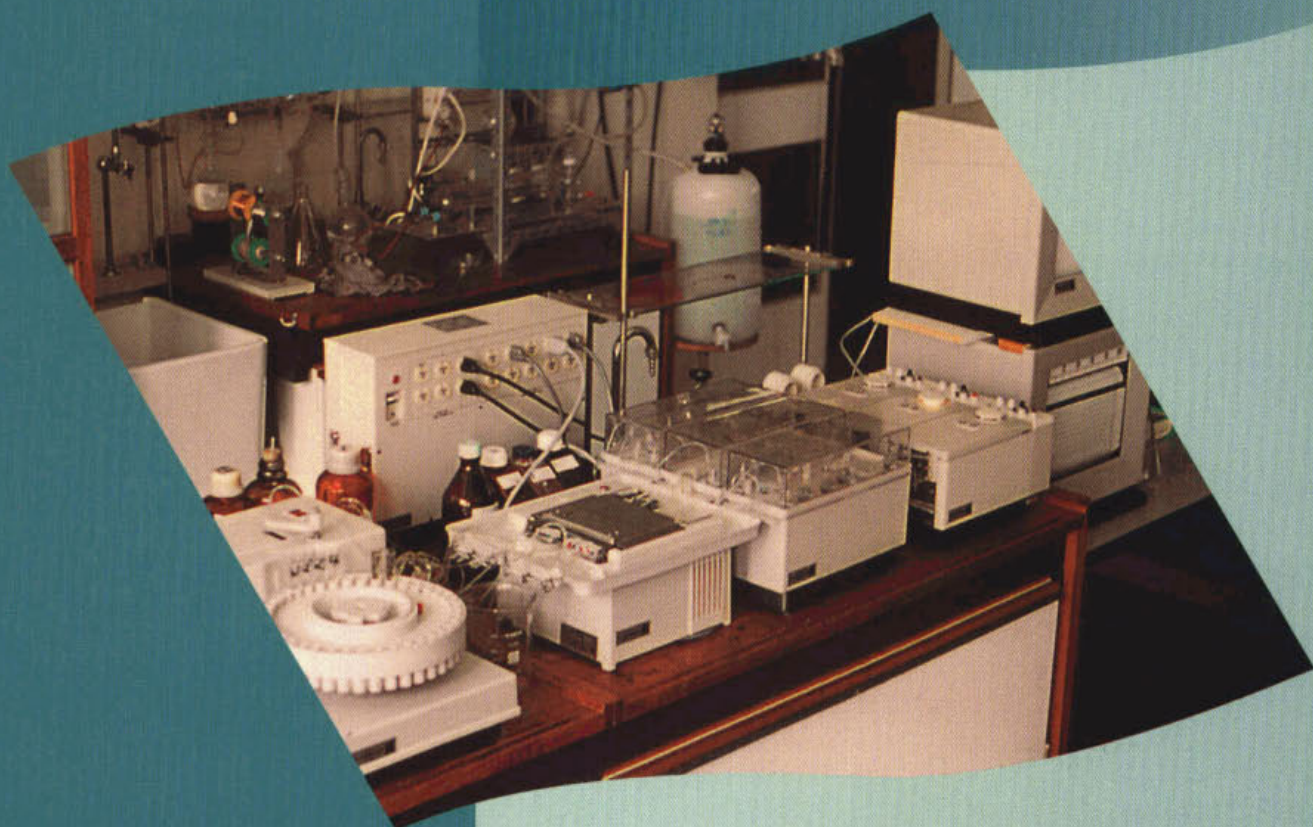


Indicatieve analytische methoden en groeps- en somparameters voor de bepaling van waterkwaliteit

Validatie van geselecteerde technieken



97 09

Indicatieve analytische methoden en groeps- en somparameters voor de bepaling van waterkwaliteit

Validatie van geselecteerde technieken

97 09

Arthur van Schendelstraat 816

Postbus 8090, 3503 RB Utrecht

Telefoon 030 232 11 99

Fax 030 232 17 66

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

Hageman Verpakkers BV

Postbus 281

2700 AC Zoetermeer

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

ISBN 90.74476.75.9

INHOUD

TEN GELEIDE

1	INLEIDING	1
1.1	Algemeen	1
1.2	Inzetbaarheid van de geselecteerde technieken	4
1.3	Kosten en tijdsaspecten	5
1.4	Uitgevoerde werkzaamheden	7
1.5	Doelstoffen	7
1.6	Veldmonsterprogramma	8
1.7	Deze rapportage	9
2	IMMUNOCHEMISCHE METHODEN	11
2.1	Werkwijze	11
2.2	Monsteroplossingen	12
2.3	Resultaten	13
3	HPLC FINGERPRINT METHODEN	23
3.1	Werkwijze	23
3.2	Resultaten somparameter	25
3.3	Resultaten doelstofanalyse	27
4	VERGELIJKINGSONDERZOEK PRAKTIJKMONSTERS EN GESPIKETE MONSTERS	29
4.1	Opzet van het onderzoek	29
4.2	Immunochemische methoden	32
4.3	HPLC Fingerprint methoden	34
4.4	Algemene beschouwing van de resultaten	35
5	CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN	41
5.1	Immunochemische methoden	41
5.2	HPLC Fingerprint methoden	42

Figuren 1-10

Bijlagen 1-8

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. immuno-assaytechnieken, chemische indicatoren en selectieve bioassays. Daarnaast kan in bepaalde situaties mogelijk worden volstaan met de bepaling van groeps- en somparameters, danwel 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 het aan het International Centre of Water Studies (ICWS) in Amsterdam, om in samenwerking met AquaSense, EltiSupport en KIWA een studie uit te voeren naar mogelijk geschikte indicatieve analytische methoden en groeps- en somparameters voor de bepaling van de waterkwaliteit. Het tweede produkt van deze studie is een validatie van de meest belovende methoden uit een eerder uitgevoerde inventarisatie. Als derde fase van het onderzoek zal nog een nadere toetsing en de implementatie van deze technieken in de praktijk van het Nederlandse waterbeheer plaatsvinden.

Het project is uitgevoerd door het ICWS met medewerking van AquaSense, EltiSupport en KIWA. Het projectteam bestond uit dr. H.A.G. Niederländer (projectleider), mw.dr. P.M.M. Meulenberg (EltiSupport) en dr. Th.H.M. Noij (KIWA).

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 en dhr. H. van den Berg (Zuiveringschap West-Overijssel), dhr. B. Eshuis (Waterschap Regge & Dinkel), dr. S.P. Klapwijk (STOWA), dr. W.H. Mulder (RIZA), dhr. P.J. van der Wee (Hoogheemraadschap van Rijnland) en drs. D. de Zwart (RIVM) als leden.

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

Utrecht, april 1997

De directeur van de STOWA

drs. J.F. Noorthoorn van der Kruijff

1 INLEIDING

1.1 Algemeen

Chemische analysemethoden moeten aan hoge eisen voldoen om bruikbare resultaten te kunnen leveren. Zo wordt verwacht dat een methode robuust is, selectief de gezochte verbinding(en) aantoonst, de monstermatrix geen invloed heeft op de bepaling en dat de detectielimieten ruim beneden de AMK-normen liggen. Om aan deze voorwaarden te kunnen voldoen blijken steeds vaker dure en gecompliceerde analysemethoden noodzakelijk te zijn. Dergelijke analysemethoden blijken bovendien vaak bijzonder tijdrovend te zijn. Daarnaast gebeurt het niet zelden dat dure analysemethoden gebruikt worden om uiteindelijk te constateren dat de gezochte verbinding niet aangetoond kan worden.

Vooraf ten behoeve van routinemetingen zou een indicatieve (voor)analyse een belangrijke verbetering betekenen; daarmee zou een eerste scheiding worden aangebracht tussen 'verdachte' en 'onverdachte' monsters. Voor de laatste categorie kunnen de eerder genoemde dure analyses dan wellicht achterwege blijven. Kansrijke indicatieve analysetechnieken zijn onder andere immunoassaytechnieken, selectieve bioassays en enzymremmings-assays. Verder bieden ook sensor technieken (chemische - en biosensoren) in toenemende mate interessante mogelijkheden voor de milieu-analyse.

Naast dergelijke indicatieve methoden kan, afhankelijk van het doel en de onderzoeksvraag, mogelijk voor een deel van de werkzaamheden worden volstaan met de bepaling van groeps- of somparameters, dan wel met breed screenende technieken. Kansrijke nieuwe technieken zijn onder andere: totaalgehalte vluchtig organokoolstof (VOC), adsorbeerbaar organohalogenen (AOX), extraheerbaar organostikstof (EON), bepaling van organotin (na extractie) met AAS en somparameterbepaling en multicomponentenscreening met bijvoorbeeld HPLC en UV of diode array detectie.

Om een beter beeld te krijgen van de analytische technieken die voor dit doel beschikbaar zijn en de toepassingsmogelijkheden die deze technieken bieden is een inventarisatie-, validatie- en implementatie-onderzoek noodzakelijk.

In opdracht van de Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer (STOWA) en in het kader van het STOWA onderzoeksplan 1995-1999, heeft ICWS opdracht gekregen een bijdrage te leveren aan de inventarisatie, validatie en mogelijk implementatie van indicatieve analytische technieken en analytische technieken die een groeps- of somparameterresultaat opleveren. De twee hoofddoelstellingen die voor het gehele project geformuleerd werden luiden als volgt:

- A Selectie en evaluatie van de toepasbaarheid van (eenvoudige, snelle en goedkope) indicatieve (voor)analysetechnieken die potentieel inzetbaar zijn voor routinematig door de waterbeheerders uit te voeren bepalingen.
- B Evaluatie van chemische groeps- en somparameters voor de bepaling of screening van organische microverontreinigingen in water, en het operationeel maken en valideren van

geselecteerde methode(n) en overdragen van deze methode(n) naar uitvoerende laboratoria.

Door de STOWA is een begeleidingscommissie samengesteld om de voortgang en de behaalde resultaten zo breed mogelijk te toetsen aan de mening van experts en de visie van de waterbeheerders (die immers de "ontvangende partij" zijn in dit project). De begeleidingscommissie bestaat uit vertegenwoordigers (experts) van verschillende Nederlandse instellingen, die zich onder andere bezighouden met de ontwikkeling/implementatie van nieuwe technieken voor milieu-analyse, en vertegenwoordigers van een aantal waterbeheerders.

In grote lijnen loopt het project langs twee sporen, overeenkomstig met de beide hierboven geformuleerde doelstellingen. Daarbij worden enerzijds de mogelijkheden van indicatieve analytische methoden onderzocht en anderzijds de mogelijkheden van groeps- en somparameters. Gezien het nut van kruisbestuivingen en interacties tussen deze beide sporen heeft vanaf de start van het project een integrale benadering plaatsgevonden. Dit houdt onder andere in dat overlegmomenten en rapportages volledig geïntegreerd zijn. Daarnaast is er naar gestreefd om validatieonderzoek zo veel mogelijk op elkaar af te stemmen; bijvoorbeeld door waar mogelijk dezelfde prestatiekenmerken als toetskader te hanteren en gebruik te maken van identieke modelmonsters.

Het project is onderverdeeld in drie fasen die als zelfstandig deelproject volgtijdelijk uitgevoerd worden. De resultaten van een vorige fase zijn daarbij bepalend voor de inhoud, omvang en planning van de daaropvolgende fase. Hieronder wordt een korte omschrijving gegeven van de onderzoeksactiviteiten in elk van de drie fasen:

Fase Korte omschrijving

1. Bureaustudie: inventarisatie en evaluatie van de beschikbaarheid en de toepasbaarheid van nieuwe en bestaande indicatieve analysemethoden en de toepasbaarheid van chemische groeps- en somparameters. Selectie van de meest kansrijke methoden.
Statistische analyse van waterkwaliteitsdata.
2. Validatie van de meest kansrijke en toepasbare indicatieve methoden en groeps- en somparameters op basis van bestaande ervaringen gekoppeld aan een beperkt veldonderzoek. Evaluatie in termen van analytische prestaties, alsmede kosten en tijdsaspecten.
3. Toepassing en evaluatie van de geselecteerde indicatieve methoden binnen een/enkele onderzoeksproject(en) bij de deelnemende waterbeheerders. Implementatie van enkele methode(n) bij laboratoria van de waterbeheerders behoort in deze fase ook tot de mogelijkheden.

De onderhavige rapportage bevat de resultaten van fase 2 van dit project en heeft betrekking op een (beperkte) validatie van een aantal van de analytische methoden, waarvoor tijdens fase 1 van het project een inventarisatie werd uitgevoerd. De werkzaamheden in deze tweede fase zijn volledig gebaseerd op de resultaten van fase 1 en werden uitgevoerd door ICWS, in samenwerking met EltiSupport en Kiwa.

Tijdens fase 1 werd een zo breed mogelijk scala aan potentieel bruikbare analytische methoden geïnteriseerd. Zowel bestaande en beschreven methoden alsook nieuwe en nog niet (breed) toegepaste technieken werden bij het onderzoek betrokken. 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 etc.;
5. kosten (apparatuur, verbruiksgoederen).

De inventarisatie werd uitgevoerd door ICWS, in samenwerking met drie partners (AquaSense, EltiSupport en Kiwa). De selectie van methoden voor vervolgonderzoek (fase 2), op basis van de resultaten van fase 1, werd door de begeleidingscommissie uitgevoerd. De begeleidingscommissie heeft zich in haar beslissing laten leiden door:

- de argumenten die door de uitvoerende partijen in dit project naar voren zijn gebracht;
- eigen ervaringen met de geïnteriseerde technieken;
- de mogelijkheden om de technieken op korte termijn voor de waterbeheerders toegankelijk te maken;
- de mate waarin de technieken reeds bekend zijn bij de waterbeheerders;
- kostenoverwegingen.

Op basis van deze criteria zijn de hieronder aangegeven methoden opgenomen voor een verdere praktische evaluatie tijdens fase 2 van dit project:

Immunoassays voor de bepaling van:

- fenylureumherbiciden (groepspecifiek, standaard: chloortoluron);
- triazines¹ (groepspecifiek, standaard: atrazine);
- isoproturon (verbindingsspecifiek, doelverbinding: isoproturon);
- cyclodiënen (groepspecifiek, standaard: chloordaan).

¹ De assay is ontworpen voor de detectie van atrazine, maar is als gevolg van de hoge kruisreactiviteit voor verwante verbindingen, goed te gebruiken als groepspecifieke assay voor triazines.

HPLC fingerprint analyse met UV, of Diode Array detectie voor de bepaling van:

- een somparameter voor vloeistof-chromatografeerbare polaire verontreinigingen;
- geselecteerde polaire doelstoffen.

Een toelichting op de door de begeleidingscommissie gemaakte selectie en een uitgebreide beschrijving van de hierboven genoemde analysemethoden zijn opgenomen in de rapportage voor fase 1 van dit project.

1.2 Inzetbaarheid van de geselecteerde technieken

De geselecteerde analysemethoden bestrijken in grote lijnen hetzelfde toepassingsgebied, d.w.z. de bepaling van polaire bestrijdingsmiddelen in waterige matrices². Voor de twee hoofdgroepen waarin de technieken kunnen worden ingedeeld, immunochemische - en Hoge Prestatie Vloeistof Chromatografie (HPLC) technieken, wordt daarbij echter een fundamenteel andere benadering gekozen. Dit verschil is min of meer inherent aan de principes die aan de beide technieken ten grondslag liggen.

De immunochemische technieken zijn elk afzonderlijk slechts inzetbaar voor de bepaling van een groep structureel verwante bestrijdingsmiddelen (i.e. fenylureumherbiciden, of triazines, of cyclodiënen ... etc.). Om te voorkomen dat een grote batterij van verschillende immunoassays ingezet moet worden om een specifiek waterkwaliteitsprobleem te onderzoeken, is het derhalve noodzakelijk om vooraf te beschikken over informatie met betrekking tot de verbindingsgroep(en) die dit probleem veroorzaakt/veroorzaken. Wanneer dergelijke informatie beschikbaar is, kan met immunochemische technieken de omvang van een waterkwaliteitsprobleem snel in kaart gebracht worden. Zoals uit de (toelichting op) de doelstelling van dit onderzoeksprogramma volgt, dienen voor de identificatie van individuele probleemstoffen vervolgens meer specifieke analysemethoden ingezet te worden. Dat zo'n specifieke analysemethode ook een immunochemische methode kan zijn, wordt in deze fase van het onderzoeksproject geïllustreerd met een stofs specifieke immunoassay (voor isoproturon), die eveneens in het validatieprogramma is opgenomen.

