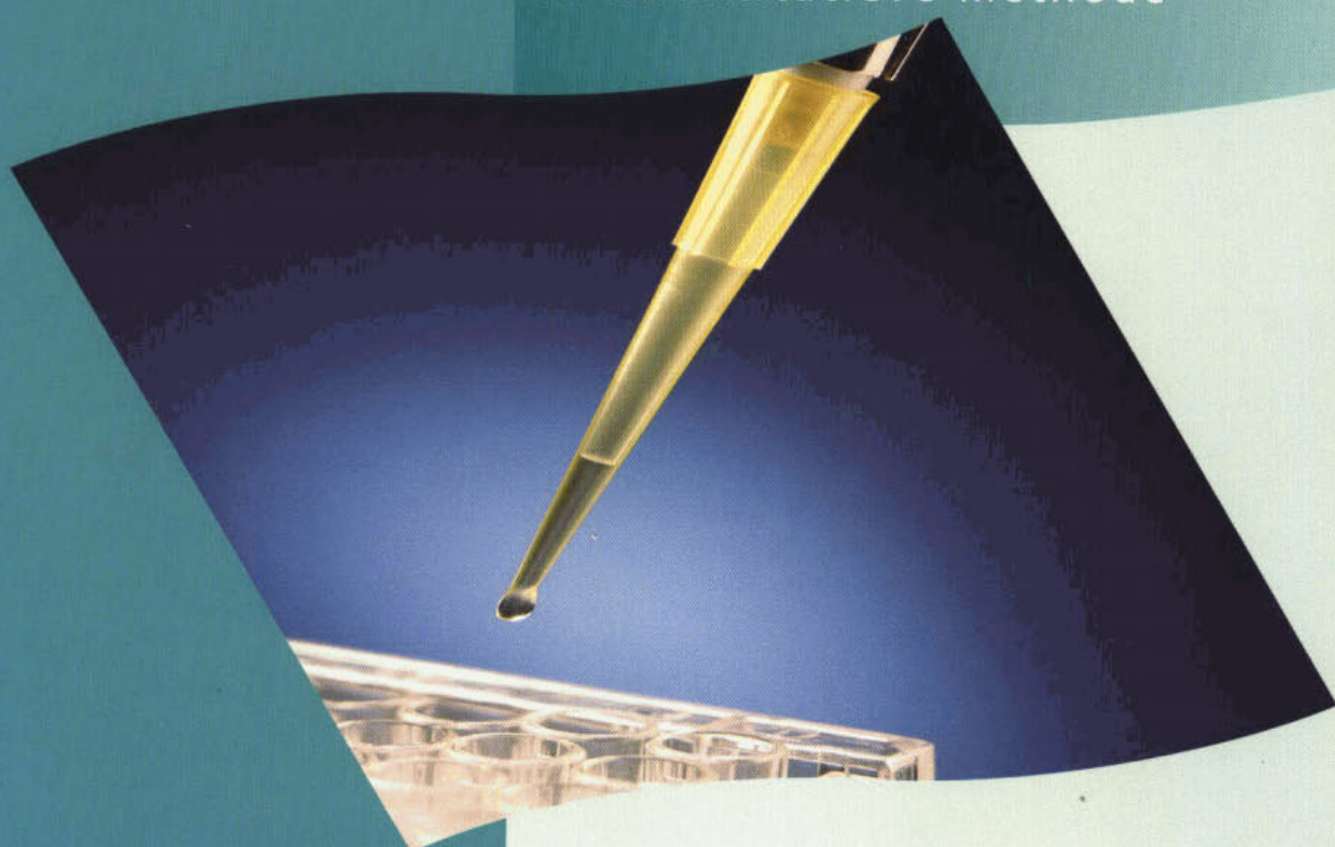


**Indicatieve analytische methoden en groeps- en
sompparameters voor de bepaling
van waterkwaliteit**

*Evaluatie van de toepasbaarheid
van de immunoassaymethode als indicatieve
en kwantitatieve methode*



98

25

**Indicatieve analytische methoden en groeps- en
sompparameters voor de bepaling
van waterkwaliteit**

*Evaluatie van de toepasbaarheid
van de immunoassaymethode als indicatieve
en kwantitatieve methode*

Arthur van Schendelstraat 816

Postbus 8090, 3503 RB Utrecht

Telefoon 030 232 11 99

Fax 030 232 17 66

E-mail stowa@stowa.nl

Publicaties en het publicatie-
overzicht van de STOWA kunt u
uitsluitend bestellen bij:

Hageman Verpakkers BV

Postbus 281

2700 AC Zoetermeer

tel. 079 - 361 11 88

fax. 079 - 361 39 27

o.v.v. ISBN- of bestelnummer en
een duidelijk afleveradres.

ISBN 90.5773.035.9

98

25

INHOUD

TEN GELEIDE

SAMENVATTING

1 INLEIDING 1

2 UITVOERING 3

2.1 INLEIDING	3
2.2 VELDMONSTERS	4
2.3 ANALYSES	4
2.4 INDICATIEVE ANALYSE	5
2.5 STATISTISCHE VERGELIJKING	6

3 RESULTATEN..... 9

3.1 VERGELIJKING VAN DE METHODEN EN DE HIERMEE GEMETEN PARAMETERS ...	9
3.2 DETECTIELIMIETEN EN REPRODUCEERBAARHEID	10
3.2.1 IMMUNOASSAYMETHODE	10
3.2.2 CHROMATOGRAFISCHE METHODEN	11
3.3 CARBENDAZIM.....	11
3.3.1 ANALYSERESULTATEN.....	11
3.3.2 INDICATIEVE ANALYSE.....	14
3.3.3 KWANTITATIEF.....	15
3.4 FUH'S	16
3.4.1 ANALYSERESULTATEN.....	16
3.4.2 INDICATIEF	19
3.4.3 KWANTITATIEF.....	19
3.5 ISOPROTURON.....	20
3.5.1 ANALYSERESULTATEN.....	20
3.5.2 INDICATIEF	22
3.5.3 KWANTITATIEF.....	23
3.6 TRIAZINEN	24
3.6.1 ANALYSERESULTATEN.....	24
3.6.2 INDICATIEF	26
3.6.3 KWANTITATIEF.....	27

4 DISCUSSIE, CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN..... 28

4.1 DISCUSSIE	28
4.1.1 INDICATIEF	28
4.1.2 KWANTITATIEF.....	29
4.2 CONCLUSIES.....	30
4.3 AANBEVELINGEN	30

5 LITERATUUR..... 33

6 VERKLARING VAN DE GEBRUIKTE AFKORTINGEN 35

BIJLAGEN

Bijlage 1: Overige tabellen

Bijlage 2: Gebruiksgegevens van de bestrijdingsmiddelen

Bijlage 3: Wilcoxon Signed Rank toets

Bijlage 4: De immunoassay als screeningsmethode (E.M. Meulenberg)

TEN GELEIDE

In het waterbeheer zijn steeds vaker dure en gecompliceerde analysetechnieken noodzakelijk om te voldoen aan alle eisen. Vooral bij routinemetingen zou een indicatieve vooranalyse een belangrijke verbetering betekenen; daarmee kan een eerste scheiding worden aangebracht tussen 'verdachte' en 'onverdachte' monsters. Voor de laatste categorie kunnen de dure analyses dan wellicht achterwege blijven. Kansrijke indicatieve analysetechnieken zijn o.a. immunoassaytechnieken, chemische indicatoren en selectieve bioassays. Daarnaast kan in bepaalde situaties mogelijk worden volstaan met de bepaling van groeps- en somparameters, dan wel met breed screenende technieken. Uitgangspunt voor de introductie van dergelijke technieken is het huidige en het toekomstige analysepakket van de waterbeheerders.

Om die reden heeft de STOWA opdracht gegeven aan het International Centre of Water Studies (ICWS), om in samenwerking met AquaSense, Elti Support en KIWA een studie uit te voeren naar geschikte indicatieve analytische methoden en groeps- en somparameters voor de bepaling van de waterkwaliteit. Het derde product van deze studie is een evaluatie van de toepasbaarheid van de immunoassaymethode als indicatieve en kwantitatieve methode. Daartoe zijn in een aantal veldmonsters de gehalten van een aantal (groepen van) bestrijdingsmiddelen bepaald met behulp van de immunoassaymethode en chromatografische methoden (HPLC en GC). De immunoassays zijn uitgevoerd op de laboratoria van een drietal waterbeheerders.

Dit onderdeel van het project is uitgevoerd door het International Centre of Water Studies (ICWS) met medewerking van Elti Support. Het projectteam bestond uit ing. L.G. de Vree, prof.dr. J. Dogterom (ICWS) en mw.dr. P.M.M. Meulenberg (Elti Support).

Het project is begeleid door een door het bestuur van de STOWA ingestelde begeleidingscommissie bestaande uit drs. R. Massee (Hoogheemraadschap van Uitwaterende Sluizen in Hollands Noorderkwartier) als voorzitter, dhr. H. van den Berg (Zuiveringsschap West-Overijssel), dhr. B. Eshuis (Waterschap Regge & Dinkel), dr. S.P. Klapwijk (STOWA), mw. dr. A. Houben (RIZA), dhr. P.J. van der Wee (Hoogheemraadschap van Rijnland) en drs. D. de Zwart (RIVM) als leden.

Namens de opdrachtgever, de uitvoerders en de begeleidingscommissie spreek ik de hoop uit dat deze studie zal leiden tot een vermindering of een mindere groei van de uitgaven aan analytisch-chemisch onderzoek in het Nederlandse waterbeheer.

Utrecht, februari 1998

De directeur van de STOWA,

drs. J.F. Noorthoorn van der Kruijff

SAMENVATTING

In het onderhavige rapport wordt verslag gedaan van de derde fase van het onderzoek 'Indicatieve analytische methoden en groeps- en somparameters'. In dit onderzoek wordt de toepasbaarheid van de immunoassaymethode als indicatieve en kwantitatieve methode geëvalueerd. Daartoe zijn in een aantal veldmonsters de gehalten van een aantal (groepen van) bestrijdingsmiddelen bepaald met behulp van de immunoassaymethode en chromatografische methoden (HPLC en GC). Met behulp van statistische toetsen worden de analyseresultaten van beide methoden geëvalueerd.

Uit dit onderzoek kan worden geconcludeerd, dat de immunoassaymethode geschikt is om als indicatieve methode te worden ingezet voor de bepaling van de aanwezigheid van carbendazim, FUH's, isoproturon en triazinen. De methode is eveneens geschikt voor kwantitatieve analyses voor carbendazim en FUH's. Over de betrouwbaarheid van de immunoassay als kwantitatieve methode kan op basis van dit onderzoek geen uitspraak worden gedaan. In dit onderzoek kan geen uitspraak gedaan worden over de geschiktheid van de isoproturonkit voor kwantitatieve analyses, omdat vrijwel alle analyseresultaten van de immunoassaykit en de HPLC-analyses onder of vlak boven de detectielimiet gelegen zijn. De in dit onderzoek gebruikte High-sensitivity kit voor triazinen is ongeschikt voor het gebruik als kwantitatieve methode.

Met de immunoassaymethode als indicatieve selectiemethode of zelfs als alternatieve kwantitatieve kan een (substantiële) kostenverlaging in de analysekosten gerealiseerd worden voor de waterkwaliteitsbeheerders. Dit rapport beoogt een basis te bieden aan de waterkwaliteitsbeheerders voor het gebruik en eventueel voor verdere ontwikkeling van de immunoassaymethode als indicatieve en kwantitatieve analysemethode.

1 INLEIDING

Voor het meten van de waterkwaliteit worden hoge eisen aan de toe te passen analysemethoden gesteld. Zo wordt verwacht dat een methode robuust is, selectief de gezochte verbinding(en) aantoonst, de monstermatrix geen invloed heeft op de resultaten van de bepaling en dat de detectielimieten beneden de AMK-normen liggen. Tevens wordt van een analysemethode verwacht dat de herhaalbaarheid en de reproduceerbaarheid groot zijn. Tot heden blijken om aan deze voorwaarden te kunnen voldoen dure, gecompliceerde en tijdrovende analysemethoden noodzakelijk te zijn. Niet zelden blijkt daarbij dat de gezochte verbinding niet aangetoond kan worden.

Vooraf ten behoeve van routinemetingen zou een indicatieve (voor)analyse een belangrijke verbetering betekenen. Hiermee kan een eerste scheiding worden uitgevoerd tussen 'verdachte' en 'onverdachte' monsters. Voor de laatste categorie kunnen de dure selectieve analyses achterwege blijven. De immunoassaymethode is één van de technieken die in toenemende mate interessante mogelijkheden biedt als indicatieve analysetechniek.

In 1994 is door de STOWA het project 'Indicatieve analytische methoden en groeps- en somparameters voor de bepaling van de waterkwaliteit' gestart. Dit project was onderverdeeld in drie fasen die als zelfstandige deelprojecten achtereenvolgens zijn uitgevoerd.

Tijdens fase 1 van het project is destijds een zo breed mogelijk scala aan potentieel bruikbare indicatieve analysemethoden geïnventariseerd. Uit deze inventarisatie bleken de immunoassays (IA's) en de HPLC-fingerprintmethode de meest belovende technieken te zijn (STOWA, 1996). Deze twee methoden zijn vervolgens in fase 2 getest op onder andere gevoeligheid, betrouwbaarheid, matrixeffecten en storingsgevoeligheid. De HPLC-fingerprintmethode blijkt volgens deze studie echter te gevoelig voor matrixeffecten te zijn (STOWA, 1997).

In fase 3 van dit project wordt aandacht besteed aan het toepassen en implementeren van immunoassays. Hierbij zijn de volgende doelstellingen geformuleerd:

- 1 Kan de immunoassaymethode worden ingezet als indicatieve analysemethode? Dat wil zeggen: kunnen met behulp van de immunoassaymethode de monsters op kwalitatieve basis gescheiden worden in 'verdachte' en 'onverdachte' monsters?
- 2 Kan de immunoassaymethode als kwantitatieve methode worden toegepast?

Een verdere evaluatie van de immunoassaymethode op grond van de resultaten van fase 1 en fase 2 is uitgevoerd door in een aantal veldmonsters de gehalten van een aantal (groepen van) bestrijdingsmiddelen te bepalen met behulp van immunoassays en met behulp van chromatografische methoden (HPLC en GC). De resultaten van beide analysemethoden worden met behulp van statistische toetsen vergeleken en geëvalueerd.

De resultaten van het veldonderzoek en de evaluatie hiervan zijn in de hierna volgende hoofdstukken beschreven. In hoofdstuk 2 wordt de aanpak van het project toegelicht en in hoofdstuk 3 de resultaten. In hoofdstuk 4 worden de conclusies en aanbevelingen van het onderzoek beschreven.

2 UITVOERING

2.1 INLEIDING

Het project 'Indicatieve analytische methoden en groeps- en somparameters voor de bepaling van de waterkwaliteit' startte met een inventarisatie naar een zo breed mogelijk scala aan potentieel bruikbare analytische methoden. Daarbij werd aandacht besteed aan aspecten als:

- 1 zinvolheid van de technieken als screeningsmethode voor algemene, dan wel specifieke aspecten van de waterkwaliteit;
- 2 gevoeligheid van de methode voor de verbindingen waar deze betrekking op heeft;
- 3 kans op succesvolle toepassing door uitvoerende laboratoria (storingsgevoeligheid, bewerkelijkheid);
- 4 (commerciële) beschikbaarheid van apparatuur;
- 5 kosten (apparatuur, verbruiksgoederen).

Op basis van de resultaten van fase 1 zijn de immunoassay- en de HPLC-fingerprintmethode geselecteerd als methoden voor vervolgonderzoek (STOWA, 1996). Gebleken is dat de HPLC-fingerprintmethode als methode voor de bepaling van groepsparameters te gevoelig is voor matrixeffecten. Om deze reden en ook vanwege de kosten werd de fingerprintmethode minder geschikt geacht (STOWA, 1997).

In dit onderzoek wordt de immunoassaymethode geëvalueerd door voor een beperkt aantal monsters en een beperkt aantal parameters te toetsen of de methode in principe bruikbaar is om als indicatieve methode of als kwantitatieve methode te worden toegepast.

Deze evaluatie is uitgevoerd met vier (groeps)parameters, namelijk carbendazim¹, fenylureumherbiciden (verder aangeduid met FUH), isoproturon en triazinen. Daartoe zijn door de laboratoria van de waterbeheerders in de Begeleidingscommissie voor elke (groeps)parameter tien veldmonsters genomen op tien vooraf geselecteerde monsterpunten. In deze veldmonsters zijn vervolgens de geselecteerde groepen van bestrijdingsmiddelen geanalyseerd met behulp van immunoassays en met behulp van de chromatografische methoden. De resultaten van beide analysemethoden zijn statistisch getoetst.

Als gevolg van de beperkte opzet van dit onderzoek zijn geen blanco en duplo monsters afgevuld en is er geen gebruik gemaakt van gespikete monsters.

¹ De carbendazimkit werd gekozen ter vervanging van de cyclodienenkit, omdat cyclodienen niet in de monsters verwacht werden. Carbendazim wordt enerzijds regelmatig aangetroffen in het oppervlaktewater en anderzijds was deze kit beschikbaar.

2.2 VELDMONSTERS

Bij de keuze van de monsterpunten voor de veldmonsters is getracht een zo breed mogelijk bereik aan monstermatrices af te dekken. Daarbij is onder andere rekening gehouden met de concentratie aan humeuze materialen, de buffercapaciteit en pH-waarde en de (totaal)concentratie aan macro-ionen. Met behulp van beschikbare meetseries van de te onderzoeken bestrijdingsmiddelen is een keuze gemaakt van monsterlocaties, die verdeeld zijn over de beheersgebieden van de deelnemende waterkwaliteitsbeheerders.

In totaal zijn 19 locaties betrokken in het onderzoek. Voor elke (som)parameter zijn hieruit tien locaties geselecteerd. De gegevens van de locaties en de uitgevoerde analyses per locatie zijn weergegeven in Tabel 14 van bijlage 1. Omdat het voorkomen van bestrijdingsmiddelen in het oppervlaktewater sterk afhankelijk is van de neerslag, heeft de monsternamen na enkele dagen (intensieve) neerslag plaatsgevonden. Alle monsters zijn in week 24 en 25 van 1997 verzameld. De monsters zijn volgens standaardprocedures van de laboratoria van de betrokken waterkwaliteitsbeheerders genomen. Per locatie zijn tenminste zeven liter monster verzameld. Om goede mengmonsters te garanderen, zijn de monsters per locatie gemengd, voordat de deelmonsters zijn afgevuurd. Hierbij is gebruik gemaakt van een RVS-mengvat. Drie laboratoria van de vier aan dit project deelnemende waterkwaliteitsbeheerders en het laboratorium van Omegam hebben elk een identieke set van 10 monsters ontvangen.

2.3 ANALYSES

Immunoassays

De keuze van de (som)parameters is gevallen op fenylureumherbiciden (FUH), triazinen, isoproturon en carbendazim. De FUH- en triazinekit betreft kwantitatieve groepstesten. De isoproturonkit en feitelijk ook de carbendazimkit (zie § 3.1) zijn stofspecifiek en kwantitatief. Alle gebruikte immunoassaykits zijn afkomstig van SDI Europe, Hampshire, Engeland (SDI heeft alle kits van Millipore en Baker overgenomen). In de voorgaande rapportages zijn de eigenschappen van deze kits nader toegelicht (STOWA, 1996 en 1997).

Immunoassaykits kunnen ontwikkeld zijn als stofspecifiek, waarbij het antilichaam specifiek is voor slechts één verbinding, de hoofdcomponent; of als groepspecifiek, waarbij het antilichaam specifiek is voor een groep van verbindingen, waarvan de chemische structuren grote overeenkomsten vertonen met de hoofdcomponent. De mate waarin andere verbindingen, dan de hoofdcomponent, reageren met het antilichaam in de kit en kunnen bijdragen aan de gevonden waarden, wordt de kruisreactiviteit genoemd. De reactiviteit van de hoofdcomponent wordt hierbij op 100% gesteld. In Tabel 15 van bijlage 1 is van elke kit de kruisreactiviteit weergegeven.

Alle monsters zijn door drie laboratoria, van de vier aan dit project deelnemende waterkwaliteitsbeheerders, met behulp van de immunoassaymethode geanalyseerd. Alle analyses hebben in week 26 plaatsgevonden. Voor iedere immunoassaykit zijn alle monsters in 2 meetreeksen en per meetreeks in triplo geanalyseerd. Elti Support heeft aan de hand van de ruwe gegevens van de laboratoria de gemeten waarden berekend met behulp van de vier-parametrische logit-log transformatie (zie STOWA, 1997). De resultaten van de meetreeksen zijn gerapporteerd.

Chromatografische methoden

De veldmonsters zijn eveneens met behulp van chromatografische methoden geanalyseerd op de genoemde stofgroepen. Aangezien met de immunoassaymethode geen onderscheid gemaakt kan worden tussen de doelstoffen en een aantal verwante verbindingen, dient het screeningspakket van de traditionele methode(n) uitgebreid te worden om ook deze mogelijk storende componenten te kunnen inventariseren. Daarbij is expliciet een zo breed mogelijk pakket aan fenylureumherbiciden, triazinen en carbendazim beoogd. De relevante bestrijdingsmiddelen worden afgedekt met het volgende pakket aan analytische methoden (STOWA, 1997):

- HPLC/DAD voor de fenylureumherbiciden, inclusief isoproturon;
- GC/MS (N,P-detectie) voor de triazinen;
- LC-analyse voor polaire bestrijdingsmiddelen met off-line extractie (HPLC/DAD) voor carbendazim

In Tabel 16 van bijlage 1 is weergegeven welke (som)parameters met behulp van de immunoassaymethode en welke met behulp van bestaande methoden kunnen worden geanalyseerd.

De chromatografische analyses zijn door het onafhankelijke en Sterlab gecertificeerde laboratorium van Omegam uitgevoerd. De immunoassayanalyses en (de extracties ten behoeve van) de chromatografische analyses zijn in week 26 uitgevoerd.

2.4 INDICATIEVE ANALYSE

De eerste doelstelling van dit onderzoek is de vraag of met behulp van immunoassaykits voor de geselecteerde (som)parameters een indicatieve selectie kan worden gemaakt in 'verdachte' en 'onverdachte' monsters. Om een antwoord op deze vraag te kunnen geven, zijn de monsters geteld die met de immunoassaymethode 'positief' scoren en waarvan de resultaten van de chromatografische analyses eveneens 'positief' zijn. Tevens zijn de monsters geteld die met beide methoden 'negatief' scoren en zijn de monsters geteld waarvan één van beide methoden negatief scoort en de andere methode 'positief'. In dit verband wordt een positief analyseresultaat beschouwd als een concentratie boven en een negatief resultaat als een concentratie onder de detectielimiet.

Een ander criterium om de bruikbaarheid van de immunoassaymethode als indicatieve methode te toetsen, is de EG-norm voor bestrijdingsmiddelen voor het gebruik van oppervlaktewater als bron voor drinkwater. Deze norm is voor individuele bestrijdingsmiddelen vastgesteld op 0.1 µg/l en voor groepsanalyses voor bestrijdingsmiddelen op 0.5 µg/l. In dit kader worden 'verdachte' monsters gedefinieerd als monsters waarvan de gemeten concentratie hoger is dan, of gelijk is aan de norm en 'onverdachte' monsters als monsters waarvan het gemeten gehalte onder de norm is.

Op identieke wijze, zoals hierboven voor de detectielimieten is beschreven, zijn nu de monsters geteld die met beide of één van beide methoden 'positief' dan wel 'negatief' scoren. In dit verband wordt een positief analyseresultaat beschouwd als een concentratie boven of gelijk aan en een negatief resultaat als een concentratie onder de EG-norm.

Bij bovenbeschreven toetsingen is onderscheid gemaakt tussen de individuele resultaten van de immunoassaykits van alle laboratoria en de gemiddelde waarden per monster. In deze toetsing zijn de individuele resultaten van de immunoassaykits die het maximum van het meetbereik overschrijden, meegenomen. Hoe bij het berekenen van de gemiddelde waarden de detectielimieten en overschrijdingen van de maxima van de meetbereiken behandeld zijn, is uiteengezet in § 3.2.1.

2.5 STATISTISCHE VERGELIJKING

De tweede vraagstelling van dit onderzoek is aan te tonen dat de immunoassaymethode als (semi-)kwantatieve methode in plaats van de chromatografische methoden kan worden gebruikt voor de geselecteerde (som)parameters. Deze vraagstelling kan worden beantwoord met behulp van statistische methoden. Omdat het hier een indicatief onderzoek betreft, dat derhalve met een beperkt aantal monsters is uitgevoerd, is gekozen voor de non-parametrische (verdelingsvrije) Wilcoxon Signed Rank toets, omdat deze toets geen eisen stelt aan de verdeling van de data. De randvoorwaarden en uitvoering van deze toets worden in bijlage 3 nader toegelicht.

