



Использование метода поляризационно-флуоресцентного иммуноанализа для оценки содержания ацетохлора в лекарственном растительном сырье

М. А. Пашкова¹ , Д. Цзычен¹ , Л. И. Мухаметова¹ , С. А. Еремин¹ ,
Ю. В. Медведев² , С. В. Кареева² , Г. В. Раменская² , С. М. Филимонова²

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М. В. Ломоносова), химический факультет. 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119048, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

✉ Контактное лицо: Филимонова Светлана Михайловна. E-mail: filimonova.svetl@mail.ru

Резюме

Введение. Ацетохлор относится к числу наиболее распространенных гербицидов, способных накапливаться в сырье лекарственных растений и представляющих угрозу для здоровья. Для контроля содержания ацетохлора была разработана методика с использованием поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА), гомогенного и специфичного метода, который применяют для анализа низкомолекулярных токсикантов.

Цель. Разработка и валидация методики количественного определения ацетохлора в лекарственном растительном сырье на примере сырья кукурузы (столбики с рыльцами) методом ПФИА.

Материалы и методы. При разработке методики использовали поликлональные кроличьи антитела к ацетохлору и конъюгат производного ацетохлора и этилендиаминофлуоресцеина в качестве трейсера (AMPA-EDF). Анализ выполняли методом поляризации флуоресценции на портативном флуориметре Sentry-200 (Ellie LLC, США). Обработку данных проводили с использованием программного пакета SigmaPlot 11 (Systat Software Inc., США). Исследования выполняли на образцах лекарственного растительного сырья кукурузы (столбики с рыльцами), приобретенного в аптечной сети и в общедоступном интернет-магазине. Валидацию методики проводили по следующим параметрам: пределу обнаружения, пределу количественного определения, диапазону определяемых концентраций, прецизионности, правильности и специфичности.

Результаты и обсуждение. Разработана, оптимизирована и валидирована методика количественного определения пестицида ацетохлора в лекарственном растительном сырье кукурузы (столбики с рыльцами) методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА). Диапазон определения составил 0,024–1,56 мг/кг. Доказаны специфичность, прецизионность и правильность разработанной методики.

Заключение. На примере кукурузы столбиков с рыльцами метод поляризационно-флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА) применим для количественного определения пестицида ацетохлора в лекарственном растительном сырье.

Ключевые слова: лекарственное растительное сырье, пестициды, ацетохлор, поляризационный флуоресцентный иммуноанализ, ПФИА

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. М. А. Пашкова – разработка и оптимизация методики, проведение экспериментальной работы методом ПФИА, написание статьи. С. М. Филимонова – разработка и оптимизация методики, статистическая обработка результатов, написание статьи. Д. Цзычен – проведение экспериментальной работы методом ПФИА. Ю. В. Медведев, С. В. Кареева – разработка методики и проведение экспериментальной работы методом ВЭЖХ-УФ. Л. И. Мухаметова, С. А. Еремин, Г. В. Раменская – планирование эксперимента, обсуждение результатов, редактирование статьи.

© Пашкова М. А., Цзычен Д., Мухаметова Л. И., Еремин С. А., Медведев Ю. В., Кареева С. В., Раменская Г. В., Филимонова С. М., 2026

© Издатель ООО «Центр Фармацевтической Аналитики», 2026

© Pashkova M. A., Zicheng D., Mukhametova L. I., Eremin S. A., Medvedev Yu. V., Kareeva S. V., Ramenskaya G. V., Filimonova S. M., 2026

© Publisher LLC "Center of Pharmaceutical Analytics", 2026

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, проект № 121041500039-8.

Для цитирования: Пашкова М. А., Цзычен Д., Мухаметова Л. И., Еремин С. А., Медведев Ю. В., Кареева С. В., Раменская Г. В., Филимонова С. М. Использование метода поляризационно-флуоресцентного иммуноанализа для оценки содержания ацетохлора в лекарственном растительном сырье. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2026;15(3):170–179. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-3-2328>

Поступила в редакцию: 30.03.2026

Поступила после рецензирования: 16.06.2026

Принята к публикации: 21.08.2026

Application of fluorescence polarization immunoassay for acetochlor determination in medicinal plant material

Maria A. Pashkova¹ , Diao Zicheng¹ , Liliya I. Mukhametova¹ , Sergey A. Eremin¹ ,
Yuri V. Medvedev² , Sofya V. Kareeva² , Galina V. Ramenskaya² , Svetlana M. Filimonova² ✉ 

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry. 1, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia

² I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University). 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119048, Russia

✉ **Corresponding author:** Svetlana M. Filimonova. **E-mail:** filimonova.svetl@mail.ru

Abstract

Introduction. Acetochlor is one of the most common herbicides capable of accumulating in medicinal plant raw materials and posing a health risk. A method for acetochlor determination was developed using fluorescence polarization immunoassay (FPIA), a homogeneous and specific technique employed for analysis of low-molecular-weight toxicants.

Aim. To develop and validate a fluorescence polarization immunoassay for quantitative analysis of the herbicide acetochlor in medicinal plant material, exemplified by corn silk (*Zea mays* L.).

