** определяли по методу Родбарда [194]. Для этого проводили измерения 20 нулевых стандартов (растворитель, не содержащий аналита), рассчитывали минимальный значимый аналитический сигнал как разность нулевого сигнала и утроенного стандартного отклонения:

$$y_{\min} = y_0 - 3S_0,$$

где  $y_{\min}$  – значение поляризации флуоресценции, соответствующее пределу обнаружения,  $y_0$  – среднее значение поляризации флуоресценции для «нулевого» стандарта,  $S_0$  – стандартное отклонение ( $n=20$ ). Используя значение  $y_{\min}$ , находили по градуировочному графику соответствующую ему концентрацию – предел обнаружения. Предел обнаружения в стандартных растворах определяли, анализируя 10% метанол методом ПФИА. Предел обнаружения в экстрактах определяли, анализируя разбавленный в необходимое количество раз экстракт из неконтаминированного образца методом ПФИА.

**Диапазон определяемых концентраций.** За диапазон определяемых концентраций принимали линейный диапазон сигмоидной кривой, построенной по результатам анализа стандартных растворов и описываемой уравнением:

$$y = (A - D) / [1 + (x/C)^b] + D,$$

где  $A$  – максимальное значение поляризации флуоресценции,  $D$  – минимальное значение поляризации флуоресценции,  $b$  – тангенс угла наклона кривой в точке  $IC_{50}$ ,  $C$  ( $IC_{50}$ ) – концентрация аналита, ингибирующая связывание антител с трейсером на 50%.

Нижнюю границу диапазона определяемых концентраций –  $IC_{20}$  – находили как концентрацию аналита, при которой поляризация флуоресценции снижается на 20%, верхнюю границу –  $IC_{80}$  – как концентрацию аналита, при которой поляризация флуоресценции снижается на 80% интервала значений аналитического сигнала по сравнению с максимальным значением.

**Воспроизводимость** анализа оценивали по результатам нескольких параллельных измерений, рассчитывая относительное стандартное отклонение.

**Специфичность** определения каждого из пестицидов оценивали по проценту перекрестного реагирования (ПР, %) со структурно родственными соединениями. Для этого анализировали стандартные растворы таких соединений методом ПФИА в оптимизированных

условиях, строили градуировочные графики и определяли параметры кривых. Процент перекрестного реагирования рассчитывали по формуле:

$$\text{ПР}(\%) = (IC_{50}(1) / IC_{50}(2)) \times 100\%,$$

где  $IC_{50}(1)$  – концентрация определяемого соединения, вызывающая ингибирование связывания на 50%,  $IC_{50}(2)$  – концентрация структурно родственного соединения, вызывающая ингибирование связывания на 50%.

**Правильность** разработанных методик контролировали, анализируя образцы, содержащие внесенный в них аналит в известной концентрации. По результатам анализа рассчитывали процент открытия:

$$\% \text{ открытия} = (c_{\text{измерено}} / c_{\text{введено}}) \times 100,$$

где  $c_{\text{измерено}}$  – концентрация аналита, измеренная по разработанной методике,  $c_{\text{введено}}$  – концентрация аналита, внесенного в образец.

### 2.2.3. Условия ВЭЖХ-МС/МС анализа

#### 2.2.3.1. Условия хроматографирования

Все трейсеры, а также пробы для определения в них 2,4-Д, тиабендазола, тетраконазола хроматографировали в следующих условиях: подвижная фаза состояла из фазы А – 0,1% раствора муравьиной кислоты в смеси деионизованной воды с ацетонитрилом в соотношении 95:5 (об.) и фазы В – 0,1% раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле. Для разделения использовали градиентное элюирование: 0,00–2,00 мин – 5% фазы В, 15,00–18,00 мин – 95% фазы В, 19,00–23,00 мин – 5% фазы В.

Для определения триазофоса и карбарила пробы хроматографировали, используя подвижную фазу, состоящую из фазы А- деионизованной воды и фазы В - 5 мМ раствора формиата аммония в метаноле. Для разделения использовали градиентное элюирование: 0,00–2,00 мин – 20% фазы В, 12,00–15,00 мин – 95% фазы В, 16,00–17,00 мин – 20% фазы В.

Температура колонки в обоих случаях составляла 30 °С, скорость потока подвижной фазы – 0,5 мл/мин, объем ввода пробы – 3 мкл.

#### 2.2.3.2. Условия масс-спектрометрического определения

Скорость потока распыляющего газа (азот) составляла 0,40 л/мин, вспомогательного газа (азот) – 0,10 л/мин, газа-осушителя (азот) – 0,05 л/мин. Напряжение на капилляре составляло 4,00 кВ, температура на капилляре – 270 °С, температура на распылителе – 300 °С. Сканирование масс-спектров осуществляли при атмосферном давлении в режиме ИЭР. В диапазоне 100-1500 Да регистрировали положительно и отрицательно заряженные ионы при разрешении 35000 (на

половине высоты) и точности определения масс  $5 \text{ млн}^{-1}$ . Масс-спектры второго порядка получали высокоэнергетической диссоциацией соударением. В качестве ионов-предшественников для анализа в режиме мониторинга выбранных реакций использовали ионы, массы которых соответствовали протонированным молекулам триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола, и депротонированной молекуле 2,4-Д. Количественно пестициды определяли по выбранным ионам-продуктам (таблица 7).

Таблица 7 – Параметры масс-спектрометрического определения пестицидов

Соединение	Время удерживания, мин	Полярность ионов	Ион-предшественник, Да	Энергия фрагментации, эВ	Ионы-продукты, Да
2,4-Д	8,23	Отрицательная	218,9616 [M-H] <sup>-</sup>	35	160,9561, 124,9794
Триазофос	9,90	Положительная	314,0728 [M+H] <sup>+</sup>	35	162,0667, 114,9619
Карбарил	7,86	Положительная	202,0868 [M+H] <sup>+</sup>	25	145,0653, 117,0704
Тиабендазол	3,90	Положительная	202,0440 [M+H] <sup>+</sup>	40	175,0331 131,0608
Тетраконазол	10,11	Положительная	372,0294 [M+H] <sup>+</sup>	35	158,9768 70,0405

#### 2.2.4. Приготовление контаминированных образцов

Пшеничное зерно, используемое для разработки методик анализа, не содержало анализируемых соединений, как показали результаты анализа методом ВЭЖХ-МС/МС. Зерно измельчали в гомогенизаторе, затем навески образцов муки по 1 г контаминировали пестицидами в необходимых для эксперимента концентрациях и оставляли на 48 ч.

#### 2.2.5. Подготовка проб

После измельчения зерна в гомогенизаторе к навескам образцов массой 1 г добавляли необходимый объем экстрагента, перемешивали в течение 5 мин на ротаторе и экстрагировали в течение 30 мин в ультразвуковой ванне. Полученные экстракты разбавляли водой или экстрагентом, центрифугировали при  $1400 g$  в течение 5 мин и анализировали методом ПФИА. При необходимости результаты подтверждали, анализируя приготовленную пробу методом ВЭЖХ-МС/МС.

## ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1.1. Синтез иммунореагентов

Для получения трейсеров были предварительно синтезированы метки ЭДФ,  $(\text{CH}_2)_3\text{ДФ}$ ,  $(\text{CH}_2)_4\text{ДФ}$ ,  $(\text{CH}_2)_5\text{ДФ}$ ,  $(\text{CH}_2)_6\text{ДФ}$  и  $(\text{CH}_2)_7\text{ДФ}$ . Также в работе были использованы коммерчески доступные флуоресцентные метки АМФ и АФ. Структурные формулы флуоресцентных меток приведены на рисунке 9. Метку ЭДФ синтезировали из дигидрохлорида этилендиамина и ФИТЦ по ранее использовавшимся в нашей лаборатории методикам и отделяли от реакционной смеси в виде осадка. Синтез меток  $(\text{CH}_2)_3\text{ДФ}$ ,  $(\text{CH}_2)_4\text{ДФ}$ ,  $(\text{CH}_2)_5\text{ДФ}$ ,  $(\text{CH}_2)_6\text{ДФ}$  и  $(\text{CH}_2)_7\text{ДФ}$  в литературе ранее описан не был. После проведения реакций ФИТЦ и диаминов с длиной алкильного радикала от трех метиленовых групп и более осадок не выпадал. Из-за того, что в синтезе меток использовались небольшие количества реагентов, для уменьшения потерь на этой стадии выделение целевых продуктов не проводили, и в дальнейшем синтезе трейсеров использовали реакционные смеси. Содержание диаминофлуоресцеинтиокарбаматных меток в полученных реакционных смесях оценивали по площадям их хроматографических пиков в пересчете на ЭДФ.

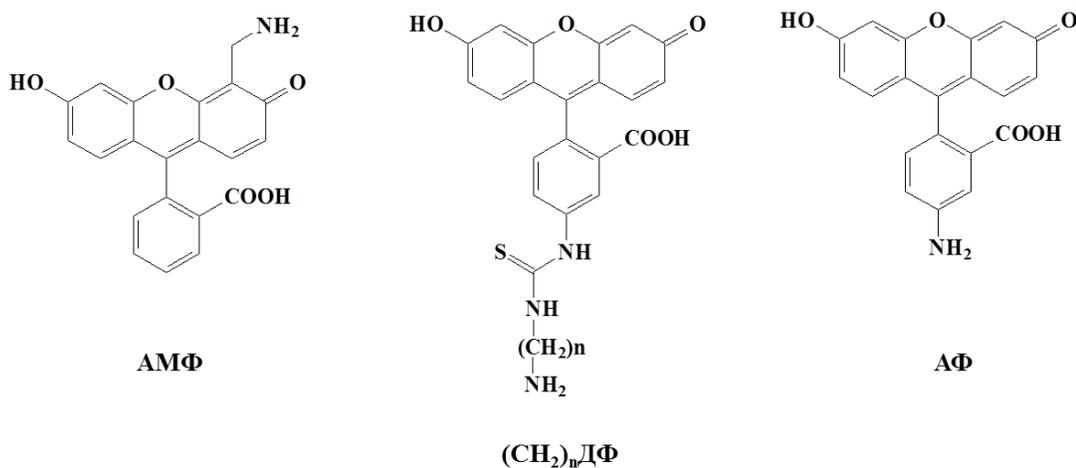


Рисунок 9 – Структурные формулы флуоресцентных меток, примененных для синтеза трейсеров в данной работе ( $n=2, 3, 4, 5, 6, 7$  для ЭДФ,  $(\text{CH}_2)_3\text{ДФ}$ ,  $(\text{CH}_2)_4\text{ДФ}$ ,  $(\text{CH}_2)_5\text{ДФ}$ ,  $(\text{CH}_2)_6\text{ДФ}$  и  $(\text{CH}_2)_7\text{ДФ}$ )

Трейсеры синтезировали карбодиимидным методом. Для синтеза трейсеров в качестве гаптенных использовали соединения, содержащие карбоксильную группу. Для ПФИА 2,4-Д в синтезе трейсеров использовали непосредственно аналит, а также родственное по структуре соединение – 4-ХФУ. Молекулы триазафоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола не содержат функциональных групп для сшивки с флуоресцентными метками, поэтому в качестве гаптена при синтезе трейсеров использовали функционализированные производные этих

соединений. Структурные формулы аналитов и гаптенов, использованных в синтезе трейсеров, приведены на рисунке 10.

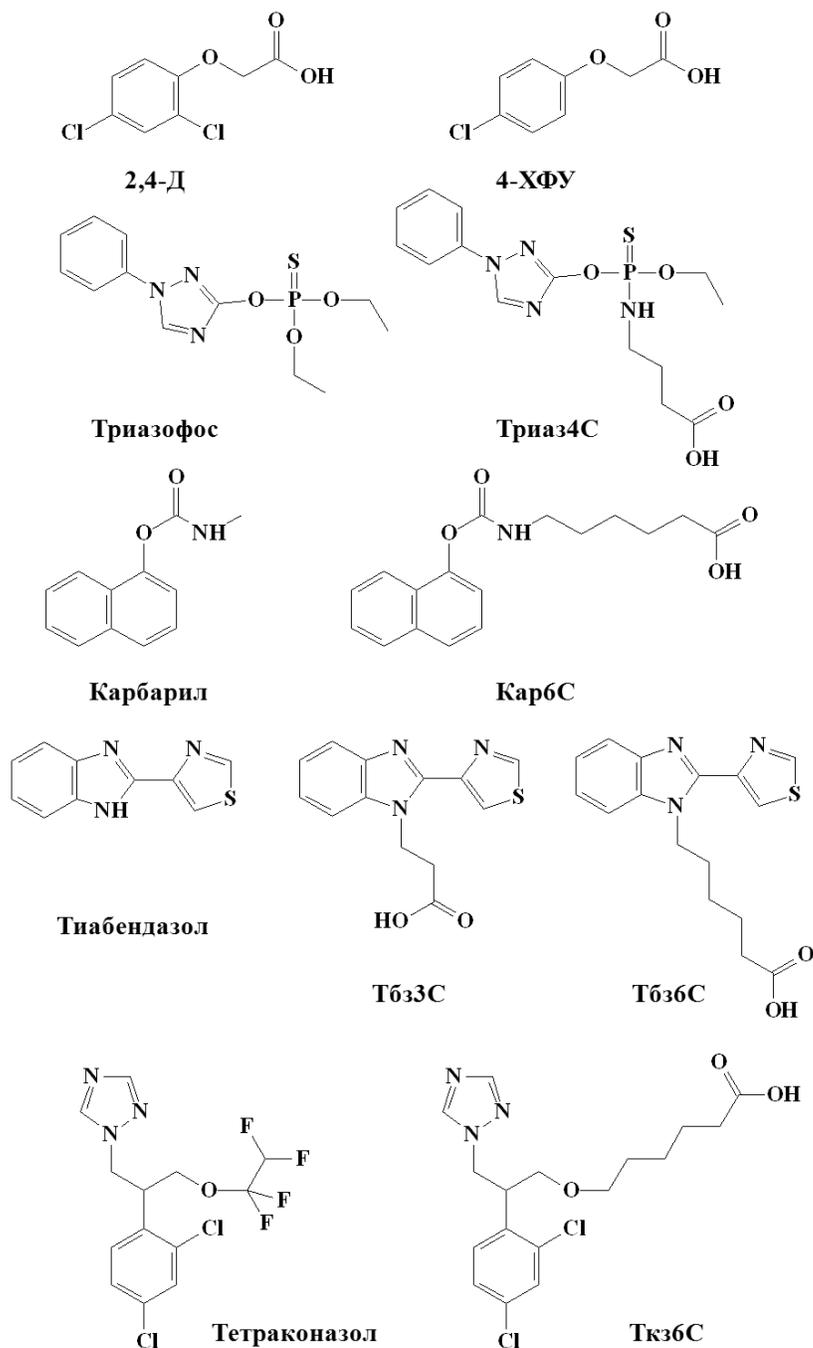


Рисунок 10 – Структурные формулы аналитов и гаптенов, использованных в синтезе трейсеров

В ходе данной работы было синтезировано 29 трейсеров, из них 28 – впервые. Для ПФИА 2,4-Д были синтезированы трейсеры 4-ХФУ-ЭДФ, 4-ХФУ-АМФ, 2,4-Д-ЭДФ и 2,4-Д-АМФ, для ПФИА тризофоса – Триаз4С-ЭДФ, Триаз4С-(СН<sub>2</sub>)<sub>3</sub>ДФ, Триаз4С-(СН<sub>2</sub>)<sub>4</sub>ДФ, Триаз4С-(СН<sub>2</sub>)<sub>5</sub>ДФ, Триаз4С-(СН<sub>2</sub>)<sub>6</sub>ДФ, Триаз4С-(СН<sub>2</sub>)<sub>7</sub>ДФ и Триаз4С-АМФ, для ПФИА карбарила – Карб6С-ЭДФ, Карб6С-(СН<sub>2</sub>)<sub>3</sub>ДФ, Карб6С-(СН<sub>2</sub>)<sub>4</sub>ДФ, Карб6С-(СН<sub>2</sub>)<sub>5</sub>ДФ, Карб6С-(СН<sub>2</sub>)<sub>6</sub>ДФ, Карб6С-(СН<sub>2</sub>)<sub>7</sub>ДФ и

КарбС-АМФ, для ПФИА тиабендазола – Тбз3С-ЭДФ, Тбз6С-ЭДФ, Тбз3С-АМФ, Тбз6С-АМФ, Тбз3С-АФ и Тбз6С-АФ, для ПФИА тетраконазола – Ткз6С-ЭДФ, Ткз6С-(СН<sub>2</sub>)<sub>4</sub>ДФ, Ткз6С-(СН<sub>2</sub>)<sub>6</sub>ДФ, Ткз6С-АМФ и Ткз6С-АФ. Структурные формулы синтезированных трейсеров приведены в приложении (рисунок П. 1-5). Трейсер 2,4-Д-ЭДФ синтезировали в нашей лаборатории и ранее [139]. В данной работе 2,4-Д-ЭДФ использовали, чтобы оценить чувствительность анализа с антителами нового клона Р6/С10 и сравнить эти результаты с ранее полученными результатами для клона Е2/Г2 [139].

### 3.1.2. Подтверждение структур синтезированных соединений

В результате синтезов флуоресцентные метки и трейсеры были получены в составе реакционных смесей; трейсеры впоследствии были выделены методом тонкослойной хроматографии. Почти все трейсеры были синтезированы впервые, а методики синтеза диаминофлуоресцеинтиокарбаматных меток более чем с двумя метиленовыми группами в составе диамина в литературе не описаны, поэтому было важно подтвердить успешность синтезов и успешность выделения целевых продуктов синтезов из реакционных смесей. В ходе синтезов в ряде случаев были задействованы небольшие количества соединений, что ограничивало выбор методов для подтверждения структур.

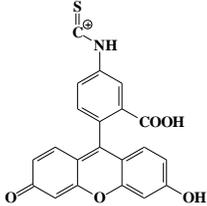
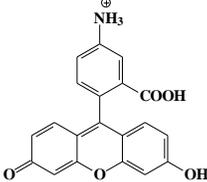
Для идентификации органических соединений в низких концентрациях, в том числе и в составе смесей, мощным инструментом является хромато-масс-спектрометрия. Предварительное хроматографическое разделение позволяет анализировать отдельные компоненты смеси, а масс-спектрометрия позволяет определить молекулярную массу, брутто-формулы соединения и его фрагментов. Полученные данные позволяют установить соответствие между структурами молекул и ионами, образующимися при фрагментации. В данной работе для идентификации синтезированных соединений использовали ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения.

#### 3.1.2.1. ВЭЖХ-МС/МС анализ флуоресцентных меток

Масс-спектры синтезированных флуоресцентных меток первоначально получали в режиме полного ионного сканирования. В режиме регистрации положительно заряженных ионов ЭДФ, (СН<sub>2</sub>)<sub>3</sub>ДФ, (СН<sub>2</sub>)<sub>4</sub>ДФ, (СН<sub>2</sub>)<sub>5</sub>ДФ, (СН<sub>2</sub>)<sub>6</sub>ДФ, (СН<sub>2</sub>)<sub>7</sub>ДФ образовывали однозарядные протонированные молекулы с  $m/z$  450,1124, 464,1280, 478,1431, 492,1588, 506,1750, 520,1901 и двузарядные протонированные молекулы с  $m/z$  225,5605, 232,5679, 239,5758, 246,5836, 253,5914, 260,5992, соответственно. Для получения МС/МС спектров в качестве ионов-предшественников использовали однозарядные ионы. В МС/МС спектрах всех синтезированных меток были

зарегистрированы ионы с  $m/z$  390,0436 и 348,0872. Рассчитанные по точной массе брутто-формулы ионов-продуктов и полученные с помощью программы HighChem Mass Frontier структуры соответствовали фрагментам, полученным в результате распада по C-N связям (таблица 8).

Таблица 8 – Предполагаемые структуры и точные массы фрагментных ионов, полученных в результате МС/МС распада флуоресцентных меток

Теоретическое значение $m/z$ иона-продукта, Да	Брутто-формулы ионов-продуктов	Предполагаемая структура иона-продукта
390,0436	$C_{21}H_{12}O_5NS$	
348,0872	$C_{20}H_{14}O_5N$	
Примечание: здесь и далее теоретическое значение $m/z$ отличалось от измеренного не более, чем на 5 м.д.		

### 3.1.2.2. ВЭЖХ-МС/МС анализ трейсеров

Для всех трейсеров первоначально получали масс-спектры в режиме полного ионного сканирования. В полученных масс-спектрах первого порядка в режиме регистрации положительно заряженных ионов присутствовали сигналы, соответствующие протонированным молекулам трейсеров (таблица 9) – однозарядным и двузарядным. С целью идентификации синтезированных соединений изучали фрагментацию однозарядных ионов. Фрагментацию ионов осуществляли, варьируя энергию столкновений в диапазоне от 10 до 40 эВ. Энергию фрагментации подбирали для получения максимально информативных спектров – содержащих наибольшее число интенсивных пиков ионов-продуктов. Масс-спектры в режиме сканирования и тандемные масс-спектры трейсеров приведены в приложении (рисунок П. 6-34).

При помощи программного обеспечения Xcalibur по точной массе ионов-продуктов рассчитывали их брутто-формулы. Структуры ионов-продуктов получали с помощью программы HighChem Mass Frontier.

Таблица 9 – Значения точных масс для ионов-предшественников и выбранные энергии фрагментации

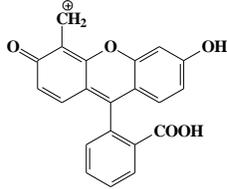
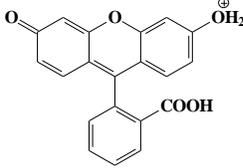
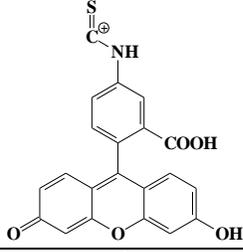
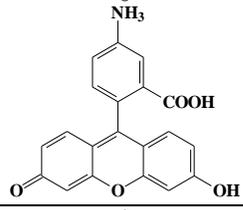
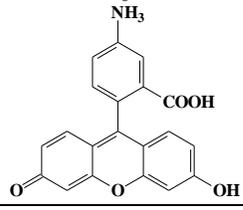
Идентифицируемое соединение	Теоретическое значение m/z иона-предшественника [M+H] <sup>+</sup> , Да	Брутто-формула иона-предшественника [M+H] <sup>+</sup>	Энергия фрагментации, эВ
4-ХФУ-ЭДФ	618,1102	C <sub>31</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S	25
4-ХФУ-АМФ	530,1007	C <sub>29</sub> H <sub>20</sub> ClNO <sub>7</sub>	25
2,4-Д-ЭДФ	652,0712	C <sub>31</sub> H <sub>25</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S	25
2,4-Д-АМФ	564,0617	C <sub>29</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>7</sub>	25
Триаз4С-ЭДФ	802,1883	C <sub>37</sub> H <sub>37</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> PS <sub>2</sub>	25
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> ДФ	816,2034	C <sub>38</sub> H <sub>39</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> PS <sub>2</sub>	25
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ДФ	830,2196	C <sub>39</sub> H <sub>41</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> PS <sub>2</sub>	25
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> ДФ	844,2352	C <sub>40</sub> H <sub>43</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> PS <sub>2</sub>	25
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> ДФ	858,2509	C <sub>41</sub> H <sub>45</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> PS <sub>2</sub>	25
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> ДФ	872,2665	C <sub>42</sub> H <sub>47</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> PS <sub>2</sub>	25
Триаз4С-АМФ	714,1787	C <sub>35</sub> H <sub>33</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> PS	25
КарбС-ЭДФ	733,2332	C <sub>40</sub> H <sub>37</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> S	25
КарбС-(СН <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> ДФ	747,2489	C <sub>41</sub> H <sub>39</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> S	25
КарбС-(СН <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ДФ	761,2645	C <sub>42</sub> H <sub>41</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> S	25
КарбС-(СН <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> ДФ	775,2802	C <sub>43</sub> H <sub>43</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> S	25
КарбС-(СН <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> ДФ	789,2958	C <sub>44</sub> H <sub>45</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> S	25
КарбС-(СН <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> ДФ	803,3115	C <sub>45</sub> H <sub>47</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> S	25
КарбС-АМФ	645,2237	C <sub>38</sub> H <sub>33</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	25
Тбз3С-ЭДФ	705,1590	C <sub>36</sub> H <sub>29</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	35
Тбз6С-ЭДФ	747,2060	C <sub>39</sub> H <sub>35</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	35
Тбз3С-АМФ	617,1495	C <sub>34</sub> H <sub>25</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S	35
Тбз6С-АМФ	659,1964	C <sub>37</sub> H <sub>31</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S	35
Тбз3С-АФ	603,1338	C <sub>33</sub> H <sub>23</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S	35
Тбз6С-АФ	645,1808	C <sub>36</sub> H <sub>29</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S	35
Ткз6С-ЭДФ	817,1978	C <sub>40</sub> H <sub>39</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> S	20
Ткз6С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ДФ	845,2291	C <sub>42</sub> H <sub>43</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> S	20
Ткз6С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> ДФ	873,2604	C <sub>44</sub> H <sub>47</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> S	20
Ткз6С-АМФ	729,1883	C <sub>38</sub> H <sub>35</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	20
Ткз6С-АФ	715,1726	C <sub>37</sub> H <sub>33</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	35

В МС/МС спектрах всех трейсеров присутствовали пики, характерные для соответствующих флуоресцентных фрагментов молекул трейсеров. Пики с m/z 345,0763 и 333,0763 присутствовали в спектрах трейсеров с меткой АМФ, пики с m/z 390,0436 и 348,0872 присутствовали в спектрах трейсеров с диаминофлуоресцеинизотиоцианатными метками, и пик с m/z 348,0872 присутствовал в спектрах трейсеров с меткой АФ. Брутто-формулы и предположительные структуры этих ионов приведены в таблице 10.

В МС/МС спектрах трейсеров 4-ХФУ-ЭДФ, 4-ХФУ-АМФ, 2,4-Д-ЭДФ и 2,4-Д-АМФ присутствовали пики, соответствующие флуоресцентным фрагментам их молекул. Другие пики в

МС/МС спектрах этих трейсеров имели низкие значения относительной интенсивности – менее 1%.

Таблица 10 – Предполагаемые структуры и точные массы фрагментных ионов, соответствующие флуоресцентным меткам в составе молекул трейсеров

Структурный фрагмент молекулы	Предполагаемая структура иона-продукта	Теоретическое значение m/z иона-продукта, Да	Брутто-формулы ионов-продуктов
АМФ		345,0763	C <sub>21</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub>
		333,0763	C <sub>20</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub>
(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> ДФ		390,0436	C <sub>21</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub> NS
		348,0872	C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub> N
АФ		348,0872	C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub> N

Примечание: n – число метиленовых групп – от 2 до 7.

В МС/МС спектрах трейсеров, синтезированных из гаптена Триаз4С, присутствовали пики ионов, соответствующие «мостику» между антигенной и флуоресцентной частями молекул трейсеров, соединенному с флуоресцентной частью молекулы. В спектрах трейсеров, синтезированных на основе диаминофлуоресцеинизотиоцианатных меток, были зарегистрированы также пики, соответствующие «мостику» между антигенной и флуоресцентной частями молекул трейсеров, и пики, соответствующие гаптenu, соединенному с «мостиком» (таблица 11).

Таблица 11 – Предполагаемые структуры и точные массы фрагментных ионов в МС/МС спектрах трейсеров, синтезированных из гаптена Триаз4С

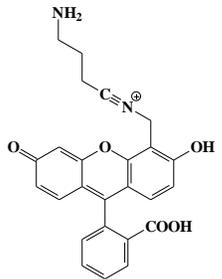
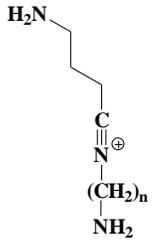
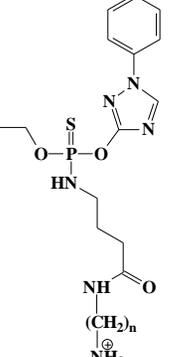
Идентифицируемое соединение	Теоретическое значение m/z иона-продукта, Да	Брутто-формулы ионов-продуктов	Предполагаемая структура иона-продукта
Триаз4С-АМФ	429,1450	$C_{25}H_{21}N_2O_5$	
Триаз4С-ЭДФ	128,1188	$C_6H_{14}N_3$	
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> ДФ	142,1344	$C_7H_{16}N_3$	
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ДФ	156,1501	$C_8H_{18}N_3$	
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> ДФ	170,1657	$C_9H_{20}N_3$	
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> ДФ	184,1814	$C_{10}H_{22}N_3$	
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> ДФ	198,1970	$C_{11}H_{24}N_3$	
Триаз4С-ЭДФ	170,0752	$C_7H_{12}N_3S$	
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> ДФ	184,0908	$C_8H_{14}N_3S$	
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ДФ	198,1065	$C_9H_{16}N_3S$	
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> ДФ	212,1221	$C_{10}H_{18}N_3S$	
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> ДФ	226,1378	$C_{11}H_{20}N_3S$	
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> ДФ	240,1534	$C_{12}H_{22}N_3S$	
Триаз4С-ЭДФ	413,1525	$C_{16}H_{26}N_6O_3PS$	
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> ДФ	427,1681	$C_{17}H_{28}N_6O_3PS$	
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ДФ	441,1838	$C_{18}H_{30}N_6O_3PS$	
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> ДФ	455,1994	$C_{19}H_{32}N_6O_3PS$	
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> ДФ	469,2151	$C_{20}H_{34}N_6O_3PS$	
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> ДФ	483,2307	$C_{21}H_{36}N_6O_3PS$	

Таблица 11 (продолжение) – Предполагаемые структуры и точные массы фрагментных ионов в МС/МС спектрах трейсеров, синтезированных из гаптена Триаз4С

Триаз4С-ЭДФ	517,1546	$C_{27}H_{25}N_4O_5S$	
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> ДФ	531,1702	$C_{28}H_{27}N_4O_5S$	
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ДФ	545,1859	$C_{29}H_{29}N_4O_5S$	
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> ДФ	559,2015	$C_{30}H_{31}N_4O_5S$	
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> ДФ	573,2172	$C_{31}H_{33}N_4O_5S$	
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> ДФ	587,2328	$C_{32}H_{35}N_4O_5S$	

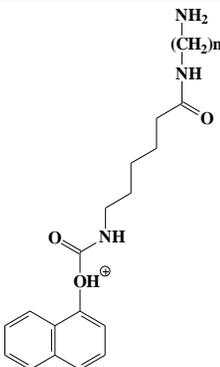
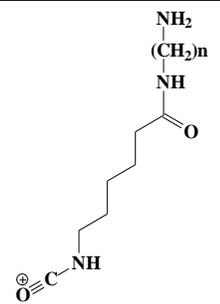
Примечание: n – число метиленовых групп – от 2 до 7.

В МС/МС спектрах трейсеров, синтезированных из гаптена Кар6С, присутствовали пики ионов-продуктов, соответствующие фрагменту «мостика» между антигенной и флуоресцентной частями молекулы и пики, соответствующие «мостику», связанному с антигенной или флуоресцентной частями молекулы (таблица 12).

Таблица 12 – Предполагаемые структуры и точные массы фрагментных ионов в МС/МС спектрах трейсеров, синтезированных из гаптена Кар6С

Идентифицируемое соединение	Теоретическое значение m/z иона-продукта, Да	Брутто-формулы ионов-продуктов	Предполагаемая структура иона-продукта
Кар6С-АМФ	501,1661	$C_{28}H_{25}N_2O_7$	
Кар6С-ЭДФ	589,1757	$C_{30}H_{29}N_4O_7S$	
Кар6С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> ДФ	603,1913	$C_{31}H_{31}N_4O_7S$	
Кар6С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ДФ	617,2070	$C_{32}H_{33}N_4O_7S$	
Кар6С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> ДФ	631,2226	$C_{33}H_{35}N_4O_7S$	
Кар6С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> ДФ	645,2383	$C_{34}H_{37}N_4O_7S$	
Кар6С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> ДФ	659,2539	$C_{35}H_{39}N_4O_7S$	

Таблица 12 (продолжение) – Предполагаемые структуры и точные массы фрагментных ионов в МС/МС спектрах трейсеров, синтезированных из гаптена Кар6С

Идентифицируемое соединение	Теоретическое значение m/z иона-продукта, Да	Брутто-формулы ионов-продуктов	Предполагаемая структура иона-продукта
Кар6С-ЭДФ	344,1974	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	
Кар6С-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> ДФ	358,2131	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	
Кар6С-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ДФ	372,2287	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	
Кар6С-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> ДФ	386,2444	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	
Кар6С-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> ДФ	400,2600	C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	
Кар6С-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> ДФ	414,2757	C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	
Кар6С-ЭДФ	242,0963	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	
Кар6С-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> ДФ	256,1120	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	
Кар6С-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ДФ	270,1276	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	
Кар6С-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> ДФ	284,1433	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	
Кар6С-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> ДФ	298,1589	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	
Кар6С-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> ДФ	312,1746	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	
Кар6С-ЭДФ	200,1399	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	
Кар6С-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> ДФ	214,1556	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	
Кар6С-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ДФ	228,1712	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	
Кар6С-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> ДФ	242,1869	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	
Кар6С-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> ДФ	256,2025	C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	
Кар6С-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> ДФ	270,2182	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	

Примечание: n – число метиленовых групп – от 2 до 7.

В МС/МС спектрах трейсеров, синтезированных из гаптенa Тб3С и Тб3БС, присутствовал интенсивный пик иона-продукта, соответствующий антигенному фрагменту молекул трейсеров (m/z 202,0433). Были получены также пики, соответствующие фрагменту углеродного «мостика» между антигенной и флуоресцентной частями молекулы и пики, соответствующие углеродному «мостикy», связанному с антигенной частью молекул (таблица 13).

Таблица 13 – Предполагаемые структуры и точные массы фрагментных ионов в МС/МС спектрах трейсеров, синтезированных из гаптенон Тб33С и Тб36С

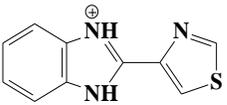
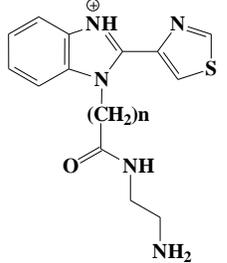
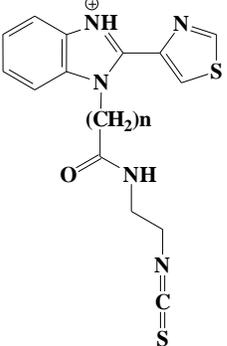
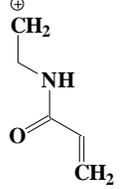
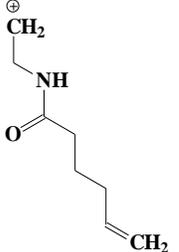
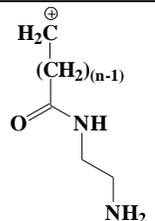
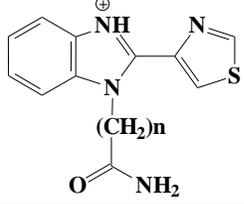
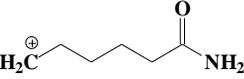
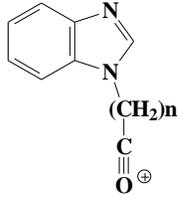
Идентифицируемое соединение	Теоретическое значение m/z иона-продукта, Да	Брутто-формулы ионов-продуктов	Предполагаемая структура иона-продукта
Тб33С-ЭДФ, Тб36С-ЭДФ, Тб33С-АМФ, Тб36С-АМФ, Тб33С-АФ, Тб36С-АФ	202,0439	$C_{10}H_8N_3S$	
Тб33С-ЭДФ	316,1232	$C_{15}H_{18}N_5OS$	
Тб36С-ЭДФ	358,1702	$C_{18}H_{24}N_5OS$	
Тб33С-ЭДФ	358,0796	$C_{16}H_{16}N_5OS_2$	
Тб36С-ЭДФ	400,1266	$C_{19}H_{22}N_5OS_2$	
Тб33С-ЭДФ	98,0606	$C_5H_8NO$	
Тб36С-ЭДФ	140,1075	$C_8H_{14}NO$	
Тб33С-ЭДФ	115,0871	$C_5H_{11}N_2O$	
Тб36С-ЭДФ	157,1341	$C_8H_{17}N_2O$	

Таблица 13 (продолжение) – Предполагаемые структуры и точные массы фрагментных ионов в МС/МС спектрах трейсеров, синтезированных из гаптенот Тбз3С и Тбз6С

Идентифицируемое соединение	Теоретическое значение m/z иона-продукта, Да	Брутто-формулы ионов-продуктов	Предполагаемая структура иона-продукта
Тбз3С-АМФ	273,0810	$C_{13}H_{13}N_4OS$	
Тбз6С-АМФ	315,1280	$C_{16}H_{19}N_4OS$	
Тбз6С-АМФ	114,0919	$C_6H_{12}NO$	
Тбз3С-АФ	256,0545	$C_{13}H_{10}N_3OS$	
Тбз6С-АФ	298,1014	$C_{16}H_{16}N_3OS$	

Примечание: n=2 для трейсеров с гаптенот Тбз3С, n=5 для трейсеров с гаптенот Тбз6С.

В МС/МС спектрах трейсеров, синтезированных из гаптена Ткз6С и диаминофлуоресцеинизотиоцианатных меток, присутствовали пики, соответствующие углеродному «мостику», соединенному с антигенной частью молекулы. В МС/МС спектре трейсера Ткз6С-АМФ присутствовал пик, соответствующий гаптену в составе его молекулы (таблица 14).

Таблица 14 – Предполагаемые структуры и точные массы фрагментных ионов в МС/МС спектрах трейсеров, синтезированных из гаптена Ткз6С

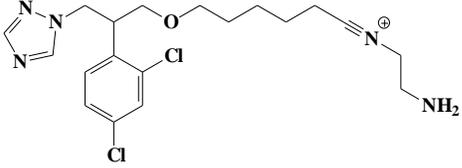
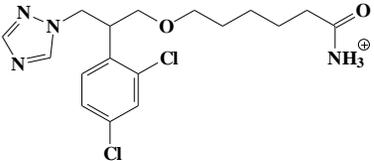
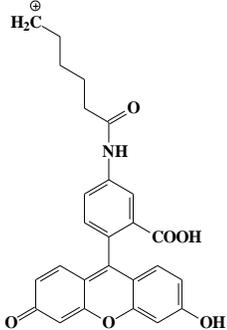
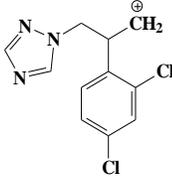
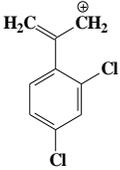
Идентифицируемое соединение	Теоретическое значение m/z иона-продукта, Да	Брутто-формулы ионов-продуктов	Предполагаемая структура иона-продукта
Ткз6С-ЭДФ	410,1514	$C_{19}H_{26}Cl_2N_5O$	
Ткз6С-ЭДФ	428,1620	$C_{19}H_{28}Cl_2N_5O_2$	
Ткз6С-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ДФ	456,1933	$C_{21}H_{32}Cl_2N_5O_2$	
Ткз6С-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> ДФ	484,2246	$C_{23}H_{36}Cl_2N_5O_2$	

Таблица 14 (продолжение) – Предполагаемые структуры и точные массы фрагментных ионов в МС/МС спектрах трейсеров, синтезированных из гаптена Ткз6С

Идентифицируемое соединение	Теоретическое значение m/z иона-продукта, Да	Брутто-формулы ионов-продуктов	Предполагаемая структура иона-продукта
Ткз6С-АМФ	385,1198	$C_{17}H_{23}Cl_2N_4O_2$	
Ткз6С-АФ	444,1447	$C_{26}H_{22}NO_6$	
Ткз6С-АФ	254,0252	$C_{11}H_{10}Cl_2N_3$	
Ткз6С-АФ	184,9925	$C_9H_7Cl_2$	

Примечание: n – число метиленовых групп – составляет 2, 4, 6 для Ткз6С-ЭДФ, Ткз6С-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>ДФ, Ткз6С-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>ДФ, соответственно.

Таким образом, использование хроматографического разделения позволило получить масс-спектры отдельных компонентов реакционных смесей, а при помощи масс-спектрометрии высокого разрешения был установлен элементный состав синтезированных соединений и фрагментных ионов. При помощи тандемной масс-спектрометрии были получены данные о структурных фрагментах молекул синтезированных соединений. Полученные данные подтверждают успешность синтеза и структуры флуоресцентных меток и трейсеров, синтезированных в ходе данной работы.

## 3.2. Оптимизация ПФИА

### 3.2.1. Определение оптимальных концентраций иммунореагентов

При оптимизации ПФИА на первом этапе подбирают концентрации иммунореагентов - трейсеров и антител. Концентрации иммунореагентов должны быть достаточными, чтобы обеспечивать при проведении анализа необходимый перепад аналитического сигнала, а их соотношение должно обеспечивать наилучшую чувствительность анализа.

При приготовлении растворов трейсеров наиболее удобным подходом является оценка их концентрации по интенсивности флуоресценции. Интенсивность флуоресценции рабочих растворов трейсеров определяли следующим образом. Разбавляли 1 мкл метанольного раствора трейсера в 1 мл боратного буферного раствора. Из полученного раствора готовили серию растворов, имеющих разведение 1 : 2000, 1 : 4000, 1 : 8000, 1 : 16000, 1 : 32000, 1 : 64000, 1 : 128000, 1 : 256000, 1 : 512000 по отношению к метанольному раствору. По 1 мл каждого из полученных растворов анализировали на приборе Sentry 200, регистрируя интенсивность и поляризацию флуоресценции. Поляризация флуоресценции растворов трейсера остается на одном уровне в интервале концентраций, соответствующем интенсивностям флуоресценции от максимальной из зарегистрированных до  $2,0 \times 10^5$  отн. ед., после чего резко падает. Для достижения наилучшей чувствительности анализа выбирали минимальную концентрацию трейсера внутри интервала стабильного сигнала поляризации флуоресценции. Поэтому за интенсивность рабочего раствора трейсера, учитывая его последующее двукратное разбавление при проведении ПФИА, принимали  $(4,0 \pm 0,2) \times 10^5$  отн. ед. Рабочая концентрация трейсеров в пересчете на флуоресцеин составляла 5 нМ.

Концентрации антител для получения градуировочных графиков выбирали внутри линейного диапазона кривой титрования таким образом, чтобы обеспечить достаточный перепад сигнала поляризации флуоресценции при наименьшей концентрации антител для достижения наилучшей чувствительности. Чтобы провести сравнение трейсеров в равных условиях, для каждого трейсера выбирали концентрацию антител, позволяющую получить определенное значение перепада сигнала поляризации флуоресценции. Это значение составляло 70-90 мР, поскольку стандартные отклонения для значений мР в нашем эксперименте составляли в среднем от 0,8 до 2,5 мР, что при диапазоне значений аналитического сигнала 70-90 мР составляет менее 5%.

### 3.2.2. Выбор иммунореагентов

В основе ПФИА лежит конкуренция между антигеном и меченым флуоресцентной меткой антигеном – трейсером – за ограниченное число центров связывания антител. Для оптимизации наиболее чувствительного ПФИА необходимо подобрать такую пару трейсер–антитела, в которой трейсер хорошо связывается с антителами и легко вытесняется из этой связи анализом. Антитела, используемые в анализе низкомолекулярных соединений, а в частности пестицидов, получают против иммуногенов, представляющих собой конъюгаты белка с анализируемым соединением или его производным. При этом гаптен в составе иммуногена может являться самим анализом или его производным с необходимой для синтеза конъюгата функциональной группой – в этом случае говорят о гомологичном иммуногене, или может отличаться от анализа по структуре – в этом случае говорят о гетерологичном иммуногене. Как правило, высокоаффинные антитела удается получить, используя именно гомологичные иммуногены [195]. Что касается выбора между моноклональными и поликлональными антителами, то, хотя и возможно получить высокоаффинные антитела обоих типов, предпочтение отдается моноклональным антителам. Моноклональные антитела однородны по молекулярным свойствам и не содержат низкоаффинных фракций, что важно при разработке иммунохимических методик анализа для сложных матриц. Структуру трейсера можно варьировать несколькими способами: выбирая для синтеза различные флуоресцентные метки, изменяя структуру фрагмента, сшивающего антигенную и флуоресцентную части молекулы, а также используя в синтезе анализ или родственные ему по структуре соединения. В данной работе для анализа всех веществ использовали моноклональные антитела, полученные при иммунизации гомологичными иммуногенами; при подборе трейсеров были реализованы перечисленные выше подходы.

#### 3.2.2.1. ПФИА 2,4-Д

Для оптимизации ПФИА 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты использовали моноклональные антитела Р6/С10. В соответствии с информацией, предоставленной коллегами из Института Ветеринарии, антитела были получены против гомологичного иммуногена 2,4-Д-БСА, синтезированного по методу смешанных ангидридов.

Ранее уже были проведены исследования по подбору трейсеров для ПФИА 2,4-Д [195]. Для синтеза трейсеров использовались 2,4-Д и ее производные (4-хлор-2-метилфеноксиуксусная кислота, 2,4-дибромфеноксиуксусная кислота, 2,5-дихлорфеноксиуксусная кислота, 2,4-диметилфеноксиуксусная кислота), флуоресцентные метки ЭДФ,  $(\text{CH}_2)_6\text{ДФ}$ , АФ, лизин-ФИТЦ,

карбоксихлорофлуоресцеин). Представляло интерес применить для анализа новые иммуореагенты – трейсеры, для синтеза которых использовали 4-хлорфеноксиуксусную кислоту и АМФ, а также новые антитела клона Р6/С10, и оценить аналитические характеристики полученных тест-систем.

В данной работе для ПФИА 2,4-Д были получены трейсеры 2,4-Д-ЭДФ, 2,4-Д-АМФ, 4-ХФУ-ЭДФ, 4-ХФУ-АМФ. Кривые титрования антител (рисунок 11, а) и градуировочные графики (рисунок 11, б) для каждой пары трейсер-антитела получали, как описано в п. 2.2.2. Трейсер 4-ХФУ-АМФ обладает низкой способностью связываться с антителами и не может быть использован для ПФИА 2,4-Д. Для трейсеров, обладающих способностью связываться с антителами, строили градуировочные графики, рассчитывая рабочую концентрацию антител из кривых титрования, как описано в п. 3.2.1.

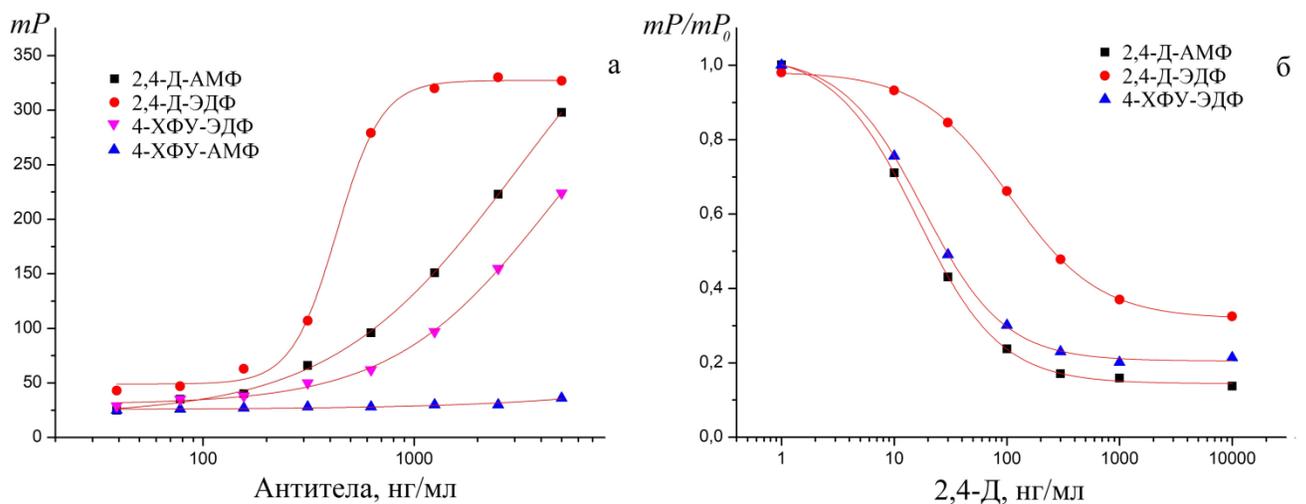


Рисунок 11 – Кривые титрования антител (а) и градуировочные графики (б) с трейсерами 2,4-Д-АМФ, 2,4-Д-ЭДФ, 4-ХФУ-ЭДФ, 4-ХФУ-АМФ

Трейсер 2,4-Д-ЭДФ обладает высокой способностью связываться с антителами, но плохо вытесняется 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой из этой связи, из-за чего соответствующая методика имеет низкую чувствительность. У 4-ХФУ-ЭДФ и 2,4-Д-АМФ наблюдается худшее связывание с антителами, чем у 2,4-Д-ЭДФ, а методики определения 2,4-Д с использованием этих трейсеров будут характеризоваться наилучшей чувствительностью (таблица 15). Для анализа 2,4-Д методом ПФИА более целесообразно выбрать трейсер 2,4-Д-АМФ, так как его использование позволит уменьшить расход антител – наиболее дорогого реагента в иммунохимических методах анализа.