Met behulp van de Wilcoxon toets (zie bijlage 3) zijn de resultaten van de immunoassays getoetst aan de chromatografische methoden. Per (som)parameter zijn de toetsen op drie manieren uitgevoerd.

- 1 Per monster zijn de gemiddelden van de immunoassayresultaten van alle laboratoria (in totaal zes resultaten per monster) vergeleken met de resultaten van de chromatografische methoden. Omdat er in totaal tien monsters zijn, worden op deze wijze tien gemiddelde waarden getoetst aan de tien resultaten van de chromatografische methode (bijvoorbeeld in Tabel 4: $N=10$, onder 'Type analyse'='gemiddelde'). Dit is statistisch gezien de meest zuivere methode, omdat voor alle (som)parameters de gemiddelden van de resultaten van de immunoassaymethode in een één op één situatie kunnen worden getoetst aan de resultaten van de chromatografische methoden.
- 2 Alle resultaten van de immunoassaymethode zijn samengevoegd in één steekproef. Hierbij wordt gebruik gemaakt van alle beschikbare resultaten, waardoor een zo groot mogelijke steekproefomvang wordt verkregen. Doordat de laboratoria voor elke immunoassaykit twee reeksen hebben geanalyseerd, zijn per (som)parameter zes meetreeksen voor de immunoassaymethode beschikbaar. De chromatografische methode is echter in enkelvoud uitgevoerd. Om gebruik te kunnen maken van alle beschikbare resultaten worden per parameter alle zes reeksen, verkregen met de immunoassaymethode, vergeleken met de reeks afkomstig van de chromatografische methode. Op deze wijze worden 60 resultaten (10 monsters, 3 laboratoria, 2 resultaten per monster) getoetst aan 6×10 resultaten van de chromatografische methoden (zie Tabel 4: $N=60$, onder 'Type analyse'='alle resultaten').
- 3 De resultaten van de immunoassaymethode zijn per deelnemend laboratorium in deelreeksen gesplitst. Met deze variant kan de gevoeligheid voor laboratoriumcondities worden onderzocht. Per laboratorium zijn de twee meetreeksen van elk 10 monsters getoetst aan de reeks afkomstig van de chromatografische methode: per laboratorium 20 resultaten (10 monsters, 2 resultaten per monster per laboratorium), getoetst aan 2×10 resultaten van de chromatografische methoden (zie Tabel 4: $N=20$, onder 'Type analyse'='per laboratorium').

Voor deze drie varianten is getoetst of de resultaten van de immunoassayanalyses gelijk zijn aan de resultaten van de chromatografische methoden. De H_0 - en H_A hypothesen voor deze toetsing luiden derhalve:

H_0 : de steekproeven zijn gelijk

H_A : de steekproeven zijn ongelijk

Bij de beoordeling of de resultaten van beide methoden aan elkaar gelijk zijn, is een betrouwbaarheidsniveau van 90% gehanteerd (het onbetrouwbaarheidsniveau α wordt daarmee 10%). In de tabellen met toetsresultaten (Tabel 4, Tabel 7, Tabel 10 en Tabel 13) wordt de volgende informatie gepresenteerd: het aantal analyseresultaten N waarmee de toets is uitgevoerd, de toetsingsgrootte Z van de toets en de overschrijdingskans P . In de kolom 'Significant gelijk' wordt het resultaat van

de toets geïnterpreteerd op basis van het genoemde betrouwbaarheidsinterval van 90%. De resultaten van beide methoden worden geacht significant aan elkaar gelijk te zijn, wanneer de overschrijdingskans kleiner is dan 10% (100-90%; zie ook bijlage 3).

In deze toetsing zijn de resultaten van de immunoassaykits, die het maximum van het meetbereik overschrijden, niet meegenomen.

3 RESULTATEN

In dit hoofdstuk worden de resultaten van het onderzoek nader toegelicht. Omdat de FUH- en triazinekits groepstesten zijn, wordt in § 3.1 ingegaan op de verschillen, met betrekking tot de te meten componenten tussen de immunoassay- en de chromatografische methoden. In deze paragraaf wordt met name aandacht besteed aan het feit óf er consequenties zijn en zo ja welke, wanneer met de chromatografische methoden componenten niet worden gemeten, waarvoor de immunoassaykits wel gevoelig zijn.

In § 3.2 wordt uiteengezet hoe met de detectielimieten en overschrijdingen van het meetbereik, dit betreft alleen de immunoassaykits, tijdens dit onderzoek is omgegaan. In deze paragraaf wordt tevens summier ingegaan op de reproduceerbaarheid van de methoden. De resultaten van het onderzoek worden vervolgens per (som)parameter toegelicht in § 3.3 tot en met § 3.6 (achtereenvolgens carbendazim, FUH's, isoproturon en tot slot triazinen. Per (som)parameter worden de volgende aspecten toegelicht: de analyseresultaten, de kit als indicatieve selectiemethode en de statistische toetsen met betrekking tot het gebruik van de kit als kwantitatieve methode.

3.1 VERGELIJKING VAN DE METHODEN EN DE HIERMEE GEMETEN PARAMETERS

In Tabel 16 van bijlage 1 is weergegeven of de parameters met beide methoden kunnen worden geanalyseerd. Uit deze tabel blijkt dat van de triazinen prometon wel door de triazinekit wordt gemeten, maar niet in het GC/NPD pakket aanwezig is. De kruisreactiviteit voor prometon in de kit (zie Tabel 15 in bijlage 1) is met 32% redelijk hoog, maar een effect van prometon op de resultaten van de kit is niet te verwachten, omdat prometon niet in Nederland wordt toegepast (Plantenziektenkundige Dienst, 1993). Van de FUH's worden chlooranocryl, chloorbromuron en neburon niet met HPLC geanalyseerd. De kruisreactiviteit in de kit van deze middelen bedraagt respectievelijk 73, 75 en 252%. Evenals voor prometon is hiervan geen effect te verwachten op de resultaten van de FUH-kit, omdat deze stoffen eveneens niet in Nederland worden gebruikt (Plantenziektenkundige Dienst, 1993). Van de componenten die met de carbendazimkit worden bepaald, worden benomyl en 2-benzimidazolylureum niet met HPLC/DAD geanalyseerd. De kruisreactiviteit van deze componenten bedraagt respectievelijk 26 en 16%. In het veld en tijdens de analyse wordt benomyl echter snel omgezet in carbendazim (mondelinge mededeling Omegam). 2-benzimidazolyl is als bestrijdingsmiddel niet toegelaten in Nederland en is ook niet als metaboliet van een ander middel bekend (mondelinge mededeling Omegam). Om deze redenen wordt de carbendazimkit in dit onderzoek als stofspecifiek beschouwd.

De triazine- en FUH-kit zijn groepstesten. Ze meten alleen het totaal van een aantal componenten waarvoor ze gevoelig zijn. De analyseresultaten van de chromatografische methoden voor deze somparameters geven echter de concentraties van een aantal individuele componenten weer. Om de resultaten van beide methoden te kunnen vergelijken, dienen de individuele concentraties, afkomstig van de chromatografische methode, gesommeerd te worden. In Tabel 17 van bijlage 1 zijn de concentraties van de individuele FUH's en triazinen en de gesommeerde gehalten weergegeven. In deze tabel zijn niet de FUH's of triazinen opgenomen die wel met de chromatografische methoden

kunnen worden geanalyseerd, maar waarvoor de immunoassaymethode niet gevoelig is (zie Tabel 16 van bijlage 1).

3.2 DETECTIELIMIETEN EN REPRODUCEERBAARHEID

3.2.1 IMMUNOASSAYMETHODE

Bij de immunoassaymethode wordt de detectielimiet bepaald door de kwaliteit van de ijklijn en geldt de detectielimiet voor alle monsters die met de betreffende ijklijn zijn bepaald. De resultaten van de immunoassaymethode worden weergegeven in Tabel 2, Tabel 5, Tabel 8 en Tabel 11. In deze tabellen worden de analyseresultaten lager dan de detectielimiet met een '<'-teken weergegeven.

Bij de indicatieve en de kwantitatieve toetsen is onderscheid gemaakt tussen de individuele resultaten van de immunoassaykits van alle laboratoria voor elk monster en de gemiddelde waarden per monster. Bij het berekenen van het gemiddelde worden de resultaten onder de detectielimiet vervangen door de halve waarde van de detectielimiet. Het gemiddelde per monster wordt als lager dan de detectielimiet beschouwd wanneer **alle** resultaten van alle laboratoria voor dat monster lager dan de detectielimiet zijn.

Voor de immunoassaymethode bestaan voor de kits ook maximumconcentraties. Dit hangt samen met het maximum van het meetbereik van de kit. De resultaten van de monsters die buiten het maximum van het meetbereik vallen, dienen te worden verworpen, omdat buiten het meetbereik geen uitspraak over de betrouwbaarheid en lineariteit van de ijklijn kan worden gedaan. De maximum concentratieniveaus van de kits zijn weergegeven in onderstaande tabel (tussen haakjes is achter de naam van de kit de standaardcomponent vermeld).

Voor het berekenen van het gemiddelde per monster zijn de analyseresultaten die het maximum van het meetbereik overschrijden niet meegeteld.

De resultaten van de immunoassaykits die het maximum van het meetbereik overschrijden, zijn niet in de grafieken en statistische toetsen meegenomen. Deze resultaten zijn echter wel in de indicatieve beoordeling meegenomen.

<i>Tabel 1: Maximumconcentraties immunoassaykits</i>	
Kit	Max (µg/l)
Carbendazim	10
Isoproturon	0.5
FUH (chloortoluron)	2.0
Triazinen (atrazine)	1

Over de reproduceerbaarheid van de gebruikte immunoassaykits zijn voor gebruik voor waterkwaliteitsonderzoek vooralsnog geen gegevens bekend.

3.2.2 CHROMATOGRAFISCHE METHODEN

De detectielimieten² die bij de chromatografische methoden worden gebruikt, zijn veelal afhankelijk van de matrix. Dientengevolge kunnen ze per monster variëren. De resultaten van de chromatografische methoden worden weergegeven in Tabel 17 van bijlage 1. In deze tabel zijn de analyseresultaten die lager zijn dan de detectielimiet met een '<' -teken weergegeven.

De immunoassaymethoden voor FUH's en triazinen zijn groepstesten. De resultaten van de chromatografische methoden voor de FUH's en triazinen bestaan uit de concentraties van aantal individuele componenten. Zoals in § 3.1 besproken, dienen de resultaten van individuele componenten van de chromatografische methoden te worden gesommeerd om de resultaten van beide methoden te kunnen vergelijken. Bij deze sommatie (zie 'Totaal FUH' en 'Totaal triazinen' in Tabel 17 van bijlage 1) zijn de concentraties onder de detectielimiet vervangen door de halve waarde van de detectielimiet. Bij deze sommatie zijn alleen die componenten betrokken waarvoor in Tabel 15 in bijlage 1 een kruisreactiviteit is vermeld. De som van de FUH's of triazinen voor een monster wordt als lager dan de detectielimiet beschouwd wanneer de concentraties van **alle** componenten lager zijn dan de detectielimiet.

Tenzij anders is vermeld, zijn voor de figuren, tabellen en toetsen in § 3.3 tot en met § 3.6 de resultaten lager dan de detectiegrens vervangen door de halve waarden van de detectiegrens (zie ook § 2.4 en § 2.5).

Een maat voor de nauwkeurigheid van de analysemethode is de reproduceerbaarheid. Een maat voor de reproduceerbaarheid is onder andere het betrouwbaarheidsinterval rond het gemiddelde. Deze wordt bepaald door een (standaard)monster veelvuldig te meten. De reproduceerbaarheid neemt toe naarmate het betrouwbaarheidsinterval kleiner wordt en is bij de meeste analysemethoden afhankelijk van het concentratieniveau. De reproduceerbaarheid voor de chromatografische methoden is voor carbendazim 6% bij 0.1 µg/l en 3% bij 5 µg/l. Voor de FUH's bedraagt de reproduceerbaarheid rond detectieniveau voor de verschillende individuele componenten 5 à 10% (voor monolinuron 17%). Voor triazinen ligt de reproduceerbaarheid voor de verschillende componenten tussen 5 en 10% en bij een concentratieniveau van (circa) 0.2 µg/l 3 tot 5%.

3.3 CARBENDAZIM

3.3.1 ANALYSERESULTATEN

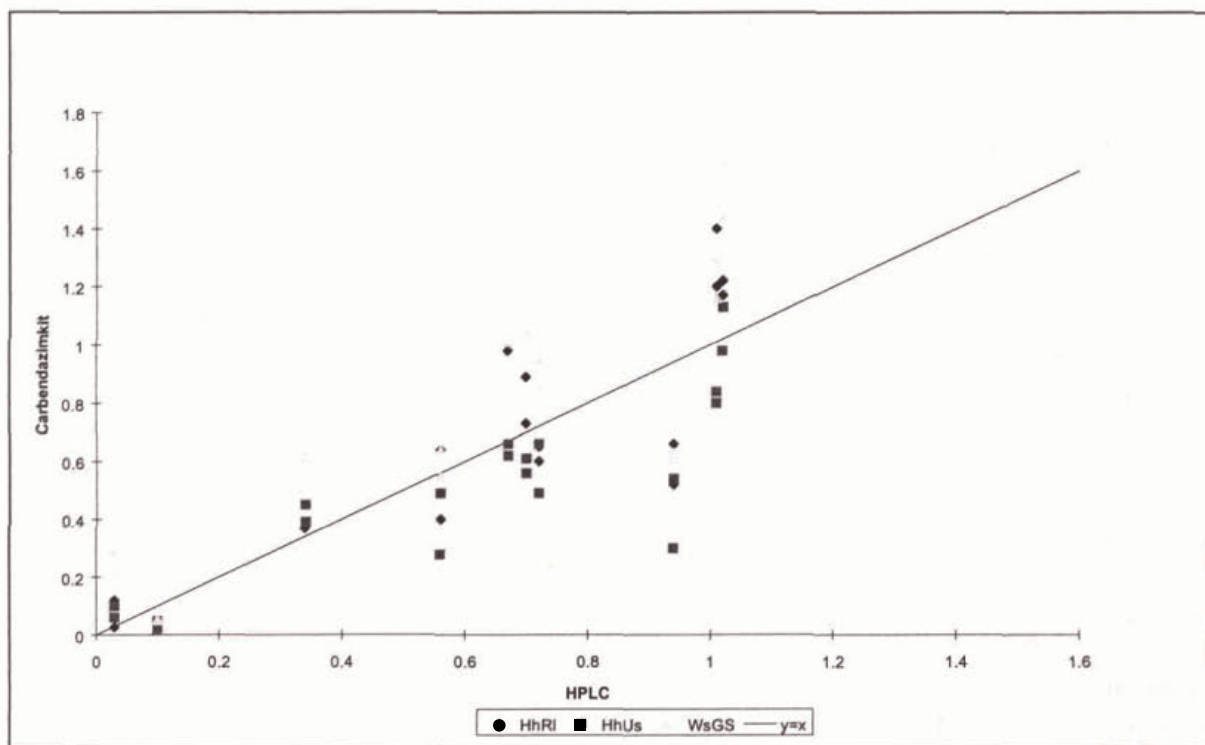
De analyseresultaten van de carbendazimkit en de HPLC/DAD-methode zijn in Tabel 2 weergegeven. In monster 1 worden met behulp van de kit door alle laboratoria gehalten onder het detectieniveau gemeten. Met de HPLC-methode wordt in monster 2, in tegenstelling tot de immunoassaymethode, eveneens een carbendazimgehalte gevonden dat onder de detectielimiet ligt. In monster 2 worden door het laboratorium van Waterschap Groot Salland relatief hoge carbendazimgehalten gemeten in vergelijking met de andere twee laboratoria (waar relatief grote verschillen tussen de duplo metingen zijn), namelijk 0.21 tot 0.29 µg/l door het laboratorium van Waterschap Groot Salland versus <0.054 tot 0.12 µg/l voor de andere laboratoria.

² Feitelijk dient in dit verband gesproken te worden over de aantoonbaarheidsgrens

Figuur 1 laat zien dat, wat de carbendazimkit betreft, een redelijk sterk verband aanwezig is tussen de resultaten van beide methoden, maar dat de spreiding tussen de resultaten van de immunoassayanalyses groot is en toeneemt bij hogere concentraties. Ook bij de gemiddelden van de resultaten (zie Figuur 2) neemt de spreiding bij hogere concentraties toe.

Tabel 2: Analyseresultaten carbendazim [$\mu\text{g/l}$]

Monster	Immunoassaymethode ³								HPLC ⁴
	HhRI ⁵		HhUs		WsGS		Mean	Std. Dev.	
	I	II	I	II	I	II			
1	<0.042	<0.054	<0.098	<0.043	<0.103	<0.107	0.04	0.02	0.10
2	0.12	<0.054	0.10	0.06	0.21	0.29	0.13	0.01	0.025
6	0.60	0.65	0.66	0.49	0.86	0.95	0.70	0.17	0.72
11	0.64	0.40	0.49	0.28	0.55	0.64	0.50	0.14	0.56
12	1.20	1.40	0.80	0.84	1.29	1.16	1.12	0.24	1.01
13	1.22	1.17	0.98	1.13	1.63	1.44	1.26	0.23	1.02
14	0.89	0.73	0.56	0.61	1.11	1.04	0.82	0.23	0.70
16	0.52	0.66	0.54	0.30	0.61	0.63	0.54	0.13	0.94
17	0.66	0.98	0.66	0.62	1.01	0.79	0.79	0.17	0.67
19	0.39	0.37	0.45	0.39	0.83	0.61	0.51	0.18	0.34
DL ⁶	0.042	0.054	0.098	0.043	0.103	0.107			0.05-0.2 ⁷



Figuur 1: Carbendazim: analyseresultaten immunoassay versus HPLC [$\mu\text{g/l}$]

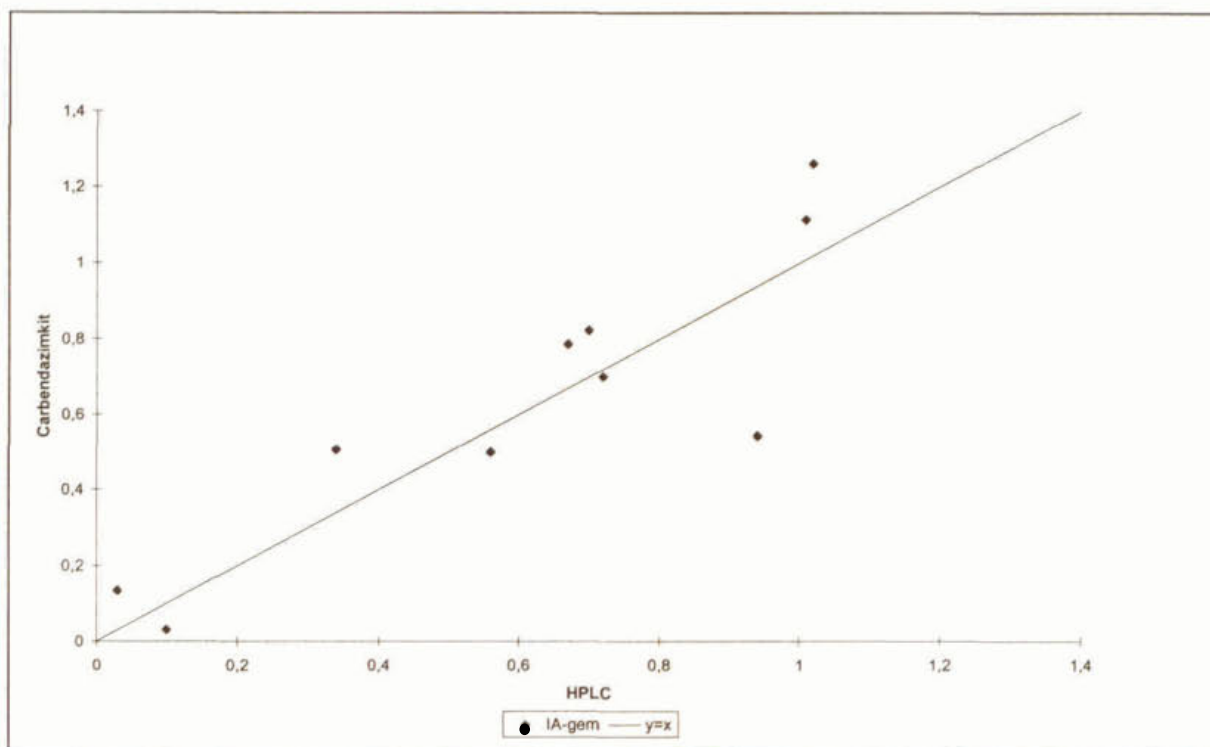
³ In de figuren en toetsen zijn de resultaten, kleiner dan de DL, vervangen door de halve waarde van de DL

⁴ Resultaten kleiner dan de DL zijn vervangen door de halve waarde van de DL, zie Tabel 17, bijlage 1

⁵ Zie hoofdstuk 6, blz. 34

⁶ DL = detectielimiet

⁷ Zie Tabel 17, bijlage 1



Figuur 2: Carbendazim: gemiddelde analyseresultaten immunoassay versus HPLC [µg/l]

3.3.2 INDICATIEVE ANALYSE

Zoals in de inleiding is uiteengezet, is één van de doelstellingen van dit onderzoek om aan te tonen dat met behulp van immunoassaykits voor de geselecteerde (som)parameters een indicatieve selectie kan worden gemaakt in 'verdachte' en 'onverdachte' monsters. Hierbij zijn twee criteria gehanteerd: de detectielimiet en de EG-normen voor bestrijdingsmiddelen voor het gebruik van oppervlaktewater als bron voor drinkwater. Deze norm is voor individuele bestrijdingsmiddelen vastgesteld op 0.1 µg/l en voor groepsanalyses voor bestrijdingsmiddelen op 0.5 µg/l. In dit onderzoek wordt de carbendazimkit beschouwd als een stofspecifieke kit (zie § 3.1), zodat de resultaten hiervan aan de EG-norm voor individuele bestrijdingsmiddelen kunnen worden getoetst. In § 2.4 is beschreven hoe deze toets is uitgevoerd.

De resultaten van de kwalitatieve screening zijn voor beide criteria weergegeven in Tabel 3. In de tabel wordt onderscheid gemaakt tussen de individuele resultaten van de immunoassaykits en de gemiddelde waarden per monster.

In het bovenste deel van de tabel worden in de kolommen 'beide>DL' en 'beide<DL' de percentages van de aantallen metingen gepresenteerd waarbij de resultaten van de immunoassay- en de HPLC-methode beide groter respectievelijk beide kleiner zijn dan de detectielimiet (DL). In de kolom 'HPLC<DL en IA>DL' worden de aantallen metingen weergegeven (in procenten) waarbij de resultaten van de HPLC-methode kleiner zijn dan de detectielimiet en tegelijkertijd de resultaten van de immunoassaymethode (IA) groter dan de detectielimiet. In de kolom 'HPLC>DL en IA<DL' zijn de percentages van de aantallen metingen weergegeven waarbij de resultaten van de HPLC-methode groter zijn dan de detectielimiet en die van de immunoassaymethode kleiner. In de kolom 'N' is het aantal resultaten weergegeven, waarop de percentages uit de andere kolommen betrekking hebben.

Tabel 3: Kwantitatieve toets carbendazimkit op basis van de detectielimieten en EG-normen⁸ [%]

Selectie	Beide>DL	Beide<DL	HPLC<DL en IA>DL	HPLC>DL en IA<DL	N
individueel	80	12	8	0	60
gemiddeld	80	10	10	0	10
Selectie	Beide≥NORM	Beide<NORM	HPLC<NORM en IA≥NORM	HPLC≥NORM en IA<NORM	N
individueel	80	13	7	0	60
gemiddeld	80	10	10	0	10

Uit Tabel 3 kan worden afgelezen dat de carbendazimkit met meer dan 90% zekerheid een kwalitatieve selectie kan maken tussen 'verdachte' en 'onverdachte' monsters. In de overige 8% voor de individuele en 10% voor de gemiddelde resultaten scoort de kit hoger dan de detectielimiet, terwijl de HPLC-methode lager scoort. Geen van de immunoassaykits heeft 'negatief' gescoord, wanneer met de chromatografische methode concentraties groter dan de detectielimiet worden aangetoond.

