

Иммунохимические методы анализа гербицидов группы *сим*-1,3,5-триазинов

С.А.Еремин, Ж.В.Самсонова, А.М.Егоров

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова,
Химический факультет
119899 Москва, Воробьевы горы, факс (095) 939–2742

В обзоре рассматриваются опубликованные за последние 10 лет работы, посвященные разработке иммунохимических методов анализа гербицидов группы *сим*-1,3,5-триазинов. Обсуждены вопросы, касающиеся оптимизации методов иммуноферментного анализа и их применения для определения *сим*-1,3,5-триазинов в различных объектах (вода, почва, продукты питания и др.).

Библиография — 75 ссылок.

Оглавление

I. Введение	638
II. Основные компоненты иммунохимических методов анализа	639
III. Твердофазный иммуноферментный анализ с использованием поликлональных антисывороток	643
IV. Твердофазный иммуноферментный анализ с использованием моноклональных антител	645
V. Количественное определение нескольких гербицидов в одной пробе	647
VI. Альтернативные методы иммуноанализа	648

I. Введение

Загрязнение окружающей среды вследствие хозяйственной деятельности человека давно стало одной из глобальных проблем современности. Важным аспектом этой проблемы является повсеместное применение пестицидов в практике сельского хозяйства. С одной стороны химическая защита растений — наиболее радикальный способ борьбы с вредителями, болезнями и сорняками, но с другой стороны — нерациональное применение пестицидов может приводить к накоплению их в объектах окружающей среды и вызывать нарушение связей в экосистемах. Так, например, в странах-членах ЕС установлены жесткие нормативы по содержанию пестицидов в питьевой воде: не более $0.1 \text{ нг} \cdot \text{мл}^{-1}$ для одного пестицида и $0.5 \text{ нг} \cdot \text{мл}^{-1}$ для всех пестицидов.¹ Вот почему важно иметь аналитические методы, позволяющие быстро и точно определять остаточные количества пестицидов в почве, воде и продуктах питания. Именно экологические проблемы являются стимулом для дальнейшего развития и совершенствования методов анализа физиологически активных веществ. В обзоре рассматриваются опубликованные за последние 10 лет работы, посвященные иммунохимическим методам (ИХМ) анализа гербицидов группы *сим*-1,3,5-триазинов в объектах окружающей среды.

С.А.Еремин. Кандидат химических наук, старший научный сотрудник кафедры химической энзимологии Химического факультета МГУ. Телефон 939–3407.

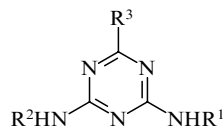
Ж.В.Самсонова. Инженер той же кафедры.

А.М.Егоров. Доктор биологических наук, профессор, заведующий той же кафедрой.

Круг научных интересов авторов: биотехнология, иммунохимические методы анализа, охрана окружающей среды.

Дата поступления 28 апреля 1994 г.

Гербициды группы *сим*-1,3,5-триазинов, применяемые в сельском хозяйстве для уничтожения сорной растительности, являются крупнейшей группой гербицидов по масштабам мирового производства и потребления.²



Основные представители этой группы приведены в табл. 1. В России главным образом применяются симазин, атразин и прометрин.³ В нашей стране приняты следующие предельно допустимые концентрации (ПДК) в водоемах санитарно-бытового назначения: атразин — 0.5, прометрин — $3.0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, а остаточное количество симазина не допускается. Традиционно для анализа остаточных количеств гербицидов, в том числе и *сим*-1,3,5-триазинов в воздухе, воде, почве, продуктах питания применяют физико-химические методы анализа (ФХМ), а именно тонкослойную (ТСХ), газовую (ГХ), газожидкостную (ГЖХ) и высокоэффективную жидкостную хроматографии (ВЭЖХ).^{4–7} Эти методы незаменимы для случаев, когда нужно строго идентифицировать искомое вещество, но они имеют ряд существенных недостатков. К ним следует отнести трудоемкость, сложную подготовку образца, длительное проведение анализа, высокие требования к квалификации персонала и дороговизну применяемого оборудования. Техническая оснащенность ФХМ постоянно совершенствуется, что увеличивает их чувствительность, точность и в то же время стоимость соответствующего оборудования. Поэтому приходится признать, что ФХМ совершенно непригодны для массового анализа и оперативного контроля. Стремление создать более эффективные методы анализа воздуха, почвы, пищевых продуктов на содержание остаточных количеств пестицидов и снизить стоимость их определения привело к разработке ИХМ.

Таблица 1. Структура гербицидов группы *сим*-1,3,5-триазинов, их метаболитов и аналогов

Название	R ¹	R ²	R ³
Атразин	Et	<i>i</i> -Pr	Cl
Симазин	Et	Et	Cl
Пропазин	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr	Cl
Тербутилазин	Et	<i>t</i> -Bu	Cl
Цианазин	Et	C(CN)Me ₂	Cl
Аметрин	Et	<i>i</i> -Pr	SMe
Прометрин	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr	SMe
Тербутрин	Et	<i>t</i> -Bu	SMe
Азипротрин	N ₃	<i>t</i> -Bu	SMe
Атразин-меркаптурат	Et	<i>i</i> -Pr	$\begin{array}{c} \text{NHCOMe} \\ \\ \text{SCH}_2\text{CHCOOH} \end{array}$
Гидроксиатразин	Et	<i>i</i> -Pr	OH
Гидроксисимазин	Et	Et	OH
Дезэтилатразин	H	<i>i</i> -Pr	Cl
Дезизопропилатразин	Et	H	Cl

Возможность применения ИХМ для анализа пестицидов в воде, почве и продуктах питания подробно обоснована в ряде обзоров.^{8–15} К преимуществам ИХМ относят: специфичность, чувствительность, точность, простоту проведения, быстроту, возможность автоматизации и использования для массовых анализов в полевых условиях, легкую подготовку образца (если она требуется), исключающую деградацию вещества. Иммунохимические методы также характеризуются относительной дешевизной определения; например, одно определение гербицида дифлубензурана методом иммуноферментного анализа (ИФА) стоит в 20 раз дешевле определения методом ВЭЖХ и в 55 раз дешевле — ГХ.¹⁶ Среди недостатков ИХМ называют: требования к квалификации персонала и возможность антител реагировать с родственными по структуре веществами, что в ряде случаев делает проблематичным строгое количественное определение аналита. В настоящее время ИХМ широко вошли в аналитическую практику и используются в различных областях медицины, сельского хозяйства, микробиологической и пищевой промышленности и в целях мониторинга окружающей среды.

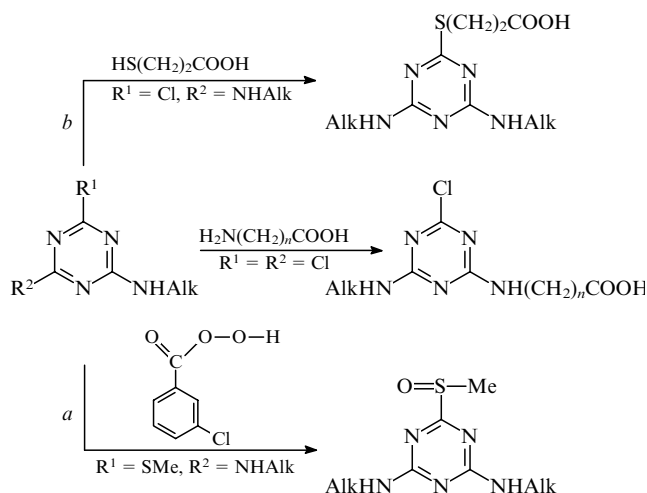
II. Основные компоненты иммунохимических методов анализа

Иммунохимические методы анализа основаны на специфическом связывании определяемого соединения с соответствующими антителами. Индикация образовавшегося комплекса осуществляется введением в один из исходных компонентов реакционной системы метки (ферментной, флуоресцентной и др.). Если один из компонентов этой системы химически (ковалентно) или сорбционно соединяют с твердофазным носителем, чтобы отделить специфический комплекс от компонентов реакционной смеси, то методы называют гетерогенными. В противном случае, если нет необходимости проводить разделение компонентов иммунохимической реакции, эти методы называют гомогенными. За последние годы появилось много работ, посвященных разработке и различным аспектам оптимизации ИХМ анализа гербицидов группы *сим*-1,3,5-триазинов в объектах окружающей среды и пищевых продуктах. Подавляющее большинство работ посвящено методам твердофазного

иммуноферментного анализа — ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Для проведения ELISA необходимы специфические антитела, конъюгат определяемого вещества с белком или ферментом и твердая фаза, на которой будет адсорбирован один из компонентов иммунохимического комплекса.

Основными компонентами любого ИХМ являются специфические антитела — поли- или моноклональные. *сим*-1,3,5-Триазины, как и все пестициды, являются гаптенами, т.е. они не способны вызывать продуцирование антител при введении в организм, и поэтому для получения антител их конъюгируют с белками. В молекуле *сим*-1,3,5-триазина нет подходящих реакционных групп для связывания с высокомолекулярным носителем (белком или ферментом), следовательно, исследователям приходится прибегать к модификации гербицида. Вопросы выбора правильной структуры гаптена при синтезе иммуногенов пестицидов для успешного получения антител подробно описаны в работе¹⁶. Рассмотрим пути модификации *сим*-1,3,5-триазинов. Обычно карбоксильную группу вводят в *N*-алкильную боковую цепь или по второму положению триазинового кольца (схема).