De somparameter, gebaseerd op HPLC-UV analyse, biedt de mogelijkheid om met één enkele meting een aanmerkelijk bredere groep van polaire verbindingen te adresseren. Enerzijds betreft het bestrijdingsmiddelen, maar ook andere - antropogene en natuurlijk voorkomende - polaire verbindingen vormen een integraal onderdeel van deze somparameter. Uitsluitend verbindingen die bijzonder polair of apolair zijn en verbindingen die geen UV-absorptie vertonen bij de gekozen golflengte vallen buiten het bereik van deze methode. De hoeveelheid voorinformatie met betrekking tot de verbindingsgroepen die een specifiek waterkwaliteitsprobleem veroorzaken, die voor het inzetten van deze methode noodzakelijk is, is derhalve gering. Voor het in kaart brengen van een waterkwaliteitsprobleem met deze methode, is echter meer tijd noodzakelijk, omdat met één instrument niet meer dan één bepaling gelijktijdig uitgevoerd kan worden. Voorts dienen, evenals bij de immunochemische technieken, voor de identificatie van individuele probleemstoffen meer specifieke analysemethoden ingezet te worden. Dat voor zo'n meer specifieke analysemethode gebruik gemaakt kan worden van hetzelfde chromatografische systeem wordt in deze fase van het onderzoeksproject geïllustreerd met een HPLC Diode Array Detectie (DAD) methode, die eveneens

² Voor de immunochemische technieken is tevens gekozen voor een assay gericht op de bepaling van cyclodiënen.

in het validatieprogramma is opgenomen.

1.3 Kosten en tijdsaspecten

1.3.1 Immunochemische methoden

In onderstaande tabel wordt een overzicht gegeven van de operationele kosten die gemoeid zijn met het uitvoeren van de verschillende immunochemische methoden. In het overzicht is rekening gehouden met kosten voor de immunoassay kits, additionele kosten voor verbruiksartikelen en chemicaliën en personeelskosten (manuren). Voor de personeelskosten is er van uit gegaan dat incubatietijden geen supervisie behoeven en derhalve geen personeelskosten met zich meebrengen.

Investeringskosten zijn niet in het overzicht opgenomen aangezien deze slechts eenmalig worden gemaakt en niet zonder meer naar een kostenpost per monster kunnen worden omgerekend. Voor de immunochemische methoden bedragen deze investeringskosten ten minste circa Hfl. 5000 tot 6000, voor de aanschaf van een microtiterplaatlezer, of een eenvoudige spectrofotometer. Additioneel moet op dit punt rekening gehouden worden met kosten voor laboratoriuminrichting, huisvesting, bedrijfsvoering, bureauwerkzaamheden (overhead), etc.

Immunoassay kit	capaciteit (monsters per kit)	tijdsbesteding		kosten			
		totaal (uren)	onbe- waakt ¹	assay kit (Hfl./kit)	diversen (Hfl./kit)	manuren (Hfl./uur)	overall (Hf./ monster)
fenylureumherbiciden	28	4	37.5%	1075	25	100	48
triazines	30	4	10.0%	1185	25	100	52
lisoproturon	28	4	37.5%	1075	25	100	48
cyclodiënen	29	4	37.5%	1185	25	100	50

¹ het deel van de totale tijdsbesteding waarbij geen actieve inzet van een laboratoriummedewerker noodzakelijk is (i.e. incubatietijd).

De kosten die voor de analyse van één monster gemaakt moeten worden, bedragen circa Hfl. 50,- voor elk van de immunochemische methoden. Daarbij is er vanuit gegaan dat een complete monsterserie van 28 tot 30 monsters in één keer met een immunoassaykit gemeten wordt. Aangezien de meting van een complete monsterserie steeds de gelijktijdige bepaling van een viertal standaarden behoeft, stijgen de kosten die per monster gemaakt worden als kleinere monsterseries gehanteerd worden. Daarbij dient opgemerkt te worden dat een immunoassaykit in delen gebruikt kan worden, zodat bij series van 12 monsters twee keer de helft van de immunoassaykit ingezet kan worden, waarbij beide keren een serie van vier standaarden meegemeten moet worden.

Voor de gemiddelde tijdsbesteding per monster geldt een soortgelijk verband. De gelijktijdige bepaling van een monsterserie van elke willekeurige omvang neemt altijd circa 4 uur in beslag. Bij series van 28 monsters leidt dat derhalve tot een gemiddelde van 8 tot 9 minuten per monster, terwijl bij een serie van bijvoorbeeld twaalf monsters dit gemiddelde stijgt naar 20 minuten per monster.

Tot slot kan opgemerkt worden dat zowel de kosten als de tijdsbesteding recht evenredig zijn met het aantal immunochemische bepalingen dat per monster moet worden uitgevoerd. De bepaling van zowel fenylureumherbiciden, als triazines, als cyclodiënen in een monster is dan dus drie keer zo duur, en neemt drie keer zoveel tijd in beslag, als wanneer bijvoorbeeld uitsluitend fenylureumherbiciden worden bepaald.

1.3.2 HPLC fingerprint methoden

In onderstaande tabel wordt een overzicht gegeven van de operationele kosten die gemoeid zijn met het bepalen van de HPLC-UV somparameter en de HPLC-DAD doelstofanalyse bij routinematige toepassing in grote monsterseries. In het overzicht is rekening gehouden met kosten voor gebruiksartikelen en personeelskosten (manuren). Voor de personeelskosten is er van uit gegaan dat de instrumentele analyse volledig geautomatiseerd, buiten kantoor tijden, wordt uitgevoerd en geen supervisie behoeft. Dit is weergegeven als het percentage van de tijd dat "onbewaakt" kan verstrijken.

Investeringskosten zijn niet in het overzicht opgenomen, aangezien deze slechts eenmalig worden gemaakt en niet zonder meer naar een kostenpost per monster kunnen worden omgerekend. Voor beide HPLC fingerprint methoden bedragen deze investeringskosten circa Hfl. 150.000,- voor de aanschaf van een volledig geautomatiseerde en geïntegreerde opstelling (i.e. autosampler, voorkolom-systeem, gradiëntelutie systeem, kolom en thermostaat, DAD-detector en gegevensopslag- en verwerkingsapparatuur). Additioneel moet op dit punt rekening gehouden worden met kosten voor laboratoriuminrichting, huisvesting, bedrijfsvoering, bureauwerkzaamheden (overhead), onderhoud kwaliteitssysteem, etc.

HPLC methode	capaciteit ³	tijdsbesteding		kosten			
		totaal (uren) ²	onbe-waakt ¹	verbruiks-artikelen (Hfl./serie)	diversen (Hfl./ serie)	manuren (Hfl./uur)	overall (Hfl./ monster)
somparameter	32	120	80	400	1000	100	119
doelstofanalyse	32	120	70	400	1000	100	156

1 het deel van de totale tijdsbesteding waarbij geen actieve inzet van een laboratoriummedewerker noodzakelijk is (i.e. instrumentele analyse)

2 inclusief (off-line uitgevoerde) voorbereiding (filtratie), HPLC-runtijd, dataverwerking, DAD-interpretatie, rapportage en administratieve monsterbegeleiding

3 exclusief controlemonsters, calibratiestandaarden, controlestandaarden, blanco's en additiemonsters, totale capaciteit gehele sampler: 56 samples

De kosten die voor de analyse van één monster gemaakt moeten worden bedragen derhalve Hfl. 120 - 160,- voor elk van de HPLC fingerprint methoden. Daarbij is er vanuit gegaan dat een complete monsterserie van 32 monsters + een totaal van 24 kwaliteitsborgingsmonsters in één keer met de autosampler verwerkt wordt. Aangezien de meting van een complete monsterserie steeds de gelijktijdige bepaling van een vast minimum aantal kwaliteitsborgingsmonsters behoeft (voor kleinere series tenminste 12), stijgen de kosten per monster als kleinere monsterseries gehanteerd worden. Zo zullen bij een serie van slechts 6 monsters in plaats van 32 de kosten per monster ongeveer verdubbelen.

Voor de gemiddelde tijdsbesteding per monster geldt dat behalve de HPLC-runtijd van circa 90 minuten ook tijd is opgevoerd voor voorbereiding en dataverwerking van tenminste 30 minuten per monster. Afhankelijk van de complexiteit van het monster en de mate van routinematige toepassing kan meer tijd nodig zijn.

Tot slot kan opgemerkt worden dat kosten en tijdsbesteding niet recht evenredig toenemen als beide bepalingen voor een monster moeten worden uitgevoerd. Aangezien de instrumentele resultaten, die bij de doelstofanalyse verkregen worden direct gebruikt kunnen worden voor de bepaling van de somparameter, zullen kosten die met het uitvoeren van beide bepalingen voor hetzelfde monster gemoeid zijn slecht tot circa 30% hoger liggen dan voor het uitvoeren van één van deze beide bepalingen.

1.4 Uitgevoerde werkzaamheden

Tijdens de (beperkte) validatieronde (fase 2 van dit project) werden de geselecteerde analysetechnieken toegepast voor het uitvoeren van bepalingen van relevante parameters in modelmonsters, onder mogelijk wijzigende analytisch-procedurele omstandigheden. Bij de validatiewerkzaamheden is aandacht besteed aan aspecten als: toepassingsgebied, doelstoffen, gevoeligheid, blanco waarden, specificiteit, meetbereik, lineariteit, betrouwbaarheid/juistheid, herhaalbaarheid, matrixeffecten, storingsgevoeligheid en gebruiksvriendelijkheid (voor de individuele technieken afhankelijk van al bekende gegevens en prioriteiten). Voor geen van de technieken is ontwikkelingswerk uitgevoerd.

Voor de immunoassay methoden werd expliciet aandacht besteed aan de volgende aspecten:

- Gevoeligheid
- Intra-assay variatie
- Inter-assay variatie
- Lineariteit
- Matrixeffecten (d.w.z. op assay nauwkeurigheid en precisie, alsmede op recovery na filtratie of bezinking)
- Recovery
- Nauwkeurigheid

Voor de HPLC fingerprint analyses is expliciet aandacht besteed aan de volgende aspecten:

1. Het definiëren van een somparameter voor waterkwaliteit op basis van een HPLC/UV fingerprint. Daarbij werd tevens aandacht besteed aan een aantal prestatiekenmerken voor de geselecteerde somparameter:
 - Herhaalbaarheid
 - Memory-effecten
 - Blanco waarden
 - Matrixeffecten
2. Het bepalen van retentietijden voor een tiental doelstoffen (zie hieronder) en het opnemen, bewerken en in een bibliotheek vastleggen van de bijbehorende UV-absorptiespectra. Daarbij werd tevens aandacht besteed aan een aantal prestatiekenmerken van de methode voor de doelstoffen:
 - Herhaalbaarheid (voor retentietijden en gemeten concentraties)
 - Recovery
 - Lineariteit
 - Aantoonbaarheidsgrenzen

1.5 Doelstoffen

Voor de HPLC fingerprint doelstofanalyse werd een selectie gemaakt van tien verbindingen die relevant zijn voor de waterkwaliteit. De selectie van stoffen is gebaseerd op voorstellen vanuit de

begeleidingscommissie en de technische mogelijkheden om de gewenste stoffen te analyseren. De geselecteerde verbindingen behoren tot de volgende groepen: triazines, fenylureumherbiciden, carbamaten en enkele (moderne) stikstof- en chloor-bestrijdingsmiddelen. Vanwege de onvoldoende scheiding van atrazine en isoproturon is, om de prestatiekenmerken niet te laten beïnvloeden door een (toevallige) slechte chromatografische scheiding, in deze uiteindelijke selectie isoproturon vervangen door mevinfos (waarvoor twee stereo-isomeren, cis- en trans-, onderscheiden kunnen worden). De geselecteerde verbindingen zijn weergegeven in onderstaande tabel.

Geselecteerde verbindingen voor doelstofanalyse	
simazin	metribuzin
diuron	carbendazim
mevinfos (cis en trans)	pirimicarb
atrazin	metolachloor
chloridazon	vinchlozolin

Niet opgenomen zijn zure bestrijdingsmiddelen (fenolen en chloorfenoxycarbonzuren) omdat deze niet zonder aanvullend onderzoek en verdere ontwikkeling van de methode te combineren zijn met de pH-neutrale HPLC/UV-fingerprint. Bij de selectie is bovendien rekening gehouden met de wens om resultaten voor immunoassays voor fenylureumherbiciden en triazines te vergelijken met resultaten voor de HPLC fingerprint doelstofanalyses. Ook voor de (beperkte) validatie van de immunoassay methoden werd derhalve, waar relevant, gebruik gemaakt van deze zelfde lijst van verbindingen. Voor de evaluatie van de immunoassay methode voor de analyse van isoproturon (stofs specifiek), werd deze verbinding nog aan de lijst van doelstoffen toegevoegd.

Voor de immunoassay methode voor de bepaling van cyclodiënen werd een volledig gescheiden validatieprogramma gevolgd. Daarbij werd gebruik gemaakt van een selectie van cyclodiënen, uitgaande van de door de fabrikant bij de assay geleverde specificaties.

Geselecteerde verbindingen voor cyclodiënen assay validatie	
chloordaan	endrin
aldrin	alfa-endosulfan
dieldrin	heptachloor

1.6 Veldmonsterprogramma

Om bij het bestuderen van matrixeffecten zoveel mogelijk aan te sluiten bij de matrices zoals de waterbeheerders deze in praktijksituaties tegenkomen, zijn aan het slot van fase 2 voor elk van de technieken bepalingen uitgevoerd voor een vijftiental (extra) "veldmonsters". Daartoe zijn in de verschillende beheersgebieden in totaal vijf monsters genomen die zo mogelijk "vrij" waren van de parameters waarop de geselecteerde indicatieve analysetechnieken betrekking hebben³. Door middel van standaardadditie met een bekende concentratie van relevante modelstoffen is, uitgaande

³ De samenstelling van deze modelmonsters is langs onafhankelijke weg vastgesteld d.m.v. screening op een breed pakket aan bestrijdingsmiddelen.

van deze vijf basismonsters, voor elk van de te valideren analysemethoden een serie van vijftien synthetische veldmonsters samengesteld. Deze monsters werden ("blind") voor bepaling met de te valideren analysetechnieken aangeboden.

1.7 Deze rapportage

De indeling van deze rapportage is als volgt:

De hoofdstukken 2 en 3 geven een overzicht van de, voor elk van de analysemethoden, individueel uitgevoerde validatie-onderdelen. Achtereenvolgens wordt de validatie van de immunochemische (Hoofdstuk 2) en de vloeistofchromatografische (Hoofdstuk 3) methoden besproken. Aangezien op dit moment nog geen conclusies kunnen worden getrokken met betrekking tot onderlinge verschillen tussen de prestaties van de verschillende methoden, zijn concluderende opmerkingen binnen deze hoofdstukken voor de individuele methoden geformuleerd; i.e. uitgesplitst naar immunochemische en vloeistofchromatografische methoden.

Hoofdstuk 4 geeft een overzicht van de resultaten van het "veldmonster" programma. Allereerst wordt de selectie van basismonsters en het additieschema voor dit programma omschreven. Daarbij wordt tevens aandacht besteed aan de onafhankelijke screening van de basismonsters op de aanwezigheid van - in het kader van dit project - relevante bestrijdingsmiddelen. Vervolgens worden de resultaten die met de verschillende analysemethoden werden verkregen, becommentarieerd en ten opzichte van de basisgegevens (i.e. de additieconcentraties) geëvalueerd. Tot slot worden de verschillende gegevens tegen elkaar afgezet om tot een geïntegreerde conclusie met betrekking tot de prestaties van de individuele methoden te komen.

Hoofdstuk 5 geeft een algemene conclusie met betrekking tot de prestaties van de verschillende analysemethoden.

2 IMMUNOCHEMISCHE METHODEN

2.1 Werkwijze

De hieronder beschreven algemene procedure is van toepassing op de uitvoering van elk van de in deze rapportage beschreven immunoassays. Voor detailinformatie wordt verwezen naar de bijlagen bij de rapportage van fase 1.

Algemene procedure:

- 1 80 tot 200 µl (afhankelijk van de assay) van het te meten monster (dan wel vrije standaard voor ijkdoeleinden) wordt, gelijktijdig met een bekende hoeveelheid standaard-enzymconjugaat, toegevoegd aan het met antilichaam gecoate dragermateriaal (microtiterplaat, of magnetiseerbare bolletjes).

De geconjugeerde standaard en de in het monster aanwezige (kruis)reagerende verbindingen, gaan een competitie aan voor bindingsplaatsen op het antilichaam. Hoe hoger de concentratie kruisreagerende verbindingen in het monster, des te minder enzymconjugaat aan het antilichaam kan binden.

