

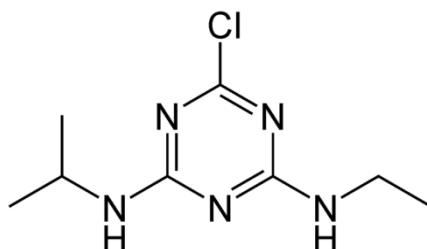
Porovnání výsledků stanovení atrazinu ve vodách metodou ELISA a separačními technikami HPLC, GC/MS.

Ing. František Štumar¹⁾, Ing. Dana Marková²⁾, Ing. Květa Tomková¹⁾, Ing. Pavla Dvorská¹⁾, Mgr. Petra Šafářová¹⁾, Mgr. Petra Šimůnková¹⁾, Doc. RNDr. Ladislav Pecen CSc.³⁾, Ing. P. Král Ph.D.⁴⁾, Ing. Petr Řezníček⁴⁾, Ing. Vlastislav Mácha⁵⁾, Ing. Jan Plicka CSc.⁶⁾

- 1) SEDIUM RD s.r.o., Pardubice
- 2) Zdravotní ústav, Hradec Králové
- 3) Ústav informatiky Akademie věd ČR, v.v.i.
- 4) Královéhradecká provozní, a.s., Hradec Králové
- 5) Vodohospodářské laboratoře, s.r.o., Pardubice
- 6) IMMUNOTECH a.s., Praha

1. Charakteristika atrazinu

Atrazin (viz obr. 1), 2-ethylamino-4-chlor-6-isopropylamino-1,3,5-triazin, molekulová hmotnost $M_r = 216$ g/mol, je s-triazinový herbicid, který efektivně inhibuje fotosyntézu. Používá se k hubení širokolistých a travnatých plevelů. Atrazin je jeden z nejrozšířenějších herbicidů, jehož biologický poločas rozpadu v půdách je v rozmezí jednoho týdne až jednoho roku, takže je dlouhodobě detekován v povrchových i podzemních vodách.



Obr. 1.: Strukturální vzorec atrazinu

Lidé jsou vystaveni účinkům atrazinu především pitím kontaminované vody. Rychle se vstřebává do trávicího traktu, rychle je absorbován plicemi a také neporušenou kůží. Při vyšších dávkách je neurotoxický a způsobuje poruchy motoriky, koordinace, ochrnutí údů, respirační úzkost. U lidí, kteří jsou vystaveni účinkům velkého množství atrazinu, se mohou projevit symptomy jako průjem, zvracení, oční nebo kožní dráždění a bolesti žaludku. Atrazin poškozuje hormonální systém (endokrinní disruptor), může ovlivnit reprodukci a vývoj plodu již při malých dávkách [1].

V mnoha státech je jeho používání již zakázáno, v České republice od 1. 8. 2005. Pro Českou republiku je stanovena limitní koncentrace obsahu pesticidů atrazinu či desethylatrazinu v pitné vodě na hodnotu 0,1 µg/l a tím, že suma všech pesticidních látek musí být do 0,5 µg/l [2] a v povrchových vodách 0,5 µg/l [3].

Stanovení atrazinu se běžně provádí chromatograficky (GC, HPLC) [1,4,5], nověji pak ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Přesnost a spolehlivost takovýchto testů jde na vrub přístrojové a časové náročnosti stanovení. Vedle toho imunoanalytické stanovení je časově a přístrojově nenáročná metoda, která při správném použití kvalitní validované soupravy poskytuje výsledky natolik přesné a spolehlivé, že lze odlišit vzorky s nízkým a zvýšeným obsahem atrazinu [1,6,7]. Vyloučením vzorků s nízkým obsahem atrazinu se celý postup zlevní a zefektivní a chromatografické analýze jsou podrobeny pouze ty s vyšším obsahem atrazinu [8,9].

2. Postup porovnání výsledků stanovení atrazinu metodami ELISA a HPLC a GC/MS

Důležitou součástí validačního procesu komerčního ELISA kitu ke stanovení atrazinu v pitných a povrchových vodách, bylo porovnání s výsledky stanovení použitím metod HPLC a GC/MS.