В оптимизированных условиях анализировали стандартные растворы 2,4-Д и строили градуировочный график в широком диапазоне концентраций (рисунок 12, а) и в диапазоне концентраций линейного отрезка кривой (рисунок 12, б), проводя для каждой концентрации 3

параллельных измерения. Предел обнаружения, рассчитанный по методу 20 нулевых стандартов, составил 3 нг/мл, диапазон определяемых концентраций в стандартных растворах составил от 5 до 60 нг/мл.

Таблица 15 – Характеристики ПФИА 2,4-Д при использовании различных трейсеров

Трейсер	Титр антител, нг/мл	Рабочая концентрация антител, нг/мл	Диапазон определяемых концентраций, нг/мл
2,4-Д-ЭДФ	430	360	30 – 390
2,4-Д-АМФ	3000	900	5,0 – 60
4-ХФУ-ЭДФ	4300	1700	5,7 – 59
4-ХФУ-4-АМФ	Нет связывания		

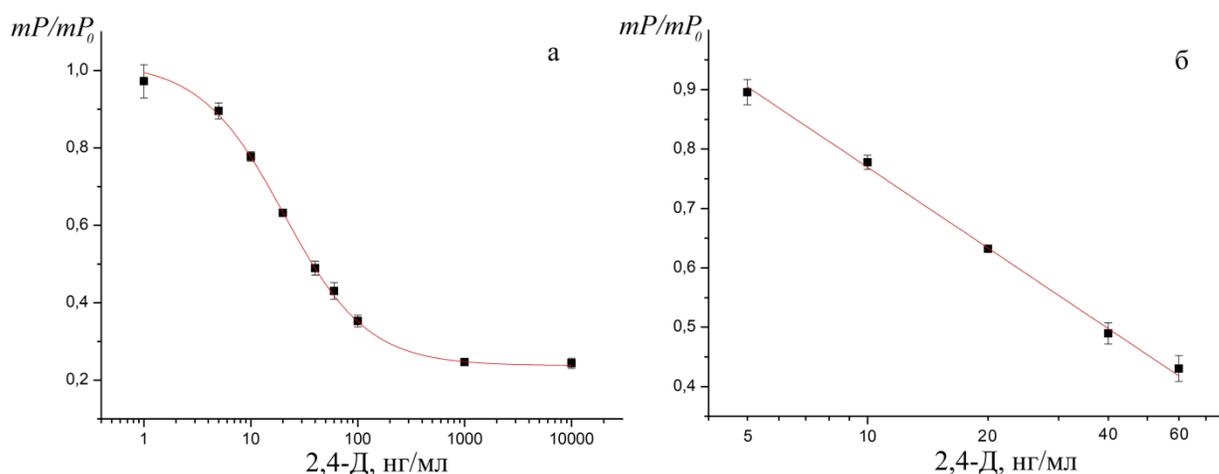


Рисунок 12 – Градуировочный график ПФИА 2,4-Д в стандартных образцах (n=3)

Уравнение градуировочной зависимости в линейном диапазоне имеет вид:

$$mP/mP_0 = (1,22 \pm 0,02) - (0,45 \pm 0,01) \lg c, \quad R^2 = 0,996, \quad P = 0,95, \quad n = 3,$$

где  $mP$  – поляризация флуоресценции анализируемого образца,  $mP_0$  – поляризация флуоресценции нулевого стандартного раствора,  $c$  – концентрация 2,4-Д, нг/мл.

ПФИА, оптимизированный с антителами клона E2/G2 [195], по чувствительности превосходит ПФИА, оптимизированный с антителами впервые исследуемого клона P6/C10. Диапазон определяемых концентраций ПФИА при использовании трейсера 2,4-Д-ЭДФ и антител клона E2/G2 составлял от 1 до 500 нг/мл, а при использовании трейсера 2,4-Д-ЭДФ и антител клона P6/C10 от 30 до 390 нг/мл. Тем не менее, в оптимизированных условиях с антителами клона P6/C10 возможна разработка методик определения 2,4-Д в реальных образцах на уровнях, сопоставимых с существующими МДУ.

### 3.2.2.2. ПФИА триазофоса

Молекула триазофоса не содержит функциональных групп для сшивки с белком или флуоресцентной меткой, поэтому в качестве гаптена при синтезе иммуногена и трейсера использовали производное триазофоса Триаз4С (рисунок 10), в котором одна из гидроксиэтильных групп замещена на  $\gamma$ -аминомасляную кислоту. Антитела для ПФИА триазофоса были получены нашими коллегами из Китайского Института Пестицидов и Экологической Токсикологии против иммуногена Триаз4С-БСА, синтезированного методом активированных эфиров [196].

Первоначально для ПФИА триазофоса синтезировали 2 трейсера – Триаз4С-ЭДФ и Триаз4С-АМФ; для каждого из них получили кривую титрования и градуировочный график (рисунок 13).

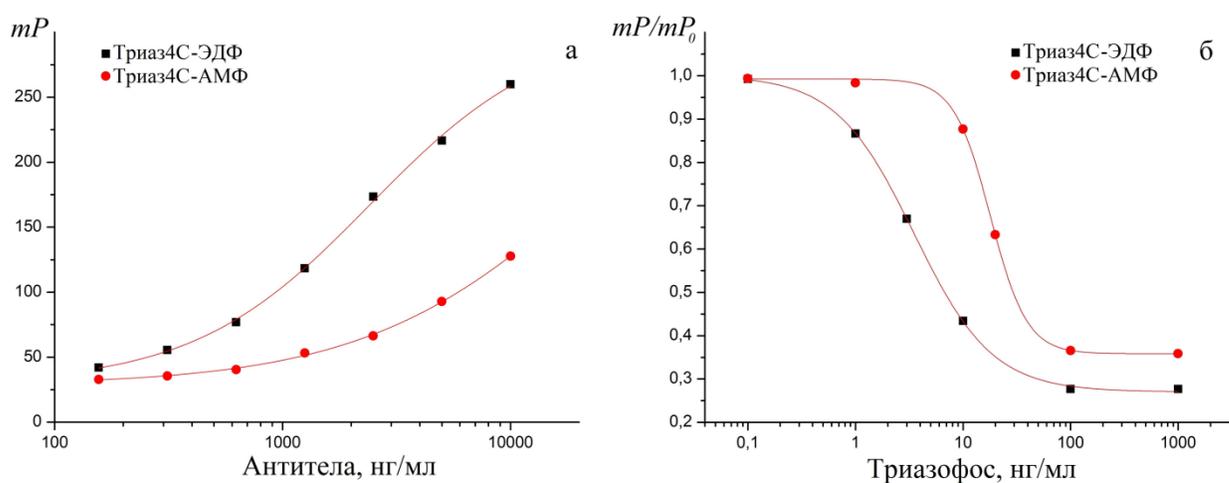


Рисунок 13 – Кривые титрования антител (а) и градуировочные графики (б) с трейсерами Триаз4С-ЭДФ и Триаз4С-АМФ

Трейсер Триаз4С-ЭДФ связывается с антителами лучше, чем Триаз4С-АМФ (рисунок 13, а). Чувствительность ПФИА при использовании трейсера Триаз4С-ЭДФ также значительно лучше – нижняя граница диапазона определяемых концентраций при использовании Триаз4С-ЭДФ на порядок ниже, чем при использовании Триаз4С-АМФ (таблица 16).

Таблица 16 – Характеристики ПФИА триазофоса при использовании трейсеров Триаз4С-ЭДФ и Триаз4С-АМФ

Трейсер	Титр антител, нг/мл	Рабочая концентрация антител, нг/мл	Диапазон определяемых концентраций, нг/мл
Триаз4С-ЭДФ	2500	1350	1,1 – 12
Триаз4С-АМФ	25000	6300	11 – 31

Метка ЭДФ содержит в своей структуре флуоресцентный фрагмент (ФИТЦ) и этилендиамин – мостик, соединяющий гаптен с флуоресцентным фрагментом молекулы. В ходе данной работы структуру лучшего из трейсеров – Триаз4С-ЭДФ – варьировали, изменяя длину углеродной цепи «мостика», и оценивали чувствительность методик при использовании таких трейсеров. Были синтезированы трейсеры, длина углеродного «мостика» у которых составляла от 2 до 7. С этими трейсерами были получены градуировочные графики (рисунок 14), как описано в п. 2.2.2.2. Концентрацию антител подбирали таким образом, чтобы перепад сигнала поляризации флуоресценции был одинаковый и составлял около 70 мР.

Показано, что чувствительность разрабатываемых методик в случае использования каждого из трейсеров, содержащих в структуре флуоресцентную метку «диамин-ФИТЦ», приблизительно одинакова (таблица 17). Выделение трейсеров с длиной «мостика» более 2 метиленовых групп из реакционных смесей затруднено, так как на стадии синтеза соответствующих меток для этих трейсеров метки в осадок не выпадают. Как следствие, конечный продукт синтеза – трейсер – находится в реакционной смеси с большим количеством примесных соединений, которые трудно отделяются при очистке. В связи с этим, для дальнейших экспериментов выбрали трейсер с меткой ЭДФ.

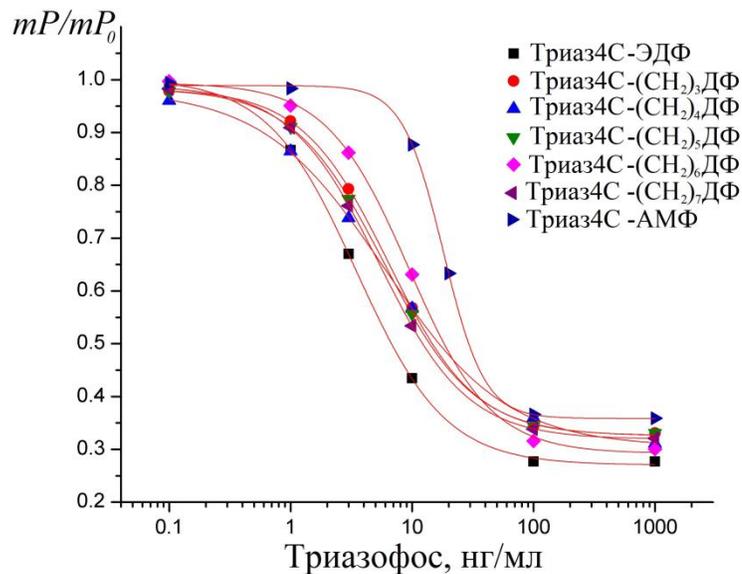


Рисунок 14 – Градуировочные графики ПФИА триазофоса с различными трейсерами

Таблица 17 – Характеристики ПФИА триазофоса при использовании различных трейсеров

Трейсер	Рабочая концентрация антител, нг/мл	Диапазон определяемых концентраций, нг/мл
Триаз4С-АМФ	6300	11 – 31
Триаз4С-ЭДФ	1350	1,3 – 12
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> ДФ	3300	1,7 – 20
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ДФ	2200	1,5 – 26
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> ДФ	2800	1,7 – 20
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> ДФ	2800	3,1 – 28
Триаз4С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> ДФ	2000	1,6 – 18

Равновесие в системе из трейсера, антител к триазофосу и триазофоса устанавливается во времени. Для определения оптимального времени инкубации исследовали кинетику образования комплекса антитела-трейсер в присутствии аналита – триазофоса – в нескольких концентрациях. Интервал между измерениями составлял 1 мин. Сигнал поляризации флуоресценции при ПФИА триазофоса становился стабильным в течение 10 мин (рисунок 15).

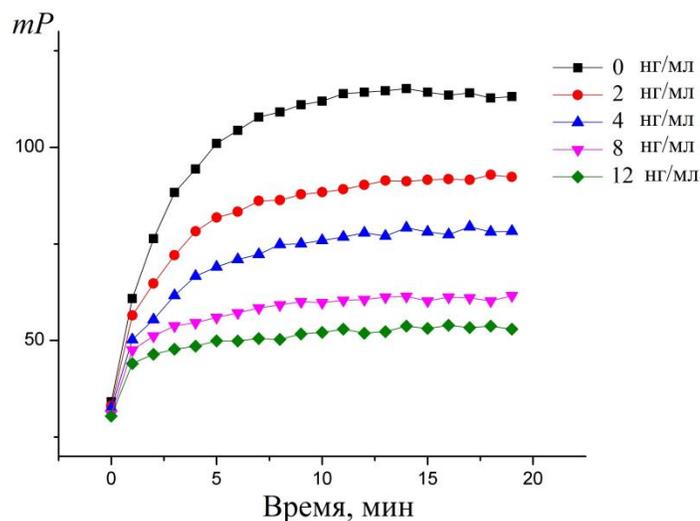


Рисунок 15 – Кинетические кривые реакции взаимодействия трейсера Триаз4С-ЭДФ и антител анти-Триаз4С 0А1-8С10 в присутствии триазофоса

Градуировочный график, полученный по данным анализа стандартных растворов триазофоса в оптимизированных условиях, представлен на рисунке 16. Диапазон определяемых концентраций составил от 1,3 до 12 нг/мл, предел обнаружения составил 1 нг/мл. Уравнение градуировочной зависимости в линейном диапазоне имеет вид:

$$mP/mP_0 = (0,88 \pm 0,01) - (0,45 \pm 0,02) \lg c, R^2 = 0,995, P = 0,95, n = 3.$$

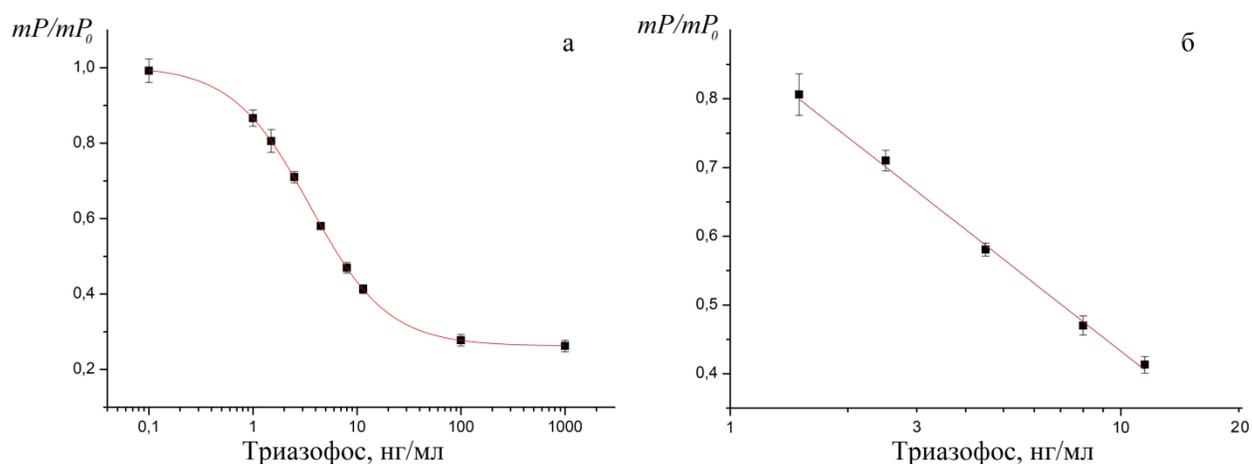


Рисунок 16 – Градуировочный график ПФИА триазофоса в стандартных образцах в широком диапазоне концентраций (а) и в диапазоне концентраций линейного отрезка кривой (б)

### 3.2.2.3. ПФИА карбарила

В соответствии с данными, предоставленными нашими коллегами из Китайского Научно-Исследовательского Института Масличных Культур, антитела против карбарила получали, используя иммуноген КарбС-БСА, синтезированный методом активированных эфиров. Гаптен КарбС – производное карбарила, в котором на место аминотильной группы присоединена 6-аминогексановая кислота (рисунок 10). Гаптен КарбС использовали также для синтеза трейсеров в данной работе.

Для ПФИА карбарила первоначально синтезировали 2 трейсера – с метками ЭДФ и АМФ. С этими трейсерами были получены кривые титрования антител и градуировочные графики (рисунок 17).

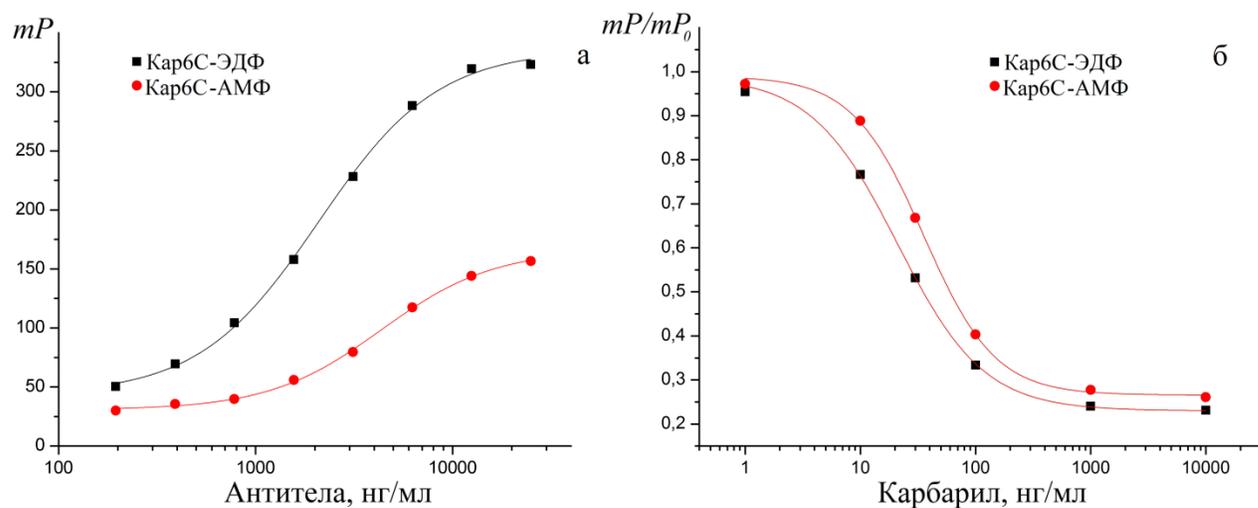


Рисунок 17 – Кривые титрования антител (а) и градуировочные графики (б) с трейсерами КарбС-ЭДФ и КарбС-АМФ

Рассчитанные параметры кривых ПФИА приведены в таблице 18. Использование трейсера КарбС-ЭДФ позволяет получить лишь небольшое преимущество по чувствительности, однако, этот трейсер значительно лучше связывается с антителами. Использование трейсера КарбС-ЭДФ делает возможным уменьшение расхода антител, что на практике будет выражаться в снижении стоимости анализа.

Таблица 18 – Характеристики ПФИА карбарила при использовании трейсеров КарбС-ЭДФ и КарбС-АМФ

Трейсер	Титр антител, нг/мл	Рабочая концентрация антител, нг/мл	Диапазон определяемых концентраций, нг/мл
КарбС-ЭДФ	2100	1000	6,3 – 69
КарбС-АМФ	4500	5500	13 – 95

Структуру трейсера КарбС-ЭДФ варьировали аналогично тому, как это было сделано для трейсеров с гаптенем ТриаЗ4С – изменяя длину углеродной цепи диаминоалкана в структуре молекулы трейсера. Были получены трейсеры, содержащие от 2 до 7 метиленовых групп в диаминоалкановом «мостике» между гаптенем и флуоресцентным фрагментом молекулы. Для всех трейсеров были получены градуировочные графики (рисунок 18) аналогично тому, как описано выше для трейсеров с гаптенем ТриаЗ4С. Границы диапазона определяемых концентраций, рассчитанные для каждой пары трейсер-антитела (таблица 19), различались незначительно, то есть, методики с использованием данных трейсеров будут характеризоваться приблизительно равной чувствительностью. Поскольку выделение из реакционной смеси меток с длиной углеродной цепи «мостика» более 2 метиленовых групп затруднено, для дальнейших исследований использовали трейсер с меткой ЭДФ.

Таблица 19 – Характеристики ПФИА карбарила при использовании различных трейсеров

Трейсер	Рабочая концентрация антител, нг/мл	Диапазон определяемых концентраций, нг/мл
КарбС-АМФ	5500	13 – 97
КарбС-ЭДФ	1000	7,0 – 82
КарбС-(СН <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> ДФ	8300	11 – 99
КарбС-(СН <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ДФ	2300	8,0 – 84
КарбС-(СН <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> ДФ	6300	6,8 – 99
КарбС-(СН <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> ДФ	2000	7,2 – 77
КарбС-(СН <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> ДФ	1700	11 – 91

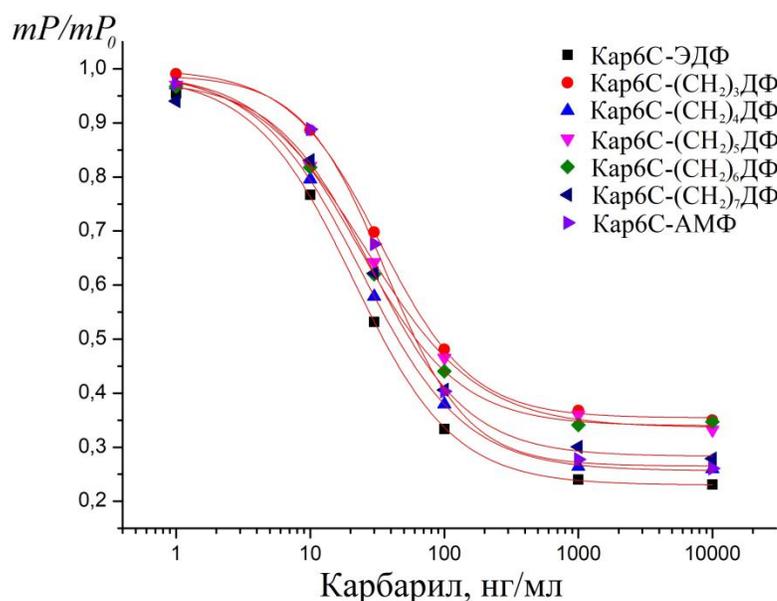


Рисунок 18 – Градуировочные графики ПФИА карбарила с различными трейсерами

Равновесие в системе из трейсера, антител к карбарилу и карбарила устанавливается во времени. Оптимальное время инкубации определяли аналогично тому, как это было сделано для ПФИА триазофоса (рисунок 19). Интервал между измерениями составлял 3 мин в течение первых 30 мин, далее – 5 мин. Сигнал поляризации флуоресценции при ПФИА карбарила становился стабильным в течение 45 мин.

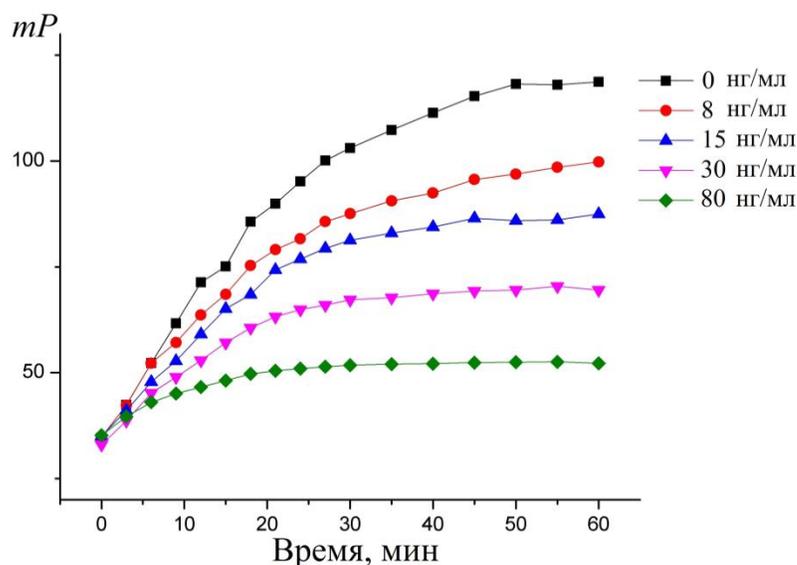


Рисунок 19 – Кинетические кривые реакции взаимодействия трейсера КарбС-ЭДФ и антител анти-КарбС 1В7 в присутствии карбарила

По данным анализа стандартных растворов карбарила в оптимизированных условиях был получен градуировочный график (рисунок 20). Диапазон определяемых концентраций составил

от 7 до 69 нг/мл, предел обнаружения составил 3 нг/мл. Уравнение градуировочной зависимости в линейном диапазоне имеет вид:

$$mP/mP_0 = (1,21 \pm 0,02) - (0,46 \pm 0,01) \lg c, R^2 = 0,996, P = 0,95, n = 3.$$

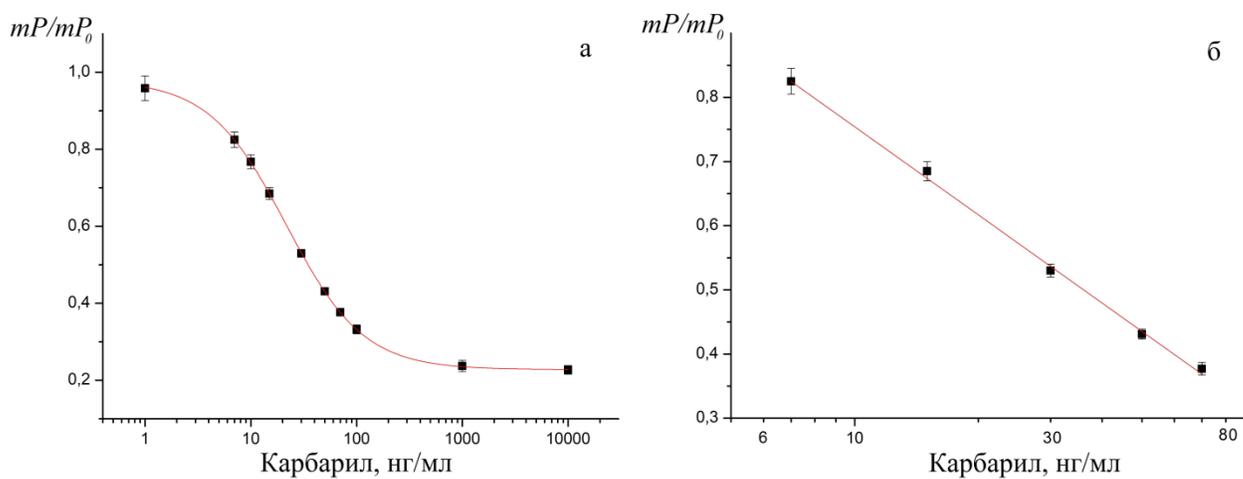


Рисунок 20 – Градуировочный график ПФИА карбарила в стандартных образцах в широком диапазоне концентраций (а) и в диапазоне концентраций линейного отрезка кривой (б)

### 3.2.2.4. ПФИА тиабендазола

Для оптимизации ПФИА тиабендазола применяли моноклональные антитела, полученные с использованием синтезированного методом активированных эфиров иммуногена Тбз3С-БСА [122]. Гаптен Тбз3С – тиабендазол с привитой пропановой кислотой – и его гомолог Тбз6С – тиабендазол с привитой гексановой кислотой – использовали для синтеза трейсеров (рисунок 10).

В качестве флуоресцентных меток для синтеза трейсеров использовали АФ, АМФ и ЭДФ. С синтезированными трейсерами получали кривые титрования и градуировочные графики (рисунок 21).

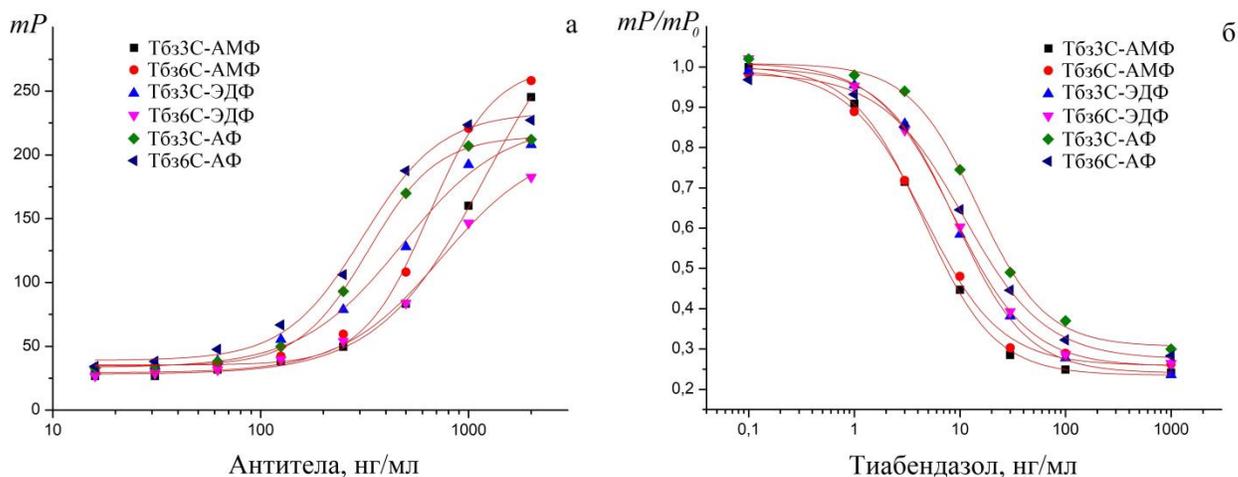


Рисунок 21 – Кривые титрования антител (а) и градуировочные графики (б) с трейсерами Тбз3С-АМФ и Тбз6С-АМФ, Тбз3С-ЭДФ и Тбз6С-ЭДФ, Тбз3С-АФ и Тбз6С-АФ

Методики определения тиабендазола, в которых используются трейсеры с одной и той же флуоресцентной меткой и гаптенами с разной длиной углеродной цепи привитой карбоновой кислоты, характеризуются одинаковой чувствительностью. Кроме того, диапазоны определяемых концентраций для всех трейсеров различаются незначительно, то есть, чувствительность методик определения тиабендазола с использованием синтезированных трейсеров будет близкой (таблица 20). Небольшое преимущество по чувствительности дает использование трейсеров с меткой АМФ, при этом использование трейсера Тбз6С-АМФ позволяет уменьшить расход антител и за счет этого удешевить анализ, поэтому его использовали для дальнейших экспериментов.

Таблица 20 – Характеристики ПФИА тиабендазола при использовании трейсеров Тбз3С-АМФ и Тбз6С-АМФ, Тбз3С-ЭДФ и Тбз6С-ЭДФ, Тбз3С-АФ и Тбз6С-АФ

Трейсер	Титр антител, нг/мл	Рабочая концентрация антител, нг/мл	Диапазон определяемых концентраций, нг/мл
Тбз3С-АМФ	1250	670	1,4 – 14
Тбз6С-АМФ	650	500	1,4 – 16
Тбз3С-ЭДФ	480	400	2,9 – 26
Тбз6С-ЭДФ	740	670	2,8 – 27
Тбз3С-АФ	330	280	4,5 – 60
Тбз6С-АФ	310	250	3,0 – 38

Градуировочный график, построенный по результатам анализа стандартных растворов тиабендазола в оптимизированных условиях, представлен на рисунке 22. Диапазон определяемых концентраций составил от 1,5 до 16 нг/мл, предел обнаружения составил 1 нг/мл. Уравнение градуировочной зависимости в линейном диапазоне имеет вид:

$$mP/mP_0 = (0,91 \pm 0,01) - (0,42 \pm 0,01) \lg c, R^2 = 0,996, P = 0,95, n = 3.$$

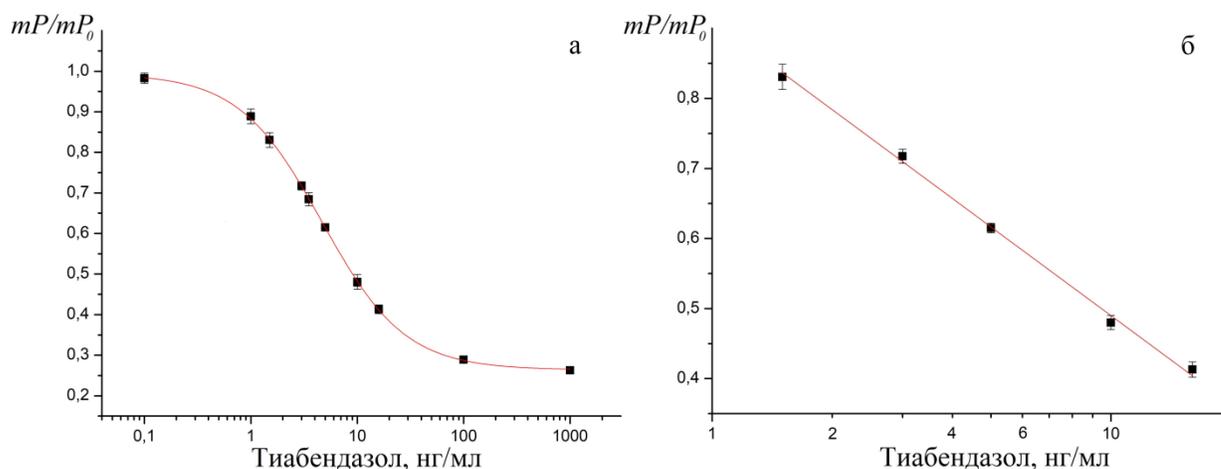


Рисунок 22 – Градуировочный график ПФИА тиабендазола в стандартных образцах в широком диапазоне концентраций (а) и в диапазоне концентраций линейного отрезка кривой (б)

### 3.2.2.5. ПФИА тетраконазола

Антитела для оптимизации ПФИА тетраконазола были получены против иммуногена Ткз6С-БСА, синтезированного методом активированных эфиров [125]. Гаптен Ткз6С – производное тетраконазола, содержащее концевую карбоксильную группу – в данной работе использовали для синтеза трейсеров (рисунок 10).

В качестве флуоресцентных меток для синтеза трейсеров использовали АМФ, ЭДФ,  $(\text{CH}_2)_4\text{ДФ}$ ,  $(\text{CH}_2)_6\text{ДФ}$  и АФ. С синтезированными трейсерами получали кривые титрования антител и градуировочные графики (рисунок 23). По графику с кривыми титрования (рисунок 23, а) видно, что Ткз6С-АФ связывается с антителами хуже других трейсеров. Более того, разница между максимальным и минимальным значениями поляризации флуоресценции для Ткз6С-АФ очень мала – около 60 мР. Для трейсеров Ткз6С-АМФ, Ткз6С-ЭДФ, Ткз6С- $(\text{CH}_2)_4\text{ДФ}$  и Ткз6С- $(\text{CH}_2)_6\text{ДФ}$  эта разница составляла, соответственно, 130, 100, 70 и 90 мР. График с трейсером Ткз6С-АМФ получили, используя антитела в концентрации 1000 нг/мл, чтобы получить перепад сигнала поляризации флуоресценции около 70-80 мР. Остальные трейсеры связываются с антителами заметно хуже, поэтому не представлялось возможным стандартизовать условия сравнения методик с использованием различных трейсеров, выбирая для всех один и тот же диапазон значений поляризации флуоресценции. Поэтому условия стандартизовали, выбрав для всех одну и ту же концентрацию антител. Для сравнения Ткз6С-АМФ с другими трейсерами с ними строили графики, также используя антитела в концентрации 1000 нг/мл. Для наглядности градуировочные графики приведены в координатах «логарифм концентрации – мР» (рисунок 23, б).

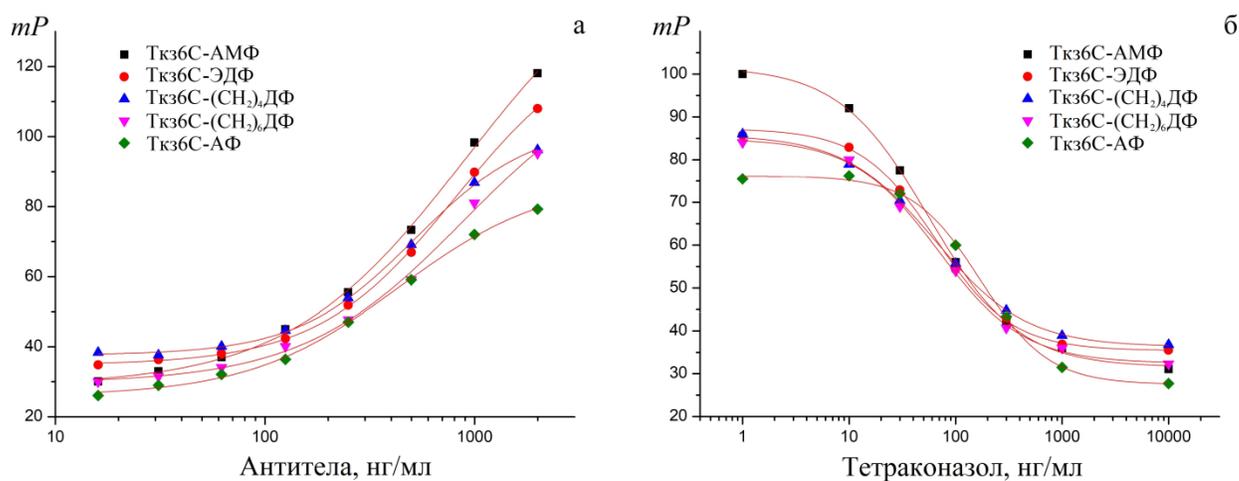


Рисунок 23 – Кривые титрования антител (а) и градуировочные графики (б) с трейсерами Ткз6С-АМФ, Ткз6С-ЭДФ, Ткз6С- $(\text{CH}_2)_4\text{ДФ}$ , Ткз6С- $(\text{CH}_2)_6\text{ДФ}$  и Ткз6С-АФ

Показано, что при использовании Ткз6С-АМФ, Ткз6С-ЭДФ, Ткз6С-(СН<sub>2</sub>)<sub>4</sub>ДФ и Ткз6С-(СН<sub>2</sub>)<sub>6</sub>ДФ чувствительность разрабатываемых методик приблизительно равная (таблица 21). Однако использование антител в концентрации 1000 нг/мл и трейсера Ткз6С-АМФ позволяет работать в диапазоне значений от 30 до 100 мР ( $\Delta mP = 70$ ), тогда как при использовании других трейсеров с антителами в той же концентрации этот диапазон сужается до 40-50 мР, поэтому Ткз6С-АМФ выбрали для дальнейших исследований.

Таблица 21 – Характеристики ПФИА тетраконазола при использовании трейсеров Ткз6С-АМФ, Ткз6С-ЭДФ, Ткз6С-(СН<sub>2</sub>)<sub>4</sub>ДФ, Ткз6С-(СН<sub>2</sub>)<sub>6</sub>ДФ и Ткз6С-АФ

Трейсер	Титр антител, нг/мл	Рабочая концентрация антител, нг/мл	Диапазон определяемых концентраций, нг/мл
Ткз6С-АМФ	910	1000	16 – 210
Ткз6С-ЭДФ	800	1000	22 – 180
Ткз6С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ДФ	530	1000	16 – 250
Ткз6С-(СН <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> ДФ	910	1000	22 – 250
Ткз6С-АФ	430	1000	62 – 440

Градуировочный график, построенный по результатам анализа стандартных растворов тиабендазола в оптимизированных условиях, представлен на рисунок 24. Диапазон определяемых концентраций составил от 16 до 210 нг/мл, предел обнаружения составил 10 нг/мл. Уравнение градуировочной зависимости в линейном диапазоне имеет вид:

$$mP/mP_0 = (1,32 \pm 0,02) - (0,37 \pm 0,01) \lg c, R^2 = 0,998, P = 0,95, n = 3.$$

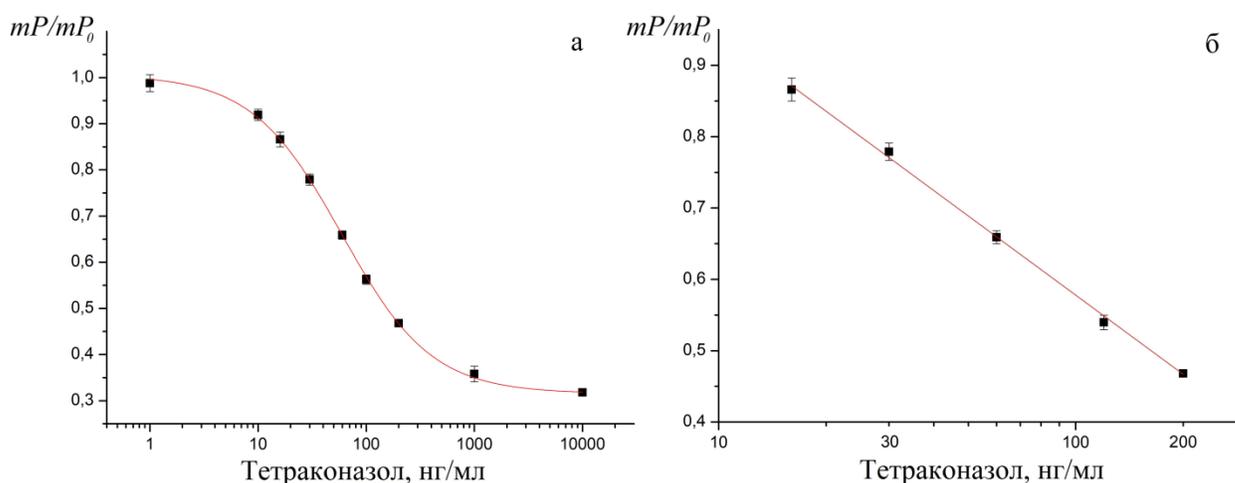


Рисунок 24 – Градуировочный график ПФИА тетраконазола в стандартных образцах в широком диапазоне концентраций (а) и в диапазоне концентраций линейного отрезка кривой (б)

В настоящей главе описана оптимизация ПФИА 5 пестицидов. Определены оптимальные условия анализа: концентрации иммунореагентов и необходимое время инкубации тест-систем из трейсера, аналита и антител. В случае тест-систем для анализа 2,4-Д, тиабендазола и тетраконазола равновесие устанавливается в первые секунды, в случае анализа триазофоса равновесие устанавливается в течение 10 мин, в случае анализа карбарила – в течение 45 мин. Выбраны трейсеры, использование которых позволяет достичь наилучшей чувствительности анализа, минимизировать затраты реагентов и увеличить рабочий диапазон значений аналитического сигнала: 2,4-Д-АМФ для анализа 2,4-Д, Триаз4С-ЭДФ для анализа триазофоса, КарбС-ЭДФ для анализа карбарила, Тбз3С-АМФ для анализа тиабендазола и Ткз6С-АМФ для анализа тетраконазола.

### **3.2.3. Специфичность определения аналитов методом ПФИА**

При разработке иммунохимических методик необходимо проводить оценку специфичности используемых антител, поскольку реальный образец может содержать другие пестициды того же класса, что и определяемое соединение. Специфичность определения каждого из пестицидов оценивали по проценту перекрестного реагирования с веществами, родственными аналитам по структуре (п. 2.2.2.4).

#### **3.2.3.1. Специфичность определения 2,4-Д**

Специфичность определения 2,4-Д оценивали по проценту перекрестного реагирования с арилоксиалканкарбоновыми кислотами и хлорпроизводными фенола (таблица 22). Высокий процент перекрестного реагирования (31%) характерен для 2,4-дихлор-5-фторфеноксиуксусной кислоты, что можно объяснить тем, что у радиусов атомов водорода и фтора близкие значения. С 2-хлор-4-фторфеноксиуксусной кислотой и 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4,5-Т) процент перекрестного реагирования несколько меньше (9 и 5%). Это связано, вероятно, в первом случае с заменой в 4 положении более объемного заместителя – хлора – на менее объемный заместитель – фтор, а во втором случае с наличием в бензольном кольце в 5 положении дополнительного и более объемного заместителя – хлора. Соединения, продемонстрировавшие наибольший процент перекрестного реагирования (2,4-дихлор-5-фторфеноксиуксусная кислота и 2-хлор-4-фторфеноксиуксусная кислота) не используются в сельском хозяйстве, поэтому не могут мешать анализу 2,4-Д в реальных образцах.

В данной работе впервые описано применение антител против 2,4-Д клона Р6/С10. Ранее было описано применение моноклональных и поликлональных антител против 2,4-Д, среди

которых наилучшими характеристиками с точки зрения чувствительности и специфичности обладают антитела клона E2/G2 (Институт Ветеринарии, Брно, Чехия). В работе [139] приведены характеристики специфичности антител E2/G2, близкие к характеристикам, полученным в ходе нашего эксперимента (таблица 22).

Таблица 22 – Данные по перекрестному реагированию родственных по структуре соединений в ПФИА 2,4-Д

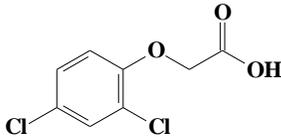
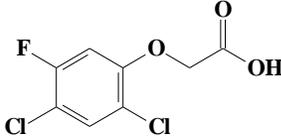
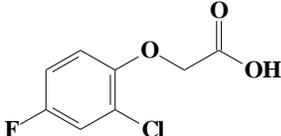
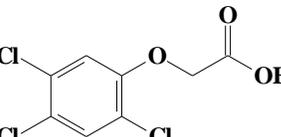
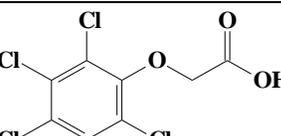
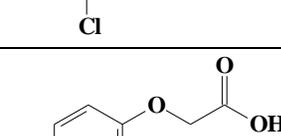
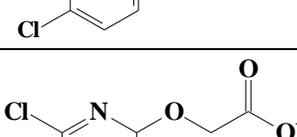
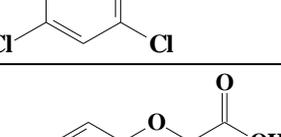
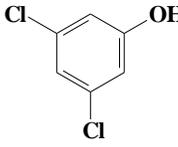
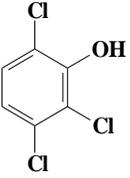
Соединение	Структурная формула	ПР, % в данной работе	ПР, % [139]
2,4-Дихлорфеноксиуксусная кислота		100	100
2,4-Дихлор-5-фторфеноксиуксусная кислота		31	19
2-Хлор-4-фторфеноксиуксусная кислота		8,7	7,5
2,4,5-Трихлорфеноксиуксусная кислота		4,8	6,8
2,3,4,5,6-Пентахлорфеноксиуксусная кислота		2,4	0,6
4-Хлорфеноксиуксусная кислота		0,8	–
3,5,6-Трихлор-2-пиридинилоксиуксусная кислота (триклопир)		0,2	<0,1
4-Хлор-2-метилфеноксипропионовая кислота (мекопроп)		0,1	0,3

Таблица 22 (продолжение) – Данные по перекрестному реагированию родственных по структуре соединений в ПФИА 2,4-Д

Соединение	Структурная формула	ПР, % в данной работе	ПР, % [139]
3,5-Дихлорфенол		<0,1	0,1
2,3,6-Трихлорфенол		<0,1	0,4

### 3.2.3.2. Специфичность определения триазофоса

Специфичность определения триазофоса оценивали по проценту перекрестного реагирования с другими фосфорорганическими пестицидами. Антитела продемонстрировали высокую селективность в отношении триазофоса; перекрестного реагирования между триазофосом и паратионом, паратион-метилом, диметоатом, метидатионом, хлорпирифосом и изокарбофосом практически не наблюдалось (таблица 23). Фрагментом, распознаваемым антителами, является, с наибольшей вероятностью, фенилтриазол.