- 2 Na incubatie (circa 5 tot 60 min afhankelijk van de assay) worden alle ongebonden stoffen weggewassen (circa 3 tot 5 maal afhankelijk van de assay).
- 3 Daarna worden chromogeen en enzymsubstraat toegevoegd (incuberen circa 2 tot 30 min afhankelijk van de assay).
Hoe minder enzym gebonden is aan het antilichaam, des te lager de omzetting van het chromogeen en als gevolg des te minder kleur ontstaat.
- 4 Tot slot wordt een stopoplossing toegevoegd en de kleuring gemeten (bij 450 nm), dan wel op het oog met de standaarden vergeleken.
De concentratie kruisreagerende verbindingen is omgekeerd evenredig met de kleur. Bij deze rapportage werd gebruik gemaakt van een methode voor het vervaardigen van een ijklijn, op basis van een vier-parametrisch logit-log transformatie (zie bijlage 1).

Voor het uitvoeren van de immunoassay bepalingen worden in de immunoassay-kits over het algemeen de volgende materialen meegeleverd:

- met antilichaam bekleed dragermateriaal (microtiterplaten / magnetiseerbare deeltjes);
- standaarden (diverse oplossingen);
- standaard-enzym-conjugaat oplossing;
- controleoplossing;
- enzymsubstraat oplossing;
- chromogeen oplossing;
- stopoplossing.

Daarnaast, moeten bovendien de volgende materialen aanwezig zijn:

- µl pipetten;
- parafilm;
- vortex (voor de buizenkits);
- spoelwater (kraanwater of gedestilleerd water).

Tot slot dient men de beschikking te hebben over een microtiterplaatreader dan wel een spectrofotometer, voor respectievelijk het bepalen van de mate van kleuring bij een microtiterplaat immunoassay kit en een immunoassay kit op basis van buizen. De kosten die met deze instrumenten gemoeid zijn bedragen respectievelijk circa 6000 en circa 5000 Hfl. Aangezien het hier investeringskosten betreft, zijn deze niet bij de operationele kosten voor de individuele immunoassays opgenomen. De kosten voor de immunoassay-kits en de aanvullend benodigde materialen zijn wel, als aparte kostenposten, opgenomen voor de individuele immunoassays.

2.2 Monsteroplossingen

Tijdens de tweede fase van het onderhavige STOWA project werden (aanvullende) validatie experimenten uitgevoerd van immunoassaykits voor fenylureumherbiciden, triazines, isoproturon en cyclodiënen. Daartoe werd gebruik gemaakt van modelmonsters, gebaseerd op reële oppervlaktewater matrices, waaraan, d.m.v. standaardadditie, bekende hoeveelheden fenylureumherbiciden en triazines, dan wel cyclodiënen, toegevoegd waren. Het betreft daarbij standaardaddities op twee concentratieniveaus, alsmede een modelmonster zonder standaardaddities ("blanco").

Voor de fenylureumherbiciden en triazines (voor de validatie van de fenylureumherbicidenkit, de triazinekit en de isoproturonkit) werden de modelmonsters aangeleverd door Kiwa. Deze monsters zijn gebaseerd op een Rijnwatermatrix met de datumcode 13-11-95. Voor referentie in deze rapportage werden aan de monsters de codes STOWA "blanco", STOWA "laag" en STOWA "hoog" meegegeven. Daarbij dient voor het blanco monster opgemerkt te worden dat hierin wel een normaal achtergrondniveau aan te meten bestrijdingsmiddelen aanwezig kan zijn (weergegeven als actueel niveau of a.n.).

In onderstaande tabel zijn de concentraties ($\mu\text{g/l}$) van de geaddeerde bestrijdingsmiddelen in deze modelmonsters weergegeven.

Verbinding	Modelmonsters		
	STOWA "blanco"	STOWA "laag"	STOWA "hoog"
simazin	a.n. ²	0,48	1,9
diuron	a.n. ²	0,20	0,79
lioproturon	a.n. ²	0,19	0,77
atrazin	a.n. ²	0,50	2,0
chloradizon	a.n. ²	0,49	2,0
metribuzin	a.n. ²	0,51	2,0
carbendazim	a.n. ²	0,50	2,0
pirimicarb	a.n. ²	0,50	2,0
metolachloor	a.n. ²	0,55	2,2
vinclozolin	a.n. ²	0,51	2,1
mevinfos ¹	a.n. ²	0,50	2,0
parathionethyl	a.n. ²	0,50	2,0
dichloorprop (2,4-DP)	a.n. ²	0,50	2,0
propachloor	a.n. ²	0,51	2,0

¹ Mevinfos is het totaal van mevinfos-trans en mevinfos-cis. De verhouding trans-cis is 1:3
² a.n. is het actuele niveau dat in de immunoassays bepaald wordt als blancowaarde.

Uitgaande van het monster met de code STOWA "hoog" werd een extra serie modelmonsters gegenereerd. Met name de noodzaak om voor verschillende matrices bepalingen uit te kunnen voeren, i.e. om matrixeffecten te kunnen bepalen, gaf hiertoe aanleiding. Deze extra serie modelmonsters werd gegenereerd door het monster met de code STOWA "hoog" tienvoudig te verdunnen, gebruikmakend van de originele matrix (i.e. STOWA "blanco"), een Maas-Waalkanaalwater monster en een monster uit een sloot in de Ooypolder. Voor referentie in deze rapportage werden aan deze monsters respectievelijk de codes Rijnwater, Maas-Waalkanaalwater en Slootwater meegegeven.

Voor de cyclodiënen (voor de validatie van de cyclodiënen-kit) werden modelmonsters gegenereerd door het Waterwinningbedrijf Rijn-Kennemerland (WRK), gebaseerd op drie verschillende uitgangsmatrices (een Waalwater monster, een Maas-Waalkanaalwater monster en een monster uit een sloot in de Ooypolder) met de respectievelijke datumcodes. Voor referentie in deze rapportage werden aan de monsters de codes Waalwater, Maas-Waalkanaalwater en Slootwater meegegeven. Daarbij dient voor de blanco monsters opgemerkt te worden dat hierin natuurlijk wel een normaal achtergrondniveau aan te meten bestrijdingsmiddelen aanwezig kan zijn (weergegeven als actueel niveau, of a.n.). Standaardaddities werden door de WRK uitgevoerd op twee concentratieniveaus (resp. 2 µg/l en 20 µg/l voor individuele verbindingen).

De standaardadditie stockoplossing bevatte de volgende verbindingen (op basis van het ontbreken van kruisreactiviteit niet relevante verbindingen zijn cursief weergegeven):

<i>Beta-HCH</i>	<i>Trans-heptachloorepoxide</i>
<i>Gamma-HCH</i>	<i>2,4,5,2',5'-Pentachloorbifenyyl</i>
<i>2,4,4'-Trichloorbifenyyl</i>	Alfa-endosulfan
Heptachloor	<i>p,p-DDE</i>
<i>2,5,2',5'-Tetrachloorbifenyyl</i>	Dieldrin
Aldrin	<i>2,3,4,2',4',5'-Hexachloorbifenyyl</i>
Endrin	<i>2,3,4,5,2',4',5'-Heptachloorbifenyyl</i>
<i>2,4,5,3',4'-Pentachloorbifenyyl</i>	<i>Alfa-HCH.</i>
<i>p,p-DDD</i>	<i>p,p-DDT</i>
<i>2,4,5,2',4',5'-Hexachloorbifenyyl</i>	

2.3 Resultaten

Een uitgebreid overzicht van de resultaten die bij de primaire validatie van de geselecteerde immunoassaykits verkregen werden, is opgenomen in bijlage 2. Hieronder wordt een overzicht gegeven van de belangrijkste gegevens, zoals die uit de in bijlage 2 opgenomen basisresultaten volgen.

Hierbij dient opgemerkt te worden dat waar van "een meting" gesproken wordt steeds een "in triplo" bepaling voor een monster (dan wel een standaard) bedoeld wordt. Dit houdt in dat wanneer bijvoorbeeld vermeld wordt dat een meting in vijfvoud is uitgevoerd, in praktijk vijf keer een "in triplo" bepaling van hetzelfde monster (dan wel dezelfde standaard) is uitgevoerd.

2.3.1 Fenylureumherbiciden assay

Verschillende algemene kenmerken en prestatiekenmerken van deze immunoassay worden door de fabrikant als bijsluiters bij de immunoassaykit geleverd. Daarnaast zijn verschillende prestatiekenmerken al tijdens eerder, door EltiSupport uitgevoerd, onderzoek geïnventariseerd. De in de bijsluiters vermelde specificaties, alsmede de resultaten uit eerdere onderzoeken, zijn in de twee onderstaande tabellen integraal opgenomen.

Vooraf bekende specificaties	
Producent	Millipore
Produktcode	ENVR P00 28.
Doel verbinding(en)	fenylureumherbiciden
Kosten	Hfl. 1075,
Assay type	competitieve ELISA
Specificiteit	groepspecifiek
Standaard	chloortoluron
Lineair meetbereik	0,04 - 2,0 µg/l chloortoluron
Gevoeligheid	0,04 µg/l chloortoluron (90%B/B0)
Recovery	-
Intra assay variatie	circa 16% (uit eerder onderzoek)
Inter assay variatie	15 tot 20% (uit eerder onderzoek)
Plate grootte	96 putjes
Monstercapaciteit	28 monsters in triplo, incl. Standaarden.
Uitvoeringstijd	circa 4 uur, incl. Berekening.
Additionele materiaalkosten	circa Hfl. 25,00

Kruisreactiviteiten	
verbinding	kruisreactiviteit (%)
diuron	183
chlooranocryl	73
chloortoluron	100
neburon	252
linuron	110
chloorbromuron	75
monolinuron	12
metobromuron	11
monuron	23
metoxuron	3
propanil	3
fluometuron	5
isoproturon	< 1
siduron	< 1
fenuron	< 1
propyzamide	< 1
alachloor	< 1
chloormethiuron	< 1
methabenzthiazuron	< 1
chlooroxuron	< 1

Om een aantal aanvullende prestatiekenmerken te beoordelen, en om een aantal van de hierboven weergegeven prestatiekenmerken op hun juistheid te toetsen, werd aanvullend validatie-onderzoek uitgevoerd. Daarbij werd gebruik gemaakt van de modelmonsters die in paragraaf 2.2 werden beschreven. Een overzicht van de resultaten van dit onderzoek is hieronder opgenomen.

De gehanteerde modelmonsters bevatten twee fenylureumherbiciden, te weten diuron en isoproturon op een gelijk concentratieniveau. Uitgaande van bovenvermelde kruisreactiviteiten, wordt verwacht dat met name het aanwezige diuron verantwoordelijk zal zijn voor de behaalde resultaten. Uitgaande van de gegeven concentratie niveaus en de gepubliceerde kruisreactiviteiten, zal het aandeel van isoproturon in

deze resultaten minder dan 3% bedragen. Concentratiewaarden worden steeds weergegeven in chloortoluron equivalenten ($\mu\text{g/l}$ ChT-eq.).

Prestatie-kenmerk	Bepalingsmethode ⁴	Grootheid	Waarde
Gevoeligheid	Vier parametrische logit-log bepaling (in vijfvoud, in opeenvolgende assays)	detectielimiet ¹ 90% B/B0	0,006 $\mu\text{g/l}$ ChT-eq. 0,02 $\mu\text{g/l}$ ChT-eq.
Intra-assay variatie	Vijfvoudige meting van een viertal monsters (circa 1 $\mu\text{g/l}$ ChT-eq.) tijdens één run.	Variatie coëfficiënt	circa 10,5% ²
Inter-assay variatie	Meting van een tweetal monsters (resp. 0,15 en 0,4 $\mu\text{g/l}$ ChT-eq.) in vijf opeenvolgende runs.	Variatie coëfficiënt	respectievelijk 17.5 en 1%
Lineariteit	Meting van een tweetal verdunningsreeksen (5 punten) over het concentratietraject 0 tot circa 1.5 $\mu\text{g/l}$ ChT-eq.	Correlatie coëfficiënt	0,991 (oppervlaktewater) en 0,982 (leidingwater)
Effect van filtratie	Meting van drie verschillende watertypen (blanco en met circa 0,15 $\mu\text{g/l}$ ChT-eq.), zowel met als zonder filtratie.	Absolute toename / afname a.g.v. filtratie	Een toename van circa 0,1 $\mu\text{g/l}$ ChT-eq. voor twee van de drie geaddeerde monsters ³ .
Effect van bezinken	Meting van monstercode Maas-Waalkanaal (blanco en met ca 0,15 $\mu\text{g/l}$ ChT-eq.), geschud en bezonken	Absolute toename / afname a.g.v. bezinking	Afname van 0,03 tot 0,06 $\mu\text{g/l}$ ChT-eq. (6 tot 11%), met name voor het geaddeerde monster.

¹ De detectielimiet is gedefinieerd als: de concentratie die een signaal levert dat gelijk is aan het drievoudige van de standaardafwijking voor een blanco bepaling.

² Voor één van de monsters werd, mogelijk als gevolg van een relatief geringe verstoring door vaste deeltjes in het monster, een variatie coëfficiënt van 4.24% verkregen.

³ In de Rijnwater - en Maas-Waalkanaalwater matrices worden relatief hoge blancowaarden gemeten.

⁴ Weergegeven concentratie niveaus ($\mu\text{g/l}$ ChT-eq.) zijn indicatief en hebben uitsluitend betrekking op geaddeerde hoeveelheden (diuron en isoproturon).

Uitgaande van de geïnterpreteerde prestatiekenmerken, kan geconcludeerd worden dat de immunoassay over het algemeen aan de verwachtingen voldoet. De gevoeligheid van de assay blijkt onder de gehanteerde omstandigheden zelfs iets beter te zijn dan op basis van de bijsluiter verwacht mag worden, waarbij voor verbindingen met een kruisreactiviteit >100% de gevoeligheid beter is, maar bij een kruisreactiviteit <100% deze slechter is dan voor chloortoluron. De Intra-assay - en Inter-assay variatie zijn zeer acceptabel; waarden van respectievelijk 10 en 20% worden bij ELISA bepalingen over het algemeen als de norm gehanteerd. Het is derhalve niet aannemelijk dat matrixelementen aanleiding geven tot een afname van de precisie. Voor de mogelijk storende effecten van de aanwezigheid van vaste deeltjes in de monsters, wordt deze conclusie bevestigd door het feit dat filtreren nagenoeg geen effect heeft op de meetwaarden voor de blanco-monsters. Wel bestaat de mogelijkheid dat de aanwezigheid van vaste deeltjes de "beschikbaarheid" van verbindingen voor immunochemische interacties, en daarmee de nauwkeurigheid (juistheid), enigszins beïnvloedt. Dit blijkt uit het feit dat filtreren voor twee van de drie geaddeerde monsters tot een verhoogde meetwaarde leidt. Het tegengestelde effect van bezinken is echter vanuit deze optiek niet te verklaren. De lineariteit tenslotte is, met name voor een indicatieve inzet van deze methode, eveneens acceptabel.

2.3.2 Triazines

Verschillende algemene kenmerken en prestatiekenmerken van deze immunoassay worden door de fabrikant als bijsluiters bij de immunoassaykit geleverd. Daarnaast zijn verschillende prestatiekenmerken al tijdens eerder, door -Support uitgevoerd, onderzoek geïnventariseerd. De in de bijsluiters vermelde specificaties, alsmede de resultaten uit eerdere onderzoeken, zijn in de twee onderstaande tabellen integraal opgenomen.

Vooraf bekende specificaties	
Producent	J. T. Baker
Produktcode	RaPID Assay Atrazine (No: 2923-03)
Doel verbinding(en)	triazines
Kosten	Hfl. 1185,00
Assay type	competitieve ELISA
Specificiteit	groepspecifiek
Standaard	atrazine
Lineair meetbereik	0,05 - 5,0 µg/l atrazine
Gevoeligheid	0,046 µg/l atrazine (90% B/B0)
Recovery	90 to 105% voor atrazine
Intra assay variatie	< 7.6%
Inter assay variatie	< 5,0% (13% bij eerder onderzoek)
"Plate" grootte	100 buizen
Monstercapaciteit	30monsters in triplo, incl. standaarden.
Uitvoeringstijd	circa 4 uur, incl. Berekening.
Additionele materiaalkosten	circa Hfl. 25,00
Magnetisch scheidingsrek	Hfl 1500,00

Kruisreactiviteit	
verbinding	kruisreactiviteit (%)
atrazine	100
propazin	97
ametryn	195
prometryn	113
prometon	32
desethylatrazin	22
terbutryn	13
terbutylazin	4,6
simazin	15
desisopropyl- atrazine	<1
cyanazin	<1
2-hydroxy-atrazine	<1

Noot: Voor aldicarb, aldicarb-sulfon, aldicarb-sulfoxyde, alachloor, benomyl, butachloor, butylaat, captan, carbaryl, carbendazim, carbofuran, 2,4-D, 1,3-dichloorpropeen, dinoseb, MCPA, metolachloor, metribuzin, pentachloorfenol, picloram, propachloor, terbufos, thiabendazool en thiofanaat-methy werd geen reactiviteit gevonden bij concentraties tot 1000 µg/l

Om een aantal aanvullende prestatiekenmerken te beoordelen, en om een aantal van de hierboven weergegeven prestatiekenmerken op hun juistheid te toetsen, werd aanvullend validatie-onderzoek uitgevoerd. Daarbij werd gebruik gemaakt van de modelmonsters die in paragraaf 2.2 werden beschreven. Een samenvattend overzicht van de resultaten is hieronder opgenomen.

