VYUŽITIE IMUNOANALYTICKÝCH METÓD V STOPOVEJ ORGANICKEJ ANALÝZE VÔD

Skúsenosti s ELISA metódou a jej porovnanie s konvenčnou HPLC metódou

Zoltán Krascsenits, Mikuláš Bartal

V práci bola testovaná kompetitívna ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) metóda na skupinové stanovenie triazínových herbicídov (atrazínu, prometrynu), alachlóru, isoproturónu a mikrocystínov vo vodách. Použili sa mikrotitračné dostičky s naviazanými protilátkami. Boli testované krížové reaktivity rôznych pesticídov a sinicových toxínov. Pritom sa vyhodnocovala tzv. hodnota IC_{50} (%) na základe odozvových kriviek látok. Boli zistené nasledovné hodnoty: ATRAZIN 0,25 $\mu g.l^{-1}$, ISOPROTURON 0,15 $\mu g.l^{-1}$,ALACHLOR 0,49 $\mu g.l^{-1}$, MCYST-LR 0,31 $\mu g.l^{-1}$, MCYST-RR 0,32 $\mu g.l^{-1}$, MCYST-YR 0,38 $\mu g.l^{-1}$. V ďalšej časti práce bol testovaný vplyv matrice vzorky. Výsledky potvrdili že obsah acetonitrilu významne neruší stanovenie ak je prítomný v množstve 0 – 10 % (v/v), resp. metanol v množstve 0 – 5 % (v/v). Kalibračné čiary sa vyhodnocovali v semilogaritmickom formáte, ktorým boli zistené regresné koeficienty v rozsahu r^2= 0,9985 až 1,0^2. Štatistickým vyhodnotením kalibračných kriviek boli určené hodnoty detekčných limitov pre jednotlivé látky. Tie dosahovali hodnoty rádovo desatiny až stotiny mikrogramov v litry vody bez predchádzajúceho zakoncentrovania analytov. ELISA metóda bola porovnávaná s konvenčnou HPLC metódou pomocou Youdenovho diagramu.

Kľúčové slová: ELISA, HPLC, pesticíd, mikrocystín, toxín, imunochémia, validácia metód

During the past years immunoassay became more and more important also as a method for environmental analysis, especially for the determination of pesticides and toxins. Comparison of conventional method (HPLC) with alternative ELISA method for the analysis of polar pesticides (atrazine, isoproturon, alachlor) and microcystins was done. The plate kit uses polyclonal antibodies, which bind both pesticides, microcystins and pesticide (microcystin)-enzyme conjugate. First the cross reactivity of the antibodies was evaluated. At the end also new, immunochemical method ELISA was compared with standard HPLC method. The value of correlation coefficient was 0,9318 which means, that also results obtained by immunochemical method are reliable.

Key wors: ELISA, HPLC, immunosensor, pesticide, algal toxin, method validation

---

ÚVOD

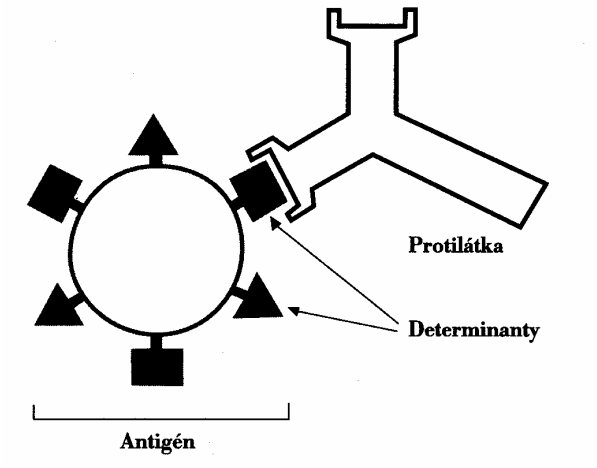
V súčasnosti rastie úsilie o monitoring zlúčenín nepriaznivo ovplyvňujúcich stav ekosystémov. Významnou skupinou týchto látok sú pesticídy, pri ktorých sa pozornosť zameriava na skúmanie ich vplyvu a transportu v životnom prostredí. Okrem vplyvov pesticídnych látok na zložky životného prostredia je zaznemenaná aj zvyšujúca sa eutrofizácia vôd. Príčinou eutrofizácie je hromadenie sa živín (dusík a fosfor) z poľnohospodárskej činnosti a nedokonale vyčistených komunálnych odpadových vôd. Použitie klasických analytických metód je časovo a z hľadiska technického vybavenia laboratórií veľmi náročné, čo má vplyv na obmedzenie počtu analyzovaných vzoriek. Zavedenie imunochemických metód na stanovenie rôznych organických látok umožnilo predchádzať niektorým z uvedených nedostatkov konvenčných metód. Vývoj imunochemických metód v environmentálnej analýze je relatívne nové. Prvé aplikácie boli komerčne dostupné pre stanovenie pesticídov v Európe v 90. rokoch 20. storočia, avšak využitie inunostanovení v predchádzajúcom období rapídne narástlo, vďaka vysokej špecifickosti a ďalším výhodám týchto stanovení v porovnaní s konvenčnými analytickými metódami. Tento trend je možné tiež pozorovať napr. v prijatí imunostanovenia US EPA ako skríningovej metódy na stanovenie celkového obsahu triazínov a iných organických kontaminantov. Imunostanovenia boli tiež zaradené medzi nové formy stanovenia ako sú multi-reziduálne metódy alebo flow-injection imunostanovenia. [1]

IMUNOCHÉMIA A IMUNOCHEMICKÉ METÓDY

Imunochemické metódy sú založené na interakciách antigén-protilátka, ktoré sa vyznačujú vysokou afinitou a špecifickosťou. Tieto vlastnosti umožňujú citlivé a selektívne stanovenie vybraných polutantov. Protilátky sú kľúčovými zložkami všetkých imunochemických metód. Sú charakterizované štruktúrou, ktorá umožní vytvorenie vysoko špecifickej interakcie s antigénmi. Priebeh reakcie antigénu s protilátkou sa meria na základe úbytku jedného z dvojice reaktantov alebo na základe tvorby reakčného produktu – antigén-protilátkového komplexu (imunokomplex). Pri vyhodnocovaní sa detekuje vznikajúci imunokomplex. [2, 3]