Таблица 23 – Данные по перекрестному реагированию родственных по структуре соединений в ПФИА триазофоса

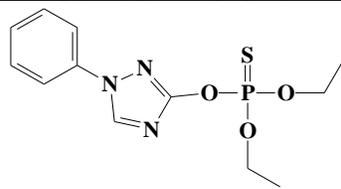
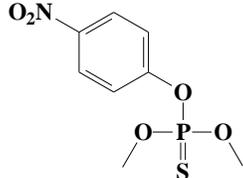
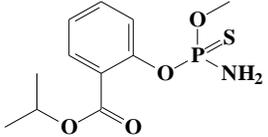
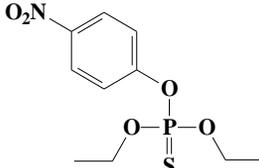
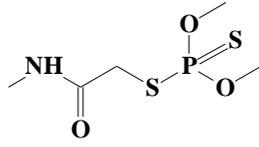
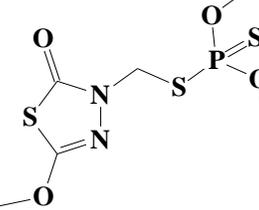
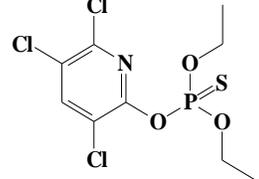
Соединение	Структурная формула	ПР, %
Триазофос		100
Паратион-метил		1,0
Изокарбофос		0,5

Таблица 23 (продолжение) – Данные по перекрестному реагированию родственных по структуре соединений в ПФИА триазофоса

Соединение	Структурная формула	ПР, %
Паратион		<0,1
Диметоат		<0,1
Метидатион		<0,1
Хлорпирифос		<0,1

### 3.2.3.3. Специфичность определения карбарила

Для определения специфичности ПФИА карбарила была исследована перекрестная реактивность карбаматов (карбарила, карбофурана, феномедифама, десмедифама, хлорпрофама), производных фенилмочевины (дикурана, диурона, изопротурона) и анилидов (беналаксила, пропанила). Согласно полученным данным (таблица 24), карбарил можно специфично определять в реальных образцах с помощью разработанной тест-системы. Перекрестное реагирование структурно родственных аналиту соединений не превышало 1%, то есть, антитела распознают структуру нафтилкарбамата.

Таблица 24 – Данные по перекрестному реагированию родственных по структуре соединений в ПФИА карбарила

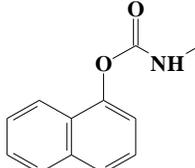
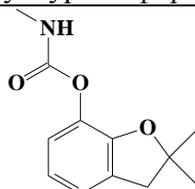
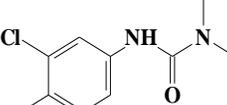
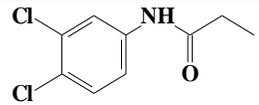
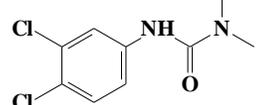
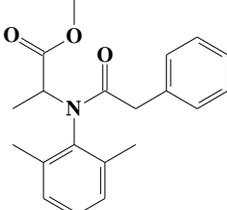
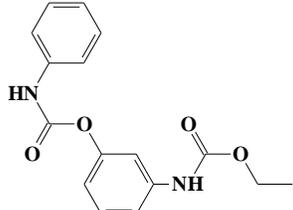
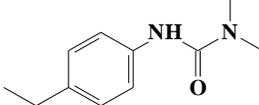
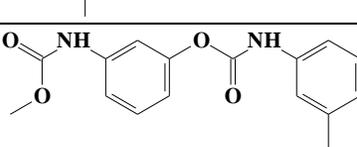
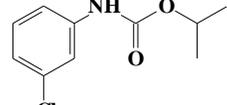
Соединение	Структурная формула	ПР, %
Карбарил		100

Таблица 24 (продолжение) – Данные по перекрестному реагированию родственных по структуре соединений в ПФИА карбарила

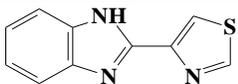
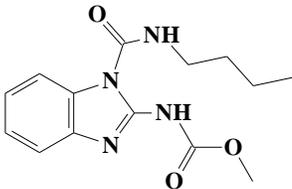
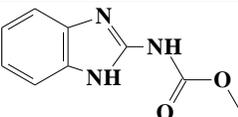
Соединение	Структурная формула	ПР, %
Карбофуран		0,8
Диуран		0,2
Пропанил		0,2
Диурон		0,1
Беналаксил		<0,1
Десмедифам		<0,1
Изопротурон		<0,1
Фенмедифам		<0,1
Хлорпрофам		<0,1

#### 3.2.3.4. Специфичность определения тиабендазола

Специфичность антител против тиабендазола в методе ПФИА определяли по проценту перекрестного реагирования с беномилом и карбендазимом – пестицидами группы

бензимидазолов, наиболее близкими по структуре к аналиту. Для этих соединений ПР составило менее 0,1% (таблица 25). Из полученных данных следует, что антитела не распознают бензимидазольный фрагмент молекулы в отсутствие тиазольного.

Таблица 25 – Данные по перекрестному реагированию родственных по структуре соединений в ПФИА тиабендазола

Соединение	Структурная формула	ПР, %
Тиабендазол		100
Беномил		<0,1
Карбендазим		<0,1

### 3.2.3.5. Специфичность определения тетраконазола

Специфичность ПФИА тетраконазола исследовали на пестицидах класса триазолов. Антитела продемонстрировали высокий процент перекрестной реактивности с пенконазолом (35%) и ципроконазолом (23%), тогда как с другими протестированными веществами перекрестная реактивность была незначительной (таблица 26). Антитела ЛІВ-Тк36С-41 распознают, по всей вероятности, триазольный фрагмент молекулы, соединенный с этилбензолом, имеющим в качестве заместителей в бензольном кольце атомы хлора.

Таблица 26 – Данные по перекрестному реагированию родственных по структуре соединений в ПФИА тетраконазола

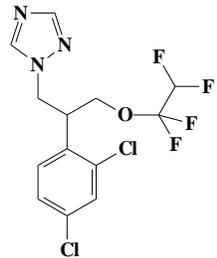
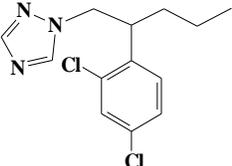
Соединение	Структурная формула	ПР, %
Тетраконазол		100
Пенконазол		35

Таблица 26 (продолжение) – Данные по перекрестному реагированию родственных по структуре соединений в ПФИА тетраконазола

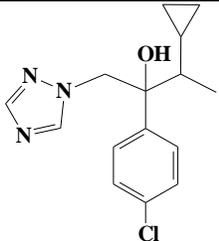
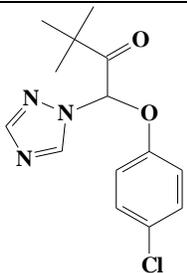
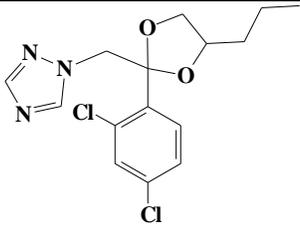
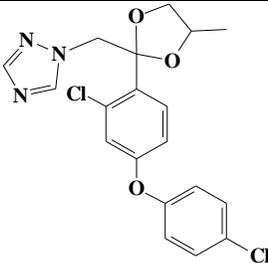
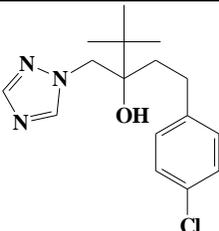
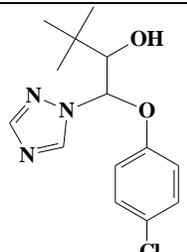
Соединение	Структурная формула	ПР, %
Ципроконазол		23
Триадимефон		0,5
Пропиконазол		0,3
Дифеноконазол		<0,1
Тебуконазол		<0,1
Триадименол		<0,1

Таблица 26 (продолжение) – Данные по перекрестному реагированию родственных по структуре соединений в ПФИА тетраконазола

Соединение	Структурная формула	ПР, %
Тритиконазол		<0,1

Кроме того, была проверена перекрестная реактивность используемых нами антител с 2,4-Д, триазафосом, карбарилом, тиабендазолом и тетраконазолом. Для каждой пары «антитела-определяемое вещество» были получены данные, показывающие, что перекрестная реактивность с другими четырьмя аналитами составляет менее 0,1%.

\*\*\*

В ПФИА триазафоса, карбарила и тиабендазола перекрестная реактивность родственных по структуре соединений не превышала 1%, то есть триазафос, карбарил и тиабендазол можно высокоспецифично определять методом ПФИА. В ПФИА 2,4-Д перекрестная реактивность соединения 2,4,5-Т составляла около 5%. 2,4,5-Т не производится и не применяется в большинстве стран, в том числе не входит в список пестицидов, разрешенных к применению на территории РФ. Тем не менее, способность 2,4,5-Т связываться с антителами против 2,4-Д Р6/С10 следует учитывать при интерпретации результатов анализа. Разработанная тест-система для определения тетраконазола является групп-специфичной: среди соединений, с которыми связываются антитела против тетраконазола ЛВ-Ткз6С-41, есть соединения, применяющиеся в сельском хозяйстве. Значения границ диапазонов определяемых концентраций для веществ, дающих перекрестную реакцию - пенконазола и ципроконазола – превышают в 3-3,5 раз эти значения для тетраконазола, что также необходимо учитывать при интерпретации результатов анализа.

### 3.3. Выбор условий пробоподготовки

Основными объектами загрязнения пестицидами являются вода, почва и продукты питания. В ГН РФ установлены нормативы содержания пестицидов в объектах окружающей среды, сельскохозяйственных культурах и продуктах питания в соответствии со спектром применения каждого из пестицидов. В зерне хлебных злаков регламентируется содержание

значительной части перечня пестицидов, в том числе 2,4-Д, триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола.

Зерно представляет собой объект со сложным химическим составом. В состав семян зерновых культур входят белки (9-13%), углеводы (55-70%), в том числе и обладающие коллоидными свойствами крахмал и слизи, липиды (2-5%), нуклеиновые кислоты, витамины, пигменты и некоторые другие соединения. Кроме того, зерно представляет собой твердый объект и не может быть напрямую проанализировано на содержание пестицидов, поэтому для перевода аналитов из твердой фазы в жидкую и для устранения мешающего влияния матрицы проводят пробоподготовку.

Пробоподготовка твердых объектов, как правило, включает экстракцию и очистку экстракта от соизвлеченных компонентов матрицы. Для пробоподготовки перед хроматографическим анализом в большинстве случаев экстракт предварительно очищают, затем концентрируют посредством упаривания и перерастворяют. Использование подобных схем пробоподготовки сопряжено со значительными затратами труда и времени, что неприемлемо для скринингового анализа, так как наиболее важной его характеристикой является экспрессность. Альтернативным способом нивелировать влияние матрицы является разбавление экстракта. Концентрация аналита в пробе при этом снижается, поэтому при выборе условий пробоподготовки важно подобрать минимальную достаточную степень разбавления экстракта.

На стадии экстракции в качестве экстрагентов чаще всего используют органические растворители или смеси органических растворителей с водой. При выборе экстрагента необходимо учитывать полноту извлечения аналита данным экстрагентом, а также способность экстрагента и соизвлеченных экстрагентом компонентов матрицы оказывать влияние на такие параметры тест-системы ПФИА, как диапазон определяемых концентраций и диапазон значений аналитического сигнала ( $\Delta mP$ ).

### **3.3.1. Влияние органических растворителей на аналитические характеристики ПФИА**

Для экстракции изучаемых соединений применяются преимущественно ацетонитрил и водно-ацетонитрильные смеси [30, 31, 33, 36-38, 40-42, 44, 46, 48, 57-64], реже – метанол [29, 33, 34, 66]. В литературе описаны случаи применения менее полярных растворителей – ундецилового спирта [45], октанола [47], трихлорэтилена [51], тетрахлорэтилена [53], метилхлорида [55]. Чтобы разработать экспрессную пробоподготовку для ПФИА, требуется экстрагент, смешивающийся с водой, поскольку после разбавления экстракт будет содержать остаточные количества экстрагента, а готовую пробу будут анализировать, используя

разбавленные в буферном растворе иммунореагенты. Поскольку даже небольшие количества содержащихся в готовой пробе органических растворителей способны влиять на результаты анализа, в ходе выбора условий пробоподготовки первоначально оценивали эффект, оказываемый смешивающимися с водой органическими растворителями на аналитический сигнал. Были приготовлены водно-метанольные и водно-ацетонитрильные смеси с различной концентрацией (об.) органического растворителя – 10, 20, 30, 50, 70 и 100%.

На первом этапе данного эксперимента оценивали влияние органического растворителя, содержащегося в пробе, на значение поляризации флуоресценции в отсутствие антител. Для этого в кювете смешивали 50 мкл водно-метанольной или водно-ацетонитрильной смеси, 500 мкл рабочего раствора трейсера и 500 мкл боратного буферного раствора, после чего измеряли сигнал поляризации флуоресценции. Значения поляризации флуоресценции в ходе данного эксперимента оставались стабильными от измерения к измерению, то есть, в отсутствие антител содержащиеся в пробе метанол или ацетонитрил на аналитический сигнал не влияли.

На втором этапе эксперимента оценивали влияние органического растворителя, содержащегося в пробе, на значение поляризации флуоресценции в присутствии антител. В кювете смешивали 50 мкл водно-метанольной или водно-ацетонитрильной смеси, 500 мкл рабочего раствора трейсера и 500 мкл рабочего раствора антител, после чего измеряли сигнал поляризации флуоресценции. Результаты анализа представлены на рисунке 25 в виде графиков в координатах «концентрация растворителя –  $mP_0$ ».

Было показано, что по мере увеличения концентраций метанола и ацетонитрила в пробе значение  $mP_0$  снижается. Также отмечено, что метанол во всех случаях оказывает заметно меньшее влияние на значение аналитического сигнала, чем ацетонитрил.

В ПФИА 2,4-Д при возрастании концентрации метанола в пробе  $mP_0$  снижается достаточно сильно – разница между  $mP_0$  (вода) и  $mP_0$  (100 % метанол) составляет около 45 мР; без значительного снижения аналитического сигнала метанол может присутствовать в пробе в концентрации менее 10%. В ПФИА триазофоса значение  $mP_0$  остается приблизительно на одном уровне при небольших концентрациях метанола в пробе (до 20%), после чего начинает постепенно снижаться. В ПФИА карбарила значение  $mP_0$  приблизительно одинаково при концентрациях метанола в пробе от 0 до 10%, снижается незначительно (на 10 мР) при увеличении концентрации метанола в пробе до 20-30%, при дальнейшем увеличении концентрации метанола  $mP_0$  продолжает постепенно снижаться. В ПФИА тиабендазола значение  $mP_0$  остается приблизительно на одном уровне при концентрациях метанола в пробе от 0 до 50%, в диапазоне от 50 до 100%  $mP_0$  снижается приблизительно на 20 мР. В ПФИА тетраконазола

значение  $mP_0$  остается стабильным при концентрациях метанола в пробе от 0 до 20%, при концентрациях от 20 до 100%  $mP_0$  плавно снижается на 15 мР. Из этих данных следует, что концентрация метанола в готовой пробе не должна превышать 30% в ПФИА триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола, и не должна превышать 10% в ПФИА 2,4-Д во избежание значительного сужения диапазона значений аналитического сигнала.

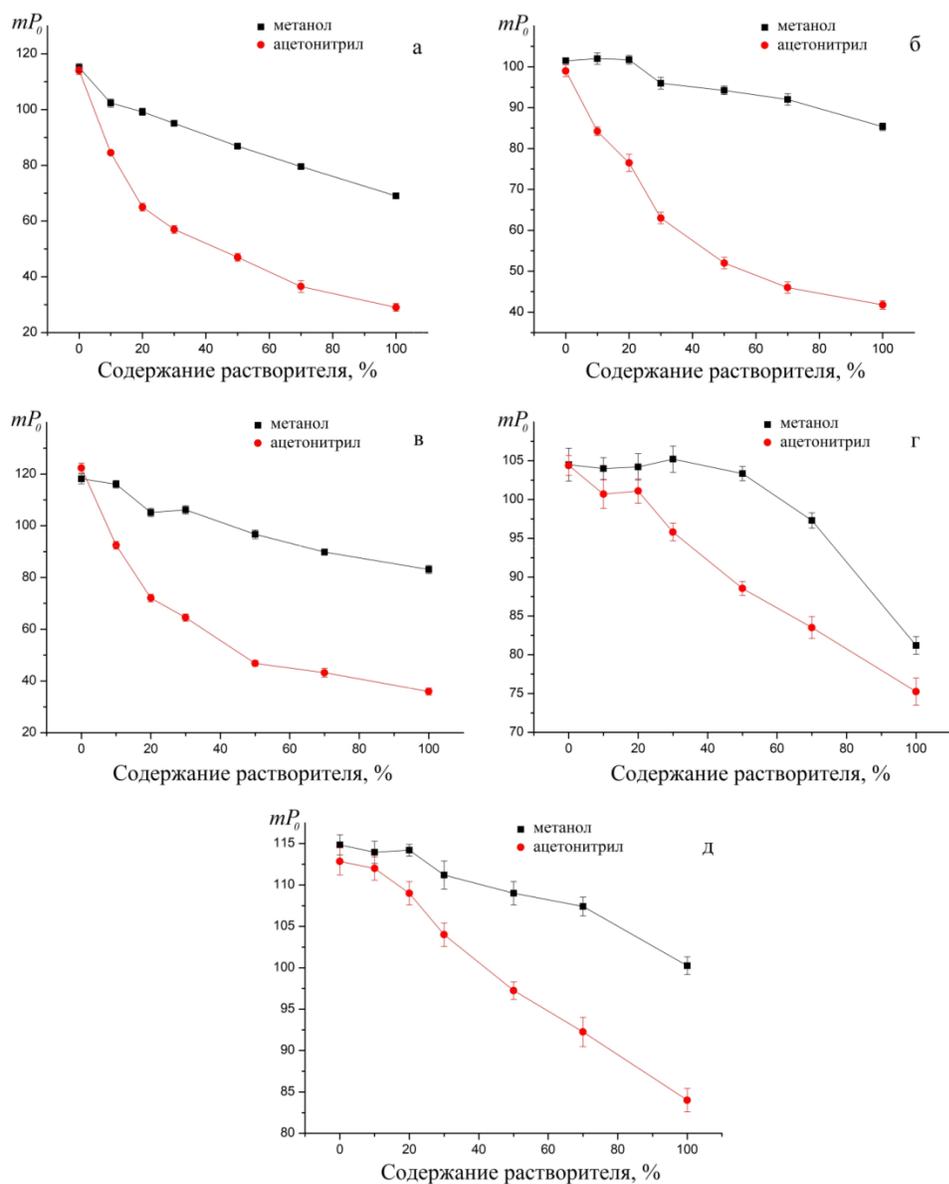


Рисунок 25 – Влияние различных концентраций метанола и ацетонитрила на значение  $mP_0$  в ПФИА 2,4-Д (а), триазофоса (б), карбарила (в), тиабендазола (г) и тетраконазола (д) ( $n=3$ ,  $P=0,95$ )

Далее в процессе выбора условий пробоподготовки оценивали эффект, оказываемый органическими растворителями на диапазон определяемых концентраций ПФИА. Для этого готовили стандартные растворы аналитов в растворителях, представляющих собой водно-

метанольные смеси с концентрацией метанола 0, 2, 5, 10, 20, 30% (об.) и анализировали их методами ПФИА в оптимизированных условиях. Результаты анализа приведены в таблице 27.

Таблица 27 – Влияние органических растворителей на диапазон определяемых концентраций веществ

Аналит	Концентрация метанола в пробе (об.)	IC <sub>20</sub> , нг/мл	IC <sub>80</sub> , нг/мл	ΔmP
2,4-Д	0%	5,3	59	93
	5%	4,8	65	83
	10%	5,8	60	78
	20%	6,1	71	74
	30%	11	97	72
Триазофос	0%	1,5	11	80
	5%	1,5	13	80
	10%	1,3	14	78
	20%	1,3	13	77
	30%	1,7	14	74
Карбарил	0%	5,8	71	86
	5%	6,3	73	83
	10%	6,9	94	79
	20%	6,4	75	76
	30%	6,0	76	73
Тиабендазол	0%	1,7	18	83
	5%	1,5	17	80
	10%	1,8	16	80
	20%	1,7	22	77
	30%	1,9	24	75
Тетраконазол	0%	16	210	72
	5%	15	200	71
	10%	18	230	70
	20%	18	220	68
	30%	20	230	66

В ПФИА 2,4-Д, триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола диапазон определяемых концентраций остается приблизительно одинаковым при содержании метанола в анализируемом растворе от 0 до 30%. В случае анализа 2,4-Д в присутствии метанола в пробах в концентрации 30% наблюдается небольшое смещение границ диапазона определяемых концентраций в сторону более высоких значений.

\*\*\*

Следует учитывать, что в процессе экстракции метанол может захватывать значительное количество компонентов матрицы зерна, которые будут оказывать влияние на аналитические характеристики разрабатываемых методик. Оптимизировать состав экстрагента для уменьшения матричного эффекта пробы возможно, варьируя соотношение метанол/вода в экстрагенте. Для

выбора состава экстрагента также необходимо оценить полноту извлечения пестицидов метанолом и смесями метанол/вода в различном соотношении.

### 3.3.2. Влияние состава экстрагента на степень извлечения пестицидов

Данные о степени извлечения пестицидов получали, анализируя методом ВЭЖХ-МС/МС экстракты из образцов искусственно контаминированной пестицидами пшеницы. Для этого образцы молотого пшеничного зерна контаминировали анализируемыми пестицидами на уровне 500 мкг/кг. Навески искусственно контаминированных образцов массой 1 г экстрагировали 2 мл экстрагента и центрифугировали как описано выше (2.2.5.), после чего разбавляли экстрагентом в 4 раза и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС как описано в п. 2.2.3.

Из данных, приведенных в таблице 28, видно, что степени извлечения триазофоса, карбарила и тиабендазола из пшеницы при экстракции 100% метанолом составляют более 90%, а при использовании для экстракции 70% метанола уменьшаются незначительно. Степень извлечения тетраконазола из пшеницы при экстракции 100% метанолом составляет около 80%, а при использовании для экстракции 70% метанола снижается до 74%. Степень извлечения 2,4-Д составляет около 50% при использовании экстрагентов с концентрацией метанола от 10 до 100% и около 30% при экстракции водой.

Таблица 28 – Влияние состава экстрагента на степень извлечения анализируемых веществ (n = 3, P = 0,95)

Содержание метанола в экстрагенте, %, (об.)	Степень извлечения, %				
	<i>2,4-Д</i>	<i>Триазофос</i>	<i>Карбарил</i>	<i>Тиабендазол</i>	<i>Тетраконазол</i>
100	53 ± 3	98 ± 3	92 ± 3	94 ± 3	82 ± 2
70	56 ± 3	93 ± 2	86 ± 3	87 ± 4	74 ± 2
50	57 ± 2	79 ± 2	63 ± 4	46 ± 3	53 ± 1
10	47 ± 2	11 ± 1	35 ± 2	22 ± 1	10 ± 1
0	32 ± 1	8,0 ± 0,6	22 ± 1	15 ± 1	7,0 ± 0,5

### 3.3.3. Влияние соизвлеченных экстрагентом компонентов матрицы

При разбавлении экстракта влияние матрицы можно устранить либо за счет снижения концентрации компонентов матрицы, когда для разбавления используют экстрагент или подобный ему растворитель, либо за счет осаждения компонентов матрицы, когда используют разбавитель, отличающийся по природе от экстрагента. Иммунореагенты – трейсеры и антитела – разведены в буферном растворе, а в неразбавленных экстрактах содержится метанол в высоких концентрациях и растворенные в нем компоненты матрицы. Чтобы отделить соизвлеченные компоненты матрицы, а также избежать выпадения осадка непосредственно при проведении

ПФИА, метанольные и водно-метанольные экстракты разбавляли водой и центрифугировали дополнительно 5 мин при 1400 g. О матричном эффекте судили, сравнивая результаты анализа разбавленных экстрактов с результатами анализа разбавленных экстрагентов (100%  $\text{CH}_3\text{OH}$  и 70%  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). Данные приводили в координатах «кратность разбавления – поляризация флуоресценции».

Чтобы оценить влияние соизвлеченных экстрагентом компонентов матрицы, разбавленные экстракты, полученные из незагрязненной пестицидами пшеницы, анализировали методом ПФИА. В качестве экстрагентов использовали 100% метанол и 70% метанол, соотношение масса навески образца (г): объем экстрагента (мл) составляло 1:2. Экстракцию и центрифугирование образцов проводили как описано выше (2.2.5.), после чего разбавляли водой в 2, 4, 6, 8, 10, 30 и 50 раз.

В ПФИА 2,4-Д компоненты матрицы пшеницы занижают значение  $mP_0$  (рисунок 26). Матричный эффект экстракта, полученного при использовании 100% метанола, выражен более значительно, чем матричный эффект экстракта, полученного при использовании 70% метанола. При использовании 100% метанола для экстракции 2,4-Д из пшеницы матричный эффект нельзя нивелировать даже 50-кратным разбавлением экстракта. При использовании 70% метанола матричный эффект можно нивелировать, разбавляя экстракт ориентировочно в 30-50 раз.

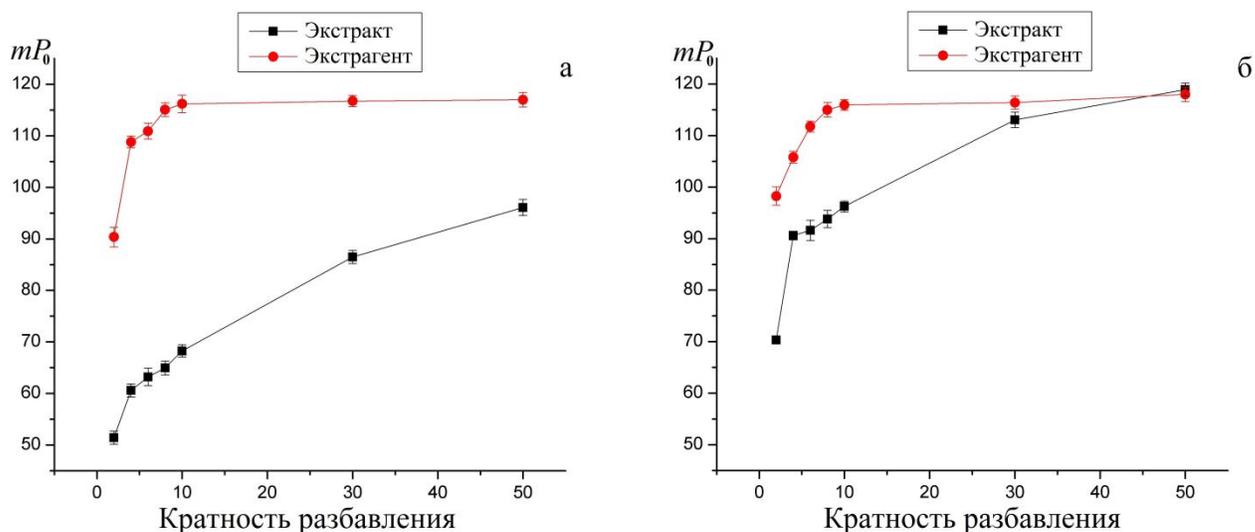


Рисунок 26 – Матричный эффект пшеницы в ПФИА 2,4-Д при использовании в качестве экстрагентов 100% метанола (а) и 70% метанола (б) ( $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )

В ПФИА триафоса, как и в ПФИА 2,4-Д, матрица пшеницы занижает значение  $mP_0$  (рисунок 27), причем матричный эффект выражен значительно сильнее, если для экстракции был использован 100% метанол. Метанольный экстракт необходимо развести в 30-50 раз для

нивелирования матричного эффекта, а экстракт, полученный при использовании в качестве экстрагента 70% метанола, необходимо развести лишь в 8-10 раз.

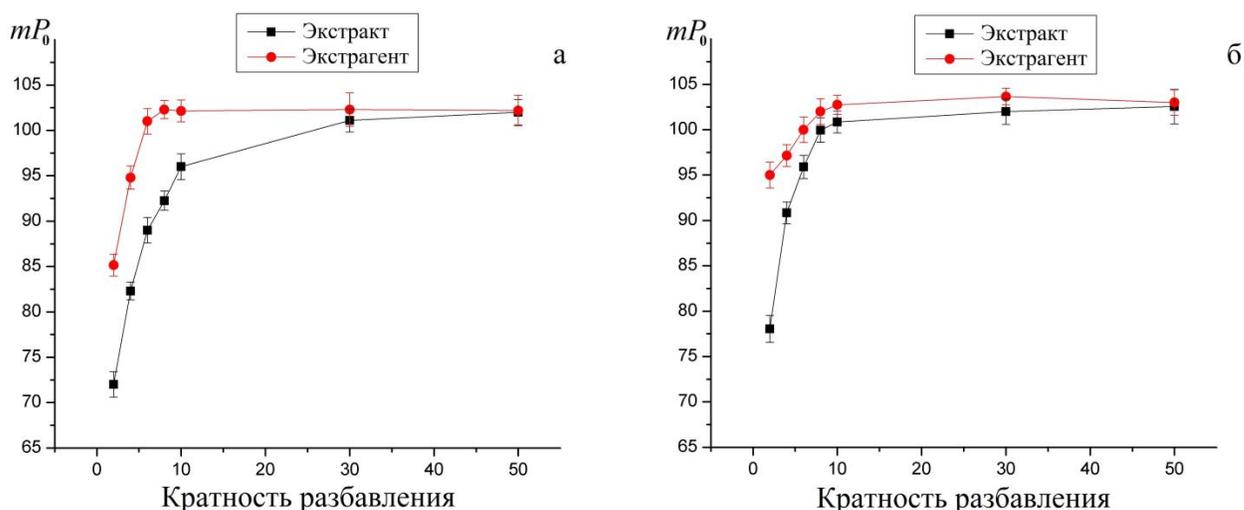


Рисунок 27 – Матричный эффект пшеницы в ПФИА триазофоса при использовании в качестве экстрагентов 100% метанола (а) и 70% метанола (б) ( $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )

Матрица метанольных и водно-метанольных экстрактов из зерна влияет на  $mP_0$  в ПФИА карбарила в меньшей степени, чем в ПФИА 2,4-Д и триазофоса (рисунок 28). Как и в двух предыдущих случаях, чтобы устранить влияние матрицы в метанольном экстракте, метанольный экстракт требуется разбавлять сильнее (30-кратное разбавление), чем водно-метанольный (4-кратное разбавление).

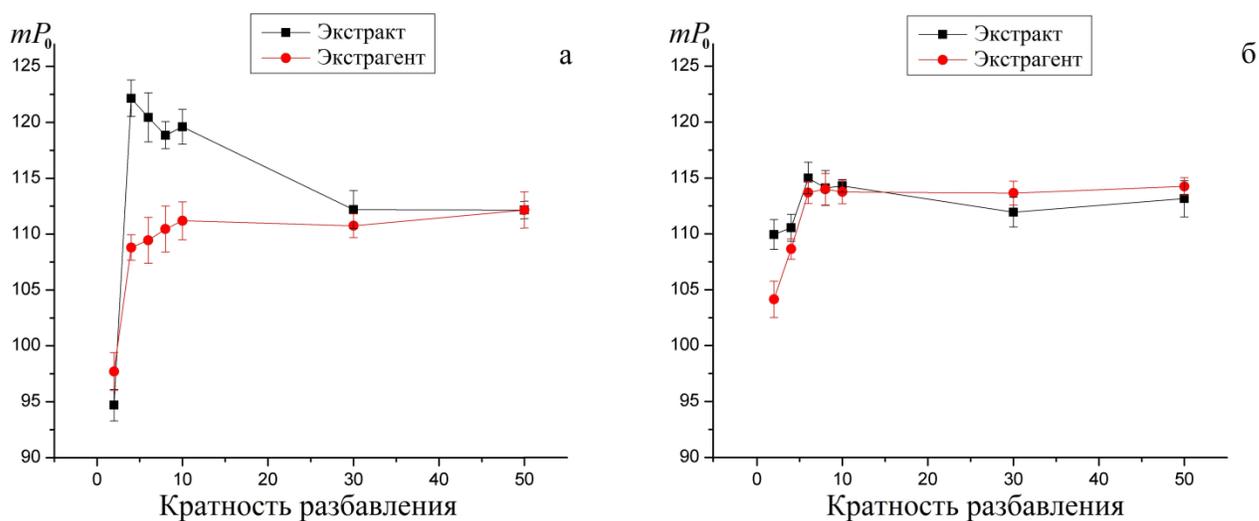


Рисунок 28 – Матричный эффект пшеницы в ПФИА карбарила при использовании в качестве экстрагентов 100% метанола (а) и 70% метанола (б) ( $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )

Матричный эффект пшеницы в ПФИА тиабендазола и тетраконазола оказывает заметное влияние на значение  $mP_0$ , если в качестве экстрагента был использован 100% метанол (рисунок

29, 30). Для ПФИА тиабендазола метанольный экстракт потребуется разбавлять в 30 раз, а для ПФИА тетраконазола – в 10 раз. Если в качестве экстрагента выбрать 70% метанол, то для ПФИА тиабендазола такой экстракт потребуется разбавить в 2-4 раза, а для ПФИА тетраконазола – в 4-6 раз.

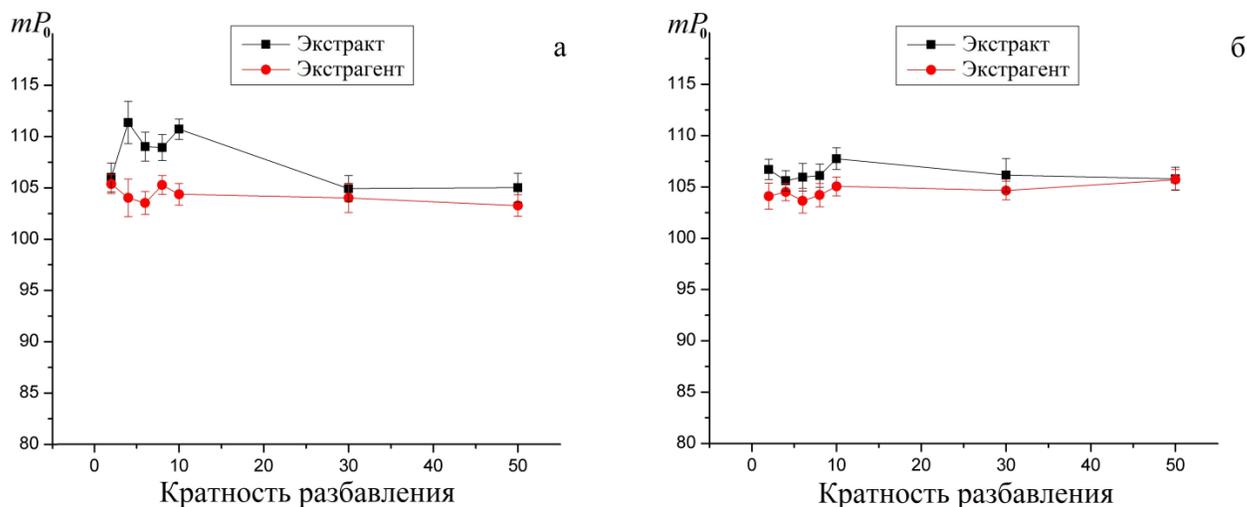


Рисунок 29 – Матричный эффект пшеницы в ПФИА тиабендазола при использовании в качестве экстрагентов 100% метанола (а) и 70% метанола (б) ( $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )

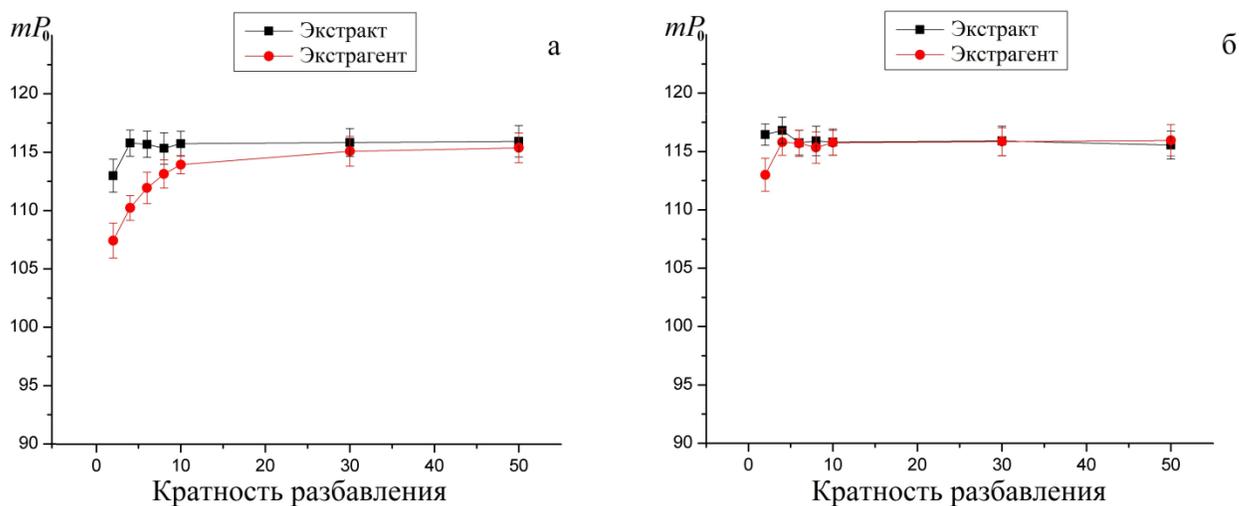


Рисунок 30 – Матричный эффект пшеницы в ПФИА тетраконазола при использовании в качестве экстрагентов 100% метанола (а) и 70% метанола (б) ( $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )

\*\*\*

При экстракции триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола метанолом или водно-метанольными смесями с содержанием метанола 70% и более можно достичь высоких степеней извлечения. Влияние матрицы таких экстрактов на значение  $mP_0$  нивелируется разбавлением водой, причем экстракты, полученные при использовании метанола в качестве

экстрагента, требуется разбавлять в большее число раз, чем экстракты, полученные при использовании 70% метанола. Принимая во внимание эти данные, проводить экстракцию триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола было решено 70% метанолом.

### 3.3.4. Экстракция 2,4-Д

При использовании метанола и водно-метанольных смесей для экстракции 2,4-Д высокой степени извлечения достичь не удалось. Кроме этого, матричный эффект экстрактов с высоким содержанием метанола в ПФИА 2,4-Д можно нивелировать лишь многократным (в 50 и более раз) разбавлением, что значительно снижает чувствительность анализа образцов пшеницы.

Из литературных данных известно [197-199], что в растительном материале 2,4-Д образует конъюгаты с сахарами, полисахаридами, аминокислотами, белками и другими соединениями. В исследованиях метаболизма структуры этих конъюгатов в полном объеме не идентифицированы, кроме того, конъюгирование органических кислот с макромолекулами матрицы может приводить к образованию неэкстрагируемых соединений [200]. По этим причинам целесообразно проводить гидролиз конъюгатов. В методики определения хлорфеноксикислот включают стадию гидролиза – кислотного [35, 37, 47], щелочного [56, 201-204] или ферментативного [205]. В данной работе для гидролиза и экстракции 2,4-Д использовали карбонатный буферный раствор (0,05 М, рН 9,5), поскольку в щелочной среде гидролиз проходит необратимо и более эффективно. Карбонатный буферный раствор обеспечивает постоянное присутствие в растворе необходимых для гидролиза ионов  $\text{OH}^-$ , и не создает при этом сильнощелочную среду, которая могла бы привести в дальнейшем к проблемам с устранением матричного эффекта, обусловленного и сильнощелочной средой пробы, и присутствием в пробе значительного количества продуктов гидролиза. Поскольку 2,4-Д в органических растворителях растворяется значительно лучше, чем в воде, карбонатный буферный раствор готовили, добавляя в него небольшое количество метанола (5%, об.).

Данные о степени извлечения 2,4-Д получали аналогично тому, как описано в п. 3.3.2, изменив соотношение объем экстрагента: масса образца, так как молотая пшеница абсорбирует экстрагент на водной основе – на 1 г молотой пшеницы брали 4 мл экстрагента. По результатам анализа методом ВЭЖХ-МС/МС степень извлечения 2,4-Д составляла  $100 \pm 2\%$  ( $n = 3$ ,  $P = 0,95$ ).

Данные о влиянии матрицы, захватываемой экстрагентом при экстракции, получали аналогично тому, как описано выше (3.3.3.), используя соотношение 1:4 между массой навески образца (г) и объемом экстрагента (мл). Экстракт разбавляли экстрагентом в 2, 4, 6, 8 и 10 раз и

анализировали в оптимизированных условиях. Результаты анализа разбавленных экстрактов сравнивали с результатами анализа карбонатного буферного раствора, содержащего 5%  $\text{CH}_3\text{OH}$ .

На рисунке 31 видно, что значения поляризации флуоресценции, полученные при анализе экстрактов, разбавленных в 4, 6, 8 и 10 раз находятся приблизительно на одном уровне – 108-112  $mP_0$ . Значения поляризации флуоресценции, полученные при анализе карбонатного буферного раствора, содержащего 5%  $\text{CH}_3\text{OH}$ , находились в том же диапазоне, то есть, матричный эффект зерна не оказывал заметного влияния на значение  $mP_0$  при разбавлении экстрактов в 4 и более раз.

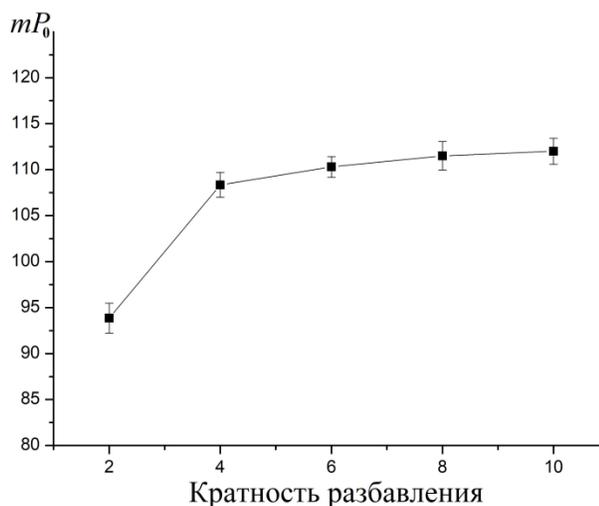


Рисунок 31 – Матричный эффект пшеницы в ПФИА 2,4-Д при использовании в качестве экстрагента и разбавителя карбонатного буферного раствора, содержащего 5%  $\text{CH}_3\text{OH}$  ( $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )

Таким образом, для экстракции 2,4-Д из пшеницы был подобран экстрагент, с одной стороны, не содержащий значительной доли органических растворителей, и поэтому не приводящий к значительному усилению матричного эффекта в ПФИА 2,4-Д, и, с другой стороны, создающий условия для гидролиза конъюгатов 2,4-Д, что позволило достичь степени извлечения 2,4-Д около 100%.

### 3.3.5. Определение оптимального разбавления экстрактов

Данные анализа разбавленных незараженных экстрактов позволяют оценить матричный эффект лишь ориентировочно, поскольку единственное значение, на которое опираются при оценке – это  $mP_0$ . Для выбора оптимального разбавления экстрактов необходимо оценить влияние матрицы во всем диапазоне концентраций градуировочного графика ПФИА, а также определить процент открытия пестицидов в тесте «введено-найдено» при выбранной степени разбавления.

Кратность разбавления экстрактов, при которой матрица значимо не влияет на результаты ПФИА 2,4-Д, определяли следующим образом: готовили серии стандартных растворов в неразбавленном экстракте из неконтаминированной пшеницы, а также в экстрактах, разбавленных в 2 и в 4 раза экстрагентом, и анализировали полученные растворы методом ПФИА в оптимизированных условиях. Полученные по результатам анализа кривые сравнивали с градуировочным графиком, полученным по результатам анализа стандартных растворов в экстрагенте. При разведении экстракта в 4 раза градуировочные графики практически совпадали, а параметры кривых отличались между собой лишь незначительно, поэтому данное разбавление использовали при подготовке проб для ПФИА 2,4-Д. Данные результатов анализа представлены на рисунке 32 и в таблице 29; значения  $R^2$  для всех кривых составляли более 0,995.

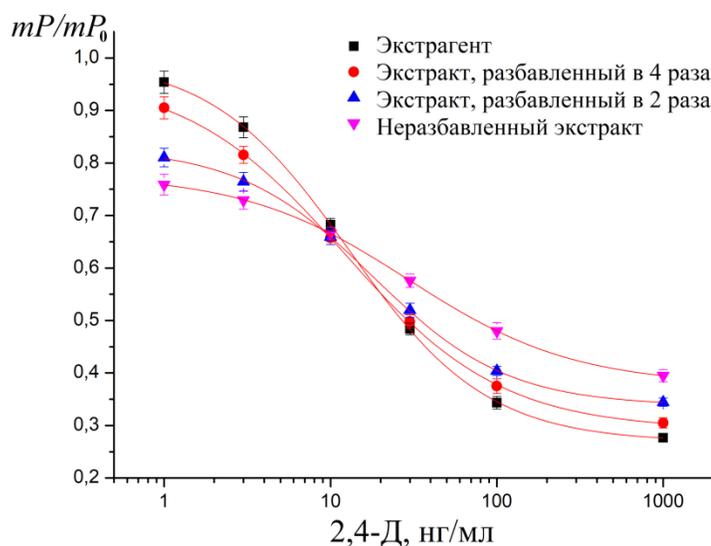


Рисунок 32 – Матричный эффект пшеницы в ПФИА 2,4-Д при разбавлении экстрактов в разное количество раз ( $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )

Таблица 29 – Влияние степени разбавления экстрактов пшеницы на параметры градуировочных графиков в ПФИА 2,4-Д

Параметры кривых	Неразбавленный экстракт	Разбавленный (1:2) экстракт	Разбавленный (1:4) экстракт	Экстрагент
$mP_0$	90	96	108	112
$IC_{20}$ , нг/мл	5,7	4,6	4,4	4,3
$IC_{50}$ , нг/мл	30	19	12	13
$IC_{80}$ , нг/мл	160	75	60	51

Степень необходимого разбавления экстрактов для ПФИА триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола определяли следующим образом. Готовили экстракт из незараженной пестицидами пшеницы, из него готовили разбавленные водой экстракты и центрифугировали. Разбавленные экстракты использовали для приготовления серий стандартных

растворов аналитов. Кроме того, серии стандартных растворов были приготовлены в разбавленном экстрагенте. По результатам ПФИА стандартных растворов строили градуировочные графики. Градуировочные графики сравнивали попарно: график, построенный по результатам анализа стандартных растворов в разбавленном в определенное число раз экстрагенте сравнивали с графиком, построенным по результатам анализа стандартных растворов в разбавленном в то же число раз экстракте. Разбавление экстракта считали достаточным, если кривые, полученные по результатам анализа стандартов в разведенном экстракте и в разведенном экстрагенте, практически совпадали, а значения  $IC_{20}$ ,  $IC_{50}$ ,  $IC_{80}$  и  $mP_0$  различались незначительно. Было определено, что для ПФИА карбарила достаточным является 4-кратное разбавление экстракта, а для ПФИА триазофоса, тиабендазола и тетраконазола 8-кратное. Кривые приведены на рисунке 33, параметры кривых – в таблице 30; значения  $R^2$  для всех кривых составляли более 0,995.

