

УДК 632.95:543.645:57.083.3

ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ НА РЕЗУЛЬТАТЫ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕРБИЦИДА БУТАХЛОРА: ВЫБОР РЕЖИМОВ ПРОБОПОДГОТОВКИ

© 2024 г. А. Н. Берлина¹, Н. И. Смирнова¹, Н. С. Комова¹, К. В. Серебренникова¹,
А. В. Жердев¹, Б. Б. Дзантиев^{1, *}

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 05.12.2023 г.

После доработки 10.01.2024 г.

Принята к публикации 28.02.2024 г.

Изучено влияние органических растворителей метанола и ацетонитрила на результаты иммуноопределения бутахлора в пробах риса и продуктов на его основе. Рассмотрены схемы иммуноферментного анализа с использованием: нативной антисыворотки, содержащей специфические антитела к бутахлору, антивидовых антител, меченных пероксидазой хрена, и биотинилированных специфических антител и стрептавидина, меченного пероксидазой. Для двух схем установлены близкие значения IC₅₀ (0.77 и 0.68 нг/мл соответственно) и рабочего диапазона (2.6–165 и 2.4–192 нг/мл соответственно) при проведении анализа в смеси фосфатного буфера и метанола 85%: 15%. Для второй схемы показано обнаружение бутахлора в пробах риса и пищевых продуктов на его основе на уровне 80–132% от вводимого количества аналита. Проведенное сравнение способов пробоподготовки позволило рекомендовать экстрагирование бутахлора гексаном с переработкой сухого остатка в буфере с 15% метанола, либо получение метанольного экстракта с последующим разведением буферным раствором в 6 раз.

Ключевые слова: пестициды, иммуноанализ, рис, иммуноферментный анализ, водно-органические смеси, экстракция

DOI: 10.31857/S0555109924040118 EDN: RZUMFS

Широкое применение агрохимикатов за последние годы привело к загрязнению биосферы токсичными соединениями [1]. К наиболее распространенным загрязнителям окружающей среды относят пестициды [2, 3]. Бутахлор, или N-(бутоксиметил)-2-хлор-N-(2,6-диэтилфенил) ацетамид представляет собой хлорацетамидный гербицид избирательного действия, используемый для борьбы с однолетними сорняками при выращивании риса, кукурузы и пшеницы [4]. Использование бутахлора в технологиях производства сельскохозяйственных культур приводит к накоплению химиката в окружающей среде, что отрицательно сказывается на продовольственной безопасности. Установлено, что бутахлор проявляет канцерогенные свойства и индуцирует апоптоз клеток млекопитающих [5]. Детекция бутахлора играет важную роль в контроле безопасности окружающей среды и оценке рисков для здоровья человека.

В настоящее время при рутинном определении гербицидов преимущественно используются физико-химические методы на основе

газовой и жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией [6, 7]. Несмотря на высокую специфичность и чувствительность данных методов (предел обнаружения бутахлора достигает 5 нг/л), их реализация сопряжена с использованием дорогостоящего оборудования, большим расходом органических растворителей, необходимостью профессиональной подготовки персонала и продолжительной процедуры с последовательным тестированием проб [8]. Иммунохимические системы вытесняют традиционные виды определения гербицидов благодаря быстрым и простым методическим решениям, а применение антител в качестве распознающего элемента определяет их высокую специфичность и чувствительность. Иммуноопределение хлорацетамидных гербицидов, в частности бутахлора, в различных матрицах описано в работах [9–14]. Однако преобладают разработки систем для определения структурно близких соединений – алахлора и метолахлора, реализованных в различных форматах иммуноанализа в сочетании с колориметрической [15–17]

или флуоресцентной [11] детекцией сигнала. Иммуноаналитические системы для определения бутахлора представлены несколькими разработками и включают ферментный [13], поляризационно-флуоресцентный [12], а также мембранный иммуноанализ [18]. Среди перечисленных методов иммуноферментный анализ (ИФА) заслуживает особого внимания благодаря разделению стадий взаимодействий и возможности одновременно скринингового контроля большого количества проб. Применение ИФА для определения бутахлора в сложных по составу продуктах питания и ограничения, которые при этом возникают, ранее не изучались. Особенность иммуноанализа многих пестицидов с низкой растворимостью в водно-солевых средах и высокой в органических растворителях заключается в необходимости выбора таких условий, в которых полнота экстрагирования аналита из проб сочетается с возможностью его иммунохимического определения без инактивации антител.

Цель настоящей работы – оценка влияния органических растворителей на результаты иммуноферментного определения бутахлора в рисе (наиболее распространенной культуры, обрабатываемой этим гербицидом) и пищевых продуктах на его основе.

МЕТОДИКА

Реактивы. Для проведения работы использовали бутахлор фирмы “Clearsynth” (Индия), ацетохлор, диметахлор и пропахлор фирмы “Sigma-Aldrich” (США). Исходные растворы бутахлора (2 мг/мл) готовили в ацетонитриле и метаноле и хранили при 4°C. Для получения конъюгата гаптен–белок применяли овальбумин (ОВА), N,N'-дициклогексилкарбодиимид, N-гидроксисукцинимид и 3-меркаптопропионовую кислоту (МПА) фирмы “Sigma-Aldrich” (США). В работе использовали биотин и стрептавидин, а также меченный пероксидазой хрена стрептавидин фирмы “ИМТЕК” (Россия).