Materials and methods. For the development of the method, polyclonal rabbit antibodies against acetochlor and a tracer consisting of an acetochlor derivative conjugated with ethylenediamine fluorescein (AMPA-EDF) were used. The analysis was performed by fluorescence polarization using a portable Sentry-200 fluorimeter (Ellie LLC, USA). Data processing was carried out with SigmaPlot 11 software package (Systat Software Inc., USA). The study was performed on samples of corn silk medicinal plant material purchased from a local pharmacy and an online store. Method validation included the following parameters: limit of detection, limit of quantification, analytical range, precision, accuracy, and specificity.

Results and discussion. A method for the quantitative determination of the pesticide acetochlor in the herbal medicinal raw material corn silk (*Zea mays* L.) has been developed, optimized, and validated using fluorescence polarization immunoassay (FPIA). The determination range was from 0.024 to 1.56 mg/kg. The specificity, precision, and accuracy of the developed method were confirmed.

Conclusion. The fluorescence polarization immunoassay (FPIA) method was applied for the quantitative determination of the pesticide acetochlor in herbal medicinal raw material, using corn silk as an example.

Keywords: herbal medicinal raw material, pesticides, acetochlor, fluorescence polarization immunoassay, FPIA

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Maria A. Pashkova – development and optimization of the method, conducting experimental work using the FPIA method, writing the manuscript. Svetlana M. Filimonova – development and optimization of the method, statistical processing of the results, writing the manuscript. Diao Zicheng – conducting experimental work using the FPIA method. Yuri V. Medvedev, Sofya V. Kareeva – development of the method and conducting experimental work using the HPLC-UV method. Liliya I. Mukhametova, Sergey A. Eremin, Galina V. Ramenskaya – experimental planning, discussion of results, editing the manuscript.

Funding. This work was supported by M. V. Lomonosov Moscow State University (Project No. 121041500039-8).

For citation: Pashkova M. A., Zicheng D., Mukhametova L. I., Eremin S. A., Medvedev Yu. V., Kareeva S. V., Ramenskaya G. V., Filimonova S. M. Application of fluorescence polarization immunoassay for acetochlor determination in medicinal plant material. *Drug development & registration*. 2026;15(3):170–179. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-3-2328>

Received: 30.03.2026

Revised: 16.06.2026

Accepted: 21.08.2026

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важных задач контроля качества лекарственного растительного сырья является определение содержания пестицидов. Несмотря на требования надлежащей практики культивирования, сбора и обработки сырья растительного происхождения¹, запрещающие применение химикатов, включая пестициды, при выращивании лекарственных растений, эти меры не всегда полностью предотвращают попадание пестицидов в сырье. В частности, лекарственное растительное сырье кукурузы столбиков с рыльцами представляет собой побочный продукт сельскохозяйственного производства, где контроль применения пестицидов может быть затруднен. Кроме того, остаточные количества пестицидов, присутствующие в почве и в водоемах, воду из которых используют при поливе, способны аккумулироваться в растениях.

Ацетохлор, относящийся к группе хлорацетамидов (рисунок 1), – один из наиболее распространенных гербицидов, используемых в агротехнике кукурузы, сои, подсолнечника и других сельскохозяйственных культур, что обусловлено его высокой эффективностью в подавлении сорной растительности и экономической целесообразностью. Данное соединение применяется преимущественно на этапе довсходовой обработки почвы, обеспечивая ингибирование прорастания семян сорных видов. Однако ацетохлор, обладающий высокой сорбционной способностью по отношению к почвенным компонентам [1], демонстрирует тенденцию к накоплению в грунте. Помимо этого, ацетохлор является водорастворимым соединением и благодаря своей стабильности может обнаруживаться в водоемах. Эти факторы создают риск миграции пестицида в ткани сельскохозяйственных культур. Данный фактор обуславливает потенциальную контаминацию лекарственного растительного сырья остаточными количествами гербицида.

Содержание ацетохлора в пищевых продуктах нормируется СанПиН 1.2.3685-21 «Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания»², согласно которому максимально

допустимый уровень в бобах сои, семенах подсолнечника, зерне и масле рапса составляет 0,04 мг/кг, в зерне кукурузы – 0,03 мг/кг, в масле подсолнечника – 0,02 мг/кг.

Согласно действующей классификации, ацетохлор относится к III классу опасности для теплокровных организмов, включая человека. Тем не менее в научной литературе обсуждаются данные, указывающие на возможную канцерогенную, гепатотоксическую, нефротоксическую активность данного соединения [2], что доказывает необходимость контроля содержания ацетохлора в лекарственном растительном сырье.

Количественное определение ацетохлора осуществляется с применением хроматографических и иммуноферментных методов анализа. Наибольшее распространение для контроля содержания данного пестицида получили методы хроматографии: газожидкостная и высокоэффективная жидкостная хроматография. Анализ пестицидов в растительной матрице хроматографическими методами рекомендован XV Государственной фармакопией Российской Федерации (ГФ РФ)³.

Для количественного определения ацетохлора разработан ряд подходов, основанных на сверхэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (СВЭЖХ-МС/МС) [3], ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии (УВЭЖХ) [4] и газовой хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ГХ-МС) [5]. Хроматографические методы характеризуются высокой чувствительностью и селективностью, однако при анализе растительных матриц требуют многостадийной пробоподготовки для удаления экстрактивных веществ. Помимо этого, данные методы предполагают использование дорогостоящего оборудования и требуют привлечения квалифицированного персонала.

