

## 1. ÚVOD

Atrazin: 2-chloro-4-(ethylamine)-6-(isopropylamine)-s-triazine, je s-triazinový herbicid, který efektivně brzdí fotosyntézu. Používá se k hubení širokolistých a travnatých plevelů. Atrazin je jeden z nejrozšířenějších herbicidů, přičemž jeho biologický poločas v půdách je v rozmezí jednoho týdne až jednoho roku, takže je detekován v povrchových, ale i podzemních vodách.

Lidé jsou vystaveni účinkům atrazinu především pitím kontaminované vody, ale také dýcháním vzduchu v oblastech, kde byl atrazin používán ve velkém množství. Rychle se vstřebává do trávicího traktu, mohou jej rychle absorbovat plíce a také neporušená kůže. Je neurotoxický při vyšších dávkách a způsobuje poruchy motoriky, koordinace, ochrnutí údů, respirační úzkost. U lidí, kteří jsou vystaveni účinkům velkého množství atrazinu, se mohou projevit tyto symptomy: průjem, zvracení, oční nebo kožní dráždění a bolesti žaludku. Atrazin poškozují hormonální systém (endokrinní disruptor), může ovlivnit reprodukci a vývoj již při malých dávkách.

V mnoha státech je jeho použití již zakázáno (v České republice od 1. 8. 2005). Pro Českou republiku je stanovena limitní koncentrace obsahu atrazinu v pitné vodě na hodnotu 0.1 µg/l (Vyhláška Ministerstva zdravotnictví ČR č. 376/2000 Sb.) a v povrchových vodách 0.5 µg/l (Nařízení vlády č. 61/2003 Sb.).

## 2. POUŽITÍ SOUPRAVY

Tuto soupravu je možné použít pro všechny typy vzorků vod v rozsahu pH 4 – 9. Vzorky zakalené či jinak znečištěné je nutno před nadávkováním do jamek mikrotitrační destičky přefiltrovat.

## 3. PRINCIP METODY

Imunoenzymatické stanovení atrazinu je v kompetitivním uspořádání. Neznámé vzorky, kontrolní vzorky a kalibrátory se spolu s konjugátem atrazinu s křenovou peroxidázou inkubují v jamkách potažených králičí protilátkou. Atrazin ve vzorcích a atrazin v konjugátu soutěží o omezený počet vazebných míst na protilátce proti atrazinu. Po inkubaci se jamky promyjí, aby se odstranil nenavázaný konjugát, a na jamkách navázaná peroxidáza je detekována přidávkem chromogenního substrátu (tetramethylbenzidin). Intenzita vzniklého zabarvení je nepřímo úměrná koncentraci atrazinu v kalibrátorech a vzorcích.

## 4. SLOŽENÍ SOUPRAVY

Všechny reagenty v soupravě jsou stabilní do data expirace soupravy, jestliže jsou skladovány při 2 - 8 °C. Zabraňte zmraznutí.

**3.1 Deska s víčkem:** 96 jamek (12 proužků po 8 jamkách) potažených specifickou protilátkou (připraveno k použití).

**3.2 Pufr pro ředění konjugátu:** (ústojný roztok obarvený růžově) 1 lahvička s 6 ml (připraven k použití).

**3.3 Koncentrát konjugátu (40x):** 1 lahvička se 150 µl (koncentrát konjugátu atrazinu s křenovou peroxidázou v ústojném roztoku se stabilizátory)  
Před použitím se ředí růžovým pufrem pro ředění konjugátu (viz. kap. 6.1.1).

**3.4 Kalibrátory:** 6 lahviček po 1.3 ml (lahvičky obsahují atrazin s hodnotami 0, 0.03, 0.10, 0.30, 1.00 a 3.00 ng/ml obarvené žlutě).

Přesné hodnoty koncentrací jsou uvedeny na štítcích lahviček (připraveny k použití).

**3.5 Kontrolní vzorky:** 2 lahvičky po 1.3 ml obarvené žlutě (připraveny k použití).

**3.6 Koncentrát promývacího roztoku (20x):** 1 lahvička s 50 ml (koncentrát).

Koncentrovaný roztok musí být před použitím zředěn (viz.kap. 6.1.2).

**3.7 TMB substrát (tetramethylbenzidin):** 1 lahvička s 22 ml (přípraven k použití).

**3.8 Stop roztok:** 1 lahvička s 5.5 ml (přípraven k použití). 2 M kyselina chlorovodíková.

**3.9 Lahvička pro ředění konjugátu:** 1 kus.

**3.10 Návod, výstupní list kontroly kvality použitých komponent**

#### **4. POTŘEBNÝ MATERIÁL NEDODÁVANÝ V SOUPRAVĚ**

Kromě obvyklého laboratorního zařízení je pro zpracování soupravy potřebné následující vybavení:

##### **4.1 Chemikálie**

- destilovaná nebo deionizovaná voda

##### **4.2 Laboratorní přístroje a pomůcky**

- nastavitelné mikropipety 50, 200 a 1000  $\mu$ l
- nastavitelné opakovací dávkovače v rozsahu 50 – 300  $\mu$ l
- fotometr pro mikrotitrační destičky s filtrem 450 nm
- promývačka pro mikrotitrační destičky, nebo opakovací dávkovač do rozsahu 300  $\mu$ l