Als de immunoassaymethode als indicatieve methode wordt getoetst op basis van de EG-normen, dan blijkt de carbendazimkit met een nauwkeurigheid van ongeveer 90% een selectie te kunnen maken tussen onder of boven de EG-norm. In 7% van de individuele analyseresultaten en in 10% van de gemiddelden scoort de immunoassaymethode hoger dan de EG-norm, terwijl de HPLC-methode lager dan de norm scoort. Hierbij scoren twee van de vier individuele resultaten en het gemiddelde resultaat tussen 0.1 en 0.15 µg/l. Er zijn geen monsters aanwezig die met de immunoassaymethode lager dan de norm scoren, terwijl de HPLC-methode hoger scoort.

3.3.3 KWANTITATIEF

Met behulp van de Wilcoxon Signed Rank toets zijn de resultaten van de carbendazimkit statistische getoetst aan de HPLC-methode. Zoals in § 2.5 is uiteengezet, zijn de toetsen op drie manieren uitgevoerd:

- 1 Analyse op basis van de gemiddelden van de immunoassayresultaten.
- 2 Analyse van alle resultaten in één steekproef.
- 3 Analyse van de resultaten per laboratorium.

De resultaten van de toetsing voor de carbendazimkit zijn weergegeven in Tabel 4. In deze tabel worden de volgende kentallen gepresenteerd: het aantal paren van resultaten ('N'), het toetsresultaat ('Z'), de overschrijdingskans ('P') en de significantie van de toets op basis van het 90% betrouwbaarheidsinterval ('Significant gelijk').

⁸ Voor carbendazim geldt de EG-norm voor individuele bestrijdingsmiddelen van 0.1 µg/l

Tabel 4: Resultaten Wilcoxon Signed Rank toets voor carbendazim

Type analyse	N	Z	P	Significant gelijk
gemiddelden	10	-1.172	0.241	ja
alle resultaten	60	-2.183	0.029	nee
per laboratorium:				
HhUs	20	-1.139	0.255	ja
HhRl	20	-1.232	0.218	ja
WsGS	20	-2.950	0.003	nee

Voor de toets op de gemiddelden zijn alle analyseresultaten van de carbendazimkit van alle laboratoria voor elk monster gemiddeld. De aldus ontstane reeks van tien gemiddelden is getoetst aan de 10 analyseresultaten van de HPLC-methode. Uit Tabel 4 blijkt dat de analyseresultaten van beide methoden voor carbendazim met een betrouwbaarheid van 90% significant gelijk zijn. Hierbij dient te worden opgemerkt dat de steekproefomvang (N=10) klein is.

Indien alle individuele analyseresultaten van de immunoassaymethode worden gebruikt, wordt voorkomen dat, zoals in § 2.5 is opgemerkt, de steekproefomvang (te) klein is. Wordt de Wilcoxon toets op deze wijze uitgevoerd, dan blijkt dat de resultaten van beide methoden niet significant overeenkomen (op basis van een betrouwbaarheid van 90%). Het feit dat, in tegenstelling tot de toets op basis van de gemiddelden, geen significant gelijke resultaten kunnen worden aangetoond, moet, zoals Figuur 1 laat zien, worden toegeschreven aan de relatief grote spreiding van de individuele resultaten (die in de gemiddelden worden 'weggemiddeld'; zie Figuur 2).

Door de Wilcoxon toets uit te voeren op deelreeksen per laboratorium (variant 3), kan een kwalitatieve indruk verkregen worden van de spreiding van de resultaten tussen de deelnemende laboratoria. Tabel 4 laat zien dat de resultaten voor carbendazim alleen voor de laboratoria van Hoogheemraadschap van Rijnland en Hoogheemraadschap van Uitwaterende Sluizen in Hollands Noorderkwartier significant overeenkomen met de resultaten van de HPLC-methode. Figuur 1 laat zien dat de resultaten van Waterschap Groot Salland van deze kit structureel hoger zijn dan de HPLC-resultaten en dat de resultaten van het laboratorium van Waterschap Groot Salland ook een groot deel van de totale spreiding veroorzaken. Dit is ook de reden dat een significante overeenkomst op basis van alle carbendazimresultaten niet meer kan worden aangetoond.

3.4 FUH'S

3.4.1 ANALYSERESULTATEN

Uit de resultaten van de HPLC-methode (zie Tabel 17 in bijlage 1) blijkt dat de totale concentratie voor FUH's in hoofdzaak bepaald wordt door diuron. In alle monsters zijn voor de andere individuele FUH's concentraties gemeten die lager zijn dan de detectielimiet. Uit Tabel 5, Figuur 3 en Figuur 4 blijkt dat de individuele resultaten van alle laboratoria en de gemiddelde resultaten van de FUH-analyses van de kit structureel hoger zijn dan de resultaten van de HPLC-methode. Dit geldt met name voor de monsters 5 en 15. In monster 5 liggen alle met de immunoassaykits gemeten concentraties boven het maximum van de ijklijn. Met de HPLC-methode wordt in dit monster een diuronconcentratie van 3.08 µg/l gemeten. In monster 15 wordt door het laboratorium van Hoogheemraadschap van Rijnland 1.69 en 1.87 µg/l gemeten en door de twee andere laboratoria

gehalten, die het maximum van het meetbereik van de kit overschrijden. Met de HPLC-methode wordt een gehalte van 1.4 µg/l in monster 15 gemeten.

In de praktijk wordt met de immunoassaymethode een achtergrondniveau van 0.2 µg/l voor FUH's gemeten (mondelinge mededelingen Elti Support). Onderzoek in Brabant heeft uitgewezen dat in het (vroege) voor- en (late) najaar diurongehalten rond 0.05 µg/l in het oppervlaktewater worden aangetroffen (Van der Wiele, 1994). De gehalten van de andere individuele FUH's waren in dit onderzoek in de genoemde perioden lager dan de detectielimiet (voor de meeste componenten tussen 0.005 en 0.04 µg/l). In dit onderzoek zijn de analyses van de FUH's met behulp van HPLC uitgevoerd.

Tabel 5: Analyseresultaten FUH [µg/l]

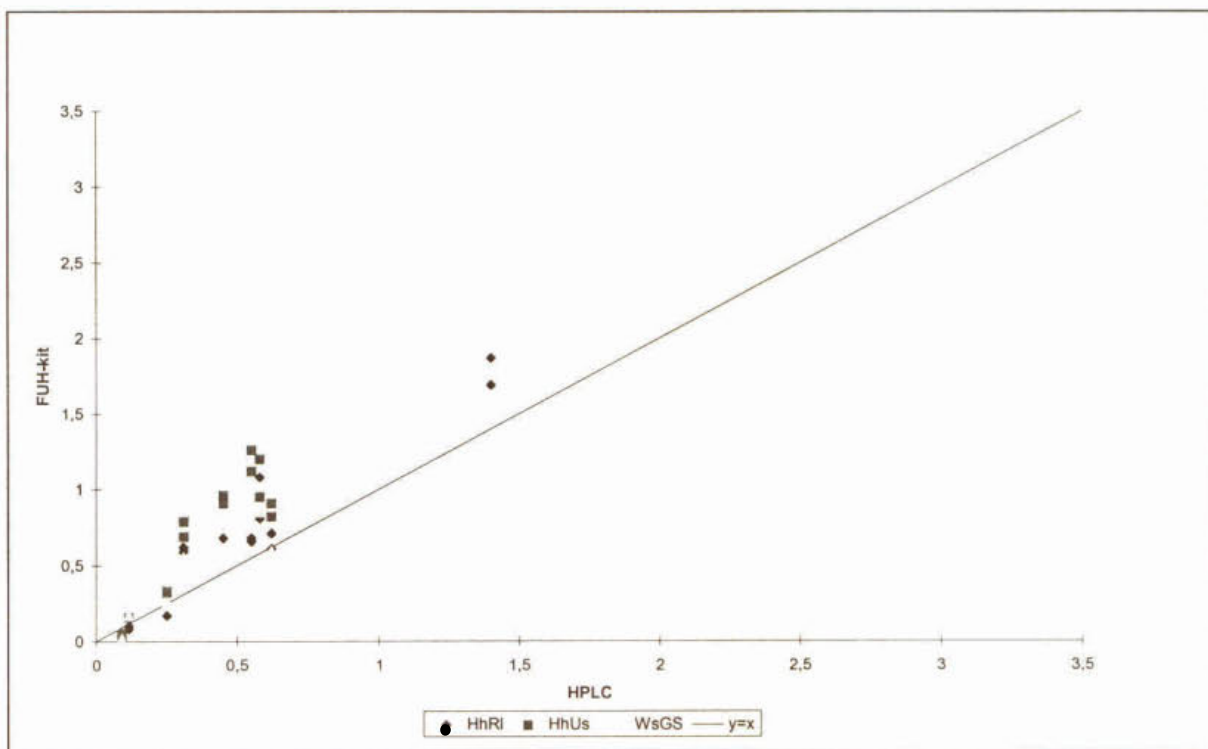
Monster	Immunoassaymethode ⁹								HPLC ¹⁰
	HhRI		HhUs		WsGS		Mean	Std. Dev.	
	I	II	I	II	I	II			
2	<0.023	<0.023	<0.034	<0.011	<0.029	<0.036	0.01	0.0045	0.09
5	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0			3.24
7	0.93	0.68	0.91	0.96	0.76	0.79	0.84	0.11	0.45
8	1.08	0.81	0.95	1.2	0.85	0.86	0.96	0.15	0.58
9	0.71	0.61	0.82	0.91	0.57	0.6	0.70	0.14	0.62
10	0.17	0.17	0.32	0.33	0.24	0.26	0.25	0.07	0.25
14	0.68	0.66	1.12	1.26	1.02	0.92	0.94	0.24	0.55
15	1.69	1.87	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0	1.78	0.13	1.40
17	0.59	0.62	0.79	0.69	0.42	0.56	0.61	0.12	0.31
19	0.08	0.1	0.16	0.16	0.17	0.26	0.16	0.06	0.12
DL ¹¹	0.023	0.023	0.034	0.011	0.029	0.036			0.03-0.2 ¹²

⁹ In de figuren en toetsen zijn de resultaten, kleiner dan de DL, vervangen door de halve waarde van de DL

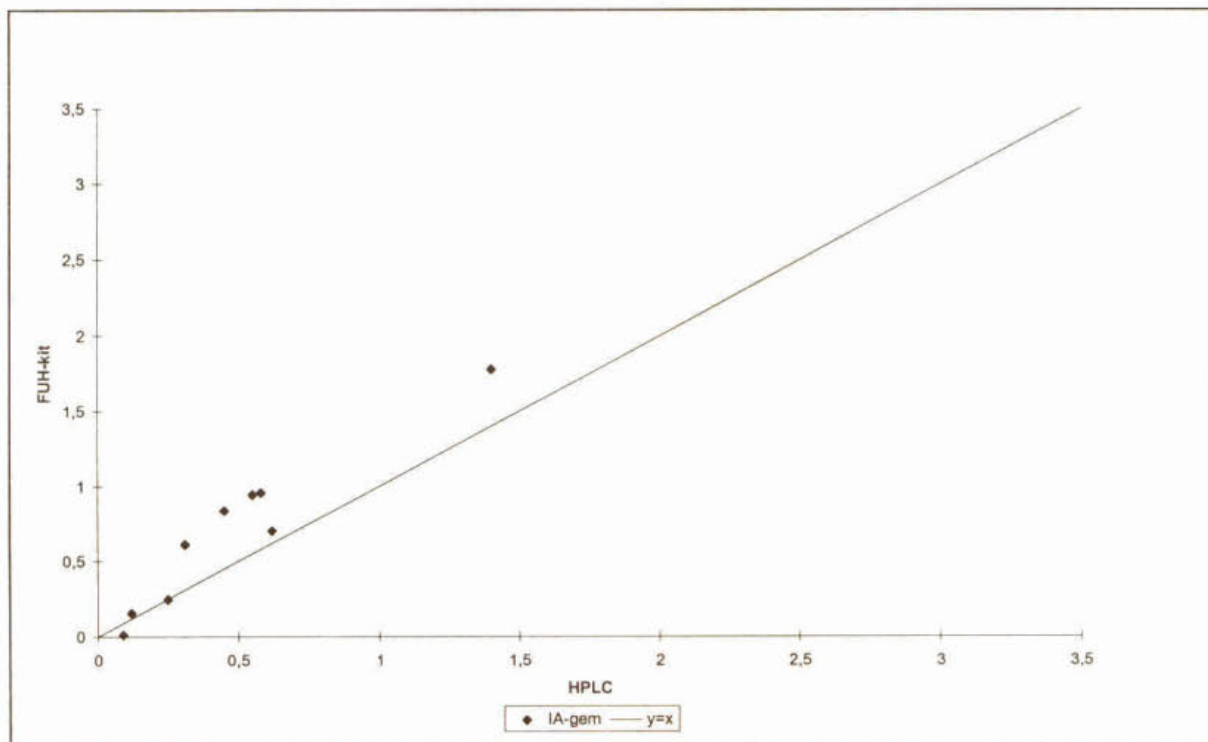
¹⁰ Resultaten kleiner dan de DL zijn vervangen door de halve waarde van de DL, zie Tabel 17, bijlage 1

¹¹ DL = detectielimiet

¹² Zie tabel 17, bijlage 1



Figuur 3: FUH: analyseresultaten immunoassay versus HPLC [$\mu\text{g/l}$]



Figuur 4: FUH: gemiddelde analyseresultaten immunoassay versus HPLC [$\mu\text{g/l}$]

3.4.2 INDICATIEF

Voor de HPLC-methode is ten aanzien van de sommatie van de individuele FUH's de werkwijze gehanteerd die in § 3.2 is beschreven.

Op basis van de detectielimieten kan de FUH-kit met 90% zekerheid een kwalitatieve selectie maken tussen 'verdachte' en 'onverdachte' monsters voor zowel de individuele als de gemiddelde resultaten (zie Tabel 6). Voor 10% van de analyses geeft de kit een waarde boven het detectieniveau aan, terwijl de chromatografische methode een waarde lager dan de detectielimiet aangeeft. Hierbij dient te worden opgemerkt dat door de sommatie van de individuele FUH's bij de HPLC-methode de som alleen onder de detectielimiet scoort als de gehalten van **alle** individuele FUH's onder de detectielimiet zitten. Dit is alleen in monster 2 en 19 het geval, omdat in alle andere monsters de diurongehalten boven de detectielimiet zijn. De kit scoort niet onder de detectielimiet, terwijl met de HPLC-methode gehalten boven de detectielimiet worden aangetoond (de kit scoort niet 'vals-negatief').

Tabel 6 laat zien dat voor zowel de individuele als de gemiddelde resultaten met de FUH-kit met een nauwkeurigheid van ongeveer 90% een selectie gemaakt wordt tussen resultaten onder of boven de EG-norm. In 20% van de resultaten (zowel de individuele als de gemiddelde resultaten) scoort de kit hoger dan de norm, terwijl de HPLC-methode onder de norm scoort. Er zijn bij deze kit geen resultaten die met de immunoassaymethode lager dan de norm scoren, terwijl de HPLC-methode hoger scoort.

Tabel 6: Kwalitatieve toets FUH-kit op basis van de detectielimieten en EG-normen ¹³ [%]					
Selectie	Beide>DL ¹⁴	Beide<DL	HPLC<DL en IA>DL	HPLC>DL en IA<DL	N
individueel	80	10	10	0	60
gemiddeld	80	10	10	0	10
Selectie	Beide≥NORM	Beide<NORM	HPLC<NORM en IA≥NORM	HPLC≥NORM en IA<NORM	N
individueel	50	32	18	0	60
gemiddeld	50	30	20	0	10

3.4.3 KWANTITATIEF

Voor alle varianten van de toetsen blijkt volgens Tabel 7, dat met een betrouwbaarheid van 90% geen significante overeenkomst voor beide analysemethoden kan worden aangetoond. Figuur 3 en Figuur 4 laten zien dat de reden hiervan gelegen is in het feit dat de resultaten van de FUH-kit structureel hoger zijn ten opzichte van de HPLC-methode.

Op basis van Figuur 3 en Figuur 4 kan echter wel een verband tussen de resultaten van de kits en de HPLC-methode worden verondersteld. Met behulp van correlatie- en regressie-analyse kan een significant verband tussen beide analysemethoden worden aangetoond voor de individuele resultaten ($r=0.805$) en voor de gemiddelden van de resultaten ($r=0.764$), (er is geen regressie-analyse uitgevoerd voor de deelreeksen per laboratorium).

¹³ Voor FUH's geldt de EG-norm voor groepen van bestrijdingsmiddelen van 0.5 µg/l

¹⁴ De titels van de kolommen worden in § 3.3.2 toegelicht

Tabel 7: Resultaten Wilcoxon Signed Rank toets voor FUH's

Type analyse	N	Z	P	Significant gelijk
gemiddelden	10	-2.395	0.017	nee
alle resultaten	50	-4.649	0.000	nee
per laboratorium:				
HhUs	16	-3.000	0.003	nee
HhRI	18	-2.505	0.012	nee
WsGS	16	-2.353	0.019	nee

3.5 ISOPROTURON

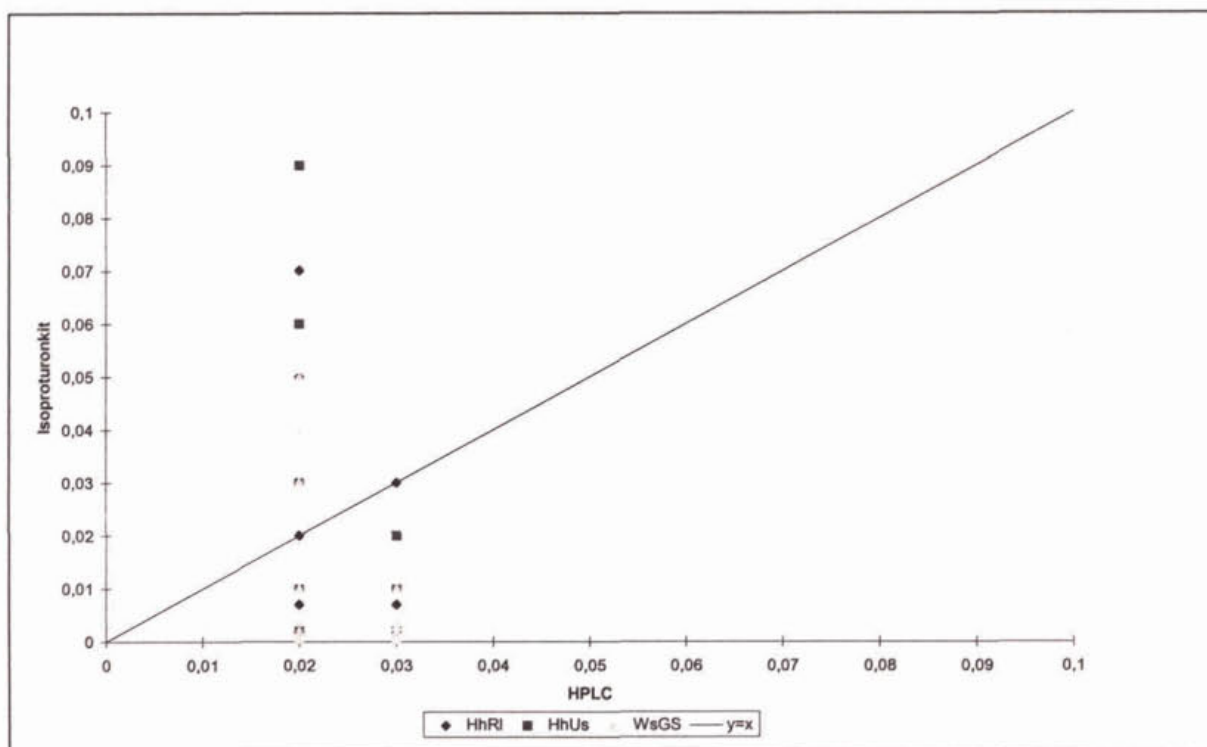
3.5.1 ANALYSERESULTATEN

Met zowel de immunoassaymethode als met de HPLC-methode worden slechts sporen isotroturon in de monsters aangetoond (zie Tabel 8 en Tabel 17 in bijlage 1). Zestien van de in totaal vijftig individuele resultaten van de immunoassays liggen onder de detectiegrens van de methode. Alle analyseresultaten met de HPLC-methode zijn onder de detectiegrens. Uitgezonderd voor monsternummer 5 overschrijden de resultaten van de immunoassaykits, die boven de detectielimiet van deze methode liggen, niet de detectielimiet van de HPLC-methode.

In Figuur 5 zijn alle resultaten (van alle laboratoria) afzonderlijk weergegeven en in Figuur 6 de gemiddelden van de resultaten per monster.

Tabel 8: Analyseresultaten isoproturon [$\mu\text{g/l}$]

Monster	Immunoasaymethode ¹⁵								HPLC ¹⁶
	HhRI		HhUs		WsGS		Mean	Std. Dev.	
	I	II	I	II	I	II			
2	<0.02	<0.014	<0.004		0.002	0.003	0.005	0.004	0.025
5	0.07	0.06	0.06		0.05	0.04	0.056	0.011	0.015
7	0.02	0.02	0.02		0.01	0.004	0.015	0.007	0.025
8	<0.02	0.03	<0.004		0.002	<0.001	0.009	0.012	0.025
9	<0.02	0.03	0.03		0.01	<0.001	0.016	0.013	0.015
14	0.02	0.02	0.01		0.004	<0.001	0.01	0.009	0.015
15	0.02	<0.01	0.01		0.008	<0.001	0.008	0.008	0.025
17	0.02	<0.01	<0.004		0.004	<0.001	0.007	0.008	0.025
18	0.05	0.03	0.09		0.03	0.009	0.042	0.03	0.015
19	0.02	<0.01	<0.004		0.004	0.002	0.007	0.008	0.015
DL ¹⁷	0.02	0.014	0.004		0.001	0.001			0.03-0.05 ¹⁸



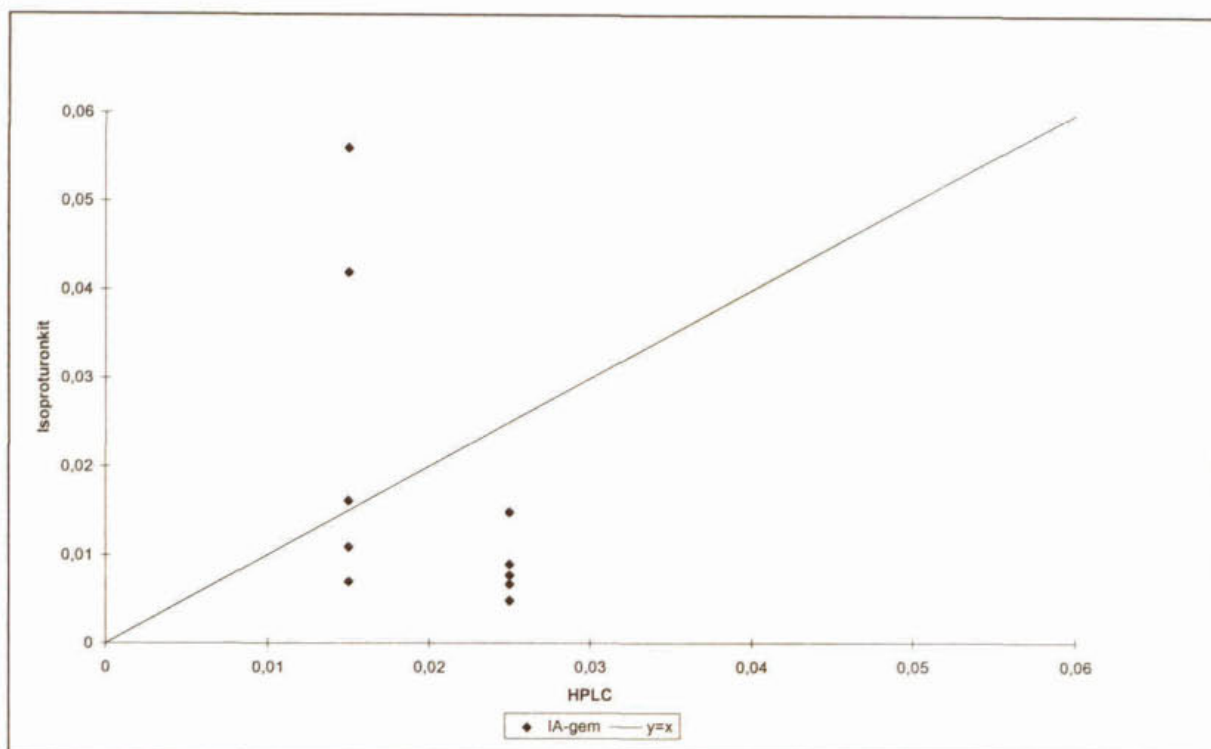
Figuur 5: Isoproturon: analyseresultaten immunoassay versus HPLC [$\mu\text{g/l}$]

¹⁵ In de figuren en toetsen zijn de resultaten, kleiner dan de DL, vervangen door de halve waarde van de DL

¹⁶ Resultaten kleiner dan de DL zijn vervangen door de halve waarde van de DL, zie Tabel 17, bijlage 1

¹⁷ DL = detectielimiet

¹⁸ Zie tabel 17, bijlage 1



Figuur 6: Isoproturon: gemiddelde analyseresultaten immunoassay versus HPLC [$\mu\text{g/l}$]

3.5.2 INDICATIEF

Op basis van de resultaten van de toets, zoals gepresenteerd in Tabel 9, blijkt de isoproturonkit niet erg nauwkeurig te zijn. Slechts in circa 30% van de individuele metingen kan met de kit een goede selectie worden gemaakt tussen 'verdachte' en 'onverdachte' monsters. In de overige circa 70% scoort de kit hoger dan de detectielimiet, terwijl de HPLC-methode lager scoort ('vals-positief'). Op basis van de gemiddelden wordt 100% 'vals-positief gescoord'. Hierbij dient echter opgemerkt te worden, dat alle resultaten van de HPLC-methode onder het detectieniveau zijn.