Antigény

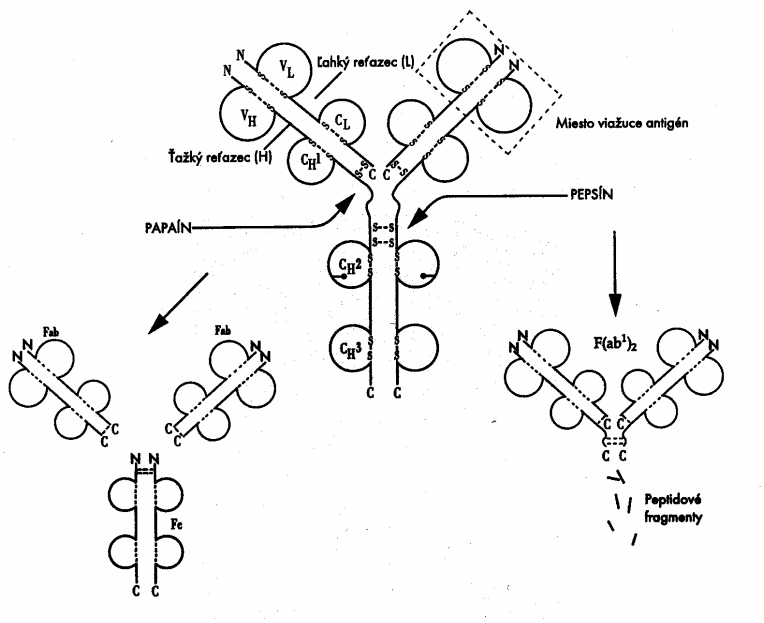
Ako **antigény** sa označujú makromolekulové látky prirodzeného alebo umelého (syntetického) pôvodu, ktoré imunitný systém rozpoznáva ako cudzie. Po vpravení do vhodného organizmu stimulujú tvorbu protilátok, čiže navodia *imunitnú odpoveď*. Takýto antigén označujeme ako kompletný antigén alebo **imunogén**. Veľmi malé molekuly samé osebe nie sú schopné indukovať imunitnú odpoveď, avšak nadviazaním sa na inú väčšiu molekulu, túto schopnosť získajú. Takáto látka sa označuje ako **haptén** a molekula, na ktorú sa nadväzuje sa označuje ako *nosič*. [4]. Antigén reaguje so svojou špecifickou protilátkou na spôsob „kľúč a zámka“, keď je jeho epitop ponorený do priehlbiny vytváranej variabilnými doménami ľahkých a ťažkých reťazcov protilátok (viď. obr. 1.).



Obr. 1 Schéma väzby antigénových determinantov s väzbovými miestami protilátky
Fig. 1 Scheme of the bindig of antigene with specific sites of antibody

Protilátky

Z chemického hľadiska protilátky patria medzi glykoproteíny čo bolo dokázané r. 1930 M. Heidelbergom. Hlavnou biologickou funkciou imunoglobulínov je protilátková aktivita, čo znamená, že molekula obsahuje *väzbové miesto*, ktoré sa môže špecifickým spôsobom nadviazať na determinantné skupiny antigénu, ktorý indukoval ich tvorbu. Základná molekula imunoglobulínu sa skladá zo štyroch polypeptidových reťazcov. Menší reťazec sa označuje ako ľahký (L - light), väčší reťazec sa označuje ako ťažký (H - heavy). L-reťazec sa viaže na ťažký reťazec prostredníctvom disulfidových väzieb a tvoria tvar písmena Y (viď. obr. 2.), podobné väzby spájajú aj oba ťažké reťazce. Na základe existencie rôznych ťažkých režazcov sa imunoglobulíny (Ig) delia do 5 základných tried - IgG, IgM, IgA, IgD, IgE. Ľahké reťazce sú dva, pričom ťažký reťazec sa kombinuje buď s jedným alebo druhým ľahkým režťazcom. [5]



Obr. 2 Schéma protilátky (odhalenie jej štruktúry pomocou papaínu a pepsínu)
Fig. 2 Scheme of the antibody (structure identification after enzymatic digestion with papaine and pepsine)

Z mechanizmu tvorby protilátok vyplýva, že každý antigénový determinant aktivuje len jeden klon buniek a ten potom syntetizuje len jeden druh imunoglobulínových molekúl. Keďže protilátky určitej špecifickosti sú výsledkom produkcie jedného klonu B-lymfocytov, imunitná odpoveď je **polyklonová**. [2] Myelómy sú nádorovo zvrhnuté B-lymfocyty, ktoré produkujú rovnaký typ protilátok, obyčajne ťažko zistiteľnej špecifickosti. Myelóm možno teda považovať za abnormálne veľký klon buniek a produkované protilátky sú **monoklonové**.

Termínom enzýmová imunoanalýza (EIA) sa označuje skupina imunoanalytických metód, ktoré v detekčnej alebo kvantifikačnej fáze používajú enzýmovú reakciu. Enzým je pritom kovalentne viazaný na niektorý z imunoreaktantov (antigén, haptén, protilátka, druhá protilátka) alebo v špeciálnom usporiadaní, napr. v homogénnej EIA sa pridáva priamo do reakčnej zmesi po vytvorení imunokomplexu. Citlivosť metód enzymových imunoanalýz limituje tvorba imunokomplexu, t.j. rovnovážna konštanta *K* reakcie antigénu s protilátkou. [6]

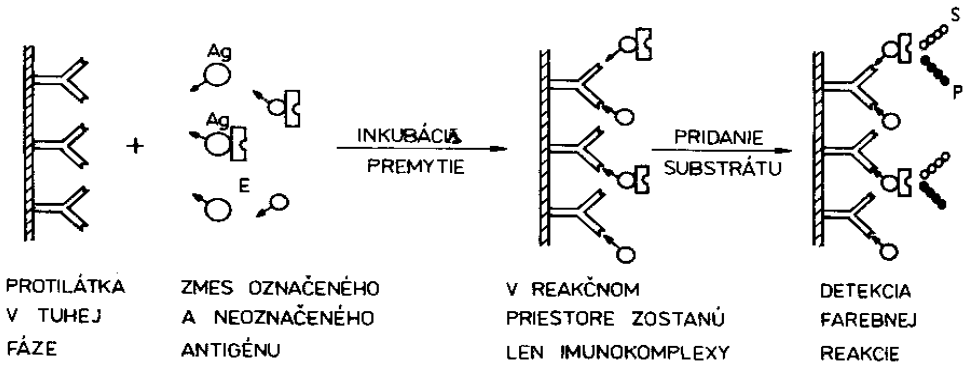
$$\mathbf{K = k_1 / k_2 = [Ab\text{-}Ag] / [Ab] . [Ag]}$$

K je rovnovážna asociačná konštanta, charakterizujúca silu väzby medzi antigénom a protilátkou. Asociačné konštanty komplexu antigén - protilátka majú pri optimálnych podmienkach hodnoty približne 10^{12} mol/l.

ELISA

Je to metóda heterogénnych enzýmových imunoanalýz, pričom jeden z reaktantov je na konci reakcie oddelený od imunokomplexu. Na oddelenie sa najčastejšie používajú tuhé povrchy – stena skúmavky alebo stena mikrotitračnej jamky. Najpoužívanejšou technikou v oblasti analýz životného prostredia je kompetitívna ELISA s imobilizovanými protilátkami: na tuhú fázu sa naviaže protilátka špecifická pre antigén, ktorý sa má stanoviť. Potom sa pridá známe množstvo enzýmom označeného antigénu a buď známe (štandardné) množstvo, alebo neznáme (analyzované) množstvo neoznačeného antigénu. Počas inkubácie súťaží označený antigén so štandardným alebo skúmaným (vzorka) neoznačeným antigénom. Po skončení inkubácie sa reakčný priestor (napr. jamka v mikrotitračnej doštičke) premyje tlmivým roztokom, čím sa odstránia voľné reaktanty. Zostanú len označené a neoznačené antigény

nadviazané na imobilizované protilátky. Potom sa pridá roztok substrátu, ktorý enzým prítomný v imunokomplexoch rozloží za vzniku farebného produktu. Intenzita zafarbenia roztoku s produktom enzýmovej reakcie sa meria spektrofotometricky. [2, 7]



Obr. 3 Schéma kompetitívnej ELISA pre antigén
Fig. 3 Scheme of the competitive ELISA reaction