Для анализа ацетохлора в различных матрицах были разработаны иммунные методы, которые не уступают по селективности и чувствительности хроматографическим, в то же время характеризуются более низкой стоимостью анализа. Иммуноферментный анализ (ИФА) применяли для определения содержания пестицида в речной воде [6] и кукурузе [7]. Иммунохроматографический метод (ИХА) использовали для контроля содержания ацетохлора в растительном масле [8]. Был также предложен метод поляризационно-флуоресцентного иммуноанализа для анализа ацетохлора в речной воде [9], однако

¹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 26 января 2016 года № 15 «Об утверждении Правил надлежащей практики выращивания, сбора, обработки и хранения исходного сырья растительного происхождения». Доступно по: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_291919/aa0cc7a9c6c5363a2a94199780f5d7f1f6082c96/ Ссылка активна на 12.02.2026.

² СанПиН 1.2.3685-21 «Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания». От 29.01.2021. Доступно по: https://www.rospotrebnadzor.ru/files/news/GN_sreda%20obitaniya_compressed.pdf Ссылка активна на 30.03.2026.

³ ОФС.1.5.3.0011 «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах». Государственная фармакопея РФ XV издания. Доступно по: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-5/1-5/1-opredelenie-soderzhaniya-ostatochnykh-pestitsidov-v-lekarstvennom-rastitelnom-syre-i-lekarstvennykh/> Ссылка активна на 12.02.2026.

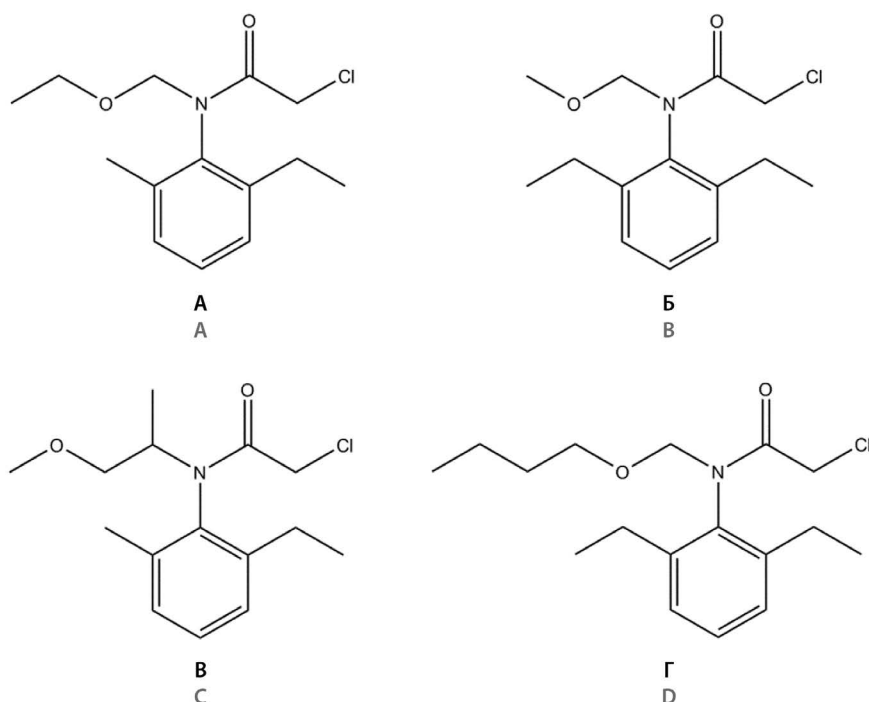


Рисунок предоставлен авторами
The figure was provided by the authors

Рисунок 1. Структурные формулы хлорацетамидных гербицидов:

A – ацетохлора; Б – алахлора; В – метолахлора; Г – бутаклора

Figure 1. Chemical structures of chloroacetamide herbicides:

A – acetochlor; B – alachlor; C – metolachlor; D – butachlor

об использовании данного метода для контроля качества лекарственного растительного сырья еще не сообщалось.

Сравнительная характеристика рассмотренных методов представлена в таблице 1.

Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ (ПФИА) представляет собой гомогенный иммунохимический метод, предназначенный для определения низкомолекулярных соединений, таких как пестициды, антибиотики, биологически активные вещества. Данная методика находит применение в ряде областей, включая экологический мониторинг (контроль воды и почвы) [13], анализ пищевых продуктов [14] и токсикологический контроль [15]. Также был описан подход к количественному определению активной фармацевтической субстанции лизоцима в дозированной лекарственной форме с применением метода поляризации флуоресценции [16].

Принцип метода основан на измерении поляризации флуоресценции конъюгата «аналит – флуорофор» (трейсера). При возбуждении проб плоскополяризованным светом испускаемое флуоресцентное излучение регистрируется через анализатор поляризации. Разность между интенсивностями параллельной ($I_{\parallel}$) и перпендикулярной ($I_{\perp}$) компонент флуо-

ресценции, отнесенная к их сумме, представляет безразмерную величину поляризации флуоресценции (P), которую удобно выражать в тысячных долях (mP).

$$mP = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \cdot 1000. \quad (1)$$

При связывании трейсера со специфическими антителами происходит увеличение аналитического сигнала вследствие снижения молекулярной ротации. В присутствии свободного аналита конкуренция за центры связывания приводит к уменьшению поляризации флуоресценции пропорционально концентрации определяемого вещества. Калибровочная зависимость имеет сигмоидальный характер в поллогарифмических координатах. В качестве флуоресцентной метки преимущественно используется флуоресцеин.