Met behulp van de isoproturonkit wordt in 100% van de individuele en gemiddelde resultaten terecht aangetoond, dat de norm niet wordt overschreden, maar alle resultaten van beide methoden zijn ook onder de EG-norm.

Tabel 9: Kwalitatieve toets isoproturonkit op basis van de detectielimieten en EG-normen¹⁹ [%]

Selectie	Beide>DL ²⁰	Beide<DL	HPLC<DL en IA>DL	HPLC>DL en IA<DL	N
individueel	0	32	68	0	50
gemiddeld	0	0	10	0	10
Selectie	Beide≥NORM	Beide<NORM	HPLC<NORM en IA≥NORM	HPLC≥NORM en IA<NORM	N
individueel	0	100	0	0	50
gemiddeld	0	100	0	0	10

3.5.3 KWANTITATIEF

De resultaten van de isoproturonanalyses zijn voor de HPLC-methode alle onder de detectielimiet en voor de immuassaymethode rond het detectieniveau. Hoewel in de bijsluiters van de kits een detectieniveau of een minimumniveau wordt opgegeven (zie § 3.2), blijkt uit de analyseresultaten dat (veel) lagere concentratieniveaus zijn aangetoond. De interpretatie van de Wilcoxon toetsen wordt daarmee problematisch, omdat het toetsresultaat geheel afhankelijk wordt van de wijze waarop met deze detectieniveaus wordt omgegaan. In Tabel 10 zijn de resultaten van de Wilcoxon toetsen weergegeven, waarbij de detectielimieten geïnterpreteerd zijn, zoals in § 3.2 wordt omschreven.

Op basis van de gemiddelden van de immunoassayresultaten kan voor de isoproturon een significante overeenkomst tussen beide methoden worden aangetoond. Er kan echter geen significante overeenkomst tussen beide methoden worden aangetoond op basis van alle individuele resultaten van de isoproturonkit. Worden de resultaten per laboratorium beschouwd, dan kan voor de laboratoria van Hoogheemraadschap van Rijnland en Hoogheemraadschap van Uitwaterende Sluizen in Hollands Noorderkwartier een significante overeenkomst voor beiden methoden worden aangetoond, maar niet voor het laboratorium van Waterschap Groot Salland.

Tabel 10: Resultaten Wilcoxon Signed Rank toets voor isoproturon

Type analyse	N	Z	P	Significant gelijk
gemiddelden	10	-0.764	0.445	ja
alle resultaten	50	-1.766	0.077	nee
per laboratorium:				
HhUs	10	-0.409	0.682	ja
HhRl	20	-0.188	0.851	ja
WsGS	20	-2.130	0.033	nee

¹⁹ Voor isoproturon geldt de EG-norm voor individuele bestrijdingsmiddelen van 0.1 µg/l

²⁰ De titels van de kolommen worden in § 3.3.2 toegelicht

3.6 TRIAZINEN

Voor de uitvoering van de immunoassaymethode is in plaats van de gewone triazinekits gebruik gemaakt van High sensitivity kits, omdat abusievelijk de verkeerde kits zijn geleverd. Ten gevolge hiervan liggen 16 van de 60 individuele resultaten buiten het meetbereik van de kit. In een aantal gevallen is getracht de monsters te verdunnen, maar ook deze resultaten vielen buiten het meetbereik van de kit. De resultaten die buiten het meetbereik van de kit vallen, dienen feitelijk verworpen worden. Deze resultaten zijn echter wel meegenomen in de beoordeling van de kit als indicatieve screeningsmethode, maar niet in de statistische toetsen, omdat de resultaten van de statistische toetsen hierdoor te veel worden beïnvloed.

Het laboratorium van Hoogheemraadschap van Uitwaterende Sluizen in Hollands Noorderkwartier heeft gemeld dat er praktische problemen waren met de uitvoering van de analyses met deze kit.

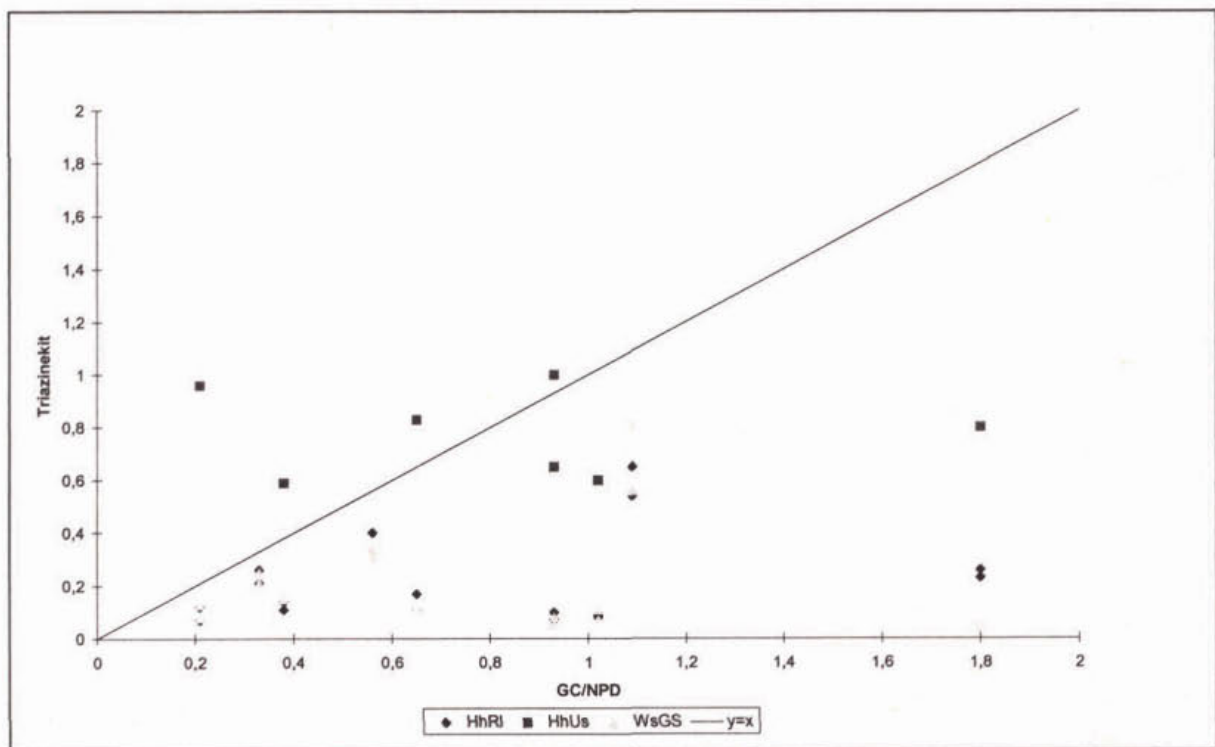
3.6.1 ANALYSERESULTATEN

De resultaten van de triazinekit (zie Tabel 11) worden gekenmerkt door het grote aantal metingen (16 van in totaal 60), dat door overschrijding van het maximum van het meetbereik van de kit (1 µg/l) dient te worden verworpen. Figuur 7 en Figuur 8 laten zien dat voor zowel de individuele als de gemiddelde resultaten geen verband bestaat tussen de immunoassay- en de GC/NPD-methode. Uitgezonderd voor monster 18 liggen de gemiddelden van de resultaten van de kits onder die van de chromatografische methode. Voor de individuele resultaten wordt de spreiding in belangrijke mate bepaald door de relatief hoge resultaten van het laboratorium van Hoogheemraadschap van Uitwaterende Sluizen in Hollands Noorderkwartier voor de monsters 7 tot en met 18.

Voor monster 15 lopen de resultaten van de laboratoria van Hoogheemraadschap van Rijnland en Waterschap Groot Salland een factor 4 uiteen (0.26 en 0.23 µg/l respectievelijk 0.04 en 0.06 µg/l). Met de GC/NPD-methode wordt voor dit monster een gehalte van 0.18 µg/l gemeten.

Tabel 11: Analyseresultaten triazinen [$\mu\text{g/l}$]

Monster	Immunoassaymethode ²¹								GC/NPD ²²
	HhRI		HhUs		WsGS		Mean	Std. Dev.	
	I	II	I	II	I	II			
2	0.4	0.4	>1	>1	0.34	0.31	0.36	0.05	0.55
3	>1	>1	>1	>1	>1	>1			1.80
4	0.65	0.54	>1	>1	0.56	0.81	0.64	0.12	1.09
7	0.14	0.11	>1	0.59	0.15	0.17	0.23	0.20	0.38
8	0.26	0.21	>1	>1	0.21	0.25	0.23	0.03	0.33
9	0.09	0.08	0.6	0.6	0.07	0.11	0.26	0.26	1.02
10	0.1	0.07	1	0.65	0.05	0.08	0.33	0.40	0.93
15	0.26	0.23	>1	0.8	0.04	0.06	0.28	0.31	1.8
17	0.17	0.11	>1	0.83	0.1	0.12	0.27	0.32	0.65
18	0.12	0.07	>1	0.96	0.08	0.13	0.27	0.39	0.21
DL ²³	0.015	0.007	0.027	0.303	0.008	0.015			0.01-0.03 ²⁴



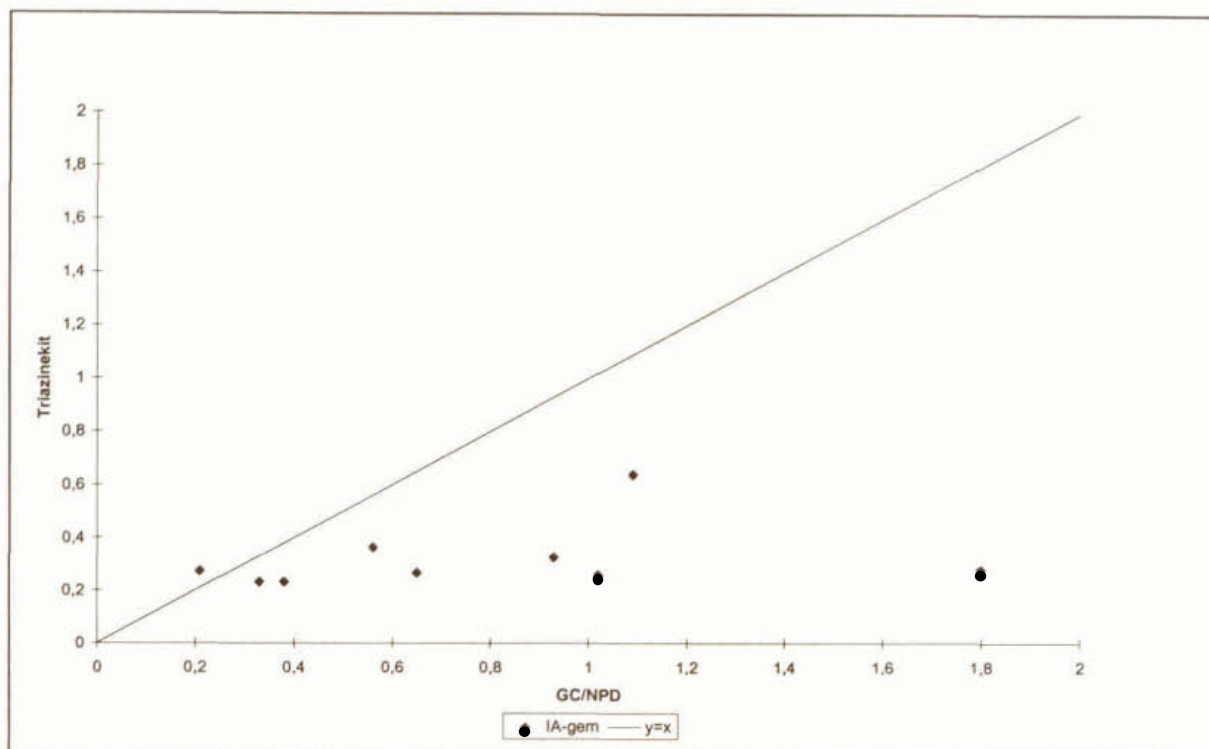
Figuur 7: Triazinen: analyseresultaten immunoassay versus HPLC [$\mu\text{g/l}$]

²¹ In de figuren en toetsen zijn de resultaten, kleiner dan de DL, vervangen door de halve waarde van de DL

²² Resultaten kleiner dan de DL zijn vervangen door de halve waarde van de DL, zie Tabel 17, bijlage 1

²³ DL = detectielimiet

²⁴ Zie tabel 17, bijlage 1



Figuur 8: Triazinen: gemiddelde analyseresultaten immunoassay versus HPLC [$\mu\text{g/l}$]

3.6.2 INDICATIEF

Voor de GC/NPD-methode is de sommatie van de individuele triazinen en het berekenen van de gemiddelden van de resultaten van de triazinekit uitgevoerd volgens de methode welke in § 3.2 is beschreven. De gehanteerde definities van de detectielimiet voor de gemiddelden per monster van de kit en de gesommeerde gehalten voor de GC/NPD-analyses zijn conform de beschrijving in § 3.2. Voor de analyseresultaten van de triazinekit die het maximum van het meetbereik overschrijden, zijn voor het berekenen van het gemiddelde per monster waarden van $1 \mu\text{g/l}$ ingevoerd (zijnde het maximum van het meetbereik).

Uit Tabel 12 kan worden afgelezen dat met behulp van de triazinekit op basis van de detectielimieten met 100% zekerheid een kwalitatieve selectie gemaakt kan worden tussen 'verdachte' en 'onverdachte' monsters. Geen van de immunoassaykits heeft 'negatief' gescoord, terwijl de chromatografische methode concentraties groter dan de detectielimiet aantoonde.

Met de triazinekit kan met een nauwkeurigheid van ongeveer 50% een selectie gemaakt worden tussen monsters die onder of die boven de EG-norm scoren. In 10% van de individuele resultaten van de triazinekit wordt de EG-norm overschreden, terwijl met de HPLC-methode geen overschrijding wordt aangetoond. In ongeveer een derde van de individuele en in de helft van de gemiddelde resultaten scoort de triazinekit onder de EG-norm, terwijl de GC/NPD-methode hogere gehalten vindt ('vals-negatief'). Ten aanzien van de gemiddelden is dit deels toe te schrijven aan de aanwezigheid van de overschrijdingen van de maxima van de meetbereiken, omdat hiervoor niet de werkelijke, maar een vervangende waarde van $1 \mu\text{g/l}$ is gebruikt.

Tabel 12: Kwantitatieve toets triazinenkit op basis van de detectielimieten en EG-normen²⁵ [%]

Selectie	Beide $\geq$ DL ²⁶	Beide<DL	GC<DL en IA>DL	GC>DL en IA<DL	N
individueel	100	0	0	0	60
gemiddeld	100	0	0	0	10
Selectie	Beide $\geq$ NORM	Beide<NORM	GC<NORM en IA $\geq$ NORM	GC $\geq$ NORM en IA<NORM	N
individueel	37	20	10	33	60
gemiddeld	20	30	0	50	10

3.6.3 KWANTITATIEF

Voor de triazinen is op basis van de gemiddelde resultaten van de triazinekit bij een betrouwbaarheid van 90% geen significante overeenkomst tussen beide methoden aan te tonen (zie Tabel 13). Uit Figuur 7 blijkt dat 8 van de 9 gemiddelden onder de resultaten van de GC/NPD-methode liggen. Waarschijnlijk is het maximum van het meetbereik van de kit (1 µg/l) hiervan de oorzaak. Het gemiddelde van de meeste monsters (uitgezonderd monster 9 en 10) wordt beïnvloed door het grote aantal resultaten, dat moet worden verworpen, omdat het maximum van het meetbereik van de kit wordt overschreden (zie Tabel 11).

Ook op basis van individuele resultaten kan voor de triazinen geen significante overeenkomst tussen beide methoden worden aangetoond. Evenals voor de gemiddelden wordt het resultaat van de toets beïnvloed door het grote aantal resultaten (16 van de 60 metingen) dat verworpen moet worden, omdat het maximum van het meetbereik overschreden wordt (zie Tabel 11).

Uit de analyse van de resultaten per laboratorium volgt dat alleen voor de resultaten van het laboratorium van Hoogheemraadschap van Uitwaterende Sluizen in Hollands Noorderkwartier een significante overeenkomst met de GC/NPD-analyses kan worden aangetoond (met 90% betrouwbaarheid). Uit Figuur 7 kan worden afgeleid dat de resultaten van de laboratoria van Hoogheemraadschap van Rijnland en Waterschap Groot Salland structureel lager zijn dan de resultaten van de GC/NPD-methode. Overigens is het toetsresultaat van het laboratorium van Hoogheemraadschap van Uitwaterende Sluizen in Hollands Noorderkwartier op slechts 8 van de 20 monsters gebaseerd, omdat de resultaten van de overige monsters het maximum van het meetbereik van de kit overschrijden.

Tabel 13: Resultaten Wilcoxon Signed Rank toets voor triazinen

Type analyse	N	Z	P	Significant gelijk
gemiddelden	9	-2.547	0.011	nee
alle resultaten	44	-5.100	0	nee
per laboratorium:				
HhUs	8	-0.701	0.483	ja
HhRl	18	-3.724	0.000	nee
WsGS	18	-3.724	0.000	nee

²⁵ Voor triazinen geldt de EG-norm voor groepen van bestrijdingsmiddelen van 0.5 µg/l

²⁶ De titels van de kolommen worden in § 3.3.2 toegelicht

4 DISCUSSIE, CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

4.1 DISCUSSIE

Met dit indicatieve onderzoek dient antwoord gegeven te worden op de vraag of de geselecteerde immunoassaykits indicatief als voorselectie voor de kostbare chromatografische methoden dan wel (semi-)kwantitatief als (alternatieve) analysemethode kunnen worden ingezet.

Bij de interpretatie van de resultaten dient te worden gerealiseerd dat het onderzoek is uitgevoerd met een beperkt aantal monsters (10). Tevens dient te worden opgemerkt dat de betrokken laboratoria geen ervaring met de uitvoering van de immunoassayanalyses hebben en dat in een enkel geval de kits ongekoeld bewaard zijn, waardoor het niet uitgesloten is, dat de gevoeligheid van de kits is afgenomen.

In plaats van de Rapid Assay Atrazine kit van Baker met een lineair meetbereik van 0.05 tot 5.0 µg/l is abusievelijk een High sensitivity kit geleverd, waarvan het maximum van het meetbereik 1.0 µg/l bedraagt. Ten gevolge hiervan overschrijden 16 van de 60 individuele meetwaarden het maximum van het meetbereik (ook na verdunning van de monsters overschreden de gehalten het meetbereik van de kit).

Het laboratorium van Hoogheemraadschap van Uitwaterende Sluizen in Hollands Noorderkwartier heeft tijdens de uitvoering van de testen enkele praktische problemen ondervonden met de triazinekit (druppels vloeistof die aan de binnenkant van de buizen bleven hangen, mogelijk ten gevolge van statische electriciteit), waardoor een grote spreiding tussen de beide meetreeksen is ontstaan.

4.1.1 INDICATIEF

Uit het voorliggende onderzoek blijkt dat de immunoassaymethode een goede methode is om als kwalitatieve (voor)selectie te gebruiken voor de bepaling van carbendazim, FUH's en triazinen. Voor deze drie (som)parameters kan met meer dan 80% zekerheid een selectie gemaakt worden tussen monsters boven of onder de detectielimiet. Een belangrijk punt hierbij is, dat de kans dat de immunoassaymethode ten onrechte 'negatief' ('vals-negatief') scoort 0% is.

Omdat voor isoproturon alle HPLC-analyses onder de detectielimiet zitten, terwijl de immunoassaykit wel een groot aantal metingen boven de detectielimiet scoort, is een vertekend beeld ontstaan over de betrouwbaarheid van de kit. 26 van de 34 metingen, die hoger dan de detectielimiet scoren, liggen desalniettemin rond of onder het niveau van 0.02 of 0.03 µg/l en dit is het detectieniveau van de HPLC-methode. De kit lijkt derhalve voldoende betrouwbaar.

Beschouwt men de EG-norm voor oppervlaktewater waaruit drinkwater wordt gemaakt als basis voor de selectie, dan scoren de immunoassaykits voor carbendazim, FUH's en isoproturon goed: met de immunoassaymethode scoort tenminste 80% van de resultaten terecht boven of onder de EG-norm. Het aantal uitkomsten, dat in deze toetsing 'vals-negatief' scoort, is 0%. De triazinekit scoort slecht, omdat meer dan 30% van de resultaten (33% van de individuele resultaten en 50% van de gemiddelden) onder de EG-norm scoort, terwijl de GC/NPD-methode boven de norm aangeeft.

4.1.2 KWANTITATIEF

De tweede vraagstelling van dit onderzoek is aan te tonen of de immunoassaymethode als alternatieve analysemethode in plaats van de chromatografische methoden kan worden gebruikt voor de geselecteerde (som)parameters. Deze vraagstelling is in dit onderzoek beantwoord met behulp van de non-parametrische (verdelingsvrije) Wilcoxon Signed Rank toets. Per (som)parameter is de Wilcoxon toets op een drietal varianten uitgevoerd.

De resultaten van de Wilcoxon toetsen voor carbendazim geven een onduidelijk beeld. Wordt de toets uitgevoerd op de gemiddelden, dan zijn de resultaten van beide analysemethoden bij een betrouwbaarheidsinterval van 90% significant aan elkaar gelijk. Wordt de toets op de individuele resultaten uitgevoerd, dan zijn de resultaten niet significant aan elkaar gelijk. Worden de resultaten opgesplitst naar laboratorium, dan zijn de resultaten van de laboratoria van Hoogheemraadschap van Uitwaterende Sluizen in Hollands Noorderkwartier en Hoogheemraadschap van Rijnland wel significant gelijk aan de HPLC-methode, maar die van het laboratorium van Waterschap Groot Salland niet.

Deze uiteenlopende toetsresultaten zijn het gevolg van de relatief grote spreiding in de analyseresultaten van de immunoassaymethode. Mogelijk speelt het ontbreken van routine bij de uitvoering van de analyses hierbij een rol.

Samenvattend kan gesteld worden dat de carbendazimkit in potentie geschikt is als alternatieve kwantitatieve analysemethode, maar dat voor het vaststellen van de betrouwbaarheid een grotere steekproef (met meer monsters) noodzakelijk is (zie ook § 4.3).

Uit de resultaten van de HPLC-analyses blijkt dat het totale FUH-gehalte in hoofdzaak bepaald wordt door diuron. De gehalten van de andere FUH's zijn vrijwel zonder uitzondering onder de detectielimiet. De analyseresultaten van de FUH-kit zijn structureel hoger dan de resultaten van de HPLC-analyses. De Wilcoxon toets geeft derhalve voor geen van de varianten een duidelijke significante overeenkomst tussen beide analysemethoden.

Met behulp van correlatie- en regressie-analyse kan echter wel een significant verband tussen beide analysemethoden worden aangetoond.