V posledných piatich rokoch nastal intenzívny vývoj automatizovaných biosenzorov. Tieto prístroje fungujú na princípe kompetitívnej ELISA, namiesto enzýmov pri detekcii sú používané fluorescenčné farbivá. Pre monitorovanie chlórtriazínov vo vode bol vyvinutý imunosenzor, ktorý bol spojený s FIA systémom. Tento systém, označovaný ako RIANA (River ANAlyzer) s optickým imunosenzorom a bol použitý pre monitoring chlórtiazínov v povrchových vodách. [8,9,10]. Ďalším novovyvinutým biosenzorom je AWACSS - Automated Water Analyser Computer Supported System. Základom systému je prietoková injekčná analýza FIA spojená s nepriamou ELISA na stenách prietokovej cely. Tento senzor dosahuje nízke detekčné limity, môže súčasne stanovovať viac druhov kontaminantov vo vodách, môže pracovať priamo na mieste monitoringu a umožňuje diaľkové ovládanie internet. [11,12]

EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Cieľové analyty

Pesticídy

Z veľkého počtu pesticídov boli vybrané tie, pre ktoré boli dostupné ELISA súpravy a sú relevantné pre Slovenskú republiku, čiže sú registrované v SR a sú intenzívne používané v poľnohospodártve [13]. Tieto pesticídy boli zo skupiny tiazínových, fenylmočovinových a acetanilidových herbicídov. Hlavnými predstaviteľmi skupiny triazínových herbicídov sú atrazín, simazín a prometrýn. Ich cfyzikálno-chemické vlastnosti uvádza tabuľka 1.

Tab. 1 Triazínové pesticídy
Tab. 1 Triazine herbicides

Názov látky	Mol. Hmotnosť	Rozpustnosť vo vode (pH 7, 20 °C) $mg.l^{-1}$	Kow (log P) (25 °C)	Prípravok v SR
Atrazín	215,7	33	2,5	ATRANEX 50SC ZEAZIN S 40 GESAPRIM 90WG
Simazín	201,7	6,2	2,1	SIMAZIN 50SC GESAGARD 80WP
Prometrýn	241,1	33	3,1	PROMETREX 50SC

Zo skupiny fenylmočovinových herbicídov boli vybrané *diurón, isoproturón* lebo majú značné toxické účinky pre vodné organizmi, preto Európskou komisiou pre životné prostredie boli zaradené medzi prioritné polutanty (na Slovensku nie je registovaný žiadny prípravok s touto účinnou látkou) a *chlortolurón* ako najviac používaný močovinový herbicíd.
Zo skupiny chlóracetamidových herbicídov boli vybrané dva štruktúrne príbuzné látky - *metolachlór* a *acetochlór* nakoľko v posledných rokoch ich použitie má rastúcu tendenciu, sú pomerne pohyblivé v pôde a produkujú toxické degradačné produkty.

Tab. 2 Fenylmočovinové pesticídy
Tab. 2 Phenylureae herbicides

Názov látky	Mol. Hmotnosť	Rozpustnosť vo vode (pH 7, 20 °C) mg.l^{-1}	Kow (log P) (25 °C)	Prípravok v SR
Izoproturón	206,3	65 mg/l	2,5	TOLKAN FLO PROTURIN 500SC
Diurón	233,1	36,4 mg/l	2,8	-
Chlortoluón	212,7	74 mg/l	2,5	SYNCURAN 80DP LENTIPUR 500FW

Tab. 3 Chlóracetanilid pesticídy
Tab. 3 Anilidic herbicides

Názov látky	Mol. Hmotnosť	Rozpustnosť vo vode (pH 7, 20 °C) mg.l^{-1}	Kow (log P) (25 °C)	Prípravok
Alachlór	269,8	242mg/l	3,09	SALTO 50EC LASSO MTX
Metolachlór	283,8	488 mg/l	2,9	
Acetochlór	269,8	223 mg/l	3,03	ACENIT A 880EC GUARDIAN EC

Mikrocystíny

Cyanobaktérie a ich hlavné metabolity - cyanotoxíny , boli pozorované vo vodných telesách zahŕňajúcich aj vodné nádrže v celej Európe. Cyanotoxíny sú zahrnuté medzi prioritné nebezpečné látky v Rámcovej smernici o vodách (Water Framework Directive), ktoré môžu spôsobovať smrť zvierat a tiež vyvolať zdravotné ťažkosti alebo smrť u ľudí. Na Slovensku sa najčastejšie vyskytujú sinice z rodu Mycrocystis, ktoré produkujú hepatotoxíny – mikrocystíny (MCYST). Ich toxický účinok spočíva v inhibíci proteinových fosfatáz PP-1c a PP-2Ac, ktoré sú dôležitými enzýmami pri potlačení vzniku nádorov. Toxíny spôsobujú poškodenie štruktúry a funkcie pečene ako cieľového orgánu. Z tohoto dôvodu je potrebné ich kontinuálne monitorovanie v pitných vodách a tiež vo vodách pre rekreačné účely.

Chemikálie a materiál

Použili sa rozpúšťadlá čistoty pre organickú stopovú analýzu. Acetonitril, metanol, acetón, hexán, dichlórmetán a síran sodný, bezvodý, p.a. boli z Nemecka. Redestilovaná voda Milli-Q z USA bola pripravená ultrafiltráciou. Štandardy pesticídov (atrazín, alachlor, isproturon, ametryn, prometryn, propazin, simazin a terbutylazin) s čistotou najmenej 96 - 99 % boli zakúpené ako čisté látky z Nemecka a štandardy mikrocystínov MCYST-LR, MCYST-RR, MCYST-YR z Kanady. Z tuhých štandardov boli pripravené zásobné roztoky s koncentráciou 1000 µg.ml^{-1} v acetonitrile alebo v acetóne (simazín). Zriedením týchto roztokov sa pripravili pomocné a pracovné roztoky pesticídov s koncentráciou 25 µg.ml^{-1} v acetonitrile. Na prípravu mobilnej fázy pre HPLC experimentov bol použitý octan amónny najvyššej čistoty z Nemecka a kyselina trifluórooctová. Na izoláciu mikrocystínov z vody boli použité SPE kolónky STRATA SDB-L styréndivinylbenzén 100

μm, 500 mg zo Slovenska a pre pesticídy mikrokolónky plnené PLRP-S sorbentom. Na testovanie boli použité komerčné ELISA súpravy EnviroGard Plate Kit na stanovenie isoproturonu, alachlóru, triazinových pesticídov a mikrocystínov vo vodách z USA. Každá súprava obsahovala 96 jamkovú mikrotitračnú dostičku s naviazanými polyklónovými protilátkami, 1 vialku roztoku „negatívnej kontroly" (0,0 $\mu g.l^{-1}$), kalibračné roztoky, 1 vialku x-enzým konjugátu, 1 vialku substrátu, 1 vialku chromogénu a 1 vialku roztoku na ukončenie reakcie („stop solution").