Помимо общих преимуществ иммунохимических методов (экспрессность, высокая пропускная способность, отсутствие необходимости в сложной пробоподготовке и дорогостоящем оборудовании), метод ПФИА характеризуется высокой специфичностью и чувствительностью, а также простотой выполнения анализа.

Таблица 1. Статистические параметры методик определения ацетохлора в различных объектах

Table 1. Statistical parameters of methods for the determination of acetochlor in different matrices

№	Метод Method	Объект исследования Object of study	Предел обнаружения Limit of detection	Предел количественного определения Limit of quantification	Диапазон линейности Linear range	Ссылка Reference
1	ВЭЖХ HPLC	Сертифицированный стандарт ацетохлора Certified acetochlor standard	26,96–31,25 мкг/л 26.96–31.25 µg/L	1 мкг/л 1 µg/L	1–100 мкг/л 1–100 µg/L	[10]
2	ГХ-МС GC-MS	Солома кукурузы и сои Maize and soybean straw	0,07 нг/г 0.07 ng/g	0,1 нг/г 0.1 ng/g	0,1–5 нг/г 0.1–5 ng/g	[5]
3	ГХ-МС с твердофазным экстрагированием с использованием адсорбента MIL-101 GC-MS coupled with solid-phase extraction using the MIL-101 adsorbent	Образцы почвы с пшеничного, соевого, кукурузного полей Soil taken from the wheat, corn and soybean field	0,25 мкг/кг 0.25 µg/kg	0,75 мкг/кг 0.75 µg/kg	0,75–1 мкг/кг 0.75–1 µg/kg	[11]
4	СВЭЖХ-МС/МС UPLC-MS/MS	Соевые бобы, солома Soybeans, straw	0,01 мг/кг 0.01 mg/kg	0,01 мг/кг 0.01 mg/kg	0,01–1 мг/кг 0.01–1 mg/kg	[3]
5	УВЭЖХ-МС/МС UHPLC-MS/MS	Донные отложения и мышцы рисовой рыбы Bottom sediments and muscles of rice fish	0,10–0,50 мкг/кг 0.10–0.50 µg/kg	0,50–1,50 мкг/кг 0.50–1.50 µg/kg	0,50–100 мкг/кг 0.50–100 µg/kg	[4]
6	ИФА ELISA	Речная вода River water	–	0,2 мкг/л 0.2 µg/L	0,2–65 мкг/л 0.2–0.65 µg/L	[6]
7	ПФИА FPIA	Речная вода River water	0,009 мг/л 0.009 mg/L	0,05 мг/л 0.05 mg/L	0,05–5,5 мг/л 0.05–5.5 mg/L	[9]
8	ИФА ELISA	Кукуруза Corn	1,19 нг/мл 1.19 ng/mL	–	–	[7]
9	ИХА LFIA	Сертифицированный стандарт ацетохлора Certified acetochlor standard	3,2 нг/г 3.2 ng/g	1 мкг/г 1 µg/g	1–1000 мкг/г 1–1000 µg/g	[12]
10	ИХА LFIA	Растительное масло Vegetable oil	3,53 нг/г 3.53 ng/g	12,03 нг/г 12.03 ng/g	12,03–2000,00 нг/г 12.03–2000.00 ng/g	[8]
11	ПФИА FPIA	Лекарственное растительное сырье кукурузы столбиков с рыльцами Medicinal plant material of corn silk (<i>Zea mays</i> L.)	0,017 мг/кг 0.017 mg/kg	0,024 мг/кг 0.024 mg/kg	0,024–1,56 мг/кг 0.024–1.56 mg/kg	Данное исследование This study

Таблица предоставлена авторами
The table was provided by the authors

Целью данной работы была разработка методики количественного определения ацетохлора в лекарственном растительном сырье кукурузы столбиков с рыльцами методом поляризационного флуоресцентного анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для количественного определения ацетохлора использовали поликлональные антитела против ацетохлора (кроличий IgG), описанные в работе Яковле-

вой и соавт. [9], конъюгат производного ацетохлора и этилендиаминфлуоресцеина AMPA-EDF в качестве трейсера [17]. Стандартные образцы ацетохлора, бутлахлора, метолахлора были получены от компании (Sigma-Aldrich, США). Все остальные реактивы и растворители имели аналитическую степень чистоты. Поляризационно-флуоресцентный анализ проводили в среде боратного буферного раствора с pH 8,0 при температуре 25 °C.

Для построения калибровочных графиков матричные растворы ацетохлора, бутлахлора и метолахлора 25 мг/мл готовили с использованием 96%-го этанола в качестве растворителя. Серию рабочих растворов стандартов с концентрациями 0; 0,01; 0,1; 0,2; 0,4; 0,5; 1; 10 и 100 мкг/мл получали путем последовательного разбавления матричного раствора 10%-м этанолом.

Измерения методом поляризации флуоресценции выполняли на портативном флуориметре Sentry-200 (Ellie LLC, США) в боросиликатных пробирках размером 10 × 75 мм. Прибор оснащен светодиодным источником возбуждения и фотоумножительным детектором ($\lambda_{\text{ex}} = 485$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 535$ нм). Обработку полученных данных проводили с использованием программного пакета SigmaPlot 11 (Systat Software Inc., США).