Для проведения ИФА использовали следующие реагенты: конъюгат бутахлор-3-меркаптопропионовая кислота – ОВА (БМПА-ОВА), антивидовые (иммуноглобулины козы, связывающие иммуноглобулины кролика) антитела, меченные пероксидазой хрена (“ИМТЕК”, Россия), 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ, “НВО Иммунотех”, Россия), Твин-20 (“Sigma-Aldrich”, США), а также 96-луночные прозрачные микропланшеты Costar 9018 (“Corning Costar”, США).

Все вспомогательные реагенты (соли, кислоты, щелочи и органические растворители) были аналитической или химической чистоты.

Все растворы готовили с использованием деионизованной воды Milli Q (сопротивление 18

МОм·см), полученной с помощью системы очистки воды Simplicity (“Millipore”, США).

Оборудование. Спектры поглощения и оптические плотности измеряли в лунках микропланшетов с помощью многофункционального планшетного анализатора EnSpire Multimode Plate Reader (“PerkinElmer”, США).

Получение конъюгата бутахлора с белком-носителем. Гаптен состава бутахлор-3-меркаптопропионовая кислота (БМПА) синтезировали по описанной ранее методике [13].

Полученный БМПА ковалентно связывали с ОВА карбодиимидным методом с получением конъюгата БМПА-ОВА. Смесь, состоящую из 3 мг (0.0075 ммоль) гаптена, 4.7 мг (0.045 ммоль) N-гидроксисукцинимид и 9.4 мг (0.045 ммоль) N,N'-дициклогексилкарбодиимид в 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) инкубировали в течение ночи при перемешивании и комнатной температуре. На следующий день смесь центрифугировали и к супернатанту по каплям добавляли 13.2 мг ОВА (молярное соотношение гаптен: белок составило 25 : 1) в 1 мл 0.15 М натрий-бикарбонатного буфера, pH 9.5. Далее реакционную смесь оставляли на 12 ч при 4°C, после чего полученный конъюгат очищали диализом против 50 мМ фосфатного буфера (ФБС), pH 7.4, в течение 48 ч при 4°C. Концентрацию препарата БМПА-ОВА рассчитывали, исходя из спектров поглощения компонентов. Аликвоты белкового конъюгата (5 мг/мл в ФБС) лиофилизовали и хранили при –20°C.

Выделение иммуноглобулинов G (IgG) из антисыворотки и их биотинилирование. К 1 мл антисыворотки [13] добавляли 270 мг сульфата аммония и перемешивали в течение 30 мин. Далее проводили осаждение центрифугированием при 9500 g в течение 10 мин с последующим удалением надосадочной жидкости. Осадок растворяли в 1 мл ФБС и диализовали против 2 л ФБС в течение суток.

Для биотинилирования к 1 мл выделенных иммуноглобулинов (10 мг/мл) добавляли N-гидроксисукцинимид эфира биотина в 20-кратном молярном избытке. Реакционную смесь инкубировали в течение 2 ч при перемешивании и диализовали против 10 мМ ФБС в течение суток. Концентрацию белка определяли по оптической плотности при 280 нм.

Иммуноферментный анализ бутахлора с использованием нативной антисыворотки и биотинилированных антител. Конъюгат БМПА-ОВА, растворенный в 50 мМ ФБС, вносили в лунки микропланшета в концентрации 1.0 мкг/мл (по 50 мкл) для стандартного ИФА и в концентрации 2.0 мкг/мл (по 100 мкл) для усиленного ИФА, инкубируя в течение 2 ч при 37°C. Затем микропланшет три раза промывали ФБС, содержащим 0.05% Твин-20 (ФБСТ). На первой стадии стандартного и усиленного ИФА варьировали разведение антисыворотки/

биотинилированных антител, специфичных к бутахлору. Различные разведения антисыворотки/биотинилированных антител добавляли для взаимодействия с адсорбированным конъюгатом БМПА-ОВА и инкубировали 1 ч при 37°C. Затем после отмывки добавляли антивидовые антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (разведение коммерческого препарата 1 : 3000), или меченный пероксидазой стрептавидин (разведение коммерческого препарата 1 : 5000) и инкубировали 1 ч при 37°C. После промывки (три раза ФБСТ и один раз дистиллированной водой) определяли активность ферментной метки, связавшейся в лунках микропланшета, добавляя по 100 мкл раствора субстрата (коммерческий раствор ТМБ + H₂O₂). Через 15 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл 0.1 М H₂SO₄. Оптическую плотность измеряли при 450 нм и строили график зависимости оптической плотности (ОП) от разведения антисыворотки/биотинилированных антител с использованием программного обеспечения Origin 9.0 ("OriginLab", США). Разведение антисыворотки/биотинилированных антител, соответствующее ОП₄₅₀ = 1.0, выбирали для проведения конкурентного ИФА.