De gehanteerde modelmonsters bevatten twee triazines, te weten atrazine en simazin, op een gelijk concentratieniveau. Uitgaande van bovenvermelde kruisreactiviteiten wordt verwacht dat met name het aanwezige atrazine verantwoordelijk zal zijn voor de behaalde resultaten. Voor simazin wordt nog een bijdrage van circa 14% in de resultaten verwacht. Concentratiewaarden worden weergegeven in atrazine equivalenten (µg/l Atr-eq.).

Verder dient opgemerkt te worden dat in de loop van de experimenten bleek dat de bij de kit

geleverde plastic buizen onbetrouwbare resultaten en een hoge spreiding in de gevonden waarden opleverden. Daarom werden metingen herhaald met glazen buizen.

Prestatie-kenmerk	Bepalingsmethode ⁴	Grootheid	Waarde
Gevoeligheid	Vier parametrische logit-log bepaling (in vijfvoud, in opeenvolgende assays)	detectielimiet ¹ 90% B/B0	0,03 µg/l Atr-eq. 0,08 µg/l Atr-eq.
Intra-assay variatie	Vijfvoudige meting van een drietal monsters (0,2 tot 0,6 µg/l Atr-eq.) tijdens één run.	Variatie coëfficiënt	circa 3.5 tot 5% ²
Inter-assay variatie	Meting van een drietal monsters (resp. 0,2, 0,6 en 3.0 µg/l Atr-eq.) in zes opeenvolgende runs.	Variatie coëfficiënt	8 tot 11%
Lineariteit	Meting van een drietal verdunningsreeksen (6 punten) over het concentratietraject 0 tot circa 2.3 µg/l Atr-eq.	Correlatie coëfficiënt	0,996 tot 0,999
Effect van filtratie	Meting van vier verschillende watertypen (blanco en met circa 0,2 µg/l Atr-eq.), zowel met als zonder filtratie.	Absolute toename / afname a.g.v. filtratie	Geringe afname voor geaddeerde monsters (< 0,04 µg/l Atr-eq.) Geringe toename voor blanco's (< 0,02 µg/l Atr-eq.) ³
Effect van bezinken	Meting van twee verschillende watertypen (blanco en met ca 0,2 µg/l Atr-eq.), geschud en bezonken	Absolute toename / afname a.g.v. bezinking	Afname voor geaddeerde monsters (< 0,12 µg/l Atr-eq.). Geen effect voor blanco's.

¹ De detectielimiet is gedefinieerd als: de concentratie die een signaal levert dat gelijk is aan het drievoudige van de standaardafwijking voor een blanco bepaling.

² Voor één van de monsters werd, bij een eerdere bepaling, een variatie coëfficiënt van circa 16% verkregen. A.g.v. een hoge spreiding binnen individuele metingen (triplo's) werden deze resultaten echter verworpen.

³ In de Maas-Waalkanaalwater matrix worden relatief hoge blancowaarden gemeten. In de Sloopwater matrix wordt een relatief groot effect van filteren geconstateerd (afname met 0,15 µg/l Atr-eq.).

⁴ Weergegeven concentratie niveaus (µg/l Atr-eq.) zijn indicatief en hebben uitsluitend betrekking op geaddeerde hoeveelheden (atrazine en simazin).

Uitgaande van de geïnventariseerde prestatiekenmerken, kan geconcludeerd worden dat de immunoassay over het algemeen goed aan de verwachtingen voldoet. De gevoeligheid van de assay blijkt onder de gehanteerde omstandigheden overeenkomstig te zijn met wat op basis van de bijsluiters verwacht mag worden, waarbij voor verbindingen met een kruisreactiviteit >100% de gevoeligheid beter is, maar bij een kruisreactiviteit <100% deze slechter is dan voor atrazine.

De Intra-assay - en Inter-assay variatie zijn zeer acceptabel.; waarden van respectievelijk 10 en 20% worden bij ELISA-bepalingen over het algemeen als de norm gehanteerd. De gevonden waarden, respectievelijk 3 tot 5 en 8 tot 11%, liggen ruimschoots onder deze criteria. Het is derhalve niet aannemelijk dat matrixelementen aanleiding geven tot een afname van de precisie. Ook wat de nauwkeurigheid (juistheid) van de methode betreft, lijken matrixeffecten (i.e. storende effecten van de aanwezigheid van vaste deeltjes in de monsters) zeer gering of in het geheel niet aanwezig te zijn. Hoewel filteren (en in mindere mate bezinken) leidt tot een zekere toename van de meetwaarden voor de blanco monsters, ligt deze afwijking in dezelfde orde van grootte als de inter-assay variatie. Dit effect is derhalve nauwelijks significant te noemen.

De lineariteit van de methode tenslotte kan als uitstekend gekarakteriseerd worden.

Verder werd, naast bovengenoemde prestatie-eigenschappen, voor vier triazines (atrazine, propazin, terbutylazin en prometryn) de kruisreactiviteit experimenteel bepaald. De resultaten (zie bijlage 2) benaderen de in de bijsluiters vermelde waarden redelijk tot goed.

2.3.3 Isoproturon

Verschillende algemene kenmerken en prestatiekenmerken van deze immunoassay worden door de fabrikant als bijsluiters bij de immunoassaykit geleverd. Daarnaast zijn verschillende prestatiekenmerken al tijdens eerder door EltiSupport uitgevoerd onderzoek geïnventariseerd. De in de bijsluiters vermelde specificaties, alsmede de resultaten uit eerdere onderzoeken, zijn in de twee onderstaande tabellen integraal opgenomen.

Vooraf bekende specificaties	
Producent	Millipore
Produktcode	ENVR P0013
Doel verbinding(en)	isoproturon
Kosten	Hfl. 1075,00
Assay type	competitieve ELISA
Specificiteit	stofs specifiek
Standaard	isoproturon
Lineair meetbereik	0,05 - 0,50 µg/l isoproturon
Gevoeligheid	0,02 µg/l isoproturon (85% B/B0)
Recovery	circa 110%
Intra assay variatie	circa 13% (bij eerder onderzoek)
Inter assay variatie	circa 3 tot 25% (bij eerder onderzoek)
Plate grootte	96 putjes
Monstercapaciteit	28 monsters in triplo, incl. standaarden.
Uitvoeringstijd	circa 4 uur, incl. Berekening.
Additionele materiaalkosten	circa Hfl. 25,00

kruisreactiviteit	
verbinding	kruisreactiviteit (%)
Isoproturon	100
chloorbromuron	< 1
chloortoluron	< 1
chloroxuron	< 1
diuron	< 1
fenuron	< 1
fluometuron	< 1
linuron	< 1
metobromuron	< 1
metoxuron	< 1
monolinuron	< 1
monuron	< 1
nuburon	< 1
siduron	< 1
4-isopropylaniline	< 1

Om een aantal aanvullende prestatiekenmerken te beoordelen, en om een aantal van de hierboven weergegeven prestatiekenmerken op hun juistheid te toetsen, werd aanvullend validatie-onderzoek uitgevoerd. Daarbij werd gebruik gemaakt van de modelmonsters die in paragraaf 2.2 werden beschreven. Een overzicht van de resultaten van dit onderzoek is hieronder opgenomen.

De isoproturonkit is heel specifiek voor deze verbinding. De standaard is in dit geval isoproturon zelf.

weergegeven zoals deze werden geaddeerd ($\mu\text{g/l}$ isoproturon (Isp)).

Prestatie-kenmerk	Bepalingsmethode ³	Grootheid	Waarde
Gevoeligheid	Vier parametrische logit-log bepaling (in vijfvoud, in opeenvolgende assays)	detectielimiet ¹ 90% B/B0	0,01 $\mu\text{g/l}$ Isp. 0,02 $\mu\text{g/l}$ Isp.
Intra-assay variatie	Vijfvoudige meting van een viertal monsters (0,08 tot 0,26 $\mu\text{g/l}$ Isp.) tijdens één run.	Variatie coëfficiënt	circa 3 tot 9%
Inter-assay variatie	Meting van een tweetal monsters (resp. 0,08 en 0,19 $\mu\text{g/l}$ Isp.) in zes opeenvolgende runs.	Variatie coëfficiënt	9 tot 12%
Lineariteit	Meting van een tweetal verdunningsreeksen (5 punten) over het concentratietraject 0 tot circa 8 $\mu\text{g/l}$ Isp.	Correlatie coëfficiënt	0,992 (oppervlaktewater) 0,989 (leidingwater)
Effect van filtratie	Meting van drie verschillende watertypen (blanco en met circa 0,08 $\mu\text{g/l}$ Isp.), zowel met als zonder filtratie.	Absolute toename / afname a.g.v. filtratie	Incidenteel een zeer geringe afname (circa 0,01 $\mu\text{g/l}$ Isp.) ²
Effect van bezinken	Meting van monstercode Maas-Waalkanaal (blanco en met ca 0,08 $\mu\text{g/l}$ Isp.), geschud en bezonken	Absolute toename / afname a.g.v. bezinking	Een zeer geringe toename voor de blanco (circa 0,02 $\mu\text{g/l}$ Isp., is 20%).

¹ De detectielimiet is gedefinieerd als: de concentratie die een signaal levert dat gelijk is aan het drievoudige van de standaardafwijking voor een blanco bepaling.

² In de Maas-Waalkanaalwater matrix wordt een relatief hoge blancowaarde gemeten.

³ Weergegeven concentratie niveaus ($\mu\text{g/l}$ Isp.) zijn indicatief en hebben uitsluitend betrekking op de geaddeerde hoeveelheid isoproturon.

Concluderend kan, uitgaande van de geïnventariseerde prestatiekenmerken, gesteld worden dat de immunoassay over het algemeen zeer goed aan de verwachtingen voldoet. De gevoeligheid van de assay is erg goed (de berekende detectielimiet voor triplo waarnemingen ligt uiterst laag) en blijkt onder de gehanteerde omstandigheden overeenkomstig te zijn met wat op basis van de bijsluiters verwacht mag worden.

De Intra-assay - en Inter-assay variatie zijn zeer acceptabel; waarden van respectievelijk 10 en 20% worden bij ELISA bepalingen over het algemeen als de norm gehanteerd. De gevonden waarden, respectievelijk 3 tot 9 en 9 tot 12%, voldoen goed tot zeer goed aan deze criteria. Het is derhalve niet aannemelijk dat matrixelementen aanleiding geven tot een afname van de precisie. Ook wat de nauwkeurigheid (juistheid) van de methode betreft, blijken matrixeffecten (i.e. storende effecten van de aanwezigheid van vaste deeltjes in de monsters) geen invloed op de prestaties van de assay te hebben. Zowel filtreren als bezinken leiden niet tot veranderingen in de meetwaarden. De lineariteit van de methode ten slotte kan als acceptabel gekarakteriseerd worden. Evenals voor de fenylureumherbiciden kit, blijkt de lineariteit voor de isoproturon kit in oppervlaktewater beter te zijn dan in leidingwater. De relatief lage ionenconcentratie in leidingwater is hier mogelijk de oorzaak van; verstoringen bij lage ionenconcentraties zijn een bekend fenomeen bij de onderhavige immunoassays.

Verder werden voor de monstermatrices met de codes Rijnwater, Maas-Waalkanaalwater en Slootwater experimenteel recoveries voor isoproturon vastgesteld. De berekende waarden bedragen respectievelijk 130, 90 en 100%, bij standaardadditie op een niveau van 0,1 $\mu\text{g/l}$ Isp. Voor

isoproturon kan derhalve een recovery van tenminste 100% aangenomen worden, geheel in overeenstemming met de door de fabrikant geleverde specificaties.

2.3.4 Cyclodiënen

Verskillende algemene kenmerken en prestatiekenmerken van deze immunoassay worden door de fabrikant als bijsluiter bij de immunoassaykit geleverd. De in de bijsluiters vermelde specificaties zijn in de twee onderstaande tabellen opgenomen.

Vooraf bekende specificaties	
Producent	Millipore
Produktcode	ENVR P00 05
Doel verbinding(en)	cyclodiënen
Kosten	Hfl. ??
Assay type	competitieve ELISA
Specificiteit	groepspecifiek (kwalitatief)
Standaard	chloordaan
Lineair meetbereik	5 - 100 µg/l chloordaan
Gevoeligheid	5,0 µg/l chloordaan (90% B/B0)
Recovery	-
Intra assay variatie	-
Inter assay variatie	-
Plate grootte	96 putjes
Monstercapaciteit	27 monsters in triplo, incl. standaarden
Uitvoeringstijd	circa 4 uur, incl. berekening.
Additionele materiaalkosten	circa Hfl. 25,00

Kruisreactiviteiten	
verbinding	kruisreactiviteit (%)
aldrin	36
chloordaan	100
dieldrin	111
endosulfan	500
endrin	1000
heptachloor	91

Om een aantal aanvullende prestatiekenmerken te beoordelen, en om een aantal van de hierboven weergegeven prestatiekenmerken op hun juistheid te toetsen, werd aanvullend validatie-onderzoek uitgevoerd. Daarbij werd gebruik gemaakt van de modelmonsters die in paragraaf 2.2 werden beschreven. Een overzicht van de resultaten van dit onderzoek is hieronder opgenomen.

De gehanteerde modelmonsters bevatten vijf van de cyclodiënen op een gelijk concentratieniveau, waarvoor hierboven kruisreactiviteiten zijn opgenomen. Uitsluitend chloordaan is niet aanwezig in de modelmonsters. Uitgaande van de gegeven kruisreactiviteiten wordt verwacht dat met name het aanwezige endrin verantwoordelijk zal zijn voor de behaalde resultaten. Voor de vier andere cyclodiënen (aldrin, dieldrin, endosulfan en heptachloor) wordt nog een gezamenlijke bijdrage van circa 74% in de resultaten verwacht. Concentratiewaarden worden steeds weergegeven in chloordaan equivalenten (µg/l ChD-eq.). De gehanteerde modelmonsters, op twee concentratieniveaus (2 µg/l en 20 µg/l voor individuele verbindingen, zie paragraaf 2.2), bevatten theoretisch respectievelijk circa 35 en 350 µg/l ChD-eq.

Prestatie-kenmerk	Bepalingsmethode ⁴	Grootheid	Waarde
Gevoeligheid	Vier parametrische logit-log bepaling (in vijfvoud, in opeenvolgende assays)	detectielimiet ¹ 90% B/B0	1.0 µg/l ChD-eq. 3.6 µg/l ChD-eq.
Intra-assay variatie	Vijfvoudige meting van een drietal monsters (9 tot 350 µg/l ChD-eq.) tijdens één run.	Variatie coëfficiënt	circa 3.2 tot 16% ²
Inter-assay variatie	Meting van een tweetal monsters (resp. 35 en 350 µg/l ChD-eq.) in zes opeenvolgende runs.	Variatie coëfficiënt	51 tot 58%
Lineariteit	Meting van een drietal verdunningsreeksen (5 punten) over het concentratietraject 22 tot 350 - en 2 tot 35 µg/l ChD-eq.	Correlatie coëfficiënt	0,987 tot 1.000
Effect van filtratie	Meting van drie verschillende watertypen (blanco en met circa 350 µg/l ChD-eq.), zowel met als zonder filtratie.	Absolute toename / afname a.g.v. filtratie	Sterke afname voor geadderde monsters (circa 30 µg/l ChD-eq.; 30 tot 50%) Sterke toename voor blanco's (circa 5 µg/l ChD-eq.; 30 tot 225%) ³

¹ De detectielimiet is gedefinieerd als: de concentratie die een signaal levert dat gelijk is aan het drievoudige van de standaardafwijking voor een blanco bepaling.

² De waarde van de variatie coëfficiënt is omgekeerd evenredig met de in het monster gemeten gemiddelde concentratie µg/l ChD-eq.