Оптимизация методики количественного определения ацетохлора методом конкурентного связывания

Оптимизацию условий проведения ПФИА для количественного определения ацетохлора проводили в несколько этапов. На первом этапе устанавливали оптимальную концентрацию трейсера, обеспечивающую десятикратное превышение флуоресцентного сигнала над фоном при конечной концентрации 5 нМ в боратном буфере (pH 8.5). На втором этапе определяли рабочее разведение антисыворотки, составившее 1:800, при котором достигалось оптимальное связывание с трейсером.

Процедуру анализа стандартизировали следующим образом: в аналитические пробирки вносили 50 мкл стандартных растворов ацетохлора (0–100 мкг/мл) и 500 мкл рабочего раствора трейсера. После минутной инкубации добавляли 500 мкл рабочего раствора антител и регистрировали величину флуоресцентной поляризации. Данный протокол обеспечивал воспроизводимое определение ацетохлора в исследованном диапазоне концентраций.

Для установления оптимального времени анализа и оценки стабильности аналитического сигнала измерения проводили в следующие временные точки: 1, 5, 10, 15, 30, 60 и 120 мин. Построение калибровочной зависимости выполняли на основе трехкратного анализа стандартных растворов в каждой временной точке. В результате эксперимента были получены по-

лулогарифмические нормализованные зависимости параметра mP/mP_{max} от содержания ацетохлора (мкг) в анализируемой пробе. Обработку калибровочных кривых проводили методом аппроксимации с использованием четырехпараметрической сигмоидальной логистической функции вида:

$$mP = mP_0 + \frac{mP_{\text{max}} - mP_0}{1 + \left(\frac{[\text{Ацетохлор}]}{IC_{50}} \right)^{\text{наклон кривой}}}, \quad (2)$$

где mP – значение поляризации флуоресценции, mP_0 – значение поляризации свободного трейсера, mP_{max} – значение поляризации флуоресценции комплекса антитела с трейсером без добавления анализируемого раствора ацетохлора, IC_{50} – концентрация ацетохлора в анализируемом растворе, которая вызывает уменьшение показателя ΔmP на 50 %.

Анализ образцов сырья

В качестве образцов для исследования использовали лекарственное растительное сырье кукурузы столбиков с рыльцами. Два образца были приобретены в местной аптеке (образцы 1 и 2), а также сырье, являющееся биологически активной добавкой к пище (образец 3), было приобретено в общедоступном интернет-магазине.

Пробоподготовка

К точной навеске 1,0 г растительного сырья кукурузы столбиков с рыльцами добавляли 15 мл воды и экстрагировали в течение 15 мин. Экстракт фильтровали и проводили двукратную жидко-жидкостную экстракцию ацетохлора 2 мл гексана. Гексановые фазы объединяли и выпаривали при температуре 65 °C. Остаток растворяли в 60 мкл 10%-го этанола и 50 мкл анализировали методом ПФИА. Все измерения проводили трехкратно.

Анализ образцов методом ВЭЖХ-УФ

Для подтверждения результатов количественного определения, полученных методом ПФИА, был проведен анализ образцов методом ВЭЖХ-УФ.

Количественное определение ацетохлора проводили на системе Agilent 1290, оснащенной диодно-матричным детектором. Использовали колонку Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (150 × 4,6 мм, 2,7 мкм). Элюирование проводили в изократическом режиме смесью 25 мМ дигидрофосфата натрия (pH 2,5) и ацетонитрила (30:70, об./об.) при скорости потока 0,7 мл/мин и температуре колонки 50 °C. Объем вводимой пробы составлял 10 мкл. Детектирование вели на длине волны 205 нм. Обработку хроматограмм выполняли в программе Agilent ChemStation (Agilent Technologies, США).

Пробоподготовку выполняли по аналогии с процедурой, использованной для анализа методом ПФИА. Сухой остаток растворяли 300 мкл ацетонитрила. Процесс экстракции интенсифицировали последовательным перемешиванием на вихревом шейкере МХ-Е (5 мин) и ультразвуковой обработкой (5 мин) с последующим повторным перемешиванием. Для очистки экстракта проводили центрифугирование при 13200g в течение 10 мин при 20 °С (центрифуга ROTINA 380 R, Hettich, Германия). Надосадочную жидкость отбирали для хроматографического анализа. В каждой серии измерений параллельно анализировали три повторности образца, чистый растворитель (контроль) и стандартный раствор ацетохлора с концентрацией 0,01 мкг/мл.

Валидация методики

Чувствительность и аналитический диапазон.

Предел обнаружения устанавливали как IC_{10} – минимальную концентрацию аналита, вызывающую 10 % снижение аналитического сигнала. Аналитический диапазон определяли как интервал концентраций, соответствующий 20–80 % от максимального сигнала.

Специфичность метода оценивали по перекрестной реактивности со структурно близкими ацетанилидными пестицидами – бутахлором и метолахлором. Кросс-реактивность определяли на уровне IC_{10} согласно формуле:

$$CR(\%) = \frac{IC_{10}(\text{ацетохлора})}{IC_{10}(\text{кросс-реактанта})} \cdot 100 \%,$$

где IC_{10} ацетохлора и кросс-реактантов – концентрация ацетохлора и кросс-реактантов: бутахлора или метолахлора, вызывающая снижение аналитического сигнала на 10 % за счет вытеснения трейсера из комплекса с антителами.