Схема



2,4-Дихлорпроизводные *сим*-1,3,5-триазинов конъюгируют с неразветвленными аминокислотами с терминальной аминогруппой (причем 2,4-дихлорпроизводные могут сразу использоваться для конъюгирования).^{17–19} 2-Метилтио-*сим*-1,3,5-триазины модифицируют, окисляя их до сульфоксидов 3-хлорпербензойной кислотой (путь *a*).^{18, 20–22} а 2-хлор-*сим*-1,3,5-триазины конъюгируют с 3-тиопропионовой кислотой (путь *b*). Последний метод модификации объясняется тем, что атом серы наиболее подходит для имитации атома хлора, так как он содержит две неподеленные пары электронов, как и хлор; резонансное взаимодействие между атомом серы и триазиновым кольцом ограничено; атомные радиусы серы и хлора близки; протоны не присоединяются к сере как к кислороду или азоту; нуклеофильность тиолат-аниона облегчает замещение хлора; наконец все реагенты доступны для синтеза.¹⁷

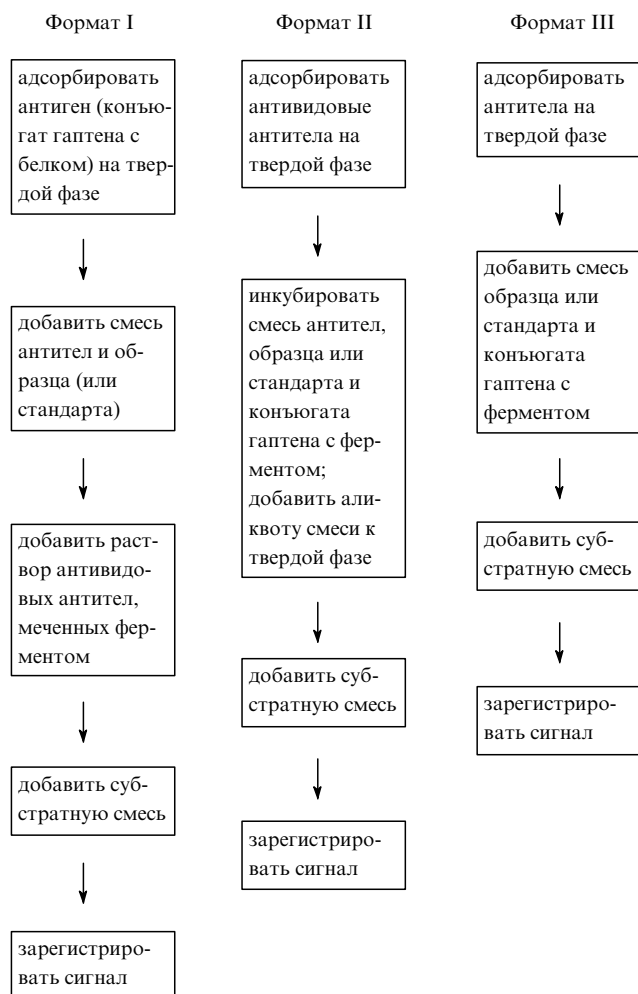
В табл. 2 приведена структура модифицированных *сим*-1,3,5-триазинов, которые после конъюгирования с белками были использованы для получения поликлональных антисывороток и моноклональных антител. Как видно из табл. 2, поликлональные антисыворотки и моноклональные антитела показывают значительные проценты перекрестного реагирования для структуроподобных гербицидов. Кроме того, можно отметить следующие закономерности: для антител, полученных против производного симазина (гаптен **2**) наблюдается значительный процент перекрестного реагирования с атразином; для антител, полученных против про-

Таблица 2. Структура модифицированных *сим*-1,3,5-триазинов, методы конъюгирования производных с карбоксильной группой и характеристика специфичности полученных моноклональных антител и поликлональных антисывороток

Соединение	R ¹	R ²	R ³	Метод конъюгирования с белком	Анти-тела	Гербицид	Процент перекрестного реагирования, %	Ссылки
1	<i>i</i> -Pr	Cl	Cl	—	мАт	Азипротрин	100	18
					мАт	Пропазин	70	
						Тербутилазин	100	19
						Атразин	7	
2	Et	(CH ₂) _{<i>n</i>} COOH <i>n</i> = 1 ÷ 5	Cl	АЭ	пАт	Симазин	100	17, 23
						Пропазин	180	
						Атразин	250	
						Гаптен 2	1830	
				КД (ЦМК)	мАт	Атразин	100	39
						Пропазин	136	
						Цианазин	28	
3	<i>i</i> -Pr	(CH ₂) _{<i>n</i>} COOH <i>n</i> = 1 ÷ 5	Cl	АЭ	пАт	Атразин	100	17, 23
						Гаптен 3	700	
						Пропазин	260	
						Симазин	12	
				АЭ	мАт	—	—	24
						СА	пАт	Атразин
						Пропазин	87	
						Симазин	10	
				АЭ	пАт	Атразин	100	42
						Пропазин	90	
				КД (ЦМК, ДЦК)	пАт	Атразин	100	47
						Пропазин	195	
						Симазин	20	
						Атразин	100	68
						Пропазин	116	
						Прометрин	10	
						—	—	75
4	Et	(CH ₂) ₂ COOH	ОН	АЭ	пАт	Гидроксисимазин	100	25
						Гаптен 3	96	
						Гидроксиатразин	38	
5	<i>i</i> -Pr	(CH ₂) ₅ COOH	ОН	АЭ	мАт	Гидроксиатразин	100	42
						Гидроксипропазин	100, 83 ^a	
6	H	(CH ₂) ₅ COOH	Cl	КД (ЦМК)	пАт	Дезилатразин	100	40
						Деизопропилатразин	100	
7	<i>i</i> -Pr	Et	SOMe	—	мАт	Тербутрин	100	18
						Тербутилазин	64	
						Прометрин	100	18
						Аметрин	25	
						Атразин	100	22
						Аметрин	106	
						Пропазин	57	
8	Et	<i>t</i> -Bu	SOMe	—	пАт	Тербутрин	100	21
						Гидрокситербутрин	78	
						Тербутилазин	64	
9	<i>i</i> -Pr	Et	S(CH ₂) ₂ COOH	АЭ	пАт	Аметрин	100	17, 23
						Гаптен 9	200, 670 ^a	
				АЭ	мАт	—	—	24
						АЭ	пАт	—
10	Et	Et	S(CH ₂) ₂ COOH	АЭ	пАт	Симетрин	100	17, 23
						Гаптен 10	1050, 157 ^a	
11	<i>i</i> -Pr	C(CN)Me ₂	S(CH ₂) ₂ COOH	СА	пАт	Цианазин	100	29
						Тербутилазин	3	
12	(CH ₂) ₃ COOH	C(CN)Me ₂	Cl	—	пАт	—	—	48, 49

Примечание. Принятые обозначения: пАт — поликлональные антисыворотки, мАт — моноклональные антитела, ДЦК — дициклогексил-карбодиимид, ЦМК — 1-циклогексил-3-(2-*N'*-метилморфолиноэтил)карбодиимид-*n*-толуолсульфонат; АЭ — метод активированных эфиров, КД — карбодиимидный метод, СА — метод смешанных ангидридов.

^a Приведены значения для разных антител или значения, полученные различными методами определения специфичности.



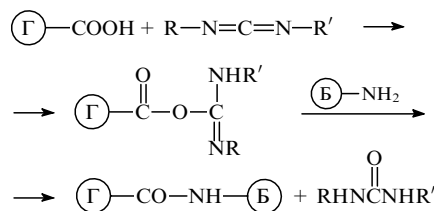
Форматы ELISA, используемые для анализа гаптен. После проведения инкубации на каждой стадии осуществляется отмывка непрореагировавших компонентов промывочным буфером, содержащим Твин-20. Модификации формата III: IIIa — на первой стадии на твердой фазе адсорбировать антивидовые антитела; IIIб — на первой стадии на твердой фазе адсорбировать белок А

изводного атразина (гаптен **3**) — значительный процент перекрестного реагирования с пропазином. Антитела, полученные на конъюгаты *сим*-1,3,5-триазинов с 3-тиопропионовой кислотой (гаптены **9** и **10**) узнают и 2-метилтиосодержащие гербициды (например, аметрин, прометрин). В некоторых случаях специфичность полученных антител была неожиданной.^{18, 19} Для синтеза конъюгатов с ферментом и белком и использования в анализе могут применяться как гомологичные, так и гетерологичные гаптены. Напомним, что если для получения иммуногена и конъюгата используется один гаптен и способ его присоединения к высокомолекулярному носителю одинаков, то такая система называется гомологичной. Если же гаптены различны для обоих случаев, то система является гетерологичной. При этом структура гаптена, который применяют для конъюгирования с высокомолекулярными носителями может оказывать значительное влияние на чувствительность анализа. Как будет показано ниже, гетерологичные системы являются более чувствительными по сравнению с гомологичными.^{17, 23–26}