³ In alle matrices wordt een relatief hoge blancowaarden gemeten 4 tot 6 µg/l ChD-eq. ongefiltreerd en 8 tot 14 µg/l ChD-eq. gefiltreerd.

⁴ Weergegeven concentratie niveaus (µg/l ChD-eq.) zijn indicatief en hebben uitsluitend betrekking op geadderde hoeveelheden (aldrin, dieldrin, endrin, endosulfan en heptachloor).

Concluderend kan, uitgaande van de geïnventariseerde prestatiekenmerken, gesteld worden dat de immunoassay slechts op deelaspecten aan de verwachtingen voldoet. De gevoeligheid van de assay is, hoewel overeenkomstig met de door de fabrikant geleverde specificaties, beslist onvoldoende om deze klasse van verbindingen op een relevant concentratieniveau in oppervlaktewater te bepalen.

De intra-assay variatie is sterk afhankelijk van het concentratieniveau in de monsters, en pas bij relatief hoge concentraties (i.e. boven de 10 µg/l ChD-eq) acceptabel. De inter-assay variatie, is bijzonder hoog (> 50%). Het is goed mogelijk dat deze hoge waarde in sterke mate effecten van het bewaren en hanteren van de monsters reflecteert. Gezien het apolaire karakter van de cyclodiënen kan eenvoudig adsorptie aan het oppervlak van gehanteerde materialen optreden. Mogelijk kan de inter-assay variatie nog verlaagd worden door standaardisering van de omstandigheden van bewaren en hanteren. Gegeven de huidige gegevens met betrekking tot intra-assay- en inter-assay-variatie dient de precisie van de methode echter als bijzonder slecht gekarakteriseerd te worden.

Voor de nauwkeurigheid (juistheid) van de methode lijken matrixeffecten een grote rol te spelen. Deze effecten lijken enerzijds het gevolg te zijn van het apolaire karakter van de doelverbindingen, maar lijken anderzijds aan een directe verstoring van de assay gerelateerd te kunnen worden. Zoals op grond van het apolaire karakter van cyclodiënen verwacht mag worden, blijkt filtreren een vrij grote invloed op de gevonden waarden te hebben voor geadderde monsters (sterke afname van de gemeten waarden). In de blanco monsters daarentegen neemt de gemeten concentratie toe na filtreren. Mogelijk is dit het gevolg van de verwijdering van vaste deeltjes die storen in de assay. Het sterk

afwijkende gedrag voor geaddeerde en niet geaddeerde monsters dient echter toch als merkwaardig beschouwd te worden.

De lineariteit van de methode tenslotte kan wel als acceptabel gekarakteriseerd worden.

Verder werd voor de monstermatrix met de code Waalwater experimenteel de recovery voor chloordaan vastgesteld. Gezien de ogenschijnlijk lage recoveries die impliciet uit de andere bepalingen volgen, uitgaande van de gegeven concentratieniveaus en kruisreactiviteiten, is de gevonden waarde (116%) opmerkelijk goed. De relatief hoge concentratie methanol (1%), in het monster dat werd gehanteerd voor het bepalen van de recovery, kan hierbij mogelijk van invloed geweest zijn. Een grotere oplosbaarheid van chloordaan in een oplossing die 1% methanol bevat kan adsorptie aan het oppervlak van gehanteerde materialen mogelijk verhinderen en de beschikbaarheid van chloordaan voor immunochemische interacties mogelijk gunstig beïnvloeden.

3 HPLC FINGERPRINT METHODEN

3.1 Werkwijze

3.1.1 Procedure

Voor de keuze van HPLC-condities is gebruik gemaakt van de gegevens uit de vakliteratuur (zie onder andere de referenties uit het overzicht van de met HPLC/DAD meetbare bestrijdingsmiddelen, Bijlage 3) en eigen ervaringen bij het laboratorium van Kiwa. Er is gebruik gemaakt van de bij Kiwa operationele methodiek gebaseerd op on-line concentrering en HPLC-analyse. Een schematische voorstelling van de gebruikte opstelling is weergegeven in Figuur III.1. Dit is dezelfde configuratie die ook bij andere door Kiwa (mede-) ontwikkelde methoden is toegepast: N-methylcarbamaten, dinitrofenolen, glyfosaat en AMPA, diverse mengsels van bestrijdingsmiddelen [Noij en Brandt, 1995].

Hieronder is de algemene procedure voor de uitvoering van de in deze rapportage beschreven bepalingen beknopt weergegeven. Voor detail informatie wordt verwezen naar bijlage 3.

Algemene procedure:

1. Monsters worden handmatig gefiltreerd (0,45 µm cellulosefilter), in 20 ml vials overgebracht en in de autosampler geplaatst.
2. Door de sampler wordt 15 ml van het monster over de concentreringskolom geleid, die na belading gespoeld wordt met 1 ml acetonitril-water (5 + 95%, v/v).
Spoelen vindt plaats om anorganisch materiaal, en tevens een deel van het storende humeuze materiaal, te verwijderen.
3. Vervolgens wordt de PLRP-kolom in de eluensstroom geschakeld.
Daarbij worden de geadsorbeerde componenten in tegenstroom van de concentreringskolom geëluëerd, waarna de componenten op de analytische kolom gescheiden - en sequentiëel in de diode array detector gedetecteerd worden.
4. Na de laatste stap volgt een regeneratiestap met een KH₂PO₄-oplossing, waarna de oorspronkelijke eluenscondities weer hersteld worden.

3.1.2 Definitie somparameter

Als somparameter is in eerste instantie gekozen voor de som van de piekoppervlakken van alle chromatografische pieken bij een golflengte van 215 nm met retentietijden tussen 8 en 40 minuten, waarbij het totaal-oppervlak wordt uitgedrukt als µg/l atrazine:

$$PS_{A, 215nm, 8-40min} = (\sum_{t=8}^{40} A_{215nm})/R \text{ (}\mu\text{g atrazine/l)}$$

waarbij:

PS	=	HPLC/UV-piekensom (µg atrazine/l)
A _{215nm}	=	oppervlak van een chromatografische piek bij 215nm (µVs)
R	=	respons voor atrazine bij 215 nm (µVs×l/µg atrazine)

Er is hierbij gekozen voor de golflengte van 215 nm omdat bij deze golflengte de meeste relevante verbindingen het best zichtbaar zijn, zonder dat al te veel storing wordt ondervonden van een extreem hoge achtergrond. Het tijdsinterval van 8 tot 40 minuten is zo gekozen dat onder de voornoemde chromatografisch condities de meeste relevante verbindingen in dit tijdsinterval elueren

en tevens de beïnvloeding vanuit de blanco HPLC-run minimaal is. Atrazine is als referentieverbinding genomen, omdat deze verbinding een goed en goed gedefinieerd chromatografisch gedrag en goede UV-respons heeft bij 215 nm. Bovendien is van atrazine veel aan waterkwaliteitsgegevens bekend. Het voordeel van het werken met een referentieverbinding is dat PS uitgedrukt wordt in de vorm van een waterkwaliteitsparameter in plaats van in een weinigzeggende eenheid als μVs .

Een voorbeeld van een HPLC-run is gegeven in Figuur 1a en 1b.

Van deze somparameter is de herhaalbaarheid vastgesteld, en is de somparameter bepaald in een 8-tal door leden van de begeleidingscommissie aangeleverde monsters. Tevens zijn blanco's, memory-effecten en het effect van het bewaren van monsters onderzocht.

Bij een eerste bespreking van de resultaten van dit vooronderzoek met de begeleidingscommissie is geconstateerd dat de piekenschap als indicatieve parameter als zodanig onvoldoende onderscheidend is ten aanzien van wel en niet verontreinigd oppervlaktewater. De grote verschillen in opgelost natuurlijk organisch materiaal en de daarmee samenhangende verschillen in de bijdrage aan de piekenschap van individuele, natuurlijk voorkomende verbindingen, hebben aanleiding gegeven tot een nadere beschouwing van de piekenschap als indicatieve parameter. Onderzocht is of met UV-detectie bij andere golflengtes (244 en 280 nm) een beter onderscheid tussen wel en niet verontreinigd water mogelijk is. Tevens is onderzocht of de verhouding van de piekenschap met het Totaalgehalte Detecteerbaar Organisch Materiaal, de in het HPLC/UV-chromatogram aanwezige "humeuze bult", (PS/TDOM), bij verschillende golflengtes een beter bruikbare kwaliteitsparameter oplevert. Tenslotte is onderzocht of het aantal gedetecteerde pieken een bruikbaar criterium kan zijn.

3.1.3 Doelstoffen

Voor het onderzoek naar de mogelijkheden om de methode voor de somparameter gelijktijdig in te zetten als methode voor doelstofanalyse, zijn voor de verbindingen die in paragraaf 1.4 als doelstoffen werden aangeduid (zie tevens volgende tabel: overzicht doelstoffen en de voor de kwantificering gebruikte golflengtes) een aantal prestatiekenmerken onderzocht:

- herhaalbaarheid retentietijden
- herhaalbaarheid van de gemeten concentratie
- recoveries
- lineariteit
- aantoonbaarheidsgrenzen.

Omdat bij het toepassen van deze methode de identificatie van componenten gebaseerd is op de combinatie van retentietijd en UV-absorptiespectrum, zijn van de doelstoffen de UV-spectra opgenomen en beoordeeld in relatie tot hun specificiteit.

Op basis van deze UV-spectra bleken 3 golflengtes voldoende (215, 244 en 280 nm) om de verbindingen te kwantificeren. In onderstaande tabel zijn deze golflengtes weergegeven. Figuur 1b geeft een chromatogram van de standaard en de UV-absorptiespectra.

Overzicht doelstoffen en de voor de kwantificering gebruikte golflengtes (in nm)

component	kwantificering	alternatieven
mevinfos-trans	215	
chloridazon	215	280
carbendazim	215	280, 244
mevinfos-cis	215	
simazin	215	
metribuzin	215	280
pirimicarb	244	
atrazine	215	
diuron	244	
metolachloor	215	
vinclozolin	215	

Uiteraard is het mogelijk de methode met andere doelstoffen uit te breiden, uitgaande van een voldoende goede isoleerbaarheid uit water met behulp van de PLRP-S kolom, een voldoende UV-gevoeligheid (en voor identificatie voldoende specifiek UV-spectrum) en een goede chromatografeerbaarheid onder de vastgestelde condities. Bijlage 4 geeft een overzicht van met HPLC/UV analyseerbare verbindingen, gebaseerd op verschillende literatuurreferenties.

3.2 Resultaten somparameter

3.2.1 Nadere beschouwing definitie

Om een HPLC/UV-fingerprint als indicatieve methode voor verontreiniging te kunnen gebruiken, moet deze methode in staat zijn om onderscheid te maken tussen verontreinigende stoffen en het natuurlijk organisch materiaal ("humus"-achtige verbindingen). Het natuurlijk organisch materiaal (Eng.: "Natural Organic Matter", NOM) herbergt een dusdanige diversiteit aan individuele verbindingen dat HPLC als scheidingstechniek niet in staat is om deze allemaal als individuele pieken zichtbaar te maken: in het HPLC-chromatogram ontstaat een "bult" van onvolledig gescheiden pieken. In niet-verontreinigd water heeft deze bult een geleidelijk verloop met geen of weinig discrete pieken. In niet-verontreinigd water zijn deze pieken (groepen van) natuurlijke stoffen die ten opzichte van de bulk een afwijkende (hogere) concentratie hebben dan de omringende verbindingen, dan wel een andere chemische structuur hebben waardoor de UV-absorptie sterker is. In beide gevallen, een hogere concentratie of een sterkere UV-absorptie, betekent dit dat de natuurlijke bijdrage aan de in paragraaf 3.1.2 gedefinieerde piekensom groter is naarmate het NOM-gehalte in het water groter is. Het is immers te verwachten dat in een evenwichtssituatie de samenstelling van NOM (binnen de natuurlijke variatie) redelijk constant is. Om aan de hand van de piekensom verontreiniging vast te stellen moet deze parameter dan ook gecorrigeerd worden voor de natuurlijke bijdrage. Dit kan op twee manieren:

1. Door de totale piekensom van het te onderzoeken monster (PS_m) te verminderen met de natuurlijke bijdrage op basis van de piekensom van een onverdacht watertype (PS_{onv}), in relatie tot het NOM-gehalte in de respectievelijke monstertypen, waardoor het antropogene aandeel in de piekensom (PS_{anthr}) resulteert:

$$PS_{anthr} = PS_m - (PS_{onv}/NOM_{onv}) \times NOM_m$$

Als ervan uitgegaan wordt dat het NOM-gehalte evenredig is met het gemeten TDOM, kan deze vergelijking geschreven worden als:

$$PS_{\text{anthr}} = PS_m - (PS_{\text{onv}}/TDOM_{\text{onv}}) \times TDOM_m$$

Voor PS_{anthr} zijn dan richtwaarden op te stellen die de mate van verontreiniging weergeven.

2. Door de verhouding $PS/TDOM$ van het monster te berekenen en hiervoor richtwaarden op te stellen als maat voor verontreiniging:

$$PS_m/TDOM_m$$

waarbij opnieuw $TDOM$ als maat voor het NOM-gehalte is gekozen.

Overigens zijn PS_{anthr} en $PS_m/TDOM_m$ aan elkaar gekoppeld via:

$$PS_m/TDOM_m = (PS_{\text{onv}}/TDOM_{\text{onv}}) + (PS_{\text{anthr}}/TDOM_m)$$

zodat er geen fundamentele voorkeur bestaat voor één van beide parameters. Uit het oogpunt van eenvoud heeft de tweede benadering de voorkeur; bovendien kan deze bepaald worden zonder dat een onverdacht monster als referentie wordt meegemeten. In het vervolg van het rapport zal naast PS dan ook steeds $PS/TDOM$ in de beschouwing betrokken worden.

3.2.2 Prestatiekenmerken somparameter

Prestatiekenmerk	Bepalingsmethode	Grootheid	Waarde
Herhaalbaarheid	Zesvoudige bepaling van de somparameter voor een modelmonster	Variatie coëfficiënt PS Variatie coëfficiënt $TDOM$	5,3% 3,6%
Blanco waarden	Bepaling van PS en $TDOM$ in een blanco HPLC run (d.w.z. zonder voorkolom belading)	Verhouding tot normale run	< 5%
Memory effect	Toename blanco waarde direct na een normale run	Relatieve toename	nihil
Effecten watertype	Bepaling PS en $PS/TDOM$ voor 12 verschillende watertypen, waarvoor de mate van belasting vanuit antropogene bronnen kwalitatief bekend is	Kwalitatieve beoordeling van verwachte en gevonden kwaliteitsrelaties.	Incidenteel worden verwachte relaties o.b.v. metingen bevestigd.

Concluderend kan, uitgaande van de geïnventariseerde prestatiekenmerken, gesteld worden dat de HPLC-UV somparameter in kwantitatieve zin goed voldoet, maar dat voor het relateren van uiteenlopende watertypen aan de mate van verontreiniging PS en $TDOM$ als zodanig onvoldoende houvast bieden. Wel kunnen voor watermonsters van één locatie en van verschillende locaties van eenzelfde waterstroom kwaliteitsveranderingen gemeten worden. De herhaalbaarheid van zowel PS als van $TDOM$ is beter dan 6%, hetgeen voor een chromatografische analyse een gangbare waarde is. Voor de relatieve piekensom wordt een iets hogere waarde gevonden, die evenwel nog steeds lager is dan 10%. De hogere waarde geeft aan dat de variaties in PS en $TDOM$ onafhankelijk zijn. Blanco meetwaarden blijken verwaarloosbaar te zijn. Bovendien blijken memory effecten bij meting van een blanco direct na een praktijkmonster, volkomen afwezig te zijn.

Voor de effecten van onderling verschillende watertypen op de waarde van de (relatieve) piekensom kan gesteld worden dat de absolute piekensom (PS) als parameter niet voldoende in staat is om voor sterk uiteenlopende watertypen een indicatie te geven van de mate van verontreiniging. De relatieve piekensom (PS/TDOM) lijkt hiervoor beter geschikt te zijn. Bij beoordelingen op basis van de relatieve piekensom speelt echter ook kennis omtrent de samenstelling van het onderzochte water een cruciale rol⁴. Karakterisering op basis van de PS-waarde en de PS/TDOM-waarde is met name relevant voor onderling vergelijkbare watertypen. In het verlengde hiervan kunnen PS en PS/TDOM, voor individuele monsterpunten wel goed als indicator voor een toe- of afname van verontreiniging gehanteerd worden. Voor de individuele monsterpunten dienen dan referentiewaarden bepaald te worden, waaraan actuele meetwaarden getoetst kunnen worden.