Ke studii byly použity anonymní vzorky pitných vod, ve kterých koncentraci atrazinu vždy paralelně stanovila jedna ze tří rutinních analytických laboratoří, se kterými byla dohodnuta spolupráce. Všechny tyto laboratoře byly akreditovány dle normy ISO 17025 a stanovení atrazinu provedly separačními technikami HPLC nebo

GC/MS. Vzorčky vod byly přebírány po vyzvání osobně nebo zaslány ihned po odběru poštou v plastových nádobkách. Stanovení atrazinu metodou ELISA bylo vždy provedeno nejpozději do 7 dnů po přijetí vzorků do laboratoře.

Stanovení atrazinu metodou ELISA bylo provedeno dle návodu komerční soupravy Atrazine ELISA Kit, výrobce SEDIUM RD s.r.o., Pardubice. Významnou charakteristikou této soupravy je použití králičí polyklonální protilátky, připravené ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství v Brně [6] se zkříženou reakcí na desethylatrazin.

Pipetovací a inkubační schéma stanovení:

- do každé jamky pipetováno 150 µl kalibrátoru, kontrolního nebo analyzovaného vzorku a 50 µl pracovního roztoku konjugátu atrazin-HRP,
- inkubace při 18 až 25°C po dobu 2 hodiny, bez třepání,
- reakční směs odsáta, jamky 4x promyty a obsah odsát,
- do každé jamky pipetováno 200 µl TMB substrátu,
- inkubace při 18 až 25°C po dobu 20 minut ve tmě, bez třepání,
- do každé jamky pipetováno 50 µl STOP roztoku,
- změřena absorbance při 450 nm.

K pipetování byly použity mikropipety NICHYRIO. K promývání byl použit automatický promývač mikrotitračních destiček - washer COLUMBUS SLT. K měření absorbance byl použit fotometr k měření mikrotitračních destiček ELISA SLT SUNRISE. K vyhodnocení analýzy byl použit program KIMsoft.

Statistické vyhodnocení bylo provedeno s využitím software S.A.S. verze 8.2. Podle vztahů (1) až (4) byly vypočteny vybrané statistické charakteristiky – senzitivita, specifická, pozitivní prediktivní hodnota PPV, negativní prediktivní hodnota NPV.

$$\text{Senzitivita} = \frac{TP}{TP+FN} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{Specifická} = \frac{TN}{TN+FP} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{Pozitivní PV} = \frac{TP}{TP+FP} \times 100\% \quad (3)$$

$$\text{Negativní PV} = \frac{TN}{TN+FN} \times 100\% \quad (4)$$

TP	počet správně pozitivních výsledků
TN	počet správně negativních výsledků
FP	počet falešně pozitivních výsledků
FN	počet falešně negativních výsledků

Byla zjištěna a ověřena normalita rozdělení sledovaných parametrů a provedena korelační analýza.

3. Výsledky porovnání stanovení atrazinu

Porovnání obou metod – ELISA a separační techniky, bylo pro zjednodušení založeno na předpokladu, že rutinní analytické laboratoře pracují (i s ohledem na certifikaci ISO 17025) zcela shodně, přestože reálně mezi jejich výsledky existují rozdíly.

Výsledky stanovení atrazinu jsou uvedeny v tab. 1., vybrané statistické charakteristiky jsou uvedeny v tab. 2.

Tab. 1.: Výsledky stanovení atrazinu

číslo stanovení	datum analýzy ELISA	ELISA [μg/l]	hodnocení ELISA	GC/MS, HPLC [μg/l]	hodnocení GC/MS, HPLC	laboratoř
1	19.10.2007	0,067	NEG	0,070	NEG	A
2	19.10.2007	0,017	NEG	0,209	POZ	A
3	19.10.2007	0,082	NEG	0,082	NEG	A
4	19.10.2007	0,016	NEG	0,019	NEG	A
5	12.11.2007	0,059	NEG	0,070	NEG	A
6	12.11.2007	0,107	POZ	0,130	POZ	A
7	19.10.2007	0,276	POZ	0,293	POZ	B
8	9.7.2007	0,236	POZ	0,272	POZ	B
9	29.5.2008	0,087	NEG	0,044	NEG	B
10	25.5.2007	0,095	NEG	0,053	NEG	B
11	9.4.2008	0,222	POZ	0,107	POZ	B
12	9.4.2008	0,250	POZ	0,177	POZ	B
13	9.4.2008	0,083	NEG	0,056	NEG	B
14	9.4.2008	0,082	NEG	0,056	NEG	B
15	9.4.2008	0,105	POZ	0,041	NEG	B
16	9.4.2008	0,131	POZ	0,041	NEG	B
17	9.4.2008	0,533	POZ	0,665	POZ	B
18	9.4.2008	0,148	POZ	0,080	NEG	B
19	9.4.2008	0,250	POZ	0,103	POZ	B
20	21.10.2008	0,105	POZ	0,118	POZ	B
21	21.10.2008	0,189	POZ	0,185	POZ	B
22	21.10.2008	0,039	NEG	0,086	NEG	B
23	21.10.2008	<0,030	NEG	<0,025	NEG	B
24	7.11.2008	0,098	NEG	0,149	POZ	B
25	7.11.2008	0,226	POZ	0,319	POZ	B
26	7.11.2008	0,192	POZ	0,290	POZ	B
27	23.12.2008	0,030	NEG	0,046	NEG	B
28	23.12.2008	0,050	NEG	0,074	NEG	B
29	4.2.2008	0,031	NEG	0,030	NEG	C