При проведении конкурентного ИФА бутахлора после иммобилизации конъюгата БМПА-ОВА и промывки микропланшета, описанных выше, в лунки вносили по 50 мкл раствора бутахлора (концентрации в диапазоне 10000–0.06 и 0 нг/мл) и антисыворотки (разведение в ФБСТ 1 : 100000), либо биотинилированных антител (разведение в ФБСТ 1 : 6000). Затем микропланшет инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Заключительные стадии ИФА также совпадали с описанной выше методикой.

Для оценки влияния органических растворителей на результаты ИФА проводили анализ с использованием буферных растворов, содержащих от 5 до 50% по объему органических растворителей (метанол или ацетонитрил).

Подготовка проб. В качестве проб для анализа использовались красный рис (круглозерный, не перемолотый), рис басмати (не пропаренный), рис басмати (пропаренный, длиннозерный), рисовая мука (цельнозерновая), флайчипсы (кукурузно-рисовые), хлебцы рисовые с кунжутом. Для приготовления экстрактов взвешивали 1 г измельченного продукта, вносили 80 мкл бутахлора (2 мг/мл в метаноле), добавляли 5 мл 50 мМ ФБС и интенсивно перемешивали в течение 5 мин. Затем добавляли 2 мл гексана и проводили экстракцию при перемешивании в течение 2 ч при комнатной температуре. После экстракции пробы центрифугировали 15 мин при 6000 g, отбирали гексановый слой и выпаривали супернатант под тягой в течение ночи. Для метанольной экстракции к 1 г пробы добавляли 2 мл метанола, оставляли смесь на 2 ч при перемешивании, а затем центрифугировали при 4°C и 4000 g в течение 15 мин и отбирали супернатант.

Обработка результатов иммуноферментного анализа. Параметры получаемых кривых зависимости аналитического сигнала (y) от концентрации аналита (x) определяли на основании четырехпараметрической сигмоидной аппроксимации: $y = (A1 - A2)/(1 + (x/x_0)^p) + A2$, проводившейся с использованием программного обеспечения Origin 9.0. Далее вычислялись величины IC₁₀, IC₂₀, IC₅₀, IC₈₀ – концентрации бутахлора, ингибирующие аналитический сигнал на 10, 20, 50 и 80% от максимального ингибирования, соответственно. Принимая во внимание точность измерений, IC₁₀ рассматривали как предел обнаружения, IC₂₀–IC₈₀ – как диапазон концентраций, определяемых методом ИФА.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Принцип анализа и подготовка реагентов для ИФА. Исследование было направлено на то, чтобы сравнить две схемы анализа по пределам обнаружения и оценить влияние органических растворителей на результаты определения бутахлора при использовании этих схем. В первой схеме конкурентный ИФА проводили с использованием нативной антисыворотки. Антисыворотка содержит специфические антитела в естественной среде, которая защищает их от денатурации при хранении. Сорбированный в лунках микропланшета конъюгат гаптен–белок конкурировал со свободным аналитом (бутахлором) за центры связывания антител. Если аналит отсутствовал в пробе, антитела связывались с иммобилизованным гаптеном и далее взаимодействовали с антивидовыми антителами, меченными пероксидазой, обеспечивавшей при окислении субстрата формирование аналитического колориметрического сигнала оптической плотности, регистрировавшейся при 450 нм. Присутствие аналита в пробе снижало связывание антител с иммобилизованным гаптеном, приводя к уменьшению аналитического сигнала.

Во второй схеме использовались антитела, которые были выделены из антисыворотки и затем биотинилированы. Иммуные комплексы, формирующиеся аналогично первой схеме, обнаруживались благодаря взаимодействию биотина с меченым пероксидазой стрептавидином. Применение высокоаффинного взаимодействия стрептавидин–биотин зачастую помогает снизить предел обнаружения аналита. В то же время часть специфических антител при выделении из антисыворотки и последующих манипуляциях может денатурировать. Это особенно важно при работе с органическими растворителями, используемыми для экстракции гидрофобных соединений, поэтому исследование предусматривало сравнение двух форматов ИФА, проводившихся в присутствии метанола либо ацетонитрила.

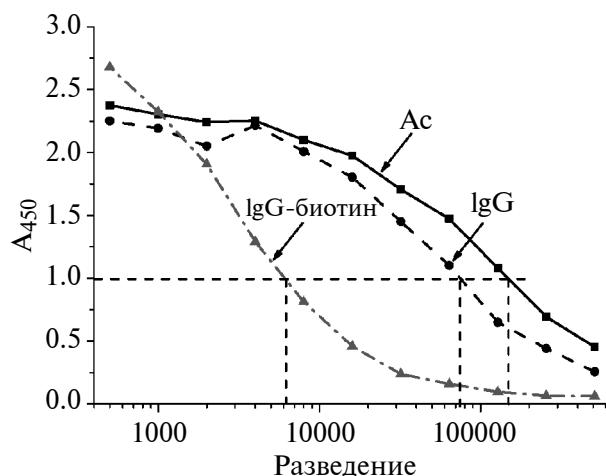


Рис. 1. Зависимости регистрируемой в ИФА ОП₄₅₀ нм при от разведений препаратов антисыворотки (Ac), выделенных IgG и конъюгата IgG–биотин. Горизонтальная пунктирная линия соответствует ОП 1.0, выбранной для проведения конкурентного ИФА, вертикальные показывают разведения препаратов, обеспечивающие достижение этой ОП.