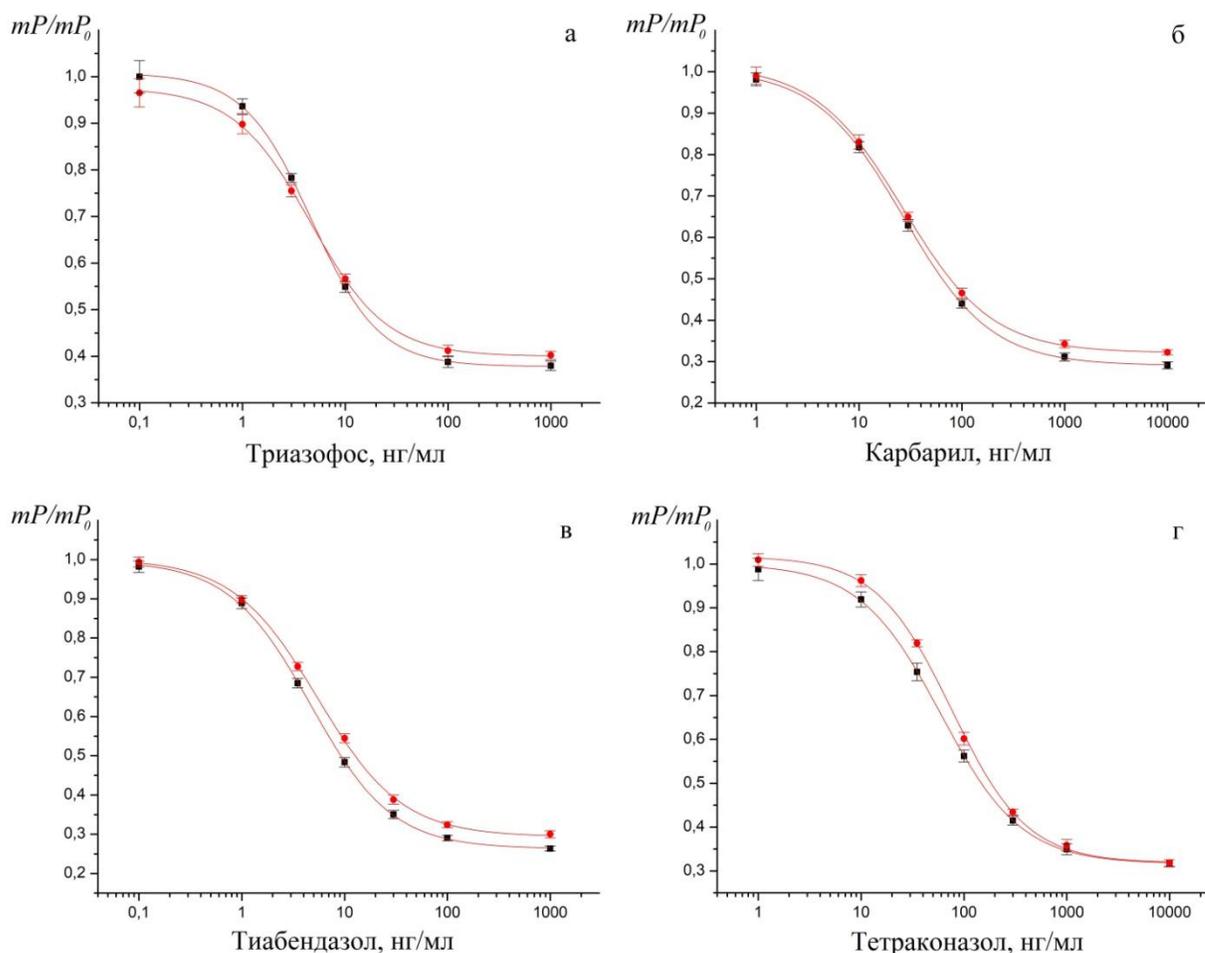


Рисунок 33 – Градуировочные графики ПФИА триазофоса (а), карбарила (б), тиабендазола (в), тетраконазола (г) (■ – стандартные растворы в разбавленном экстрагенте, ● – стандартные растворы в разбавленном экстракте,  $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )

Таблица 30 – Параметры градуировочных графиков, полученных по результатам анализа стандартных растворов триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола в разбавленных экстракте и экстрагенте

Параметры кривых	Триазофос		Карбарил	
	Разбавленный (1:8) экстракт	Экстрагент	Разбавленный (1:4) экстракт	Экстрагент
IC <sub>20</sub>	1,4	1,6	6,8	7,0
IC <sub>50</sub>	4,6	4,7	27	27
IC <sub>80</sub>	15	13	110	110
ΔmP	66	70	82	83
***				
Параметры кривых	Тиабендазол		Тетраконазол	
	Разбавленный (1:8) экстракт	Экстрагент	Разбавленный (1:8) экстракт	Экстрагент
IC <sub>20</sub>	1,5	1,3	24	17
IC <sub>50</sub>	5,4	4,7	76	59
IC <sub>80</sub>	20	17	250	210
ΔmP	75	77	72	70

\*\*\*

По результатам экспериментов были выбраны и оптимизированы условия пробоподготовки зерна для ПФИА 2,4-Д, триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола.

Пробоподготовка зерна для ПФИА 2,4-Д включает ультразвуковую экстракцию карбонатным буферным раствором (0,05 М, рН 9,5, 5% СН<sub>3</sub>ОН) в течение 30 мин и перемешивание на ротаторе в течение 5 мин, разбавление экстрагентом в 4 раза и центрифугирование 5 мин при 1400 g. Соотношение масса навески образца (г) : объем экстрагента (мл) составляет 1:4.

Пробоподготовка зерна для ПФИА триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола включает ультразвуковую экстракцию 70% метанолом в течение 30 мин и перемешивание на ротаторе в течение 5 мин, разбавление водой и центрифугирование 5 мин при 1400 g. Соотношение масса навески образца (г) : объем экстрагента (мл) составляет 1:2, степень разбавления экстракта, достаточная для ПФИА карбарила, составляет 4, а степень разбавления экстракта, достаточная для ПФИА триазофоса, тиабендазола и тетраконазола, составляет 8.

#### 3.4. Тестирование методик в варианте «введено-найдено»

Для проверки правильности методик определения пестицидов искусственно контаминированные образцы зерна готовили и анализировали методом ПФИА в

оптимизированных условиях. Диапазон определяемых содержаний и предел обнаружения определяли, как описано в п. 2.2.2.4, учитывая средние степени извлечения аналитов (п. 3.3.2).

Методику определения 2,4-Д в зерне апробировали на образцах молотого зерна в варианте «введено-найдено», используя четырехкратное разбавление экстракта (таблица 31). Относительные стандартные отклонения не превышали 0,10 в пределах одного эксперимента, а процент открытия составлял от 67 до 111%. Результаты ПФИА завышены при измерении на уровне нижней границы определяемых концентраций, и занижены на уровне верхней границы определяемых концентраций, что объясняется влиянием матрицы образца. Разработанная методика имеет предел обнаружения 40 мкг/кг и диапазон определяемых содержаний от 80 до 1000 мкг/кг.

Таблица 31 – Результаты теста «введено–найдено» ( $n = 3$ ,  $P = 0,95$ ) для ПФИА 2,4-Д в зерне

Внесено, мкг/кг	Определено, мкг/кг	$S_r$	Открытие, %
0	–	–	–
80	$89 \pm 8$	0,09	$111 \pm 10$
160	$132 \pm 9$	0,07	$82 \pm 6$
320	$254 \pm 23$	0,09	$79 \pm 7$
480	$320 \pm 7$	0,02	$67 \pm 1$

Методики определения триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола в зерне апробировали на образцах зерна в варианте «введено-найдено», используя при пробоподготовке выбранные степени разбавления. Результаты теста представлены в таблице 32.

Таблица 32 – Результаты теста «введено–найдено» ( $n = 3$ ,  $P = 0,95$ ) для ПФИА триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола в зерне

Аналит	Внесено, мкг/кг	Определено, мкг/кг	$S_r$	Открытие, %
Триазофос	0	–	–	–
	40	$43 \pm 3$	0,06	$108 \pm 6$
	80	$68 \pm 4$	0,06	$85 \pm 5$
	120	$92 \pm 3$	0,03	$77 \pm 2$
	160	$125 \pm 5$	0,04	$78 \pm 3$

Таблица 32 (продолжение) – Результаты теста «введено–найдено» ( $n = 3, P = 0,95$ ) для ПФИА триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола в зерне

Аналит	Внесено, мкг/кг	Определено, мкг/кг	$S_r$	Открытие, %
Карбарил	0	–	–	–
	60	$59 \pm 2$	0,04	$98 \pm 4$
	120	$125 \pm 6$	0,05	$104 \pm 5$
	200	$189 \pm 4$	0,02	$94 \pm 2$
	400	$353 \pm 18$	0,05	$88 \pm 4$
Тиабендазол	0	–	–	–
	40	$35 \pm 2$	0,05	$88 \pm 4$
	100	$76 \pm 3$	0,04	$76 \pm 3$
	200	$144 \pm 6$	0,04	$72 \pm 3$
	300	$214 \pm 6$	0,03	$72 \pm 2$
Тетраконазол	0	–	–	–
	600	$366 \pm 17$	0,05	$61 \pm 3$
	1300	$914 \pm 23$	0,02	$70 \pm 2$
	2000	$1530 \pm 33$	0,02	$77 \pm 2$
	3000	$2280 \pm 35$	0,02	$76 \pm 1$

Процент открытия триазофоса составил от 77 до 110%. Процент открытия завышен на уровне нижней границы определяемых концентраций и занижен на уровне верхней границы определяемых концентраций из-за влияния матрицы. В образце, не содержащем внесенных пестицидов, присутствие триазофоса не задетектировано. Методика определения триазофоса в зерне методом ПФИА имеет предел обнаружения 40 мкг/кг и диапазон определяемых содержаний от 40 до 200 мкг/кг.

Процент открытия карбарила составил от 88 до 104%. Методика определения карбарила в зерне методом ПФИА имеет предел обнаружения 20 мкг/кг и диапазон определяемых содержаний от 60 до 650 мкг/кг.

Процент открытия тиабендазола составил от 68 до 86%. Методика определения тиабендазола в зерне методом ПФИА имеет предел обнаружения 20 мкг/кг и диапазон определяемых содержаний от 40 до 500 мкг/кг.

Процент открытия тетраконазола составил от 60 до 77%. Методика определения тетраконазола в зерне методом ПФИА имеет предел обнаружения 200 мкг/кг и диапазон определяемых содержаний от 600 до 3200 мкг/кг.

Относительные стандартные отклонения во всех случаях не превышали 0,10.

Разработанные методики определения 2,4-Д, триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола в зерне методом ПФИА можно использовать для высокопроизводительного скринингового анализа образцов зерна. 2,4-Д, триазофос, карбарил и тиабендазол можно определять количественно даже при их содержании в зерне ниже установленных МДУ. Методика определения тетраконазола имеет предел обнаружения, равный существующему МДУ (200 мкг/кг), то есть, позволяет судить о наличии или отсутствии тетраконазола на этом уровне.

### **3.5. Корреляция результатов ПФИА с результатами ВЭЖХ-МС/МС анализа зерна**

При выборе условий хроматографирования и МС/МС детектирования пестицидов (таблица 7) опирались на литературные данные. 2,4-Д, тиабендазол и тетраконазол элюировали в обращенно-фазовом режиме на колонке, заполненной сорбентом на основе силикагеля с привитой фазой С18, используя подвижную фазу с рН, соответствующим слабокислому раствору [35, 38, 40, 42]. Триазофос и карбарил элюировали с помощью воды и раствора ацетата аммония в метаноле на колонке, заполненной сорбентом на основе силикагеля с привитой фазой С18 [36]. Ионизацию пестицидов осуществляли способом ИЭР в режиме регистрации положительно заряженных ионов в случае триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола, и в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов в случае 2,4-Д. Ионы-предшественники и ионы-продукты, по которым проводилась количественная оценка содержания пестицидов в пробах, также выбирали, основываясь на литературных данных [35, 41, 44, 46, 94]. Энергии фрагментации, использование которых позволяет получить наиболее интенсивный аналитический сигнал, определяли экспериментально. Пробоподготовку зерна для анализа методами ПФИА и ВЭЖХ-МС/МС осуществляли в соответствии с методиками, разработанными для метода ПФИА (п. 3.3). Анализ проб методом ПФИА выполняли в оптимизированных условиях; условия ВЭЖХ-МС/МС анализа приведены в п. 2.2.3.

Исследования корреляции проводили на 6 образцах зерна: в 5 образцов была внесена 2,4-Д в различной концентрации, и один образец не содержал внесенных пестицидов. Результаты анализа 2,4-Д в зерне, полученные двумя методами, представлены в таблице 33, корреляция между результатами анализа графически отображена на рисунке 34. Процент открытия 2,4-Д

составил от 64 до 112% по результатам ПФИА, и от 99 до 101% по результатам ВЭЖХ-МС/МС анализа.

Таблица 33 – Процент открытия 2,4-Д в искусственно контаминированных образцах, рассчитанный по результатам ПФИА и ВЭЖХ-МС/МС анализа (n=3, P=0,95)

Внесено, мкг/кг	Определено (ПФИА), мкг/кг	Открытие, %	Определено (ВЭЖХ-МС/МС), мкг/кг	Открытие, %
0	–	–	–	–
80	90 ± 8	112 ± 10	81 ± 2	101 ± 2
150	137 ± 10	91 ± 6	152 ± 2	101 ± 1
300	241 ± 22	80 ± 7	299 ± 10	100 ± 3
500	342 ± 8	68 ± 2	496 ± 16	99 ± 3
750	480 ± 11	64 ± 2	759 ± 13	101 ± 2

Были также проведены исследования корреляции результатов ПФИА и ВЭЖХ-МС/МС анализа триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола в зерне. Исследования корреляции проводили на 6 образцах: в 5 образцов были внесены четыре пестицида в различной концентрации, и 1 образец не содержал внесенных пестицидов. Пробоподготовку зерна проводили в соответствии с разработанными методиками, разбавляя все экстракты в 8 раз. Результаты, полученные методами ПФИА и ВЭЖХ-МС/МС, приведены в таблице 34, графически корреляция между результатами анализа отображена на рисунке 34.

Таблица 34 – Процент открытия триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола в искусственно контаминированных образцах, рассчитанный по результатам ПФИА и ВЭЖХ-МС/МС анализа (n = 3, P = 0,95)

Соединение	№ образца п/п	Внесено, мкг/кг	Определено (ПФИА), мкг/кг	Открытие, %	Определено (ВЭЖХ-МС/МС), мкг/кг	Открытие, %
Триазофос	1	0	–	–	–	–
	2	40	44 ± 3	110 ± 6	36 ± 2	90 ± 5
	3	60	56 ± 5	88 ± 7	49 ± 3	82 ± 4
	4	100	76 ± 3	79 ± 2	94 ± 3	94 ± 3
	5	130	102 ± 2	80 ± 2	117 ± 5	90 ± 4
	6	160	122 ± 6	77 ± 4	152 ± 11	95 ± 7
Карбарил	1	0	–	–	–	–
	2	160	162 ± 10	102 ± 6	138 ± 5	86 ± 3
	3	320	322 ± 19	101 ± 6	282 ± 5	88 ± 1
	4	640	661 ± 11	103 ± 2	486 ± 9	76 ± 1
	5	960	904 ± 34	94 ± 4	772 ± 62	80 ± 6
	6	1300	1130 ± 88	88 ± 7	1060 ± 68	83 ± 5

Таблица 34 (продолжение) – Процент открытия триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола в искусственно контаминированных образцах, рассчитанный по результатам ПФИА и ВЭЖХ-МС/МС анализа ( $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )

Соединение	№ образца п/п	Внесено, мкг/кг	Определено (ПФИА), мкг/кг	Открытие, %	Определено (ВЭЖХ-МС/МС), мкг/кг	Открытие, %
Тиабендазол	1	0	–	–	–	–
	2	40	$34 \pm 3$	$86 \pm 8$	$36 \pm 1$	$89 \pm 3$
	3	100	$75 \pm 7$	$75 \pm 7$	$88 \pm 1$	$88 \pm 1$
	4	200	$144 \pm 5$	$72 \pm 2$	$171 \pm 7$	$86 \pm 3$
	5	300	$213 \pm 7$	$71 \pm 2$	$248 \pm 3$	$83 \pm 1$
	6	400	$272 \pm 5$	$68 \pm 1$	$340 \pm 8$	$85 \pm 2$
Тетраконазол	1	0	–	–	–	–
	2	600	$358 \pm 23$	$60 \pm 4$	$439 \pm 10$	$73 \pm 2$
	3	1300	$900 \pm 31$	$69 \pm 2$	$936 \pm 9$	$72 \pm 1$
	4	1900	$1470 \pm 57$	$77 \pm 3$	$1430 \pm 9$	$75 \pm 1$
	5	2500	$1900 \pm 68$	$76 \pm 3$	$1850 \pm 12$	$74 \pm 1$
	6	3200	$2450 \pm 68$	$77 \pm 2$	$2400 \pm 23$	$75 \pm 1$

Между результатами ПФИА и ВЭЖХ-МС/МС анализа наблюдалась линейная корреляция (рисунок П35). Данные, полученные двумя методами, хорошо согласуются между собой – значения  $R^2$  для анализа 2,4-Д, триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола составляли 0,997, 0,974, 0,987, 0,998 и 0,999, соответственно.

### 3.6. Тестирование разработанных методик на коммерчески доступных образцах зерна

Разработанные методики были апробированы на образцах пшеничного зерна из различных регионов России. Пробоподготовку образцов зерна осуществляли двумя способами: одним – для определения 2,4-Д, другим – для определения триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола (п. 3.3). Все приготовленные пробы были проанализированы в трех повторах методами ПФИА и ВЭЖХ-МС/МС. Присутствие 2,4-Д, триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола в образцах методом ПФИА не детектировалось, то есть, содержание этих веществ не превышало пределов обнаружения разработанных методик (таблица 35). Присутствие 2,4-Д, триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола в зерне методом ВЭЖХ-МС/МС также не детектировалось.

Образцы зерна не содержат аналитов в детектируемых концентрациях. Тем не менее, сельскохозяйственные культуры и продукты питания необходимо проверять на содержание токсичных веществ, в частности пестицидов, для выявления превышения норм их применения в сельском хозяйстве и дальнейшего предотвращения таких нарушений.

Таблица 35 – Результаты анализа 2,4-Д, триазофоса, карбарила, тиабендазол и тетраконазола в образцах зерна

Образец	Регион	2,4-Д, мкг/кг	Триазофос, мкг/кг	Карбарил, мкг/кг	Тиабендазол, мкг/кг	Тетраконазол, мкг/кг
1	Московская область	< 40	< 40	< 20	< 20	< 200
2	Московская область	< 40	< 40	< 20	< 20	< 200
3	Тверская область	< 40	< 40	< 20	< 20	< 200
4	Тверская область	< 40	< 40	< 20	< 20	< 200
5	Тверская область	< 40	< 40	< 20	< 20	< 200
6	Тверская область	< 40	< 40	< 20	< 20	< 200

### Выводы

1. Для ПФИА 2,4-Д, триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола осуществлен синтез 29 трейсеров, различных по структуре гаптена, флуоресцентной метки и длине углеродной цепи фрагмента, соединяющего флуоресцентную метку с гаптенем. Структуры трейсеров подтверждены методом ВЭЖХ-МС/МС.
2. Оптимизированы условия ПФИА: выбраны иммунореагенты и их концентрации, определено оптимальное время инкубации. Выбраны трейсеры, использование которых позволяет достичь наилучшей чувствительности анализа, минимизировать затраты реагентов и увеличить рабочий диапазон значений аналитического сигнала: 2,4-Д-АМФ для анализа 2,4-Д, Триаз4С-ЭДФ для анализа триазофоса, Карб6С-ЭДФ для анализа карбарила, Тбз3С-АМФ для анализа тиабендазола и Ткз6С-АМФ для анализа тетраконазола. Использование трейсера Триаз4С-ЭДФ позволяет получить 10-кратное преимущество в чувствительности определения триазофоса по сравнению с Триаз4С-АМФ.
3. Разработаны экспрессные методики определения триазофоса, карбарила, тиабендазола, тетраконазола и 2,4-Д в зерне. Оптимизированы условия пробоподготовки зерна, включающей ультразвуковую экстракцию, разбавление экстрактов и центрифугирование. Использование 70% метанола для экстракции триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола, а для экстракции 2,4-Д карбонатного буферного раствора с добавлением метанола позволяет достичь приемлемых степеней извлечения и минимизирует матричный эффект в ПФИА. Предел обнаружения и нижняя граница определяемых содержаний в зерне составляют 40 и 80 мкг/кг для 2,4-Д, 40 и 40 мкг/кг для триазофоса, 20 и 60 мкг/кг для карбарила, 20 и 40 мкг/кг для тиабендазола, 200 и 600 мкг/кг для тетраконазола.
4. Разработанные методики определения пестицидов апробированы на искусственно контаминированных образцах пшеничного зерна в тесте «введено-найдено», а также на коммерчески доступных образцах зерна. Данные ПФИА подтверждены методом ВЭЖХ-МС/МС. Результаты, полученные двумя методами, хорошо согласуются между собой – значения  $R^2$  для анализа 2,4-Д, триазофоса, карбарила, тиабендазола и тетраконазола составляли 0,997, 0,974, 0,987, 0,998 и 0,999, соответственно.

**Список литературы**

1. Mostafalou, S. Pesticides: an update of human exposure and toxicity / S. Mostafalou, M. Abdollahi // Archives of toxicology. – 2017. – Vol. 91. – № 2. – P. 549-599.
2. Garcia, F. P. Pesticides: classification, uses and toxicity. Measures of exposure and genotoxic risks / F. P. Garcia, S. Y. C. Ascencio, J. C. G. Oyarzun, A. C. Hernandez, P. V. Alavarado // Journal of Research in Environmental Science and Toxicology. – 2012. – Vol. 1. – № 11. – P. 279-293.
3. Ullah, S. Ecotoxicology: a review of pesticides induced toxicity in fish / S. Ullah, M. J. Zorriehzahra // Advances in Animal and Veterinary Sciences. – 2015. – Vol. 3. – № 1. – P. 40-57.
4. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 10 мая 2018 г. № 33 «Об утверждении Гигиенических Нормативов ГН 1.2.3539-18 Гигиенические нормативы содержания пестицидов в объектах окружающей среды (перечень)» [Электронный ресурс]. – 2018. – 134 с. – Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/557532326>.
5. Willett, K. L. Differential toxicity and environmental fates of hexachlorocyclohexane isomers / K. L. Willett, E. M. Ulrich, R. A. Hites // Environmental Science & Technology. – 1998. – Vol. 32. – № 15. – P. 2197-2207.
6. Lotufo, G. R. DDT toxicity and critical body residue in the amphipod *Leptocheirus plumulosus* in exposures to spiked sediment / G. R. Lotufo, J. D. Farrar, B. M. Duke, T. S. Bridges // Archives of Environmental Contamination and Toxicology. – 2001. – Vol. 41. – № 2. – P. 142-150.
7. Buhler, D. R. Chronic oral DDT toxicity in juvenile coho and chinook salmon / D. R. Buhler, M. E. Rasmusson, W. E. Shanks // Toxicology and applied pharmacology. – 1969. – Vol. 14. – № 3. – P. 535-555.
8. Song, Y. Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide / Y. Song // Journal of integrative plant biology. – 2014. – Vol. 56. – № 2. – P. 106-113.
9. Bukowska, B. Toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid — molecular mechanisms / B. Bukowska // Polish Journal of Environmental Studies. – 2006. – Vol. 15. – № 3. – P. 365-374.
10. World Health Organization. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2009. – Geneva: WHO Press, 2010. – 78 p. – ISBN 978-92-4-154796-3.
11. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации (по состоянию на 26 апреля 2018 г.). – М.: МСХ России, 2018. – 960 с.
12. Sanchez-Santed, F. Organophosphate pesticide exposure and neurodegeneration / F. Sanchez-Santed, M. T. Colomina, E. H. Hernández // Cortex. – 2016. – Vol. 74. – P. 417-426.

13. Thiermann, H. Lessons to be learnt from organophosphorus pesticide poisoning for the treatment of nerve agent poisoning / H. Thiermann, L. Szinicz, P. Eyer, N. Felgenhauer, T. Zilker, F. Worek // *Toxicology*. – 2007. – Vol. 233. № 1. P. 145-154.
14. Eto, M. *Organophosphorus pesticides* / M. Eto. – Boca Raton: CRC press, 2018. – 399 p.  
(2018). *Organophosphorus pesticides*. CRC press. 399.
15. Liao, M. Impact of triazophos insecticide on paddy soil environment / M. Liao, S. Abid, C. Y. Huang, Z. M. Xie // *Journal of Environmental Sciences*. – 2002. – Vol. 14. – № 3. – P. 309-316.
16. Rani, S. Persistence and dissipation behavior of triazophos in canal water under Indian climatic conditions / S. Rani, V. K. Madan, T. S. Kathpal // *Ecotoxicology and environmental safety*. – 2001. – Vol. 50. – № 1. – P. 82-84.
17. Gambi, N. Acetylcholinesterase activity in the earthworm *Eisenia andrei* at different conditions of carbaryl exposure / N. Gambi, A. Pasteris, E. Fabbri // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. – 2007. – Vol. 145. – № 4. – P. 678-685.
18. Darvesh, S. Carbamates with differential mechanism of inhibition toward acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase / S. Darvesh, K. V. Darvesh, R. S. McDonald, D. Mataija, R. Walsh, S. Mothana, O. Lockridge, E. Martin // *Journal of medicinal chemistry*. – 2008. – Vol. 51. – № 14. – P. 4200-4212.
19. Baraldi, E. Studies on thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of pears: pathogenic fitness and genetic characterization / E. Baraldi, M. Mari, E. Chierici, M. Pondrelli, P. Bertolini, G. C. Pratella // *Plant Pathology*. – 2003. – Vol. 52. – № 3. – P. 362-370.
20. Allen, P. M. Mechanism of action of the fungicide thiabendazole, 2-(4'-thiazolyl) benzimidazole / P. M. Allen, D. Gottlieb // *Applied microbiology*. – 1970. – Vol. 20. – № 6. – P. 919-926.
21. Robinson, H. J. Thiabendazole: toxicological, pharmacological and antifungal properties / H. J. Robinson, R. H. Silber, O. E. Graessle // *Texas reports on biology and medicine*. – 1969. – Vol. 27. – № 2. – P. 537-560.
22. Rosman, Y. Carbamate poisoning: treatment recommendations in the setting of a mass casualties event / Y. Rosman, I. Makarovsky, Y. Bentur, S. Shrot, T. Dushnistky, A. Krivoy // *American Journal of Emergency Medicine*. – 2009. – Vol. 27. – № 9. – P. 1117-1124.
23. Smolka, S. Cytological studies on the mode of action of systemic fungicides on the host pathogen complex barley-powdery mildew (*Erysiphegraminis* f. sp. *hordeimarchal*) / S. Smolka, G. Wolf // *Pesticide Science*. – 1986. – Vol. 17. – № 3. – P. 249-255.
24. Kano, R. In vitro resistance of *Aspergillus fumigatus* to azole farm fungicide / R. Kano, H. Sobukawa, S. Y. Murayama, D. Hirose, Y. Tanaka, Y. Kosuge, A. Hasegawa, H. Kamata // *Journal of Infection and Chemotherapy*. – 2016. – Vol. 22. – № 3. – P. 133-136.

25. Zolotarev, K.V. Dependence between LD 50 for rodents and LC 50 for adult fish and fish embryos / K. V. Zolotarev, N. F. Belyaeva, A. N. Mikhailov, M. V. Mikhailova // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2017. – Vol. 162. – № 4. – P. 445-450.
26. Bolčič-Tavčar, M. Prediction of mutagenicity, carcinogenicity, developmental toxicity, and skin sensitisation with CAESAR program for a set of conazoles / M. Bolčič-Tavčar, M. Vračko // *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. – 2012. – Vol. 63. – № 3. – P. 283-292.
27. Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к продукции (товарам), подлежащей санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) (с изменениями на 10 мая 2018 года) [Электронный ресурс]. – 2018. – 1011 с. – Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/902249109>.
28. Parrilla, P. Optimization of the separation, isolation and recovery of selected pesticides in water samples by solid-phase extraction and HPLC photodiode array detection / P. Parrilla, J. L. Martinez-Vtdal, A. R. Fernandez-Alba // *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. – 1993. – Vol. 16. – № 18. – P. 4019-4029.
29. Thapar, S. Degradation of organophosphorus and carbamate pesticides in soils—HPLC determination / S. Thapar, R. Bhushan, R. P. Mathur // *Biomedical Chromatography*. – 1995. – Vol. 9. – № 1. – P. 18-22.
30. Vichapong, J. Determination of benzimidazole anthelmintics using HPLC after vortex-assisted mixed anionic–cationic surfactant-enhanced emulsification microextraction with solidification of floating organic droplet procedure / J. Vichapong, Y. Santaladchaiyakit, R. Burakham, W. Kanchanamayoon, S. Srijaranai // *Journal of Food Composition and Analysis*. – 2015. – Vol. 37. – P. 30-37.
31. Díaz-Álvarez, M. Hollow fiber membrane-protected molecularly imprinted microspheres for micro solid-phase extraction and clean-up of thiabendazole in citrus samples / M. Díaz-Álvarez, A. Martín-Esteban // *Journal of Chromatography A*. – 2018. – Vol. 1531. – P. 39-45.
32. Wang, S. Multiresidue determination of fluoroquinolones, organophosphorus and N-methyl carbamates simultaneously in porcine tissue using MSPD and HPLC–DAD / S. Wang, H. Mu, Y. Bai, Y. Zhang, H. Liu // *Journal of Chromatography B*. – 2009. – Vol. 877. – № 27. – P. 2961-2966.
33. Xu, Z. L. Monitoring of organophosphorus pesticides in vegetables using monoclonal antibody-based direct competitive ELISA followed by HPLC–MS/MS / Z. L. Xu, H. Deng, X. F. Deng, J. Y. Yang, Y. M. Jiang, D. P. Zeng, F. Huang, Y. D. Shen, H. T. Lei, H. Wang, Y. M. Sun // *Food Chemistry*. – 2012. – Vol. 131. – № 4. – P. 1569-1576.

34. Pei, M. Graphene reinforced multiple monolithic fiber solid-phase microextraction of phenoxyacetic acid herbicides in complex samples / M. Pei, X. Shi, J. Wu, X. Huang // *Talanta*. – 2019. – Vol. 191. – P. 257-264.
35. Ji, Z. A highly sensitive and selective method for determination of phenoxy carboxylic acids from environmental water samples by dispersive solid-phase extraction coupled with ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry / Z. Ji, J. Cheng, C. Song, N. Hu, W. Zhou, Y. Suo, Z. Sun, J. You // *Talanta*. – 2019. – Vol. 191. – P. 313-323.
36. Lee, S. J. Multiresidue analysis of 47 pesticides in cooked wheat flour and polished rice by liquid chromatography with tandem mass spectrometry / S. J. Lee, H. J. Park, W. Kim, J. S. Jin, A. M. Abd El-Aty, J. H. Shim, S. C. Shin // *Biomedical Chromatography*. – 2009. – Vol. 23. – № 4. – P. 434-442.
37. Carneiro, R. P. Development and method validation for determination of 128 pesticides in bananas by modified QuEChERS and UHPLC–MS/MS analysis / R. P. Carneiro, F. A. Oliveira, F. D. Madureira, G. Silva, W. R. de Souza, R. P. Lopes // *Food Control*. – 2013. – Vol. 33. – № 2. – P. 413-423.
38. Zhang, H. Analysis of tebuconazole and tetraconazole enantiomers by chiral HPLC-MS/MS and application to measure enantioselective degradation in strawberries / H. Zhang, M. Qian, X. Wang, X. Wang, H. Xu, P. Qi, Q. Wang, M. Wang // *Food Analytical Methods*. – 2012. – Vol. 5. – № 6. – P. 1342-1348.
39. Young, M. S. Application of a mixed-mode solid-phase extraction and cleanup procedure for LC/MS determination of thiabendazole and carbendazim in apple juice / M. S. Young, M. F. Early, C. R. Mallet, J. Krol // *Journal of AOAC International*. – 2001. – Vol. 84. – № 5. – P. 1608-1613.
40. Lehotay, S. J. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables / S. J. Lehotay, K. A. Son, H. Kwon, U. Koesukwiwat, W. Fu, K. Mastovska, E. Hoh, N. Leepitapiboon // *Journal of Chromatography A*. – 2010. – Vol. 1217. – № 16. – P. 2548-2560.
41. Mastovska, K. Pesticide multiresidue analysis in cereal grains using modified QuEChERS method combined with automated direct sample introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS techniques / K. Mastovska, K. J. Dorweiler, S. J. Lehotay, J. S. Wegscheid, K. A. Szpylka // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2009. – Vol. 58. – № 10. – P. 5959-5972.
42. Chen, J. H. LC-MS/MS method for simultaneous determination of myclobutanil, hexaconazole, diniconazole, epoxiconazole and tetraconazole enantiomers in soil and earthworms / J. H. Chen, H. L. Wang, B. Y. Guo, J. Z. Li // *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. – 2014. – Vol. 94. – № 8. – P. 791-800.

43. Fernandez, M. Liquid chromatographic–mass spectrometric determination of post-harvest fungicides in citrus fruits / M. Fernandez, R. Rodriguez, Y. Pico, J. Manes // *Journal of Chromatography A*. – 2001. – Vol. 912. – № 2. – P. 301-310.
44. Kundu, A. Persistence behaviour of tetraconazole in watermelon / A. Kundu, S. Mukherjee, B. Ghosh, A. Goon, S. Roy, K. Chakrabarti, A. Bhattacharyya // *Journal of Crop and Weed*. – 2014. – Vol. 10. – № 2. – P. 355-358.
45. Bordagaray, A. Determination of triazole fungicides in liquid samples using ultrasound-assisted emulsification microextraction with solidification of floating organic droplet followed by high-performance liquid chromatography / A. Bordagaray, R. Garcia-Arrona, E. Millán // *Food Analytical Methods*. – 2014. – Vol. 7. – № 6. – P. 1195-1203.
46. Guan, Y. Modified QuEChERS method for the analysis of 11 pesticide residues in tea by liquid chromatography–tandem mass spectrometry / Y. Guan, H. Tang, D. Chen, T. Xu, L. Li // *Analytical Methods*. – 2013. – Vol. 5. – № 12. – P. 3056-3067.
47. Amani, V. Determination of 2, 4-D in environmental samples by three phases directly suspended LPME combined with HPLC-UV / V. Amani, S. Roshan, A. A. Asgharinezhad, E. Najafi, H. Abedi, N. Tavassoli, H. R. L. Z. Zhad // *Analytical Methods*. – 2011. – Vol. 3. – № 10. – P. 2261-2267.
48. Rajski, Ł. Evaluation of MS2 workflows in LC-Q-Orbitrap for pesticide multi-residue methods in fruits and vegetables / Ł. Rajski, M. D. M. G. Ramos, A. R. Fernández-Alba // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2017. – Vol. 409. – № 23. – P. 5389-5400.
49. Anastassiades, M. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce / M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Štajnbaher, F. J. Schenck // *Journal of AOAC International*. – 2003. – Vol. 86. – № 2. – P. 412-431.
50. Xiong, J. Comparison of hollow fiber liquid phase microextraction and dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of organosulfur pesticides in environmental and beverage samples by gas chromatography with flame photometric detection / J. Xiong, B. Hu // *Journal of Chromatography A*. – 2008. – Vol. 1193. – № 1. – P. 7-18.
51. Suárez, R. Determination of herbicides in environmental water samples by simultaneous in syringe magnetic stirring assisted dispersive liquid–liquid microextraction and silylation followed by GC–MS / R. Suárez, S. Clavijo, A. González, V. Cerdà // *Journal of separation science*. – 2018. – Vol. 41. – № 5. – P. 1096-1103.

52. Ding, W. H. Analysis of chlorophenoxy acid herbicides in water by large-volume on-line derivatization and gas chromatography–mass spectrometry / W. H. Ding, C. H. Liu, S. P. Yeh // *Journal of Chromatography A*. – 2000. – Vol. 896. – № 1. – P. 111-116.
53. Tankiewicz, M. Fast, sensitive and reliable multi-residue method for routine determination of 34 pesticides from various chemical groups in water samples by using dispersive liquid–liquid microextraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry / M. Tankiewicz, M. Biziuk // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2018. – Vol. 410. – № 5. – P. 1533-1550.
54. Quintana, J. B. Multiresidue analysis of acidic and polar organic contaminants in water samples by stir-bar sorptive extraction–liquid desorption–gas chromatography–mass spectrometry / J. B. Quintana, R. Rodil, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez // *Journal of Chromatography A*. – 2007. – Vol. 1174. – № 1. – P. 27-39.
55. Oh-Shin, Y. S. Simultaneous quantification of insecticides including carbaryl in drinking water by gas chromatography using dual electron-capture and nitrogen–phosphorus detection / Y. S. Oh-Shin, M. Ko, H. S. Shin // *Journal of Chromatography A*. – 1997. – Vol. 769. – № 2. – P. 285-291.
56. Anastassiades, M. Analysis of carbendazim, benomyl, thiophanate methyl and 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in fruits and vegetables after supercritical fluid extraction / M. Anastassiades, W. Schwack // *Journal of Chromatography A*. – 1998. – Vol. 825. – № 1. – P. 45-54.
57. Lehotay, S. J. Automated mini-column solid-phase extraction cleanup for high-throughput analysis of chemical contaminants in foods by low-pressure gas chromatography—tandem mass spectrometry / S. J. Lehotay, L. Han, Y. Sapozhnikova // *Chromatographia*. – 2016. – Vol. 79. – № 17. – P. 1113-1130.
58. Wiest, L. Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection / L. Wiest, A. Buleté, B. Giroud, C. Fratta, S. Amic, O. Lambert, H. Pouliquen, C. Arnaudguilhem // *Journal of Chromatography A*. – 2011. – Vol. 1218. – № 34. – P. 5743-5756.
59. Yang, Y. A multiresidue method for simultaneous determination of 44 organophosphorous pesticides in *Pogostemon cablin* and related products using modified QuEChERS sample preparation procedure and GC–FPD / Y. Yang, W. Kong, L. Zhao, Q. Xiao, H. Liu, X. Zhao, M. Yang // *Journal of Chromatography B*. – 2015. – Vol. 974. – P. 118-125.
60. Nguyen, T. D. A multiresidue method for the determination of 107 pesticides in cabbage and radish using QuEChERS sample preparation method and gas chromatography mass spectrometry / T. D. Nguyen, J. E. Yu, D. M. Lee, G. H. Lee // *Food Chemistry*. – 2008. – Vol. 110. – № 1. – P. 207-213.

61. Petrarca, M. H. Multiclass pesticide analysis in fruit-based baby food: a comparative study of sample preparation techniques previous to gas chromatography–mass spectrometry / M. H. Petrarca, J. O. Fernandes, H. T. Godoy, S. C. Cunha // *Food Chemistry*. – 2016. – Vol. 212. – P. 528-536.
62. Mondal, R. Validation of multiresidue method for analysis of 31 pesticides in rice using gas chromatography-tandem mass spectrometry / R. Mondal, R. K. Kole, A. Bhattacharyya // *Journal of AOAC International*. – 2017. – Vol. 100. – № 4. – P. 1094-1101.
63. Tsuchiyama, T. Compensation of matrix effects in gas chromatography–mass spectrometry analysis of pesticides using a combination of matrix matching and multiple isotopically labeled internal standards / T. Tsuchiyama, M. Katsuhara, M. Nakajima // *Journal of Chromatography A*. – 2017. – Vol. 1524. – P. 233-245.
64. Cervera, M. I. Screening and quantification of pesticide residues in fruits and vegetables making use of gas chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization / M. I. Cervera, T. Portolés, F. J. López, J. Beltrán, F. Hernández // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2014. – Vol. 406. – № 27. – P. 6843-6855.
65. Huang, Z. Simultaneous determination of 102 pesticide residues in Chinese teas by gas chromatography–mass spectrometry / Z. Huang, Y. Li, B. Chen, S. Yao // *Journal of Chromatography B*. – 2007. – Vol. 853. – № 1. – P. 154-162.
66. Amer, M. M. Determination of tetraconazole and diniconazole fungicide residues in tomatoes and green beans by capillary gas chromatography / M. M. Amer, M. A. Shehata, H. M. Lotfy, H. H. Monir // *Yakugaku Zasshi*. – 2007. – Vol. 127. – № 6. – P. 993-999.
67. Koesukwiwat, U. Rapid determination of phenoxy acid residues in rice by modified QuEChERS extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry / U. Koesukwiwat, K. Sanguankaew, N. Leepipatpiboon // *Analytica Chimica Acta*. – 2008. – Vol. 626. – № 1. – P. 10-20.
68. Grimalt, S. Review of analytical methods for the determination of pesticide residues in grapes / S. Grimalt, P. Dehouck // *Journal of Chromatography A*. – 2016. – Vol. 1433. – P. 1-23.
69. Petropoulou, S. S. E. Gas chromatographic–tandem mass spectrometric method for the quantitation of carbofuran, carbaryl and their main metabolites in applicators' urine / S. S. E. Petropoulou, E. Gikas, A. Tsiropoulos, P. A. Siskos // *Journal of Chromatography A*. – 2006. – Vol. 1108. – № 1. – P. 99-110.
70. Golge, O. Determination of 115 pesticide residues in oranges by high-performance liquid chromatography–triple-quadrupole mass spectrometry in combination with QuEChERS method / O. Golge, B. Kabak // *Journal of Food Composition and Analysis*. – 2015. – Vol. 41. – P. 86-97.

71. Golge, O. Validation of a modified QuEChERS method for the determination of 167 pesticides in milk and milk products by LC-MS/MS / O. Golge, A. Koluman, B. Kabak // *Food Analytical Methods*. – 2018. – Vol. 11. – № 4. – P. 1122-1148.
72. Koesukwiwat, U. High throughput analysis of 150 pesticides in fruits and vegetables using QuEChERS and low-pressure gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry / U. Koesukwiwat, S. J. Lehotay, S. Miao, N. Leepipatpiboon // *Journal of Chromatography A*. – 2010. – Vol. 1217. – № 43. – P. 6692-6703.
73. Chamkasem, N. Analysis of 136 pesticides in avocado using a modified QuEChERS method with LC-MS/MS and GC-MS/MS / N. Chamkasem, L. W. Ollis, T. Harmon, S. Lee, G. Mercer // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2013. – Vol. 61. – № 10. – P. 2315-2329.
74. Pei, X. Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: a review / X. Pei, B. Zhang, J. Tang, B. Liu, W. Lai, D. Tang // *Analytica Chimica Acta*. – 2013. – Vol. 758. – P. 1-18.
75. Пивень, Н. В. Методы иммунохимического анализа с использованием меченых реагентов / Н. В. Пивень, А. И. Бураковский // *Имунопатология, аллергология, инфектология*. – 2012. – Vol. 1. – P. 93-102.
76. Borrebaeck, C. A. Antibodies in diagnostics—from immunoassays to protein chips / C. A. Borrebaeck // *Immunology today*. – 2000. – Vol. 21. – № 8. – P. 379-382.
77. Rubtsova, M. Y. Chemiluminescent immunoassay: Application of a portable scanning luminometer for the determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in microtiter and membrane strip format / M. Y. Rubtsova, C. Wittmann, A. M. Egorov, R. D. Schmid // *Food and Agricultural Immunology*. – 1997. – Vol. 9. – № 4. – P. 235-247.
78. Hall, J. C. Enzyme immunoassay based survey of precipitation and surface water for the presence of atrazine, metolachlor and 2,4-D / J. C. Hall, T. D. Van Deynze, J. Struger, C. H. Chan // *Journal of Environmental Science and Health Part B*. – 1993. – Vol. 28. – № 5. – P. 577-598.
79. Richman, S. J. Low-level immunoassay screen for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in apples, grapes, potatoes, and oranges: circumventing matrix effects / S. J. Richman, S. Karthikeyan, D. A. Bennett, A. C. Chung, S. M. Lee // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1996. – Vol. 44. – № 9. – P. 2924-2929.
80. Cuong, N. V. Development of a dipstick immunoassay for quantitative determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in water, fruit and urine samples / N. V. Cuong, T. T. Bachmann, R. D. Schmid // *Fresenius' journal of analytical chemistry*. – 1999. – Vol. 364. – № 6. – P. 584-589.

81. Newsome, W. H. Determination of 2,4-D in foods by enzyme-linked immunosorbent assay / W. H. Newsome, P. G. Collins // *Food and Agricultural Immunology*. – 1989. – Vol. 1. – № 4. – P. 203-210.
82. Hall, J. C. Immunoassays for the detection of 2, 4-D and picloram in river water and urine / J. C. Hall, R. J. Deschamps, K. K. Krieg // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1989. – Vol. 37. – № 4. – P. 981-984.
83. Dzgoev, A. Optimization of a charge coupled device imaging enzyme linked immuno sorbent assay and supports for the simultaneous determination of multiple 2,4-D samples / A. Dzgoev, M. Mecklenburg, B. Xie, A. Miyabayashi, P. O. Larsson, B. Danielsson // *Analytica Chimica Acta*. – 1997. – Vol. 347. – № 1. – P. 87-93.
84. Chuang, J. S. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for the measurement of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in human urine / J. S. Chuang, J. M. Van Emon, J. Durnford, K. Thomas // *Talanta*. – 2005. – Vol. 67. – № 3. – P. 658-666.
85. Vdovenko, M. M. Quantification of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in oranges and mandarins by chemiluminescent ELISA / M. M. Vdovenko, A. S. Stepanova, S. A. Eremin, N. Van Cuong, N. A. Uskova, I. Y. Sakharov // *Food Chemistry*. – 2013. – Vol. 141. – № 2. – P. 865-868.
86. Liang, C. Enzyme-linked immunosorbent assay based on a monoclonal antibody for the detection of the insecticide triazophos: assay optimization and application to environmental samples / C. Liang, R. Jin, W. Gui, G. Zhu // *Environmental Science & Technology*. – 2007. – Vol. 41. – № 19. – P. 6783-6788.
87. Jin, R. Y. Comparison of monoclonal antibody-based ELISA for triazophos between the indirect and direct formats / R. Y. Jin, W. J. Gui, Y. R. Guo, C. M. Wang, J. X. Wu, G. N. Zhu // *Food and Agricultural Immunology*. – 2008. – Vol. 19. – № 1. – P. 49-60.
88. Jin, R. Y. Development of a bispecific monoclonal antibody to pesticide carbofuran and triazophos using hybrid hybridomas / R. Y. Jin, Y. R. Guo, C. M. Wang, J. X. Wu, G. N. Zhu // *Journal of Food Science*. – 2009. – Vol. 74. – № 1. – P. 1-6.
89. Gui, W. An improved rapid on-site immunoassay for triazophos in environmental samples / W. Gui, C. Liang, Y. Guo, G. Zhu // *Analytical letters*. – 2010. – Vol. 43. – № 3. – P. 487-498.
90. Xu, Z. L. Monoclonal antibody-based broad-specificity immunoassay for monitoring organophosphorus pesticides in environmental water samples / Z. L. Xu, D. P. Zeng, J. Y. Yang, Y. D. Shen, R. C. Beier, H. T. Lei, H. Wang, Y. M. Sun // *Journal of Environmental Monitoring*. – 2011. – Vol. 13. – № 11. – P. 3040-3048.
91. Xu, Z. L. Development of a solid-phase extraction coupling chemiluminescent enzyme immunoassay for determination of organophosphorus pesticides in environmental water samples / Z. L.