číslo stanovení	datum analýzy ELISA	ELISA [μg/l]	hodnocení ELISA	GC/MS, HPLC [μg/l]	hodnocení GC/MS, HPLC	laboratoř
30	4.2.2008	0,081	NEG	0,080	NEG	C
31	3.3.2008	0,034	NEG	0,040	NEG	C
32	3.3.2008	0,095	NEG	0,110	POZ	C
33	7.4.2008	0,082	NEG	0,110	POZ	C
34	7.4.2008	0,025	NEG	0,020	NEG	C
35	5.5.2008	0,037	NEG	0,030	NEG	C
36	5.5.2008	0,086	NEG	0,100	POZ	C
37	2.6.2008	0,036	NEG	0,040	NEG	C
38	2.6.2008	0,207	POZ	0,230	POZ	C
39	11.8.2008	0,039	NEG	0,040	NEG	C
40	11.8.2008	0,094	NEG	0,080	NEG	C
41	1.9.2008	0,089	NEG	0,080	NEG	C
42	1.9.2008	0,048	NEG	0,030	NEG	C
43	8.10.2008	0,094	NEG	0,080	NEG	C
44	8.10.2008	0,036	NEG	0,040	NEG	C
45	7.11.2008	0,079	NEG	0,080	NEG	C
46	7.11.2008	0,038	NEG	0,030	NEG	C
47	2.12.2008	0,093	NEG	0,130	POZ	C
48	2.12.2008	0,041	NEG	0,080	NEG	C
49	17.12.2008	<0,030	NEG	0,017	NEG	C
50	17.12.2008	<0,030	NEG	<0,005	NEG	C
51	17.12.2008	<0,030	NEG	<0,005	NEG	C
52	17.12.2008	<0,030	NEG	<0,005	NEG	C
53	17.12.2008	0,294	POZ	0,423	POZ	C
54	17.12.2008	<0,030	NEG	<0,005	NEG	C
55	17.12.2008	0,715	POZ	1,100	POZ	C
56	17.12.2008	1,860	POZ	2,460	POZ	C
57	17.12.2008	0,620	POZ	0,846	POZ	C
58	17.12.2008	<0,030	NEG	<0,005	NEG	C
59	17.12.2008	<0,030	NEG	<0,005	NEG	C
60	17.12.2008	0,066	NEG	0,133	POZ	C
61	17.12.2008	<0,030	NEG	0,017	NEG	C
62	14.7.2008	0,850	POZ	0,987	POZ	C
63	14.7.2008	0,080	NEG	0,081	NEG	C
64	14.7.2008	0,130	POZ	0,108	POZ	C
65	7.11.2008	0,543	POZ	0,568	POZ	C
66	7.11.2008	0,077	NEG	0,067	NEG	C
67	7.11.2008	0,111	POZ	0,103	POZ	C

Tab. 2.: Vybrané statistické charakteristiky

počet správně pozitivních výsledků	20
počet správně negativních výsledků	37
počet falešně pozitivních výsledků	3
počet falešně negativních výsledků	7
specificita [%]	92,5
senzitivita [%]	74,1
pozitivní prediktivní hodnota [%]	87,0
negativní prediktivní hodnota [%]	84,1
účinnost [%]	85,1

Jako srovnávací byly pro výpočet vybraných statistických charakteristik použity výsledky a hodnocení stanovení metodami HPLC a GC/MS. Uvedené analýzy byly provedeny v rutinních laboratořích, k účelům této práce zde v tab. 1. označených písmeny A, B a C. Fisherův exaktní test byl použit pro zhodnocení míry závislosti hodnocení výsledků mezi metodami ELISA a HPLC, GC/MS a prokázal závislost s vysokou statistickou významností ($p < 0,0001$).