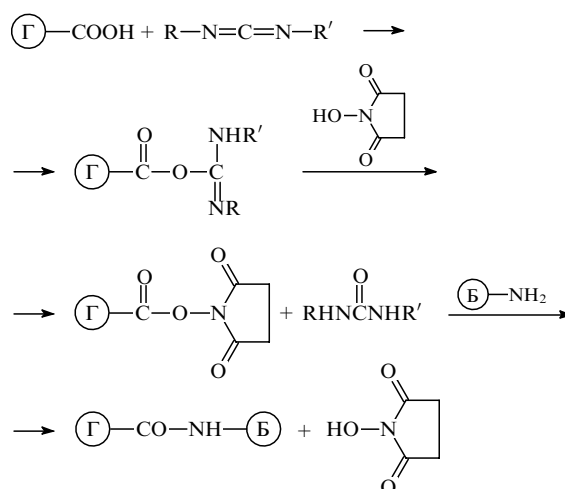
Конъюгирование модифицированного карбоксилсодержащего *сим*-1,3,5-триазина с аминокислотами белка или фермента с образованием пептидной связи проводят традиционными методами, применяемыми в белковой химии. Среди

них назовем карбодимидный метод, метод активированных эфиров (используется *N*-гидроксисукцинимидный эфир)²⁷ и метод смешанных ангидридов с использованием изобутилхлорформата.^{28, 29}

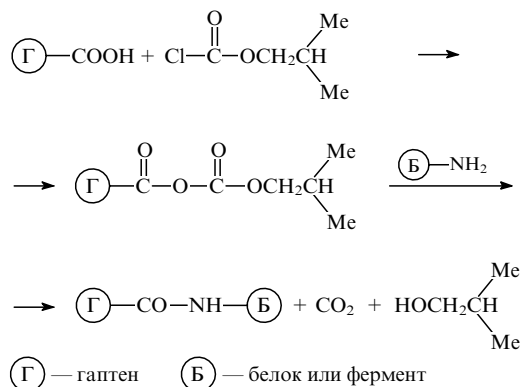
Карбодимидный метод



Метод активированных эфиров



Метод смешанных ангидридов



В большинстве исследований по разработке методов ELISA *сим*-1,3,5-триазинов в качестве твердой фазы используют 96-луночные полистироловые планшеты. Ряд авторов сообщает также о применении полистироловых пробирок,^{30–37} сфер^{20–22} и магнитных частиц.^{29, 38} Способы проведения конкурентного ELISA (форматы) также различны (рисунок). Формат I обычно используется для скрининга получаемых антител и отличается большим количеством стадий. Одной из модификаций формата III является предварительная адсорбция на твердой фазе антивидовых антител или белка А. Отмечается, что форматы II и III выгодно отличаются от формата I более высокой чувствительностью и требуют меньше времени на проведение анализа,^{24–26, 39} однако они более чувствительны к влиянию матрикса и растворителей.²⁴ Работы по сравнительной оценке различных форматов ELISA, будут рассмотрены ниже более подробно.

Таблица 3. Характеристика ELISA *сим*-1,3,5-триазинов

Анализируемое вещество	Предел обнаружения, $\text{нг} \cdot \text{мл}^{-1}$	Анализируемые объекты	Формат ELISA ^a	Твердая фаза	Антитела	Ссылки
Атразин	0.01	Вода	III	Планшет	пАт	20, 22
	0.1	»	III	Сферы	пАт	20, 22
	0.05	Вода, почва	I, II, IIIa	Планшет	мАт	24
	0.5–10	Вода, почва,	III	Пробирки	пАт	30, 31
		пищевые продукты			пАт	36, 37
	0.2–6.4	Молоко	III	»	пАт	32
	20–1000	Почва	III	»	пАт	33, 34
	0.05	Вода		Магнитные частицы		38
	0.03	Вода, почва	II, III, IIIa, IIIb	Планшет	мАт	39
	0.05	»	I	»	мАт	42
	1–10	Вода, почва, водные растения	I	»	пАт	43
	1 ^b	Почва	III	»	пАт	52
		Вода	II, IIIa	»	мАт	55
	0.03–1	»	IIIa	»	мАт	58
	0.01–10	»	I	»	пАт	75
Деизопропил-атразин	0.01	»	III	»	пАт	40
Деэтилатразин	0.01	»	III	»	пАт	40
	2 ^b	Почва	III	»	пАт	52
Гидроксидатразин	0.1	Вода, почва, навоз, грибковые микроорганизмы	I, II, IIIa	»	пАт	25
	0.1 ^c	Вода, почва	I	»	мАт	42
Гидроксисимазин	0.1 ^c	Вода, почва, навоз, грибковые микроорганизмы	I, II, IIIa	»	пАт	25
		Почва	II, IIIa	»	мАт	55
	0.5	Моча	IIIa	»	мАт	57
Симазин		Вода, почва	I, II, IIIa	»	мАт	24
		Почва	II, IIIa	»	мАт	55
Цианазин	0.035	Вода	III	Магнитные частицы	пАт	29
	3.5	Почва	III	»	пАт	29
	0.5	Вода	I	Планшет	пАт	48, 49
	10	Почва	I	»	пАт	48, 49
Тербутрин	25–1500	Вода	III	»	пАт	21
	0.1–600	»	III	Сферы	пАт	21
Атразин, симазин, цианазин	1 ^c	»	I, II, IIIa	Планшет	мАт	26

^a Выделены форматы, используемые для анализа.^b Предел обнаружения приведен в $\text{мкг} \cdot \text{кг}^{-1}$.^c Предел обнаружения приведен в $\text{мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$.

Обзор опубликованной литературы показывает, что методом ELISA *сим*-1,3,5-триазины обычно анализируют в воде и почве, хотя есть сообщения и о других объектах исследования (табл. 3, 4). Воду для анализа используют без предварительной подготовки, так как ее матрикс, как правило, не влияет на результаты анализа. Данные, полученные методами ELISA и ГХ,^{24, 29, 39–41} ВЭЖХ,^{26, 30, 36, 37, 42–44} ГХ/МС³⁵ (МС — масс-спектрометрия) хорошо коррелируют

между собой, при этом метод ELISA не показывает ложных отрицательных результатов. Сообщается о корреляции результатов с ВЭЖХ при анализе жидких пищевых продуктов.³¹ Гербициды из почвы, твердых пищевых продуктов и других объектов экстрагируют органическими растворителями или водой. Результаты измерений также хорошо коррелируют с ФХМ (табл. 4).

Таблица 4. Экстрагенты и процедура подготовки образца для анализа *сим*-1,3,5-триазинов методом ELISA

Анализируемый объект	Экстрагент и процедура подготовки образца ^a	ФХМ для корреляции	Ссылка	Анализируемый объект	Экстрагент и процедура подготовки образца ^a	ФХМ для корреляции	Ссылка
Почва	Вода, водный метанол, развести буфером	ГХ	23	Почва	Вода, развести в 10 раз	—	52
	Этилацетат; ацетонитрил : вода (9 : 1), выпарить, реконструировать буфером	ГЖХ	24		Этилацетат, выпарить, развести буфером	КХ	55
	Ацетонитрил, выпарить досуха, реконструировать буфером	—	25		Вода : метанол (3 : 2), развести буфером	ГХ	56
	Метанол : вода (3 : 1), развести буфером в 50 раз	—	29	Навоз	Метанол : этилацетат (1 : 1), выпарить, реконструировать буфером	—	25
	Ацетонитрил : вода (9 : 1), выпарить досуха, реконструировать буфером	ВЭЖХ	30	Грибковые микроорганизмы	Метанол : вода (1 : 10)	—	25
	Вода; метанол; вода : метанол (3 : 2); ацетонитрил, развести буфером	ГХ	34	Твердые пищевые продукты (кукуруза, ананас)	Ацетонитрил : вода (9 : 1), выпарить досуха, реконструировать буфером	ВЭЖХ	31
	Метанол : вода (4 : 1), развести буфером в 40 раз	ГЖХ, ВЭЖХ	42	Водные растения	Органические раст-ворители, развести буфером до 1%	ВЭЖХ	43
	Вода, электроультра-фильтрация	ГХ	43	Моча	Хлороформ, выпарить досуха, реконструировать буфером	—	57
	Метанол : вода (4 : 1), 0.5 N ацетат аммония, ацетонитрил : вода (9 : 1), органические экстракты развести буфером	—	51				

^a Выделены экстрагенты, используемые для анализа.

III. Твердофазный иммуноферментный анализ с использованием поликлональных антисывороток

1. Определение *сим*-1,3,5-триазинов в объектах окружающей среды

Наибольшее внимание из *сим*-1,3,5-триазинов уделяется атразину, как самому распространенному за рубежом гербициду данной группы, и его метаболитам (см. табл. 3). В ряде публикаций описываются методы анализа, разработанные на основе поликлональных антисывороток.

Первые работы по ELISA атразина были опубликованы в 1985 г.^{20,45} Для характеристики антисыворотки, описанной в патенте⁴⁵, использовали метод радиоиммуноанализа. Конъюгат гаптена с метиловым эфиром тирозина, подходящий для введения метки ¹²⁵I, был синтезирован по методу смешанных ангидридов; предел обнаружения атразина составил 1 нг в пробе. Позже²⁸ был разработан ELISA с нижним пределом обнаружения атразина 0.1 нг · мл⁻¹. При проведении анализа на формате I использовали вторичные антитела, конъюгированные с биотином, которые на следующей стадии взаимодействовали с конъюгатом стрептавидина — пероксидаза хрена.