Prístroje a zariadenia

HPLC

Kvapalinový chromatograf s diode-array UV detektorom

- UV- detektor diódového poľa
- chemostanica
- analytická kolóna 250 x 4,0 mm, 5μm (pesticídy)
- analytická kolóna 250 x 3 mm i.d., 5 μm (mikrocystíny)

Automatizovaná predkoncentračná SPE jednotka PROSPEKT

- SDU - solvent delivery unit
- SAMOS Win/SPE softwer

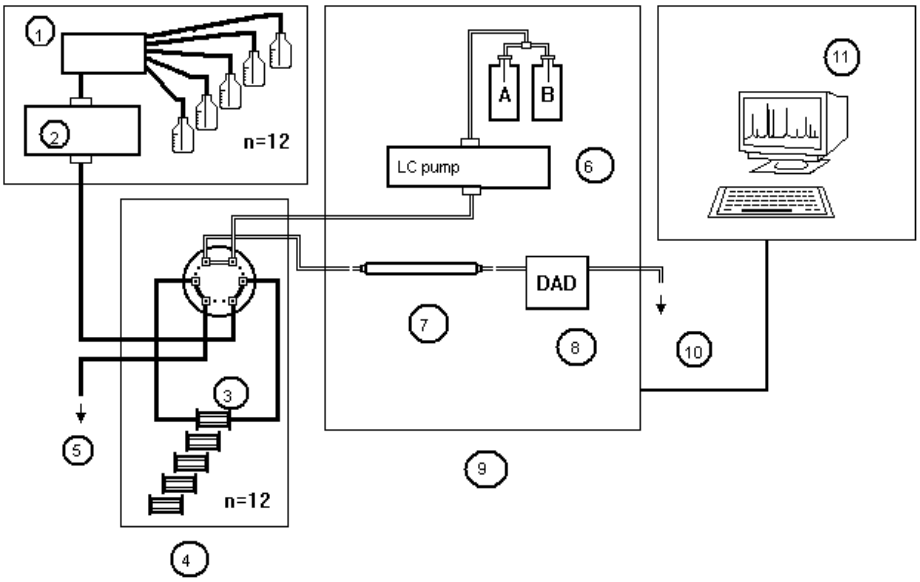
ELISA

Spektrofotometer pre mikrotitračné dostičky Plate Reader s počítačovým softvérom; automatická mikropipeta s nastaviteľným objemom.

Postupy

On-line SPE-HPLC/DAD-UV stanovenie pesticídov

Predkoncentrácia vzoriek bola uskutočnená pomocou automatizovaného systému PROSPEKT. Na zachytenie analytov boli použité SPE mikrokolónky s rozmerom 10 x 2,0 mm vnútorného priemeru. Kolónky boli pred analýzou kondicionované prečerpávaním 10 ml metanolu a 10 ml Milli Q vody pomocou SDU jednotky prietokovou rýchlosťou 5 $ml.min^{-1}$. Nasledovalo prečerpávanie 100 ml vzorky tiež rýchlosťou 5 ml/min. Zachytené analyty boli eluované priamo na analytickú kolónu gradientom mobilnej fázy. Mobilná fáza bola nasmerovaná na SPE kolónku pomocou automatického prepínania ventilov. Schému prístroja uvádza obrázok 8. Gradient mobilnej fázy bol nasledovný : lineárne z 10 % B na 50 % B za 30 minút a potom naspäť na 10 % B za 2 minúty s prietokom 1 $ml.min^{-1}$ (A - 1 $mmol.l^{-1}$ octan amónny s 2,5 % v/v acetonitrilu, B – acetonitril) Na detekciu bol použitý UV detektor diódového poľa, čo umožňuje kvantifikáciu v UV oblasti a identifikáciu látok pomocou UV-VIS spektier. Na kvantifikáciu pesticídov boli použité signály snímané pri vlnových dĺžkach 220 nm a 230 nm pre triazíny a 245 nm pre fenylmočoviny.



Obr. 4 Schéma zapojenia SAMOS SPE-HPLC/DAD-UV systému
1-SDU, 2-čerpadlo, 3-SPE kolónky, 4-PROSPEKT, 5,10-odpady, 6-HPLC pumpa, 7-analytická kolóna, 8-detektor, 9-HPLC HP 1090, 11-Chemostanica
Fig. 4 Scheme of the automatized SAMOS on-line SPE HPLC/DAD-UV system
1-SDU, 2-pump, 3-SPE column, 4-PROSPEKT, 5,10-waste, 6-HPLC pump, 7-analytical column, 8- detector, 9-HPLC HP 1090, 11-Chemstation

Off-line SPE -HPLC/UV analýza mikrocystínov

K extrakcii sa použilo 500 ml vzorky vody prefiltrovanej cez GF/C predfilter. Potom sa do vzorky pridal vodný roztok TFA a metanol. SPE kolónky boli kondicionované etylacetátom, metanolickým roztokom TFA, metanolom a utračistou vodou Milli-Q. Za tým nasledovala prekoncentrácia vzorky. Sorbent sa po prečerpaní vzorky vody s cieľom odstránenia balastných látok sa premýval postupne s 10 %, 20 %, 30 % vodnými roztokmi metanolu. Po vysušení v prúde vzduchu sorbované toxíny boli eluované s 0,1 % (v/v) metanolickým roztokom TFA. Extrakt sa zahustil odfúkaním so vzduchom a objem sa upravil metanolom na 150 μl. Chromatogram analýzy modelovej vzorky vody s koncentráciou mikrocystínov 1 μg.l-1 separované na analytickej kolóne Luna C-18, 250 x 3 mm i.d. so zrnitosťou 5 μm je uvedený na obrázku 5. Gradient mobilnej fázy bol nasledovný : lineárne z 20 % B na 70 % B za 30 minút a potom naspäť na 20 % B za 2 minúty s prietokom 0,6 $ml.min^{-1}$ (A – 5% v/v acetonitrilu a 0,05% v/v TFA vo vode, B – 0,05% v/v TFA v acetonitrile) Chromatografický proces separácie mikrocystínov bol monitorovaný UV detektorom pri vlnovej dĺžke 238 nm (na základe charakteristickej absorpcie UV žiarenia kyseliny ADDA pri 238 nm).

ELISA

Do vopred vyznačených jamiek bolo napipetované po 80 μl negatívnej kontroly, štandarných roztokov a vzoriek. Následne do každej jamky bolo pridaných 80 μl x-enzým konjugátu. Obsah jamiek bol premiešaný opatrným krúživým pohybom a jamky sa zakryli parafilmom. Takto pripravené jamky sa nechajli inkubovať po dobu 1 h pri laboratórnej teplote v tme. Po uplynutí inkubačnej doby jamky boli premyté 5 krát vodovodnou vodou. Potom do každej jamky sa pridalo 80 μl substrátu a 40 μl chromogénu, pričom sa vždy pridával najskôr substrát. Znova sa nechali inkubovať 30 minút pri laboratórnej teplote. Po uplynutí doby na ukončenie vyfarbovacej reakcie bolo pridaných 40 μl 2,5 $mol.l^{-1}$ kyseliny sírovej („stop solution“). Pôvodné modré zafarbenie roztokov v jamkách sa zmenilo na žlté. Na meranie intenzity prechádzajúceho svetla bol použitý spektrofotometer („Plate-reader“) pri 450 nm, a 650 nm ako referenčná vlnová dĺžka.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

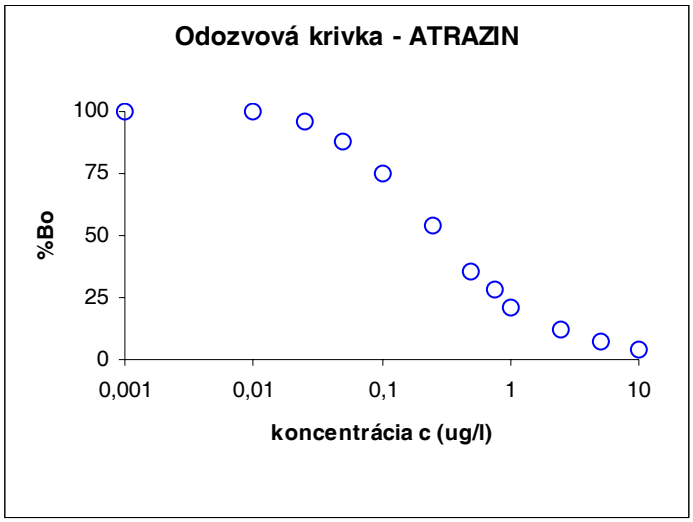
Charakterizácia ELISA súprav

Testovanie citlivosti

Pri hodnotení citlivosti ELISA súprav boli použité odozvové krivky jednotlivých analytov. Odozvové krivky boli merané pre laboratórne štandardné roztoky. Z nameraných hodnôt absorbancií sa vypočítala hodnota $\%B_0$ dosadením príslušných údajov do vzorca :

$$\%B_0 = (OD_{ŠT} / OD_{NC}) \cdot 100 \ \%$$

kde $OD_{ŠT}$ je absorbancia (optická hustota) jednotlivých štandardov, OD_{NC} je absorbancia negatívnej kontroly. Vynesením získaných hodnôt %Bo na y-ovú os a príslušných koncentrácií na x-ovú os v semilogaritmickej forme sa získali odozvové krivky pre cieľové analyty. Táto závislosť má sigmoidálny tvar s priamkovou časťou.