Alle analyseresultaten voor isoproturon van zowel de immunoassay- als de HPLC-methode zijn onder of vlak boven de detectielimiet. Dit is toe te schrijven aan het feit dat isoproturon in het algemeen vroeg in het voorjaar gebruikt wordt. In het algemeen geldt voor elke analysemethode dat rondom de detectielimiet de onnauwkeurigheid van de methode vrij groot is. Dit maakt de interpretatie van de resultaten van de Wilcoxon toetsen problematisch. Op basis van deze resultaten kan geen uitspraak gedaan worden over de toepasbaarheid van de isoproturonkit als kwantitatieve methode, ondanks het feit dat de toets op de gemiddelden een significant gelijk resultaat geeft.

De analyseresultaten van de triazinekit lopen relatief sterk uiteen tussen enerzijds de deelnemende laboratoria en anderzijds de resultaten van de kits en de GC/NPD-analyses. Met de Wilcoxon toets kan in geen van de onderzochte varianten een significante overeenkomst met de resultaten van de GC/NPD-analyses worden aangetoond (uitgezonderd voor de resultaten van het laboratorium van Hoogheemraadschap van Uitwaterende Sluizen in Hollands Noorderkwartier). Uit Figuur 7 en Figuur 8 kan worden afgeleid, dat er waarschijnlijk geen verband bestaat tussen de resultaten van de chromatografische methode en die van de kit. In dit onderzoek kan niet worden aangetoond in welke mate de High sensitivity kit oorzaak is van deze resultaten.

4.2 CONCLUSIES

Uit het voorliggende onderzoek kan worden geconcludeerd, dat de immunoassaymethode geschikt is om als indicatieve methode te worden ingezet voor de bepaling van de aanwezigheid van carbendazim, FUH's, isoproturon en triazinen. Voor de genoemde (som)parameters kan met de immunoassaykits met meer dan 80% zekerheid een selectie gemaakt worden tussen monsters die de detectielimiet overschrijden of die deze niet overschrijden. De kans op 'vals-negatieven' (de kans dat de immunoassaymethode gehalten onder de detectielimiet vindt, terwijl met de HPLC-methode gehalten boven de detectielimiet worden aangetoond) in dit onderzoek was 0%.

Beschouwt men de geschiktheid van de kit op basis van de EG-norm voor oppervlaktewater in gebruik als bron voor drinkwater, dan kan met de besproken kits, uitgezonderd die voor triazinen, met tenminste 80% zekerheid een selectie gemaakt worden tussen monsters die de norm wel of niet overschrijden. Hierbij zijn in dit onderzoek geen 'vals-negatieve' uitkomsten opgetreden. De triazinekit is in deze test onbetrouwbaar gebleken. Het aantal 'vals negatieve' uitkomsten bedroeg bij deze kit meer dan 30%.

De immunoassaymethode is geschikt voor kwantitatieve analyses voor carbendazim. Op basis van de voorliggende resultaten kan echter geen gefundeerde uitspraak worden gedaan over de betrouwbaarheid van de immunoassaymethode.

Voor de FUH's kan op basis van dit onderzoek worden geconcludeerd, dat met behulp van correlatie- en regressieanalyse een significant verband tussen beide methoden kan worden aangetoond, maar dat de analyseresultaten van de immunoassaykit structureel hoger zijn dan de resultaten van de HPLC-methode. De FUH-kit kan derhalve als kwantitatieve methode worden ingezet, maar over de betrouwbaarheid kan op basis van deze resultaten geen uitspraak worden gedaan.

Omdat vrijwel alle analyseresultaten van de isoproturonkit en de HPLC-analyses onder of vlak boven de detectielimiet gelegen zijn, kan geen uitspraak gedaan worden over de geschiktheid van de isoproturonkit voor kwantitatieve analyses.

Met de gebruikte triazinekit kan geen significante overeenkomst tussen de immunoassay- en de GC/NPD-methode worden aangetoond. In welke mate dit moet worden toegeschreven aan het beperkte meetbereik van de gebruikte High sensitivity kit, kan op basis van dit onderzoek niet worden aangetoond.

4.3 AANBEVELINGEN

Met dit rapport wordt de derde fase van het onderzoek 'Indicatieve analytische methoden en groeps- en somparameters' afgesloten. Dit onderzoek toont aan dat de immunoassaymethode toegepast kan worden als indicatieve methode. Hiermee kan een (aanzienlijke) kostenverlaging in de analysekosten voor de waterkwaliteitsbeheerders gerealiseerd worden. Dit rapport beoogt een basis te bieden voor het gebruik door de waterkwaliteitsbeheerders en eventueel voor verdere ontwikkeling van de immunoassaymethode als indicatieve en kwantitatieve analysemethode.

Voor carbendazim zal vervolgonderzoek met een groter aantal monsters moeten uitwijzen hoe betrouwbaar de immunoassaymethode als kwantitatieve methode is ten opzichte van de chromatografische methoden.

Voor de FUH's dient vervolgonderzoek met een groter aantal monsters uit te wijzen of de betrouwbaarheid van de methode (ook) in kwantitatief opzicht voldoende groot is.

Omdat alle resultaten voor isoproturon in dit onderzoek onder of vlak boven de detectielimiet liggen, kan geen uitspraak worden gedaan over het gebruik van de immunoassaymethode als alternatieve analysemethode. In dit perspectief gezien is het wenselijk dat het indicatief onderzoek voor isoproturon in het vroege voorjaar of met gespikete monsters herhaald wordt. De isoproturonkit wordt al drie jaar met succes toegepast door het WRK in een early warning system.

Herhaling van het onderzoek met een standaard triazinekit in plaats van de High sensitivity kit is noodzakelijk om ook de eventuele geschiktheid van deze kit als indicatieve of kwantitatieve methode te kunnen aangeven.

5 LITERATUUR

Plantenziektenkundige Dienst, 1993, Gewasbeschermingsgids. Handboek voor de bestrijding van ziekten, plagen en onkruiden en de toepassing van groeiregulatoren in de akkerbouw, veehouderij, tuinbouw en het openbaar groen; dertiende druk, Wageningen.

STOWA, 1996, Indicatieve analysemethoden en groeps- en somparameters voor de bepaling van de waterkwaliteit. Inventarisatie van bestaande technieken en correlatieanalyse van waterkwaliteitsgegevens, rapportnr. 96-25.

STOWA, 1997, Indicatieve analysemethoden en groeps- en somparameters voor de bepaling van de waterkwaliteit. Validatie van geselecteerde technieken, rapportnr. 97-09.

Wiele, P.W. van der, 1994, Project Onderzoek Maas. Meetcampagne bestrijdingsmiddelen 1994, ICWS, rapportnr. 94.07

6 VERKLARING VAN DE GEBRUIKTE AFKORTINGEN

DL	Detectielimiet
FUH	Phenyl Ureum Herbicides
GC/NPD	Gas Chromatography with Nitrogen Phosphorous Detection
GC/MS	Gas Chromatography with Mass Spectrometry
HhRl	Hoogheemraadschap van Rijnland
HhUs	Hoogheemraadschap van Uitwaterende Sluizen in Hollands Noorderkwartier
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HPLC/DAD	High Pressure Liquid Chromatography with Diode Array Detection
IA	Immunoassay(methode)
STOWA	Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer
WsGS	Waterschap Groot Salland
WsRD	Waterschap Regge en Dinkel

BIJLAGE 1: OVERIGE TABELLEN

Tabel 14: Monsterprogramma project 'Indicatieve Analysemethoden fase 3'

Ws Regge en Dinkel						
Monsternr.	Datum	Locatiecode	Analyses			
			FUH	Triazinen	Isoproturon	Carbendazim
1	10-06-97	10010010				•
2	10-06-97	10060010	•	•	•	•
3	11-06-97	10200100		•		
4	10-06-97	10080010		•		
5	11-06-97	10300010	•		•	
Ws Groot Salland						
Monsternr.	Datum	Locatiecode	Analyses			
			FUH	Triazinen	Isoproturon	Carbendazim
6	10-06-97	CEVENMSO				•
7	09-06-97	LVE92--O	•	•	•	
8	09-06-97	LRE50--O	•	•	•	
Hh van Rijnland						
Monsternr.	Datum	Locatiecode	Analyses			
			FUH	Triazinen	Isoproturon	Carbendazim
9	12-06-97	ROP040A07	•	•	•	
10	12-06-97	ROP07703	•	•		
11	12-06-97	ROP14320				•
12	12-06-97	ROP18905				•
13	12-06-97	ROP05307				•
Hh van US in NH						
Monsternr.	Datum	Locatiecode	Analyses			
			FUH	Triazinen	Isoproturon	Carbendazim
14	16-06-97	206003	•		•	•
15	16-06-97	280105	•	•	•	
16	16-06-97	280209				•
17	16-06-97	675120	•	•	•	•
18	16-06-97	540012		•	•	
19	16-06-97	423008	•		•	•
Totaal aantal analyses			10	10	10	10

BIJLAGE 1: (vervolg)

Tabel 15: Kruisreactiviteit immunoassays

Kit	Kruisreagerende verbinding	% Kruisreactiviteit
Atrazine	ametryn	195
	atrazine	100
	desethylatrazine	22
	prometon	32
	prometryn	113
	propazine	97
	simazine	15
	terbutryn	13
	terbutylazine	4.6
Fenylureum	chlooranocryl	73
	chloorbromuron	75
	chloortoluron	100
	diuron	183
	linuron	110
	metobromuron	11
	monolinuron	12
	monuron	23
	neburon	252
Isoproturon	isoproturon	100
Carbendazim	2-benzimidazolylureum	16
	benomyl	26
	carbendazim	100

BIJLAGE 1: (vervolg)

Tabel 16: (Som)parameters en analysemethoden			
Groep	(Som)parameter	Immunoassay	Chromatografisch
Triazinen	ametryn	◆	◆
	atrazine	◆	◆
	cyanazine		◆
	desethylatrazine	◆	◆
	desmetryn		◆
	methoprotryn		◆
	metribuzin		◆
	prometon	◆	
	prometryn	◆	◆
	propazine	◆	◆
	simazine	◆	◆
	terbutryn	◆	◆
	terbutylazine	◆	◆
	hexazinon		◆
FUH	chlooranocryl	◆	
	chloorbromuron	◆	
	chloortoluron	◆	◆
	chloroxuron		◆
	diuron	◆	◆
	fenuron		◆
	linuron	◆	◆
	metabenzthiazuron		◆
	metobromuron	◆	◆
	metoxuron		◆
	monolinuron	◆	◆
	monuron	◆	◆
	neburon	◆	
	pencycuron		◆
Isoproturon	isoproturon	◆	◆
Carbendazim	2-benzimidazolylureum	◆	
	benomyl	◆	
	carbendazim	◆	◆

BIJLAGE 1: (vervolg)

Tabel 17: Analyseresultaten chromatografische methoden [µg/l]												
Monster ²⁷	1	2	2a	3	4	5	6	7	7a	8	9	9a
carbendazim	< 0.2	< 0.05	< 0.05				0.72		< 0.05			0.49
monuron		< 0.03	< 0.03			< 0.03		< 0.05	< 0.1	< 0.05	< 0.03	< 0.03
cl-toluron		< 0.03	< 0.03			< 0.2		< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.1	< 0.05
diuron		< 0.03	< 0.03			3.08		0.34	0.33	0.46	0.5	0.4
monolinuron		< 0.03	< 0.03			< 0.03		< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	0.08
metobromuron		< 0.03	< 0.03			< 0.03		< 0.03	< 0.03	< 0.05	< 0.03	< 0.03
linuron		< 0.03	< 0.03			< 0.03		< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03
Totaal FUH ²⁸		0.09	0.09			3.24		0.445	0.46	0.575	0.62	0.55
isoprot		< 0.05	< 0.03			< 0.03		< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.03	< 0.03
simazine		< 0.01	< 0.01	0.18	0.48			0.09	0.07	0.11	0.95	1
desethyl-atrazine		0.05	0.07	0.1	< 0.04			< 0.02	< 0.02	< 0.01	< 0.02	< 0.02
atrazine		0.47	0.46	1.4	0.53			0.21	0.16	0.18	0.02	0.03
propazine		< 0.01	< 0.01	0.02	< 0.02			< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.02	< 0.02
terbutryn		< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02			< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02
terbutylazine		< 0.01	< 0.01	0.08	0.03			0.04	0.03	0.01	< 0.01	< 0.01
prometryn		< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01			< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
ametryn		< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01			< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Totaal triazinen		0.555	0.565	1.8	1.09			0.375	0.295	0.33	1.015	1.075
Monster	10	11	12	13	14	14a	15	16	17	18	19	19a
carbendazim		0.56	1.01	1.02	0.7	0.72		0.94	0.67		0.34	0.26
monuron	< 0.03				< 0.03	< 0.03	< 0.05		< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03
cl-toluron	< 0.05				< 0.1	< 0.1	< 0.1		< 0.1	< 0.03	< 0.03	< 0.03
diuron	0.16				0.44	0.45	1.28		0.2	< 0.2	< 0.03	< 0.2
monolinuron	< 0.03				< 0.03	< 0.05	< 0.03		< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03
metobromuron	< 0.03				< 0.03	< 0.03	< 0.03		< 0.03	< 0.03	< 0.05	< 0.03
linuron	< 0.03				< 0.03	< 0.03	< 0.03		< 0.03	< 0.03	< 0.06	< 0.03
Totaal FUH	0.245				0.55	0.57	1.4		0.31	0.175	0.115	0.175
isoprot	< 0.03				< 0.03	< 0.03	< 0.05		< 0.05	< 0.03	< 0.03	< 0.05
simazine	0.86						0.65		0.5	0.05		0.04
desethyl-atrazine	< 0.01						< 0.05		< 0.02	< 0.02		< 0.01
atrazine	0.03						0.55		0.1	0.11		0.11
propazine	< 0.02						0.55		< 0.03	< 0.02		< 0.01
terbutryn	< 0.02						< 0.02		< 0.02	< 0.02		< 0.02
terbutylazine	< 0.01						< 0.01		< 0.01	< 0.01		< 0.01
prometryn	< 0.01						< 0.01		< 0.01	< 0.01		< 0.01
ametryn	< 0.01						< 0.01		< 0.01	< 0.01		< 0.01
Totaal triazinen	0.93						1.8		0.65	0.205		0.185

²⁷ De met 'a' aangeduide monsters zijn duplo-analyses. In deze monsters zijn alle (som)parameters gemeten

²⁸ Bij de sommatie van de FUH en de triazinen zijn de resultaten kleiner dan de DL vervangen door de halve waarde van de DL

BIJLAGE 2: Gebruiksgegevens van de bestrijdingsmiddelen

Inzicht in de gewassen waarin en de tijdstippen waarop de belangrijkste individuele bestrijdingsmiddelen per stofgroep worden toegepast, is wenselijk om tot een goede keuze van de monsterlocaties en -tijdstippen te komen. Met betrekking tot de fenylureumherbiciden is diuron het meest gebruikte middel. Het wordt aangewend als onkruidbestrijdingsmiddel op verharde terreinen en in openbaar groen, de fruitteelt, boomkwekerijen en in asperges. In onderstaande tabel is globaal aangegeven wanneer diuron in de verschillende gewassen wordt aangewend. Omdat chloortoluron de standaard in de betreffende kit is, is ook deze parameter in deze tabel opgenomen.

Van de groep van triazinen worden atrazine en simazine het meest toegepast. Atrazine wordt het meest gebruikt in de teelt van maïs. Simazine wordt toegepast op verschillende gewassen. Isoproturon is een actieve stof en geen stofgroep. Het wordt in hoofdzaak op wintergranen toegepast.

Carbendazim wordt voornamelijk gebruikt in de teelten van bloembollen en fruit, maar ook in de groententeelt, in wintergranen en in aardappelen.

Benomyl wordt in dezelfde gewassen als carbendazim gebruikt, maar tevens in stambonen, uien, suikerbieten en bloemisterijgewassen.

Uit de tabel kan worden geconcludeerd, dat in mei en juni (globaal week 18 t/m 24) de meeste kans aanwezig is om de te analyseren bestrijdingsmiddelen in het oppervlaktewater aan te treffen. Voor alle parameters van alle stofgroepen wordt het voorkomen in het oppervlaktewater in belangrijke mate bepaald door de neerslag in de periode mei tot en met juni. Het is aan te bevelen de monsters na één of twee dagen van intensieve regen te nemen.

Tabel 18: Bestrijdingsmiddelen, belangrijkste gewassen waarop ze worden toegepast en periode van toepassing		
Parameter	Gewas	Periode van toepassing
diuron	asperges	juni, juli
	appel/peer	april/mei
	bos/haag/plantsoen	maart/april
chloortoluron	wintergranen	oktober/november, voorjaar zo vroeg mogelijk
atrazine	maïs	juni
simazine	bos/haag/plantsoen	maart/april
	erwten/bonen	april/mei
	prei	juli+september/oktober
	asperges	juni
	aardbei	mei+augustus
isoproturon	wintertarwe	april/mei+okt/nov (alleen op klei)
	wintergerst	maart/april (alleen Gelderland, Utrecht, Limburg)
carbendazim	fruit, bloembollen	april-juni
benomyl	idem, bloemisterijgewassen, uien, suikerbieten, stambonen	

BIJLAGE 3: Wilcoxon Signed Rank Toets

Inleiding

De t-toets voor gemiddelden is een redelijk robuuste toets en kan derhalve ook gebruikt worden wanneer de dataset bij benadering normaal verdeeld is. Wanneer er desondanks twijfels zijn of de t-toets toegepast kan worden, bijvoorbeeld in geval van seizoensinvloeden, is de non-parametrische Wilcoxon Signed Rank toets een alternatief.

Toepasbaarheid en bijzonderheden

De Wilcoxon Signed Rank toets vereist dat de steekproeven gepaard kunnen worden (gelijke aantallen waarnemingen) en, hieruit volgende, dat het aantal metingen voor beide datasets overeenkomen.

Hypothese

Met de Wilcoxon Signed Rank toets wordt de volgende hypothese getoetst:

H_0 : de steekproeven zijn gelijk

H_A : de steekproeven zijn ongelijk

Toetsingsgrootheid, formules en kritieke waarden

De toetsingsgrootheid voor de Wilcoxon Signed Rank toets is T . Voor het gegeven aantal getallenparen (N) wordt de kansverdeling van T benaderd door de toetsingsgrootheid Z , waarbij:

$$Z = \frac{T - \mu_T}{\sigma_T}$$

met:
$$\mu_T = \frac{N(N+1)}{4} \quad (1)$$

en
$$\sigma_T = \sqrt{\frac{N(N+1)(2N+1)}{24}}$$

Hierin is:

Z	standaardisatie van de toetsingsgrootheid T
T	toetsingsgrootheid zijnde de kleinste waarde van de som van de rangnummers van respectievelijk de positieve en de negatieve verschillen
N	aantal getallenparen in de toets

BIJLAGE 3: (vervolg)

De toetsingsgrootheid Z volgt een standaard normale verdeling. De kritieke waarde bij een gegeven onbetrouwbaarheidsniveau α kan worden afgelezen in een tabel voor (rechter) overschrijdingskansen van de standaard normale verdeling. De hypothese H_0 (de steekproeven zijn gelijk) wordt bij een onbetrouwbaarheidsniveau α geaccepteerd wanneer $|Z| \leq Z_{(1-\alpha)}$.

Stappenplan uitvoering toets

De toetsingsgrootheid voor de Wilcoxon Signed Rank toets is T . Deze wordt op de volgende wijze berekend:

- Stap 1: Bereken voor ieder getallenpaar het verschil in meetwaarde.
- Stap 2: Rangschik deze verschillen naar hun **absolute** waarde en ken naar grootte een rangnummer toe waarbij het kleinste verschil rangnummer 1 krijgt. Wanneer de verschillen van 2 of meer getallenparen aan elkaar gelijk zijn, krijgen ze een rangnummer dat het gemiddelde is van de nummers die ze zouden krijgen wanneer de verschillen niet exact gelijk zouden zijn.
- Stap 3: Plaats + en - tekens voor de rangnummers wanneer de verschillen respectievelijk positief en negatief zijn.
- Stap 4: De som van de positieve rangnummers resulteert in T^+ , de (absolute) som van de negatieve rangnummers geeft T^- .
- Stap 5: De toetsingsgrootheid T wordt vervolgens gevonden door de kleinste waarde van T^+ of T^- te kiezen. Met de grootheid Z wordt bij een gegeven betrouwbaarheidsniveau $(1-\alpha)$ de hypothese bevestigd (H_0 is waar) of verworpen (H_A is waar).

Niet altijd wordt vooraf de onbetrouwbaarheidsdrempel α vastgelegd, maar wordt de overschrijdingskans berekend. De overschrijdingskans wordt gedefinieerd als zijnde de kleinste waarde van α , waarvoor het steekproefresultaat tot verwerping van H_0 zou leiden. De overschrijdingskans staat ook wel bekend als: probability value en wordt aangeduid met P .

BIJLAGE 3: (vervolg)

Rekenvoorbeeld/cases

Het voorbeeld heeft betrekking op de vergelijking van de fosfaatvrachten (kg/ha) in 1994 met die van 1987 voor een polder in Friesland.

Maand	1987	1994	Vershil 1994-1987	Rang(nummer)
januari	0.329	0.540	0.211	8
februari	0.296	0.294	-0.002	(-)1
maart	0.246	0.469	0.223	9
april	0.172	0.335	0.163	6
mei	0.259	0.253	-0.006	(-)2
juni	0.262	0.132	-0.130	(-)5
juli	0.390	0.205	-0.185	(-)7
augustus	0.541	0.126	-0.415	(-)11
september	0.529	0.473	-0.056	(-)4
oktober	1.068	0.690	-0.378	(-)12
november	0.860	0.592	-0.268	(-)10
december	0.652	0.627	-0.025	(-)3

Berekening van T:

Som van de - rangnummers = 55

Som van de + rangnummers = 23

De waarde voor de toetsingsgrootte T wordt dus 23.

Vervolgens wordt Z berekend volgens formule (1) en wordt hiermee :

$$Z = - 1.2551$$

In een tabel voor rechter overschrijdingskansen van de standaard normaalverdeling kan vervolgens de bijbehorende overschrijdingskans P worden bepaald (voor een Z-waarde van -1.26):

$$\begin{aligned} P &= 2*(1-P[Z \leq -1.26]) \text{ (tweezijdig)} \\ &= 2*(1-0.8962) \\ &= 0.2076 \end{aligned}$$

Kiezen we voor een $\alpha=0.1$ dan wordt de nulhypothese (H_0 : geen verschil tussen 1994 en 1987) dus **niet** verworpen: de vrachten voor beide jaren zijn significant gelijk.

**BIJLAGE 4: De immunoassay als screeningsmethode
(E.M. Meulenberg)**

DE IMMUNOASSAY ALS SCREENINGSMETHODE

ELTI SUPPORT

Drieskensacker 12-10

6546 MH Nijmegen

Dr. Eline Meulenberg

Instructiedag

Zwolle, 14 mei 1997

INSTRUCTIEDAG IMMUNOASSAYS

1. Inleiding

Deze instructiedag wordt gegeven in het kader van het STOWA project "Indicatieve analytische methoden en groeps- en somparameters voor de bepaling van waterkwaliteit". Dit project is ongeveer twee jaar geleden gestart en omvat drie fasen: inventarisatie, evaluatie/validatie en implementatie. De eerste twee fasen zijn afgerond met een rapport. De derde fase wordt in de tweede helft van 1997 uitgevoerd en omvat de toepassing van immunoassays in verschillende laboratoria.

2. Doel

Het doel van de derde fase van het project is het bekend maken van waterlaboratoria met de techniek van de immunoassay voor de screening van watermonsters op de aanwezigheid van bepaalde pesticiden. De respectievelijke laboratoria zullen met behulp van 4 verschillende immunoassaykits 10 watermonsters analyseren op de aanwezigheid van triazines, fenylureumherbiciden en carbendazim. Referentieanalyses zullen ter vergelijking worden uitgevoerd met conventionele methoden (HPLC, GC) op een onafhankelijk laboratorium.

3. Problematiek

De kwaliteit van oppervlakte- en grondwater moet in Nederland (en in EC-verband) op reguliere basis continu worden getest op talloze parameters en verontreinigingen. Enerzijds om onze ecosystemen in stand te houden, anderzijds uit overwegingen van de volksgezondheid. Bij dit laatste punt speelt met name de kwaliteit van het uit grond- en oppervlaktewater bereide drinkwater een grote rol.