Антисыворотка против бутахлора была получена ранее в лаборатории [13]. Антисыворотку, выделенные антитела и биотинилированные антитела титровали в лунках микропланшета с иммобилизованным конъюгатом БМПА-ОВА. На рис. 1 приведены кривые титрования антисыворотки, выделенных из нее иммуноглобулинов класса G (IgG) и биотинилированных IgG. Для проведения конкурентного анализа выбраны разведения 1 : 150000 антисыворотки и 1 : 6000 препарата IgG–биотин. Также по расположению кривых видно, что антиген-связывающая способность IgG снизилась после модификации биотином. Исходная концентрация препарата биотинилированных антител составила 10 мг/мл, а выбранная для проведения конкурентного анализа концентрация – 1.7 мкг/мл. Для сравнения; концентрация выделенных IgG, выбранная для конкурентного анализа, составила 0.45 мкг/мл.

Используемая в работе антисыворотка кролика была проверена на селективность определения бутахлора. С этой целью проводились замены бутахлора на ацетохлор, диметахлор, пропахлор в качестве конкурента. С двумя последними хлорацетамидами не наблюдалось перекрестных взаимодействий (IC₅₀ составлял более 10000 нг/мл), а ацетохлор продемонстрировал незначительную перекрестную реактивность, которая составила 0.6%. Таким образом, антисыворотка, а соответственно и антитела, высокоспецифичны по отношению к бутахлору.

Характеристика конкурентных кривых для двух форматов ИФА бутахлора. С использованием выбранных для ИФА концентраций

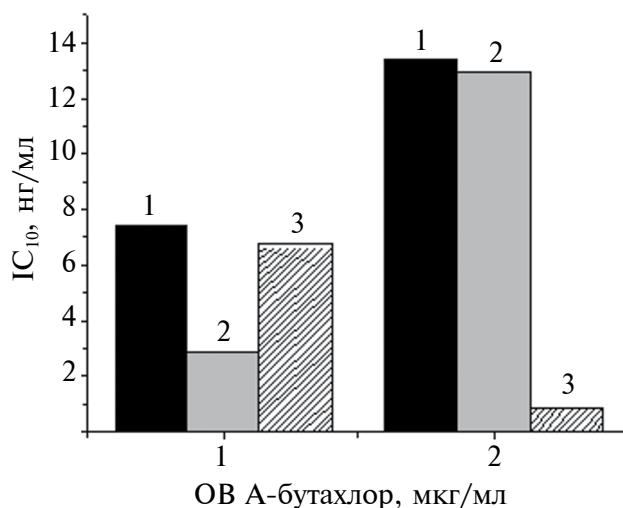


Рис. 2. Значения параметра IC₁₀, достигаемого в ИФА при различных сочетаниях иммунореагентов. 1 – Ac – 1 : 150000; 2 – IgG – 1 : 80000; 3 – IgG–биотин – 1 : 6000.

иммунореагентов получены зависимости оптической плотности при 450 нм от концентрации бутахлора в буферном растворе. В табл. 1 приведены аналитические характеристики систем. Наименьшее значение IC₁₀ достигалось при использовании биотинилированных антител и составляло 0.9 нг/мл, что в 8 раз меньше по сравнению с использованием нативной антисыворотки: IC₁₀ = 7.4 нг/мл. Как видно, применение высокоаффинной пары биотин–стрептавидин действительно позволило снизить предел обнаружения ИФА. При использовании препарата IgG–биотин наблюдалось некоторое расширение диапазона определяемых концентраций – до 43–512 нг/мл. Описанные отличия не имеют универсального характера и не сохраняются при концентрациях реагентов, отличающихся от выбранных оптимальных. Об этом свидетельствует, в частности, сравнение IC₁₀ при двух концентрациях конъюгата ОВА–бутахлор, иммобилизованного в лунках микропланшета – 1 и 2 мкг/мл (см. рис. 2).

Изучение влияния органических растворителей на ИФА бутахлора. Иммуноопределение антигенов с выраженными гидрофобными свойствами – микотоксинов, органических красителей, многих пестицидов и других соединений требует использования органического растворителя как для экстракции аналита из проб, так и для поддержания его в растворимом состоянии при взаимодействии с антителами. Однако при высоких концентрациях органических веществ происходила инактивация антител, а значительные разведения органических экстрактов вызывали потери в чувствительности обнаружения исходного содержания аналита в пробе. При работе с гидрофобными

Таблица 1. Аналитические параметры конкурентного ИФА бутахлора с использованием антисыворотки, выделенных IgG и конъюгата IgG–биотин

Препарат	IC ₁₀ , нг/мл	IC ₂₀ , нг/мл	IC ₈₀ , нг/мл	IC ₅₀ , нг/мл
Антисыворотка	7.4	15.1	171.7	50.9
IgG	2.8	8.1	298.9	49.1
IgG-биотин	0.9	3.6	513.4	43.2

соединениями такими, как бутахлор, необходимо понимать уровень толерантности иммунореагентов и допустимое содержание растворителя как при экстракции, так и на стадии иммунодетекции.