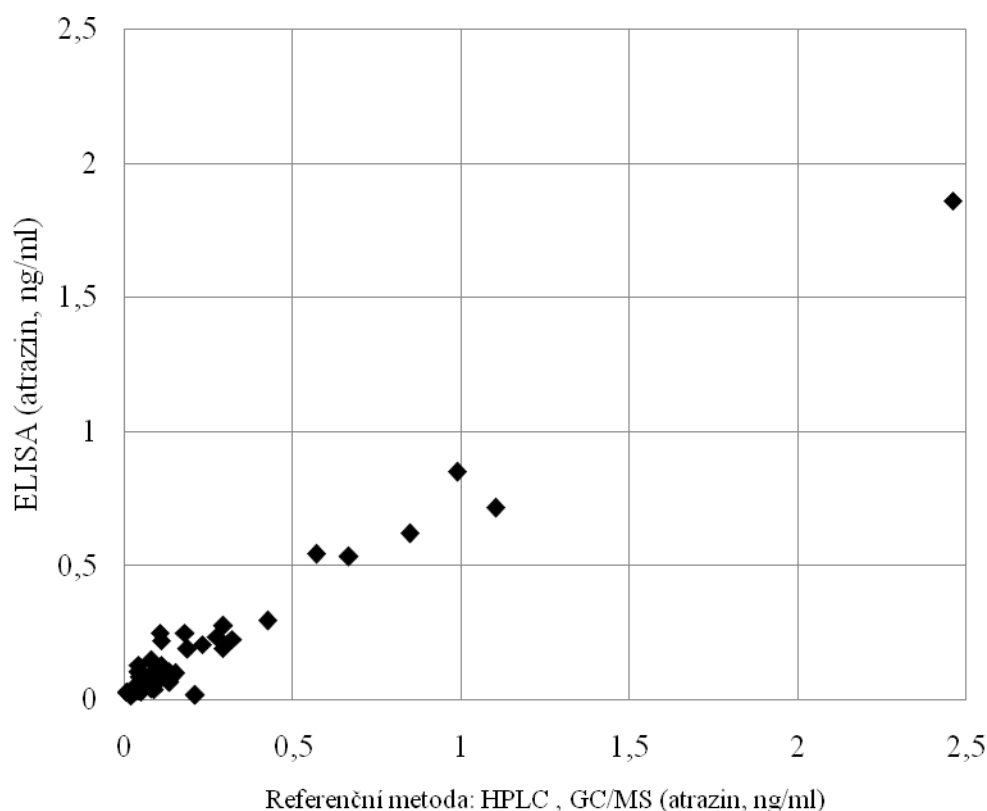
Z hodnocení numerických výsledků byly vyloučeny výsledky stanovení reprezentované pouze horním limitem ($< 0,030$ pro ELISA; $< 0,005$ pro HPLC a GC/MS). Byla ověřena normalita sledovaných parametrů, seznam testů s výsledky p-hodnot je uveden v tab. 3.

Tab. 3.: Provedené testy normality

Shapiro - Wilk	$p < 0,0001$
Kolmogorov - Smirnov	$p < 0,0100$
Cramer - von Mises	$p < 0,0050$
Anderson - Darling	$p < 0,0050$

Pro účely statistického testování byl použit neparametrický Wilcoxonův test, na jehož základě jsme zamítli hypotézu o nulovém rozdílu mezi výsledky porovnávaných metod (Wilcoxon $p = 0,0963$). Navíc medián difference mezi výsledky činil pouze $0,0035$ ng/ml, což se vzhledem pro plánovaný účel využití metody ELISA nezdá být významné.

Rozdělení sledovaných parametrů není gaussovské, nebyla proto provedena regresní, ale korelační analýza. Vzhledem k rozdělení parametrů byl vypočten Spearmanův korelační koeficient $r_s = 0,783$, který se ukázal jako vysoce významný ($p < 0,0001$). Výsledky jsou znázorněny na obr. 2.