- Xu, W. J. Sun, J. Y. Yang, Y. M. Jiang, K. Campbell, Y. D. Shen, H. T. Lei, D. P. Zeng, H. Wang, Y. M. Sun // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2012. – Vol. 60. – № 9. – P. 2069-2075.
92. Du, P. A rapid immunomagnetic-bead-based immunoassay for triazophos analysis / P. Du, M. Jin, L. Yang, X. Du, G. Chen, C. Zhang, F. Jin, H. Shao, Y. She, S. Wang, L. Zheng, J. Wang // *RSC Advances*. – 2015. – Vol. 5. – № 99. – P. 81046-81051.
93. Du, P. Competitive colorimetric triazophos immunoassay employing magnetic microspheres and multi-labeled gold nanoparticles along with enzymatic signal enhancement / P. Du, M. Jin, G. Chen, C. Zhang, X. Cui, Yu. Zhang, Ya. Zhang, P. Zou, Z. Jiang, X. Cao, Y. She, F. Jin, J. Wang // *Microchimica Acta*. – 2017. – Vol. 184. – № 10. – P. 3705-3712.
94. Jin, M. Enhanced competitive chemiluminescent enzyme immunoassay for the trace detection of insecticide triazophos / M. Jin, H. Shao, F. Jin, W. Gui, X. Shi, J. Wang, G. Zhu // *Journal of Food Science*. – 2012. – Vol. 77. – № 5. – P. 99-104.
95. Chen, G. The rapid screening of triazophos residues in agricultural products by chemiluminescent enzyme immunoassay / G. Chen, L. Yang, M. Jin, P. Du, C. Zhang, J. Wang, H. Shao, F. Jin, L. Zheng, S. Wang, Y. She, J. Wang // *PloS One*. – 2015. – Vol. 10. – № 7. – P. e0133839.
96. Itak, J. A. Validation of a paramagnetic particle-based ELISA for the quantitative determination of carbaryl in water / J. A. Itak, E. G. Olson, J. R. Fleeker, D. P. Herzog // *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. – 1993. – Vol. 51. – № 2. – P. 260-267.
97. Gabaldon, J. A. Determination of atrazine and carbaryl pesticide residues in vegetable samples using a multianalyte dipstick immunoassay format / J. A. Gabaldon, J. M. Cascales, S. Morias, A. Maquieira, R. Puchades // *Food Additives & Contaminants*. – 2003. – Vol. 20. – № 8. – P. 707-715.
98. Wang, S. Development of a flow-through enzyme-linked immunosorbent assay and a dipstick assay for the rapid detection of the insecticide carbaryl / S. Wang, C. Zhang, Y. Zhang // *Analytica Chimica Acta*. – 2005. – Vol. 535. – № 1. – P. 219-225.
99. Marco, M. P. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for carbaryl / M. P. Marco, S. J. Gee, H. M. Cheng, Z. Y. Liang, B. D. Hammock // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1993. – Vol. 41. – № 3. – P. 423-430.
100. Marco, M. P. Validation of two immunoassay methods for environmental monitoring of carbaryl and 1-naphthol in ground water samples / M. P. Marco, S. Chiron, J. Gascon, B. D. Hammock., D. Barcelo // *Analytica Chimica Acta*. – 1995. – Vol. 311. – P. 319-329.
101. Abad, A. Application of a monoclonal antibody-based ELISA to the determination of carbaryl in apple and grape juices / A. Abad, A. Montoya // *Analytica Chimica Acta*. – 1995. – Vol. 311. – № 3. – P. 365-370.

102. Abad, A. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay to carbaryl. 2. Assay optimization and application to the analysis of water samples / A. Abad, A. Montoya // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1997. – Vol. 45. – № 4. – P. 1495-1501.
103. Nunes, G. S. Validation of an immunoassay method for the determination of traces of carbaryl in vegetable and fruit extracts by liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection / G. S. Nunes, M. P. Marco, M. L. Ribeiro, D. Barcelo // *Journal of Chromatography A*. – 1998. – Vol. 823. – № 1. – P. 109-120.
104. Abad, A. Determination of carbaryl, carbofuran and methiocarb in cucumbers and strawberries by monoclonal enzyme immunoassays and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: an analytical comparison / A. Abad, M. J. Moreno, R. Pelegrí, M. I. Martínez, A. Sáez, M. Gamón, A. Montoya // *Journal of Chromatography A*. – 1999. – Vol. 833. – № 1. – P. 3-12.
105. Nunes, G. S. Direct application of an enzyme-linked immunosorbent assay method for carbaryl determination in fruits and vegetables. Comparison with a liquid chromatography–postcolumn reaction fluorescence detection method / G. S. Nunes, M. P. Marco, M. Farre, D. Barcelo // *Analytica Chimica Acta*. – 1999. – Vol. 387. – № 3. – P. 245-253.
106. Abad, A. Monoclonal enzyme immunoassay for the analysis of carbaryl in fruits and vegetables without sample cleanup / A. Abad, M. J. Moreno, R. Pelegrí, M. I. Martínez, A. Sáez, M. Gamón, A. Montoya // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2001. – Vol. 49. – № 4. – P. 1707-1712.
107. Wang, S. Rapid enzyme immunoassays for the detection of carbaryl and methoprene in grains / S. Wang, R. D. Allan, A. S. Hill, I. R. Kennedy // *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. – 2002. – Vol. 37. – № 6. – P. 521-532.
108. Mickova, B. Correlation study of enzyme-linked immunosorbent assay and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the determination of N-methylcarbamate insecticides in baby food / B. Mickova, J. Zrostlikova, J. Hajslova, P. Rauch, M. J. Moreno, A. Abad, A. Montoya // *Analytica Chimica Acta*. – 2003. – Vol. 495. – № 1. – P. 123-132.
109. Mickova, B. Analytical performances of validated chemiluminescent enzyme immunoassays to detect N-methylcarbamate pesticides / B. Mickova, T. Kovalczuk, P. Rauch, M. J. Moreno, A. Abad, A. Montoya, E. Ferri, F. Fini, S. Girotti // *Analytica Chimica Acta*. – 2005. – Vol. 528. – № 2. – P. 243-248.
110. Wang, S. Enzyme immunoassay for the determination of carbaryl residues in agricultural products / S. Wang, C. Yu, J. Wang // *Food additives and contaminants*. – 2005. – Vol. 22. – № 8. – P. 735-742.

111. Wang, S. Tube-immunoassay for rapid detection of carbaryl residues in agricultural products / S. Wang, C. Yu, Y. Zhang, J. Wang, Z. Duan, J. Zhang // *Journal of Environmental Science and Health Part B.* – 2006. – Vol. 41. – № 5. – P. 693-704.
112. Sun, J. Development of enzyme linked immunoassay for the simultaneous detection of carbaryl and metolcarb in different agricultural products / J. Sun, T. Dong, Y. Zhang, S. Wang // *Analytica Chimica Acta.* – 2010. – Vol. 666. – № 1. – P. 76-82.
113. Dong, T. Development of a sensitivity-improved immunoassay for the determination of carbaryl in food samples / T. Dong, J. Sun, B. Liu, Y. Zhang, Y. Song, S. Wang // *Journal of the Science of Food and Agriculture.* – 2010. – Vol. 90. – № 7. – P. 1106-1112.
114. Sun, J. W. Development of chemiluminescence enzyme-linked immunosorbent assay for the screening of metolcarb and carbaryl in orange juice, cabbage and cucumber / J. W. Sun, Y. Zhang, S. Wang // *Food Additives and Contaminants.* – 2010. – Vol. 27. – № 3. – P. 338-346.
115. Moreno, M. J. Comparative study of monoclonal and recombinant antibody-based immunoassays for fungicide analysis in fruit juices / M. J. Moreno, E. Plana, J. J. Manclús, A. Montoya // *Food Analytical Methods.* – 2014. – Vol. 7. – № 2. – P. 481-489.
116. Brandon, D.L. A monoclonal antibody-based ELISA for thiabendazole in liver / D. L. Brandon, R. G. Binder, A. H. Bates, W. C. Montague // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* – 1992. – Vol. 40. – № 9. – P. 1722-1726.
117. Brandon, D. L. Rapid screening for benzimidazole residues in bovine liver / D. L. Brandon, K. P. Holland, J. S. Dreas, A. C. Henry // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* – 1998. – Vol. 46. – № 9. – P. 3653-3656.
118. Brandon, D. L. Analysis of thiabendazole in potatoes and apples by ELISA using monoclonal antibodies / D. L. Brandon, R. G. Binder, R. E. Wilson, W. C. Montague // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* – 1993. – Vol. 41. – № 6. – P. 996-999.
119. Bushway, R. J. Quantitative determination of thiabendazole in fruit juices and bulk juice concentrates using a thiabendazole monoclonal antibody / R. J. Bushway, D. L. Brandon, A. H. Bates, L. Li, K. A. Larkin, B. S. Young // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* – 1995. – Vol. 43. – № 5. – P. 1407-1412.
120. Brandon, D. L. Competitive ELISA of thiabendazole residues in produce using indirectly immobilized monoclonal antibodies / D. L. Brandon, R. G. Binder, A. H. Bates, W. C. Montague // *Food and Agricultural Immunology.* – 1995. – Vol. 7. – № 2. – P. 99-108.
121. Bushway, R. J. Determination of thiabendazole in potatoes by ELISA / R. J. Bushway, K. Larkin, B. Perkins // *Food and Agricultural Immunology.* – 1997. – Vol. 9. – № 4. – P. 249-255.

122. Abad, A. Determination of thiabendazole in fruit juices by a new monoclonal enzyme immunoassay / A. Abad, J. J. Manclús, M. J. Moreno, A. Montoya // *Journal of AOAC International*. – 2001. – Vol. 84. – № 1. – P. 156-161.
123. Tsialla, Z. Development of an indirect enzyme immunoassay for the determination of thiabendazole in white and red wines / Z. Tsialla, A. Ucles-Moreno, P. Petrou, A. R. Fernandez-Alba, S. E. Kakabakos // *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. – 2015. – Vol. 95. – № 13. – P. 1299-1309.
124. Uclés, A. Benzimidazole and imidazole fungicide analysis in grape and wine samples using a competitive enzyme-linked immunosorbent assay / A. Uclés, A. V. García, M. D. G. García, A. M. A. del Real, A. R. Fernández-Alba // *Analytical Methods*. – 2015. – Vol. 7. – № 21. – P. 9158-9165.
125. Manclús, J. J. Development of monoclonal immunoassays for the determination of triazole fungicides in fruit juices / J. J. Manclús, M. J. Moreno, E. Plana, A. Montoya // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2008. – Vol. 56. – № 19. – P. 8793-8800.
126. Plana, E. Development and application of recombinant antibody-based immunoassays to tetraconazole residue analysis in fruit juices / E. Plana, M. J. Moreno, Á. Montoya, J. J. Manclús // *Food Chemistry*. – 2014. – Vol. 143. – P. 205-213.
127. Cairoli, S. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitation of the fungicide tetraconazole in fruits and fruit juices / S. Cairoli, A. Arnoldi, S. Pagani // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1996. – Vol. 44. – № 12. – P. 3849-3854.
128. Rogers, K. R. Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using a fluorescence immunoanalyzer / K. R. Rogers, S. D. Kohl, L. A. Riddick, T. Glass // *Analyst*. – 1997. – Vol. 122. – № 10. – P. 1107-1112.
129. Liang, C. Development of a bead-based immunoassay for detection of triazophos and application validation / C. Liang, M. Zou, L. Guo, W. Gui, G. Zhu // *Food and Agricultural Immunology*. – 2013. – Vol. 24. – № 1. – P. 9-20.
130. Guo, Y. Multiplex bead-array competitive immunoassay for simultaneous detection of three pesticides in vegetables / Y. Guo, J. Tian, C. Liang, G. Zhu, W. Gui // *Microchimica Acta*. – 2013. – Vol. 180. – P. 387-395.
131. Zhang, C. A simple and sensitive competitive bio-barcode immunoassay for triazophos based on multi-modified gold nanoparticles and fluorescent signal amplification / C. Zhang, P. Du, Z. Jiang, M. Jin, G. Chen, X. Cao, X. Cui, Y. Zhang, R. Li, A. M. Abd El-Aty, J. Wang // *Analytica Chimica Acta*. – 2018. – Vol. 999. – P. 123-131.

132. Zhang, C. Development of a capillary electrophoresis-based immunoassay with laser-induced fluorescence for the detection of carbaryl in rice samples / C. Zhang, G. Ma, G. Fang, Y. Zhang, S. Wang // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2008. – Vol. 56. – № 19. – P. 8832-8837.
133. Matveeva, E. G. Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in reverse micelles AOT/n-octane by polarization and quenching fluoroimmunoassays / E. G. Matveeva, V. A. Popova, S. A. Eremin // *Journal of Fluorescence*. – 1997. – Vol. 7. – № 4. – P. 251-256.
134. Smith, D. S. Fluorescence polarization immunoassays and related methods for simple, high-throughput screening of small molecules / D. S. Smith, S. A. Eremin // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2008. – Vol. 391. – № 5. – P. 1499-1507.
135. Eremin, S. A. Fluorescence polarization immunoassays for pesticides / S. A. Eremin, D. S. Smith // *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. – 2003. – Vol. 6. – № 3. – P. 257-266.
136. Jameson, D. M. Fluorescence polarization/anisotropy in diagnostics and imaging / D. M. Jameson, J. A. Ross // *Chemical Reviews*. – 2010. – Vol. 110. – № 5. – P. 2685-2708.
137. Еремин, С. А. Влияние структуры трейсера на чувствительность и специфичность поляризационного флуороиммуноанализа 2,4-дихлорфеноксисуксной кислоты / С. А. Еремин, И. М. Лунская, А. М. Егоров // *Биоорганическая Химия*. – 1993. – Т. 19. – № 8. – С. 836-843.
138. Eremin, S. A. Polarization fluoroimmunoassay for rapid, specific detection of pesticides / S. A. Eremin // *ACS Symposium Series*. – 1995. – Vol. 586. – P. 223-234.
139. Krikunova, V. S. Preliminary screening method for dioxin contamination using polarization fluoroimmunoassay for chlorinated phenoxyacid pesticides / V. S. Krikunova, S. A. Eremin, D. S. Smith, J. Landon // *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. – 2003. – Vol. 83. – № 7. – P. 585-595.
140. Hatzidakis, G. I. Use of L-lysine fluorescence derivatives as tracers to enhance the performance of polarization fluoroimmunoassays / G. I. Hatzidakis, A. M. Tsatsakis, E. K. Krambovitis, A. Spyros, S. A. Eremin // *Analytical Chemistry*. – 2002. – Vol. 74. – № 11. – P. 2513-2521.
141. Морозова, В. С. Микроволновая и ультразвуковая экстракция хлорфеноксикислот из почвы и их определение методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа / В. С. Морозова, С. А. Еремин, П. Н. Нестеренко, Н. А. Ключев, А. А. Шелепчиков, И. В. Кубракова // *Журнал аналитической химии*. – 2008. – Т. 63. – № 2. – С. 143-151.
142. Eremin, S. A. Kinetic determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by stopped-flow fluorescence polarization immunoassay / S. A. Eremin, E. G. Matveeva, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito // *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. – 1998. – Vol. 71. – № 8. – P. 137-146.

143. Hunt, C. E. A fluorescence polarisation molecular imprint sorbent assay for 2,4-D: a non-separation pseudo-immunoassay / C. E. Hunt, P. Pasetto, R. J. Ansell, K. Haupt // *Chemical Communications*. – 2006. – Vol. 71. – P. 1754-1756.
144. Xu, Z. L. A simple, rapid and high-throughput fluorescence polarization immunoassay for simultaneous detection of organophosphorus pesticides in vegetable and environmental water samples / Z. L. Xu, Q. Wang, H. T. Lei, S. A. Eremin, Y. D. Shen, H. Wang, R. C. Beier, J. Y. Yang, K. A. Maksimova, Y. M. Sun // *Analytica Chimica Acta*. – 2011. – Vol. 708. – № 1. – P. 123-129.
145. Anfossi, L. Lateral-flow immunoassays for mycotoxins and phycotoxins: a review / L. Anfossi, C. Baggiani, C. Giovannoli, G. D'Arco, G. Giraudi // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2013. – Vol. 405. – № 2. – P. 467-480.
146. Sajid, M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: a literature review / M. Sajid, A. N. Kawde, M. Daud // *Journal of Saudi Chemical Society*. – 2015. – Vol. 19. – № 6. – P. 689-705.
147. Любавина, И. А. Иммунохроматографический анализ 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и симазина с использованием моноклональных антител, меченных коллоидным золотом / И. А. Любавина, А. А. Зинченко, И. С. Саломатина, А. В. Жердев, Б. Б. Дзантиев // *Биоорганическая Химия*. – 2004. – Т. 30. – № 2. – С. 178-183.
148. Guo, Y. R. Gold immunochromatographic assay for simultaneous detection of carbofuran and triazophos in water samples / Y. R. Guo, S. Y. Liu, W. J. Gui, G. N. Zhu // *Analytical Biochemistry*. – 2009. – Vol. 389. – № 1. – P. 32-39.
149. Weetall, H. H. A simple assay for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using coated test-strips / H. H. Weetall, K. R. Rogers // *Analytical Letters*. – 2002. – Vol. 35. – № 8. – P. 1341-1348.
150. Wang, S. Development of colloidal gold-based flow-through and lateral-flow immunoassays for the rapid detection of the insecticide carbaryl / S. Wang, C. Zhang, J. Wang, Y. Zhang // *Analytica Chimica Acta*. – 2005. – Vol. 546. – № 2. – P. 161-166.
151. Zhang, C. Development of multianalyte flow-through and lateral-flow assays using gold particles and horseradish peroxidase as tracers for the rapid determination of carbaryl and endosulfan in agricultural products / C. Zhang, Y. Zhang, S. Wang // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2006. – Vol. 54. – № 7. – P. 2502-2507.
152. Du, P. Highly sensitive detection of triazophos pesticide using a novel bio-bar-code amplification competitive immunoassay in a micro well plate-based platform / P. Du, M. Jin, C. Zhang, G. Chen, X. Cui, Yu. Zhang, Ya. Zhang, P. Zou, Z. Jiang, X. Cao, Y. She, F. Jin, J. Wang // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2018. – Vol. 256. – P. 457-464.

153. Posthuma-Trumpie, G. A. Amorphous carbon nanoparticles: a versatile label for rapid diagnostic (immuno) assays / G. A. Posthuma-Trumpie, J. H. Wichers, M. Koets, L. B. Berendsen, A. van Amerongen // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2012. – Vol. 402. – № 2. – P. 593-600.
154. Holubová-Mičková, B. Development of colloidal carbon-based immunochromatographic strip for rapid detection of carbaryl in fruit juices / B. Holubová-Mičková, M. Blažková, L. Fukal, P. Rauch // *European Food Research and Technology*. – 2010. – Vol. 231. – № 3. – P. 467-473.
155. Blažková, M. Strip-based immunoassay for rapid detection of thiabendazole / M. Blažková, P. Rauch, L. Fukal // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2010. – Vol. 25. – № 9. – P. 2122-2128.
156. Verma, N. Biosensor technology for pesticides—a review / N. Verma, A. Bhardwaj // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2015. – Vol. 25. – № 9. – P. 3093-3119.
157. Stoytcheva, M. Electrochemical biosensors for direct determination of organophosphorus pesticides: a review / M. Stoytcheva, V. Gochev, Z. Velkova // *Current Analytical Chemistry*. – 2016. – Vol. 12. – № 1. – P. 37-42.
158. Songa, E. A. Recent approaches to improving selectivity and sensitivity of enzyme-based biosensors for organophosphorus pesticides: a review / E. A. Songa, J. O. Okonkwo // *Talanta*. – 2016. – Vol. 155. – P. 289-304.
159. Navrátilová, I. The immunosensors for measurement of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid based on electrochemical impedance spectroscopy / I. Navrátilová, P. Skládal // *Bioelectrochemistry*. – 2004. – Vol. 62. – № 1. – P. 11-18.
160. Gobi, K. V. Novel surface plasmon resonance (SPR) immunosensor based on monomolecular layer of physically-adsorbed ovalbumin conjugate for detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and atomic force microscopy study / K. V. Gobi, S. J. Kim, H. Tanaka, Y. Shoyama, N. Miura // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2007. – Vol. 123. – № 1. – P. 583-593.
161. Loh, K. S. Use of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for enhancement of biosensor response to the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid / K. S. Loh, Y. H. Lee, A. Musa, A. A. Salmah, I. Zamri // *Sensors*. – 2008. – Vol. 8. – № 9. – P. 5775-5791.
162. Vinayaka, A. C. Bioconjugation of CdTe quantum dot for the detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by competitive fluoroimmunoassay based biosensor / A. C. Vinayaka, S. Basheer, M. S. Thakur // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2009. – Vol. 24. – № 6. – P. 1615-1620.
163. Wijaya, I. P. M. Femtomolar detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicides via competitive immunoassays using microfluidic based carbon nanotube liquid gated transistor / I. P. M. Wijaya, T. J. Nie, S. Gandhi, R. Boro, A. Palaniappan, G. W. Hau, I. Rodrigues, C. R. Suri, S. G. Mhaisalkar // *Lab on a Chip*. – 2010. – Vol. 10. – № 5. – P. 634-638.

164. Xie, C. Electrochemical sensor for 2,4-dichlorophenoxy acetic acid using molecularly imprinted polypyrrole membrane as recognition element / C. Xie, S. Gao, Q. Guo, K. Xu // *Microchimica Acta*. – 2010. – Vol. 169. – № 1. – P. 145-152.
165. Tomassetti, M. New immunosensors for 2,4-D and 2,4,5-T pesticides determination / M. Tomassetti, E. Martini, L. Campanella // *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. – 2012. – Vol. 92. – № 4. – P. 417-431.
166. Shi, H. A novel photoelectrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer modified TiO<sub>2</sub> nanotubes and its highly selective detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid / H. Shi, G. Zhao, M. Liu, Z. Zhu // *Electrochemistry Communications*. – 2011. – Vol. 13. – № 12. – P. 1404-1407.
167. Wong, A. Biomimetic sensor based on 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorophenyl)-21H,23H-porphyrin iron (III) chloride and MWCNT for selective detection of 2,4-D / A. Wong, M. D. P. T. Sotomayor // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2013. – Vol. 181. – P. 332-339.
168. Ding, J. Piezoelectric immunosensor with gold nanoparticles enhanced competitive immunoreaction technique for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid quantification / J. Ding, Z. Lu, R. Wang, G. Shen, L. Xiao // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2014. – Vol. 193. – P. 568-573.
169. Wang, X. A molecular imprinting-based turn-on ratiometric fluorescence sensor for highly selective and sensitive detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) / X. Wang, J. Yu, X. Wu, J. Fu, Q. Kang, D. Shen, J. Li, L. Chen // *Biosensors and Bioelectronics*. – Vol. 81. – P. 438-444.
170. Wang, H. Dendrimer-like amino-functionalized hierarchical porous silica nanoparticle: A host material for 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid imprinting and sensing / H. Wang, Q. Xu, J. Wang, W. Du, F. Liu, X. Hu // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2018. – Vol. 100. – P. 105-114.
171. Du, D. Amperometric detection of triazophos pesticide using acetylcholinesterase biosensor based on multiwall carbon nanotube–chitosan matrix / D. Du, X. Huang, J. Cai, A. Zhang // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2007. – Vol. 127. – № 2. – P. 531-535.
172. Du, D. Rapid determination of triazophos using acetylcholinesterase biosensor based on sol–gel interface assembling multiwall carbon nanotubes / D. Du, J. Cai, D. Song, A. Zhang // *Journal of Applied Electrochemistry*. – 2007. – Vol. 37. – № 8. – P. 893-898.
173. Xie, C. Molecular imprinting method for on-line enrichment and chemiluminescent detection of the organophosphate pesticide triazophos / C. Xie, H. Zhou, S. Gao, H. Li // *Microchimica Acta*. – 2010. – Vol. 171. – № 3. – P. 355-362.
174. Li, H. Electropolymerized molecular imprinting on gold nanoparticle-carbon nanotube modified electrode for electrochemical detection of triazophos / H. Li, C. Xie, S. Li, K. Xu // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2012. – Vol. 89. – P. 175-181.

175. Ju, K. J. Biosensor for pesticide triazophos based on its inhibition of acetylcholinesterase and using a glassy carbon electrode modified with coral-like gold nanostructures supported on reduced graphene oxide / K. J. Ju, J. X. Feng, J. J. Feng, Q. L. Zhang, T. Q. Xu, J. Wei, A. J. Wang // *Microchimica Acta*. – 2015. – Vol. 182. – № 15. – P. 2427-2434.
176. Guo, Y. A non-competitive surface plasmon resonance immunosensor for rapid detection of triazophos residue in environmental and agricultural samples / Y. Guo, R. Liu, Y. Liu, D. Xiang, Y. Liu, W. Gui, M. Li, G. Zhu // *Science of the Total Environment*. – 2018. – Vol. 613. – P. 783-791.
177. Li, H. Reagentless electrochemiluminescence sensor for triazophos based on molecular imprinting electropolymerized poly (luminol-p-aminothiophenol) composite-modified gold electrode / H. Li, Y. Wang, H. Zha, P. Dai, C. Xie // *Arabian Journal for Science and Engineering*. – 2018. – P. 1-8.
178. Mauriz, E. Determination of carbaryl in natural water samples by a surface plasmon resonance flow-through immunosensor / E. Mauriz, A. Calle, A. Abad, A. Montoya, A. Hildebrandt, D. Barceló, L. M. Lechuga // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2006. – Vol. 21. – № 11. – P. 2129-2136.
179. Du, D. Determination of carbaryl pesticide using amperometric acetylcholinesterase sensor formed by electrochemically deposited chitosan / D. Du, J. Ding, J. Cai, A. Zhang // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2007. – Vol. 58. – № 2. – P. 145-150.
180. Caetano, J. Determination of carbaryl in tomato “in natura” using an amperometric biosensor based on the inhibition of acetylcholinesterase activity / J. Caetano, S. A. Machado // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2008. – Vol. 129. – № 1. – P. 40-46.
181. Cai, J. A disposable sensor based on immobilization of acetylcholinesterase to multiwall carbon nanotube modified screen-printed electrode for determination of carbaryl / J. Cai, D. Du // *Journal of Applied Electrochemistry*. – 2008. – Vol. 38. – № 9. – P. 1217-1222.
182. Pedrosa, V. A. Determination of parathion and carbaryl pesticides in water and food samples using a self assembled monolayer/acetylcholinesterase electrochemical biosensor / V. A. Pedrosa, J. Caetano, S. A. Machado, M. Bertotti // *Sensors*. – 2008. – Vol. 8. – № 8. – P. 4600-4610.
183. Valdés-Ramírez, G. Acetylcholinesterase-based biosensors for quantification of carbofuran, carbaryl, methylparaoxon, and dichlorvos in 5% acetonitrile / G. Valdés-Ramírez, M. Cortina, M. T. Ramírez-Silva, J. L. Marty // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2008. – Vol. 392. – № 4. – P. 699-707.
184. Firdoz, S. A novel amperometric biosensor based on single walled carbon nanotubes with acetylcholine esterase for the detection of carbaryl pesticide in water / S. Firdoz, F. Ma, X. Yue, Z. Dai, A. Kumar, B. Jiang // *Talanta*. – 2010. – Vol. 83. – № 1. – P. 269-273.

185. da Silva, M. K. Determination of carbamate pesticide in food using a biosensor based on reduced graphene oxide and acetylcholinesterase enzyme / M. K. da Silva, H. C. Vanzela, L. M. Defavari, I. Cesarino // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2018. – Vol. 277. – P. 555-561.
186. Hatefi-Mehrjardi, A. Bienzyme self-assembled monolayer on gold electrode: an amperometric biosensor for carbaryl determination / A. Hatefi-Mehrjardi // *Electrochimica Acta*. – 2013. – Vol. 114. – P. 394-402.
187. Kuusk, E. Transient phase calibration of tyrosinase-based carbaryl biosensor / E. Kuusk, T. Rincken // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2004. – Vol. 34. – № 7. – P. 657-661.
188. Liu, Q. Effective amperometric biosensor for carbaryl detection based on covalent immobilization acetylcholinesterase on multiwall carbon nanotubes/graphene oxide nanoribbons nanostructure / Q. Liu, A. Fei, J. Huan, H. Mao, K. Wang // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2015. – Vol. 740. – P. 8-13.
189. Santos, C. S. Biosensor for carbaryl based on gold modified with PAMAM-G4 dendrimer / C. S. Santos, R. Mossanha, C. A. Pessôa // *Journal of Applied Electrochemistry*. – 2015. – Vol. 45. – № 4. – P. 325-334.
190. Li, Y. Electrochemical biosensing of carbaryl based on acetylcholinesterase immobilized onto electrochemically inducing porous graphene oxide network / Y. Li, L. Shi, G. Han, Y. Xiao, W. Zhou // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2017. – Vol. 238. – P. 945-953.
191. Belenguer, J. Development of an SPR-based immunoassay for the detection of thiabendazole / J. Belenguer, M. C. Estévez, L. M. Lechuga, A. Montoya, R. Díaz // *Proceedings of the International Conference «Food Innova 2010», 25-29th October, 2010 / Polytechnical University of Valencia*. – Valencia, 2010. – P. 1-5.
192. Estevez, M. C. Indirect competitive immunoassay for the detection of fungicide thiabendazole in whole orange samples by Surface Plasmon Resonance / M. C. Estevez, J. Belenguer, S. Gomez-Montes, J. Miralles, A. M. Escuela, A. Montoya, L. M. Lechuga // *Analyst*. – 2012. – Vol. 45. – № 4. – P. 5659-5665.
193. Pourfarzaneh, M. Cortisol directly determined in serum by fluoroimmunoassay with magnetizable solid phase / M. Pourfarzaneh, G. W. White, J. Landon, D. S. Smith // *Clinical Chemistry*. – 1980. – Vol. 26. – № 6. – P. 730-733.
194. Rodbard, D. Statistical estimation of the minimal detectable concentration (“sensitivity”) for radioligand assays / D. Rodbard // *Analytical Biochemistry*. – 1978. – Vol. 90. – № 1. – P. 1-12.

195. Крикунова, В. С. Разработка иммунохимических методов анализа хлорсодержащих пестицидов в объектах окружающей среды. Дисс. на соискание ученой степени к.х.н. / Крикунова Виталия Сергеевна. – М: МГУ. – 2003. – 198 с.
196. Liu, R. Evaluation of a water-soluble adjuvant for the development of monoclonal antibodies against small-molecule compounds / R. Liu, Y. Liu, M. J. Lan, N. Taheri, J. L. Cheng, Y. R. Guo, G. N. Zhu // *Journal of Zhejiang University-Science B*. – 2016. – Vol. 17. – № 4. – P. 282-293.
197. Mehlretter, C. L. Potential controlled-release herbicides from 2,4-D esters of starches / C. L. Mehlretter, W. B. Roth, F. B. Meakley, T. A. McGuire, C. R. Russell // *Weed Science*. – 1974. – Vol. 22. – № 5. – P. 415–418.
198. Riederer, M. Covalent binding of chlorophenoxyacetic acids to plant cuticles / M. Riederer, J. Schönherr // *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. – 1986. – Vol. 15. – № 1. – P. 97–105.
199. Feung, C. S. Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. VII. Comparison of metabolites from five species of plant tissue cultures / C. S. Feung, R. H. Hamilton, R. O. Mumma // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1975. – Vol. 23. – № 3. – P. 373–376.
200. Skidmore, M. W. IUPAC Technical reports: bound xenobiotic residues in food commodities of plant and animal origin / M. W. Skidmore, G. D. Paulson, H. A. Kuiper, B. Ohlin, S. Reynolds // *Pest Management Science*. – 2002. – Vol. 58. – № 3. – P. 313–315.
201. Anastassiades, M. Analysis of carbendazim, benomyl, thiophanate methyl and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in fruits and vegetables after supercritical fluid extraction / M. Anastassiades, W. Schwack // *Journal of Chromatography A*. – 1998. – Vol. 825. – № 1. – P. 45–54.
202. Schaner, A. Determination of chlorinated acid herbicides in vegetation and soil by liquid chromatography/electrospray-tandem mass spectrometry / A. Schaner, J. Konecny, L. Luckey, H. Hickes // *Journal of AOAC International*. – 2007. – Vol. 90. – № 5. – P. 1402–1410.
203. Santilio, A. Determination of acidic herbicides in cereals by QuEChERS extraction and LC/MS/MS / A. Santilio, P. Stefanelli, S. Girolimetti, R. Dommarco // *Journal of Environmental Science and Health Part B*. – 2011. – Vol. 46. – № 6. – P. 535–543.
204. Sack, S. Determination of acid herbicides using modified QuEChERS with fast switching ESI+/ESI– LC-MS/MS / S. Sack, J. Vonderbrink, M. Smoker, R. E. Smith // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2015. – Vol. 63. – № 43. – P. 9657–9665.
205. Løkke, H. Analysis of free and bound chlorophenoxy acids in cereals / H. Løkke // *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. – 1975. – Vol. 13. – № 6. – P. 730-736.

## Приложение

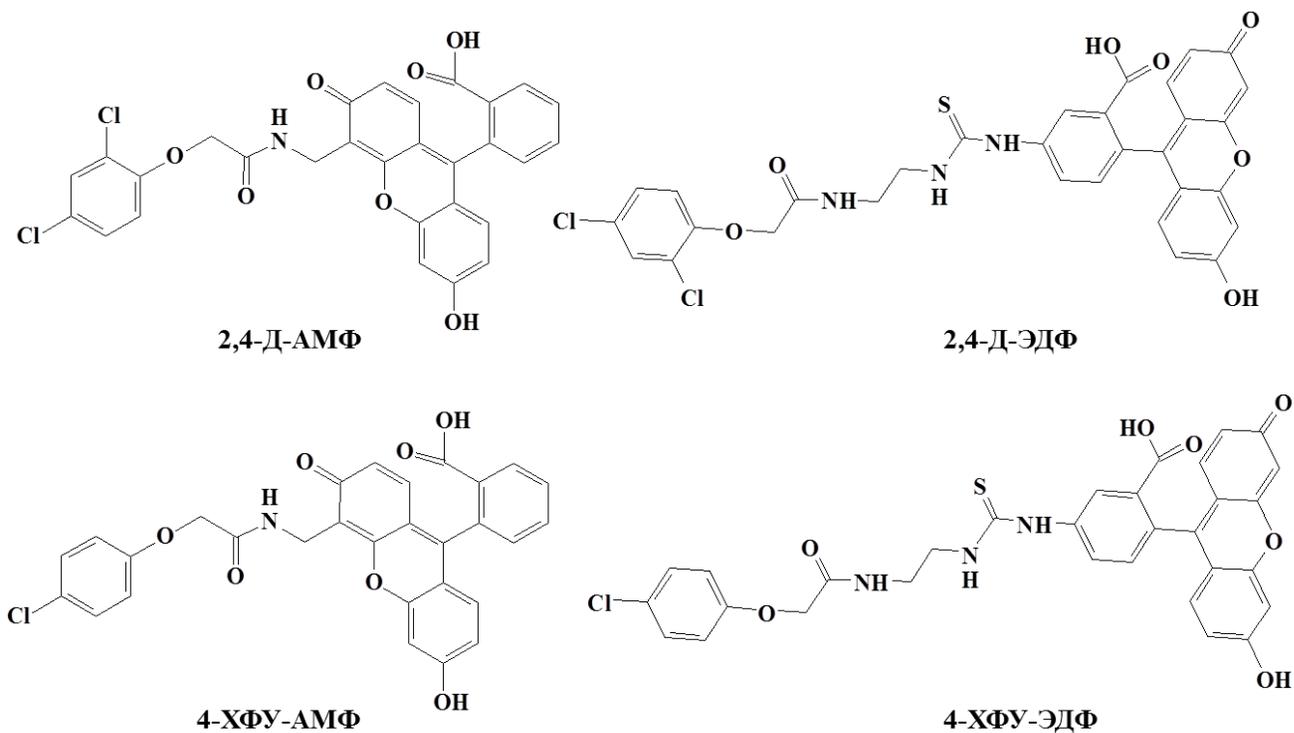
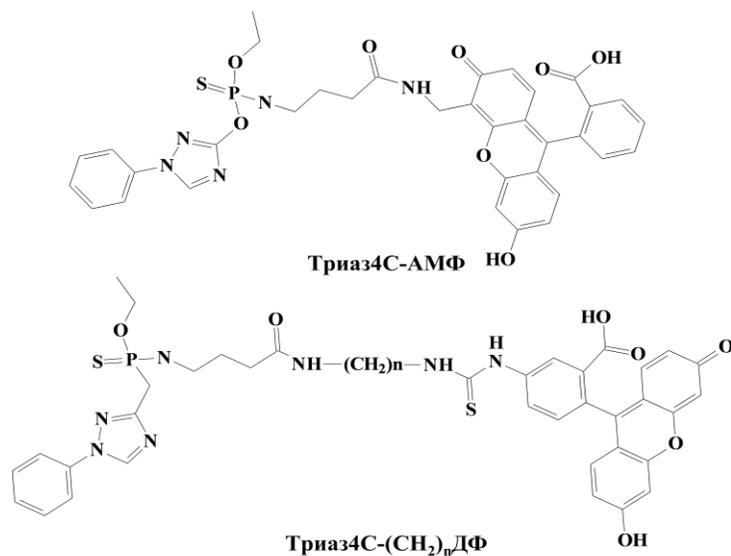


Рисунок П1 – Структурные формулы трейсеров, синтезированных для ПФИА 2,4-Д

Рисунок П2 – Структурные формулы трейсеров, синтезированных для ПФИА триазофоса (n=2, 3, 4, 5, 6, 7 для Триаз4С-ЭДФ, Триаз4С-(СН<sub>2</sub>)<sub>3</sub>ДФ, Триаз4С-(СН<sub>2</sub>)<sub>4</sub>ДФ, Триаз4С-(СН<sub>2</sub>)<sub>5</sub>ДФ, Триаз4С-(СН<sub>2</sub>)<sub>6</sub>ДФ, Триаз4С-(СН<sub>2</sub>)<sub>7</sub>ДФ, соответственно)

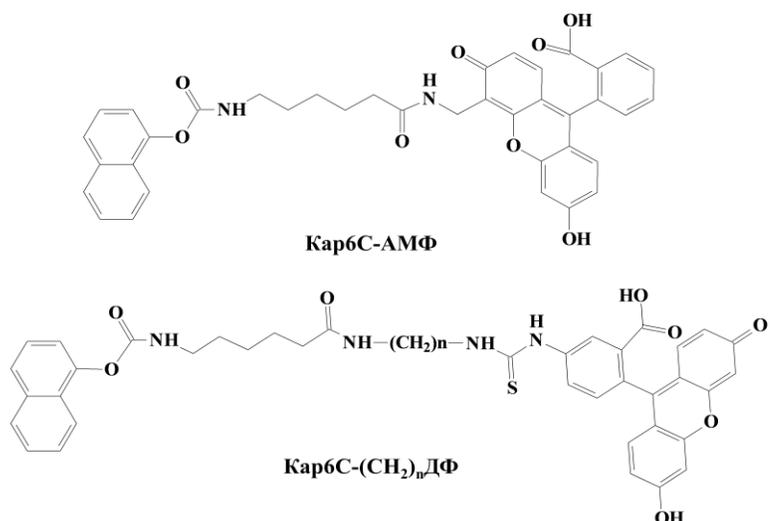


Рисунок ПЗ – Структурные формулы трейсеров, синтезированных для ПФИА карбарила (n=2, 3, 4, 5, 6, 7 для КарбС-ЭДФ, КарбС-(СН<sub>2</sub>)<sub>3</sub>ДФ, КарбС-(СН<sub>2</sub>)<sub>4</sub>ДФ, КарбС-(СН<sub>2</sub>)<sub>5</sub>ДФ, КарбС-(СН<sub>2</sub>)<sub>6</sub>ДФ, КарбС-(СН<sub>2</sub>)<sub>7</sub>ДФ, соответственно)

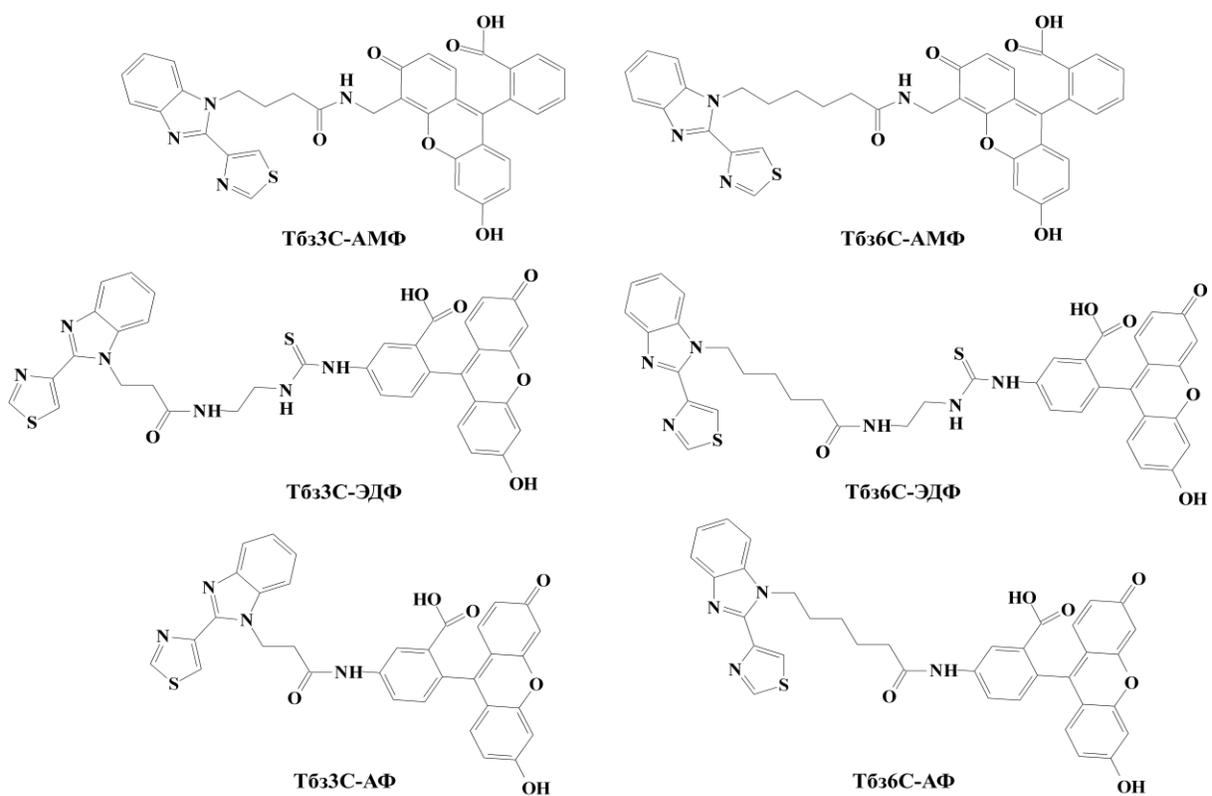


Рисунок П4 – Структурные формулы трейсеров, синтезированных для ПФИА тиабендазола

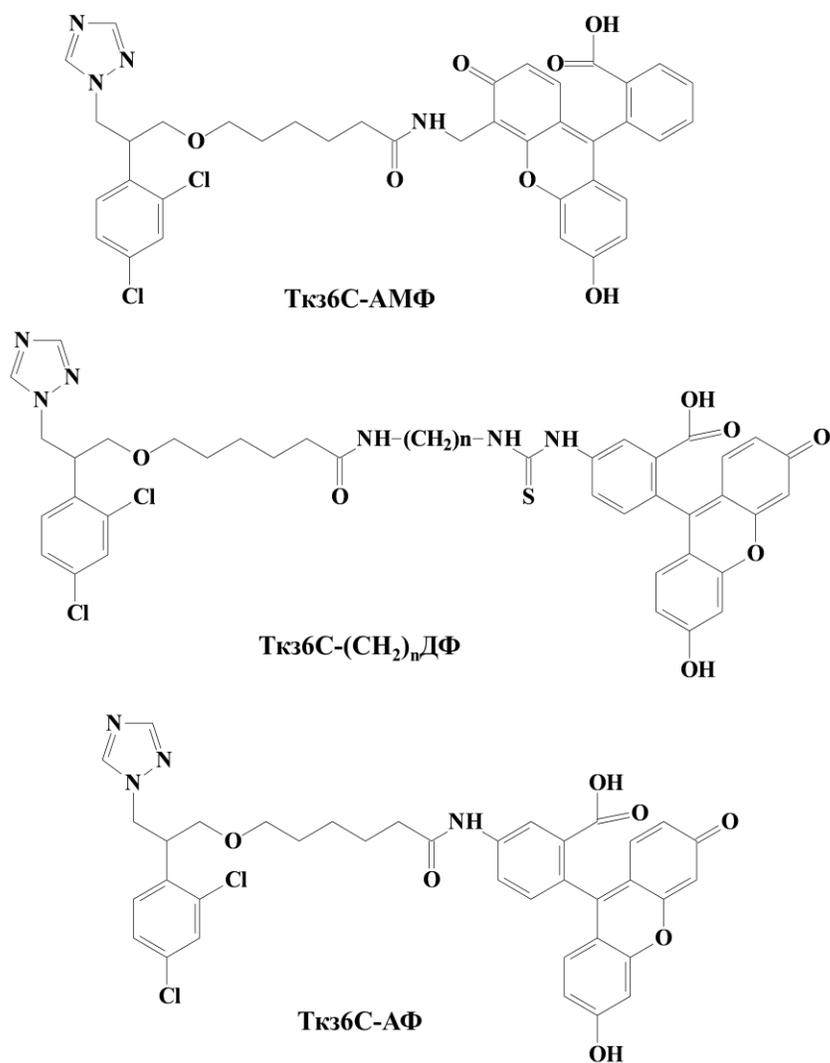


Рисунок П5 – Структурные формулы трейсеров, синтезированных для ПФИА тетраконазола (n=2, 4, 6 для Тк36С-ЭДФ, Тк36С-(СН<sub>2</sub>)<sub>4</sub>ДФ, Тк36С-(СН<sub>2</sub>)<sub>6</sub>ДФ, соответственно)