С учетом вышеизложенного рассматривались два варианта пробоподготовки. Первый вариант состоял в экстракции бутахлора гексаном с выпариванием органического слоя и перерастворением в буферном растворе, содержащем метанол либо ацетонитрил. Второй вариант – экстракция в метаноле и разбавление экстракта перед проведением ИФА.

Была изучена зависимость связывания в ИФА при варьировании от 5 до 50% добавляемого к ФБСТ метанола либо ацетонитрила. Для этой цели использовали концентрацию бутахлора 100 нг/мл, находящуюся внутри рабочего диапазона ИФА, а метанол либо ацетонитрил добавляли на стадии конкуренции. Падение оптического сигнала ниже 0.6 считали критичным, существенно ухудшающим точность количественных измерений содержания аналита. Полученные результаты (рис. 3) отражают большее влияние ацетонитрила на степень связывания и формирование меченых иммунных комплексов в ИФА. Однако и тот, и другой компонент не рекомендуется использовать в концентрациях более 30%, что подтверждают и предшествующие работы по иммунодетекции гидрофобных соединений [19–21].

Концентрация 15% была выбрана в качестве рабочей; дальнейшие эксперименты “добавлено-выявлено” проводились в этих условиях. Стоит отметить, что по сравнению с ранее описанным ИФА структурно близкого соединения претилахлора [17] в данной работе достигнуто в 3 раза большее содержание метанола, что повышает чувствительность определения из расчета на содержание аналита в исходных пробах.

Получение градуировочных зависимостей ИФА. С учетом выбранных концентраций метанола и ацетонитрила были получены градуировочные зависимости регистрируемой в ИФА оптической плотности при 450 нм от концентрации бутахлора. Данные графики приведены на рис. 4. Значение IC₁₀ для градуировочной зависимости в буфере с 15% метанола и применением сочетания антисыворотки и меченых антивидовых антител составило 0.77 нг/мл, рабочий диапазон определяемых концентраций – от 2.6 до 165 нг/мл. Аналогичная схема с применением ацетонитрила позволила получить IC₁₀ 3.7 нг/мл, а рабочий диапазон составил 11.2–496.1 нг/мл. Видно, что введение ацетонитрила изменило параметры, ранее полученные для ИФА в буфере, но незначительно. В случае использования конъюгатов IgG–биотин и стрептавидин–пероксидаза влияние органических растворителей более выражено. Так, при добавлении 15% метанола IC₁₀ составило 0.68 нг/мл, а рабочий

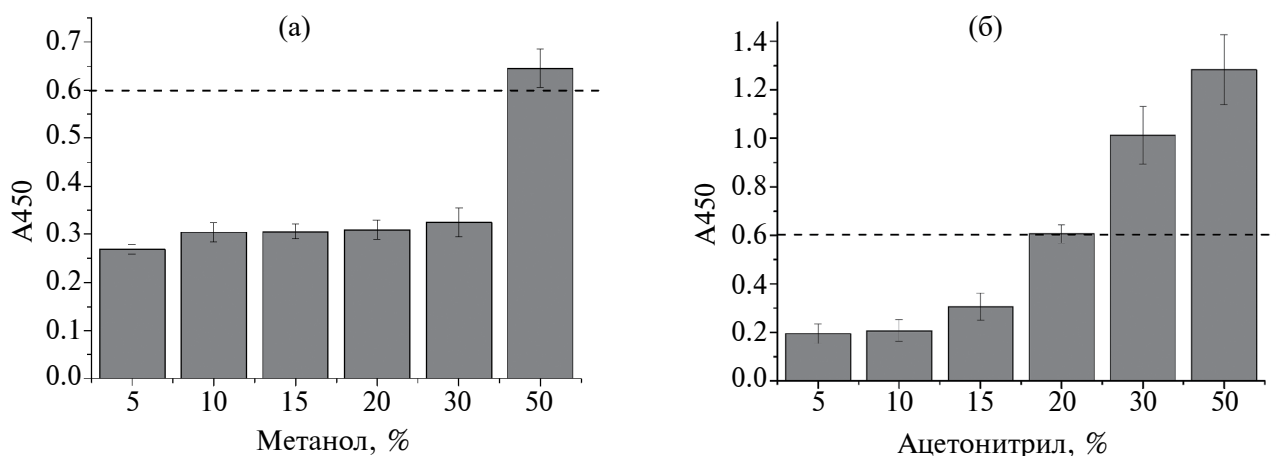


Рис. 3. Гистограммы зависимости ОП при проведении ИФА от концентрации растворителя: метанола (а), ацетонитрила (n = 2, б). Горизонтальная пунктирная линия соответствует ОП 0.6 при 450 нм.