При разработке гомологичного ELISA на атразин в воде были использованы полистироловые планшеты и сферы.^{20,22} Очистка поликлональной антисыворотки методом иммуно-

аффинной хроматографии позволила снизить предел обнаружения в 100 раз. Отмечено, что при использовании в качестве твердой фазы сфер анализ менее чувствителен (см. табл. 3). Для него характерно различное соотношение между объемом образца и площадью твердой фазы, увеличение чувствительности при увеличении объема образца возможно лишь в ограниченном диапазоне (причем требуется больший объем образца для анализа), продолжительное время анализа (5 ч), трудность механизации и автоматизации. Такая же методика была использована при разработке гомологичного ELISA на тербутрин.²¹ Предел обнаружения тербутрина был улучшен в 250 раз при применении в качестве твердой фазы полистироловых сфер.⁴⁶ Схожий диапазон определяемых концентраций получен при использовании меченого ¹⁴C тербутрина в радиоиммуноанализе.⁴⁶

В работе⁴⁷ для синтеза иммуногена были использованы различные карбодиимиды — ДЦК, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид (ЭДК), ЦМК и различные соотношения гаптен : белок, карбодиимид : гаптен. Ряд иммуногенов оказались нерастворимыми (особенно при использовании ЭДК). Для иммунизации на начальном этапе применен иммуноген состава гаптен : белок = 4 : 1 (отношение гаптен : белок = 200 : 1, ДЦК : гаптен = 1 : 2), но так как титры антисывороток были низкими, для последующей иммунизации использовали иммуноген с максимальным количеством присоединенных молекул (гаптен : белок = 35 : 1; отношение реагентов — гаптен : белок = 100 : 1, ДЦК : гаптен = 1 : 1). Также были синтезированы гомологичные конь-

югаты с такими ферментами, как пероксидаза хрена (по методу активированных эфиров) и щелочная фосфатаза (с использованием ЦМК). При синтезе также варьировали соотношения гаптен : фермент, гаптен : карбодимид. Конъюгат с пероксидазой показал большую чувствительность анализа и использовался для дальнейшей оптимизации. Разработанный метод был применен для анализа воды, почвы и водных растений,⁴³ причем в последнем случае была использована модель экосистемы с водными растениями и организмами, куда вносили определенные количества атразина. Авторы отмечают быстроту и удобство метода, а к его недостаткам относят значительную перекрестную реактивность с пропазином. В последующем была проведена оценка трех ELISA, основанных на различных комбинациях двух антисывороток, полученных против иммуногенов различной структуры, и двух ферментных конъюгатов.⁴¹ Для наиболее чувствительного анализа перекрестная реактивность составила 195% для пропазина и 20% для симазина.

Сообщается об использовании магнитных частиц в качестве твердой фазы при разработке ELISA на атразин.³⁸ Перекрестное реагирование составило для аметрина — 171, для пропазина — 132, для прометрина — 105%. Было показано, что присутствие различных солей, ионов металлов, изменение pH от 2 до 12 не влияет на результаты анализа образцов воды. Авторы отмечают преимущества разработанного анализа: время проведения составляет 45 мин и не возникает проблем с покрытием твердой фазы антителами (антитела на магнитные частицы присоединяются через глутаровый альдегид).

Исследователями компании «Shell Development Co.» получена высокоспецифичная антисыворотка на цианазин, которая была использована для разработки ELISA.^{48,49} Перекрестное реагирование было показано только для метаболитов цианазина. Метод использовали для мониторинга воды и почвы, результаты анализа хорошо коррелировали с ГХ. По методике³⁸ разработан ELISA цианазина в воде и почве на магнитных частицах.²⁹ Отмечена высокая специфичность метода к цианазину и толерантность к матриксу, а также чувствительность к изменениям pH и различным компонентам среды (органические растворители, соли).

В западных странах некоторые фирмы уже выпускают наборы иммунохимических реагентов для анализа *сим-1,3,5*-триазинов,¹⁶ например Res-I-Mune™, Res-I-Quant™ («Immunosystems»); Triazin-ELISA («Riedel-de-Haen»); RaPID Assays® («Ohmicron»); EnviroGard™, Triazine Test Kit («Mili-prore»). Опубликованы работы, где такие наборы нашли успешное применение. Бушвей с соавт. разработали ELISA на атразин в воде,^{30,36,37} почве,³⁰ жидких и твердых продуктах питания³¹ и молоке,³² с использованием Res-I-Mune™, в который входят полистироловые пробирки, покрытые поликлональными антителами, и все необходимые реагенты. За один раз можно провести анализ 8 образцов, время анализа составляет 15 мин. Исследование большого количества образцов воды, почвы, пищевых продуктов и молока как натуральных, так и с внесенным гербицидом, показало высокую точность и хорошую воспроизводимость результатов. При анализе пищевых продуктов положительный результат был получен для двух образцов. Однако метод ВЭЖХ показал отсутствие гербицидов в этих пробах. При анализе образцов молока авторами было отмечено, что для проб с высоким содержанием жира наблюдаются заниженные результаты. Они высказывают гипотезу, согласно которой атразин частично растворяется в жире и становится недоступным для антител. Авторы разделяют молоко по содержанию жира на три группы: > 3.5%, 1.5–3.5%, < 0.5% и предлагают разводить образцы молока до уровня жира порядка 1%, однако это снижает предел обнаружения. Исследованы перекрестные реакции поликлональных антител³² и обнаружено, что наибольший процент перекрестных

реакций дают аметрин, пропазин и симазин. Вследствие простоты и быстроты предложенного метода авторы предлагают использовать его для анализа в полевых условиях. Показано, что анализ малочувствителен к изменениям pH, температуры и концентрации ионов кальция, натрия и нитрат-ионов.⁵⁰

Описана попытка применения набора Res-I-Mune™ для анализа атразина в почве.^{33,34} В работе³³ сообщается, что коэкстрактивные вещества мешают определению. При использовании водной экстракции атразин определяли в концентрациях 0.5–5 нг·мл⁻¹, а с применением метанола в качестве растворителя — 5–20 нг·мл⁻¹. Были исследованы³⁴ различные растворители для экстракции (см. табл. 4). С учетом способности растворителей извлекать гербицид были выбраны водно-метанольная смесь и метанол. Однако от использования метанола авторы отказались, так как он влиял на результаты анализа при концентрациях атразина менее 50 нг·мл⁻¹. Авторы отмечают, что данный анализ пригоден для применения на полях с известной химической обработкой. Этот же набор применяли для анализа образцов воды.³⁵

Описан коммерческий набор для ИФА атразина на 96-луночных планшетах Res-I-Quant™ (см.⁵¹). Авторы опробовали два различных метода и три растворителя (см. табл. 4) при экстракции атразина из почвы. Присутствие органических растворителей начинает сказываться на результатах анализа при концентрациях более 3.5%. Показано, что лучшим растворителем по проценту открытия гербицида является ацетонитрил.

Не обойдены вниманием и метаболиты *сим-1,3,5*-триазинов. Разработке гомологичного ELISA на дезизопропил- и дезэтилатразин посвящена работа⁴⁰. Калибровочные кривые для обоих соединений практически совпадали. Метод с использованием конъюгата гаптена с пероксидазой хрена оказался более чувствительным, чем с использованием конъюгата с щелочной фосфатазой. Разработанные методы анализа на атразин⁴³ и его основной метаболит — дезэтилатразин⁴⁰ применяли для изучения деградации атразина в почве в течение года.⁵² Предложено применять упрощенную схему водной экстракции гербицида, которая позволяет проводить его извлечение из почвы на уровне 1/3–2/3 извлечения метанолом. Для анализа образцов воды успешно использовался ELISA на дезэтилатразин.⁴⁴

Применение ELISA для определения гидроксисимазина и гидроксиатразина в различных объектах (воде, почве, навозе) и для исследования деградации атразина устойчивыми к УФ-свету микроорганизмами показано в работе²⁵. Для использования в анализе гаптены **2** ($n = 2$), **4** и **5** были конъюгированы с бычьим сывороточным альбумином (БСА) и щелочной фосфатазой по методу активированных эфиров. Попытка разработать гомологичную и гетерологичную (конъюгат на основе гаптена **5**) систему для гидроксисимазина на всех форматах не привела к успеху. Неожиданно высокая чувствительность была получена при использовании ферментного конъюгата на основе гаптена **2** ($n = 2$). При исследовании полученных антисывороток на данной системе было найдено, что три из полученных антисывороток хорошо узнают гидроксисимазин и одна — гидроксиатразин. Причем при использовании различных модификаций формата III установлено, что покрытие планшета непосредственно антителами уменьшает чувствительность в 2–5 раз. Антисыворотка, которая реагировала на оба метаболита, была выбрана для разработки методов анализа. Показано, что различные соли, ионы металлов в широком диапазоне концентраций, pH (5–9) и матрикс не влияют на результаты при анализе образцов воды. Предложено использовать данный метод для исследования экосистем на толерантность и способность деградировать ксенобиотики.

Интересные данные по проведению двух межлабораторных тестов приведены в работе⁵³. Для первого теста 10

образцов воды различного состава были отправлены в 13 лабораторий. Каждая лаборатория анализировала образцы методом ELISA, полученные результаты подтверждали данными ГХ/МС. Сообщается, что только в нескольких лабораториях смогли определить правильное количество атразина, а общее количество *сим-1,3,5-триазинов* ни одна лаборатория правильно определить не смогла. Для второго теста в 12 лабораториях анализировали 6 образцов воды различного состава с помощью наиболее успешно показавших себя в первом тесте трех ELISA. Результаты также сравнивали с ГХ и ГХ/МС. Полученные результаты позволили сделать вывод: из трех методов ELISA один специфично определял атразин, а два других — общее количество *сим-1,3,5-триазинов* в пробе. Сделано несколько полезных замечаний: 1) следует сертифицировать иммунохимические лаборатории (работающий в этих лабораториях персонал должен иметь высокую квалификацию); 2) следует подробно описывать процедуру проведения анализа; 3) рабочий диапазон концентраций должен быть близок к середине калибровочной кривой; 4) следует использовать по крайней мере 6 стандартных растворов для построения калибровочной кривой; 5) если матрикс неизвестен, следует вносить в него аналит; 6) следует проводить четыре параллельных измерения каждого образца во избежание ошибочных результатов.