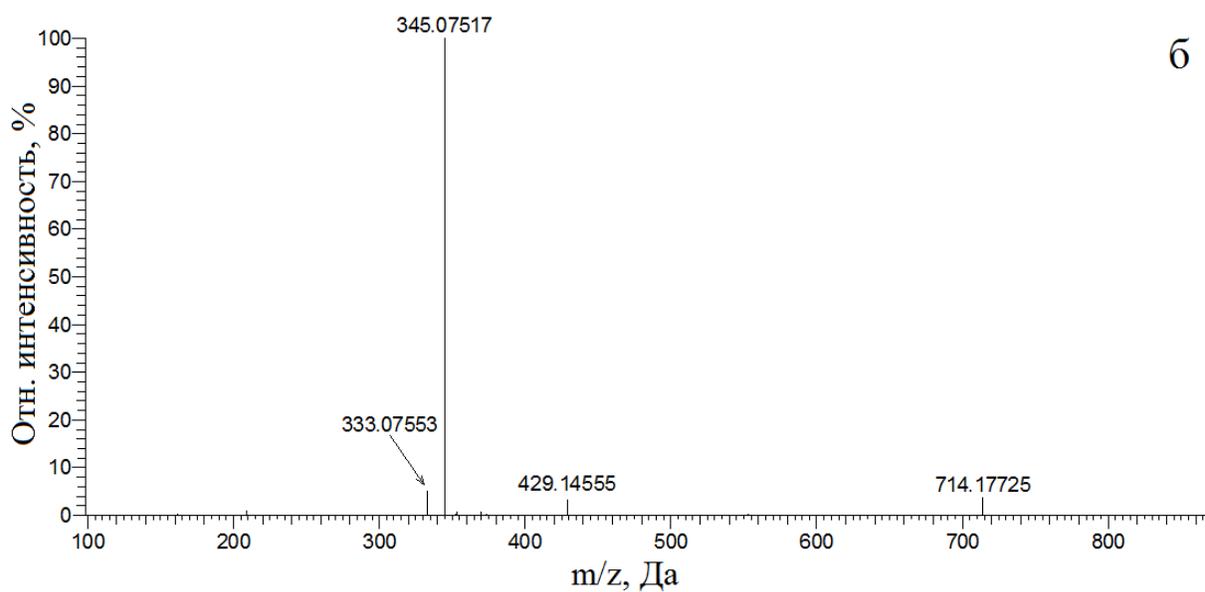
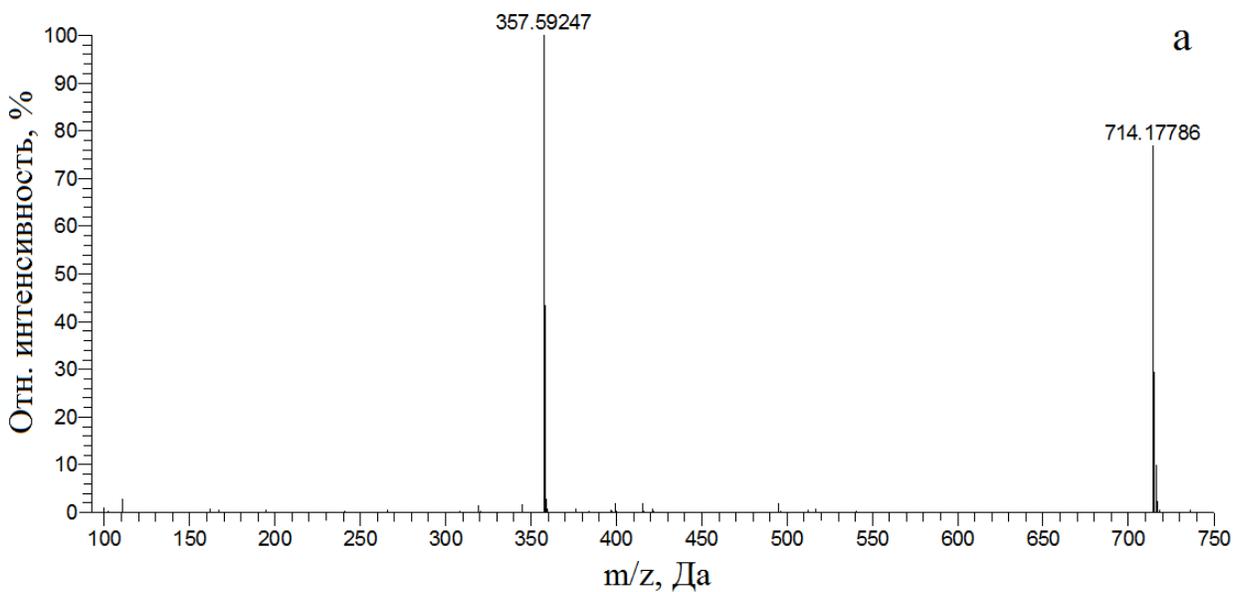


Рисунок П6 – Масс-спектры трейсера Триа34С-АМФ в режиме регистрации положительно заряженных ионов: первого порядка (а) и второго порядка (б) (ион-предшественник  $m/z$  714,18, энергия в соударительной ячейке 25 эВ)

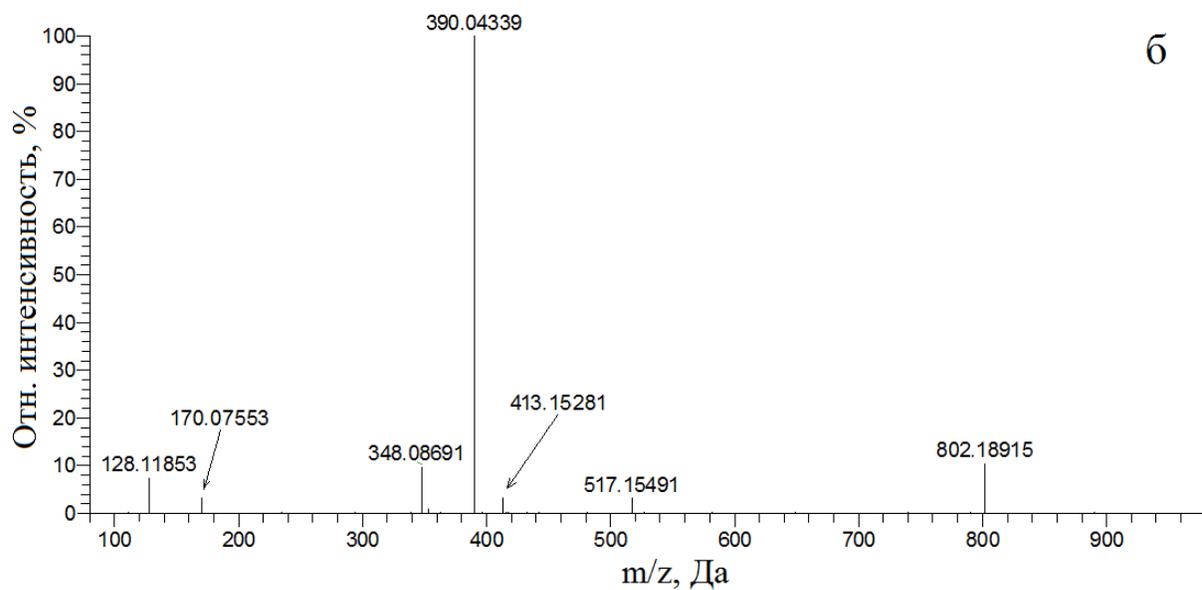
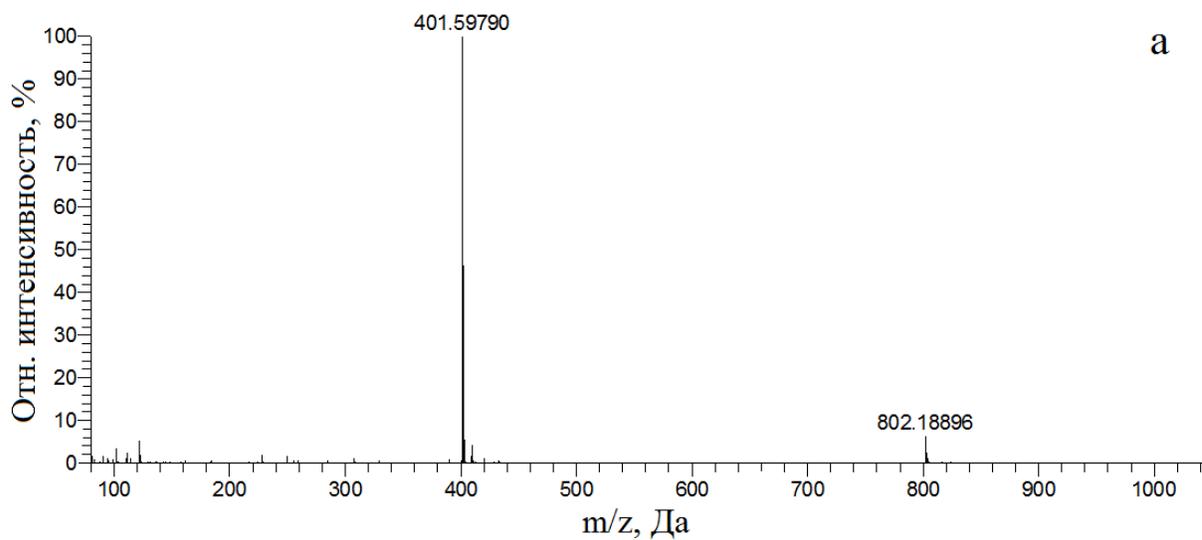


Рисунок П7 – Масс-спектры трейсера Триаз4С-ЭДФ в режиме регистрации положительно заряженных ионов: первого порядка (а) и второго порядка (б) (ион-предшественник  $m/z$  802,19, энергия в соударительной ячейке 25 эВ)

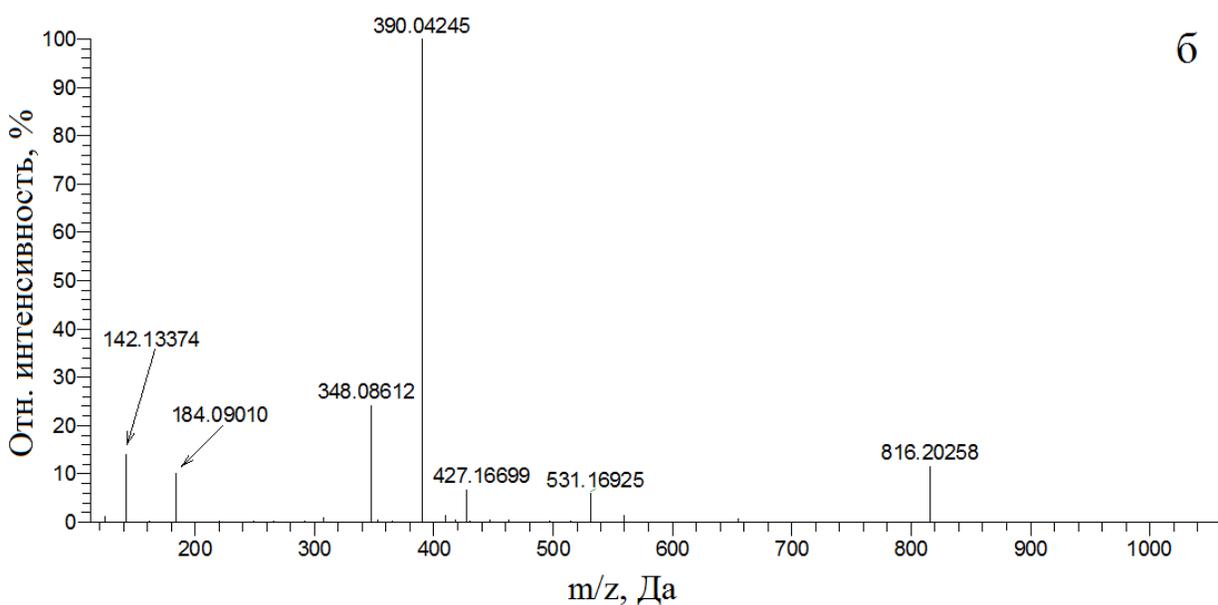
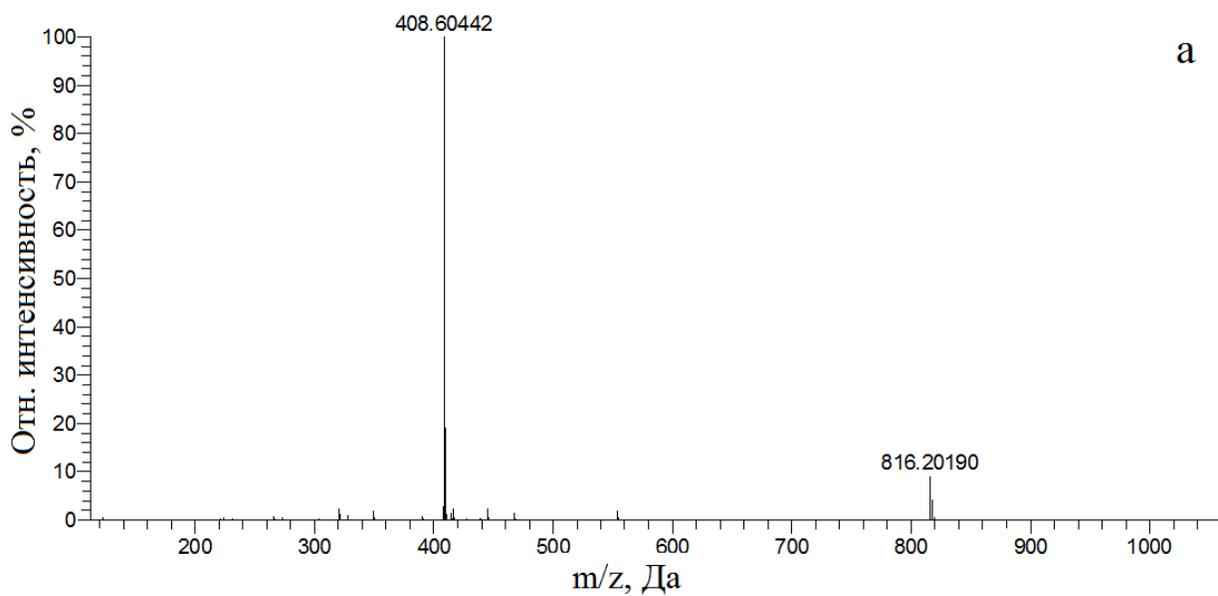


Рисунок П8 – Масс-спектры трейсера Триаз4С-(СН<sub>2</sub>)<sub>3</sub>ДФ в режиме регистрации положительно заряженных ионов: первого порядка (а) и второго порядка (б) (ион-предшественник  $m/z$  816,20, энергия в соударительной ячейке 25 эВ)

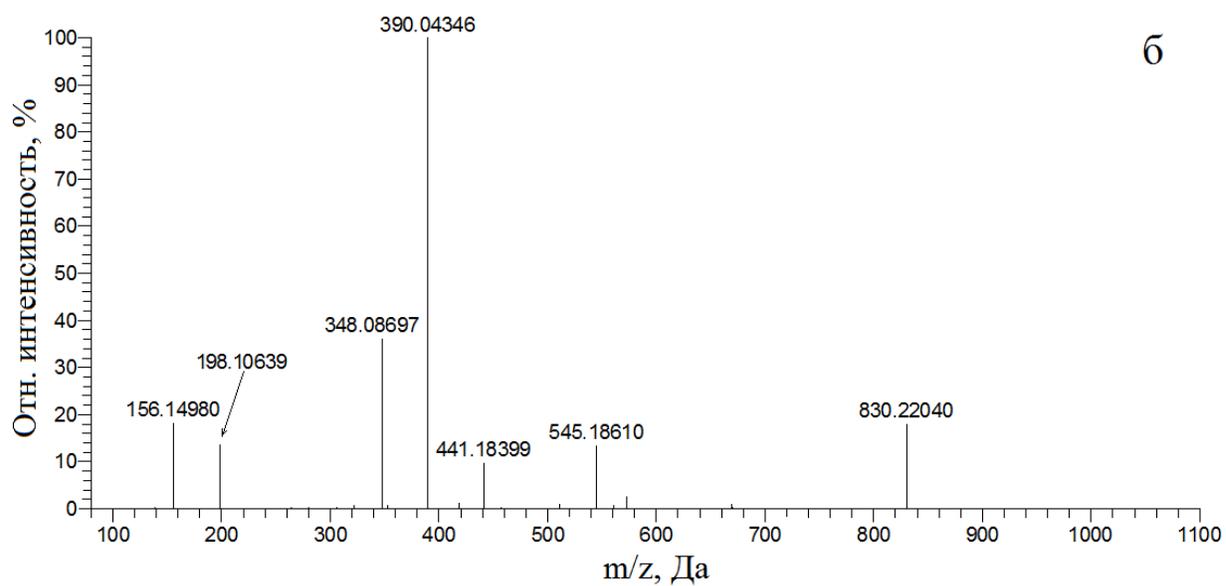
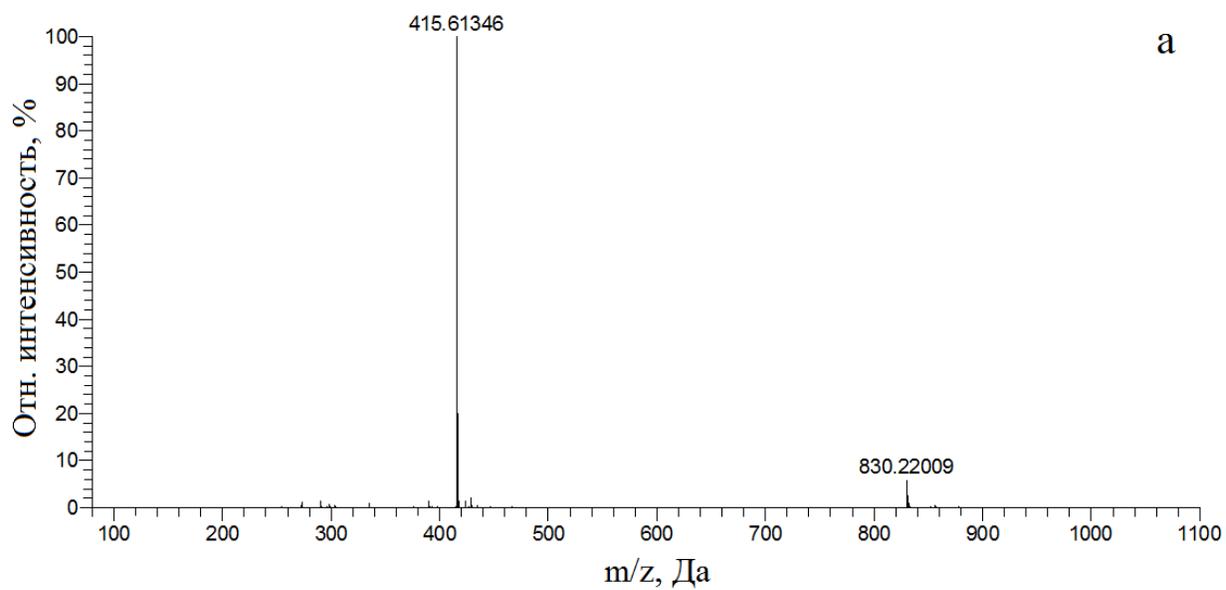


Рисунок П9 – Масс-спектры трейсера Триаз4С-(СН<sub>2</sub>)<sub>4</sub>ДФ в режиме регистрации положительно заряженных ионов: первого порядка (а) и второго порядка (б) (ион-предшественник m/z 830,22, энергия в соударительной ячейке 25 эВ)

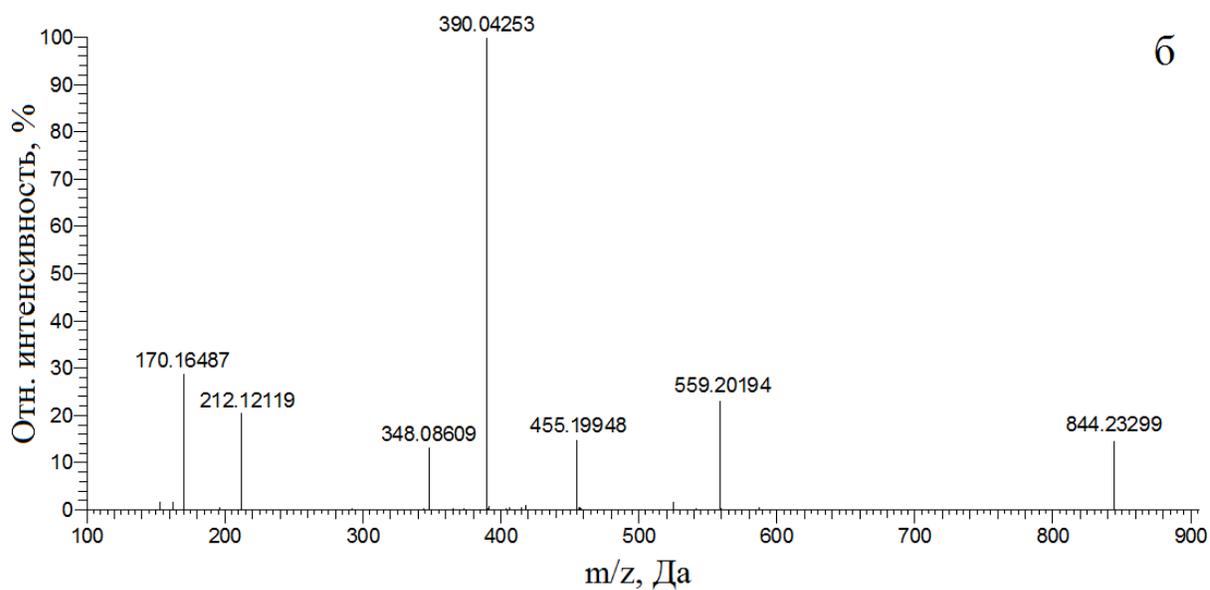
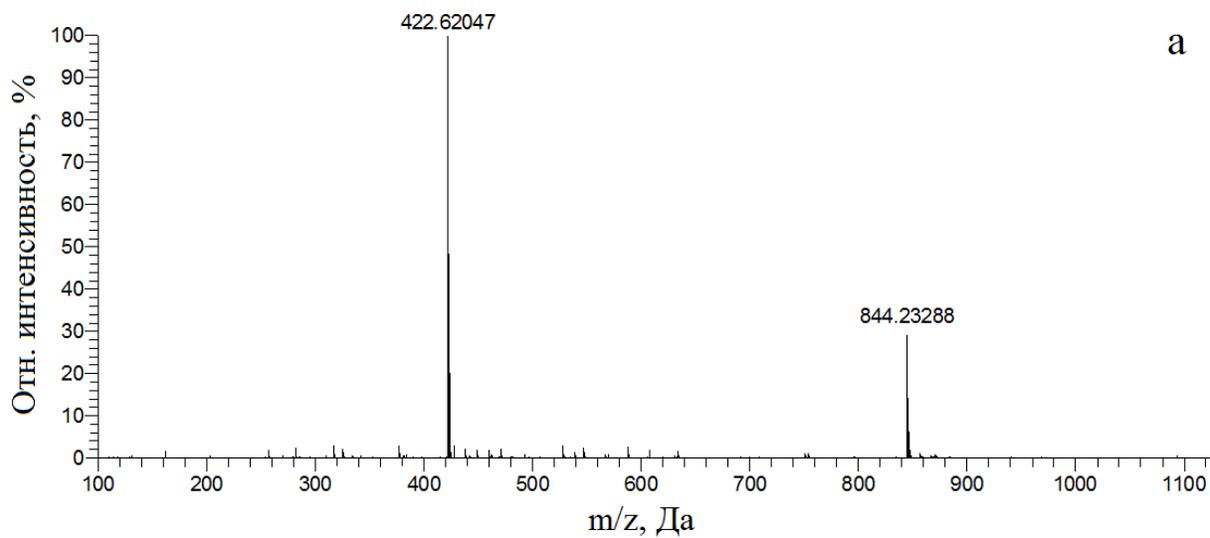


Рисунок П10 – Масс-спектры трейсера Триаз4С-(СН<sub>2</sub>)<sub>5</sub>ДФ в режиме регистрации положительно заряженных ионов: первого порядка (а) и второго порядка (б) (ион-предшественник m/z 844,23, энергия в соударительной ячейке 25 эВ)

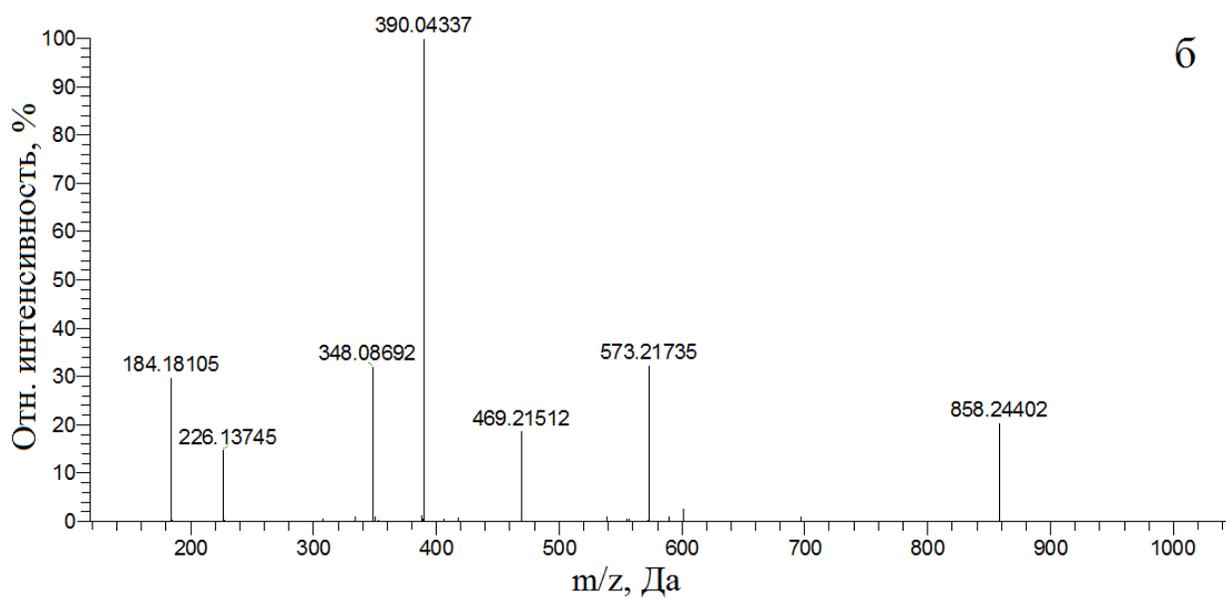
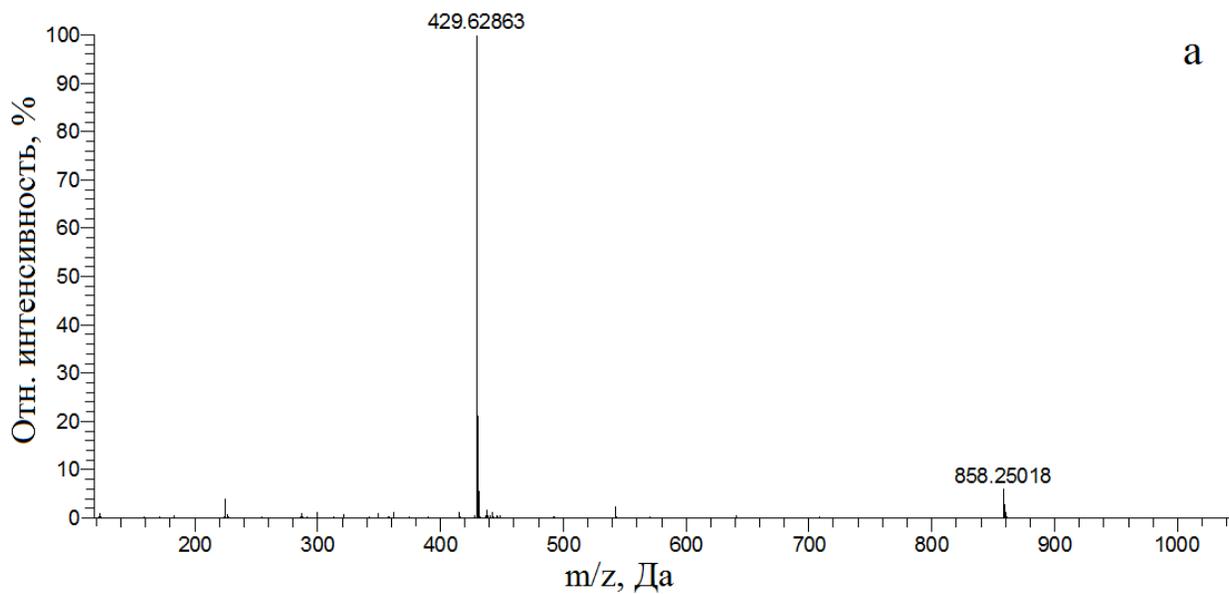


Рисунок П11 – Масс-спектры трейсера Триаз4С-(СН<sub>2</sub>)<sub>6</sub>ДФ в режиме регистрации положительно заряженных ионов: первого порядка (а) и второго порядка (б) (ион-предшественник m/z 858,25, энергия в соударительной ячейке 25 эВ)

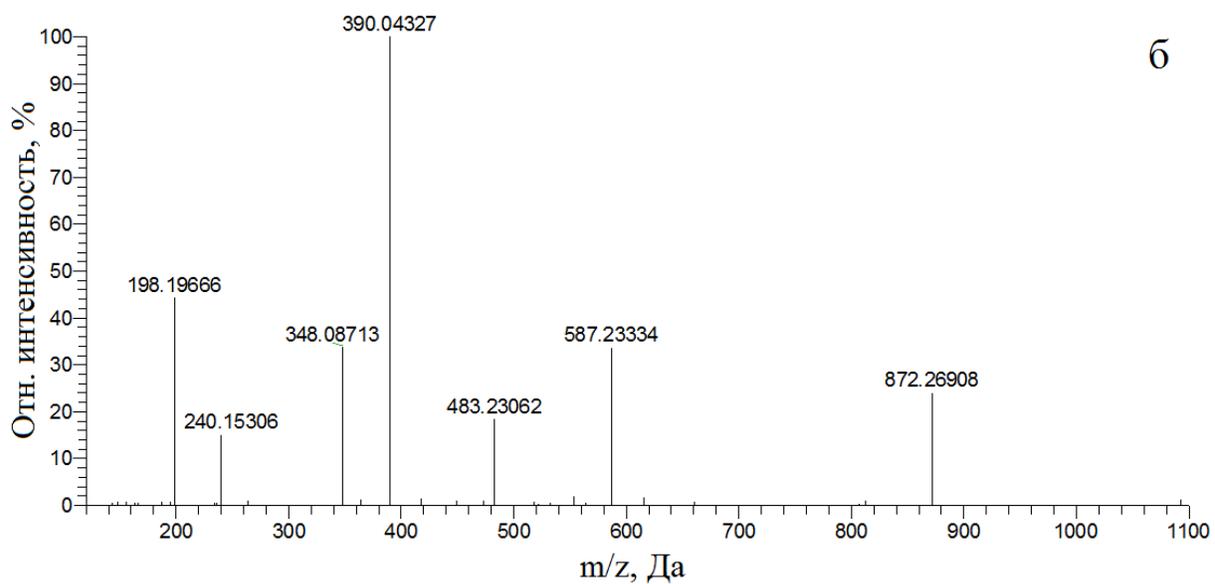
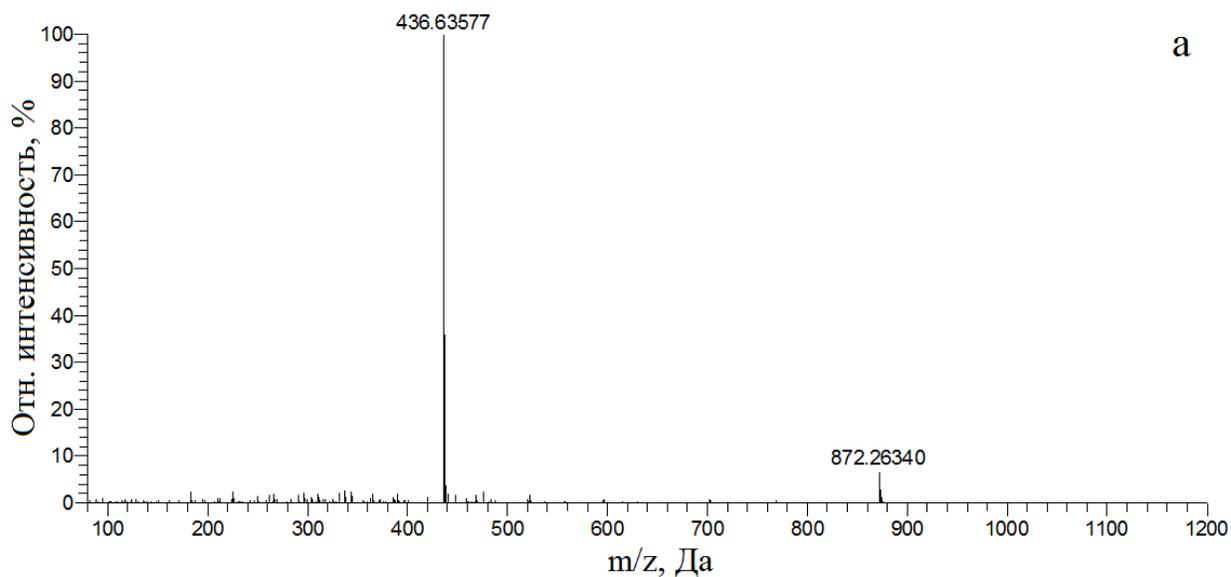


Рисунок П12 – Масс-спектры трейсера Триаз4С-(СН<sub>2</sub>)<sub>7</sub>ДФ в режиме регистрации положительно заряженных ионов: первого порядка (а) и второго порядка (б) (ион-предшественник m/z 872,27, энергия в соударительной ячейке 25 эВ)

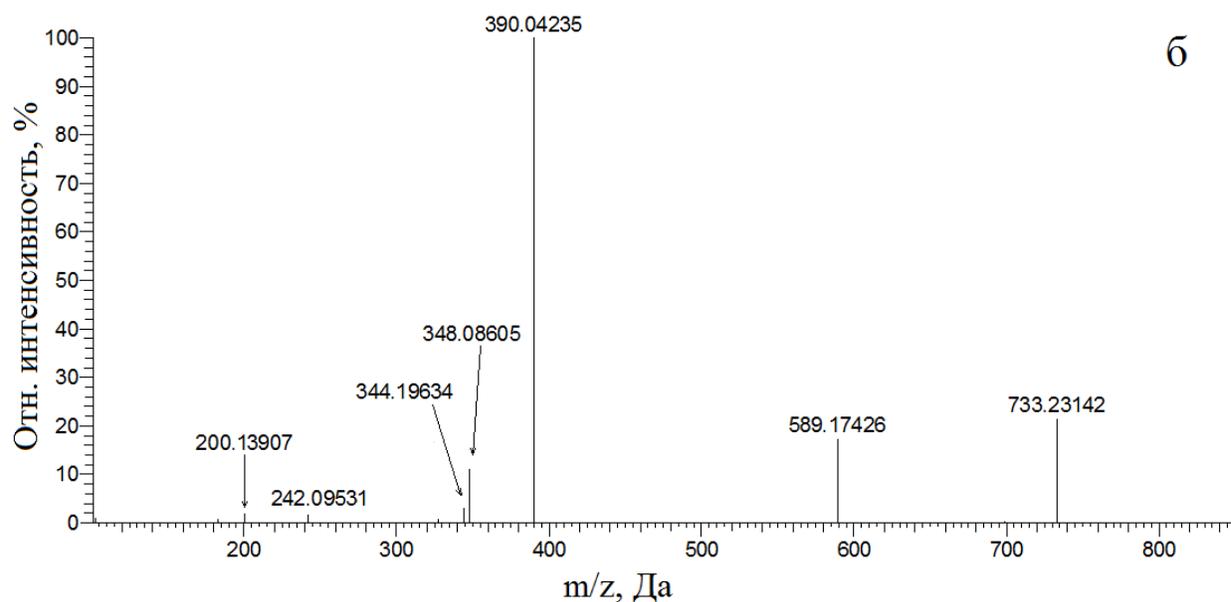
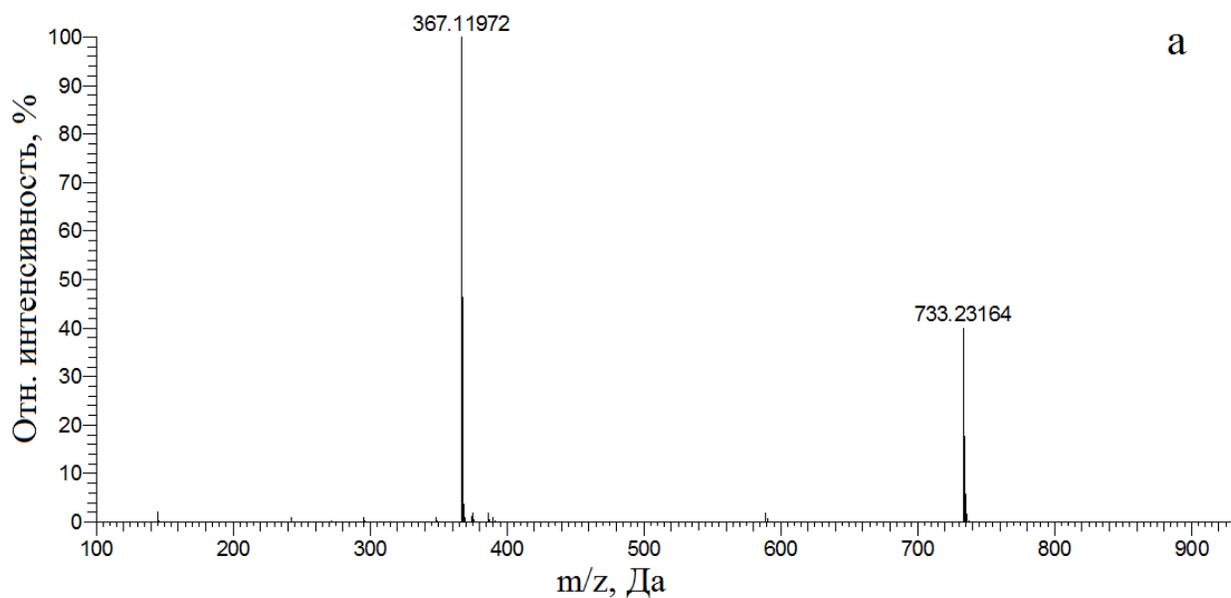


Рисунок П13 – Масс-спектры трейсера КарбС-ЭДФ в режиме регистрации положительно заряженных ионов: первого порядка (а) и второго порядка (б) (ион-предшественник  $m/z$  733,23, энергия в соударительной ячейке 25 эВ)

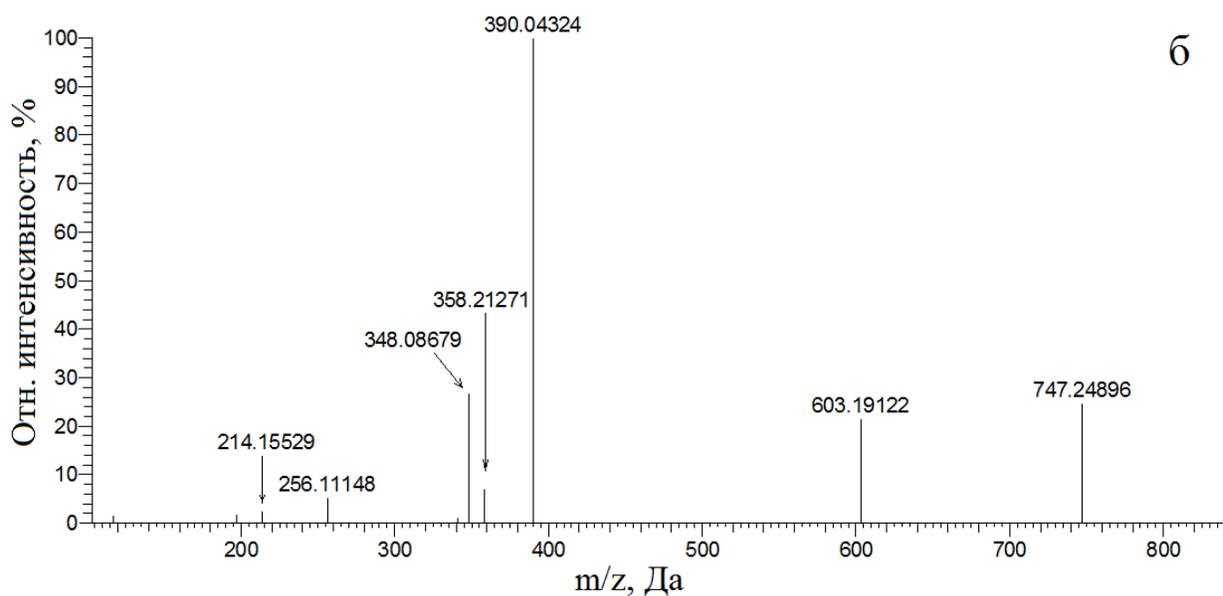
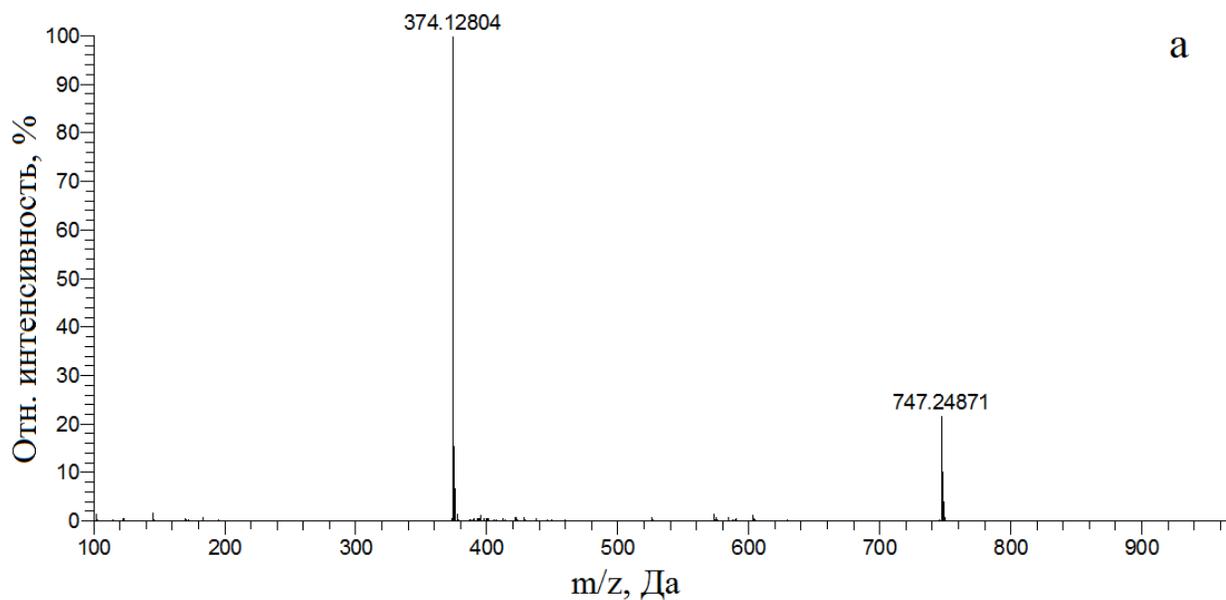


Рисунок П14 – Масс-спектры трейсера КарбС-(СН<sub>2</sub>)<sub>3</sub>ДФ в режиме регистрации положительно заряженных ионов: первого порядка (а) и второго порядка (б) (ион-предшественник m/z 747,25, энергия в соударительной ячейке 25 эВ)

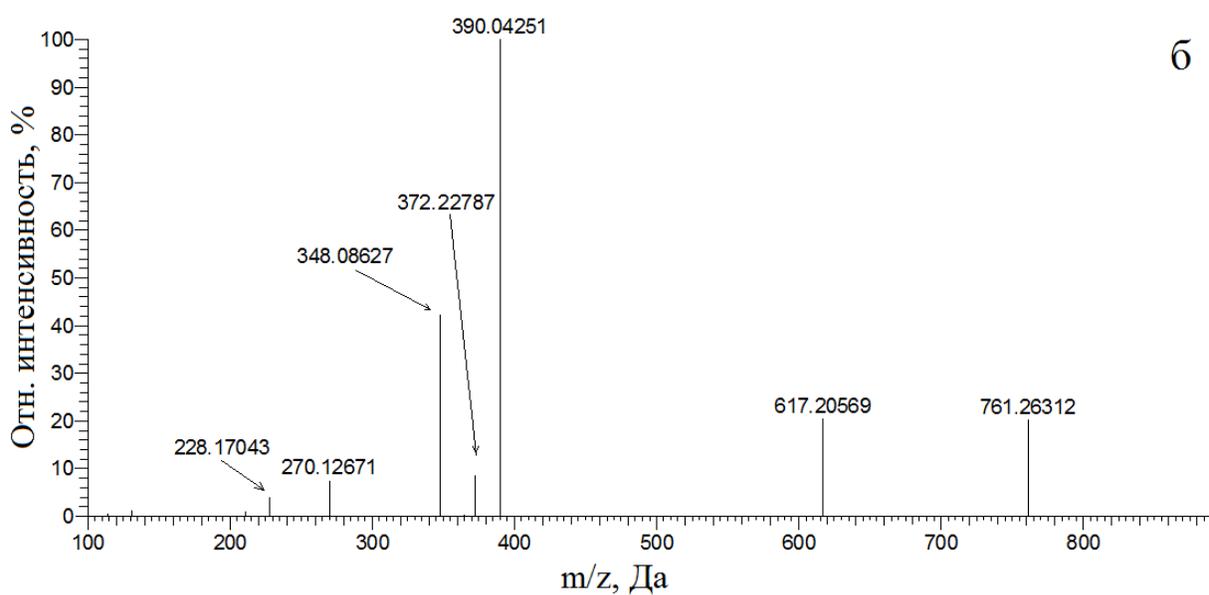
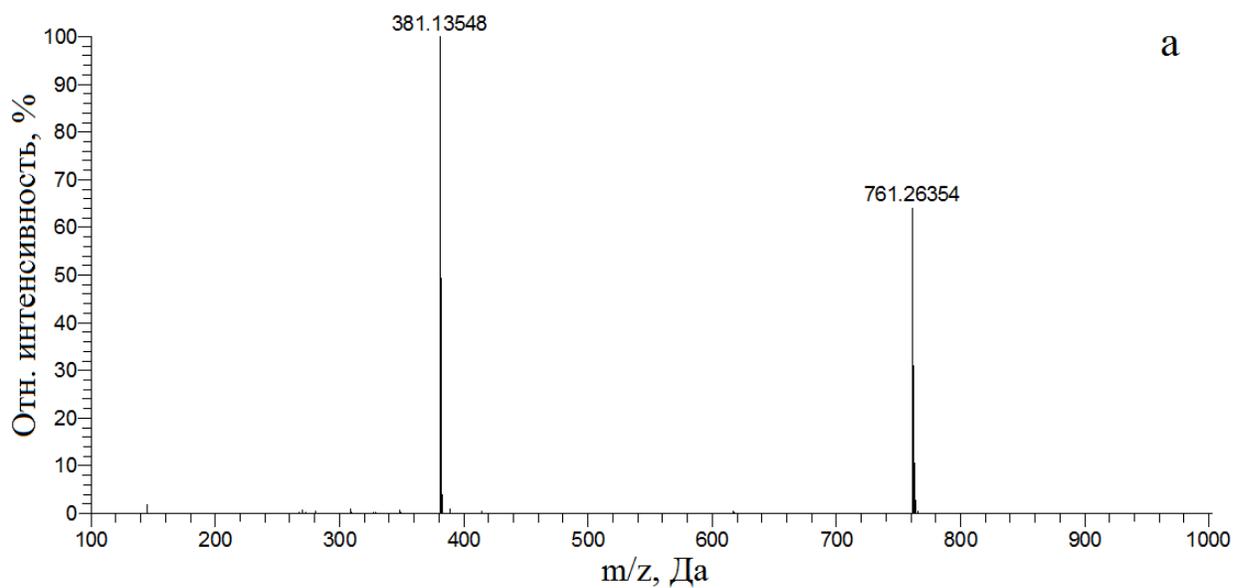


Рисунок П15 – Масс-спектры трейсера КарбС-(СН<sub>2</sub>)<sub>4</sub>ДФ в режиме регистрации положительно заряженных ионов: первого порядка (а) и второго порядка (б) (ион-предшественник m/z 761,26, энергия в соударительной ячейке 25 эВ)