#### **5. UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ**

##### **5.1 Obecné zásady**

- nemíchejte reagentie z různých šarží
- před použitím nechte reagentie vytemperovat na laboratorní teplotu (18 - 25°C) po dobu nejméně 60 minut
- konjugát nesmí přijít do styku s azidem sodným, azid sodný působí jako inhibitor křenové peroxidázy
- k pipetování jednotlivých komponent se doporučuje používat otestované pipety

##### **5.2 Kyselina chlorovodíková**

Stop roztok obsahuje 2 M kyselinu chlorovodíkovou. Při styku s kůží nebo očima může dojít k podráždění. Pokud by došlo k potřísnění, opláchněte postižené místo vodou.

#### **6. POSTUP STANOVENÍ**

##### **6.1 Příprava reagentií**

###### **6.1.1 Pracovní roztok konjugátu**

Pracovní roztok konjugátu připravte zředěním koncentráту konjugátu 40x. Například 75  $\mu$ l koncentráту konjugátu se napipetuje do lahvičky na ředění konjugátu a přidají se 3 ml pufru pro ředění konjugátu (růžového). Toto množství vystačí pro polovinu desky. Pracovní roztok konjugátu zpracujte týž den.

### 6.1.2 Promývací roztok

Promývací roztok se připravuje zředěním koncentrátu 20x. Například se 25 ml koncentrátu doplní destilovanou vodou do objemu 500 ml - toto množství postačí s dostatečnou rezervou na zpracování jedné desky. Zředěný promývací roztok může být skladován při 2 - 8 °C do data expirace soupravy.

### 6.2 Stanovení

- Do rámečku vložte tolik celých stripů, kolik je jich třeba pro stanovení neznámých vzorků v duplikátech, 12 jamek je určeno pro stanovení kalibrátorů a 4 jamky pro kontrolní vzorky. Dbejte na identifikaci poloh kalibrátorů a jednotlivých vzorků na destičce.
- Do příslušných jamek pipetujte 150 µl kalibrátorů, kontrolních vzorků nebo vzorků. Poté ihned pipetujte do každé jamky 50 µl naředěného konjugátu. Pipetování celé desky by nemělo trvat déle než 20 minut.
- Rámeček zakryjte víčkem a inkubujte 2 hodiny při teplotě laboratoře (18 – 25 °C) bez třepání.
- Obsah všech jamek odsajte a 4x promyjte naředěným promývacím roztokem na promývače. V případě ručního promývání dávkujte objem 300 µl na jamku a použijte opakovací dávkovač. Jamky vyprázdněte rychlým vylitím do výlevky. Pokud v jamkách zůstane zbytek kapaliny, destičku obraťte a kapalinu odklepněte na filtrační papír.
- Do všech jamek okamžitě a bez přerušování napipetujte opakovacím dávkovačem 200 µl TMB substrátu. Pipetování celé desky by nemělo trvat déle než 2 minuty.
- Rámeček zakryjte víčkem a inkubujte (18 – 25°C) po dobu 20ti minut, bez třepání, v temnu.
- Přidejte 50 µl stop roztoku, krátce protřepejte a nejdéle do 15 minut změřte absorbanci při 450 nm. Dbejte na to, aby v měřených jamkách nebyly bubliny.

### Schéma postupu stanovení

<b>Krok 1 Pipetace</b>	<b>Krok 2 Inkubace</b>	<b>Krok 3 Promytí</b>
Do každé jamky postupně napipetujte: <ul style="list-style-type: none"><li>- 150 µl kalibrátoru, kontrolního nebo analyzovaného vzorku a</li><li>- 50 µl ředěného konjugátu.</li></ul>	Rámeček zakryjte víčkem a inkubujte 2 hod. při 18 – 25 °C bez třepání.	Odsajte a 4x promyjte naředěným promývacím roztokem na promývače nebo ručně dávkujte objem 300 µl na jamku a použijte opakovací dávkovač.

<b>Krok 4 Pipetace</b>	<b>Krok 5 Inkubace</b>	<b>Krok 6 Měření</b>
Do každé jamky postupně napipetujte 200 µl TMB substrátu.	Rámeček zakryjte víčkem a inkubujte 20 minut při 18 – 25 °C bez třepání a v temnu.	Zastavte průběh reakce přidáním 50 µl STOP roztoku a barevnou změnu změřte na fotometru při 450 nm.

## 7. VÝSLEDKY

Výsledky se získají odečtením z kalibrační křivky, která slouží pouze pro analýzu těch vzorků, které byly inkubovány společně s kalibrátory.

## 7.1 Kalibrační křivka

Výsledky uvedené v návodu byly získány v logaritmickém zobrazení. Doporučuje se použití kvadratické regrese. Jiné vyhodnocovací metody mohou poskytovat trochu odlišné výsledky.