Tot de milieuverontreinigende stoffen behoren organische microverontreinigingen, waaronder pesticiden. Chemische analyses hiervoor moeten voldoen aan hoge eisen wat betreft robuustheid, selectiviteit, matrixeffecten en gevoeligheid. Voor pesticiden geldt een EC-norm van 0,1 µg/l per individuele verbinding en 0,5 µg/l als somnorm. De meest gebruikte analysemethoden zijn HPLC en GC (MS). Hiervoor moeten relatief grote volumina aan water verzameld worden, voorbewerkt met extractie en eventueel derivatisatie en geanalyseerd. Deze methoden zijn hierdoor bewerkelijk, langdurig en duur, hetgeen ze niet geschikt maakt als screeningsmethoden, waarbij vaak grote aantallen monsters in relatief korte tijd gemeten moeten worden. Denk hierbij aan het voorkomen van bepaalde (groepen van) pesticiden in voor- en najaar. In sommige gevallen zou voor bepaalde typen verbindingen een somparameter zelfs veel gunstiger voor screening zijn.

Dit was de reden om te zoeken naar alternatieve methoden, die eenvoudig, snel en goedkoop zijn. In de eerste fase van het STOWA project is een inventarisatie gemaakt van mogelijke

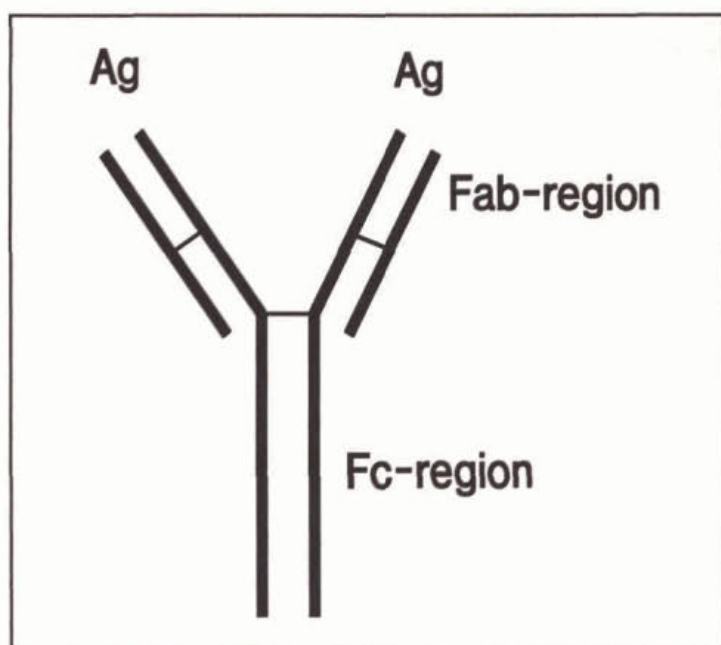
alternatieven voor de conventionele methoden, met als resultaat: de bioassay, de HPLC fingerprint en de immunoassay. Uiteindelijk is hiervan, na evaluatie en validatie, de immunoassay overgebleven als meest veelbelovende methode voor screeningsdoeleinden. Eerst zal nu het principe van de immunoassay uitgelegd worden. Daarna worden enkele resultaten uit de evaluatiefase gegeven en als laatste wordt de toepassing van de immunoassay geïllustreerd aan de hand van een praktijkvoorbeeld.

4. Principe van de immunoassay

De immunoassay is een aantal decennia geleden ontwikkeld voor de klinische diagnostiek en sinds die tijd wordt hij toegepast als een zeer betrouwbare en gevoelige analysemethode in de klinische chemie. De immunoassay is gebaseerd op het gebruik van antilichamen. Dit zijn eiwitten, die door het lichaam worden geproduceerd als reactie op een vreemde verbinding of een organisme om deze onschadelijk te maken en te verwijderen. Antilichamen zijn zeer specifiek voor een bepaalde verbinding of een deel van een verbinding of organisme. Denk hierbij met name aan de afweer van ons immuunsysteem tegen allerlei ziekten.

In een immunoassay is de hoofdcomponent een antilichaam, dat in een proefdier is opgewekt tegen een bepaalde analiet. Dit opwekken gebeurt door een dier (rat, konijn, geit, enz.) te injecteren met de analiet, waardoor het immuunsysteem van het dier grote hoeveelheden antilichamen hiertegen gaat maken. Deze antilichamen komen in het bloed terecht en kunnen hieruit geïsoleerd worden. Na een meer of minder uitvoerige zuivering van de antilichamen uit het bloed, kunnen deze gebruikt worden voor de ontwikkeling van een assay. Dit soort antilichamen wordt polykonaal genoemd, omdat in een organisme bij de immunreactie meerdere cellen betrokken zijn die ieder hun eigen antilichaam produceren, waardoor in feite in het bloed populaties van antilichamen terecht komen met elk hun eigen specificiteit en affiniteit voor de betreffende analiet. Polyklonale antilichamen staan in tegenstelling tot monoklonale antilichamen. Deze werden ontwikkeld vanwege de beperkte hoeveelheid antilichamen die uit één dier geïsoleerd kan worden en tevens vanwege het feit dat elk dier zijn eigen populaties van antilichamen heeft, die nooit reproduceerbaar op te wekken zijn. Monoklonale antilichamen worden in vitro gemaakt door het kweken van zogenaamde hybridomen. Dit zijn celfusies van specifieke antilichaamproducerende cellen en kankercellen. Wanneer hybridomen verder worden gekweekt, kunnen antilichamen worden geïsoleerd uit de kweekvloeistof. Monoklonale antilichamen zijn per definitie afkomstig van één enkele moedercel en ze bestaan daardoor uit een populatie van identieke eiwitten.

Antilichamen zijn eiwitten en ze bestaan uit vier polypeptideketens, 2 lichte en 2 zware ketens die via disulfidebruggen met elkaar verbonden zijn. Schematisch wordt een antilichaam vaak als volgt weergegeven:



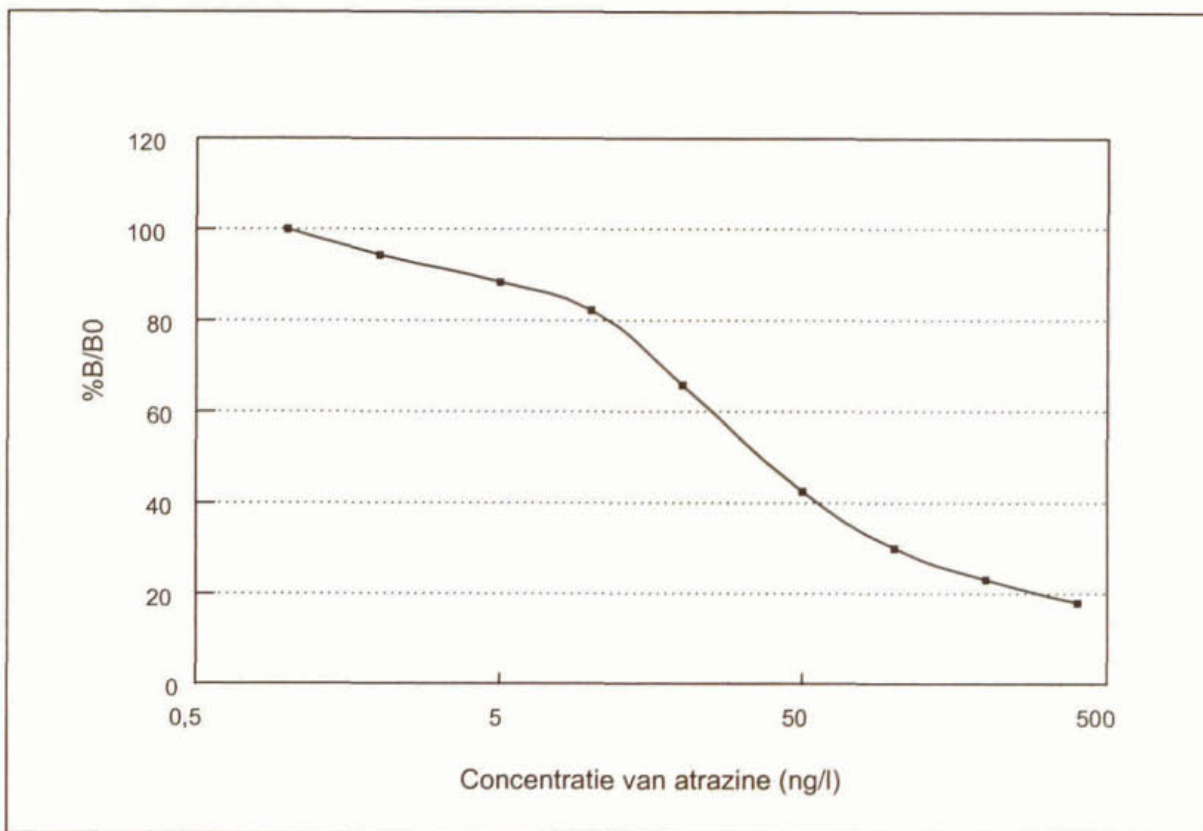
Figuur 1. Schematische weergave van een antilichaam.

Zoals reeds opgemerkt, bindt een bepaald antilichaam heel specifiek het analiet waartegen het is opgewekt. In een immunoassay, bijvoorbeeld in een reactiebuis, wordt een bepaalde hoeveelheid antilichaam gemengd met een te meten monster en na incubatie, waarbij de binding tussen antilichaam en analiet kan plaatsvinden, kan de hoeveelheid analiet gemeten worden. Omdat dit echter niet direct kan, wordt hiervoor een tracer gebruikt. Een tracer is een detecteerbare stof en in het geval van de zogenaamde competitieve immunoassay is dit de analiet, waaraan een detecteerbare groep gebonden is. Deze tracer wordt ook aan het incubatiemengsel toegevoegd en het antilichaam zal zowel de analiet als de tracer binden met vergelijkbare sterkte. In het begin van de ontwikkeling van de immunoassay werden radioactieve tracers gebruikt: ^3H , ^{14}C , ^{125}I en dergelijke. De immunochemische reactie kan als volgt worden uitgebeeld:



Al = antilichaam; Ag = antigeen (analiet); Ag^* = tracer

Wanneer uitgegaan wordt van een gedefinieerde hoeveelheid antilichaam, zal het duidelijk zijn dat hoe meer analiet (Ag) in het monster aanwezig is, des te minder tracer (Ag^*) gebonden wordt. Dit betekent, dat de concentratie van de analiet omgekeerd evenredig is met het gemeten signaal. Om de hoeveelheid gebonden signaal te kunnen meten, moeten beide fasen, gebonden en vrij, gescheiden worden en hiervoor bestaan diverse mogelijkheden. Eén van beide fasen kan daarna gemeten worden. De concentratie van een analiet kan berekend worden aan de hand van een ijkcurve. Een voorbeeld van een ijkcurve is als volgt.

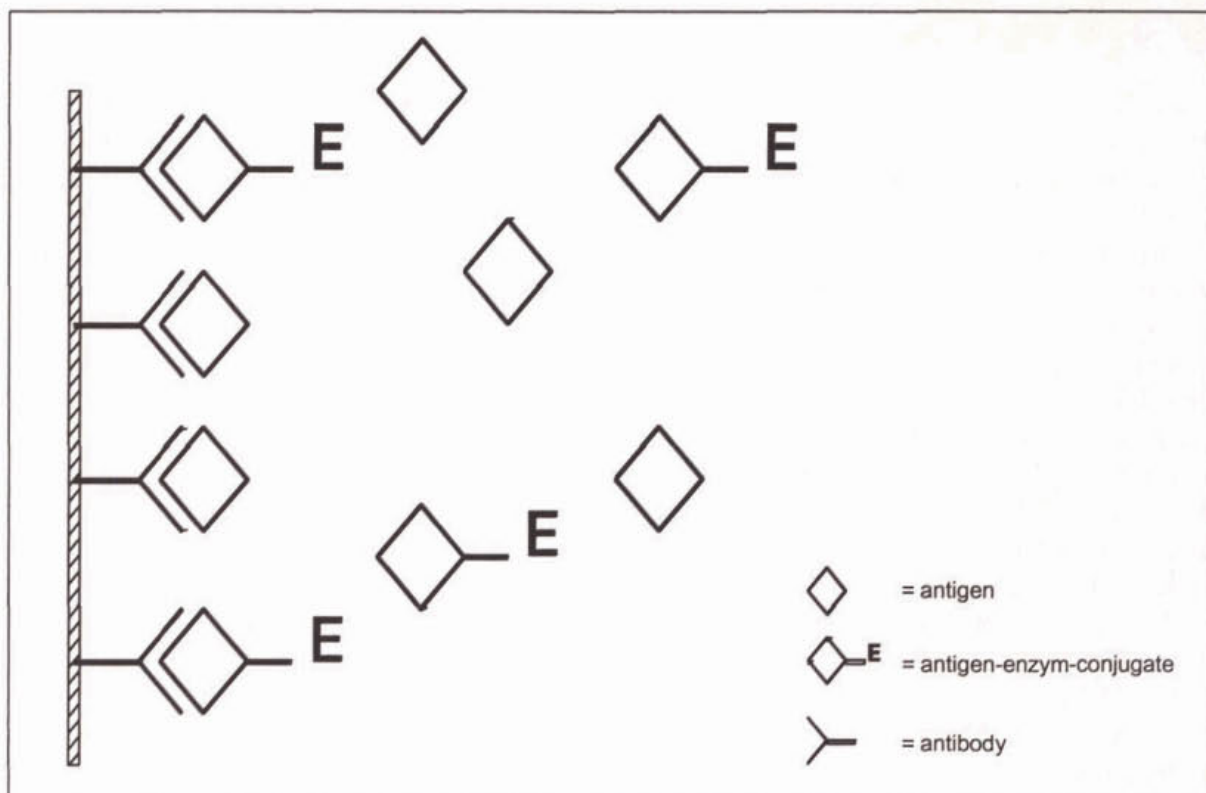


Figuur 2. IJklijn voor atrazine.

Het gebruik van radioactieve tracers heeft diverse nadelen (gevaar, vergunningen, afvalverwerking, enz.) en daarom is met name voor milieuanalyse de enzymatische immunoassay (EIA) ontwikkeld. In dit geval bestaat de tracer uit analiet-enzym en na de reactie wordt, meestal in de gebonden fase, de activiteit van het enzym bepaald na toevoeging van het bijbehorende substraat en een chromogeen (een kleurontwikkeld reagens). Nu geldt: hoe meer kleur, des te minder analiet in het monster. De kleur kan in het algemeen worden gemeten met een spectrofotometer.

Een andere ontwikkeling in immunoassays heeft betrekking op de stap van scheiding van vrije en gebonden fase. Om deze te omzeilen werd de zogenaamde enzyme-linked immunoassay (ELISA) ontwikkeld. De meest gebruikelijke vorm van een ELISA is die, waarin het antilichaam covalent of niet-covalent gebonden wordt aan een vaste drager zoals de wand van een reactiebuis, de wand van de putjes van een microtiterplaat of aan deeltjesvormige dragers zoals magnetiseerbare deeltjes.

In de ELISA, bijvoorbeeld die met een microtiterplaat, wordt aan de vaste drager + antilichaam monster en tracer toegevoegd en geïncubeerd. Na de immunochemische reactie wordt de bovenstaande vloeistof verwijderd, de plaat wordt gespoeld en er wordt substraat en chromogeen toegevoegd. De enzymreactie wordt gestopt door toevoeging van een sterk zuur en de ontwikkelde kleur kan gemeten worden. In het geval van een microtiterplaat wordt voor de meting meestal een microtiterplaatreader gebruikt.



Figuur 3. Schematische weergave van een ELISA

De ELISA met magnetische deeltjes wordt in een reactiebuis uitgevoerd. Het antilichaam is in dit geval gebonden aan magnetiseerbare deeltjes. Deze deeltjes worden samen met monster en tracer in de buis geïncubeerd. Om vrije en gebonden fase te scheiden wordt een sterk magnetische veld rond de buis aangebracht, waardoor de deeltjes op de wand van de buis gaan zitten. De vloeistof kan worden verwijderd en de deeltjes op de wand worden gewassen. Daarna wordt het magnetische veld verwijderd en er wordt substraat+chromogeen aan de deeltjes toegevoegd voor de enzymatische reactie. De reactie wordt gestopt en de ontwikkelde kleur kan worden gemeten in een spectrofotometer.

5. Kenmerken van de immunoassay

De immunoassay heeft zoals elke analytische techniek zijn voor- en nadelen, die betrekking hebben op:

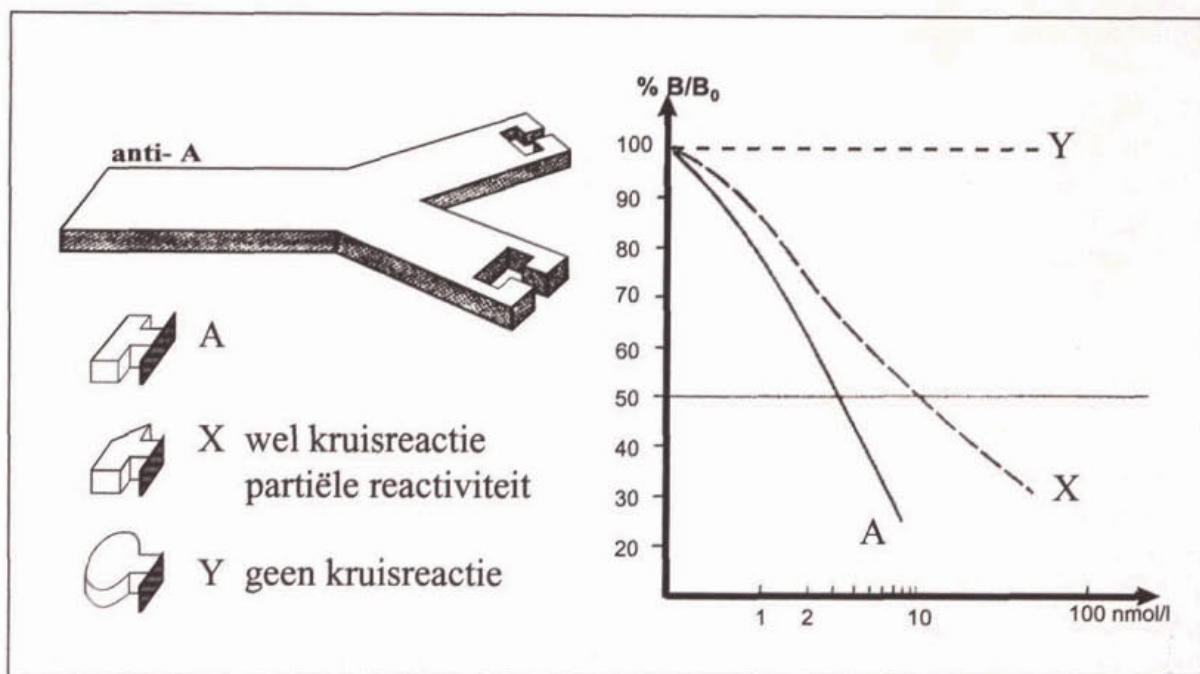
1. specificiteit/selectiviteit en kruisreactiviteit;
2. snelheid;
3. gevoeligheid;
4. kosten;
5. matrixeffecten;
6. normen.

Ad. 1. Specificiteit/selectiviteit en kruisreactiviteit

Het belangrijkste kenmerk van een antilichaam is dat het specifiek zijn overeenkomstige antigeen bindt met hoge affiniteit. Dit kenmerk komt tot uiting bij het gebruik van antilichamen, waarbij het antigeen direct gemeten wordt in een complexe omgeving. Opgemerkt moet worden, dat deze selectiviteit gerelateerd is aan de grootte van het antigeen. Een antilichaam is een eiwit, dus een relatief groot molecuul. Wanneer pesticiden gemeten moeten worden, zijn dit verbindingen die veel kleiner zijn dan het antilichaam en de herkenning omvat vaak het hele molecuul. Hoewel antilichamen een bepaalde chemische structuur herkennen, zullen verbindingen die veel lijken op de analiet echter ook herkend worden en, meestal wel met een lagere affiniteit, gebonden worden. Hierdoor bestaat altijd de onzekerheid of een signaal veroorzaakt wordt door de analiet of mede door vergelijkbare stoffen, zoals metaboliëten of chemisch verwante verbindingen. Dit verschijnsel wordt kruisreactiviteit genoemd.

De kruisreactiviteit is de reactiviteit van in een assay gebruikte antilichamen met stoffen anders dan de analiet. De waarde voor de kruisreactiviteit van relevante verbindingen wordt vaak in de bijsluiters van een kit vermeld. De meeste commerciële assays zijn niet 100 % specifiek voor de analiet en derhalve moet er rekening gehouden worden met een hogere waarde dan verwacht als gevolg van de aanwezigheid van vergelijkbare verbindingen in het monster. Kruisreactiviteit kan echter ook ten voordele werken, wanneer er behoefte is aan een zogenaamde groep-specifieke meting. Bijvoorbeeld in het geval dat men een indicatie wil verkrijgen over de mate van verontreiniging van een bepaald watermilieu met een groep van pesticiden zoals fenylureumherbiciden. Van deze groep worden er in het voorjaar verschillende gebruikt, zoals isoproturon, diuron, monuron, linuron, enz. De toepassing van een stof-specifieke immunoassay, zoals die voor isoproturon, zal een uitslag geven die in wezen betrekking heeft op isoproturon. Daarentegen zal een groep-specifieke immunoassay, zoals die voor de groep van de fenylureumherbiciden, een signaal geven dat veroorzaakt wordt door alle fenylureumverbinding m.u.v. isoproturon in het monster. Afhankelijk van de doelstelling kan kruisreactiviteit dus voordelig of nadelig werken.

Schematisch kan het verschijnsel kruisreactiviteit worden uitgebeeld zoals weergegeven in Figuur 4.



Figuur 4. Schematische weergave van kruisreactiviteit.

Ad. 2. Snelheid

De totale looptijd van een enzymimmunoassay bedraagt in het algemeen zo'n twee uur. Het grote voordeel is echter, dat in een assay meerdere monsters tegelijkijd gemeten kunnen worden.

Ad. 3. Gevoeligheid

De detectielimiet van immunoassays voor pesticiden ligt vaak rond de $0,1 \mu\text{g/l}$. Voor de assay zelf is ongeveer $100 - 250 \mu\text{l}$ monster nodig en dit monster kan direct aan de plaat of de buis toegevoegd worden. Hieruit kan geconcludeerd worden, dat de gevoeligheid van een immunoassay zeer hoog is.

Ad. 4. Kosten

In vergelijking met conventionele methoden is de immunoassay goedkoop. Een kit kost in het algemeen ongeveer Fl. 1400,- en hiermee kunnen zo'n 40 monsters gemeten worden. Dit betekent dat bij het meest efficiënte gebruik van een kit de kosten zeer laag zijn. Wanneer echter vaker een klein aantal monster gemeten wordt, loopt de prijs op, omdat dan iedere keer opnieuw een ijklijn gemaakt moet worden.

Ad. 5. Matrixeffecten

Omdat in een immunoassay de monsters direct gemeten worden, is het gevaar op matrixeffecten in principe groot. Parameters zoals de zuurgraad of ionsterkte en de aanwezigheid van zware metalen in een monster kunnen de reactie tussen antilichaam en analiet/tracer direct beïnvloeden. Andere storingen zoals zwevende stof en niet-doelstoffen zullen in het algemeen weinig invloed hebben, omdat er na de immunochemische reactie meerdere keren gewassen wordt, waardoor deze stoffen weggespoeld worden. Vals-negatieve

resultaten worden zelden gevonden, vals-positieve soms.

Ad. 6. Normen

Tot nu toe wordt de immunoassay voornamelijk gebruikt voor screeningsdoeleinden. De voordelen hiervan blijken uit de bovenstaande punten. Er wordt echter momenteel gewerkt aan de opstelling van ISO-normen, waardoor de immunoassay als een volwaardige analysetechniek beschouwd kan worden.

6. Resultaten van de evaluatie/validatie fase

Voor fase twee van het project werd gekozen voor vier verschillende immunoassays: triazines, fenylureumherbiciden (groep-specifiek), isoproturon (stof-specifiek) en cyclodinen. De eerste is een buizenkit met antilichaam gebonden aan magnetiseerbare deeltjes; de andere zijn microtiterplaat kits. In de respectievelijke bijsluiters wordt de werkwijze beschreven en er worden enkele gegevens van de kit vermeld zoals werkbereik, gevoeligheid, matrixeffecten, kruisreactiviteiten en precisie. Voorbeelden van bijsluiters zijn gegeven in Annex I t/m IV.