2. Влияние структуры иммунореагентов и формата анализа на чувствительность определения

Из сказанного выше видно, что при разработке ELISA, как правило, используют гомологичные системы. Фундаментальное исследование по разработке и оптимизации методов ELISA на гербициды класса *сим*-1,3,5-триазинов и влиянию структуры иммунореагентов на параметры анализа проведено группой Хаммока.^{17, 23} Было синтезировано и охарактеризовано два типа производных атразина и симазина: а) гаптены **9** и **10**, б) гаптены **2** и **3** с различной длиной спейсера от $n = 1$ до $n = 5$. С гаптенами **2**, **3**, **9** и **10**, а также с дихлорсимазинном и дихлоратразином были синтезированы конъюгаты с БСА, кональбумином (КОНА) и тироглобулином (ТГ). Так как возникли проблемы с растворимостью конъюгатов с ТГ и КОНА, именно конъюгаты с БСА были использованы как антигены в анализе.

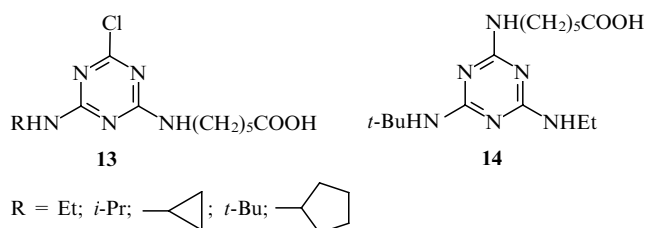
В процессе скрининга полученных антител авторами^{17, 23} были отмечены следующие закономерности: для всех антител максимальное связывание наблюдалось в гомологичных системах, при этом большинство антител показало значительное связывание хотя бы с одним гетерологичным антигеном. При использовании иммуногенов на основе производных атразина сыворотки получились с более высокими титрами, чем при использовании производных симазина. Для первых во многих случаях наблюдались высокие титры при применении гетерологичного антигена, а для последних — только в одном. Далее проводили оптимизацию анализа для антисывороток с наивысшим титром к большему числу гетерологичных систем, при этом в качестве ингибиторов использовали атразин и симазин. Показано, что наименее чувствительными являются гомологичные системы. При исследовании позиции конъюгирования, длины «ножки» (длины алкильной цепи) и изменения *N*-алкилрадикалов было обнаружено, что чувствительность в наибольшей степени зависит от позиции конъюгирования, хотя выведенная закономерность наблюдалась не всегда. Например, для антисывороток, полученных против белкового конъюгата гаптена **5**, наилучшая чувствительность была достигнута при использовании белкового конъюгата гаптена **1** (в котором «ножка» полностью отсутствовала).

При исследовании специфичности полученных антисывороток было обнаружено, что наибольшее ингибирование вызывают гомологичные гаптены. Авторы отмечают, что данные антисыворотки можно разделить на две группы:

антисыворотки, полученные против белковых конъюгатов гаптен **9** и **10**, которые распознают не только атразин, но и другие 2-метилтио-*сим*-1,3,5-триазины, и антисыворотки, полученные против белковых конъюгатов гаптен **2** и **3**, которые хорошо распознают 2-хлорсодержащие соединения, а с 2-метилтиосодержащими практически не реагируют. Для всех антисывороток потеря алкильного радикала и замещение атома хлора (метилтиогруппы) на гидроксигруппу приводили к значительному уменьшению узнавания.

В работах ^{17, 23} на примере измерения образцов воды и почвы было также рассмотрено влияние матрикса и растворителей в пробе. Было обнаружено, что наиболее чувствительные системы оказались наименее устойчивы к влиянию матрикса и растворителей в экстракте. Авторы отмечают, что при разработке любого метода анализа нужно находить компромиссное решение: наиболее чувствительный анализ или наиболее толерантный к влиянию матрикса. Авторы также подчеркивают, что при наличии набора хорошо охарактеризованных антител и антигенов различной структуры появляется возможность количественно определять структуроподобные вещества в образцах сложного состава.

В работе⁵⁴ была сделана попытка проследить влияние структуры ферментного конъюгата на чувствительность анализа. Конъюгаты с пероксидазой хрена были синтезированы по методу активированных эфиров. В качестве гаптен-ов использовали соединения **13** с различными боковыми радикалами (этил, изопропил, циклопропил, *tert*-бутил, циклопентил) и 2-*tert*-бутиламино-4-(1-карбоксистент-5-ил)-амино-6-этиламино-*cis*-1,3,5-триазин (**14**).



Четкой зависимости влияния структуры конъюгатов на чувствительность анализа проследить не удалось. Для антител, полученных против белкового конъюгата гаптена **3** (см.⁴⁷), чувствительность при использовании конъюгатов на основе соединения **13** уменьшалась в ряду (приведены R) изопропил > этил > циклопропил > *трет*-бутил > циклопентил. Эти же антитела практически не связывались с конъюгатом, полученным из соединения **14**. Для антител, полученных против белкового конъюгата гаптена **7** (см.²²), наибольшая чувствительность достигнута при использовании ферментного конъюгата гаптена с изопропильным боковым радикалом, с остальными же конъюгатами связывания практически не наблюдалось.

Как видно из изложенного выше, применение поликлональных антисывороток позволяет достичь низких пределов обнаружения *сим*-1,3,5-триазинов в различных объектах. Однако тот факт, что количество получаемых антисывороток ограничено, а их качество (аффинность, специфичность) зависит от иммунизируемого животного, делает невозможным их стандартизацию. Последнего недостатка можно избежать, применяя для анализа моноклональные антитела.

IV. Твердофазный иммуноферментный анализ с использованием моноклональных антител

Моноклональные антитела нашли широкое применение для анализа *сим*-1,3,5-триазинов. Одно из преимуществ применения моноклональных антител — возможность их стандартизации и наработки почти в неограниченном количестве. Описаны ⁴² моноклональные антитела против атразина и его метаболита гидроксиатразина. В гомологичном ELISA

использован формат I, причем смесь антител и образца предварительно инкубировали перед добавлением на планшет.

Работа²⁴ суммирует результаты исследований трех лабораторий по разработке методов ELISA *сим*-1,3,5-триазинов с использованием моноклональных антител. Были изучены три формата — I, II и IIIa. Все они показали примерно одинаковую чувствительность (использовали конъюгаты с гаптеном 3), однако применение ферментного конъюгата гаптена 2 ($n = 2$) для формата IIIa увеличило чувствительность анализа в 5 раз. Исследование специфичности полученных антител показало, что моноклональные антитела преимущественно связываются с *сим*-1,3,5-триазинами, содержащими изопропильный радикал в положении 4 или 6 и метилтиогруппу в положении 2; *N*-дезалкильные и гидроксильные производные практически не реагируют с антителами. Показано, что результаты измерения 75 образцов воды методом ГХ при определении атразина и 48 образцов почвы методом ГЖХ при определении симазина хорошо коррелировали с результатами ELISA. Метод использовали для измерения атразина и симазина в водных стоках.

С применением предложенных в работе²⁴ моноклональных антител был выполнен целый ряд работ. В работе⁵⁵ сравнивали достоинства двух ELISA на симазин и атразин с использованием моноклональных антител²⁴ и поликлональных антисывороток.¹⁷ Одна из поликлональных антисывороток и моноклональные антитела использовались против белкового конъюгата гаптена 9, а другая поликлональная антисыворотка — против белкового конъюгата гаптена 3. Было исследовано два формата ELISA (II и IIIa), при этом для моноклональных антител использовали конъюгат со щелочной фосфатазой гаптена 3 ($n = 2$), а для поликлональных антисывороток — конъюгат гаптена 3 ($n = 3$). При сравнении антител было обнаружено, что поликлональные антисыворотки более специфичны к атразину, чем к симазину, а моноклональные антитела узнавали оба гербицида примерно на одинаковом уровне. Моноклональные антитела показали большую чувствительность, меньшее значение фона, более интенсивную окраску продукта ферментативной реакции и большую устойчивость к влиянию растворителей и матрикса по сравнению с поликлональными антисыворотками, поэтому именно они были выбраны для анализа.

При исследовании форматов обнаружено, что использование формата IIIa увеличивает чувствительность в 10 раз. Однако формат II оказался более резистентным к влиянию матрикса и давал меньшее значение фона. Так, например, присутствие метанола, ацетонитрила, ацетона до 10%, тетрагидрофурана до 2.5% не оказывало влияния на результаты анализа. Формат II был выбран для проведения анализа образцов воды и почвы. Впоследствии разработанный анализ⁵⁵ был успешно применен для исследования выщелачивания симазина.⁵⁶ Образцы почвы были собраны после ирригации с различной глубины, причем наибольшая концентрация гербицида была обнаружена в верхних слоях почвы (0.2 м). Сообщается о применении этого же метода анализа для исследования содержания атразина и его метаболитов в моче;⁵⁷ ГХ, МС, и ВЭЖХ были использованы для дополнения и подтверждения ELISA при качественном и количественном определении метаболитов атразина. Показано, что основным метаболитом атразина в моче людей, которые работают с гербицидами, является атразинмеркаптурат. Этот метаболит был найден в концентрациях в 10 раз больших, чем атразин или его *N*-дезалкильные производные. Атразинмеркаптурат выделяли из мочи, используя аффинную экстракцию с применением поликлональных антисывороток.^{17,25} После наблюдения в течение 10 дней за уровнем меркаптурата атразина в моче людей, работающих с атразином и получивших различные дозы гербицида через кожу или дыхательные пути, было предложено использовать ELISA для определения атразинмеркаптурата как биомаркера полуживой дозы.