K odečtu hodnot koncentrací neznámých vzorků nepoužívejte takovou kalibrační křivku, ve které hodnota absorbance (při 450 nm) nedosahuje pro nejvyšší kalibrátor alespoň hodnoty 0.10 a dále kalibrační křivku, kde hodnota absorbance na kalibrátoru 0 ng/ml nedosahuje hodnotu 2.00. K vyhodnocení se rovněž nedoporučuje používat ty hodnoty, jejichž variační koeficient v rámci duplikátu přesahuje 10 %.

Tabulka 1 Příklad kalibrační křivky

Kalibrátor	Atrazin [ng/ml]	Absorbance
0	0.00	3.412
1	0.03	1.990
2	0.10	1.006
3	0.30	0.498
4	1.00	0.241
5	3.00	0.130

(Pouze příklad, nepoužívejte k výpočtům)

## 8. CHARAKTERISTIKY STANOVENÍ

### 8.1 Citlivost stanovení

Analytická citlivost soupravy, stanovovaná jako koncentrace odpovídající průměrnému signálu nulového kalibrátoru zmenšenému o dvojnásobek směrodatné odchylky, je 0,01 ng/ml.

Funkční citlivost, tj. koncentrace odpovídající hodnotě variačního koeficientu (20 %) mezi stanoveními (10 analýz), je přibližně 0,04 ng/ml.

### 8.2 Správnost stanovení

#### Standardní přídavek

Do třech různých vod byl přidán atrazin na hodnoty koncentrací 0.15; 0.30 a 0.60 ng/ml.

Tabulka 2 Test standardního přídavku

Vzorek	Přídavek atrazinu [ng/ml]	Nalezený obsah [ng/ml]	[% ] přídavku
A	bez přídavku	<std	-
	0.15	0.186	124.0
	0.30	0.389	129.7
	0.60	0.832	138.7
B	bez přídavku	<std	-
	0.15	0.165	110.0
	0.30	0.352	117.3
	0.60	0.759	126.5
C	bez přídavku	<std	-
	0.15	0.176	117.3
	0.30	0.382	127.3
	0.60	0.790	131.7

### Ředění

Tři vzorky obsahující atrazin (připravené fortifikováním tří vzorků vod) byly dále ředěny nulovým standardem (viz. tabulka 3) a pak analyzovány.

**Tabulka 3** Test ředění

Vzorek	Ředění	Očekávaná koncentrace [ng/ml]	Nalezená koncentrace [ng/ml]	[%]
A	Neředěno	2.680	-	-
	1 : 1	1.170	1.340	87.3
	1 : 3	0.541	0.670	80.7
	1 : 7	0.312	0.335	93.1
	1 : 15	0.152	0.168	90.7
	1 : 31	0.079	0.084	93.9
B	Neředěno	1.580	-	-
	1 : 1	0.775	0.790	98.1
	1 : 3	0.389	0.395	98.5
	1 : 7	0.209	0.198	105.8
	1 : 15	0.088	0.099	88.7
	1 : 31	0.048	0.049	97.6
C	Neředěno	1.230	-	-
	1 : 1	0.563	0.615	91.5
	1 : 3	0.249	0.308	81.0
	1 : 7	0.136	0.154	88.5
	1 : 15	0.068	0.077	88.8
	1 : 31	0.036	0.038	94.3

### 8.3 Přesnost stanovení

#### Přesnost ve stanovení

Vzorky vody byly kontaminovány přidavkem atrazinu a analyzovány ve 25 jamkách.

**Tabulka 4** Přesnost ve stanovení

	Kontaminovaná voda č.1	Kontaminovaná voda č.2	Kontaminovaná voda č.3
N	25	25	25
Průměr [ng/ml]	0.18	0.57	0.80
C.V. [%]	5.67	4.48	4.42

#### Přesnost mezi stanoveními

Tři vzorky vody kontaminované přidavkem atrazinu byly analyzovány v deseti různých stanoveních za použití různých složek soupravy.

**Tabulka 5** Přesnost mezi stanoveními

	Kontaminovaná voda č.1	Kontaminovaná voda č.2	Kontaminovaná voda č.3
N	10	10	10
Průměr [ng/ml]	0.18	0.34	0.68
C.V. [%]	12.31	14.29	17.54

#### **8.4 Specifita**

Protilátka použitá v této ELISA soupravě může vykazovat zkříženou reaktivitu s těmito látkami přítomnými ve vzorku dohromady s atrazinem<sup>1</sup>:

propazin ze 74.1 %

desethylatrazin z 26.3 %

simazin z 5.0 %

ametryn z 1.5 %.

#### **8.5 Doporučená literatura**

1. Fránek M., Kolář V., Eremit S.A. Enzyme immunoassays for s-triazine herbicides and their application in environmental and food analysis, *Analytica Chimica Acta* 311 (1995) 349 – 356.
2. Deng A., Fránek M., Kolář V. Determination of atrazine in soil samples by ELISA using polyclonal and monoclonal antibodies, *Food and Agricultural Immunology* 11 (1999) 135 – 144.