Voor een tweetal oppervlaktewatermonsters van zeer verschillende herkomst, werd het effect van een alternatieve definitie van de somparameter bepaald op het vermogen om onderscheid te maken tussen wel en niet belaste situaties. Bepaling van PS en PS/TDOM bij 244 nm, of 280 nm (in plaats van bij 215 nm) blijkt niet te leiden tot een verbetering van het onderscheidend vermogen ten aanzien van de verontreinigingsgraad. Ook een alternatieve definitie, o.b.v. het aantal discrete pieken (aantal pieken met een equivalente concentratie groter dan 0,01 µg/l atrazine ($n_{>0,01}$) dan wel groter dan 0,1 µg/l atrazine ($n_{>0,1}$)), blijkt niet tot verbetering te leiden.

3.3 Resultaten doelstofanalyse

Behalve kwantitatieve parameters als PS and TDOM beidt de HPLC/UV-fingerprint om niet nader bekende stoffen te volgen in ruimte en tijd aan de hand van retentietijd, UV-spectrum en piekgrootte. Enkele voorbeelden daarvan worden gegeven in bijlage III, tabel III,7.

Prestatie-kenmerk	Bepalingsmethode	Grootheid	Waarde
Herhaalbaarheid retentie tijden	Meervoudige analyse van standaarden (n = 12) en standaardaddities in oppervlaktewater (n = 6)	Variatie coëfficiënt	< 0,25% (< 0,05 min.)
Recovery	Voor addities aan opp. water (0,2-0,5 µg/l en 1-2 µg/l) t.o.v. waterige werkstandaard en directe injectie.	Recovery percentage t.o.v.: - waterige werkstandaard - directe injectie	> 80% ¹ > 75% ²
Kwantitatieve herhaalbaarheid	Meervoudige analyse van standaardaddities in oppervlaktewater op twee concentratieniveaus (0,2-0,5 µg/l en 1-2 µg/l)	Variatie coëfficiënt: - lage concentraties - hoge concentraties	< 5% ³ < 5% ⁴
Lineariteit	Regressie-analyse voor 7 punts responsiecurven (circa 0 tot 2 µg/l, duplo metingen)	Correlatie coëfficiënt	> 0,994 ⁵
Gevoeligheid	Op basis van de herhaalbaarheid van lage concentraties (0,04-0,2 µg/l) in oppervlaktewater en ultrapuur water.	Aantoonbaarheidsgrens ⁶ : - Oppervlaktewater - Ultrapuur water	0,02 tot 0,08 µg/l ⁷ 0,02 tot 0,06 µg/l ⁸

¹ Uitsluitend voor vinclozolin worden lage recoveries verkregen (33 tot 43%);

² Voor carbendazim en pirimicarb worden recoveries lager dan 75% gevonden (resp. 51 en 64%);

³ Voor mevinfos-(cis en trans), metolachloor en vinclozolin worden variatie coëfficiënten boven de 10% gemeten;

⁴ Uitsluitend voor mevinfos-trans wordt een waarde hoger dan 10% gemeten;

⁵ Uitsluitend voor vinclozolin wordt een aanmerkelijk slechtere correlatie coëfficiënt (0,97) verkregen.

⁶ De aantoonbaarheidsgrens is gedefinieerd als die concentratie die een signaal levert dat gelijk is aan het drievoudige van de standaardafwijking voor een blanco bepaling (concentratie 0 µg/l);

⁷ Voor carbendazim wordt een aantoonbaarheidsgrens van 0,15 µg/l verkregen;

⁸ Voor metolachloor wordt een aantoonbaarheidsgrens van 0,15 µg/l verkregen, a.g.v een coeluerende stoortpiek.

Concluderend kan, uitgaande van de geïnventariseerde prestatiekenmerken, gesteld worden dat de HPLC-DAD doelstofanalyse over het algemeen zeer goed aan de verwachtingen voldoet. De resultaten voor de herhaalbaarheid van de retentietijden voldoen geheel aan wat bij dergelijke methoden verwacht kan

⁴ Voor effluent-rijk water, waarbij de samenstelling van het effluent vooral gekenmerkt wordt door de biologische zuivering van rioolwater, zal een lage PS-waarde gemeten worden en een hoge TDOM-waarde, waardoor een zeer lage PS/TDOM-waarde resulteert. Daarentegen zal voor effluent-arm water, beïnvloed door een industrieel proces, een hoge PS-waarde, een lage TDOM-waarde, en dienovereenkomstig een hoge PS/TDOM-waarde geconstateerd worden.

worden en geven voldoende mogelijkheden om op basis van retentietijd in combinatie met het UV-spectrum pieken te benoemen. Uitsluitend voor vinclozolin worden minder goede prestaties gevonden. Vinclozolin geeft in de standaarden een gemiddelde retentietijd van 43,6 minuten en in de addities aan oppervlaktewater een gemiddelde retentietijd van 39,8 minuten. Aangezien dit fenomeen zich herhaalt in het latere onderzoek en een verklaring hiervoor niet is gevonden, moet geconcludeerd worden dat vinclozolin niet analyseerbaar is met de huidige werkwijze.

Algemeen kan gesteld worden dat de recoveries ten opzichte van de waterige werkstandaarden, alsmede ten opzichte van de directe injectie van een klein volume geconcentreerde standaard, ruim voldoende zijn. Uitsluitend voor carbendazim en pirimicarb ten opzichte van de directe injectie worden onvoldoende hoge recoveries gevonden. Aangezien gekwantificeerd wordt aan de hand van de waterige werkstandaarden, ondervindt de betrouwbaarheid van de gemeten concentraties voor carbendazim en pirimicarb hiervan echter geen nadelige gevolgen. Wel kan hierdoor de gevoeligheid van de methode voor deze beide stoffen tot een factor 2 minder zijn dan bij 100% recovery.

Voor het merendeel van de verbindingen is de relatieve standaarddeviatie, voor kwantitatieve herhaalbaarheid, in overeenstemming met de prestatiekenmerken zoals die voor vergelijkbare methoden gevonden worden [Noij en Brandt, 1995]. De hogere waarden voor mevinfos-cis en metolachloor worden veroorzaakt door stoorpieken in de gehanteerde oppervlaktewater modelmonsters. Voor mevinfos-trans wordt de kwantificering bemoeilijkt doordat deze bovenop de "humeuze bult" elueert. Algemeen moet voor de betrouwbaarheid van de resultaten in monsters, die sterk(er) belast zijn met Natuurlijk Organisch Materiaal (NOM), rekening gehouden worden met relatieve standaarddeviaties van 10% of meer.

De lineariteit, zoals die volgt uit een visuele beoordeling van de responsiecurven en de waarden van de correlatiecoëfficiënten, voldoen ruimschoots aan de eisen die aan HPLC/UV-methoden gesteld kunnen worden. Hieruitvolgend, bestond er geen aanleiding om met behulp van een F- of t-toets aanvullend de lineariteit te toetsen. Uitsluitend voor vinclozolin voldeden de resultaten, echter, ook op dit punt niet aan de gestelde criteria.

Aanvullend kan vermeld worden dat, met uitzondering van metolachloor, de y-as afsnedes steeds klein zijn (corresponderend met een concentratie van de doelstof van kleiner dan 0,02 µg/l). Voor metolachloor heeft de y-as afsnede een waarde die correspondeert met een concentratie van de doelstof van circa 0,5 µg/l, hetgeen het gevolg is van het feit dat deze verbinding coelueert met een stoorpiek.

Voor alle doelstoffen, met uitzondering van carbendazim, worden aantoonbaarheidsgrenzen lager dan 0,1 µg/l in oppervlaktewater gevonden. Het vergelijkingsonderzoek van praktijkmonsters (Hoofdstuk 4), waar gehalten rondom en lager dan 0,1 µg/l gemeten werden in monsters met een bijzonder hoge natuurlijke organische belasting, bevestigt deze constatering. Bovendien blijken de aantoonbaarheidsgrenzen in oppervlaktewater slechts in zeer geringe mate af te wijken van de aantoonbaarheidsgrenzen in ultrapuur-water. De relatief hoge waarde voor de aantoonbaarheidsgrens voor carbendazim, in oppervlaktewater, is het gevolg van de aanwezigheid van storende verbindingen in de gehanteerde modelmatrix.

4 VERGELIJKINGSONDERZOEK PRAKTIJKMONSTERS EN 'SPIKED' MONSTERS

4.1 Opzet van het onderzoek

Als ultieme test voor de te valideren analytische technieken werd een "veldmonster" programma opgenomen als onderdeel van deze validatieronde. Dit "veldmonster" programma werd vorm gegeven door voor elk van de te valideren analytische methoden, vijftien monsters blind voor analyse aan te bieden. Deze monsters werden uitgaande van een vijftal primaire reële monsters samengesteld door middel van het al dan niet toevoegen van relevante bestrijdingsmiddelen. De wijze waarop de veldmonsters (secondaire monsters) werden gegenereerd uit de primaire monsters, de wijze waarop de primaire monsters werden geselecteerd en de controlestappen die in dit veldmonsternameprogramma waren ingebouwd, worden hieronder in meer detail besproken.

De keuze van de primaire monstertypen is tot stand gekomen in nauw overleg met de betrokken waterbeheerders. Daarbij is er van uitgegaan dat bij voorkeur een zo groot mogelijke diversiteit aan matrices, waarmee de waterbeheerders in reële situaties geconfronteerd (kunnen) worden, afgedekt zou moeten worden. Voorts is gekozen voor een gradatie in matrix-complexiteit van deze primaire monsters. Dit is van essentieel belang voor het evalueren van de invloed van de monstermatrix op de prestaties van de te valideren analytische methoden. Derhalve zijn zowel analytisch complexe als eenvoudige matrices in het programma opgenomen. Dit houdt anderzijds wel in dat niet voor elk van de beheersgebieden gekozen is voor de meest complexe monstermatrix voor het betreffende gebied.

Voor de keuze van de specifieke locaties, voor het nemen van de primaire monsters, is er aanvullend rekening mee gehouden dat er een minimale kans moet bestaan op de aanwezigheid van antropogene verbindingen (met name bestrijdingsmiddelen) in de primaire monsters. Dit gezien het feit dat het samenstellen van de secondaire monsters uit de primaire monsters, gebaseerd is op een speciaal voor deze validatieronde uitgewerkt standaardadditieprogramma voor relevante bestrijdingsmiddelen. De aanwezigheid van (grote hoeveelheden van) deze bestrijdingsmiddelen in de primaire monsters zou derhalve kunnen leiden tot aanzienlijke concentratieverschillen tussen de secondaire monsters onderling. Dit kan fundamentele gevolgen hebben voor de vergelijkbaarheid van de prestaties van de analytische methoden voor verschillende monstertypen. Een overzicht van de monstertypen die door elk van de waterbeheerders aangeleverd zijn is opgenomen in onderstaande tabel:

Overzicht van de door de verschillende waterbeheerders aan te leveren monstertypen en hoeveelheden:

Waterbeheerder	"Monstertype" / beïnvloedend grondtype
Uitwaterende Sluizen	Kleigrond (Zavel)
Rijnland (locatie A)	Zoute kwel
Rijnland (locatie B)	Regenwater (zandwinput)
Regge en Dinkel	Veengrond
West Overijssel	Zandgrond

- **Monstervolume:** 25 liter;
- **Monstercontainers:** 2,5 liter-flessen (d.w.z. 10 flessen per monster), bruin glas, voorzien van een schroefdop met teflon in-lay;
- **Labeling:** naam van de waterbeheerder, waar nodig een locatie-aanduiding (zie bovenstaande tabel);
- **Conservering:** koeling;
- **Bescherming:** stevige kartonnen dozen of kratten;
- **Begeleidende informatie:** een omschrijving van monsternamelocatie en tijdstip⁵, een korte omschrijving van de wijze waarop de monsters genomen, en over de tien flessen verdeeld werden (Een beknopt overzicht van deze gegevens is in onderstaande tabel weergegeven).

Basismonster	Locatie	Datum en tijd	Monsternaam methode	Aanlevering
Uitw. Sluizen (kleigrond)	locatie 57103. Zesstedenvaart bij duiker in prov.weg en Kerkesloot	26-2-96 12.00 uur	0-20 cm wateropp. m.b.v. zinker met flessen	-
Rijnland (lok. A) (zoute kwel)	Sloot in de Haarlemmermeerpolder (einde Domineeslaan, Zwanenburg) Kilometercoördinaten: x- 110540 y- 487770	23-02-96 11:00 uur	25 steekmonsters van 1 liter op een diepte van 0,5 mtr. Direct in de mon-stervaten (zonder homogeniseren).	2,5 liter flessen
Rijnland (lok. B) (regenwater)	Plas van Broekendvelden bij Reeuwijk Kilometercoördinaten: x- 110610 y- 452050	23-02-96 9:30 uur	25 steekmonsters van 1 liter op een diepte van 0,5 mtr. Direct in de mon-stervaten (zonder homogeniseren).	2,5 liter flessen
Regge en Dinkel (veengrond)	Natuurgebied Engbertsdijk-venen ten noorden van Vriezenveen.	01-03-96 15:00 uur	Monstervat van 60 liter (3/4 gevuld). Na mengen overgebracht in de mon-stervaten (in porties van 0,5 ltr.).	2,5 liter flessen
West Overijssel (zandgrond)	Locatie ZWO TWZ		onbekend	-

De vijf primaire monsters werden bij een onafhankelijk laboratorium (OMEGAM, Amsterdam) voor screening aangeboden. Bij deze screening lag de nadruk op de doelstoffen die geselecteerd werden voor deze validatieronde (zie hoofdstuk 1: inleiding). Aangezien echter door de te valideren methoden (met name waar het de immunochemische methoden betreft) geen onderscheid gemaakt kan worden tussen deze doelstoffen en een aantal verwante verbindingen, werd het screeningspakket uitgebreid, om ook deze mogelijk storende componenten te kunnen inventariseren. Daarbij werd expliciet gemikt op een zo breed mogelijk pakket aan fenylureumherbiciden, triazines en organochloorbestrijdingsmiddelen. In praktijk konden de relevante bestrijdingsmiddelen afgedekt worden met het volgende pakket aan analytische methoden:

- Fenylureumherbiciden (HPLC/DAD: speciale werkwijze voor fenylureumherbiciden);
- Organostikstof en fosfor bestrijdingsmiddelen (GC/MS: voor de triazines);
- Organochloorbestrijdingsmiddelen (GC/ECD: voor de cyclodiënen en mogelijk storende organochloorbestrijdingsmiddelen);

⁵ De primaire monsters werden dinsdag 5 maart 1996 bij de waterbeheerders in ontvangst genomen, maar waren veelal enige dagen eerder door de waterbeheerders genomen.

- LC analyse polaire bestrijdingsmiddelen met off-line extractie (HPLC/DAD: voor de verbindingen carbendazim en chloridazon, die niet op een andere wijze gescreend konden worden met een gelijke gevoeligheid).

Naast deze analyses werd een screening met HPLC en diode array detectie (DAD) uitgevoerd, om een over-all beeld te kunnen krijgen van de aanwezigheid van polaire bestrijdingsmiddelen. Deze extra screening werd met name opgenomen om een beeld te kunnen krijgen van de mogelijke aanwezigheid van grote hoeveelheden van bestrijdingsmiddelen, die niet door de andere screenings worden afgedekt, en die van invloed zouden kunnen zijn bij het uitvoeren van HPLC fingerprint technieken.

Op basis van de bovengenoemde controlebepalingen kon geconcludeerd worden dat de primaire monsters, op een enkele uitzondering na, geen mogelijk storende componenten bevatten. Uitsluitend in de monster, die werden aangeleverd door het Zuiveringsschap West-Overijssel en het Waterschap Regge en Dinkel, werden geringe hoeveelheden diuron aangetroffen (op een niveau van respectievelijk 0,04 en 0,17 µg/l)⁶. Deze hoeveelheden waren echter geen aanleiding om van het voorgestelde schema, voor het vervaardigen van de secundaire monsters uit de primaire monsters, af te wijken. Verder dient wel opgemerkt te worden dat, met name waar het de analyse van fenylureumherbiciden betreft, de detectiegrens van de analyse voor individuele verbindingen is verhoogd door storing t.g.v. de complexiteit van de matrices. Als gevolg daarvan moet in een aantal gevallen - bij de evaluatie van de resultaten van de te valideren methoden - rekening worden gehouden met de mogelijke aanwezigheid van individuele verbindingen op een niveau tot deze verhoogde detectielimiet. De hoogste detectielimieten werden geconstateerd voor de primaire monsters afkomstig van Hoogheemraadschap van Rijnland (monstertype A, beïnvloeding door zoute kwel; Isoproturon < 0,11, Carbendazim < 0,54, Chloridazon < 0,2, Metabenzthiazuron < 0,21 en Pencycuron < 0,35 µg/l), Waterschap Regge en Dinkel (monstertype beïnvloed door veengrond; Carbendazim < 1, Chloridazon < 1, Fenuron < 0,5, Metoxuron < 0,5 en Monuron < 0,5 µg/l) en Hoogheemraadschap van Uitwaterende Sluizen in Hollands Noorderkwartier (monstertype beïnvloed door kleigrond; Pencycuron < 0,5 µg/l). Een totaaloverzicht van alle uitgevoerde controlebepalingen is opgenomen in bijlage 5.