Таблица 2. Результаты тестирования пробы, контаминированных бутахлором, для разных форматов ИФА и вариантов пробоподготовки ($n = 2$)

Растворитель для пробы/иммунореагенты	Бутахлор в пробе											
	рис красный, непропаренный		рис белый, непропаренный		рис белый, пропаренный		рисовая мука		рисовые чипсы		рисовые хлебцы	
	добавлено, нг/г	выявлено, %	добавлено, нг/г	выявлено, %	добавлено, нг/г	выявлено, %	добавлено, нг/г	выявлено, %	добавлено, нг/г	выявлено, %	добавлено, нг/г	выявлено, %
ФБС + метанол, 15% / антисыворотка + меченные пероксидазой антивидовые антитела	1110	130 ± 1	1110	116 ± 2	1110	157 ± 6	1110	120 ± 4	1110	88 ± 2	1110	98 ± 3
	370	106 ± 3	370	112 ± 1	370	106 ± 0.7	370	115 ± 5	370	86 ± 5	370	88 ± 4
	123	114 ± 3	123	134 ± 5	123	109 ± 1	123	130 ± 2	123	115 ± 6	123	98 ± 2
	41	134 ± 2	41	130 ± 5	41	145 ± 4	41	120 ± 4	41	109 ± 3	41	100 ± 3
	13.7	101 ± 3	13.7	114 ± 1	13.7	85 ± 3	13.7	134 ± 2	13.7	127 ± 2	13.7	132 ± 6
ФБС + метанол, 15% / биотинилированные антитела + меченный пероксидазой стрептавидин	1110	81 ± 3	1110	102 ± 0.6	1110	117 ± 2	1110	87 ± 3	1110	107 ± 2	1110	94 ± 4
	370	120 ± 5	370	83 ± 4	370	80 ± 2	370	107 ± 2	370	124 ± 5	370	87 ± 2
	123	78 ± 4	123	124 ± 2	123	105 ± 0.8	123	124 ± 4	123	105 ± 4	123	140 ± 6
	41	132 ± 3	41	71 ± 3	41	90 ± 1	41	90 ± 2	41	102 ± 6	41	122 ± 4
	13.7	75 ± 4	13.7	117 ± 5	13.7	104 ± 0.7	13.7	129 ± 2	13.7	129 ± 2	13.7	58 ± 4
ФБС + 15% ацетонитрила / антисыворотка + меченные пероксидазой антивидовые антитела	1110	91 ± 1	1110	127 ± 4	1110	84 ± 4	1110	83 ± 3	1110	84 ± 5	1110	113 ± 2
	370	79 ± 3	370	122 ± 3	370	88 ± 2	370	86 ± 4	370	111 ± 3	370	111 ± 5
	123	118 ± 2	123	147 ± 4	123	106 ± 0.9	123	108 ± 1	123	118 ± 4	123	128 ± 3
	41	123 ± 2	41	123 ± 2	41	119 ± 1	41	123 ± 2	41	128 ± 5	41	136 ± 5
	13.7	72 ± 5	13.7	67 ± 5	13.7	104 ± 1	13.7	106 ± 6	13.7	106 ± 5	13.7	132 ± 2

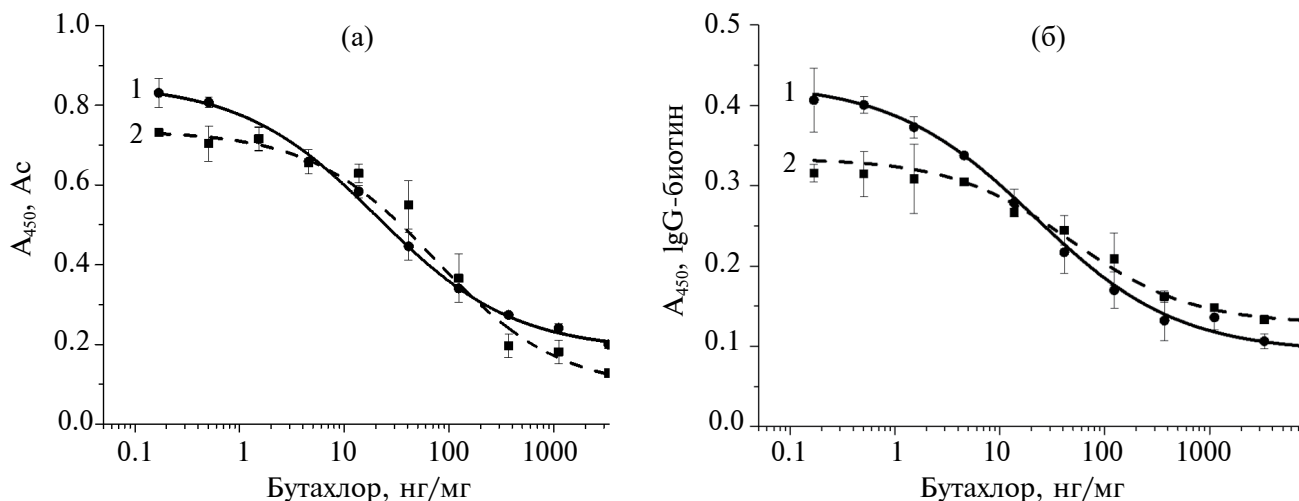


Рис. 4. Градуировочные кривые иммуноферментного определения бутахлора в ФБСТ с 15% метанола/ацетонитрила с применением нативной антисыворотки (а) либо биотинилированных IgG (б). 1 – метанол, 2 – ацетонитрил.