Прецизионность характеризовали величиной относительного стандартного отклонения (RSD, %), полученной при шестикратном анализе стандартных растворов ацетохлора с концентрациями 0,1 и 1 мкг/мл.

Правильность методики оценивали методом «введено – найдено» с использованием образцов сырья кукурузы столбиков с рыльцами. Для эксперимента отбирали навески массой 1 г каждая, на которые наносили стандартный раствор ацетохлора для достижения уровней загрязнения 0,03 и 0,4 мкг/г. После суточной выдержки при комнатной температуре проводили анализ образцов по вышеописанной методике. Количественное определение ацетохлора выполняли с использованием предварительно построенного калибровочного графика. Восстановление аналита из матрицы образца рассчитывали как отношение определенной концентрации к внесенной, выраженное в процентах. Каждый анализ проводили трижды.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация методики ПФИА

На рисунке 2 представлены полулогарифмические зависимости поляризации флуоресценции (mP) от содержания ацетохлора в анализируемой пробе, полученные во временных точках 1, 30, 60 и 120 мин. Наблюдалось увеличение аналитического сигнала в течение первых 30 мин инкубации с последующей стабилизацией показателей в течение последующих 90 мин. На основании полученных кинетических данных для проведения анализа была выбрана временная точка 30 мин, соответствующая завершению формирования аналитического сигнала и обеспечивающая стабильность измерений.

Калибровочная зависимость была построена с учетом всех оптимизированных параметров анализа с использованием калибровочных растворов ацетохлора в диапазоне концентраций 0–100 мкг/мл. На рисунке 3 представлена нормализованная полулогарифмическая зависимость $mP/mP_{\max}$ от концентрации аналита, характеризующая аналитические возможности методики.

Анализ образцов растительного сырья методом ПФИА

Согласно требованиям общей фармакопейной статьи ОФС.1.5.3.0011.15 «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» ГФ РФ XV, регламентированная методика пробоподготовки лекарственного растительного сырья включает стадию экстракции органическими растворителями с последующей многостадийной очисткой, направленной на удаление мешающих биологически активных соединений. Однако данный подход характеризуется трудоемкостью и длительностью выполнения. При разработке методики пробоподготовки для определения пестицида ацетохлора методом ПФИА требуется учитывать как специфику аналитического метода, так и физико-химические свойства целевого аналита, что обуславливает необходимость модификации стандартного протокола.

Экстракцию ацетохлора проводили водой очищенной вместо органических растворителей, поскольку было установлено, что гексановые и спиртовые извлечения из сырья демонстрируют завышенные значения аналитического сигнала. Данное явление, вероятно, обусловлено кросс-реактивностью сопутствующих биологически активных соединений, извлекаемых органическими растворителями. Учитывая растворимость ацетохлора в воде, составляющую 233 мг/мл, экстракционная способность воды очищенной в отношении целевого пестицида соответствует физико-химическим свойствам аналита. Кроме того, выбор воды в качестве экстрагента соот-

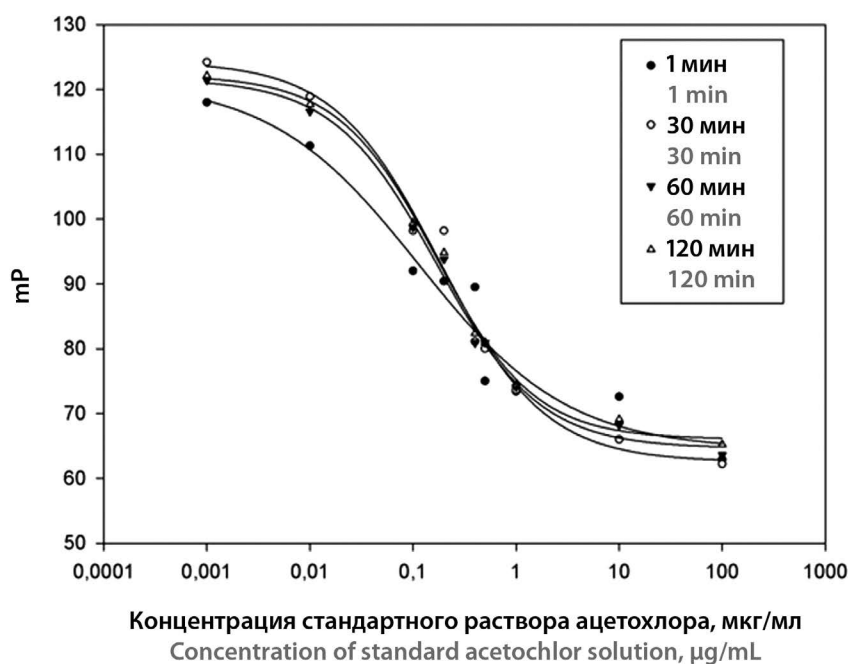


Рисунок предоставлен авторами
The figure was provided by the authors

Рисунок 2. Графики зависимости поляризации флуоресценции от концентрации ацетохлора в различных временных точках ($n = 3$, $\text{pH} = 8,5$, 25°C)

Figure 2. Dependence of fluorescence polarization on acetochlor concentration at various time points ($n = 3$, $\text{pH} = 8.5$, 25°C)

ветствует традиционному способу применения данного лекарственного сырья – приготовлению водного отвара.