Homogeniseren van de primaire monsters (i.e. voorafgaande aan de screening op de aanwezigheid van mogelijk storende componenten), uitsplitsen van deze monsters naar de secundaire monsters, en standaardadditie van de doelverbindingen (volgens de spikeschemas die zijn opgenomen in bijlage 6) werd eveneens uitgevoerd door OMEGAM. Bij het opstellen van de spikeschemas voor het vervaardigen van de secundaire monsters werden de volgende factoren in beschouwing genomen:

- Gezien het relatief beperkte aantal secundaire monsters dat verwerkt kan worden (i.e. 15), is uitgegaan van de doelverbindingen die ook tijdens het eerste deel van deze validatieronde reeds werden gehanteerd. Dit om het onderzoek niet nodeloos te compliceren.
- Er is rekening mee gehouden dat met name de immunoassays elk sterk op een individuele groep verbindingen gericht zijn. Hieruit volgt primair de opsplitsing naar polaire bestrijdingsmiddelen en cyclodiënen. Ook echter bij de indeling van de polaire bestrijdingsmiddelen is hier rekening mee gehouden (opdeling fenylureumherbiciden, triazines en "anderen"). Om het totale aantal monsters

⁶ Hierbij dient opgemerkt te worden dat in deze blancomonsters diuron noch met behulp van de immunoassay voor fenylureumherbiciden, noch met behulp van de HPLC-fingerprint techniek bevestigd werd.

gehouden (opdeling fenylureumherbiciden, triazines en "anderen"). Om het totale aantal monsters klein te houden is in een aantal gevallen naast diuron een niet fenylureumherbicide in hetzelfde monster aanwezig. Er is daarbij aangenomen dat de kans op kruisreactie in de immunoassay, in die gevallen, uiterst klein zal zijn. Dit geldt eveneens voor de monsters waarin naast triazines nog andere verbindingen aanwezig zijn.

- Speciaal t.b.v. de HPLC fingerprint methoden (zowel de somparameter, als de doelstofanalyse), zijn zowel standaardaddities met losse verbindingen, als standaardaddities met meerdere verbindingen gelijktijdig (met retentietijden die een spreiding over het gehele chromatogram zullen opleveren) uitgevoerd.
- Er is rekening gehouden met problemen en opmerkelijkheden die in de eerste fase van de validatiestudie werden geconstateerd; matrix effecten voor fenylureumherbiciden en cyclodiënen bij de immunoassays, lage - of onduidelijke recoveries voor carbendazim en vinclozolin bij HPLC analyse.
- De gehanteerde concentratieniveaus voor de standaardadditie zijn gebaseerd op het drievoudige van de door Kiwa een EltiSupport opgegeven detectielimieten.
- Bij de matrixkeuze voor de secundaire monsters is uitgegaan van een indicatieve afname in complexiteit van de matrix in de volgorde: Kleigrond ~ Veengrond > Zoute kwel > Zandgrond > Regenwater. Er is zoveel mogelijk getracht om, voor elk van de analytische methoden en elk van de verbindingen, in een zo groot mogelijk aantal matrices van uiteenlopende complexiteit te spiken.
- Elk van de primaire monsters (basismonsters) is tevens zonder standaardaddities als secundair monster opgenomen (i.e. als "blanco").

De schema's van de standaardaddities zoals door OMEGAM uitgevoerd, zijn opgenomen in bijlage 6. De secundaire monsters werden d.d. 11 maart 1996 bij EltiSupport en Kiwa aangeleverd. De monsters werden blind aangeleverd, uitsluitend voorzien van een label, waaruit werd afgeleid of de monsters bestemd waren voor de bepaling van polaire bestrijdingsmiddelen (PPST##)⁷, dan wel voor de bepaling van cyclodiënen (CYCL##). Bij aanlevering van de resultaten van de uitgevoerde analyses bij ICWS, werden de schema's van de monstersamenstellingen aan de betreffende analyserende instantie (EltiSupport/Kiwa) ter beschikking gesteld. De in deze rapportage opgenomen resultaten werden tegen deze initieel gerapporteerde waarden gecheckt en goed bevonden. De resultaten worden in de hiernavolgende paragrafen gepresenteerd en van commentaar voorzien.

4.2 Immunochemische methoden

De resultaten van de uitgevoerde bepalingen, alsmede de verwachte resultaten (gebaseerd op de door middel van standaardadditie ingebrachte concentraties en de in de kitbijsluiter gegeven percentages kruisreactiviteit), zijn in bijlage 7 opgenomen. Voor elk van de immunochemische technieken kon een aantal monsters een tweede keer gemeten worden, omdat de capaciteit van de immunoassay-kits dit toeliet. In overleg met ICWS werden hiervoor die monsters geselecteerd die bij een eerste bepaling resultaten opleverden die, in vergelijking tot de resterende monsters, een relatief grote afwijking van de verwachte resultaten te zien gaven. Bovendien werden bij heranalyse de monsters voor de cyclodiënenbepaling zowel ongefiltreerd als gefiltreerd in duplo gemeten. De monsters voor de andere kits werden alle gefiltreerd. Door een beperkt aantal plaatsen in de atrazinekit zijn bij heranalyse met deze kit de monsters in duplo in plaats van in triplo gemeten.

⁷ Binnen een serie waren de monsters voorzien van een unieke nummering (##) lopend van 01 tot 15.

4.2.1 Bespreking van de resultaten

Fenylureumherbiciden

In alle basismonsters werd een achtergrondniveau voor de fenylureumherbiciden gevonden variërend van 0,01 µg/l tot 0,16 µg/l chloortoluron equivalenten (ChT-eq.). Fenylureumverbindingen worden wijdverbreid gebruikt en hierdoor is het mogelijk dat praktisch continu lage hoeveelheden van de moederverbindingen of metabolieten in oppervlaktewateren aanwezig zijn, die ofwel beneden de detectielimiet van de referentiemethode liggen, of niet in het analysepakket van het controlelaboratorium zijn opgenomen. Deze achtergrondwaarde kan verklaren dat de monsters met geaddeerde fenylureumverbindingen een hogere waarde vertoonden dan verwacht. Volgens de verwachting zou in de monsters PPST02, PPST12 en PPST15 (R&D, 0,17 µg/l diuron, d.w.z. circa 0,3 µg/l ChT-eq.) extra diuron aanwezig moeten zijn, naast de vanuit standaardadditie toegevoegde hoeveelheden. Deze "meer-concentratie" kon echter niet bevestigd worden. Hieruitvolgend zijn de gevonden waarden lager zijn dan verwacht. Gezien het feit dat deze "meer-concentratie" ook met de HPLC-fingerprint doelstofanalyse niet bevestigd werd (zie paragraaf 4.3), moet er rekening mee gehouden worden dat de referentiewaarde in dit geval niet correct is. Met uitzondering van monster PPST05 moeten volgens de immunoassay alle monsters als positief worden beschouwd.

Atrazine

Voor de basismonsters, gekarakteriseerd als beïnvloed door kleigrond, zandgrond, zoute kwel en regenwater, lag de achtergrond in de kit op ongeveer 0,03-0,04 µg/l atrazine equivalenten (Atr-eq.) of beneden de detectielimiet. Voor het resterende basismonster, gekarakteriseerd als beïnvloed door veengrond, is deze waarde 0,12 µg/l Atr.-eq. De waarden van de andere monsters, waaraan d.m.v. standaardadditie verbindingen anders dan triazines waren toegevoegd, waren vergelijkbaar. Slechts drie van de 15 monsters waren geadderd met triazines. De voor deze monsters gevonden waarden lagen een factor 1,5 - 2 hoger dan verwacht. Wel kon er duidelijk onderscheid gemaakt worden tussen de geaddeerde en ongeaddeerde monsters. Vals positieve monsters kunnen verklaard worden door het feit, dat er een aantal kruisreagerende stoffen/metabolieten in het water zitten die ofwel beneden de detectielimiet van de referentiemethode liggen, of niet in het analysepakket van het controlelaboratorium zijn opgenomen.

Isoproturon

Aan slechts twee monsters was isoproturon toegevoegd en dit waren ook de enige twee monsters die een waarde boven 0,01 µg/l vertoonden. Heranalyse leverde voor vier monsters iets gewijzigde waarden op, maar ook hierbij kon een duidelijk onderscheid gemaakt worden tussen geaddeerde en ongeaddeerde monsters.

Cyclodiënen

De eerste bepaling van de cyclodiënen gaf voor de basismonsters een waarde van < 5 µg/l. Deze waarde kan als achtergrondniveau van de kit beschouwd worden. Geaddeerde monster vertoonden duidelijk verhoogde waarden, hoewel hoger dan verwacht. De tweede meting van een aantal van deze monster leverde weliswaar een daling in concentratie op, maar nog steeds lagen de waarden ongeveer twee keer hoger dan verwacht. Filtratie daarentegen verwijderde een deel van de toegevoegde cyclodiënen. Aanwezigheid van cyclodiënen kan echter duidelijk gedetecteerd worden in ongefiltreerde monsters. Hierbij moet opgemerkt worden dat de concentraties van de geaddeerde verbindingen praktisch gezien zeer hoog lagen om in het meetbereik van de kit te komen.

4.3 HPLC Fingerprint methoden

De wijze waarop het onderzoek werd uitgevoerd, alsmede de resultaten voor de bepaling van de somparameter en de doelstofanalyse zijn opgenomen in bijlage 8. Een meer beschouwend overzicht van de resultaten volgt hieronder.

4.3.1 Bespreking van de resultaten

Voor het interpreteren van de **somparameter** resultaten bleek het noodzakelijk om deze resultaten te groeperen naar monstertype. Deze noodzaak werd ook al in hoofdstuk 3 naar voren gebracht. Alleen al op basis van de ruwe chromatogrammen (hoogte en vorm van de humus-achtergrond) kon een duidelijk onderscheid naar een vijftal monstertypen gemaakt worden (zie Figuur 2a-e). Bij de interpretatie en evaluatie van de resultaten werd de op deze wijze verkregen onderverdeling aangehouden; een onderlinge vergelijking van resultaten voor verschillende monsters werd alleen binnen deze vijf categorieën monsters gemaakt. Pas in een later stadium werd deze onderverdeling bevestigd, o.b.v. de door ICWS aangeleverde gegevens over de monsters en de addities, als zijnde de onderverdeling naar de herkomst van de basismonsters. Op basis van die gegevens werd de naam van het beheersgebied (achteraf) toegevoegd.

In nagenoeg alle gespikete monsters is, aan de hand van de piekensom (PS) en de relatieve piekensom (PS/TDOM), een toename van verontreiniging, t.o.v. het basismonster, duidelijk vast te stellen. Daarbij dient nog opgemerkt te worden dat een nadere beschouwing van de chromatogrammen laat zien dat de piekensom van alle gespikete monsters niet alleen verhoogd wordt door de, d.m.v. standaardadditie, toegevoegde doelverbindingen; ogenschijnlijk werden bij standaardadditie tevens geringe hoeveelheden van andere (onbekende) verbindingen geïntroduceerd. Alleen de standaardadditie die werd uitgevoerd bij het basismonster afkomstig van Zuiveringsschap West-Overijssel (zandgrond), kon op basis van PS slechts in geringe mate, en op basis van PS/TDOM nauwelijks herkend worden. Dit houdt verband met de lage concentraties van de additie (totaal 0,4 µg/l) en de ten opzichte van atrazine zwakke respons van de geaddeerde verbindingen (circa 20% voor diuron en 50% voor mevinfos).

Hoewel niet strikt noodzakelijk werd ook voor de **doelstofanalyse** een evaluatie van de resultaten, gegroepeerd naar monstertype, uitgevoerd. Het feit dat matrixeffecten van een specifiek monstertype op deze wijze eenduidig naar voren komen, maakt een dergelijke evaluatie echter wel inzichtelijker. De door middel van standaardadditie toegevoegde bestrijdingsmiddelen worden, met uitzondering van vinclozolin en eventueel na correctie voor in de basismonsters aangetroffen achtergrondconcentraties, met een hoge recovery teruggevonden. De ranges voor de recovery zijn in onderstaande tabel weergegeven.

Verbinding	Recovery range (%)	Opmerkingen
diuron	87-107	-
isoproturon	66-86	Schatting; isoproturon is niet kwantitatief in het onderzoeksprogramma opgenomen (zie hoofdstuk 1).
Simazin	94	-
atrazine	94-112	-
chloridazon	100	-
Carbendazim	85	Pas na correctie voor de "dag-recovery" van de standaard.
Mevinfos (som isomeren)	57-71	-
metribuzin	86-100	-
pirimicarb	125-140	-
metolachloor	92	-

Van vinclozolin is al in het vooronderzoek vastgesteld dat de methode voor deze verbinding minder geschikt is vanwege niet constante retentietijden en sterk variërende piekgroottes. Slechts in één van de drie situaties waarin vinclozolin is toegevoegd, wordt de verbinding ook daadwerkelijk teruggevonden (recovery in die situatie is 115%).

Aanvullend zijn de hieronder vermelde opmerkingen en constatering van belang:

- In de monsters, gebaseerd op het basismonster afkomstig van Waterschap Regge & Dinkel, zijn de vroegst eluerende verbindingen (mevinfos en chloridazon) niet goed meetbaar in gehalten lager dan 0,5 µg/l. Dit is een direct gevolg van het zeer hoge gehalte aan organische stof in deze monsters en leidt tot het niet terugvinden van genoemde verbindingen in de lage addities (circa 0,2 µg/l).
- Voor een drietal basismonsters wordt een achtergrondconcentratie van bestrijdingsmiddelen aangetroffen. Het gaat daarbij om:
diuron in de monsters gebaseerd op de basismonsters van Hhs. Uitwaterende sluisen (circa 0,04 µg/l) en Hhs van Rijnland ("zoute kwel monsters") (circa 0,05 µg/l), en
atrazine in het basismonsters van Hhs van Rijnland ("regenwater monster") (circa 0,01 µg/l)
De door het controlelaboratorium gevonden achtergrondconcentraties diuron, in de basismonsters afkomstig van Zuiveringschap West-Overijssel en Waterschap Regge & Dinkel (respectievelijk 0.04 en 0.17 µg/l), werden niet bevestigd, evenmin als met de immunochemische methode, zodat de oorspronkelijk opgegeven gehalten wellicht niet juist zijn.
- In één van de monsters, gebaseerd op het basismonster afkomstig van Hoogheemraadschap van Rijnland ("zoute kwel monster"), werd carbendazim aangetoond zonder dat deze is toegevoegd. Een nadere beschouwing van de resultaten geeft echter aan dat het hier een niet nader gespecificeerde verbinding betreft met een retentietijd gelijk aan die van carbendazim en een UV spectrum dat een zekere mate van gelijkenis met het bibliotheekspectrum van carbendazim vertoont. Gebruikmakend van de kennis over de samenstelling kon derhalve, door een extra inspanning achteraf, de juiste conclusie getrokken worden. Bij meer routinematige toepassing van de methode voor onbekende monsters zullen dergelijke vals-positieve resultaten mogelijk blijven bestaan.

4.4 Algemene beschouwing van de resultaten

Deze paragraaf geeft een algemeen vergelijkende beschouwing van de resultaten, die met de immunochemische en HPLC fingerprint technieken werden verkregen. Aangezien de HPLC fingerprint methode niet geschikt is voor de analyse van cyclodiënen, is een opsplitsing gemaakt naar cyclodiënen en polaire bestrijdingsmiddelen, waarbij uitsluitend voor de polaire bestrijdingsmiddelen is getracht een relatie te leggen tussen de resultaten die met de verschillende technieken (immunoassays en HPLC fingerprint) werden verkregen.

Verder dient opgemerkt te worden dat de HPLC fingerprint somparameter een getalswaarde oplevert die om fundamentele redenen niet met de getalswaarden van de immunoassaybepalingen vergeleken kan worden (beide methoden beschrijven in essentie verschillende karakteristieken van de geanalyseerde monsters).