Obr. 5 Odozvová krivka pre atrazín v Milli-Q vode
Fig. 5 Response curve for atrazine in Milli-Q water

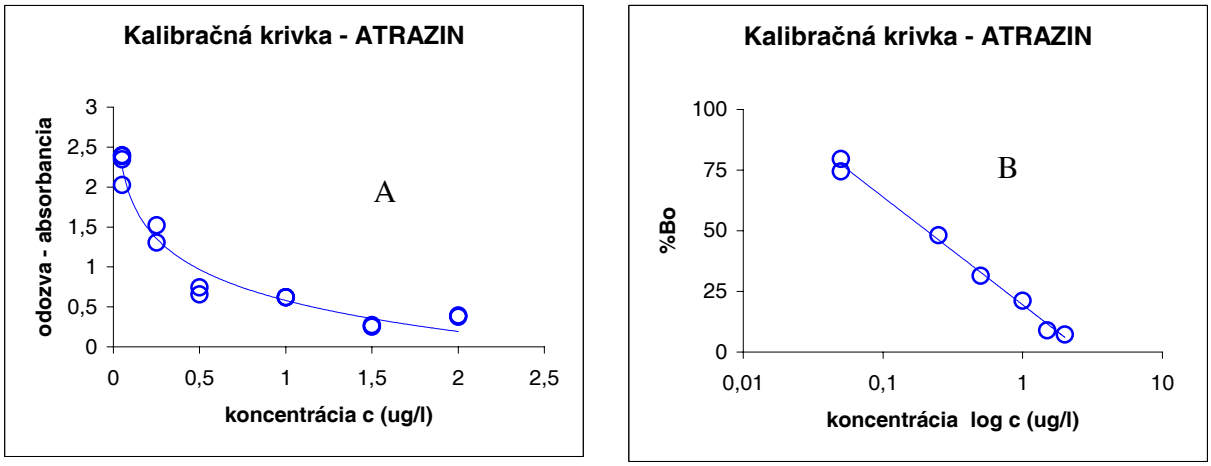
Zo získaných odozvových kriviek boli určené hranice lineárnej odozvy metódou derivácie.
Zistené koncentračné hranice pre lineárnu odozvu pre jednotlivé testované látky uvádza tabuľka 2.

Tab. 4 Koncentračné hranice linearity pre cieľové analyty
Tab. 4 Range of linear response for the target analytes

Analyt	Dolná hranica [µg.l^{-1}]	Horná hranica [µg.l^{-1}]
isoproturón	0,02	0,7
alachlór	0,06	2,5
atrazín	0,02	2,0
MCYST-LR	0,05	2,0
MCYST-RR	0,06	1,7
MCYST-YR	0,08	1,8

Roztoky použité v ďalších experimentoch boli z lineárneho rozsahu odozvovej krivky. Pred analýzou vzoriek vždy bola zostrojená kalibračná krivka. Závislosť absorbancie roztokov od koncentrácie analytu bola logaritmická, preto ďalším krokom bola linearizácia kalibračných kriviek, pričom bola

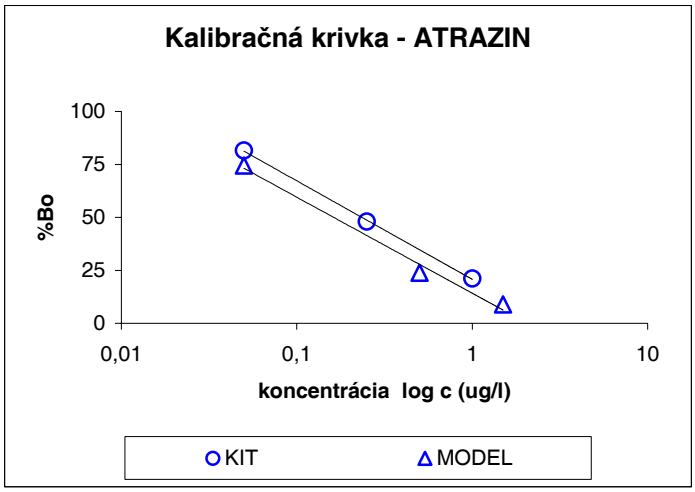
aplikovaná log-lin transformácia. V ďalších experimentoch na kvantifikáciu bola používaná % Bo = f (log c) kalibračná krivka, zostrojená v lineárnej odozvovej oblasti.



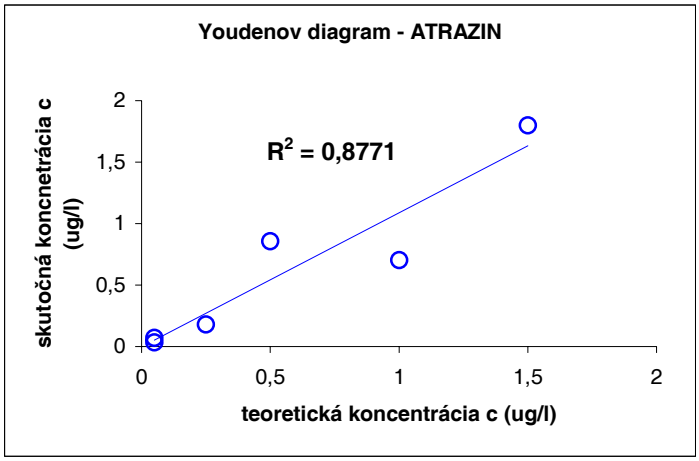
Obr. 6 Odozvová krivka pre atrazín v Milli-Q vode: A – OD = f (c); B - %B_0 = f (log c)
Fig. 6 Response curve for atrazine in Milli-Q water: A – OD = f (c); B - %B_0 = f (log c)

Vplyv matrice štandarných roztokov na presnosť výsledkov

Podkladom pre overenie tohto vplyvu bola skutočnosť, že standardné roztoky dodávané s ELISA súpravou sú pripravované v roztokoch pufrov s konzervačnými látkami. Pre hodnotenie tohto jednoduchého matricového efektu boli namerané kalibračné krivky pomocou súpravovými štandardnými roztokmi (ďalej označené ako KIT) a laboratórnymi štandardnými roztokmi (ďalej označené ako MODEL). Porovnaním týchto dvoch typov kalibračných kriviek vizálne zrejmé, že matrica kalibračných roztokov má vplyv na presnosť výsledkov pri analýze reálnych vzoriek. Najväčšia zhoda obidvoch kalibračných kriviek bola dosiahnutá v prípade súpravy pre stanovenie alachlóru a mikrocystínov, a naopak najnižšia zhoda v prípade súpravy na stanovenie isoproturónu. Pre presnejšie hodnotenie tohto matricového efektu bol použitý Youdenov diagram. Youdenovou metódou sa porovnávala teoretická koncentrácia analytu s vypočítanými koncentráciami, ktoré sa získali extrapoláciou z daných kalibračných kriviek. Hodnota korelačného koeficienta pre izoproturon bola R^2 = 0,5852. V prípade alachlóru korelačný koeficient mal hodnotu R^2 = 0,855. Podobný výsledok sme získali aj pre atrazín, kde R^2 = 0,8771 a 0,975 pre mikrocystín-LR. Preto je dôležité použiť matricové kalibračné roztoky.



