

TEXTE 41/01

UMWELTFORSCHUNGSPLAN DES BUNDESMINISTERIUMS FÜR UMWELT,
NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT
- Wasserwirtschaft -

Forschungsbericht 298 22 242
UBA-FB 000194

Validierung neuer kostengünstiger Nachweisverfahren (Immunoassay) für Pestizide

Dr. Rudolf J. Schneider

Agrikulturchemisches Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Institutsleiter **Prof. Dr. Heiner E. Goldbach**

unter Mitarbeit von

PD Dr. habil. Steffen Uhlig

quo data GmbH, Dresden

Dipl.-Ing. agr. Martina Becher

Agrikulturchemisches Institut, Universität Bonn

Zusammenfassung

Im F+E-Vorhaben wurde ein Validierungskonzept für Immunoassays, einem kostengünstigen Nachweisverfahren, erarbeitet und als Anwendungsbeispiel die Validierung eines ELISA-Testkits für das Getreideherbizid Isoproturon durchgeführt.

Das Vorhaben griff damit eine wichtige Problematik auf, da über den Nutzen immunchemischer Nachweisverfahren in der Umweltanalytik zwar Konsens besteht, es leider aber an validierten Testmethoden mangelt bzw. überhaupt keine allgemein anerkannten und praktikablen Validierungskonzepte vorliegen.

Die Grundlage für die Validierungsuntersuchungen war das Messunsicherheitskonzept (EURACHEM, 1998). Das Ergebnis sollte ein Konzept zur

laborinternen Validierung (in-house validation) sein, welches direkt in Qualitätssicherungsprozeduren analytischer Laboratorien Eingang finden könnte.

In einer Vorstudie am Umweltbundesamt hatte sich ergeben, dass Matrixeffekte (Schwermetalle, Tenside und Huminsäuren etc.) nur einen geringen Einfluss auf das Ergebnis des geprüften Immunassays für die Bestimmung von Isoproturon in Wasser hatten. Daher wurden Matrixeffekte in dieser Studie nicht systematisch, sondern anhand der Analyse von Realproben und Vergleich der Ergebnisse mit einem chromatographischen Referenzverfahren (HPLC/UV gemäß DIN EN ISO 11369:1997) erfaßt.

Relevante Varianzfaktoren für eine erste Versuchsreihe wurden aus einem bereits vorliegenden Datensatz von über 250 Platten eines Triazin-ELISAs isoliert (Typ B-Ermittlung von Unsicherheit nach dem EURACHEM-Guide). Anhand dieser Daten wurde ein Modell für die deskriptive Analyse der Kalibrierfunktion erarbeitet. Es zeigte sich, dass als Schätzwert für die Unsicherheit des Konzentrationsergebnisses die Streuung (Standardabweichung) der logarithmierten optischen Dichte, $\ln(OD)$, verwendet werden kann.

Als wichtigste Varianzkomponenten (uncertainty components) innerhalb einer Platte wurden die Raumtemperatur als auch die Position der Probe bzw. der Kalibrierstandards auf der Platte ermittelt.

In den Experimenten "Temperatur" und "Trend" wurden diese Unsicherheitsfaktoren quantifiziert, wobei die Effekte auch in ihren Wechselwirkungen durch einen hierarchisch geschachtelten fraktionierten faktoriellen Versuchsplan untersucht wurden (Typ A-Ermittlung von Unsicherheit). Zur Minimierung ihres Einflusses empfiehlt sich ein Arbeiten bei relativ niedriger Raumtemperatur ($< 19\text{ }^{\circ}\text{C}$), in einem klimatisierten Raum, ein weitgehend randomisierter Probenauftrag sowie die Einhaltung eines definierten Zeitschemas beim Probenauftrag, damit eine rechnerische Kompensation der Ortsabhängigkeit der Ergebnisse quer über die Mikrotiterplatte möglich wird. Ein mathematisches Modell hierzu wurde entwickelt.

Aufgrund der Erfahrungen in den ersten Experimenten wurden in einer weiteren Versuchsreihe der Einfluß des Personals und bestimmter technischer Hilfsmittel untersucht. Die Qualifikation und die Erfahrung des Personals im Arbeiten mit Immunoassays hatte einen signifikanten Einfluss auf das Analysenergebnis. Der Einsatz eines automatischen Washers und von Mikroliterpipetten verringerten die Streuung der Analysenergebnisse und werden deshalb für den Routineeinsatz empfohlen.

Parallel dazu wurden in zwei Messkampagnen Oberflächengewässerproben untersucht. Hier ergab sich eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse des ELISA-Tests mit dem Referenzverfahren. Matrixeffekte und größere systematische Abweichungen waren nicht nachweisbar.

Es wurde ferner ein In-house Validierungskonzept in mehreren Schritten vorgeschlagen, welches ein Kalibrierungsmodell beinhaltet, das über die 4-Parameter-Funktion hinausgeht. Es liefert darüber hinaus eine Übersicht über Stör- und Einflußfaktoren mit einer Abschätzung ihres Beitrages zur Messunsicherheit und eine Powerfunktion, die Auskunft darüber gibt, in welchem Konzentrationsbereich ein statistisch abgesichertes Ergebnis erhalten werden. Es erlaubt ebenso die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze.

Abstract

Within the framework of the project a generalised concept for performing in-house validation studies of immunoassays which is based on the concept of uncertainty of measurement has been set up. The efficiency of the concept has been demonstrated by validation of a commercially available ELISA test for the quantitative determination of the grain herbicide isoproturon in water. The variance of the logarithm of the optical density ($\ln OD$) has been chosen for estimating the uncertainty of the analytical results. As important components of variance have been ascertained room temperature, the position of the sample on the plate, the skill of the operator and the type of equipment used (pipettes vs dropper bottles, automated washer vs washing by hand). The resulting uncertainties were quantified, being considered in their interactions and partly mathematically compensated. Matrix effects have been studied with real samples (mainly surface water) by comparison of the results of the ELISA test with that of HPLC analysis and can be regarded as non-relevant. As a result of the study a multi-step validation concept is proposed, which implies a calibration model which leads beyond the 4-parameter function usually applied. It gives an overview on most important components of variance and an estimate of their contribution to the overall uncertainty, a power function which indicates from what concentration on a statistically sound result can be expected and the possibility of calculating the limit of detection and the limit of determination as a function of experimental conditions.