Obr. 2.: Porovnání výsledků stanovení atrazinu

4) Pohled na problematiku stanovení z hlediska provozovatele vodovodu

I přesto, že užití pesticidních látek je v ČR již několik let zakázáno, je díky řadě historických ekologických zátěží problematika jejich výskytu v pitných vodách stále jedním z nejvýznamnějších problémů provozovatelů zdrojů pitných vod a vodovodů. V souvislosti s tím stále roste důraz na spolehlivé a dostupné analytické stanovení těchto látek.

Z pohledu provozovatele je třeba mít k dispozici na jedné straně velmi přesná a instrumentálně složitá stanovení (GC + MS apod.), která jsou nezastupitelná při kontrole kvality dodávané pitné vody u spotřebitele. V souvislosti s provozní kontrolou úrovně kontaminace v některých zdrojích nebo případně s kontrolou provozu úpraven vod pro odstranění pesticidních látek je však vhodné mít také k dispozici stanovení rychlejší, méně složitá a v neposlední řadě méně nákladné. V této souvislosti považujeme metodu ELISA za velmi vhodný nástroj, který má velkou perspektivu mít velké využití v provozní oblasti. Podmínkou pro toto využití je však z našeho hlediska doplnění této metody o možnost stejného stanovení desethylatrazinu.

5) Závěr

Byla zjištěna významná korelace mezi výsledky stanovení atrazinu ve vzorcích pitných vod metodou ELISA a separačními technikami HPLC a GC/MS. Rovněž výsledky senzitivity, specifity a prediktivních hodnot lze hodnotit jako velmi příznivé. To podporuje oprávněnost použití testované ELISA soupravy ke screeningovým měřením obsahu atrazinu v pitných vodách. Při studii se potvrdila jednoduchost provedení analýzy metodou ELISA, její časová, přístrojová a ekonomická nenáročnost. Vzorky před touto analýzou nebyly nijak upravovány, atrazin byl stanoven přímo bez nutnosti extrakce. K analýze bylo třeba jen velmi malé množství vzorku. Vzorky pitných vod byly k analýze zaslány i poštou.

Použití metody ELISA ke stanovení atrazinu v pitných a povrchových vodách není u nás obvyklé. Těto metody používají pouze výzkumné instituce, rutinně využívána není. Z hlediska provozovatelů vodovodů a laboratoří se však jeví jako nový a velmi zajímavý analytický nástroj, který má velký potenciál nejen jako screeningové kvalitativní stanovení.

Cílem tohoto příspěvku je informovat co největší část odborné veřejnosti o přednostech tohoto postupu a přispět tak k jeho širšímu praktickému využití jako je tomu v zahraničí [1,6,7].

Ve sběru vzorků, stanovení atrazinu a statistickém vyhodnocování pokračujeme. Na výsledky dosavadního statistického hodnocení pohlížíme realisticky, považujeme je však za povzbudivé.

Literatura:

1. Graziano N. a spol.: 2004 National Atrazine Occurrence Monitoring Program using the Abraxis ELISA method, Environ. Sci. Technol., 40, 1163-1171, 2006
2. Vyhláška č.252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody.
3. Nařízení vlády ČR č. 61/2003 Sb. v novele č. 229/2007 Sb., Praha 2007.
4. Deng A. a spol.: Determination of Atrazine in Soil Samples by ELISA using polyclonal and monoclonal Antibodies, Food and Agric. Immunology, 11, 135-144, 1999
5. Mrazíková M. a spol.: Porovnání metod pro stanovení vybraných pesticidních látek (triazinových herbicidů) ve vodách, sborník 1. konference HYDROANALYTIKA 2005, ISBN 80-239-5479-2, Hradec Králové, 20.-21.9.2005
6. Fránek M. a spol.: Enzyme immunoassay for s-triazine herbicides and their application in environmental and food analysis, Analytica Chimica Acta, 311, 349-356, 1995
7. Sanchez-Camazano M. a spol.: Atrazine and alachlor inputs to surface and ground waters in irrigated corn cultivation areas of Castilla-Leon region, Spain, Environ. Monit. Assess., 105, 11-24, 2005
8. Brena B.M. a spol.: ELISA as an affordable methodology for monitoring groundwater contamination by pesticides in low-income countries, Environ. Sci. Technol., 39, 3896-3903, 2005
9. Close M.E., Rosen M.A.: 1998/99 national survey of pesticides in groundwater using GC/MS and ELISA, New Zealand Journal of Marine Freshwater Research, 35, 205-219, 2001