диапазон концентраций – от 2.4 до 192 нг/мл. Воздействие ацетонитрила было еще более выраженным по сравнению с метанолом. Существенно снизилась оптическая плотность в лунках в отсутствие аналита, но при этом возросло неспецифическое связывание, кривая приняла более пологую форму. IC_{10} изменилось до 2.7 нг/мл, а рабочий диапазон составил от 7.8 до 298.4 нг/мл.

Тестирование проб риса и продуктов на его основе и выбор способа пробоподготовки. В данной работе рассмотрены способы экстракции с использованием различных органических растворителей, изучалось их влияние на степень извлечения бутахлора в стандартном и усиленном за счет взаимодействий биотин–стрептавидин форматах иммуноферментного анализа. При характеристике пробоподготовки сопоставляли экстракцию аналита метанолом и гексаном. При работе с твердыми пробами преимущество первого варианта состоит в возможности без потерь отобрать органический надосадок. При проведении ИФА полученный экстракт разбавляли буферным раствором, обеспечивая допустимую конечную концентрацию метанола. При экстракции гексаном аналит можно сконцентрировать при перерастворении упаренного экстракта, выбирая объем используемой для этого смеси буфер: метанол либо буфер: ацетонитрил уже установленного состава.

Характеризуемые пробы включали не только рисовые зерна, но и рисосодержащие продукты, в состав которых входят специи, растительное масло, кунжут и кукуруза. Поскольку действующие вещества специй и масла также экстрагируются, представляла интерес оценка их влияния на ИФА, отражающая степень универсальности разработанных методик. Интересным объектом исследования оказалась рисовая мука, для которой перед экстракцией потребовалось добавление

буферного раствора для смачивания и набухания рисового крахмала.

Массив данных, полученный при тестировании данных проб разработанными методиками ИФА, суммирован в табл. 2. Как видно из таблицы, при использовании нативной антисыворотки и 15%-ного метанола степень выявления введенного бутахлора варьировала в диапазоне 86–134%, а при замене метанола на ацетонитрил этот диапазон расширялся до 72–147%, при этом воспроизводимость результатов измерений ухудшалась. При использовании сочетания конъюгатов IgG–биотин и стрептавидин–пероксидаза степень выявления бутахлора составила от 80 до 132%. Необходимо отметить, что сочетание использования гексана и ацетонитрила в среде для ИФА при пробоподготовке с оказалось неудачным. Результаты измерений концентраций добавленного бутахлора находились в другом концентрационном диапазоне, что могло объясняться инактивацией модифицированных антител компонентами пробы. Данные, полученные при такой комбинации растворителей при пробоподготовке и анализе в реакционной среде в табл. 2 не включены. Этот результат дополнительно демонстрировал предпочтительность использования метанола по сравнению с ацетонитрилом.

Сравнение предела обнаружения бутахлора для выбранной схемы и нормативов содержания бутахлора в пищевых продуктах подтвердило возможность мониторинга безопасности продуктов питания с помощью разработанного ИФА. Так, предел обнаружения в самой чувствительной схеме определения бутахлора составил 0.9 нг/мл или 0.9 нг/г, тогда как максимальное допустимое содержание бутахлора в сельскохозяйственной продукции составляет 0.05 мкг/г (или 50 нг/г) [22]. С учетом разведения метанольного экстракта

в 6 раз предел обнаружения бутахлора составил 5.4 нг/мл (нг/г), что на порядок ниже предельно допустимого содержания определяемого гербицида. В табл. 2 представлены данные по тестированию проб с известными количествами бутахлора, добавляемого в них до соответствующей пробоподготовки. Последние две пробы для каждого вида продукта содержали бутахлор ниже нормативного уровня (41.0, 13.2 нг/г), а в остальных пробах уровень бутахлора был выше допустимого. Согласно приведенным результатам, разработанный ИФА позволяет определять бутахлор в различных концентрациях, с учетом используемого разведения экстракта, и делать выводы о возможности использования тестируемой продукции.