В работе³⁹ подробно анализируется влияние формата ELISA и структуры ферментного конъюгата на чувствительность данного метода; оптимальный вариант использовали для анализа образцов воды и почвы. Ферментные конъюгаты с пероксидазой хрена и щелочной фосфатазой были синтезированы для гаптен 2 и 3 ($n = 2, 5$) по методу активированных эфиров. Исследовано четыре формата — II, III, IIIa, IIIб. При синтезе ферментных конъюгатов использовали различные соотношения антиген:фермент. Оказалось, что чувствительность анализа мало зависит от соотношения антиген:фермент, хотя при увеличении количества гаптена пропорционально увеличивалась оптическая плотность продукта ферментативной реакции. Сравнение ферментных конъюгатов показало, что для конъюгатов с пероксидазой хрена использование гаптен 2 с самой длинной «ножкой» ($n = 5$) увеличивает чувствительность в 3–5 раз по сравнению с гаптен 2 с короткой «ножкой» ($n = 2$). Для конъюгатов со щелочной фосфатазой картина была обратной. В общем, конъюгаты со щелочной фосфатазой оказались хуже, чем конъюгаты с пероксидазой хрена, так как для них требовалось меньшее разведение и больше времени для развития окраски продукта ферментативной реакции. В итоге самым лучшим оказался ферментный конъюгат гаптена 3 с пероксидазой хрена. Авторы³⁹ отмечают, что найденная для разных ферментов закономерность немного удивительна, и связывают ее с различной массой фермента и, следовательно, с различным расположением гаптена на его поверхности и возможными стерическими затруднениями.

При сравнении различных форматов было обнаружено, что наименее чувствительным и экономичным по расходу реагентов был формат II. Форматы III, IIIa, IIIб были примерно равны по чувствительности, но для формата III требовалось больше времени для развития окраски той же интенсивности, что и для форматов IIIa и IIIб, кроме того для него наблюдался больший разброс результатов от планшета к планшету. Из форматов IIIa и IIIб для анализа был выбран первый, как более экономичный. Наибольшие проценты перекрестного реагирования наблюдались для атразина — 100, пропазина — 147, аметрина — 70 и симазина — 32%.

О получении моноклональных антител и о чрезвычайно простом полуквантитативном методе анализа атразина на полосках сообщается в работе⁵⁸. Продолжительность анализа составляет 20 мин. Полоски последовательно покрывают антивидовыми антителами, моноклональными антителами и казеином. Для анализа смешивают аликвоту анализируемого образца и ферментного конъюгата и помещают ее на полоску на 5 мин, после промывки проявляют окраску. Данный метод позволяет визуально определять содержание атразина в воде при концентрации более $0.5 \text{ нг} \cdot \text{мл}^{-1}$. Моноклональные антитела также использовались для разработки ELISA. Применение конъюгатов гаптен 2 и 3 с пероксидазой хрена практически не дало различия в калибровочных кривых, и для анализа использовали конъюгат гаптена 3.

После запрещения применения атразина в Германии, он повсеместно стал заменяться тербутилазином. Поэтому в последнее время появился ряд работ по разработке ELISA этого гербицида. В работе Гирша и Хока¹⁸ описан синтез гомологичных конъюгатов на основе тербутилазина со щелочной фосфатазой и с использованием формата III. Были получены несколько неожиданные результаты. Для антител, синтезированных против конъюгата гаптена 7 наибольшую перекрестную реактивность показали тербуторин и прометрин (предел обнаружения 0.1 и $0.3 \text{ нг} \cdot \text{мл}^{-1}$ соответственно), а антитела, полученные против белкового конъюгата 1 (см. табл. 2), показали наибольшее узнавание для азипротрина (предел обнаружения $1 \text{ нг} \cdot \text{мл}^{-1}$). Полученные моноклональные антитела¹⁸ использованы в многочисленных исследованиях. В работе⁵⁹ предложено использовать декстран в качестве высокомолекулярного носителя. При применении белковых конъюгатов и конъюгата с декстра-

ном на формате I показано, что чувствительность определения в обоих случаях примерно одинаковая. Отмечены преимущества конъюгатов с декстраном: устойчивость к денатурации, стабильность к воздействию высоких температур, различных pH и солей.

Изучено влияние времени инкубации ферментного конъюгата на чувствительность ELISA. Использовали моноклональные антитела,^{18,42} поликлональные антисыворотки^{22,47} и формат III. Для получения антител на белковые конъюгаты гаптенa 3 был применен гомологичный ферментный конъюгат, для остальных антител — конъюгат соединения 14. Конъюгаты с пероксидазой хрена были получены по методу активированных эфиров. Время инкубации конъюгата варьировали от 1 мин до 40 ч. Для поликлональных антител изменение положения центральной точки калибровочной кривой было значительным (5 порядков). Авторы объясняют это наличием в поликлональной антисыворотке фракций антител различной аффинности. Отмечено, что такой значительный диапазон определяемых концентраций позволит проводить анализ неразбавленного образца в широком диапазоне концентраций только за счет изменения времени инкубации ферментного конъюгата. Для моноклональных антител такое изменение значительно меньше (около одного порядка). Уменьшение времени инкубации приводило к уменьшению значений оптической плотности продукта ферментативной реакции. Обнаружено, что уменьшение времени анализа не приводило к уменьшению перекрестной реактивности. Для оптимизированного анализа на атразин на поликлональной антисыворотке предел обнаружения составил $2 \text{ нг} \cdot \text{л}^{-1}$ (время инкубации 1 мин), для моноклональных антител на тербутилазин — $30 \text{ нг} \cdot \text{л}^{-1}$ (время инкубации 7 мин).

В работе¹⁹ были получены моноклональные антитела на белковый конъюгат гаптенa 1. Проведена оптимизация ELISA на тербутилазин с использованием различных форматов (I, модификация I меткой моноклональных антител биотинном с последующим взаимодействием с конъюгатом стрептавидин–пероксидаза хрена, IIIa). Для проведения анализа с использованием формата I применяли белковый конъюгат гаптенa 2, а для IIIa — ферментный конъюгат гаптенa 2 с изопропилом в качестве бокового радикала. Показано увеличение чувствительности в ряду форматов: I, модифицированный I, IIIa.

Итак, применение моноклональных антител для анализа *сим*-1,3,5-триазинов, как правило, позволяет достичь большей чувствительности анализа по сравнению с поликлональными антителами. Однако не удается кардинально улучшить специфичность анализа, так как и моноклональные антитела показывают значительное перекрестное реагирование для родственных *сим*-1,3,5-триазинов. Возможно, это связано с незначительными изменениями в структуре гербицидов данной группы, которые, как правило, касаются только алкильного радикала в боковой цепи.

V. Количественное определение нескольких гербицидов в одной пробе

При наличии в пробе нескольких родственных гербицидов из-за значительного перекрестного реагирования со структурно-подобными *сим*-1,3,5-триазинами невозможно количественное определение одного из них. Ниже мы рассмотрим результаты двух работ, в которых предлагаются пути решения этой проблемы.

Применение набора охарактеризованных моноклональных антител для количественного определения атразина, симазина и цианазина в одном образце при анализе выбросов и смылов описано в работе²⁶. Было исследовано пять моноклональных антител,²⁴ три формата — I (с прединкубацией смеси раствора антител и образца или стандарта), II и IIIa — и различные (гомо- и гетерологичные) структуры

ELISA антигенов. Из пяти первоначально предложенных антител было отобрано три с различной перекрестной реактивностью на атразин, симазин и цианазин. Наибольшая чувствительность наблюдалась для гетерологичных систем. По чувствительности лучшим был формат II, у формата IIIa чувствительность была немного ниже, но при этом продолжительность анализа меньше на 2 ч. Сначала все антитела анализировались на формате I с белковыми конъюгатами гаптенa 3 и 9 с БСА, на формате II с ферментными конъюгатами гаптенa 2, $n = 2$ и 3, $n = 2$, на формате IIIa с ферментным конъюгатом гаптенa 2, $n = 2$. Для анализа образцов воды использовали три ELISA (с различными антителами) на формате IIIa с конъюгатом гаптенa 2, $n = 2$. Подход к количественному определению нескольких гербицидов основан на допущении, что наблюдаемый и измеряемый в иммуноанализе (т.е. в ELISA) ответ антител, связывающихся с антигенами, присутствующими в пробе, представляет собой «суммарный ответ» на все реагирующие антигены. Наблюдаемый ответ представляют в виде уравнения

$$\text{ELISA-ответ} = A(X_A) + B(X_B) + C(X_C) + \dots + Z(X_Z),$$

где ELISA-ответ — количество аналита, определенное по калибровочной кривой антигена, выбранного в качестве стандарта; A, B, C и Z — концентрация различных антигенов; X_A , X_B , X_C , X_Z — коэффициенты реактивности этих антигенов.