Alle kits werden bij ELTI Support geëvalueerd. Hiervoor werden monsters gemeten met en zonder toevoeging van doelstof en eventueel kruisreagerende stoffen. De volgende parameters werden bepaald:

- * detectielimiet
- * intra- en interassay variatie
- * lineariteit
- * effect van filtratie of bezinken als voorbewerking
- * matrixeffecten

Berekeningen:

De detectielimiet kan met behulp van bepaalde software berekend worden aan de hand van de ijklijn. Voor de berekening van een ijklijn kan gebruik gemaakt worden van verschillende formules. De meest eenvoudige is lineaire regressie, waarbij de absorptie (uitgedrukt als % B/B_0) wordt uitgezet tegen de log concentratie. Het % B = % gebonden is de waarde van de binding van de tracer in de aanwezigheid van de analiet, waarbij de B_0 , de binding zonder analiet, wordt gesteld op 100; de absorpties van de verschillende standaardconcentraties worden berekend als % van de B_0 . Een meer geavanceerde berekeningswijze is die met behulp van de zogenaamde vierparametrische logit-log transformatie:

$$y = \frac{a - d}{1 + (x/c)^b}$$

$$y = B/B_0$$

$$x = \log \text{ concentratie analiet}$$

$$a = \text{meetwaarde bij } B_0$$

$$b = \text{helling van de lijn}$$

c = meetwaarde bij 50 % binding van analiet
d = meetwaarde bij grote overmaat analiet.

Toelichting:

De berekende detectielimiet lag voor de herbiciden beneden de 0,1 µg/l; voor de cyclodinen op ongeveer 1,0 µg/l.

Intra-assay variatie wordt bepaald door een bepaald monster meerdere keren in 1 meetserie te analyseren.

Inter-assay variatie wordt bepaald door een bepaald monster in meer meetseries te analyseren.

Lineariteit wordt bepaald door een monster met een hoge concentratie te verdunnen en de serie verdunningen te meten.

Matrixeffecten werden enerzijds bepaald door monsters te analyseren met of zonder voorbewerking (filtratie of bezinken), anderzijds door aan verschillende typen monster (rivierwater, slootwater, leidingwater) analiet toe te voegen. Tevens kon hieruit een waarde voor de recovery berekend worden.

Voor al deze parameters geldt dat ze moeten voldoen aan bepaalde waarden. Hierbij is uitgegaan van de reeds gepubliceerde DIN-normen.

Na de evaluatie werden de verschillende kits getest met onbekende geaddeerde monsters, die tegelijkertijd met referentiemethoden werden gemeten. Het bleek dat met de immunoassaykits positieve en negatieve monsters duidelijk te onderscheiden waren en dat voor de herbiciden de gevonden waarden vrij goed overeenkwamen met de verwachte waarden.

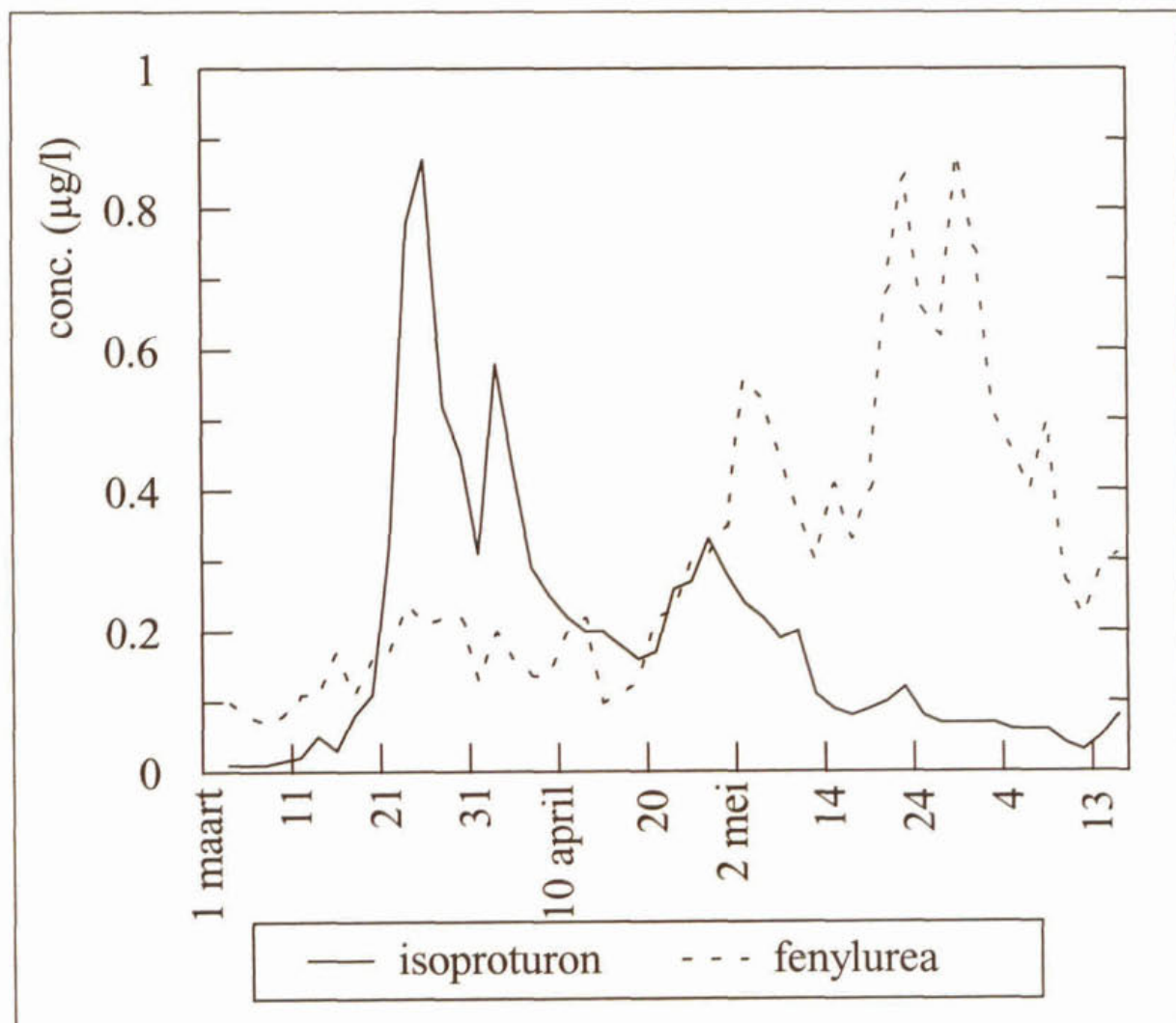
De conclusies van fase 2 waren, dat de geteste immunoassays voor alle parameters voldeden aan de gestelde eisen, behalve de cyclodiënen. Dit is een groep van zeer apolaire verbindingen, die adsorberen aan vaste deeltjes en waarschijnlijk aan de wand van monstervat en reactiebuis. Dit bleek onder andere uit het effect van de voorbewerkingen, die een aanzienlijke verlaging in de gemeten concentratie tot gevolg had. In de meetserie met onbekende monsters bleken de positieve goed te onderscheiden van de negatieve, hoewel de gevonden concentraties veel hoger lagen dan verwacht.

7. Praktijkvoorbeeld

Een voorbeeld van de toepassing van immunoassays is het project van de WRK, waarbij in Lobith dagelijks monsters worden genomen die eenmaal per week worden gemeten met zowel een stof-specifieke kit voor isoproturon als een groep-specifieke kit voor fenyl-ureumherbiciden. Deze beide kits zullen ook in dit STOWA project worden gebruikt. De gegevens van de bijsluiters staan vermeld in Appendix III en II.

De reden voor de WRK om immunoassays te gebruiken voor de screening van fenyl-ureumherbiciden is, dat deze verbindingen voornamelijk in het voorjaar gebruikt worden en een verhoogde concentratie in de periode april - mei - juni met een looptijd van ongeveer een week aangetroffen kan worden. Met de gebruikelijke tijdstippen van monsternamen en analyse

is het risico groot dat een piek gemist wordt. Daarbij komt dat de concentratie kan oplopen tot boven de 0,5 $\mu\text{g/l}$, een waarde waarbij de WRK in principe de inname van water moet stoppen. Door monsters te verzamelen in Lobith, blijft er bij een positief signaal voldoende tijd over om in Nieuwegein maatregelen te treffen (extra analyses). De resultaten over 1995 zijn weergegeven in Figuur 5.



Figuur 5. Meting van fenylureumherbiciden in de Rijn.

8. Afsluiting

Ter afsluiting van deze instructiedag worden enkele hulpmiddelen voor de uitvoering van ELISA getoond, evenals een voorbeeld van een kit zoals die gebruikt zullen worden. Tevens wordt de mogelijkheid gegeven om te pipetteren in een microtiterplaat.

Appendix I. Bijsluiter Carbendazimkit

STRATEGIC DIAGNOSTICS INC.
EnviroGard® Carbendazim/MBC Plate Kit
72300

Intended Use

The EnviroGard Carbendazim/MBC Plate Kit is a quantitative laboratory test for the detection of carbendazim, methyl 2-benzimidazole carbamate (MBC), benomyl, thiophanate and thiophanate methyl residues in water.

Test Principles

The EnviroGard Carbendazim/MBC Plate Kit uses polyclonal antibodies which bind both carbendazim and an enzyme conjugate. Carbendazim in the sample competes with enzyme conjugate for a limited number of antibody binding sites. Antibodies which bind carbendazim are immobilized to the inside of the test wells. In the assay procedure you will:

- Add a sample containing carbendazim to a test well, followed by enzyme conjugate. The enzyme conjugate competes with carbendazim for the same antibody binding sites.

Conversely, a high concentration of carbendazim allows fewer enzyme conjugate molecules to be bound by the antibodies, resulting in a lighter blue solution.

Note: Color is inversely proportional to carbendazim concentration.

Darker color = Lower concentration

Lighter color = Higher concentration

Performance Characteristics

The EnviroGard Carbendazim/MBC Plate Kit test does not differentiate between various carbendazim compounds, but detects their presence to differing degrees. The following table shows the value for 50% B_0 and the approximate value for 85% B_0 which is the lower limit of detection or Least Detectable Dose (LDD). All concentrations are in parts per billion (ppb).

Compound	85% B_0 (LDD)	50% B_0
MBC (carbendazim)	0.2	2
2-Aminobenzimidazole	150	>1000
Thiabendazole	5	50
Thiophanate methyl	0.1	4
Thiophanate	0.1	4
5-OH-MBC	11	137

$\%B_0$ = average optical density (OD) of the calibrator or sample divided by the average OD of the negative control multiplied by 100.

The following compounds are not detectable at 1000 ppb with the EnviroGard Carbendazim/MBC Plate Kit:

2,4-D, Atrazine, Carbaryl

Precautions

- Store all kit components at 4°C to 8°C (39°F to 46°F) when not in use.
- Do not freeze plate kit components or expose them to temperatures greater than 37°C (99°F).
- Allow all reagents and samples to reach ambient temperature (18°C to 27°C or 64°F to 81°F) before you begin the test.
- Do not store plate kit components for more than 8 hours at ambient temperature.
- Do not use kit components after the expiration date.
- Do not mix reagents or test well strips from plate kits with different lot numbers.
- Use approved methodologies to confirm any positive results.
- Do not dilute or adulterate test reagents or use samples not called for in the test procedure; this may give inaccurate results.
- Some solutes and particulates found in untreated ground or surface waters may affect the sensitivity level of this kit.
- If you test something other than water, use a calibrator with a matrix comparable to your sample.
- Prepare the negative control and calibrators from a known negative sample of the same type as your original sample.

Materials Provided

The EnviroGard Carbendazim/MBC Plate Kit contains the following items:

8 strips of 12 wells each, antibody-coated, in strip holder

1 vial of Negative Control (0.0 ppb MBC)

1 vial (1.0 milliliters [mL]) of 1 microgram [μ g]/mL MBC in methanol (1000 ppb)

1 vial of Carbendazim-Enzyme Conjugate

1 vial of Substrate

1 vial of Chromogen

1 vial of Stop Solution

Materials You Provide

You also need these items.

- Volumetric glassware: 100 mL flask, 50 mL flasks (2), 10 mL pipettes (2)
- Marking pen
- Disposable-tip pipette which will measure 80 μ L (120 μ L optional)
- Microtiter plate reader
- Tape or Parafilm®
- Watch or timer
- Clean running water or a wash bottle containing tap or deionized water (500 mL)
- Calculator (optional)
- Orbital shaker (optional)
- Microtiter plate washing device (optional)
- Multichannel Pipette (optional)

Assay Procedure

Have your plate kit materials available and follow these steps:

NOTE: The raised markings on the strip holder help keep the format in the correct order while you add the reagents and sample. When adding reagents, hold the pipette or dropper bottle upright over the wells and allow the drops to fall freely

into the wells. Do not touch the pipette or dropper tip to the sides of the wells.

Calibrator Preparation

- 1. Transfer the contents of the vial containing 1.0 µg/mL MBC carefully into a 100 mL volumetric flask. Rinse the vial with distilled or deionized water and add to the flask. Fill the flask to 100.0 mL with water, cap and mix completely. Label this flask "10 ppb MBC".
- 2. Using a 10 mL volumetric pipette, transfer 10.0 mL of the 10 ppb solution to a 50 mL volumetric flask. Fill the flask to 50.0 mL with water, cap and mix completely. Label this flask "2.0 ppb MBC".
- 3. Using clean 10 mL volumetric pipette, transfer 10.0 mL of the 2.0 ppb solution to a 50 mL volumetric flask. Fill the flask to 50.0 mL with water, cap and mix completely. Label this flask "0.4 ppb MBC".
- 4. Cap calibrators tightly and store at 4°-8°C for no longer than 1 month.

Perform the Test

- 1. Plan the strip format allowing for the placement of the negative control (C), 3 calibrators (C1-C3), and the samples S1-4).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C	C	C	C1	C1	C1	C2	C2	C2	C3	C3	C3
B	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4
C												
D												
E												
F												
G												
H												

NOTE: To set up an assay using fewer than eight strips, remove the unneeded strips and store them at 4°C to 8°C (39°F to 46°F) in the re-sealable plastic bag (with desiccant) provided.

- 2. Add 80 µL of Negative Control (C), 80 µL of each calibrator (C1-C3), and 80 µL of each sample (S1 to S4) to their respective wells, as shown above.
- 3. Using the same order of addition, add 80 µL of Enzyme Conjugate to each well.

NOTE: If you are running more than three strips, it is recommended that a multi-channel pipette be used in steps 2, 3, 7, 8 and 10.

- 4. Thoroughly mix the contents of the wells by moving the strip holder in a rapid circular motion on the benchtop for about 1 minute. Be careful not to spill the contents!
- 5. Cover the wells with tape or Parafilm to prevent evaporation and incubate at ambient temperature for 1 hour. Orbital mixing at 200 rpm during incubation is preferable, but not mandatory.
- 6. After incubation, carefully remove the covering and vigorously shake the contents of the wells into a sink. Flood the wells completely with cool running tap water, then shake to empty. Repeat this wash step five times. Invert the plate and tap out as much water as possible. Alternatively, use a microtiter plate washer for the wash steps.

- 7. Add 2 drops (80 µL) of Substrate to each well, beginning with the Negative Control (C) and Calibrators (C1 to C3), and finishing with the Samples (S1 to S4).
- 8. Add 2 drops (40 µL) of Chromogen to each well in the same order as for Substrate.

NOTE: You MUST add substrate before the chromogen. However, if all 96 wells are to be used at once, you can premix the substrate and chromogen by combining the contents of the 2 vials. Add 120 µL of this mixture to each well. Mix immediately before use and do not retain any of the unused mixture.

- 9. Mix the contents of the wells, as in step 4. Cover the wells with new tape or Parafilm and incubate at ambient temperature for 30 minutes (orbital mixing at 200 rpm is preferable, but not mandatory).

WARNING: Stop Solution is 2.5 N sulfuric acid.

- 10. Add 1 drop (40 µL) of Stop Solution to each well to arrest the blue color development and turn the reaction solution yellow. Mix thoroughly, without spilling, until all of the blue has converted to yellow.

INTERPRET THE RESULTS

Spectrophotometric Measurement and Analysis

- 1. Adjust the wavelength of your microtiter plate reader to 450 nanometers (nm). (If it has dual wavelength capability, use 600 or 650 nm as the "reference" wavelength.)
- 2. If the plate reader does not auto-zero on air, zero the instrument against 160 µL water in a blank well, then measure and record the optical density (OD) of each well's contents. Or, measure and record the OD in every well, then subtract the OD of the water blank from each of the readings.
- 3. If the microtiter plate reader you are using has data reduction capabilities, use a semi-log curve fit for the standard curve. You can also calculate the results manually as described in the next section.

Calculate the Results

- 1. After you read all of the wells, average the OD of each set of calibrators and samples, and calculate the %Bo as follows:

%B° = $\frac{\text{average OD of calibrator or sample} \times 100}{\text{average OD of negative control}}$

The %Bo calculation is used as a means of equalizing different runs of an assay. While the raw OD readings of negative controls, calibrators, and samples are likely to differ from run to run, the %Bo relationship of calibrators and samples to the negative control should remain fairly constant.

- 2. Graph the %Bo of each calibrator against its carbendazim concentration on a semi-log scale (see "Sample Calculations").
- 3. Determine the Carbendazim/MBC concentration of each sample by finding its %Bo value and the corresponding concentration level on the graph (or plug the %Bo values into the equation of the line calculated by linear regression).

Ordering Information

Description	Catalogue Number
-------------	------------------

EnviroGard Carbendazim/MBC Plate Kit	72300
---	-------

Technical Assistance

General Limited Warranty

Strategic Diagnostics Inc. (SDI) warrants the products manufactured by it against defects in materials and workmanship when used in accordance with the applicable instructions for a period not to extend beyond a product's printed expiration date. **SDI MAKES NO OTHER WARRANTY, EXPRESSED OR IMPLIED. THERE IS NO WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE.**

Copyright© 1998, Strategic Diagnostics Inc.,
EnviroGard is a registered trademark of Strategic Diagnostics Inc.
Parafilm is a trademark of the American Can Corporation.

3099910, Rev. 5 FEB 98

Appendix II. Bijsluiter Fenylureumherbicidenkit

STRATEGIC DIAGNOSTICS INC.

EnviroGard® Urea Herbicide Plate Kit

72600

Intended Use

The EnviroGard Urea Herbicide Plate Kit is a laboratory test for the detection of urea herbicides in water.

Test Principles

The EnviroGard Urea Herbicide Plate Kit uses polyclonal antibodies which bind either urea herbicides or a chlortoluron-enzyme conjugate. These antibodies are immobilized to the walls of the test wells. Urea Herbicides in the sample compete with the chlortoluron-enzyme conjugate for a limited number of antibody binding sites.

Since the same number of antibody binding sites are available on every test well, and each test well receives the same number of chlortoluron-enzyme conjugate molecules, a sample which contains a low concentration of urea herbicides allows the antibody to bind many chlortoluron-enzyme conjugate molecules. The result is a dark blue solution. Conversely, a high concentration of urea herbicide allows fewer chlortoluron-enzyme conjugate molecules to be bound by the antibodies, resulting in a lighter blue solution.

NOTE: Color is inversely proportional to urea herbicide concentration.

Darker color = lower concentration.
Lighter color = higher concentration.

Performance Characteristics

The EnviroGard Urea Herbicide Plate Kit does not differentiate between chlortoluron (used as kit calibrators) and other urea herbicides, but detects their presence to differing degrees. The calibrators included in the kit are prepared from chlortoluron and you should use them only for quantitation of chlortoluron. Reactivities for linuron and diuron are very close to chlortoluron (see table below and graph on page 4) and an estimate for these can be made using the Chlortoluron Calibrators included in the kit. If you wish to quantitate linuron, diuron, or other urea herbicides, you will need to prepare calibrators with that specific compound. The following chart shows the concentration yielding 50% Bo* and the approximate concentration yielding 90% Bo, which is the Lower Limit of Detection (LLD), for a number of compounds. Concentration is in parts per billion (ppb), unless otherwise noted.

Compound	LLD (ppb)	50% Bo
Diuron	0.02	0.29
Chloranocryl	0.023	0.73
Chlortoluron	0.04	0.53
Neburon	0.027	0.21
Linuron	0.02	0.48
Chlorbromuron	0.030	0.71
Monolinuron	0.037	4.5
Metobromuron	0.056	4.8
Monuron	0.07	2.3
Metoxuron	0.49	20
Propanil	0.55	18
Fluometuron	0.70	11
Isoproturon	5.9	130
Siduron	8.6	310
Fenuron	11	120
Propyzamide	25	330
Alachlor	59	2100
Chlormethiuron	120	1200
Methabenzthiazuron	130	1300
Chloroxuron	130	1600

* % Bo equals the average optical density (OD) of the calibrator or sample divided by the average OD of the negative control, multiplied by 100 (see "Calculate the Results".)

In addition, the following compounds were not detected at 1000 ppb.

Chlorsulfuron Propachlor
Metolachlor Tebuthiuron

Precautions

- Store all plate kit components at 4°C to 8°C (39°F to 46°F) when not in use.
- Do not store test kit components for more than 8 hours at ambient temperatures (20°C to 37°C or 68°F to 99°F).
- Do not freeze plate kit components or expose them to temperatures greater than 37°C (99°F).
- Allow all reagents to reach ambient temperature (18°C to 27°C or 64°F to 81°F) before beginning the test.
- Do not use plate kit components after the expiration date.
- Do not use reagents or test well strips from one plate kit with reagents or test well strips from a different plate kit.

Materials Provided

The EnviroGard Urea Herbicide Plate Kit contains the following:

- 8 antibody-coated strips (12 wells each), in strip holder
- 1 vial of Negative Control
- 1 vial of 0.05 ppb Chlortoluron Calibrator
- 1 vial of 0.4 ppb Chlortoluron Calibrator
- 1 vial of 2.0 ppb Chlortoluron Calibrator
- 1 vial of Chlortoluron-Enzyme Conjugate
- 1 vial of Substrate
- 1 vial of Chromogen
- 1 vial of Stop Solution

Materials You Provide

- disposable-tip pipette which will measure 80 µL
- marking pen (indelible)
- a multi-channel pipette (optional)
- microtiter plate washer (optional)
- orbital shaker (optional)
- tape or Parafilm®
- timer (1 hour and 30 minutes)
- tap or distilled water for rinsing wells
- microtiter plate reader or strip reader
- calculator (optional)

Assay Procedure

The raised markings on the strip holder identify the well location while you add the reagents and samples. To add the reagents, hold the dropper vial upright over the wells and allow the drops to fall freely into the wells. Do not touch the dropper tip on the sides of the wells.

1. Two strips may be used to run the Negative Control, three Calibrators and eight samples in duplicate. For example :

Negative Control (NC)
Calibrator 1 (C1) = 0.05 ppb calibrator
Calibrator 2 (C2) = 0.4 ppb calibrator
Calibrator 3 (C3) = 2.0 ppb calibrator
Samples (S1, S2, S3, S4, S5, S6 etc.)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	N	NC	C1	C1	C2	C2	C3	C3	S1	S1	S2	S2
B	S3	S3	S4	S4	S5	S5	S6	S6	S7	S7	S8	S8
C												
D												

NOTE: When you use fewer than eight strips, remove the unneeded strips and store them at 4°C to 8°C in the re-sealable plastic bag (with desiccant) provided.

2. Add 2 drops (80 µL) of Negative Control (NC) and each Calibrator (C1 to C3), and 80 µL of each sample (S1 to S8) to their respective wells, as shown above.

3. Add 2 drops (80 µL) of Chlortoluron-Enzyme Conjugate to each well.

NOTE: If you are running more than three strips, it is recommended that you use a multi-channel pipette in steps 2, 3, 7, and 9.

4. Thoroughly mix the contents of the wells by moving the strip holder in a rapid circular motion on the benchtop. Be careful not to spill the contents.

5. Cover the wells with tape or Parafilm to prevent evaporation and incubate at ambient temperature for 1 hour. During incubation, orbital mixing at 200 revolutions per minute (rpm) is recommended, but not mandatory.

6. After incubation, carefully remove the covering and vigorously shake the contents of the wells into a sink. Flood the wells completely with cool running tap or distilled water, then shake to empty. Repeat this wash step five times. Invert the plate and tap out as much water as possible. Alternatively, use a microtiter plate washer for the wash steps.

7. Add 2 drops (80 µL) of Substrate to each well, beginning with the Negative Control (NC) and calibrators (C1 to C3), then the samples (S1 to S8).

8. Add 2 drops (40 µL) of Chromogen to each well in the same order (the chromogen contains 40% methanol, therefore, each drop equals 20 µL rather than 40 µL).

Note: The Substrate must be added before the Chromogen. However, if you are using more than three strips at once, you should premix two volumes of Substrate with one volume of Chromogen in an amount sufficient to fill the number of wells used. Add 120 µL of this mixture to each well with a multi-channel pipette. Mix immediately before use and do not retain any of the unused mixture.