ФИНАНСИРОВАНИЕ. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-46-00018).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. Протокол экспериментов с животными одобрен комитетом по биоэтике ФБУН ГНЦ ПМБ (№ P05-28). Все работы с животными проводились в соответствии с ГОСТ 33216-2014 “Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meena R.S., Kumar S., Datta R., Lal R., Vijayakumar V., Brtnicky M. et al. // *Land*. 2020. V. 9. № 2. Article 34. <https://doi.org/10.3390/land9020034>
2. Intisar A., Ramzan A., Sawaira T., Kareem A.T., Hussain N., Din M.I. et al. // *Chemosphere*. 2022. V. 293. Article 133538. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133538>
3. Parra-Arroyo L., González-González R.B., Castillo-Zacarías C., Melchor Martínez E.M., Sosa-Hernández J.E., Bilal M. et al. // *Sci. Total Environ*. 2022. V. 807. Article 151879. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151879>
4. Li N., Zhang J.J., Liu J., Zhang N., Yang H. // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2022. V. 242. Article 113942. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113942>
5. Yang B., Liu Y., Li Y., Zhu S., Li Y., Yi J. et al. // *Chemosphere*. 2021. V. 283. Article 131226. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131226>
6. Kim S.H., Lee Y.H., Jeong M.J., Gwon D.Y., Lee J.H., Shin Y. et al. // *Foods* 2023. V. 12. № 8. Article 1683. <https://doi.org/10.3390/foods12081683>
7. Xue J., Jiang W., Liu F., Zhao H., Wang S., Peng W. // *J. AOAC Int*. 2014. V. 97. № 1. P. 245–251. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.12-313>
8. Wu Y., Zhang L., Zhang D., Yu R. // *Food Chem*. 2024. V. 435. Article 137659. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137659>
9. Zha Y., Lu S., Hu P., Ren H., Liu Z., Gao W. et al. // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2021. V. 13. № 5. P. 6091–6098. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c21760>
10. Zha Y., Liu X., Hu P., Lu S., Ren H., Liu Z. et al. // *Food Anal. Methods*. 2020. V. 13. P. 1008–1016. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01706-6>
11. Zha Y., Li Y., Hu P., Lu S., Ren H., Liu Z. et al. // *Anal. Chem*. 2021. V. 93. P. 13886–13892. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c02736>
12. Lei H., Xue G., Yu C., Haughey S.A., Eremin S.A., Sun Y. et al. // *Anal. Methods*. 2011. V. 3. P. 2334–2340. <https://doi.org/10.1039/C1AY05347G>
13. Yakovleva J., Zherdev A.V., Popova V.A., Eremin S.A., Dzantiev B.B. // *Anal. Chim. Acta*. 2003. V. 491. № 1. P. 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00796-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00796-7)
14. Yan X., Li H., Yan Y., Su X. // *Anal. Methods*. 2014. V. 6. P. 3543–3554. <https://doi.org/10.1039/C3AY41946K>
15. Yu X., Zhang X., Xu J., Guo P., Li X., Wang H. et al. // *J. Hazard. Mater*. 2021. V. 418. Article 126305. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126305>
16. Li Z., Wu Y., Li Z., Yu B., Mao X., Shi G. // *Anal. Methods*. 2023. V. 15. P. 5087–5094. <https://doi.org/10.1039/D3AY01379K>
17. Zhang L., Yin X., Yang H., Wen H., Han S., Pan X. et al. // *Foods*. 2023. V. 13. № 1. Article 12. <https://doi.org/10.3390/foods13010012>
18. Dzantiev B.B., Byzova N.A., Zherdev A.V., Hennion M.C. // *J. Immunoassay Immunochem*. 2005. V. 26. № 3. P. 231–244. <https://doi.org/10.1081/IAS-200062498>
19. Berlina A.N., Zherdev A.V., Xu C., Eremin S.A., Dzantiev B.B. // *Food Control*. 2017. V. 73. Part B. P. 247–253. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.08.011>
20. Nevanen T.K., Söderholm L., Kukkonen K., Suortti T., Teerinen T., Linder M. et al. // *J. Chromatogr. A*. 2001. V. 925. № 1–2. P. 89–97. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01021-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01021-4)
21. Ren X., Zhang F., Chen F., Yang T. // *Food Agric. Immunol*. 2009. V. 20. № 4. P. 333–344. <https://doi.org/10.1080/09540100903365852>
22. Hormenoo Y.A., K. Agbenorhevi J., Ekyem S.O., Bonsu K.O., Torve V., Voegborlo B.R. // *Cogent Food Agric*. 2021. V. 7. № 1. Article 1910159. <https://doi.org/10.1080/23311932.2021.1910159>

Influence of Organic Solvents on the Results of Immunoenzyme Determination of Herbicide Butachlor: Selection of Sample Preparation Modes

**A. N. Berlina^a, N. I. Smirnova^a, N. S. Komova^a, K. V. Serebrennikova^a,
A. V. Zherdev^a, B. B. Dzantiev^{a, *}**

*^aBach Institute of Biochemistry Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,
Moscow, 119071 Russia*

**e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru*

The influence of organic solvents such as methanol and acetonitrile on the results of immunodetermination of butachlor in samples of rice and rice products was studied. The schemes of enzyme immunoassay using: (a) native antiserum containing specific antibodies to butachlor and antispecies antibodies labeled with horseradish peroxidase, and (b) biotinylated specific antibodies and streptavidin labeled with peroxidase are considered. The close values of IC_{10} (0.77 and 0.68 ng/ml, respectively) and working range (2.6–165 and 2.4–192 ng/ml, respectively) were established for the two schemes, when analyzing in a mixture of phosphate buffer and methanol 85 : 15%. For the second scheme, the detection of butachlor in samples of rice and food products based on it is shown at a level of 80–132% of the administered amount of the analyte. The comparison of sample preparation methods allows us to recommend the extraction of butachlor with hexane with redissolution of the dry residue in a buffer with 15% methanol, or the preparation of a methanol extract followed by a 6-fold dilution with a buffer solution.

Keywords: pesticides, immunoassay, rice, enzyme immunoassay, aqueous-organic mixtures, extraction