После стадии экстрагирования водой проводили жидко-жидкостную экстракцию гексаном с целью концентрирования извлеченного аналита.

Для оценки эффективности стадии жидко-жидкостной экстракции к 15 мл воды очищенной добавляли 50 мкл раствора стандарта ацетохлора (1 мкг/мл) и проводили двухкратную экстракцию гексаном. Объединенные гексановые фракции упаривали при 65°C и сухой остаток растворяли в 60 мкл 10%-го этанола с последующим анализом содержания ацетохлора. Выход экстракции аналита из водного раствора составил $96,9 \pm 0,2\%$ ($n = 3$).

Проведенный анализ образцов показал наличие следовых концентраций ацетохлора во всех исследованных пробах сырья. В образцах 1 и 2 содержание ацетохлора находилось в интервале между пределом обнаружения и пределом количественного определения, в образце 3 содержание ацетохлора было ниже предела обнаружения. Таким образом, невозможно было установить точную концентрацию ацетохлора в исследуемом сырье в соответствии с валидированной методикой.

Анализ образцов методом ВЭЖХ-УФ

При анализе образцов был обнаружен хроматографический пик со временем удерживания $\sim 4,8$ мин, совпадающий с пиком стандарта ацетохлора (общее время анализа – 7 мин). Это подтверждает наличие данного пестицида во всех исследуемых пробах. Однако количественное определение ацетохлора данным методом оказалось невозможным, поскольку его содержание находилось ниже предела количественного определения методики.

Валидация методики

Валидация методики показала следующие аналитические характеристики: предел обнаружения составил 0,014 мкг/мл, что обеспечивает детектирование ацетохлора в растительном сырье на уровне от 0,017 мг/кг; предел количественного определения – 0,02 мкг/мл; диапазон количественного определения – от 0,02 до 1,3 мкг/мл, соответствующий содержанию ацетохлора в растительной матрице от 0,024 до 1,56 мг/кг. Значение IC_{50} составило 0,2 мкг/мл. Полученные параметры демонстрируют высокую чувствительность разработанной методики для мониторинга остаточных количеств ацетохлора в объектах растительного происхождения.



Рисунок предоставлен авторами
The figure was provided by the authors

Рисунок 3. Нормализованный график зависимости значения поляризации флуоресценции от концентрации ацетохлора ($n = 3$, $pH = 8,5$; $25\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Figure 3. Normalized fluorescence polarization curve as a function of acetochlor concentration ($n = 3$, $pH = 8.5$; $25\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Перекрестная реактивность с родственными ацетанилидными пестицидами (бутахлор, метолахлор) исследовалась в диапазоне концентраций 1–1000 нг/мл. Поскольку для метолахлора значение IC_{50} достигнуто не было, расчет перекрестной реактивности проводили с использованием величины IC_{10} . Для бутахлора значение кросс-реактивности составило 3,56 %, для метолахлора – 3,45 %, что подтверждает специфичность разработанной методики к ацетохлору.

Таблица 2. Анализ образцов сырья кукурузы столбиков с рыльцами с добавкой ацетохлора

Table 2. Determination of acetochlor in spiked corn silk samples

№ анализа Assay No.	Введено, мг/кг Spiked, mg/kg	Найдено, мг/кг ($n = 3$) Found, mg/kg ($n = 3$)	Процент открытия, % Recovery, %
1	0,03	0,0302 ± 0,0009	100,7
2	0,40	0,4020 ± 0,0050	100,5

Таблица предоставлена авторами
The table was provided by the authors

Проведенная оценка прецизионности показала, что значения относительного стандартного отклонения (RSD) при шестикратном анализе стандартных растворов ацетохлора составили 1,4 % при концентрации 0,1 мкг/мл и 7,6 % при концентрации 1 мкг/мл. Полученные значения RSD не превышают 8 %, что соответствует критериям приемлемости для валидации аналитических методик и подтверждает удовлетворительную прецизионность разработанного метода.

Правильность методики подтверждена методом «введено – найдено». Результаты анализа образцов с добавками ацетохлора представлены в таблице 2. Процент извлечения аналита составил 100,09–102,56 %, что соответствует установленным критериям правильности для валидируемой методики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная методика количественного определения ацетохлора методом ПФИА была использована для анализа примеси пестицида ацетохлора в лекарственном растительном сырье кукурузы столбиков с рыльцами. Методика пробоподготовки была оптимизирована с учетом специфики метода. Во всех трех анализируемых образцах была обнаружена примесь ацетохлора в количествах ниже предельно допустимой концентрации в кукурузе (0,03 мг/кг).

Аналитический диапазон методики – от 0,02 до 1,3 мкг/мл, что позволяет определить присутствие ацетохлора в растительном сырье при его содержании от 0,024 до 1,56 мкг/кг.

Отсутствие кросс-реактивности с родственными пестицидами бутахлором и метолахлором доказывает специфичность методики. Отклонение от среднего значения не превышало 8 %, что подтверждает удовлетворительную прецизионность разработанной методики. Оценена правильность методики анализа лекарственного растительного сырья с добавкой известного количества ацетохлора, составившая 100,7 и 100,5 %.