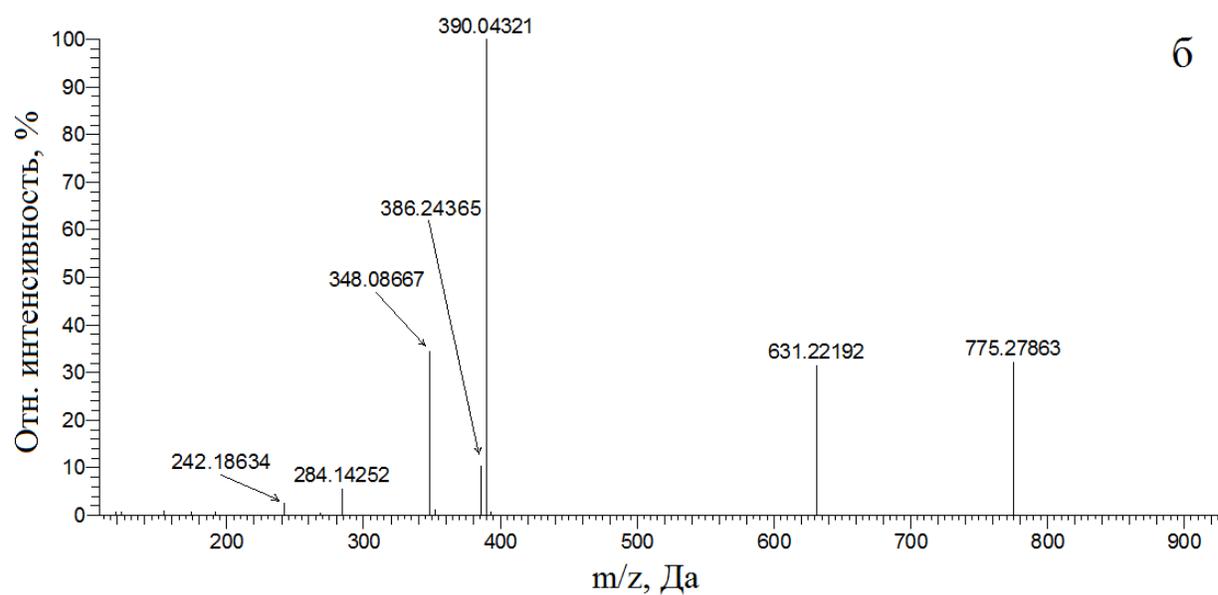
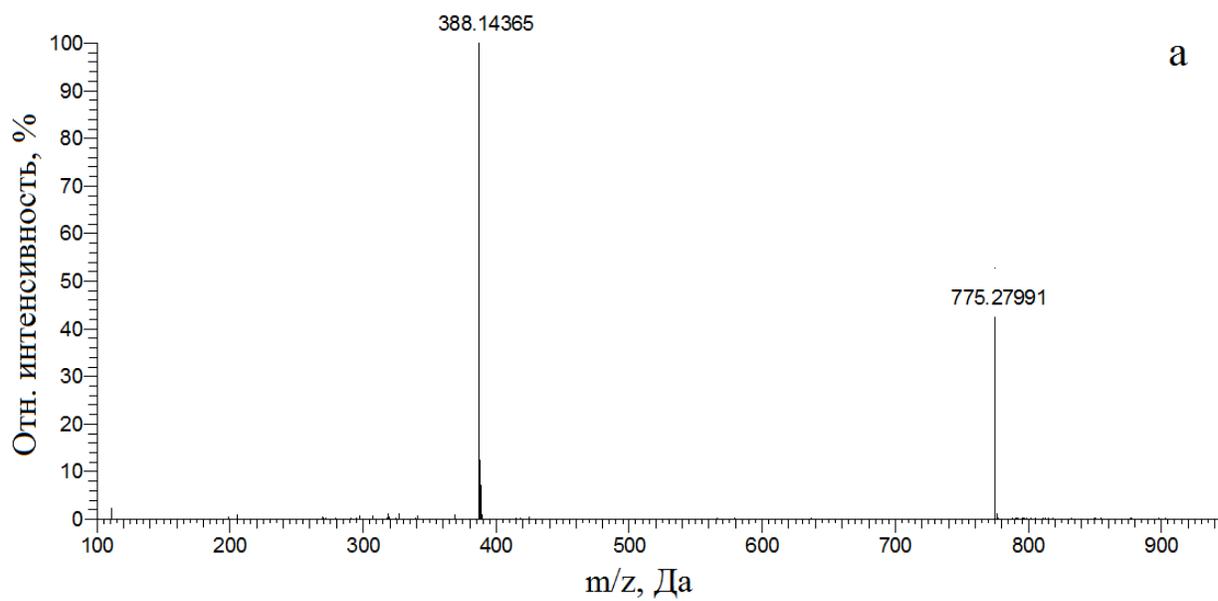


Рисунок П16 – Масс-спектры трейсера КарбС-(СН<sub>2</sub>)<sub>5</sub>ДФ в режиме регистрации положительно заряженных ионов: первого порядка (а) и второго порядка (б) (ион-предшественник m/z 775,28, энергия в соударительной ячейке 25 эВ)

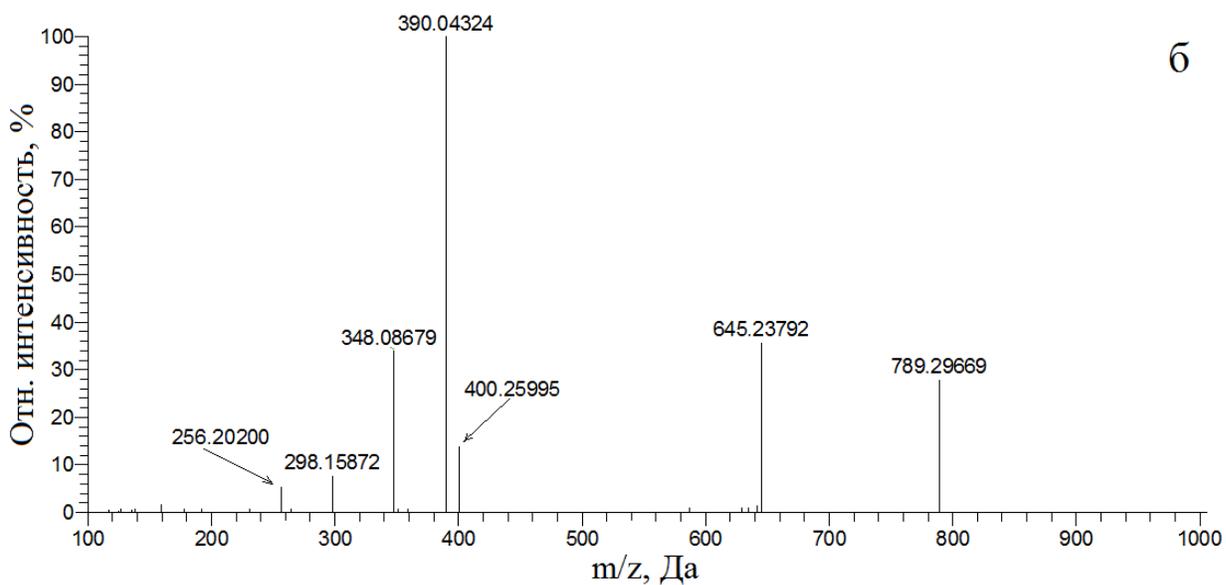
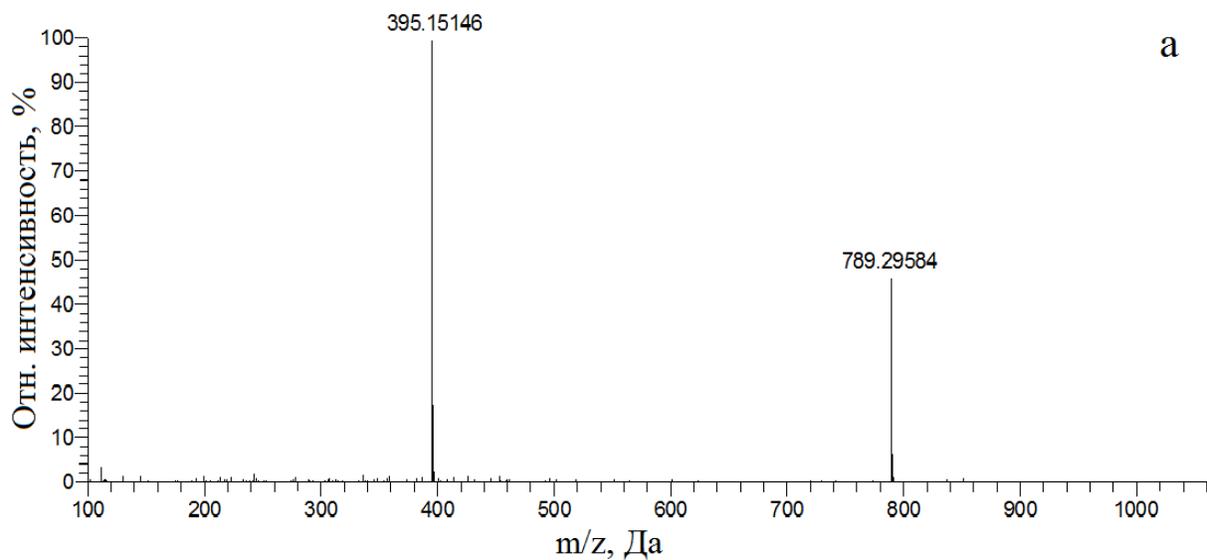


Рисунок П17 – Масс-спектры трейсера КарбС-(СН<sub>2</sub>)<sub>6</sub>ДФ в режиме регистрации положительно заряженных ионов: первого порядка (а) и второго порядка (б) (ион-предшественник m/z 789,30, энергия в соударительной ячейке 25 эВ)

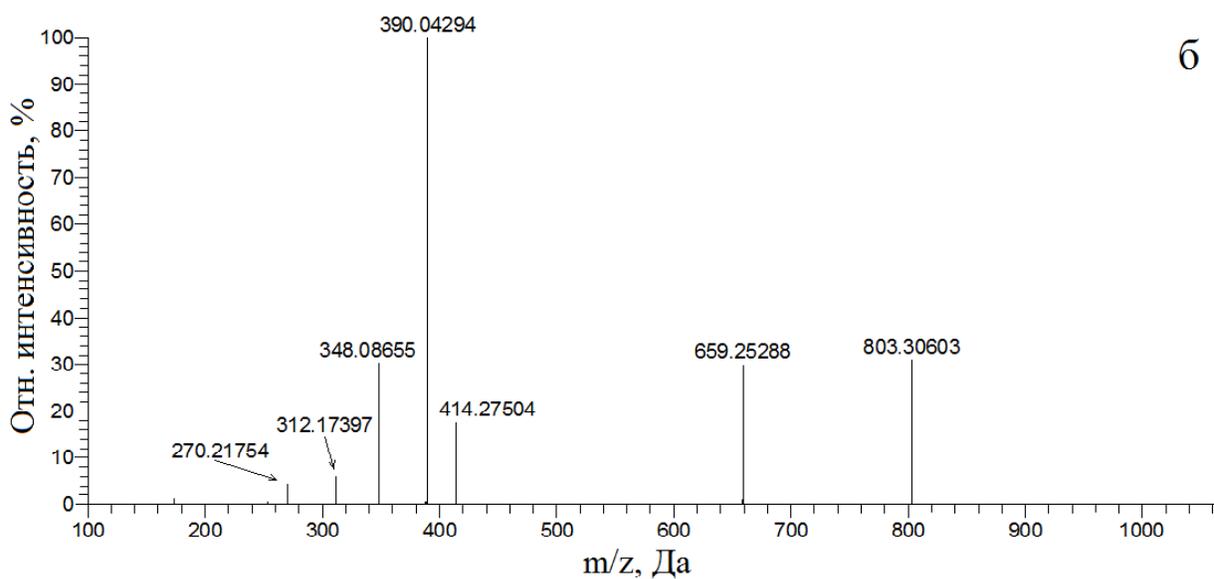
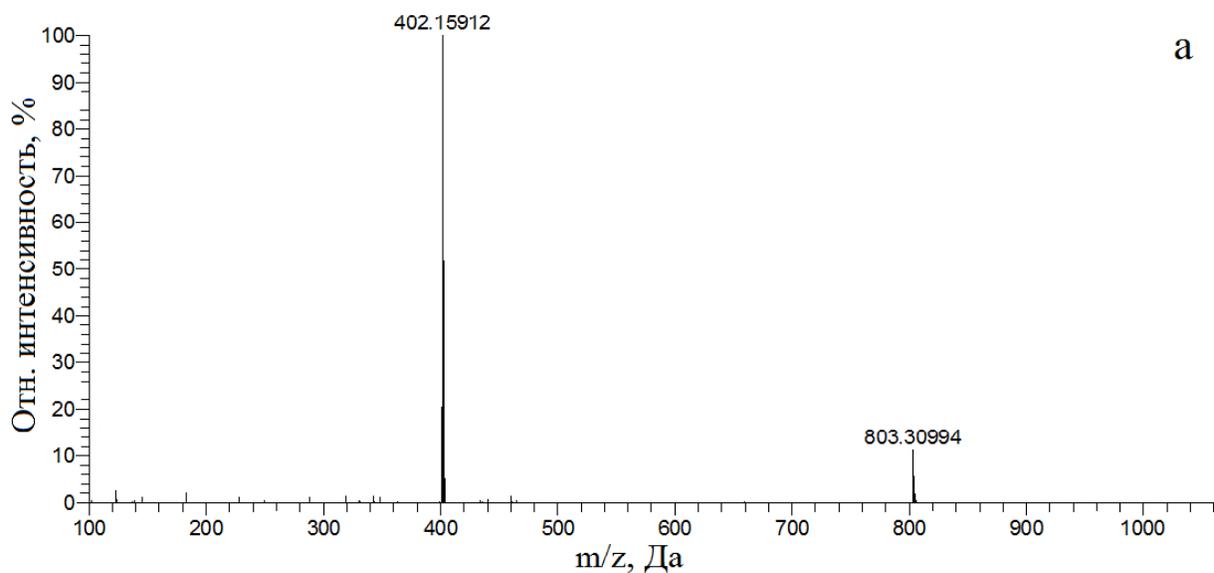


Рисунок П18 – Масс-спектры трейсера КарбС-(СН<sub>2</sub>)<sub>7</sub>ДФ в режиме регистрации положительно заряженных ионов: первого порядка (а) и второго порядка (б) (ион-предшественник m/z 803,31, энергия в соударительной ячейке 25 эВ)

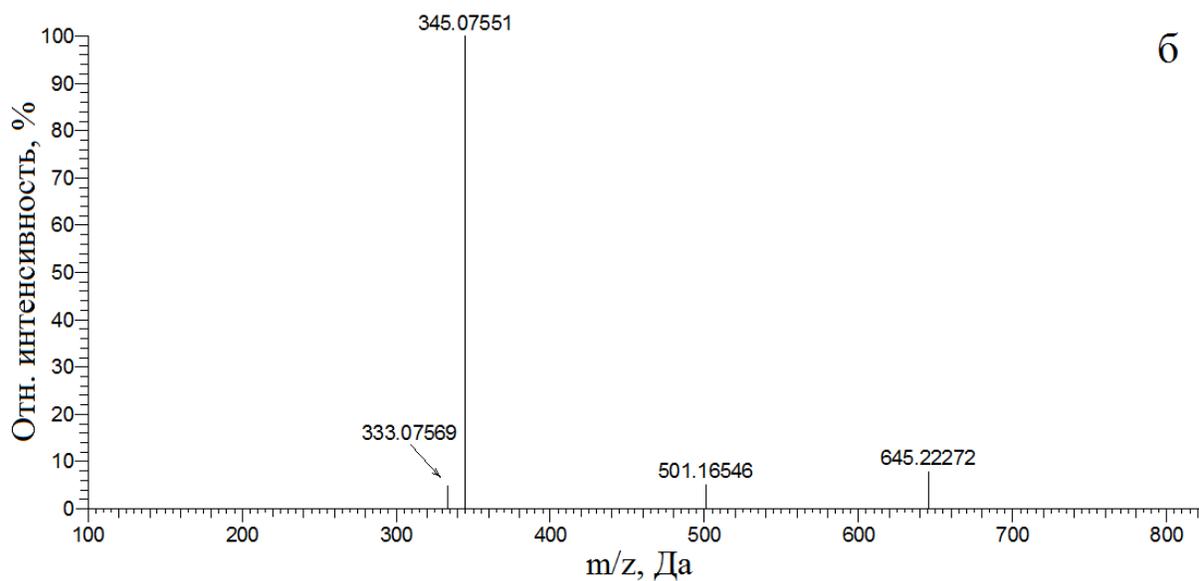
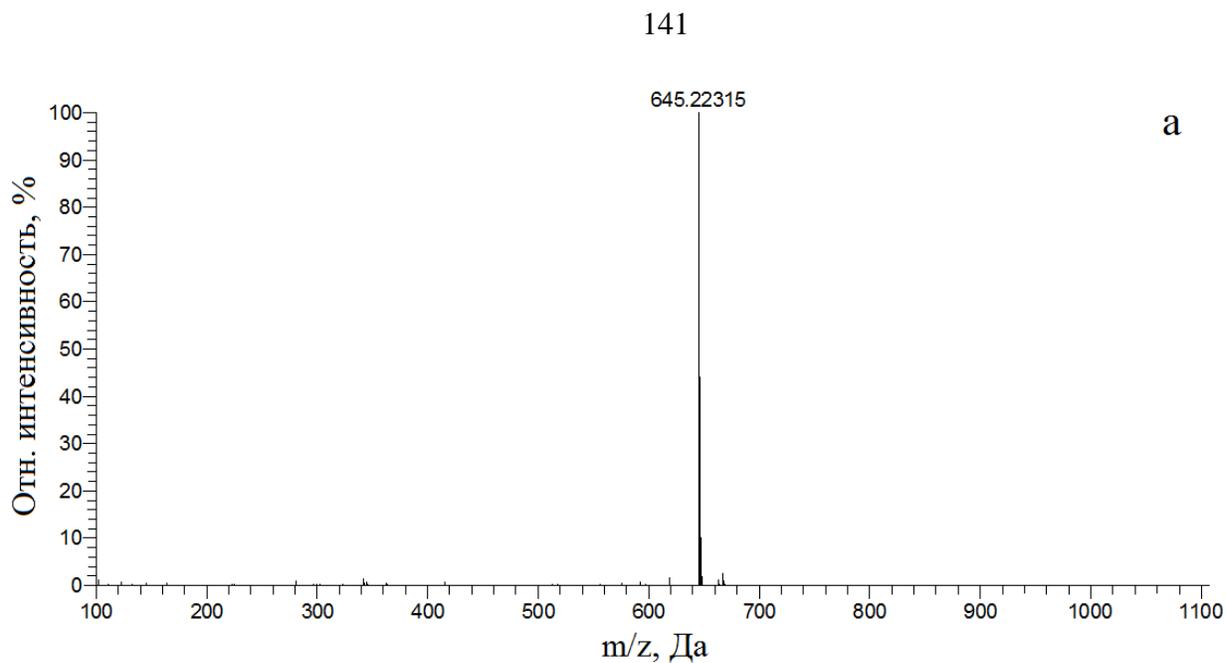


Рисунок П19 – Масс-спектры трейсера КарбС-АМФ в режиме регистрации положительно заряженных ионов: первого порядка (а) и второго порядка (б) (ион-предшественник  $m/z$  645,22, энергия в соударительной ячейке 25 эВ)

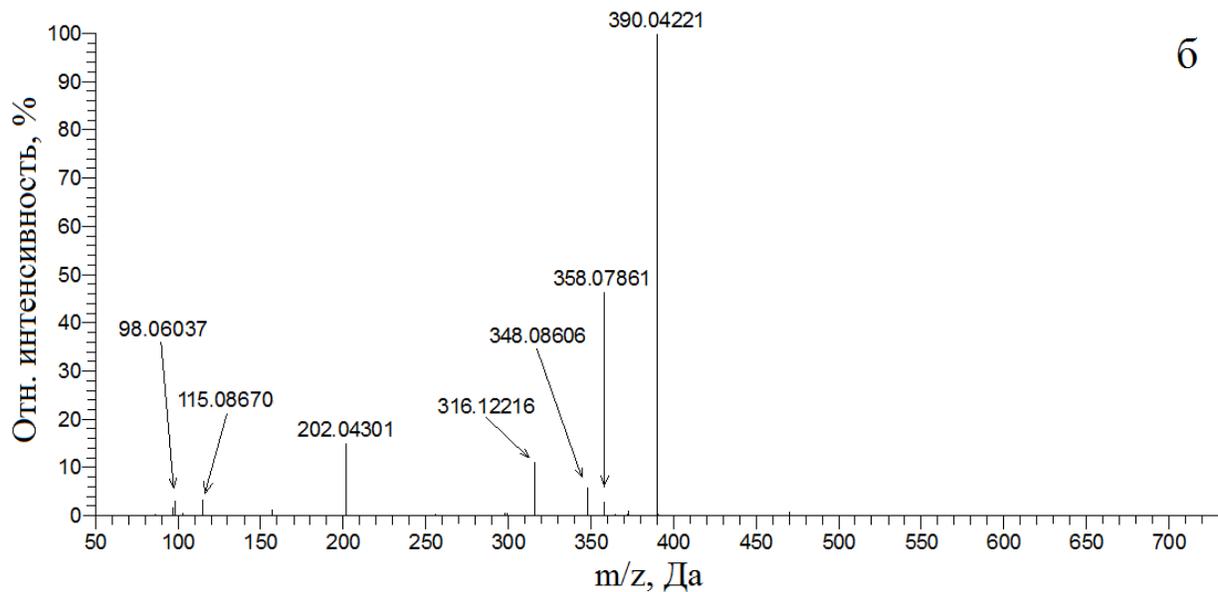
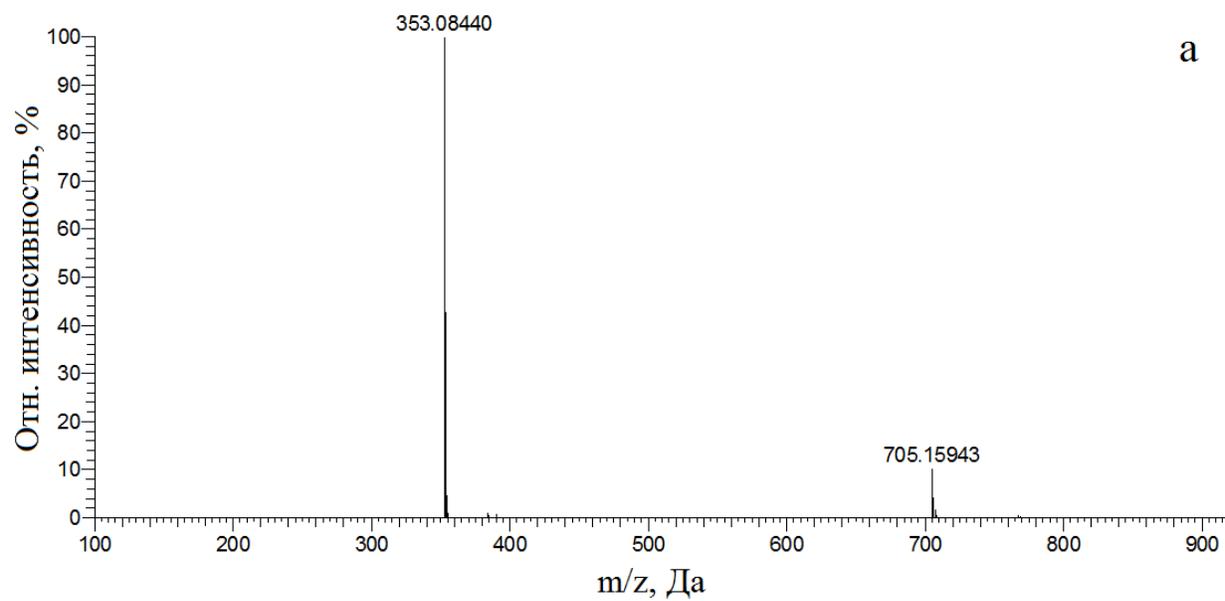


Рисунок П20 – Масс-спектры трейсера Тбз3С-ЭДФ в режиме регистрации положительно заряженных ионов: первого порядка (а) и второго порядка (б) (ион-предшественник  $m/z$  705,16, энергия в соударительной ячейке 35 эВ)

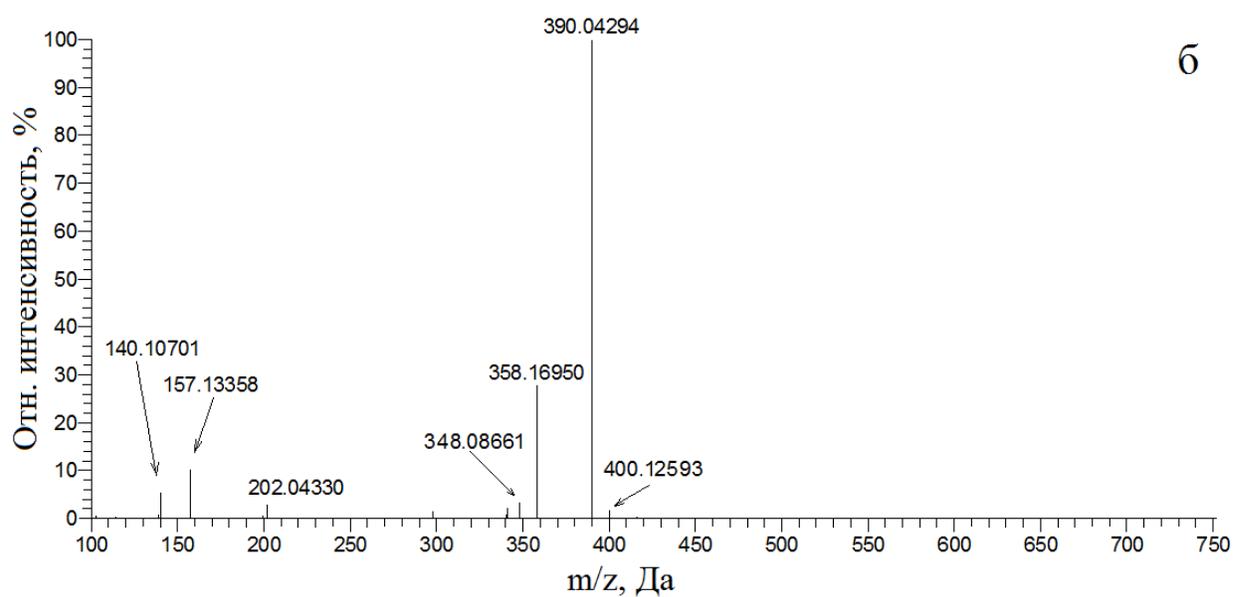
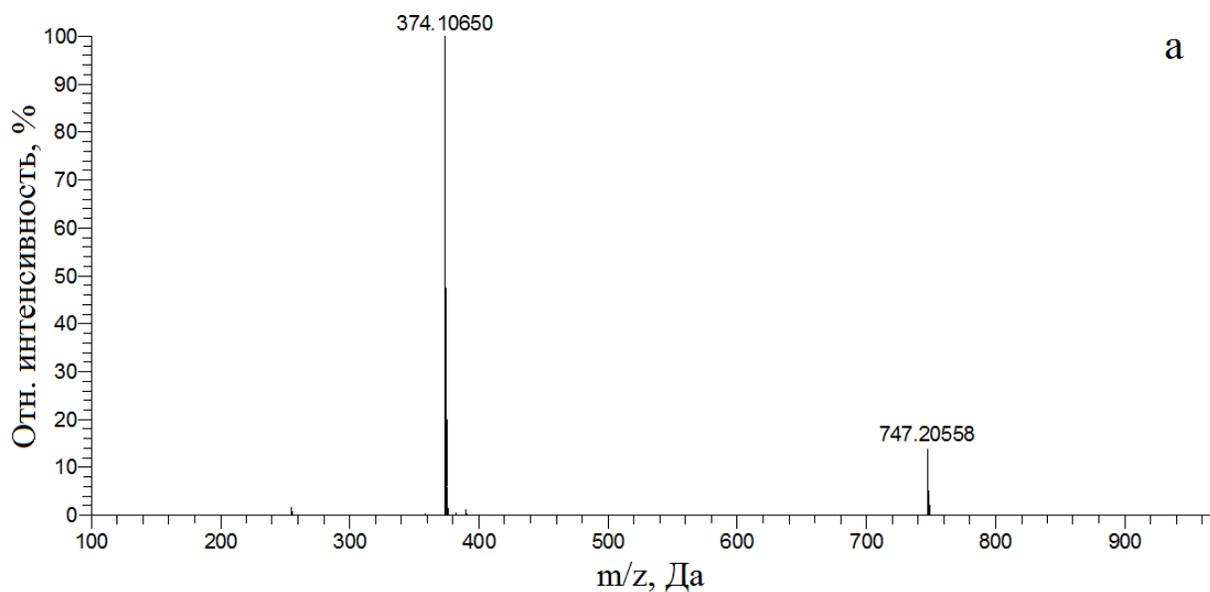


Рисунок П21 – Масс-спектры трейсера Тбз6С-ЭДФ в режиме регистрации положительно заряженных ионов: первого порядка (а) и второго порядка (б) (ион-предшественник  $m/z$  747,21, энергия в соударительной ячейке 35 эВ)

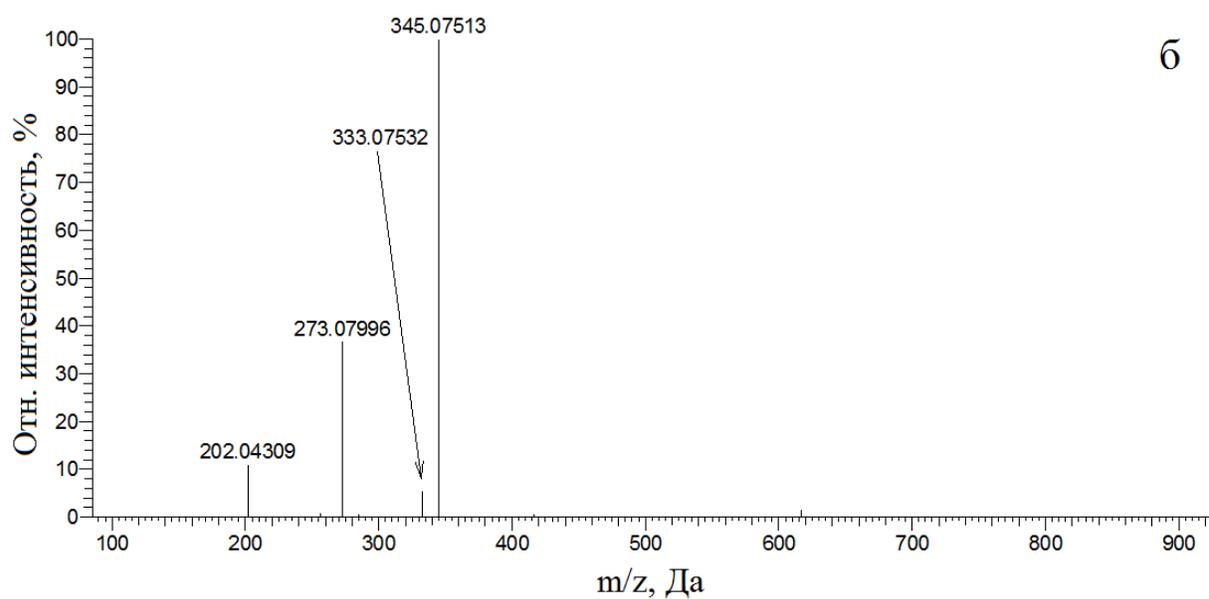
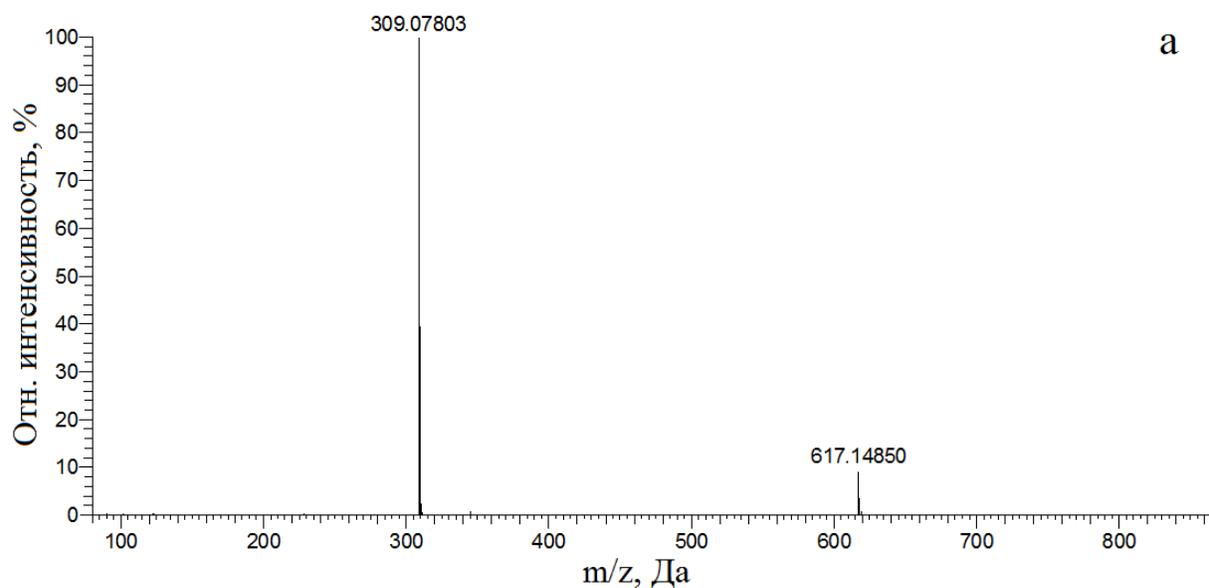


Рисунок П22 – Масс-спектры трейсера ТбзЗС-АМФ в режиме регистрации положительно заряженных ионов: первого порядка (а) и второго порядка (б) (ион-предшественник  $m/z$  617,15, энергия в соударительной ячейке 35 эВ)

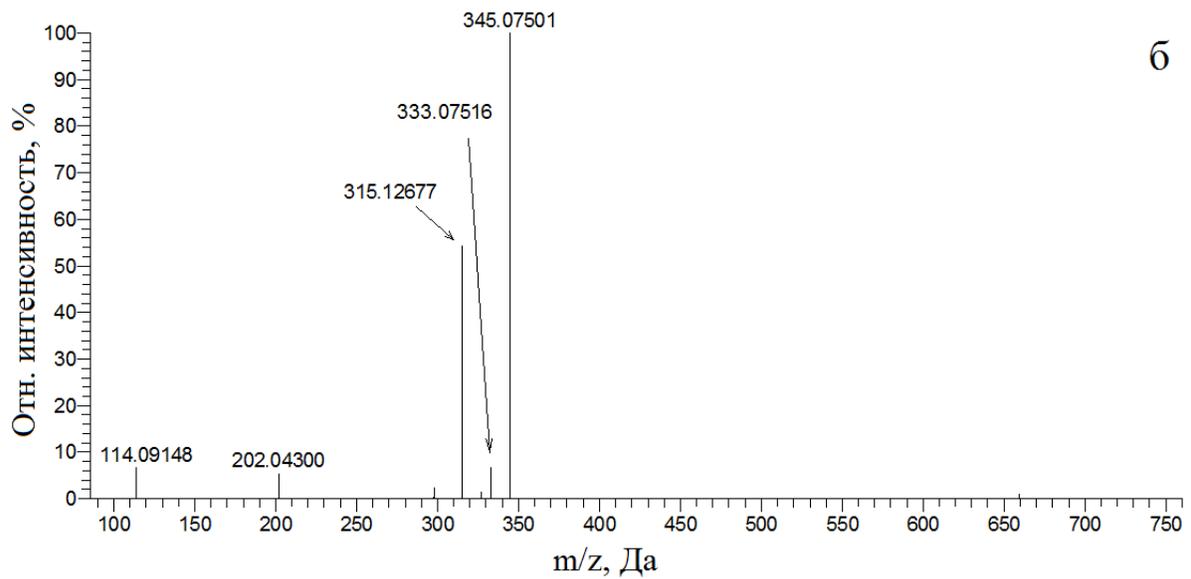
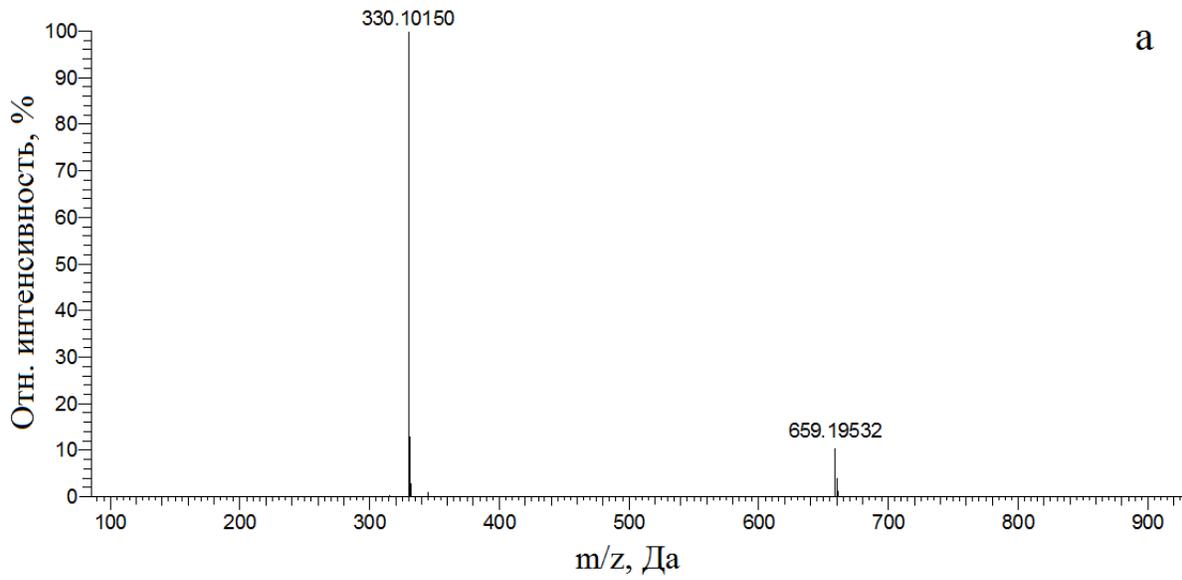


Рисунок П23 – Масс-спектры трейсера ТбзбС-АМФ в режиме регистрации положительно заряженных ионов: первого порядка (а) и второго порядка (б) (ион-предшественник  $m/z$  659,20, энергия в соударительной ячейке 35 эВ)

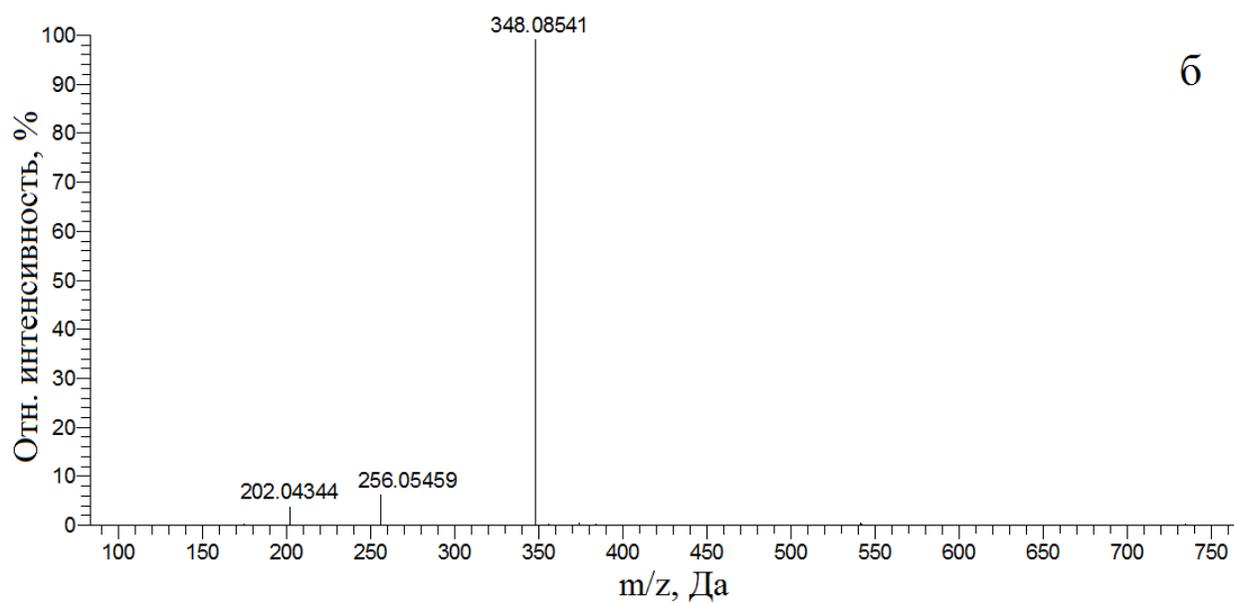
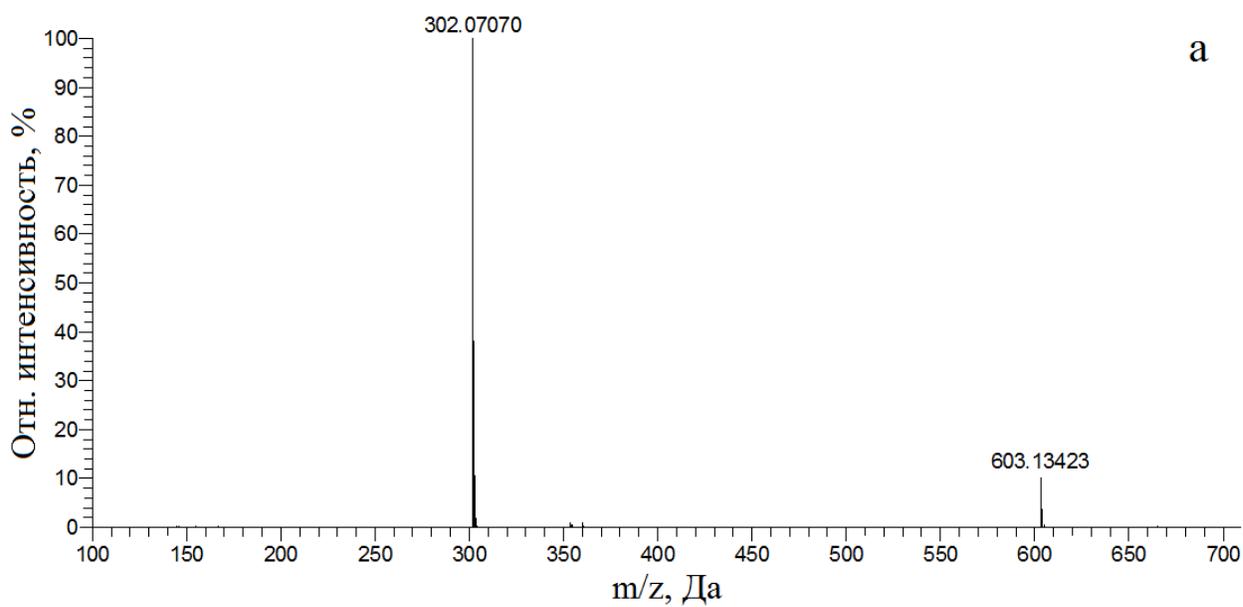


Рисунок П24 – Масс-спектры трейсера Тбз3С-АФ в режиме регистрации положительно заряженных ионов: первого порядка (а) и второго порядка (б) (ион-предшественник  $m/z$  603,13, энергия в соударительной ячейке 35 эВ)

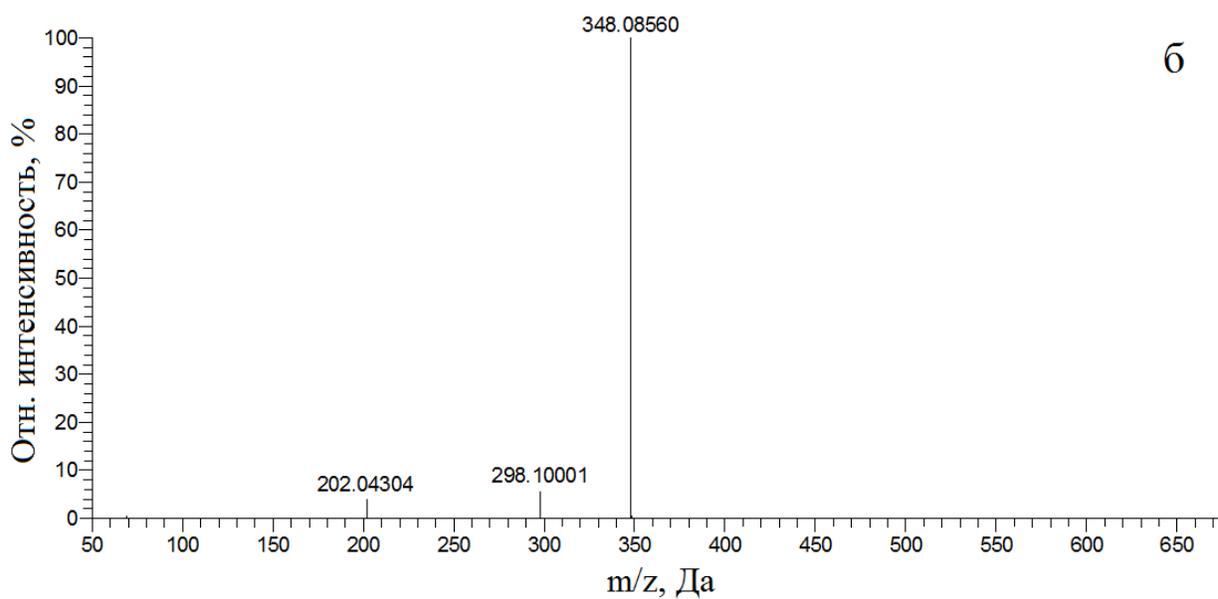
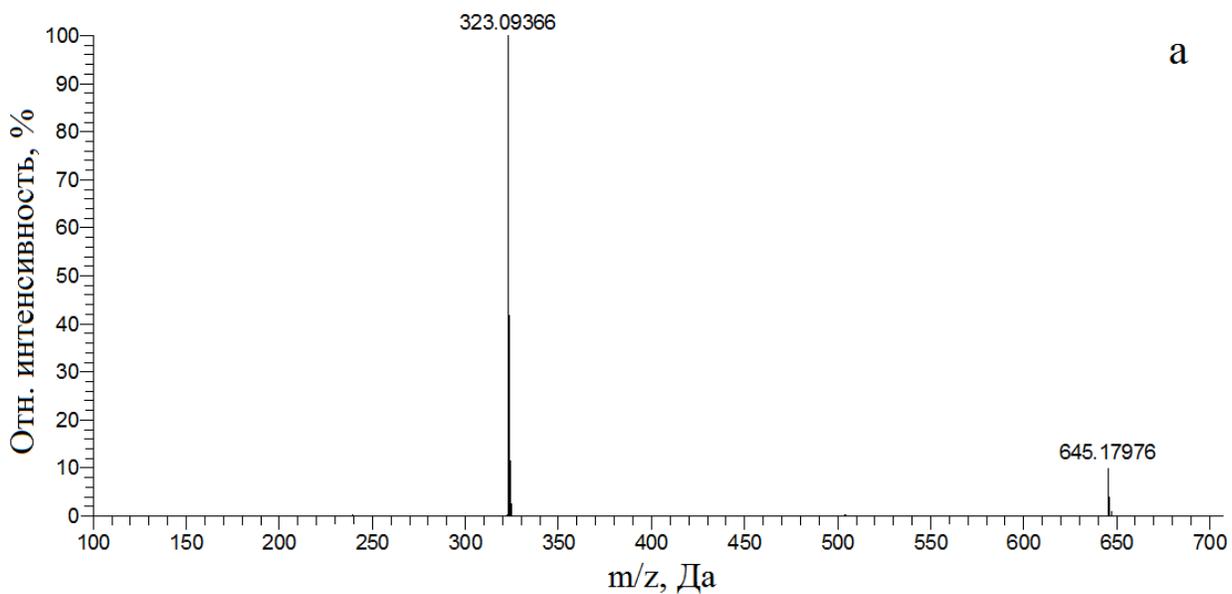