В данном случае ELISA-ответ выражали в микромолях атразина, коэффициент реактивности для которого был принят за единицу. Коэффициент реактивности других гербицидов определяли из наклона прямой на графической зависимости ответа ELISA от концентрации антигена (симазина или цианазина). При анализе образцов, содержащих три гербицида, для каждого ELISA составляли уравнения

$$\text{ELISA-ответ } 1 = A(X_{A1}) + B(X_{B1}) + C(X_{C1}),$$

$$\text{ELISA-ответ } 2 = A(X_{A2}) + B(X_{B2}) + C(X_{C2}),$$

$$\text{ELISA-ответ } 3 = A(X_{A3}) + B(X_{B3}) + C(X_{C3}),$$

где A, B, C — неизвестные концентрации атразина, симазина и цианазина; X_{A_i} , X_{B_i} , X_{C_i} — соответственно коэффициенты реактивности атразина, симазина и цианазина при использовании различных антител ($i = 1 \div 3$).

Решая систему из трех уравнений с тремя неизвестными, определяли количество каждого гербицида в пробе. Измерение образцов воды показало, что атразин и общее количество гербицидов определяются с хорошей точностью и воспроизводимостью, тогда как симазин и цианазин — менее точно.

О применении двух антител различной специфичности для определения наличия в пробе известного пестицида сообщается в работе⁶¹. Для измерения образцов воды применяли поликлональную антисыворотку (перекрестная реактивность на атразин — 100, тербутилазин — 4%)⁴⁷ и моноклональные антитела (тербутилазин — 100, атразин — 25%)¹⁸. В анализе на атразин значение перекрестной реактивности тербутилазина (4%) использовали для вычисления концентрационного эквивалента тербутилазина. Аналогичные вычисления были проведены при анализе тербутилазина. Затем определяли отношение меньшего концентрационного эквивалента к большему для каждого гербицида. Если это отношение лежало в пределах $0.4 \div 1$, то делали вывод о присутствии гербицида в пробе. Была получена удовлетворительная корреляция результатов с ГХ. Таким образом, показано, что методом ELISA в образце воды можно быстро определить тип используемого гербицида.

VI. Альтернативные методы иммуноанализа

Кроме обычно применяемой спектрофотометрической детекции продукта ферментативной реакции возможна регистрация его флуоресценции или люминесценции.

Описаны два варианта иммуноанализа атразина и симазины с усиленной люминесценцией.^{62,63} В первом случае меченый пероксидазой гаптен конкурировал с аналитом за центры связывания поликлональных антител, адсорбированных на пробирках. Затем пробирки промывали и количество пероксидазы, связавшейся с антителами определяли, используя изолуминольный реагент. При применении планшетов диапазон определяемых концентраций составил $0.01 - 1 \text{ нг} \cdot \text{мл}^{-1}$. Концентрации реагентов по сравнению с обычным методом были увеличены, чтобы уменьшить время инкубации и сделать анализ пригодным для полевых условий.

Ульрих и Ниссер⁶⁴ использовали флуорогенный субстрат для щелочной фосфатазы при разработке иммуоферментного анализа на содержание тербутилазина с флуоресцентной детекцией метки. Для проведения гомологичного анализа на моноклональных антителах¹⁸ для инкубации субстратной смеси требовалось 20 ч. Позднее удалось уменьшить время инкубации до 20 мин за счет синтеза ферментного конъюгата по модифицированному методу.⁶⁵ В качестве растворителя для синтеза ферментного конъюгата был использован глим, а вместо традиционно применяемого *N*-гидроксисукцинимиды — ди-(*N*-сукцимидил)карбонат.⁶⁶

Работа⁶⁷ посвящена применению флуоресцентного иммуноанализа (ФИА) для количественного определения сим-1,3,5-триазинов. Для этого гаптен конъюгировали с флуорофорами (дансилхлоридом или флуоресцеином).

В последнее время все большее внимание уделяется таким вариантам ИХМ, процедура которых максимально упрощена и которые наиболее пригодны для массового анализа в полевых условиях. Разработка полуколичественного метода определения атразина на полосках описана выше.⁵⁸

Предложено использовать иммунобиосенсоры для анализа атразина в питьевой воде.⁶⁸ Иммунобиосенсор представляет собой пьезокристалл с частотой колебаний 10 МГц, покрытый последовательно белком А и поликлональными антителами. При связывании иммунобиосенсора с атразином изменяется масса кристалла и, следовательно, частота его колебаний, причем эффект пропорционален содержанию пестицида в воде. Такой иммунобиосенсор после удаления антигена с поверхности может использоваться для 8–9 измерений. Линейный диапазон измеряемых концентраций составил $0.03 - 100 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$.

Первая разработка проточно-инжекционного иммуноанализа для определения пестицидов в воде опубликована в 1991 г.⁶⁹ Поликлональная антисыворотка против атразина⁴⁷ была иммобилизована на иммуоаффинных мембранах. При пропускании реагентов через мембрану использовали метод «stop-go», а флуориметр применяли для детектирования продукта пероксидазного окисления гидроксифенилпропионовой кислоты. Линейный диапазон калибровочной кривой составил $0.02 - 0.3 \text{ нг} \cdot \text{мл}^{-1}$. Воспроизводимость результатов была хуже, чем в соответствующем ИФА. Это могло быть вызвано следующими причинами: природой проточно-инжекционной реакции, неравновесными условиями реагирования и методикой иммобилизации.

Для анализа атразина в воде использовали оптиковолоконный иммуносенсор.⁷⁰ Гаптен иммобилизовали на поверхности оптического волокна посредством глutarового альдегида. Иммуносенсор помещали в ячейку, содержащую смесь анализируемого образца и моноклональных антител,¹⁸ меченых флуоресцеином, и измеряли флуоресценцию. В более поздней работе⁷¹ удалось понизить предел обнаружения в 100 раз ($0.01 \text{ нмоль} \cdot \text{л}^{-1}$ атразина) за счет подбора гаптена для иммобилизации.

Разработан иммунохроматографический метод анализа атразина,⁷² с использованием иммунохроматографических колонок с микрогетерогенной средой ABICAP (AntiBody Immuno Column for Analytical Processes, Abion, Germany), содержащих антивидовые антитела. При анализе последовательно пропускают реагенты через колонку в течение 10 мин; нижний предел обнаружения атразина — $0.1 \text{ нг} \cdot \text{мл}^{-1}$. В статье рассмотрены различные методы детекции (спектрофотометрический, флуоресцентный, хемилюминесцентный).

Нами ведутся исследования по разработке поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА) на гербициды группы сим-1,3,5-триазинов и изучению влияния структуры меченого гаптена на чувствительность анализа. Метод является гомогенным, простым и быстрым. Он основан на конкуренции определяемого антигена и антигена, меченного флуоресцентной меткой за ограниченное число центров связывания антитела, и измерении степени поляризации реакционной смеси. Разработан⁷³ ПФИА симазины на основе поликлональной антисыворотки с нижним пределом обнаружения $5 \text{ нг} \cdot \text{мл}^{-1}$. Изучено влияние структуры меченого антигена на чувствительность анализа.⁷⁴ Показано, что наиболее чувствительным является анализ с использованием гетерологичного меченого антигена с самым коротким химическим мостиком. Метод ПФИА менее чувствителен, чем метод ELISA, но более простой и быстрый.

В заключение следует сказать, что ИХМ гербицидов группы сим-1,3,5-триазинов успешно применяются для анализа различных объектов. Результаты ИХМ и ФХМ, как правило, хорошо коррелируют между собой. Более простые и экспрессные ИХМ, по-видимому, в скором времени найдут широкое применение и в нашей стране.

Литература

1. European Communities, Council Directive of 15th July 1980 Relating to the Quality of Water Intended for Human Consumption [80/778/EEC], Drinking Water Directive N L.229
2. В.А.Каспаров, В.К.Промоненков. *Применение пестицидов за рубежом*. Агропромиздат, Москва, 1990
3. В.А.Захаренко. *Гербициды*. Агропромиздат, Москва, 1990
4. *Анализ объектов окружающей среды. Инструментальные методы*. (Под ред. Р.Сониасси). Мир, Москва, 1993
5. *Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде: Справочник*. (Сост. М.А.Клисенко, А.А.Калинина, К.Ф.Новикова). Колос, Москва, 1992
6. A.Di Corcia, M.Marchetti. *Anal. Chem.*, **63**, 580 (1991)
7. G.Felding. *Pestic. Sci.*, **35**, 39 (1992)
8. С.Г.Жемчужин, Р.П.Городец. *Агрохимия*, (1), 149 (1990)
9. Е.А.Коростылева, О.А.Мельниченко, А.А.Туманов. *Журн. анал. химии*, **46**, 2314 (1991)
10. B.D.Hammonk, R.O.Mumma. In *Pesticide Analytical Methodology. V.136. ACS Symposium Series*. (Eds J.Harvey, G.Zweig). American Chemical Society, Washington DC, 1980. P. 321
11. R.O.Harrison, S.J.Gee, B.D.Hammonk. In *Biotechnology in Crop Protection. V.379. ACS Symposium Series*. (Eds P.Hedin, J.J.Menn, R.M.Hollingworth). American Chemical Society, Washington DC, 1988. P.316
12. F.Jung, S.J.Gee, R.O.Harrison, M.H.Goodrow, A.E.Karu, A.L.Braun, Q.X.Li, B.D.Hammonk. *Pestic. Sci.*, **26**, 303 (1989)
13. J.Van Emon, J.N.Seiber, B.D.Hammonk. In *Analytical Methods for Pesticides and Plant Growth Regulators: Advanced Analytical Techniques. V.XVII*. (Ed. J.Sherma). Academic Press, New York, 1989. P.217.
14. W.H.Newsome. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**, 919 (1986)
15. J.P.Sherry. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **23**, 217 (1992)
16. R.O.Harrison, M.H.Goodrow, S.J.Gee, B.D.Hammonk. In *Immunoassays for Trace Chemical Analysis. V. 451. ACS Symposium Series*. (Eds M.Vanderlaan, L.H.Stanker, B.E.Watkins, D.W.Roberts). American Chemical Society, Washington DC, 1991. P.14.