Obr. 7 Kalibračné krivky pre atrazín – rôzne matrice
Fig. 7 Comparison of the calibration curves for atrazine



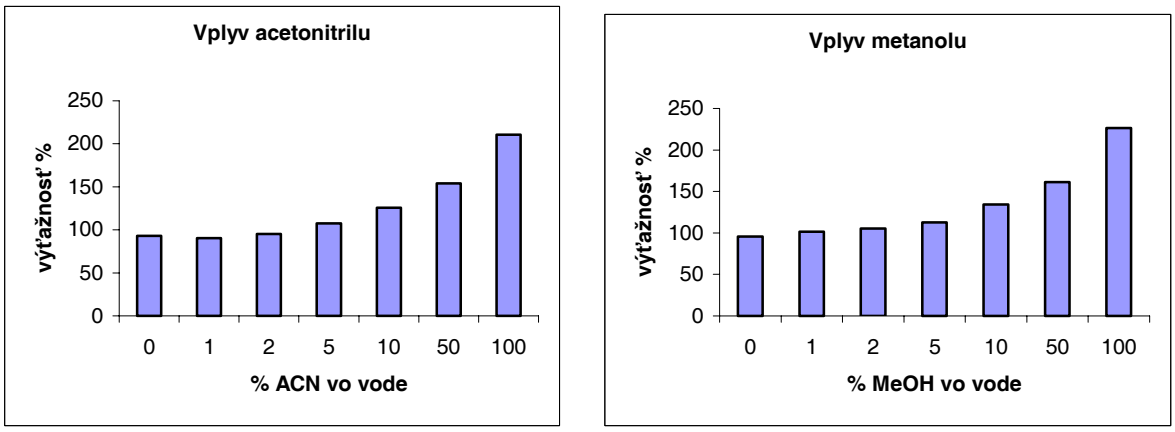
Obr. 8 Youdenov diagram pre atrazín – hodnotenie matricového efektu
Fig. 8 Youden chart for atrazine – evaluation of the matrix effect

Vplyv matrice vzoriek na presnosť výsledkov

Ako testované rozpúšťadlá boli vybrané také, ktoré sa najčastejšie používajú pri stanovení pesticídov a toxínov (sú používané na priamu extrakciu tuhých látok alebo ne rekonštitúciu odparkov pri zmene nepolárneho rozpúšťadla pre zabezpečenie kompatibilnosti so stacionárnymi fázami v HPLC). Hodnotili sme acetonitril a metanol. Pre hodnotenie matricového efektu spomínaných rozpúšťadiel boli testované všetky súpravy na jednej koncentračnej hľadine s hodnotou 0,5 $\mu g.l^{-1}$. Pracovný štandardný roztok bol pripravený v matrici Milli-Q voda s rôznym obsahom acetonitrilu alebo metanolu. Vodné roztoky obsahovali 0-1-2-5-10-50 % acetonitrilu resp. metanolu, pričom boli testované aj 100 %-né rozpúšťadlá. Merala sa absorbancia roztokov pri 450 nm. Z absorbancií boli vypočítané hodnoty % Bo, pomocou ktorých boli vypočítané skutočné koncentrácie analytov v daných roztokoch. Na jednoduchšie a exaktnejšie hodnotenie matricového efektu sme používali hodnoty výťažností, na ktorých výpočet bol použitý vzorec:

$$\eta = (C_{SKUT} / C_{TEOR}) * 100\ \%$$

kde η je výťažnosť v percentách, C_{SKUT} – koncentrácia vypočítaná pomocou kalibračnej krivky, C_{TEOR} – teoretická koncentrácia (0,5 $\mu g.l^{-1}$). Pre demonštráciu toho efektu sme vybrali výsledky získané testovaním roztokov atrazínu, nakoľko výsledky pre alachlór a isoproturon a mikrocystíny boli skoro identické.



Obr. 9 Vplyv acetonitrilu a metanolu na protilátky
Fig. 9 Effect of acetonitrile and methanol for the antibody

Výsledkom testu je, že relatívne nízke koncentrácie acetonitrilu resp. metanolu (do 5% obsahu) spôsobujú chybu od +3 % do +12 % výťažnosti, kým koncentrovanejšie roztoky rozpúšťadiel od +17 % do +130 %. Požiadavke, aby výťažnosť neprekračovala 120 % vyhovoval obsah acetonitrilu od 5 % do 10 % a metanolu do 5 % (metanol má silnejšie denaturačné vlastnosti ako acetonitril).

Testovanie krížovej reaktivity

Polyklonové protilátky majú affinitu aj voči iným hapténom, ktoré sa nepatrne líšia od pôvodného hapténu (štruktúrne blízke látky napr. triazíny, fenylmočoviny, acetanilidy alebo toxíny). Z týchto dôvodov je potrebné poznať a kvantifikovať túto bočnú reakciu, tzv. krížovú reaktivitu. Pre určenie koncentrácie krížového reaktantu, ktorá spôsobuje 50 %-nú inhibíciu, bola použitá tzv. Abrahamová metóda.. Pre hodnotenie krížovej reaktivity touto metódou, boli analyzované vodné (Milli-Q) roztoky cieľových analytov v širokom koncentračnom rozsahu. Z nameraných údajov boli zostrojené odozvové krivky pre každú látku. Pomocou regresnej analýzy priemkovej časti odozvovej krivky sa vypočítali koncentrácie zodpovedajúce IC_{50}.

Tab. 5 Hodnoty IC_{50} pre cieľové analyty
Tab. 5 Values of IC_{50} for the target analytes

Krížový reaktant	**Hodnota IC_{50} [µg.l^{-1}]**
ATRAZIN	0,25
ISOPROTURON	0,15
ALACHLOR	0,49
MCYST-LR	0,31

Tab. 6 Hodnoty IC_{50} pre krížové reaktanty
Tab. 6 Values of IC_{50} for the cross-reactants

Krížový reaktant	**Hodnota IC_{50} [µg.l^{-1}]**
PROMETRYN	0,29
SIMAZIN	1,3
DIURON	470
CHLORTOLURON	160
METOLACHLOR	34
ALACHLOR	37
MCYST-RR	0,32
MCYST-YR	0,38

Z výsledkov vyplýva, že najviac ovplyvňovanými krížovými reakciami sú anti-triazínové a anti-MCYST protilátky a najmenej ovplyvňovanými anti-isoproturónové protilátky. Veľmi blízke hodnoty krížovej reaktivity v prípade toxínových analógov nemusí znamenať nedostatok, skôr naopak výhodu. Zatiaľ žiadny legislatívny predpis zaoberajúca sa kvalitou vody z hľadiska obsahu mikrocystínov neurčuje limit pre jednotlivé analógy týchto toxínov, ale limitná hodnota je daná práve na sumárny obsah toxínov.