Рисунок П25 – Масс-спектры трейсера ТбзбС-АФ в режиме регистрации положительно заряженных ионов: первого порядка (а) и второго порядка (б) (ион-предшественник  $m/z$  645,18, энергия в соударительной ячейке 35 эВ)

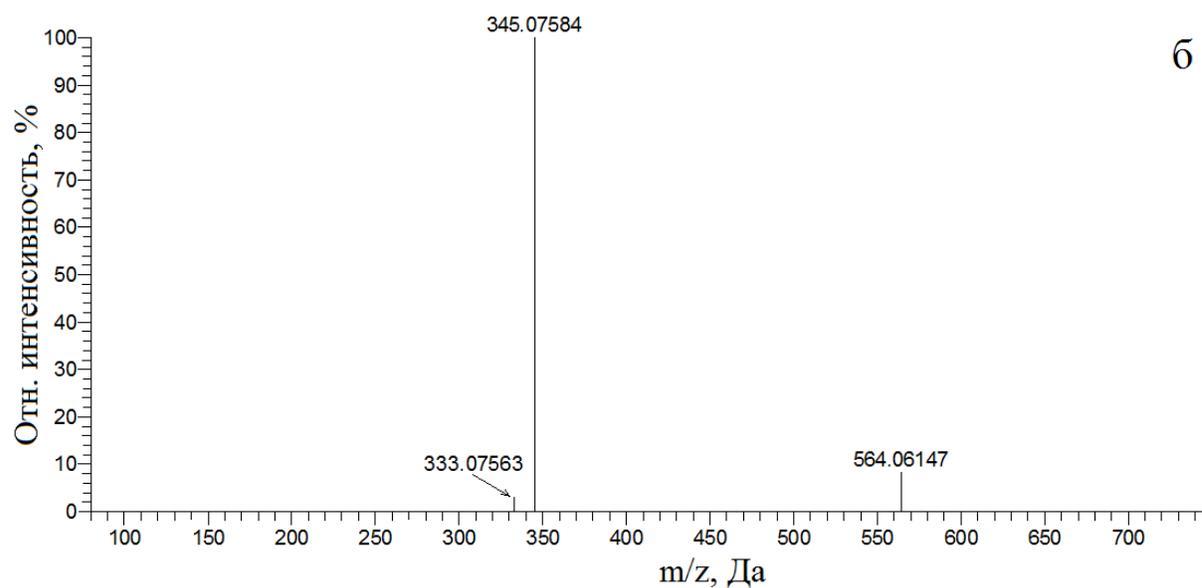
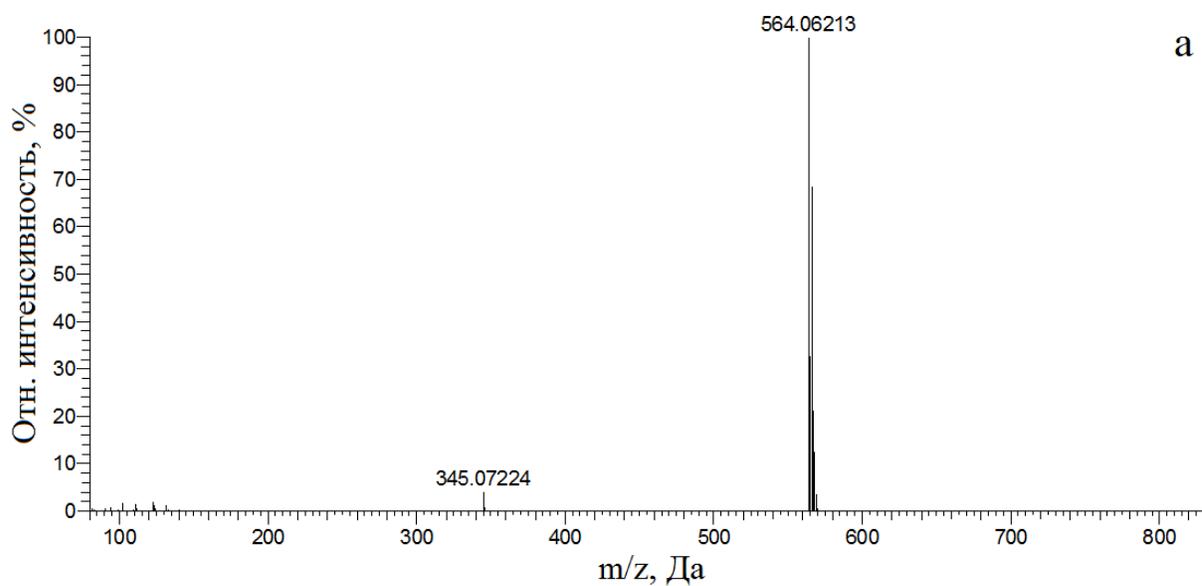


Рисунок П26 – Масс-спектры трейсера 2,4-Д-АМФ в режиме регистрации положительно заряженных ионов: первого порядка (а) и второго порядка (б) (ион-предшественник  $m/z$  564,06, энергия в соударительной ячейке 25 эВ)

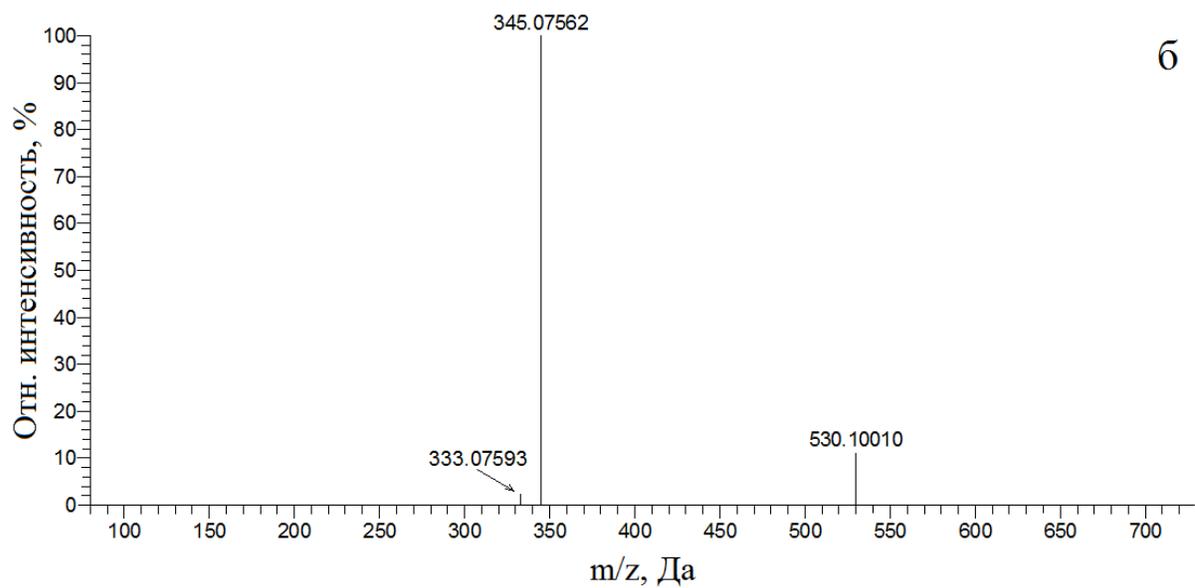
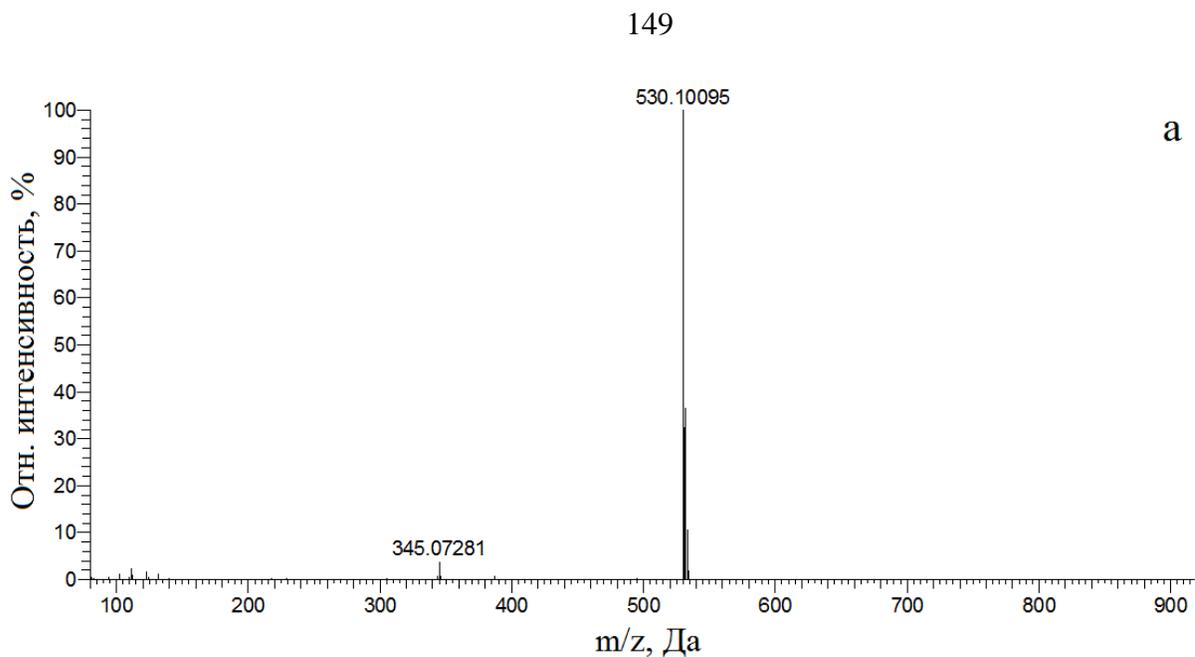


Рисунок П27 – Масс-спектры трейсера 4-ХФУ-АМФ в режиме регистрации положительно заряженных ионов: первого порядка (а) и второго порядка (б) (ион-предшественник  $m/z$  530,10, энергия в соударительной ячейке 25 эВ)

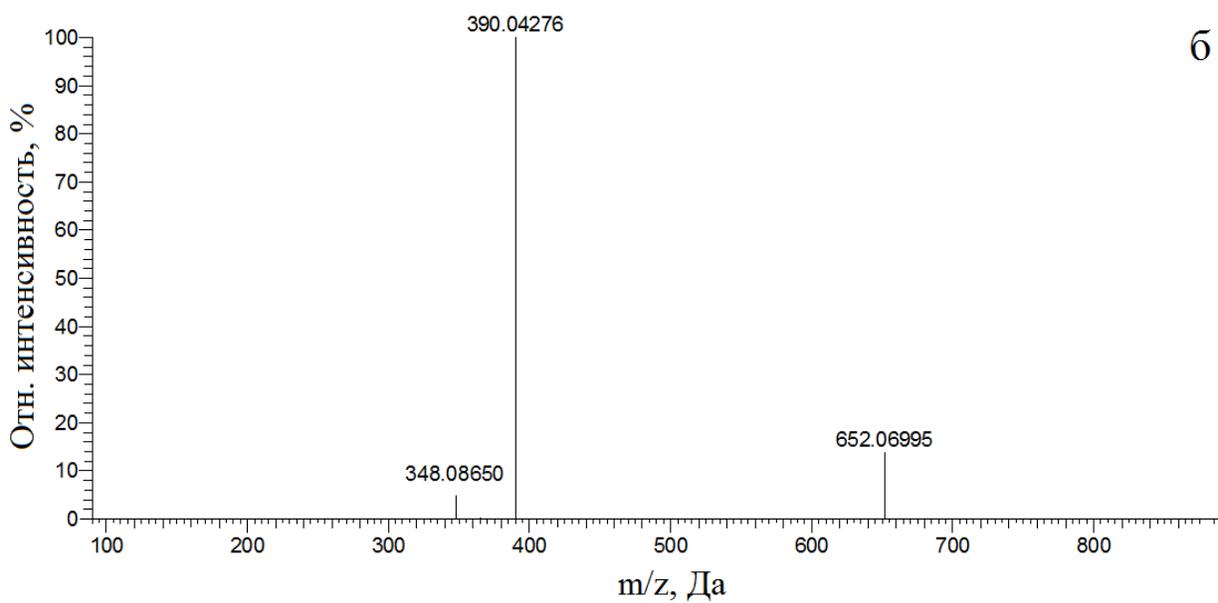
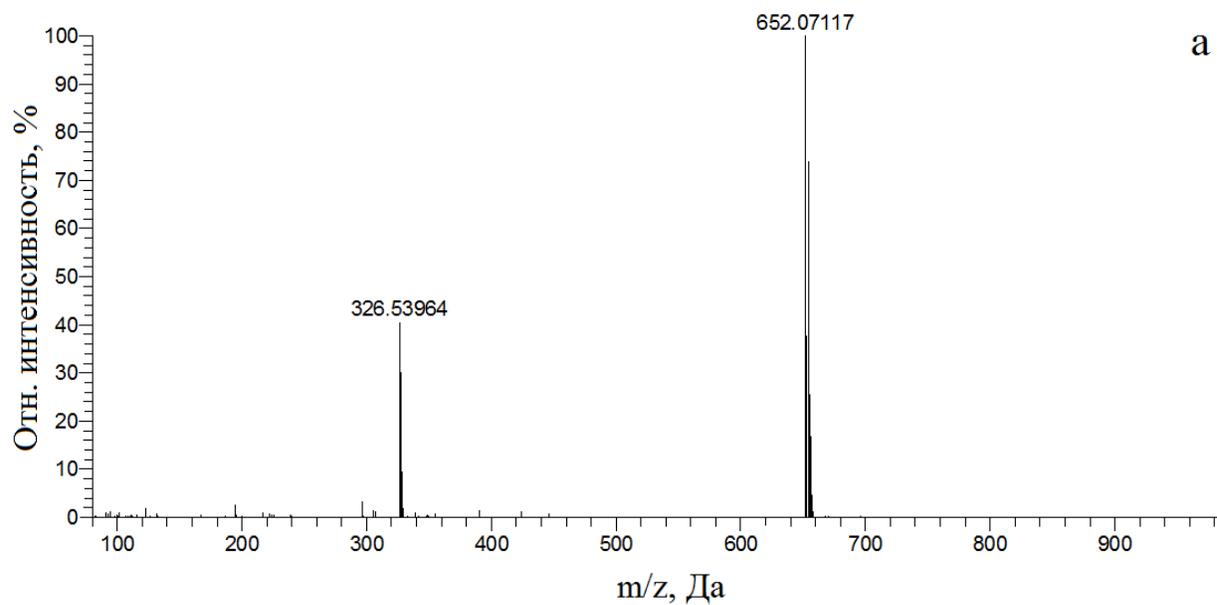


Рисунок П28 – Масс-спектры трейсера 2,4-Д-ЭДФ в режиме регистрации положительно заряженных ионов: первого порядка (а) и второго порядка (б) (ион-предшественник  $m/z$  652,07, энергия в соударительной ячейке 25 эВ)

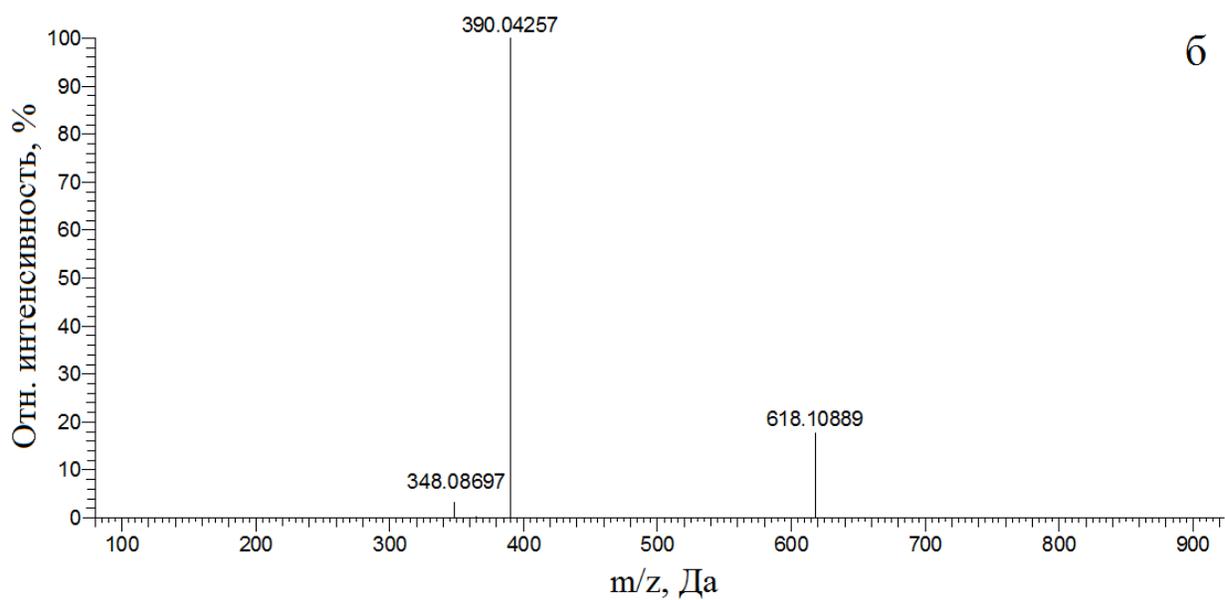
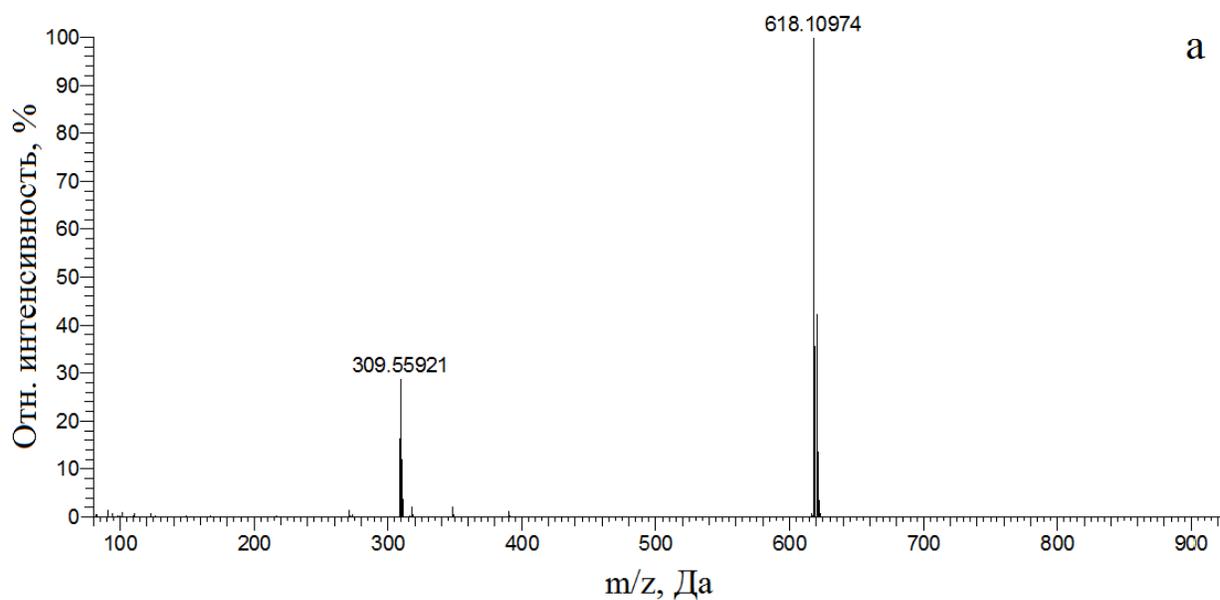


Рисунок П29 – Масс-спектры трейсера 4-ХФУ-ЭДФ в режиме регистрации положительно заряженных ионов: первого порядка (а) и второго порядка (б) (ион-предшественник  $m/z$  618,11, энергия в соударительной ячейке 25 эВ)

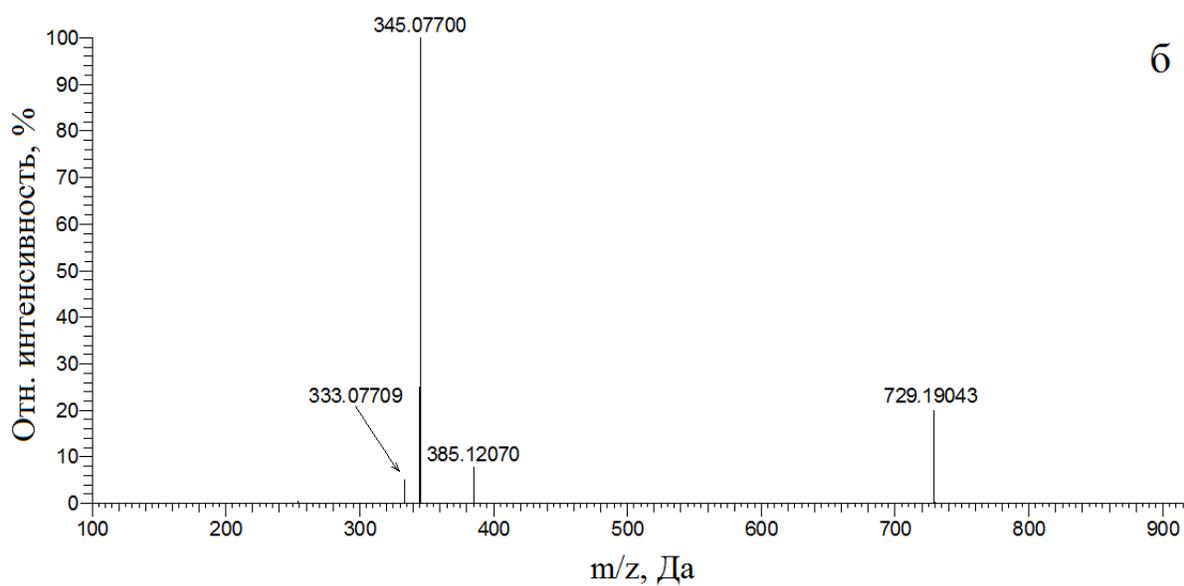
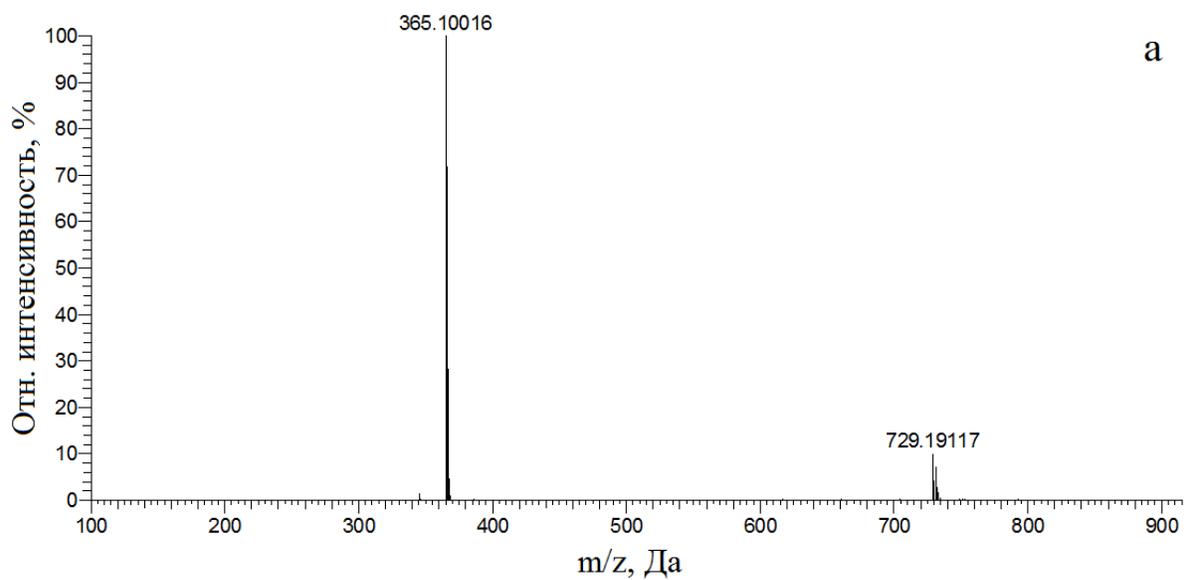


Рисунок П30 – Масс-спектры трейсера ТкзбС-АМФ в режиме регистрации положительно заряженных ионов: первого порядка (а) и второго порядка (б) (ион-предшественник  $m/z$  729,19, энергия в соударительной ячейке 20 эВ)

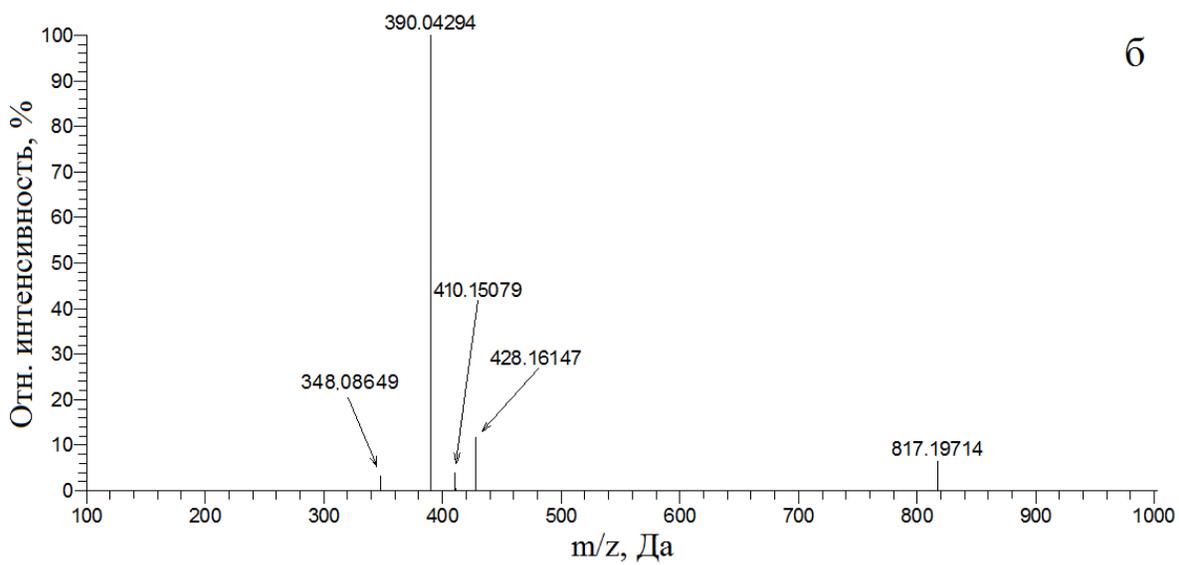
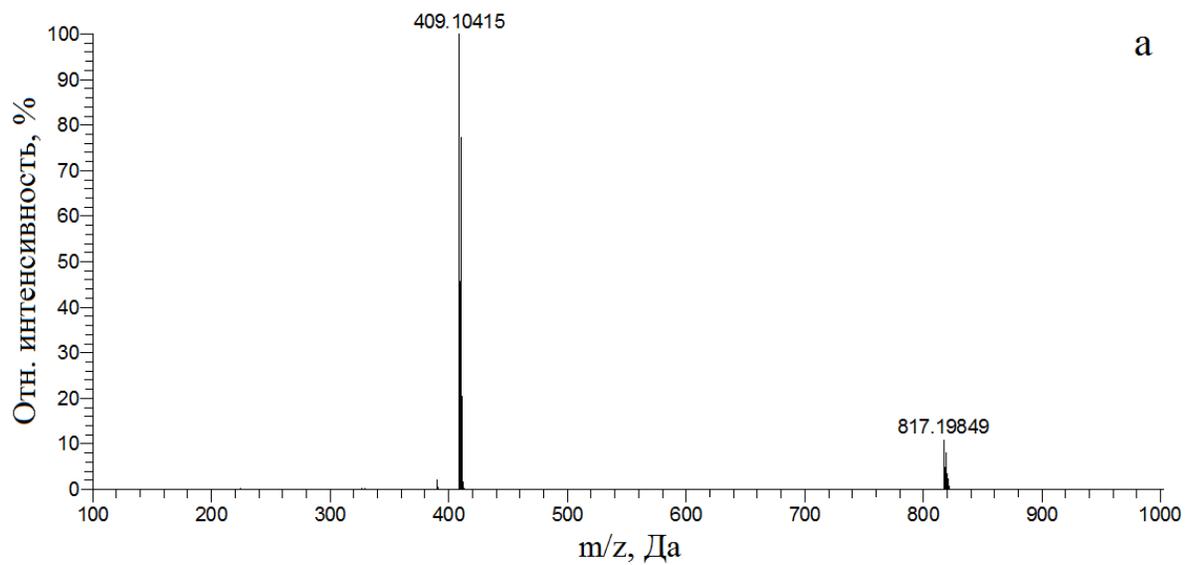


Рисунок П31 – Масс-спектры трейсера ТкзбС-ЭДФ в режиме регистрации положительно заряженных ионов: первого порядка (а) и второго порядка (б) (ион-предшественник  $m/z$  817,20, энергия в соударительной ячейке 20 эВ)

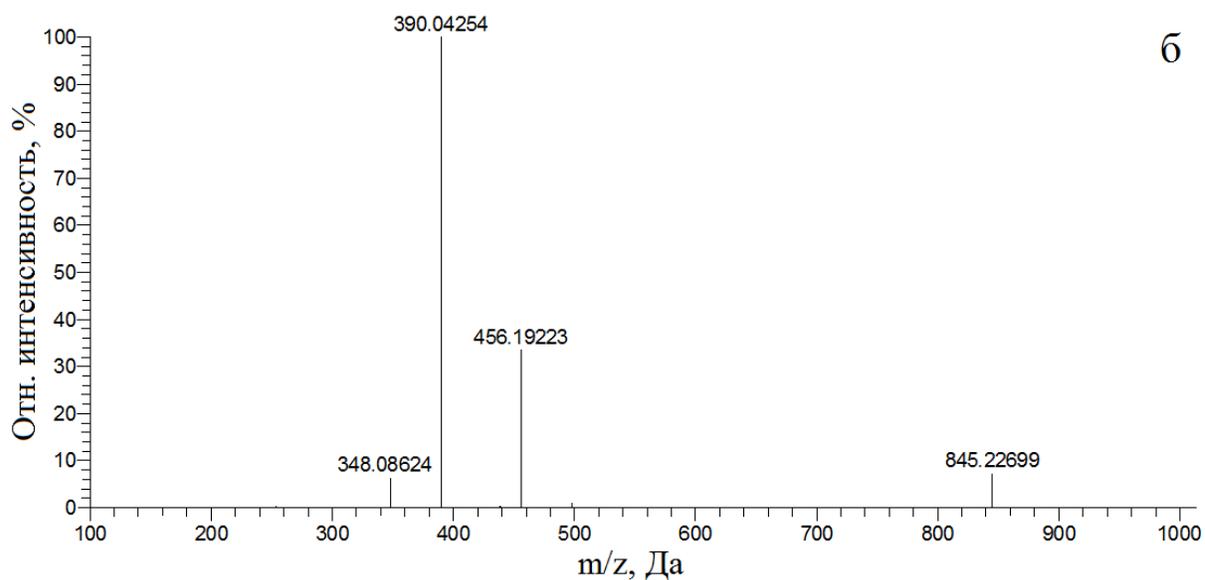
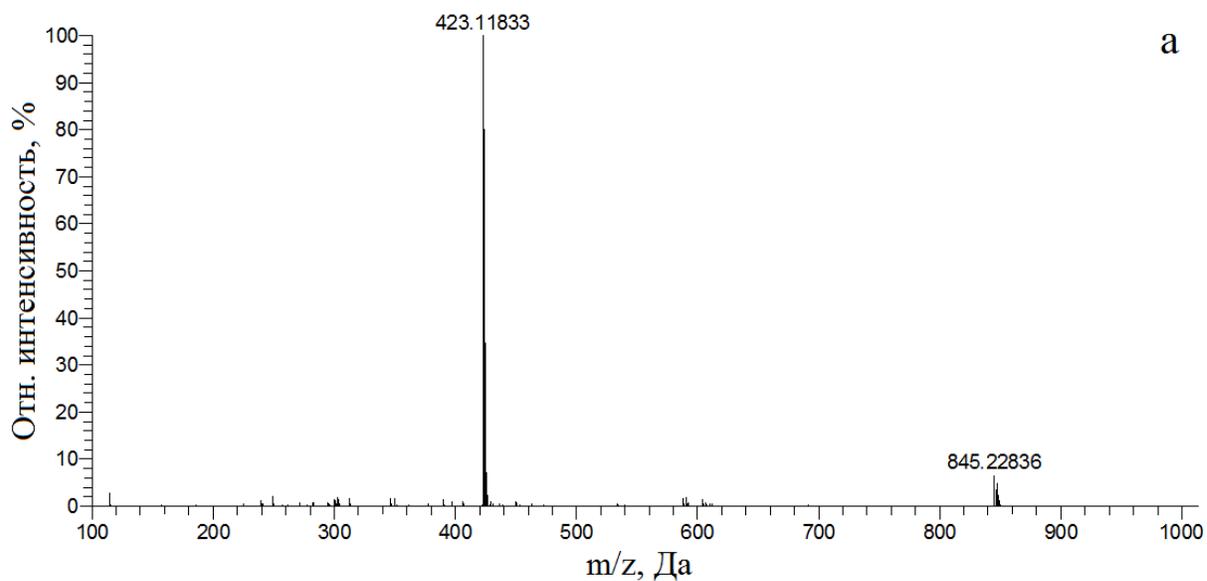


Рисунок П32 – Масс-спектры трейсера ТкзбС-(СН<sub>2</sub>)<sub>4</sub>ДФ в режиме регистрации положительно заряженных ионов: первого порядка (а) и второго порядка (б) (ион-предшественник m/z 845,23, энергия в соударительной ячейке 20 эВ)

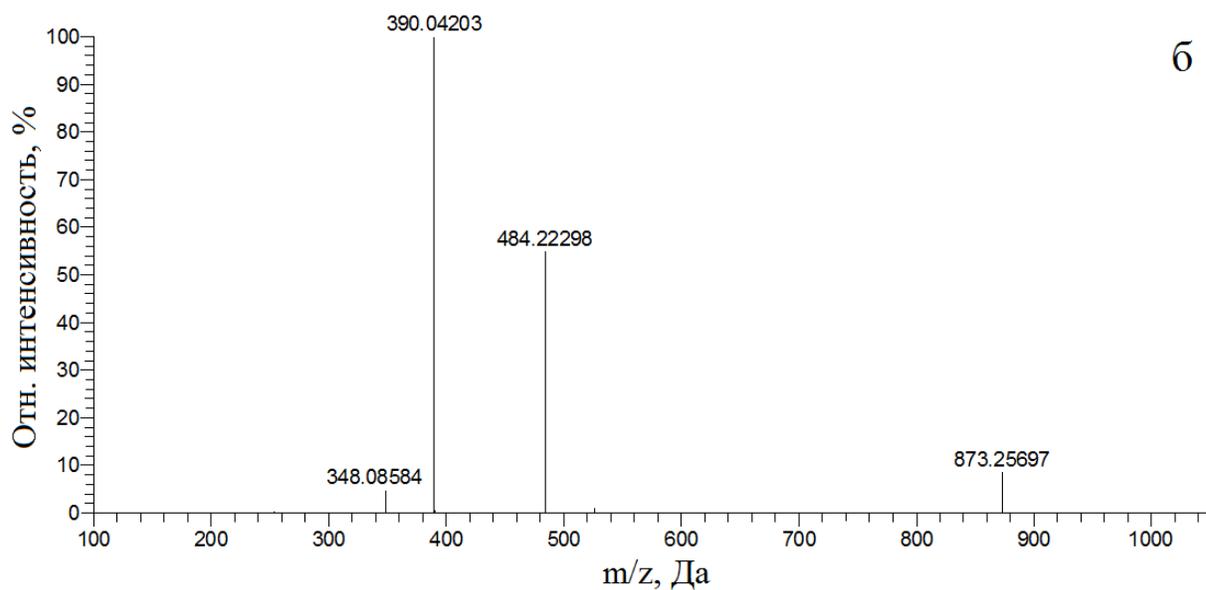
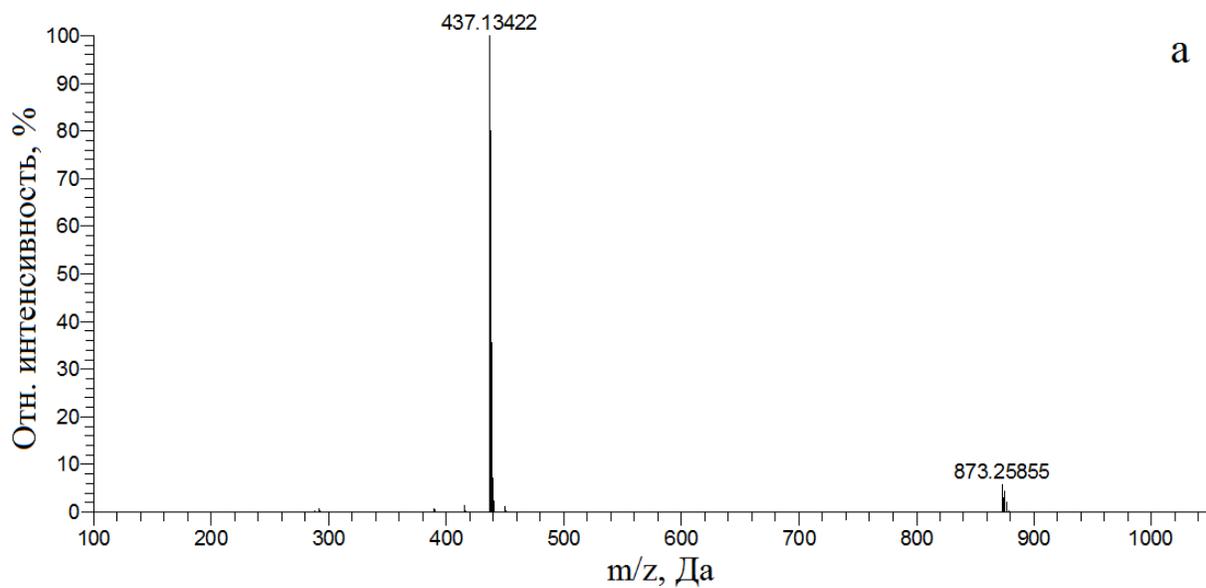


Рисунок П33 – Масс-спектры трейсера Ткз6С-(СН<sub>2</sub>)<sub>6</sub>ДФ в режиме регистрации положительно заряженных ионов: первого порядка (а) и второго порядка (б) (ион-предшественник m/z 873,26, энергия в соударительной ячейке 20 эВ)

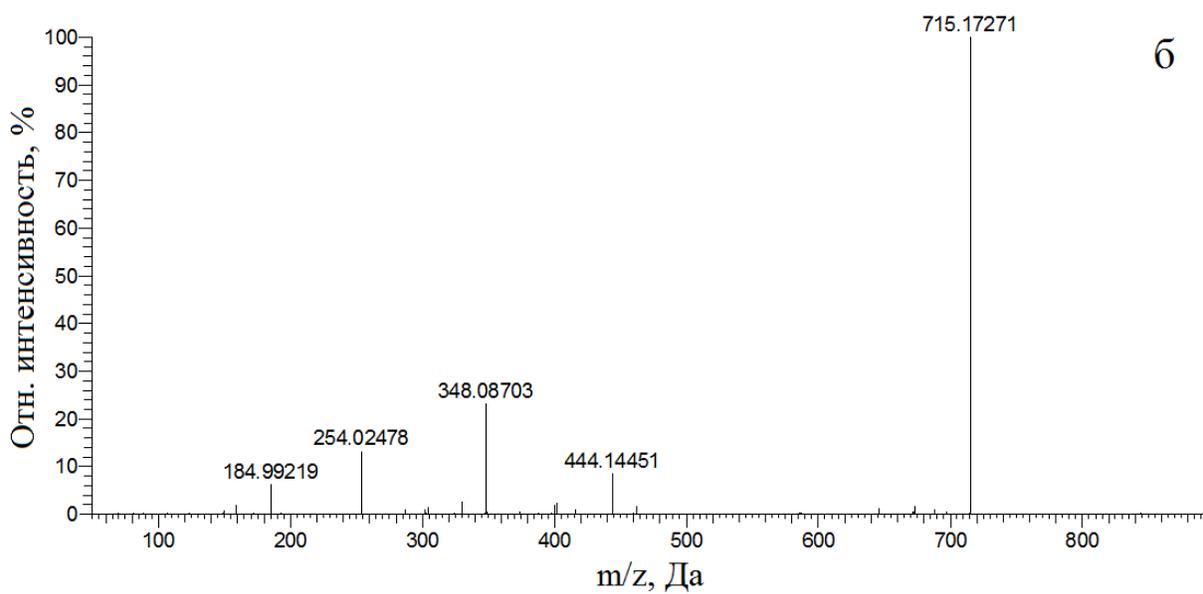
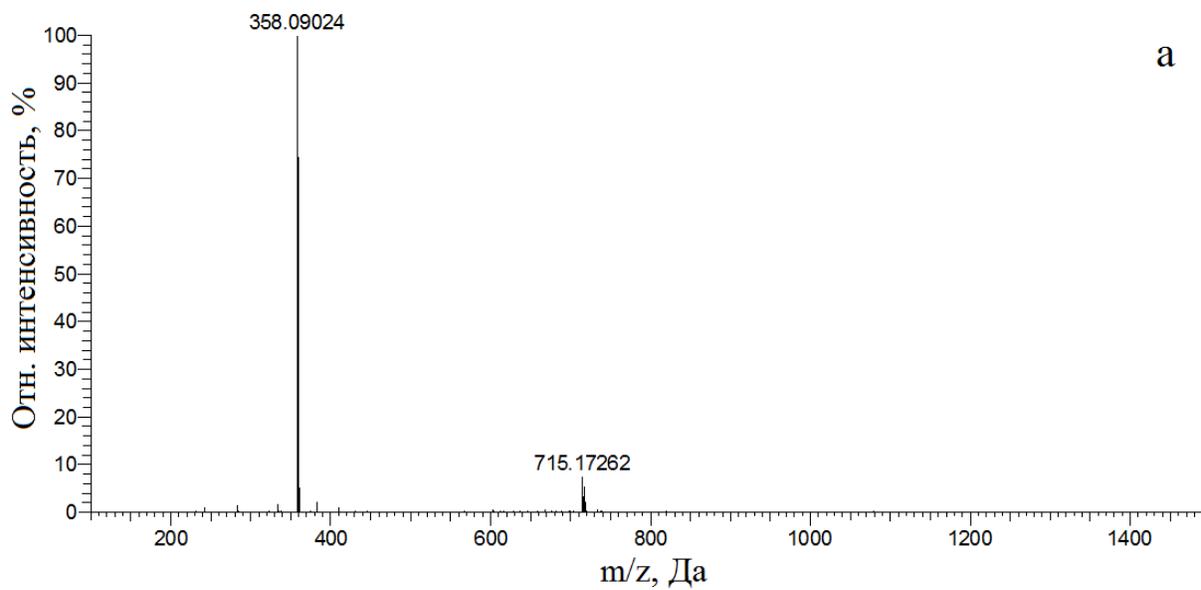


Рисунок П34 – Масс-спектры трейсера ТкзбС-АФ в режиме регистрации положительно заряженных ионов: первого порядка (а) и второго порядка (б) (ион-предшественник  $m/z$  715,17, энергия в соударительной ячейке 35 эВ)

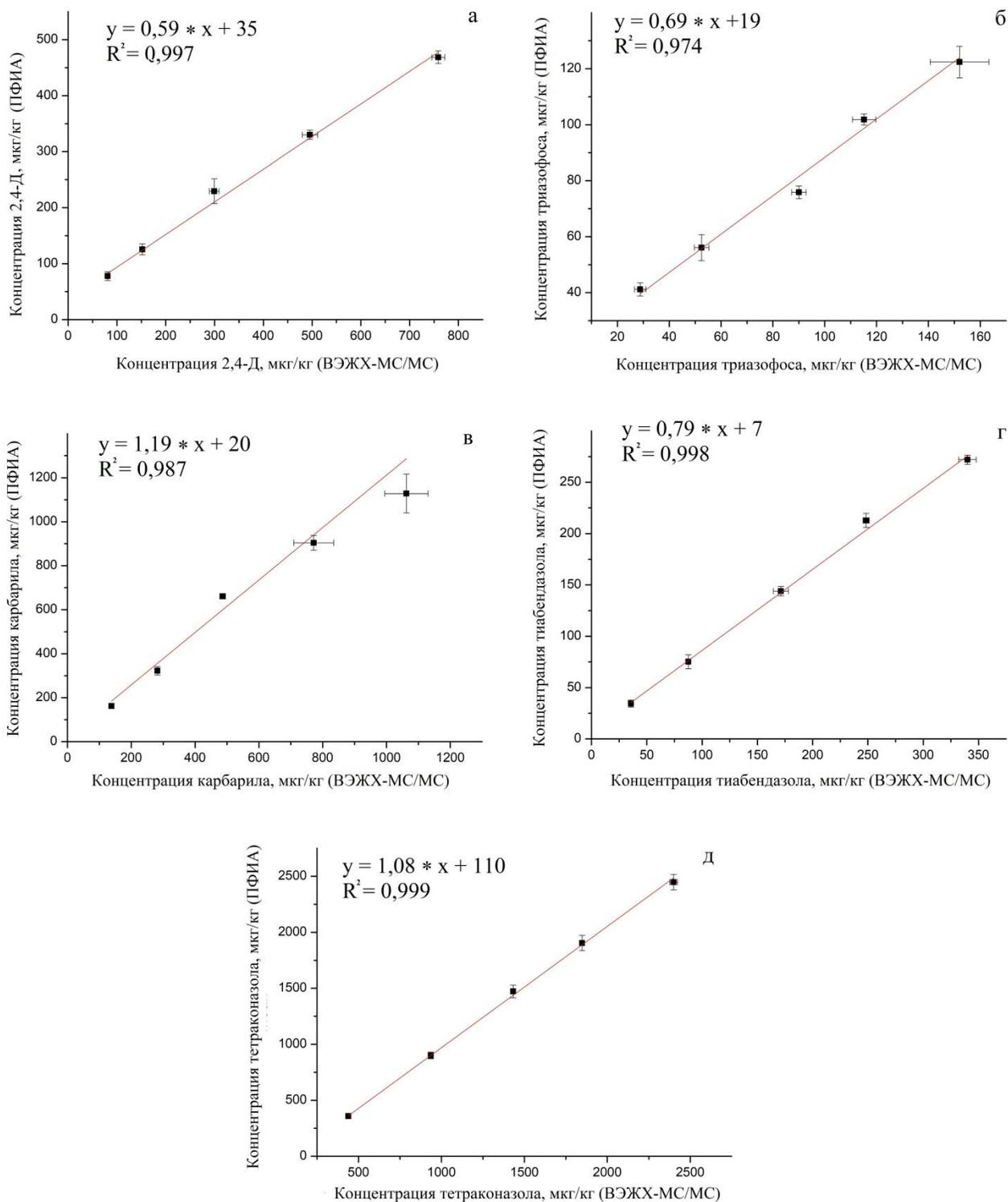


Рисунок ПЗ5 – Корреляция между результатами ПФИА и ВЭЖХ-МС/МС анализа 2,4-Д (а), триазофоса (б), карбарила (в), тиabendазола (г) и тетраконазола (д) в пшенице (n = 3, P = 0,95)