Таким образом, методика может быть применена для быстрого и недорогого экспресс-анализа примеси ацетохлора в лекарственном растительном сырье кукурузы столбиков с рыльцами.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Lengyel Z., Földényi R. Acetochlor as a soil pollutant. *Journal of Soils and Sediments*. 2002;2:155. <https://doi.org/10.1007/BF02988468>
- Wang W.-G., Li M.-Y., Diao L., Zhang C., Tao L.-M., Zhou W.-X., Xu W.-P., Zhang Y. The health risk of acetochlor metabolite CMEPA is associated with lipid accumulation induced liver injury. *Environmental Pollution*. 2023;331(2):121857. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121857>
- Hussan H. N. M., He H., Du P., Wu X., Liu X., Xu J., Dong F., Zheng Y. Determination of clomazone and acetochlor residues in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 2021;101(15):2503–2509. <https://doi.org/10.1080/03067319.2019.1694668>
- Li L., Yin Y., Zheng G., Liu S., Zhao C., Xie W., Ma L., Shan Q., Dai X., Wei L. Determination of multiclass herbicides in sediments and aquatic products using QuEChERS combined with ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) and its application to risk assessment of rice-fish co-culture system in China. *Microchemical Journal*. 2021;170:106628. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106628>
- Cara I. G., Topa D., Raus L., Calistru A. E., Filipov F., Jitareanu G. Selective and sensitive quantification of acetochlor and S-metolachlor in maize and soybean plant samples by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Agriculture*. 2021;11(4):283. <https://doi.org/10.3390/agriculture11040283>
- Hegedűs G., Krikunova V., Bélai I., Eremin S., Székács A. An enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) for the detection of acetochlor. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 2002;82(11–12):879–891. <https://doi.org/10.1080/0306731021000102338>
- Zha Y., Liu X., Hu P., Lu S., Ren H., Liu Z., Liang X., Yang Y., Li Y., Zhou Y. Alkaline phosphatase-triggered immunoassay based on fluorogenic reaction for sensitive detection of acetochlor, metolachlor, and propisochlor. *Food Analytical Methods*. 2020;13(4):1008–1016. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01706-6>
- Li Z., Wu Y., Li Z., Yu B., Mao X., Shi G. A lateral flow immunoassay method for the rapid detection of acetochlor and alachlor in vegetable oil by sensitivity enhancement by using dimethyl- β -cyclodextrin. *Analytical Methods*. 2023;15(38):5087–5094. <https://doi.org/10.1039/D3AY01379K>
- Yakovleva J. N., Lobanova A. I., Panchenko O. A., Eremin S. A. Production of antibodies and development of specific polarization fluoroimmunoassay for acetochlor. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 2002;82(11–12):851–863. <https://doi.org/10.1080/0306731021000102310>
- Altıparmak E., Yılmaz E., Dadaser-Celik F., Ates N. Sensitive quantification of acetochlor and metolachlor in water using Taguchi-optimized DLLME coupled with high-performance liquid chromatography. *Microchemical Journal*. 2024;200:110499. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.110499>
- Cai Y., Li L., Zhang J., Li Z., Zhang F., Xu Y., Tai Z. Development of a MOF-based SPE method combined with GC-MS for simultaneous determination of alachlor, acetochlor and pretilachlor in field soil. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2023;195(5):569. <https://doi.org/10.1007/s10661-023-11147-3>
- Ruan X., Wang Y., Kwon E. Y., Wang L., Cheng N., Niu X., Ding S., Van Wie B. J., Lin Y., Du D. Nanomaterial-enhanced 3D-printed sensor platform for simultaneous detection of atrazine and acetochlor. *Biosensors and Bioelectronics*. 2021;184:113238. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113238>
- Liu Y., Wang L.-T., Zhou K., Eremin S. A., Huang X.-A., Sun Y.-M., Xu Z.-L., Lei H.-T. Rapid and homologous immunoassay for the detection of herbicide propisochlor in water. *Food and Agricultural Immunology*. 2018;29(1):67–83. <https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1359499>
- Mukhametova L. I., Eremin S. A. Fluorescence polarization assays for organic compounds in food safety. *Frontiers in Bioscience-Elite*. 2024;16(1):4. <https://doi.org/10.31083/j.fbe1601004>
- Mukhametova L. I., Karimova M. R., Arutiunian D. A., Shanin I. A., Ponomarenko E. E., Eremin S. A. Detection of monobutyl phthalate in urine and environmental water by a rapid and sensitive fluorescence polarization immunoassay. *One Health Advances*. 2025;3(1):9. <https://doi.org/10.1186/s44280-025-00074-2>
- Filimonova S. M., Balyklova K. S., Zherdev D. O., Eremin S. A., Mukhametova L. I., Krylov V. B., Nifantiev N. E. A First Case of Fluorescence Polarization Biosensor-Based Assay for Rapid Monitoring of Protein API Content in Tablet Dosage Forms: Detection of Lysozyme in Tablets. *Biosensors*. 2025;15(11):724. <https://doi.org/10.3390/bios15110724>
- Deryabina M. A., Yakovleva Yu. N., Popova V. A., Eremin S. A. Determination of the herbicide acetochlor by fluorescence polarization immunoassay. *Journal of Analytical Chemistry*. 2005;60(1):80–85. <https://doi.org/10.1007/s10809-005-0063-4>