Stanovenie mikrocystínov a rezíduí pesticídov v reálych vzorkách

Analyzovali sme povrchové vody z povodia Dunaja a Nitry. Rôzne zdroje znečistenia privádzajú do tokov organické látky širokého spektra, čo sa týka štruktúry a chemických vlastností, ktoré môžu v rôznej miere vplývať na presnosť výsledkov získaných metódou ELISA. Pre kontrolovanie tohto javu vzorky boli súčasne analyzované aj metódou vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie (SPE-HPLC-DAD/UV). Pre stanovenie mikrocystínov sa odoberali vody z vybraných jazier, v ktorých bol počas letných mesiacov pozorovaný masový rozvoj siníc. Pred samotnou analýzou vzoriek

povrchových vôd pre jednoduchšie porovnaie použitých analytických metód boli analyzované modelové roztoky cieľových analytov. Ako matrica bola použitá voda Milli-Q. Na základe hodnôt R^2 ELISA metódu stanovenia vybraných pesticídov možno hodnotiť ako porovnávateľnú s konvenčnou analytickou technikou. Hodnoty R^2 sú blízke 1, v prípade atrazínu táto hodnota je 0,9887; pre isoproturon je 0,9832, pre alachlór je 0,914 a pre mikrocystíny je 0,9953. ELISA metóda produkuje najpresnejšie výsledky v koncentračnom rozsahu lineárnej odozvy.

Tab. 7 Výsledky analýz povrchových vôd
Tab. 7 Results of the analysis of surface water

Lokalita	ATRAZÍN [µg.l^{-1}]			ISOPROTURÓN [µg.l^{-1}]		ALACHLÓR [µg.l^{-1}]	
	ELISA	HPLC	GC	ELISA	HPLC	ELISA	HPLC
Nedožery	0,023	< 0,07	0,010	0,03	< 0,06	ND	< 0,08
ČOV Prievidza	0,084	< 0,07	0,062	0,03	< 0,06	0,087	< 0,08
Chalmová	0,078	< 0,07	0,068	0,03	< 0,06	0,107	< 0,08
Topoľčany	0,024	< 0,07	0,019	ND	< 0,06	0,055	< 0,08
Váh - Komárno	0,021	< 0,07	0,018	0,043	< 0,06	0,094	< 0,08
Hron -Kamenica	0,074	< 0,07	0,069	ND	< 0,06	ND	< 0,08
Dunaj - Sob	0,028	< 0,07	0,038	0,011	< 0,06	0,09	< 0,08
Malý Dunaj	0,021	< 0,07	0,018	ND	< 0,06	0,011	< 0,08
Ipeľ - Letkés	0,118	0,09	0,106	ND	< 0,06	ND	< 0,08

*Vysvetlivy : **NA** – neanalyzované (použitá iná technika), **ND** - nedetekovateľné*

V prípade niektorých vzoriek sa zitilo, že ELISA metóda dáva nadhodnotené výsledky, čo môže byť dôsledok krížových reakcií organických látok rôzneho charakteru resp. dôsledok denaturácie bielkovín týmito látkami. V silne zakalených vodách boli zistené výsledky podhodnotené, čo môže byť dôsledkom sorpcie analytov na povrch tuhých častíc (pred ELISA analýzou vzorky neboli filtrované – výhoda ELISA). Na potvrdenie pozitívnych nálezov atrazínu (ELISA) bola použitá tretia metóda – plynová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou. Výsledky dokazujú vhodnosť ELISA metódy pre stanovenie vybraných pesticídov aj vo veľmi znečistených vodách, keď multireziduálna HPLC technika sa stáva málo dôveryhodnou. V takýchto prípadoch na konfirmáciu pozitívnych nálezov pesticídov z ELISA analýzy treba použiť inú inštrumentálnu metódu.

Tab. 8 Výsledky stanovenia mikrocystínov v jazerách
Tab. 8 Results of the analysis of microcystins in lakes

Lokalita	HPLC výsledky [µg.l^{-1}]				ELISA [µg.l^{-1}]
	MC-LR	MC-RR	MC-YR	suma MC	
Jazero Tomky	0,12	0,15	ND	0,27	0,32
Liptovská Mara	0,18	0,03	0,11	0,32	0,37
Železná studnička	0,32	0,45	0,09	0,86	0,85
Kuchajda	0,13	0,08	ND	0,21	0,17

Validácia ELISA metódy pre stanovenie atrazínu a mikrocystínov

Validácia ELISA metódy bola vykonaná súčasne s validáciou HPLC metódy pre stanovenie atrazínu a mikrocystínov v rôznych typoch vôd. Ako cieľový analyt validácie, zo študovaných pesticídov bol vybraný atrazín kvôli jeho intenzívnemu používaniu v poľnohospodárstve a mikrocystíny ako hlavné metabolity siníc. Základom porovnávania a validácie metód bola limitná koncentrácia pesticídov pre pitné vody 0,1 µg.l^{-1} a limitná koncentrácia toxínov pre pitné vody 1,0 µg.l^{-1}. [14, 15]

Tab. 9 Požiadavky pracovných charakteristík - atrazín
Tab. 9 Requirements for methods- atrazine

Pracové charakteristiky		Požiadavky
Limit detekcie	**LOD**	0,025 μg.l^{-1}
Zhodnosť	**PRE**	0,0125 μg.l^{-1}
Presnosť	**ACC**	70 – 130 %
Správnosť	**TRU**	± 0,025 μg.l^{-1}
Rozsah	**RAN**	0,03 – 0,15 μg.l^{-1}
Linearita	**LIN**	v celom rozsahu

Tab. 10 Požiadavky pracovných charakteristík - mikrocystíny
Tab. 10 Requirements for methods- microcystins

Pracové charakteristiky		Požiadavky
Limit detekcie	**LOD**	0,25 μg.l^{-1}
Zhodnosť	**PRE**	0,13 μg.l^{-1}
Presnosť	**ACC**	65 - 135 %
Správnosť	**TRU**	± 0,25 μg.l^{-1}
Rozsah	**RAN**	0,1 – 2,5 μg.l^{-1}
Linearita	**LIN**	v celom rozsahu

Validačný proces bol uskutočnený na syntetických a prírodných vzorkách. Ako prírodná vzorka bola použitá povrchová voda z Dunaja, a pitná voda odobratá v laboratóriu. Na prípravu syntetických vzoriek bola použitá Milli-Q voda. Ďalšie syntetické vzorky boli pripravené obohatením pitnej a povrchovej vody štandardným roztokom analytov. Limit detekcie bol určený ako trojnásobok smerodajnej odchýlky z desiatich meraní vzorky s najnižšou koncentráciou analytu. Presnosť a správnosť boli hodnotené pomocou výťažnosti z obohatenia. Na kvantifikáciu zhodnosti boli použité hodnoty štandardných odchýliek vypočítané vo vnútri série.