9. Thoroughly mix the contents of the wells, as in step 4. Cover the wells with new tape or Parafilm and incubate at ambient temperature for 30 minutes. During incubation, orbital mixing at 200 rpm is preferable, but not mandatory.

WARNING: Stop solution is 2.5 N sulfuric acid.

10. Add 1 drop (40 µL) of Stop Solution to each well and mix thoroughly. This will turn the solution yellow.

11. Read the absorbance of the wells within 30 minutes.

Spectrophotometric Measurement and Analysis

1. Adjust the wavelength of your microtiter plate reader to 450 nanometers (nm). (If it has dual wavelength capability, use 600 nm or 650 nm as the "reference" wavelength.)

2. If the plate reader does not auto-zero on air, zero the instrument against 160 µL water in a blank well, then measure and record the optical density (OD) of each well's contents. Or, measure and record the OD in every well, then subtract the OD of the water blank from each of the readings.

3. If the microtiter plate reader you are using has data reduction capabilities, use a semi-log curve fit for the standard curve. You can also calculate the results manually as described in the next section.

Calculate the Results

1. After you read all of the wells, average the OD of each set of calibrators and samples, and calculate the %Bo as follows:

$$\%B_o = \frac{\text{average OD of calibrator or sample} \times 100}{\text{average OD of negative control}}$$

The %Bo calculation is used as a means of equalizing different runs of an assay. While the raw OD readings of negative controls, calibrators, and samples are likely to differ from run to run, the %Bo relationship of calibrators and samples to the Negative Control should remain fairly constant.

2. Graph the % Bo of each Calibrator against its chlortoluron concentration on a semi-log scale (see "Sample Calculations").

3. Determine the chlortoluron concentration of each sample by finding its % Bo value and the corresponding concentration level on the graph.

4. Interpolation of sample concentration is only valid if the % Bo of the sample falls within the range of the % Bo's set by the calibrators. If the % Bo of a sample is lower than that of the highest calibrator, dilute that sample so it falls on the standard curve when you run the assay again, then multiply by the dilution factor.

Ordering Information

Description	Catalog Number
EnviroGard Urea Herbicide Plate Kit	72600

Technical Assistance

General Limited Warranty

Strategic Diagnostics Inc. (SDI) warrants the products manufactured by it against defects in materials and workmanship when used in accordance with the applicable instructions for a period not to extend beyond a product's printed expiration date. **SDI MAKES NO OTHER WARRANTY, EXPRESSED OR IMPLIED. THERE IS NO WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE.**

Copyright© 199, Strategic Diagnostics Inc.,
EnviroGard is a trademark of Strategic Diagnostics Inc.
Parafilm is a trademark of the American Can Corporation.

3099694 Rev. 3 FEB 98

Appendix III. Bijsluiter Isoproturonkit

STRATEGIC DIAGNOSTICS INC.

EnviroGard® Isoproturon Plate Kit

74500

Intended Use

The EnviroGard Isoproturon Plate Kit is a quantitative laboratory test for the detection of isoproturon residues in water.

Test Principles

The EnviroGard Isoproturon Plate Kit uses polyclonal antibodies which bind both isoproturon compounds and an isoproturon-HRP enzyme conjugate. Isoproturon in the sample competes with isoproturon-HRP enzyme conjugate for a limited number of antibody binding sites. Antibodies which bind isoproturon are immobilized to the inside of the test wells.

Since the same number of antibody binding sites are available in every well, and each well receives the same number of isoproturon-HRP enzyme conjugate molecules, a sample containing a low concentration of isoproturon allows the antibody to bind many isoproturon-HRP enzyme conjugate molecules. The result is a dark blue solution.

Conversely, a high concentration of isoproturon allows fewer isoproturon-HRP enzyme conjugate molecules to be bound by the antibodies, resulting in a lighter blue solution.

NOTE: Color is inversely proportional to isoproturon concentration.

Darker color = Lower concentration

Lighter color = Higher concentration

Performance Characteristics

The EnviroGard Isoproturon Plate Kit does not differentiate between isoproturon and closely related compounds, but detects their presence to differing degrees. The following table shows the value for 50% Bo* and the approximate value for 85% Bo which is the Lower Limit of Detection (LLD). All concentrations are in parts per billion (ppb).

Compound	Interpolated LLD (85% Bo)	Interpolated 50% Bo Dose
Isoproturon	0.02	0.13
Chlorbromuron	85	1000
Chlorotoluron	6	165
Chloroxuron	>100	>1000
Diuron	7	475
Fenuron	>100	>1000
Fluometuron	>100	>1000
Linuron	46	2249
Metobromuron	3	46
Metoxuron	47	>1000
Monolinuron	41	442
Monuron	5	104
Neburon	6	586
Siduron	>100	>1000
4-Isopropylaniline	30	306

* % Bo = the average optical density (OD) of the calibrator or sample divided by the average OD of the 0 ppb Calibrator multiplied by 100.

Precautions

• Store all kit components at 4°C to 8°C (39°F to 46°F) when not in use.

- Do not freeze plate kit components or expose them to temperatures greater than 37°C (99°F).
- Allow all reagents and samples to reach ambient temperature (18°C to 27°C or 64°F to 81°F) before you begin the test.
- Do not store plate kit components for more than 8 hours at ambient temperature.
- Do not use kit components after the expiration date.
- Do not mix reagents or test well strips from plate kits with different lot numbers.
- Use approved methodologies to confirm any positive results.
- Do not dilute or adulterate test reagents or use samples not called for in the test procedure; this may give inaccurate results.
- Some solutes and particulates found in untreated ground or surface waters may affect the sensitivity level of this kit.
- Tightly recap the calibrator vials immediately after use to avoid evaporative losses.

Materials Provided in the EnviroGard Isoproturon Plate Kit

This test kit contains the following items:

- 8 strips of 12 wells each, antibody-coated, in strip holder
- 1 vial of 0.0 ppb Isoproturon Calibrator (Negative Control)
- 1 vial each of 0.05 ppb, 0.20 ppb, and 0.50 ppb Isoproturon Calibrator
- 1 vial of Isoproturon-HRP Enzyme Conjugate
- 1 vial of Substrate
- 1 vial of Chromogen
- 1 vial of Stop Solution

Materials You Provide

You also need these items:

- Marking pen
- Disposable-tip pipette which will measure 80 microliters (μL), (120 μL optional)
- Microtiter plate reader
- Tape or Parafilm®
- Watch or timer
- Clean running water or a wash bottle containing tap or deionized water [500 milliliters (mL)]
- Calculator (optional)
- Orbital shaker (optional)
- Microtiter plate washing device (optional)

Assay Procedure

Have your plate kit materials available and follow these steps:

NOTE: The raised markings on the strip holder help keep the format in the correct order while you add the reagents and sample. When adding reagents, hold the dropper vial upright over the wells and allow the drops to fall freely into the wells. Do not touch the dropper tip to the sides of the wells. To add samples, a pipette must be used.

1. Plan the strip format allowing for the placement of the 4 calibrators (C-C3), and the samples S1-4) in triplicate.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C	C	C	C1	C1	C1	C2	C2	C2	C3	C3	C3
B	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4
C												
D												
E												
F												
G												
H												

NOTE: To set up an assay using fewer than eight strips, remove the unneeded strips and store them at 4°C to 8°C (39°F to 46°F) in the re-sealable plastic bag (with desiccant) provided.

2. Add 2 drops (80 µL) of each calibrator (C-C3), and 80 µL of each sample (S1 to S4) to their respective wells, as shown above.

3. Using the same order of addition, add 2 drops (80 µL) of Isoproturon-HRP Enzyme Conjugate to each well.

NOTE: If you are running more than three strips, it is recommended that a multi-channel pipette be used in steps 2, 3, 7, 8, and 10.

4. Thoroughly mix the contents of the wells by moving the strip holder in a rapid circular motion on the benchtop for about 1 minute. Be careful not to spill the contents!

5. Cover the wells with tape or Parafilm to prevent evaporation and incubate at ambient temperature for 1 hour. Orbital mixing at 200 rpm during incubation is preferable, but not mandatory.

6. After incubation, carefully remove the covering and vigorously shake the contents of the wells into a sink. Flood the wells completely with cool running tap water, then shake to empty. Repeat this wash step five times. Invert the plate and tap out as much water as possible. Alternatively, use a microtiter plate washer for the wash steps.

7. Add 2 drops (80 µL) of Substrate to each well, beginning with the Calibrators (C to C3), and finishing with the Samples (S1 to S4).

8. Add 2 drops (40 µL)* of Chromogen to each well in the same order as the Substrate. The Chromogen solution contains methanol, and therefore each drop equals 20 µL rather than 40 µL.

NOTE: The Substrate MUST be added BEFORE the chromogen. However, if you are using more than three strips at once, you should premix two volumes of Substrate with one volume of Chromogen in an amount sufficient to fill the number of wells used. Add 120 µL of this mixture to each well with a multi-channel pipette. Mix immediately before use and do not retain any of the unused mixture.

9. Mix the contents of the wells, as in step 4. Cover the wells with new tape or Parafilm and incubate at ambient temperature for 30 minutes. Orbital mixing at 200 rpm is preferable, but not mandatory.

WARNING: Stop Solution is 2.5 N sulfuric acid.

10. Add 1 drop (40 µL) of Stop Solution to each well to arrest the blue color development and turn the reaction solution yellow. Mix thoroughly, without spilling, until all of the blue has converted to yellow.

INTERPRET THE RESULTS

Spectrophotometric Measurement and Analysis

1. Adjust the wavelength of your microtiter plate reader to 450 nanometers (nm). (If it has dual wavelength capability, use 600 or 650 nm as the "reference" wavelength.)
2. If the plate reader does not auto-zero on air, zero the instrument against 120 µL water in a blank well, then measure and record the optical density (OD) of each well's contents. Or, measure and record the OD in every well, then subtract the OD of the water blank from each of the readings.

3. If the microtiter plate reader you are using has data reduction capabilities, use a semi-log curve fit for the standard curve. You can also calculate the results manually as described in the next section.

Calculate the Results

1. After you read all of the wells, average the OD of each set of calibrators and samples, calculate the %Bo as follows:

$$\%B^o = \frac{\text{average OD of calibrator or sample} \times 100}{\text{average OD of 0 ppb calibrator}}$$

The %Bo calculation is used as a means of equalizing different runs of an assay. While the raw OD readings of calibrators and samples are likely to differ from run to run, the %Bo relationship of calibrators and samples to the 0 ppb calibrator should remain fairly constant.

2. Graph the %Bo of each non-zero calibrator against its isoproturon concentration on a semi-log scale (see "Sample Calculations").

3. Determine the isoproturon concentration of each sample by finding its %Bo value and the corresponding concentration level on the graph (or plug the %Bo values into the equation of the line calculated by linear regression).

Ordering Information

Description	Catalog Number
EnviroGard Isoproturon Plate Kit	74500

General Limited Warranty

Strategic Diagnostics Inc. (SDI) warrants the products manufactured by it against defects in materials and workmanship when used in accordance with the applicable instructions for a period not to extend beyond a product's printed expiration date. **SDI MAKES NO OTHER WARRANTY, EXPRESSED OR IMPLIED. THERE IS NO WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE.**

Copyright© 1998, Strategic Diagnostics Inc.,
EnviroGard is a trademark of Strategic Diagnostics Inc.
Parafilm is a trademark of the American Can Corporation.

Appendix IV. Bijsluiter HS Triazinekit

STRATEGIC DIAGNOSTICS INC.
EnviroGard® High Sensitivity Triazine Plate Kit
72160

Intended Use

The EnviroGard High Sensitivity Triazine Plate Kit is a quantitative laboratory test for the detection of triazine pesticide residues in water.

Test Principles

The EnviroGard High Sensitivity Triazine Plate Kit uses polyclonal antibodies which bind both triazines and atrazine-enzyme conjugate. Triazines in the sample compete with atrazine-enzyme conjugate for a limited number of antibody binding sites. Antibodies which bind triazine compounds are immobilized to the inside of the test wells. In the assay procedure you will:

Since the same number of antibody binding sites are available in every well, and each well receives the same number of atrazine-enzyme conjugate molecules, a sample containing a low concentration of triazines allows the antibody to bind many atrazine-enzyme conjugate molecules. The result is a dark blue solution.

Conversely, a high concentration of triazine allows fewer atrazine-enzyme conjugate molecules to be bound by the antibodies, resulting in a lighter blue solution.

NOTE: Color is inversely proportional to triazine concentration.

Darker color = Lower concentration
Lighter color = Higher concentration

Performance Characteristics

The EnviroGard High Sensitivity Triazine Plate Kit does not differentiate between the various triazines, but detects their presence to differing degrees. The following table shows the value for 50% B₀* and the approximate value for 90% B₀ which is the lower limit of detection or Least Detectable Dose (LDD). All concentrations are in parts per billion (ppb).

Compound	90% B ₀ (LDD)	50% B ₀
Atrazine	0.01	0.08
Ametryn	0.004	0.02
Cyanazine	0.3	26
De-Ethyl Atrazine	0.05	2
Di-Isopropanol Atrazine	2	84
6-Hydroxy Atrazine	0.007	3
Prometon	0.008	0.03
Prometryn	6	43
Propazine	0.01	0.1
Simazine	0.04	2
Simetryn	0.003	0.07
Terbuthylazine	4	27
Trietazine	0.005	36

* 100% B₀ equals the maximum amount of atrazine-enzyme conjugate that is bound by the antibody in the absence of any triazine in the sample (i.e. negative control).

The following compounds are not detectable at 10 ppm with the EnviroGard High Sensitivity Triazine Plate Kit:
Alachlor Metolachlor 2,4-D

The following compounds are not detectable at 1000 ppb with the EnviroGard High Sensitivity Triazine Plate Kit:

Aldicarb Carbaryl Di-dealkylated Atrazine
Isoproturon Carbofuran Triclopyr

Precautions

- Store all plate kit components at 4°C to 8°C (39°F to 46°F) when not in use.
- Do not freeze plate kit components or expose them to temperatures greater than 37°C (99°F).
- Allow all reagents and samples to reach ambient temperature (18°C to 27°C or 64°F to 81°F) before you begin the test.
- Do not store plate kit components for more than 8 hours at ambient temperature.
- Do not use plate kit components after the expiration date.
- Do not mix reagents or test well strips from plate kits with different lot numbers.
- Use approved methodologies to confirm any positive results.
- Do not dilute or adulterate test reagents or use samples not called for in the test procedure; this may give inaccurate results.
- Some solutes and particulates found in untreated ground or surface waters may affect the sensitivity level of this kit.
- Tightly recap all calibrator vials when not in use to prevent evaporative losses.
- Do not expose substrate to direct sunlight.
- If you test something other than water, use a calibrator with a matrix comparable to your sample.

Materials Provided

The EnviroGard High Sensitivity Triazine Plate Kit contains the following items:

8 strips of 12 antibody-coated wells each, in a strip holder
1 vial of Negative Control (0.0 ppb Triazine)
1 vial each of 0.01 ppb, 0.05 ppb, 0.10 ppb and 0.50 ppb Atrazine Calibrator*
1 vial of Atrazine-Enzyme Conjugate
1 vial of Substrate
1 vial of Stop Solution

Materials You Provide

You also need these items:

- Marking pen
- Adjustable pipette which will measure 50 to 150 microliters (μL), with disposable tips
- Microtiter plate reader
- Tape or Parafilm®
- Watch or timer
- Clean running water or a wash bottle containing tap or deionized water 500 milliliters (mL)

- Calculator which performs linear regression (optional)
- Orbital shaker (optional)
- Microtiter plate washing device (optional)

Assay Procedure

Have your plate kit materials available and follow these steps:

NOTE: The raised markings on the strip holder help keep the format in the correct order while you add the reagents calibrators and samples.

1. Plan the strip format allowing for the placement of two wells each of negative control (C), 4 calibrators (C1-C4), and the samples (S1-S7).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C	C	C1	C1	C2	C2	C3	C3	C4	C4	S1	S1
B	S2	S2	S3	S3	S4	S4	S5	S5	S6	S6	S7	S7
C												
D												

NOTE: To set up an assay using fewer than eight strips, remove the unneeded strips and store them at 4°C to 8°C (39°F to 46°F) in the re-sealable plastic bag (with desiccant) provided.

2. Add 150 µL of Negative Control (C), 150 µL of each calibrator (C1-C4), and 150 µL of each sample (S1 to S7) to their respective wells, as shown in step 1.
3. Using the same order of addition, add 50 µL of Atrazine-Enzyme Conjugate to each well.

NOTE: If you are running more than three strips, it is recommended that a multi-channel pipette be used in steps 2, 3, 7 and 9.

4. Move the strip holder in a rapid circular motion on the benchtop for about 1 minute to mix the contents of the wells thoroughly. Be careful not to spill the contents.
5. Cover the wells with tape or Parafilm to prevent evaporation and incubate at ambient temperature for 1 hour. Orbital mixing at 200 rpm during incubation is recommended, but not mandatory.
6. After incubation, carefully remove the covering and vigorously shake the contents of the wells into a sink. Flood the wells completely with cool running tap water, then shake to empty. Repeat this wash step four times. Invert the plate and tap out as much water as possible. Alternatively, use a microtiter plate washer for the wash steps.
7. Add 100 µL of Substrate to each well, beginning with the Negative Control (C) and Calibrators (C1 to C4), and finishing with the Samples (S1 to S7).
8. Mix the contents of the wells, as in step 4. Cover the wells with **new** tape or Parafilm and incubate at ambient temperature for 30 minutes. Orbital mixing at 200 rpm is recommended, but not mandatory.

WARNING: Stop Solution is 1.0 N hydrochloric acid.

9. Add 100 µL of Stop Solution to each well to arrest the blue color development and turn the reaction solution yellow. **Mix thoroughly**, without spilling, until all of the blue has converted to yellow.

NOTE: The plate should be read in the microtiter plate reader within 30 minutes of the addition of the stop solution.

Interpret The Results

Spectrophotometric Measurement and Analysis

1. Adjust the wavelength of your microtiter plate reader to 450 nanometers (nm). (If it has dual wavelength capability, use 600 or 650 nm as the "reference" wavelength.)
2. If the plate reader does not auto-zero on air, zero the instrument against 200 µL water in a blank well, then measure and record the optical density (OD) of each well's contents. Or, measure and record the OD in every well, then subtract the OD of the water blank from each of the readings.
3. If the microtiter plate reader you are using has data reduction capabilities, use a semi-log or 4 parameter logit log curve fit for the standard curve. You can also calculate the results manually as described in the next section.

Calculate the Results

1. After you read all of the wells, average the OD of each set of calibrators and samples, and calculate the %B₀ as follows:

$$\%B_0 = \frac{\text{average OD of calibrator or sample} \times 100}{\text{average OD of negative control}}$$

The %B₀ calculation is used as a means of equalizing different runs of an assay. While the raw OD readings of negative controls, calibrators, and samples are likely to differ from run to run, the %B₀ relationship of calibrators and samples to the negative control should remain fairly constant.

NOTE: To ensure accurate results, you should meet the following guideline for each of the two calibrators you are testing: the %CV [Coefficient of Variation = (standard deviation/mean) x 100] for the calibrator OD values should not exceed 15%.

2. Graph the %B₀ of each calibrator against its atrazine concentration on a semi-log scale.
3. Determine the atrazine concentration of each sample by finding its %B₀ value and the corresponding concentration level on the graph (or enter the %B₀ values into the equation of the line calculated by linear regression).

Ordering Information

Description	Catalog Number
EnviroGard High Sensitivity Triazine Plate Kit	72160

Technical Assistance

General Limited Warranty

Strategic Diagnostics Inc. (SDI) warrants the products manufactured by it against defects in materials and workmanship when used in accordance with the applicable instructions for a period not to extend beyond a product's printed expiration date. SDI MAKES NO OTHER WARRANTY, EXPRESSED OR IMPLIED. THERE IS NO WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE.

Copyright© 1998, Strategic Diagnostics Inc.,

EnviroGard is a registered trademark of Strategic Diagnostics Inc.

Parafilm is a trademark of the American Can Corporation.

3099940 Rev. 5 FEB 98

Appendix V. Bijsluiter Triazinekit

72110

- [illegible]

NOTE: To set up an assay using fewer than eight strips, remove the unneeded strips and store them at 4°C to 8°C (39°F to 46°F) in the re-sealable plastic bag (with desiccant) provided.

2. Add 80 µL of Negative Control (C), 80 µL of each calibrator (C1-C3), and 80 µL of each sample (S1 to S8) to their respective wells, as shown in step 1.

3. In the same order of addition, add 2 drops (80 µL) of Atrazine-Enzyme Conjugate to each well.

NOTE: If you are running more than three strips, it is recommended that a multi-channel pipette be used in steps 2, 3, 7, 8, & 10.

4. Move the strip holder in a rapid circular motion on the benchtop for about 1 minute to mix the contents of the wells thoroughly.

CAUTION: Be careful not to spill the contents.

5. Cover the wells with tape or Parafilm to prevent evaporation and incubate at ambient temperature for 1 hour. Orbital mixing at 200 rpm during incubation is recommended, but not mandatory.

6. After incubation, carefully remove the covering and vigorously shake the contents of the wells into a sink. Flood the wells completely with cool running tap water, then shake to empty. Repeat this wash step five times. Invert the plate and tap out as much water as possible. Alternatively, use a microtiter plate washer for the wash steps.

7. Add 2 drops (80 µL) of Substrate to each well, beginning with the Negative Control (C) and Calibrators (C1 to C3), and finishing with the Samples (S1 to S8).

8. Add 2 drops (40 µL) of Chromogen to each well in the same order as for Substrate. The chromogen solution contains methanol; therefore, each drop equals 20 µL rather than 40 µL.

NOTE: You **MUST** add substrate before the chromogen. However, if all 96 wells are to be used at once, you can premix the substrate and chromogen by combining the contents of the 2 vials. Add 120 µL of this mixture to each well. Mix immediately before use and do not retain any of the unused mixture.

9. Mix the contents of the wells, as in step 4. Cover the wells with new tape or Parafilm and incubate at ambient temperature for 30 minutes. Orbital mixing at 200 rpm is recommended but not mandatory.

WARNING: Stop Solution is 2.5 N sulfuric acid.

10. Add 1 drop (40 µL) of Stop Solution to each well to arrest the blue color development and turn the reaction solution yellow. Mix thoroughly, without spilling, until all of the blue has converted to yellow.

Interpret The Results

Spectrophotometric Measurement and Analysis

1. Adjust the wavelength of your microtiter plate reader to 450 nanometers (nm). (If it has dual wavelength capability, use 600 or 650 nm as the "reference" wavelength.)

2. If the plate reader does not auto-zero on air, zero the instrument against 160 µL water in a blank well, then measure and record the optical density (OD) of each well's contents. Or, measure and record the OD in every well, then subtract the OD of the water blank from each of the readings.

3. If the microtiter plate reader you are using has data reduction capabilities, use a semi-log curve fit for the standard curve. You can also calculate the results manually as described in the next section.

Calculate the Results

1. After you read all of the wells, average the OD of each set of calibrators and samples, and calculate the %Bo as follows:

$$\%B_o = \frac{\text{average OD of calibrator or sample} \times 100}{\text{average OD of negative control}}$$

The %Bo calculation is used as a means of equalizing different runs of an assay. While the raw OD readings of negative controls, calibrators, and samples are likely to differ from run to run, the %Bo relationship of calibrators and samples to the negative control should remain fairly constant.

2. Graph the %Bo of each calibrator against its atrazine concentration on a semi-log scale.

3. Determine the atrazine concentration of each sample by finding its %Bo value and the corresponding concentration level on the graph (or plug the %Bo values into the equation of the line calculated by linear regression).

4. Interpolation of sample concentration is only valid if the %Bo of the sample falls within the range of the %Bo's set by the calibrators. If the %Bo of a sample is lower than that of the highest calibrator, dilute that sample with laboratory grade water so it falls on the standard curve when you repeat the assay.

Ordering Information

Description	Catalog Number
EnviroGard Triazine Plate Kit	72110

Technical Assistance

General Limited Warranty

Strategic Diagnostics Inc. (SDI) warrants the products manufactured by it against defects in materials and workmanship when used in accordance with the applicable instructions for a period not to extend beyond a product's printed expiration date. SDI MAKES NO OTHER WARRANTY, EXPRESSED OR IMPLIED. THERE IS NO WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE.

Copyright© 1998, Strategic Diagnostics Inc.
EnviroGard is a trademark of Strategic Diagnostics Inc.
Parafilm is a trademark of the American Can Corporation.

3099400 Rev. 3 FEB 98