17. M.H.Goodrow, R.O.Harrison, B.D.Hammock. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 990 (1990)
18. T.Giersch, B.Hock. *Food Agric. Immunol.*, **2**, 85 (1990)
19. T.Giersch, K.Kramer, B.Hock. *Total Envir.*, **132**, 435 (1993)
20. S.J.Huber. *Chemosphere*, **14**, 1795 (1985)
21. S.J.Huber, B.A.Hock. *J. Plant Dis. Prot.*, **92**, 147 (1985)
22. S.J.Huber, B.Hock. In *Methods of Enzymatic Analysis, V.XII, Drugs and Pesticides*. (Ed. H.U.Bergmeyer). VCH, Weinheim, 1986. P.438
23. R.O.Harrison, M.H.Goodrow, B.D.Hammock. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 122 (1991)
24. A.E.Karu, R.O.Harrison, D.J.Schmidt, C.E.Clarkson, J.Grassman, M.H.Goodrow, A.Lucas, B.D.Hammock, J.M.Van Emon, R.J.White. In *Immunoassays for Trace Chemical Analysis: Monitoring Toxic Chemicals in Humans, Food and Environment, V. 451.ACS Symposium Series*. (Eds M.Vanderlaan, L.H.Stanker, B.E.Watkins, D.W.Roberts). American Chemical Society, Washington DC, 1991. P.59
25. A.D.Lucas, H.K.M.Bekheit, M.H.Goodrow, A.D.Jones, S.Kullman, F.Matsumura, J.E.Woodrow, J.N.Seiber, B.D.Hammock. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1523 (1993)
26. M.T.Muldoon, G.F.Fries, J.O.Nelson. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 322 (1993)
27. P.Tijssen. In *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, V. 15, Practice and Theory of Enzyme Immunoassay*. (Eds. R.H.Burdon, P.H.Knippenberg). Elsevier Verlag, Amsterdam, 1985
28. B.Dunbar, B.Riggle, G.Niswender. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 433 (1990)
29. T.S.Lawruk, C.E.Lachman, S.W.Jourdan, J.R.Fleeker, D.P.Herzog, F.M.Rubio. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 747 (1993)
30. R.J.Bushway, B.Perkins, S.A.Savage, S.J.Lekousi, B.S.Ferguson. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **40**, 647 (1988)
31. R.J.Bushway, B.Perkins, S.A.Savage, S.J.Lekousi, B.S.Ferguson. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **42**, 899 (1989)
32. R.J.Bushway, L.B.Perkins, H.L.Hurst, B.S.Ferguson. *Food Chemistry*, **43**, 283 (1992)
33. K.S.Goh, J.Hernandez, S.J.Powell, C.D.Greene. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **45**, 208 (1990)
34. K.S.Goh, J.Hernandez, S.J.Powell, C.Garretson, J.Troiano, M.Ray, C.D.Greene. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **46**, 30 (1991)
35. E.M.Thurman, M.Meyer, M.Pomes, C.A.Perry, A.P.Schwab. *Anal. Chem.*, **62**, 2043 (1990)
36. R.J.Bushway, B.Perkins, L.Fukal, R.O.Harrison, B.S.Ferguson. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **21**, 365 (1991)
37. R.J.Bushway, H.L.Hurst, B.Perkins, L.Tian, C.G.Cabanillas, B.E.S.Young, B.S.Ferguson, H.S.Jennings. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **49**, 1 (1992)
38. F.M.Rubio, J.A.Itak, A.M.Scutellaro, M.Y.Selisker, D.P.Herzog. *Food Agric. Immunol.*, **3**, 113 (1991)
39. R.J.Schneider, B.D.Hammock. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 525 (1992)
40. C.Wittmann, B.Hock. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1194 (1991)
41. S.Wuest, U.Doht, T.Giersch, C.Wittmann, B.Hock. *GIT Fachz. Lab.*, **34**, 99 (1990)
42. J.-M.Schlaeppli, W.Fory, K.Ramsteiner. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 1532 (1989)
43. C.Wittmann, B.Hock. *Food Agric. Immunol.*, **2**, 65 (1990)
44. C.Wittmann, B.Hock. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1795 (1993)
45. Пат. 4530786 США (1985)
46. S.J.Huber, B.Hock. *GIT Fachz. Lab.*, **10**, 969 (1985)
47. C.Wittmann, B.Hock. *Food Agric. Immunol.*, **1**, 211 (1989)
48. M.J.Wraith, D.W.Britton. *Brighton Crop Protection Conference - Pests and Diseases (1)*. British Crop Protection Council, London, 1988. P.131
49. K.M.Robotti, J.K.Sharp, P.R.Ehrmann, L.J.Brown, B.W.Hermann. In *Abstracts of Papers Presented at 192nd ACS National Meeting*. American Chemical Society, Washington DC, 1986. AGRO 42
50. P.A.Schulze, P.D.Capel. *Utility and Limitations of Immunoassay Tests as a Field Screening Method for Triazine Herbicides. Paper Presented at U.S. Geological Survey's 2nd National Symposium on Water Quality*, Orlando, FL, Nov. 12–17, 1989
51. G.K.Stearman, V.D.Adams. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **48**, 144 (1992)
52. R.J.Schneider, L.Weil, R.Niessner. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **46**, 129 (1992)
53. B.Hock. *Anal. Lett.*, **24**, 529 (1991)
54. P.Ulrich, M.Weller, L.Weil, R.Niessner. *Vom Vasser*, **76**, 251 (1991)
55. A.D.Lucas, P.Schneider, R.O.Harrison, J.W.Biggar, D.E.Rolston, J.N.Seiber, B.D.Hammock. *Food Agric. Immunol.*, **3**, 155 (1991)
56. K.S.Goh, S.J.Richman, J.Troiano, C.L.Garretson, J.Hernandez, J.Hsu, J.White, T.A.Barry, M.Ray, D.Tran, N.R.Miller. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **48**, 554 (1992)
57. A.D.Lucas, A.D.Jones, M.H.Goodrow, S.G.Saiz, C.Blewett, J.N.Seiber, B.D.Hammock. *Chem. Res. Toxicol.*, **6**, 107 (1993)
58. T.Giersch. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1006 (1993)
59. M.Bocher, T.Giersch, R.D.Schmid. *J. Immunol. Methods*, **151**, 1 (1992)
60. M.G.Weller, L.Weil, R.Niessner. *Mikrochim. Acta*, **108**, 29 (1992)
61. R.J.Schneider, L.Weil, R.Niessner, J.Fresenius. *Anal. Chem.*, **343**, 145 (1992)
62. G.W.Aherne. *Anal. Proc.*, **27**, 100 (1986)
63. A.Hardcastle, G.W.Aherne, V.Marks. *J. Biolumin. Chemilumin.*, **2**, 209 (1988)
64. P.Ulrich, R.Niessner. *Fres. Envir. Bull.*, **1**, 22 (1992)
65. P.Ulrich, L.Weil, R.Niessner. *Fres. J. Anal. Chem.*, **343**, 50 (1992)
66. M.G.Weller, L.Weil, R.Niessner. *Fres. J. Anal. Chem.*, **343**, 51 (1992)
67. N.J.Seare, J.N.Miller, E.R.Cole, A.J.Samuel, A.P.Woodbridge. *Anal. Proc.*, **23**, 220 (1986)
68. G.G.Guilbault, B.Hock, R.Schmid. *Biosensors Bioelectronics*, **7**, 411 (1992)
69. P.Kramer, R.Schmid. *Biosensors Bioelectronics*, **6**, 239 (1991)
70. F.F.Bier, W.Stocklein, M.Bocher, U.Bilitewski, R.D.Schmid. *Sens. Act.*, **B7**, 509 (1992)
71. R.Jockers, F.F.Bier, R.D.Schmid. *J. Immunol. Methods*, **163**, 161 (1993)
72. B.B.Kim, E.V.Vlasov, P.Miethe, A.M.Egorov. *Anal. Chim. Acta*, **280**, 191 (1993)
73. Ж.В.Самсонова, А.М.Егоров, С.А.Еремин. *Агрохимия*, (1), 95 (1994)
74. Ж.В.Самсонова, С.А.Еремин, А.М.Егоров, М.Франек. *Биоорганическая химия*, **10**, (1994)
75. S.Wust, B.Hock. *Anal. Lett.*, **25**, 1025 (1992)

THE IMMUNOCHEMICAL ASSAYS OF S-TRIAZINE HERBICIDES

S.A.Eremin, J.V.Samsonova, A.M.Egorov

Chemical Department, M.V.Lomonosov Moscow State University

Vorob'evy Gory, 119899 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)939–2742

Review of last 10 years' papers for development of immunoassay methods of *s*-triazine herbicides is given. The optimisation of enzyme immunoassays and its application for detection of *s*-triazine herbicides in different probes (water, soil, food et al) are discussed.

Bibliography — 75 references.

Received 28th April 1994