Tab. 11 Výsledky validácie pre pitnú vodu - atrazín
Tab. 11 Result of validation for drinking water - atrazine

metóda	LOD [μg.l^{-1}]	PRE [μg.l^{-1}]	ACC [%]	TRU [μg.l^{-1}]	RAN [μg.l^{-1}]	LIN
HPLC	0,009	0,002	95 - 102	0,004	0,01 – 0,5	RAN
ELISA	0,025	0,004	93 - 105	0,005	0,03 – 1,0	RAN

Tab. 12 Výsledky validácie pre povrchovú vodu - atrazín
Tab. 12 Result of validation for surface water - atrazine

metóda	LOD [μg.l^{-1}]	PRE [μg.l^{-1}]	ACC [%]	TRU [μg.l^{-1}]	RAN [μg.l^{-1}]	LIN
HPLC	0,012	0,009	87 - 112	0,005	0,01 – 0,5	RAN
ELISA	0,026	0,013	92 - 121	0,0015	0,03 – 1,0	RAN

Tab. 13 Výsledky validácie pre pitnú vodu – mikrocystíny- HPLC
Tab. 13 Result of validation for drinking water – microcystins- HPLC

HPLC metóda						
analyt	**LOD [μg.l^{-1}]**	**PRE [μg.l^{-1}]**	**ACC [%]**	**TRU [μg.l^{-1}]**	**RAN [μg.l^{-1}]**	**LIN**
MC-LR	0,05	0,04	78 - 98	0,01	0,34 – 2,5	RAN
MC-RR	0,09	0,13	88 - 133	0,21	0,80 – 2,5	RAN
MC-YR	0,11	0,03	70 - 94	0,04	0,70 – 2,5	RAN

Tab. 14 Výsledky validácie pitnú vodu – mikrocystíny- ELISA
Tab. 14 Result of validation for drinking water – microcystins- ELISA

	ELISA metóda					
analyt	**LOD [µg.l^{-1}]**	**PRE [µg.l^{-1}]**	**ACC [%]**	**TRU [µg.l^{-1}]**	**RAN [µg.l^{-1}]**	**LIN**
MC-LR	0,07	0,03	95 - 102	0,025	0,12 – 2,0	RAN
MC-RR	0,10	0,07	92 - 120	0,055	0,15 – 2,0	RAN
MC-YR	0,08	0,05	93 - 105	0,043	0,18 – 2,0	RAN

Metódy poskytujú správne a presné výsledky v pracovnom rozsahu a sú použiteľné na kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie atrazínu a mikrocystínov v pitných a povrchových vodách.

ZÁVER

Pre kvantitatívne stanovenie rezíduí týchto cieľových analytov vo vodách boli použité mikrotitračné dostičky EnviroGard s ôsmymi radmi obsahujúcimi 12 jamiek s pevne naviazanými polyklónovými protilátkami. Analýzou štandardných roztokov v zistenej lineárnej oblasti bola zostojená kalibračná krivka. V ďalšej časti sme hodnotili matricový efekt a jeho vplyv na presnosť výsledkov. Významný matricový efekt môžu mať rôzne organické rozpúšťadlá polárneho charakteru. Z tohto dôvodu v ďalších experimentoch bol testovaný vplyv acetonitrilu a metanolu na odozvu ELISA metódy. Výsledom je, že acetonitril významne neruší stanovenie keď je prítomný vo vzorke v množstve 0 – 10% v/v, resp. metanol v množstve 0 – 5%. Významnou charakteristikou protilátok v imunoanalytických technikách sú ich krížové reaktivity, t.j. citlivosť pre rôzne organické látky, ktoré sú štrukturálne podobné cieľovým analytom. Významnú krížovú reaktivitu dosahoval iba prometryn, IC_{50} 0,29 µg.l^{-1}, kým atrazín 0,25 µg.l^{-1}, a pre všetky študované mikrocystíny boli zistené podobné hodnoty IC_{50}. Pre mikrocystínový test to znamená, že výsledky vyjadrujú sumárnu koncentráciu týchto látok, čo je výhodné z pohľadu legislatívy (limit určený pre sumu mikrocystínov). Pre možnosť porovnávania metódy ELISA s klasickou metódou, ktorou v tomto prípade je vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) boli analyzované vzorky povrchových vôd. Pre exaktnú prezentáciu študovanej ELISA metódy bola uskutočnená jej validácia súbežne s validáciou HPLC metódy. Imunochemické metódy boli vyvinuté ako rýchle, lacné a jednoduché metódy pre environmentálny monitoring, kde majú slúžiť hlavne ako skríningové metódy, na vylúčenie pozitívnych vzoriek, ktoré sa musia potvrdiť inou inštrumentálnou technikou – HPLC (GC). ELISA metóda je založená na špecifickosti biomolekúl. Vyvinuté protilátky sú špeciálne určené pre záujmové analyty.Väzba antigén-protilátka je veľmi silná a zaručuje selektivitu a citlivosť týchto metód.

Literatúra

1. Barceló, D., Hennion, M.-C. (1997): Trace determination of pesticides and their degradation products in water. Elsevier, Amsterdam.

2.Ferenčík, M. (1989): Imunochémia, Bratislava, Alfa.

3. Buc M., Ferenčík M., (1994): Imunogenetika, Bratislava, Alfa-plus,

4. Ferenčík M. (1993): Handbook of immunochemistry, London, Chapman and Hall,

5. Buc M. (1997): Klinická imunológia, Bratislava, Veda

6. Králová B., Fukal L., Rauch P., Ruml T. (2001): Bioanalytické metody,VŠCHT v Praze,

7. Knopp D. (1995): Application of immunological methods for the determination of environmental pollutants in human biomonitoring. A review. Analytica Chimica Acta, Vol. 311, 383 – 392

8. Mallat E., Gauglitz G., Barceló D. (1999): River analyzer for chlorotriazines with a direct optical immunosensor. Environ. Sci. Technol., Vol. 33, 965 – 971

9. Mallat, E., Barzen, C., Klotz, A., Brecht, A., Gauglitz, G., Barceló, D. (1999): River analyzer of chlorotriazines with a direct optical immunosensor. Environ. Sci. Technol., 33, 965-971.

10. Mallat, E., Barzen , C., Abuknesha, R., Gauglitz, G., Barceló, D. (2001): Immunosensors for pesticide determination in natural waters. Trends in analytical chemistry, Vol. 20, No. 3, 124 – 132.

11. Tschmelak J., Proll G., Slobodník J., Barceló D., Kozmenko H., Tóthová L., Krascsenits Z., Gauglitz G.: Automated Water Analyser Computer Supported System (AWACSS) - Part I: Project objectives, basic technology, immunoassay development, software design & networking. Biosensors & Bioelectronics, akceptované pre publikáciu 2004

12. Tschmelak J., Proll G., Slobodník J., Barceló D., Kozmenko H., Tóthová L., Krascsenits Z., Gauglitz G.: Part II. Intelligent, remote-controlled, cost-effective, on-line, water monitoring measurement system Biosensors & Bioelectronics, akceptované pre publikáciu 2004

13. Vestník Ministerstva pôdohospodárstva SR č. 14/2004 , Prehľad prípravkov na ochranu rastlín, mechanizačných prostriedkov na ochranu rastlín, ich výrobcov a držiteľov registrácie – 2004, www.zbierka.sk

14. Vyhláška MZ SR č.151/2004 Zb. ZÁK o požiadavkách napitnú vodu a kontrolu kvality pitnej vody, www.zbierka.sk

15. SNAS: Metodická smernica na akreditáciu, Validácia skúšobných metód MSA – L/06, Bratislava, Jún 2002

Autori

Zoltán Krascsenits
Výskumný ústav vodného hospodárstva, Národné referenčné laboratórium pre oblasť vôd na Slovensku, Nábr. L. Svoboduc 5, 812 49 Bratislava, tel.: 02/ 59 343 447, e-mail: krascsenits@vuvh.sk
Mikuláš Bartal
Výskumný ústav vodného hospodárstva, Národné referenčné laboratórium pre oblasť vôd na Slovensku, Nábr. L. Svoboduc 5, 812 49 Bratislava, tel.: 02/ 59 343 467, e-mail: baxtalmi@stonline.sk