4.4.1 Cyclodiënen

Voor de cyclodiënen staan uitsluitend de resultaten, die met de cyclodiënen immunoassay werden verkregen, en de spikeconcentraties voor een evaluatie ter beschikking. Gezien het feit dat in de primaire monsters, die door de waterbeheerders aangeleverd werden, geen basishoeveelheden voor deze verbindingen aangetoond kunnen worden^B, kunnen deze gegevens echter vrij eenvoudig tegen elkaar geëvalueerd worden.

In figuur 3 is de respons die wordt verwacht op basis van de d.m.v. standaardadditie toegevoegde cyclodiënen en de bekende kruisreactiviteitsgegevens uitgezet tegen de reële respons, die bij de eerste analyse met de cyclodiënen immunoassay werd verkregen. De figuur geeft tevens (d.m.v. datalabels) informatie m.b.t. het matrixtype waarin het betreffende monster bereid werd (zie ook bijlage 7). Tot slot is, d.m.v. een tweetal lijnen, aangegeven welk verband verwacht zou mogen worden op basis van een één op één en op basis van een één op vier relatie.

Uit de figuur blijkt duidelijk dat een één op vier relatie het verband tussen de gegeven en de gemeten waarden veel beter lijkt te beschrijven dan een één op één relatie. Deze constatering lijkt sterk in de richting van een systematische meetfout te wijzen, vooral omdat er wel een duidelijke correlatie tussen de gegeven en de gemeten waarden lijkt te bestaan ($R = 0,930$, voor $N=15$). Afwijkingen van dit lineaire verband lijken nergens op problemen met een specifiek type monstermatrix teruggevoerd te kunnen worden.

Uitgaande van deze constatering, kan gesteld worden dat de voornaamste problemen met deze immunoassay gelegen zijn in het hoge achtergrondniveau, dat standaard met deze immunoassay verkregen wordt, en de betrekkelijke ongevoeligheid (detectielimiet in de orde van enkele $\mu\text{g/l}$). De geconstateerde afwijkingen bij heranalyse (na enig tijdsverloop) en filtratie worden hier niet nogmaals besproken (zie paragraaf 4.2.1 en bijlage 7).

4.4.2 Polaire bestrijdingsmiddelen

Voor de analyse van **isoproturon** levert een uitgebreide evaluatie op dit punt geen nieuwe informatie. Gezien het feit dat de immunoassay voor deze verbinding al bij eerdere validatie-experimenten goed presteerde (zie Hoofdstuk 2), en omdat deze verbinding alleen semi-kwantitatief in de HPLC fingerprint doelstofanalyse is opgenomen, werd al bij de opzet van het onderzoek voor dit "veldmonster" programma gekozen voor een benadering, waarbij isoproturon slechts in een beperkt aantal monsters werd toegevoegd. De resultaten van de eerste analyse van de "veldmonsters" met de immunoassay voor isoproturon geven aan dat deze goede prestaties ook bij een "blinde" toets in relatief complexe matrices behouden blijven; isoproturon was toegevoegd aan de matrices afkomstig van een beïnvloeding door kleigrond en veengrond. Verder blijkt, ook met de HPLC doelstofanalyse, een identificatie van isoproturon trefzeker plaats te kunnen vinden. Aangezien bij deze methode echter geen calibratie voor isoproturon heeft plaatsgevonden, kunnen de gegeven concentratieniveaus slechts als indicatief beschouwd worden. Een onderlinge vergelijking van de kwantitatieve resultaten is derhalve niet mogelijk.

Voor de **triazines** (atrazine en simazin werden in de opzet van het "veldmonster" programma opgenomen) kan geconcludeerd worden dat de resultaten van de HPLC fingerprint doelstofanalyse bijzonder goed met de basisgegevens (i.e. de standaardadditie concentraties) overeenstemmen (zie figuur 4). Een evaluatie van de resultaten van de bepalingen met de immunoassay voor triazines,

^B Geen van de organochloorbestrijdingsmiddelen kon worden aangetoond op concentraties boven de detectielimiet (0.001 tot 0.003 $\mu\text{g/l}$), terwijl de concentraties van de standaardaddities in de orde van enkele tot enkele tientallen $\mu\text{g/l}$ liggen.

tegen deze beide alternatieven, leidt tot een overeenkomstig eindresultaat.

In figuur 4 is de response die wordt verwacht op basis van de d.m.v. standaardadditie toegevoegde triazines en de bekende kruisreactiviteitsgegevens uitgezet tegen de reële respons, die bij de eerste analyse met de triazine immunoassay werd verkregen (heranalyse leverde slechts in zeer beperkte mate verschillen op). De lijn, die in de figuur is aangebracht, geeft het verband dat verwacht zou mogen worden op basis van een één op één relatie. Uit de figuur lijkt direct te volgen dat bepalingen, die met de triazine immunoassay worden uitgevoerd, leiden tot resultaten die circa 0,05 tot 0,2 µg/l boven de "werkelijke" waarde liggen. Wanneer echter rekening gehouden wordt met de mogelijke aanwezigheid van triazines in de primaire monsters (i.e. de door de waterbeheerders aangeleverde monsters), op een niveau tot maximaal de door OMEGAM bij analyse van deze monsters gehanteerde detectielimiet, blijkt dat deze "offset" niet per definitie teruggevoerd kan worden op een systematische afwijking. In figuur 5 zijn gegeven - (spike en basis) en gemeten concentraties uitgezet, waarbij aangenomen werd dat elk van de triazines in de basismonsters aanwezig is geweest op het niveau van de detectielimiet van de betreffende analytische methode (respectievelijk de GC/MS methode die door OMEGAM werd gehanteerd en de immunoassay voor triazines⁹). Het feit dat deze "maximale" waarden alle onder de één op één relatielijn liggen, geeft aan dat het niet onmogelijk is dat de genoemde "offset" het gevolg is van de aanwezigheid van triazines in de basismonsters. Ook de mogelijke aanwezigheid van metabolieten, die mogelijk niet in contra-expertise onderzoek terug te vinden zijn, kan niet uitgesloten worden.

Tot slot kan uitgaande van de figuren 4 en 5 geconcludeerd worden, dat elk van de monsters waarbij de matrix afkomstig van waterschap Regge & Dinkel (beïnvloeding door veengrond) als basis gehanteerd werd, een iets hogere "offset" geeft dan de resterende monsters. Ook hier kan, uitgaande van de voorliggende gegevens, niet geconstateerd worden of dit het gevolg is van matrixverstoringen, of van de aanwezigheid van een achtergrondconcentratie van triazines (of metabolieten).

Met name voor de **fenylureumherbiciden** levert een vergelijking van de resultaten van immunochemische methode met de resultaten van de HPLC-DAD fingerprint doelstofanalyse nog enige interessante conclusies op. Allereerst worden de analyseresultaten van OMEGAM, waarbij in de basismonsters afkomstig van zuiveringsschap West-Overijssel (zandgrond) en waterschap Regge & Dinkel een achtergrondniveau diuron wordt aangetoond (respectievelijk 0,04 en 0,17 µg/l), door geen van beide technieken bevestigd. Bij een verdere evaluatie van de resultaten is derhalve geen rekening gehouden met een dergelijk achtergrondniveau. Verder is opvallend dat bij de HPLC-DAD fingerprint doelstofanalyse wel een achtergrondniveau van diuron in de monsters, gebaseerd op de basismonsters van Hoogheemraadschap van Uitwaterende Sluizen in Hollands Noorderkwartier (kleigrond) en Hoogheemraadschap van Rijnland (locatie A: zoute kwel), geconstateerd wordt (respectievelijk ca 0,04 en 0,05 µg/l). Voor met name de monsters, waaraan niet d.m.v. standaardadditie (extra) diuron was toegevoegd, werd deze constatering bevestigd door de immunoassay voor fenylureumherbiciden. Ook hier laat de overeenkomst tussen de resultaten voor de HPLC fingerprint doelstofanalyse en de fenylureumherbiciden immunoassay zich het best grafisch illustreren. In figuur 6 is de response die wordt verwacht met de fenylureumherbiciden immunoassay, op basis van de HPLC fingerprint meetresultaten voor fenylureumherbiciden voor individuele monsters en de bekende kruisreactiviteitsgegevens, uitgezet tegen de reële respons, die bij de

⁹ Met de immunoassay voor triazines werd slechts voor 4 van de 15 monsters een waarde onder de detectielimiet van 0,03 µg/l geconstateerd.

eerste analyse met de fenylureumherbiciden immunoassay werd verkregen (heranalyse leverde slechts in zeer beperkte mate verschillen op)¹⁰.

Uit figuur 6 blijkt allereerst dat de hierboven gesuggereerde achtergrond niveaus van diuron inderdaad door beide technieken bevestigd worden. Daarnaast laat de figuur zien dat er bij gebruik van de fenylureumherbiciden immunoassay, evenals bij de triazine immunoassay, sprake lijkt te zijn van een "offset" van 0,05 tot 0,1 µg/l (uitgedrukt als chloortoluron equivalenten). Gezien de detectielimiet van 0,03 tot 0,05 µg/l die door Omegam voor individuele fenylureumherbiciden gehanteerd wordt, is het ook niet onmogelijk dat deze "offset" (ten dele) veroorzaakt wordt door fenylureumherbiciden (of metabolieten), anders dan diuron en isoproturon, die in de door de waterbeheerders aangeleverde monsters aanwezig geweest kunnen zijn (zie figuur 6: maximale concentraties). Zeer speculatief zou er nog sprake kunnen zijn van een gering effect van de monstermatrix op de omvang van de "offset"; gemiddeld iets hoger voor de matrix beïnvloed door veengrond en iets lager voor de monsters beïnvloed door regenwater en zoute kwel. De waargenomen verschillen zijn echter zeer gering en kunnen zowel afkomstig zijn van matrixeffecten als van geringe achtergrondniveaus van fenylureumherbiciden (lager dan de detectielimiet van de uitgevoerde controle bepalingen (OMEGAM)).

Tot slot kunnen voor het totale pakket aan polaire bestrijdingsmiddelen de d.m.v. standaardadditie toegevoegde concentratiestegen de resultaten van de HPLC fingerprint somparameter en doelstofanalyse uitgezet worden (figuren 7, 8 en 9).

Voor de **somparameter** zijn in de figuren 7 en 8 respectievelijk de piekensom (PS) en de relatieve piekensom (PS/TDOM) die op basis van de HPLC-UV somparameter verkregen werden uitgezet tegen het "verwachte" resultaat. De waarde voor het verwachte resultaat werd verkregen door de concentraties, voor de geaddeerde doelverbindingen, te sommeren, na schaling naar de relatieve respons voor deze verbindingen t.o.v. atrazine bij 215 nm (i.e. zoals die uit de calibratielijnen voor de individuele verbindingen volgt; zie paragraaf 3.3 en bijlage 8). De "verwachte" respons is derhalve uitgedrukt in atrazine equivalenten (µg/l Atr-eq.). Aangezien bij het berekenen van de "verwachte" respons geen rekening is gehouden met chromatografische pieken van verbindingen anders dan de doelverbindingen, die immers wel deel uitmaken van de experimenteel bepaalde piekensom, is een offset groter dan nul voor de figuren 7 en 8 vanzelfsprekend en komt overeen met de aanwezigheid van individuele verbindingen of vertonreinigingen in het monster. De omvang van de offset in de piekensom laat duidelijk een toenemende complexiteit van de basismonsters zien (beïnvloeding door ongedefinieerde natuurlijke of antropogene organische stoffen) in de volgorde regenwater < kleigrond < veengrond < zandgrond < zoute kwel. Door schaling tegen de achtergrond (resultaat PS/TDOM), die voornamelijk door humeus materiaal wordt bepaald, ontstaat hieruit een nieuwe gradatie die overeenkomt met de vervuilingsgraad van de basismonsters, zoals die in bijlage 8 wordt aangegeven (volgorde: veengrond < kleigrond < zoute kwel ~ regenwater < zandgrond).

Beide figuren laten verder zien dat er in vrijwel alle gevallen sprake is van een sprong in PS en PS/TDOM, gaande van de blanco modelmonsters (i.e. de basismonsters) naar de modelmonsters met de laagste standaardadditieconcentratie in atrazine equivalenten (d.w.z. voor eenzelfde basismatrix), waarna elke volgende additiestap een kleiner (of zelfs negatief) additioneel effect heeft.

¹⁰ Ter vergelijking is in figuur 6 de response die wordt verwacht op basis van de d.m.v. standaardadditie toegevoegde fenylureumherbiciden en de bekende kruisreactiviteitsgegevens, uitgezet tegen de reële respons, die bij de eerste analyse met de fenylureumherbiciden immunoassay werd verkregen.

Alleen voor het basismonster afkomstig van Zuiveringsschap West Overijssel (beïnvloed door zandgrond) is deze sprong nauwelijks significant. Opvallend is verder dat zowel de piekensom (PS) als de relatieve piekensom (PS/TDOM) een gelijke trend laten zien.

Concluderend kan gesteld worden dat, hoewel er geen sprake is van een lineair verband, de somparameter binnen de opzet van het veldmonsternameprogramma een duidelijk onderscheid kan maken tussen de in principe onverdachte basismonsters en de monsters waar d.m.v. standaardadditie bestrijdingsmiddelen aan toegevoegd zijn.

Voor de **doelstofanalyse** blijkt uit figuur 10 dat er over het algemeen een goede overeenkomst is tussen de gegeven - en de gemeten waarden. De afwijkingen, die in enkele monsters worden geconstateerd voor vinclozolin, mevinfos en carbendazim, werden in paragraaf 4.3.1 reeds besproken. Voor mevinfos en carbendazim bleek in dergelijke gevallen de complexiteit van de monstermatrix (op specifieke plaatsen in het chromatogram) veelal een plausibele verklaring voor deze afwijkingen te kunnen leveren. Een alomtegenwoordig effect van de monstermatrix lijkt echter niet te bestaan. Uitsluitend voor vinclozolin moet geconcludeerd worden dat de methode geen betrouwbare resultaten oplevert.

5 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

5.1 Immunochemische methoden

Voor de verschillende immunoassaykits voor de herkenning en identificatie van verontreiniging van oppervlaktewater met verschillende typen bestrijdingsmiddelen kan het volgende geconcludeerd worden:

Fenylureumherbiciden

1. Deze kit voldoet aan de gestelde eisen wat betreft detectielimiet (0,01 µg/l), intra- en inter-assay variatie en lineariteit.
2. Matrixeffecten bepaald aan de hand van gefiltreerde en bezonken monsters gaven wisselende effecten, maar zijn lager dan de spreiding in de assay.
3. De waarden in de onbekende "veld"monsters waren vergelijkbaar met de verwachte waarden, wanneer rekening gehouden werd met achtergrondniveaus die niet met de referentiemethode werden aangetoond. Dit kan verklaard worden door de aanwezigheid van meerdere metabolieten beneden de detectiegrens van de bepaling. Onverwacht was dat de wel met de referentiemethode gemeten achtergrondconcentratie van de monsterlocatie Regge en Dinkel niet met de kit teruggevonden werd.
4. Positieve monsters kunnen met de hier gebruikte immunoassaykit duidelijk gedetecteerd en van negatieve monsters onderscheiden worden.

Triazines

5. Deze kit voldoet aan de eisen wat betreft detectielimiet (0,03 µg/l), intra- en inter-assay variatie, lineariteit en recovery.
6. Vergelijkbaar met de fenylureumkit hebben filtratie en bezinken een wisselend effect. De kruisreactiviteiten die in beperkte mate bepaald werden, zijn vergelijkbaar met die, welke in de kitbijsluiters vermeld worden, maar zijn lager dan de spreiding in de assay.
7. In de onbekende "veld"monsters werd - weliswaar laag - een achtergrondniveau gemeten, dat niet met de referentiewaarden overeenkomt. Ofwel kan met de referentiemethode niet op dit lage niveau gemeten worden, ofwel meerdere metabolieten interfereren in de immunoassay. Addities werden echter teruggevonden, hoewel met een waarde die 1,5 - 2 maal hoger was dan verwacht.
8. Op een niveau > 0,1 µg/l zijn positieve monsters duidelijk te onderscheiden van negatieve monsters.

Isoproturon

9. Voor de isoproturonkit geldt eveneens dat deze voldoet aan de eisen wat betreft detectielimiet (0,01 µg/l), intra- en inter-assay variatie, lineariteit en recovery.
10. Matrixeffecten werden niet gedetecteerd, omdat filtratie en bezinken geen effect hadden op de gemeten waarden.
11. Van de onbekende "veld"monsters waren er zeven geïdentificeerd met fenylureumherbiciden, maar slechts twee waren geïdentificeerd met isoproturon. Diuron heeft in deze kit weinig kruisreactiviteit en zal weinig bijdragen in de isoproturonkit.
12. Met deze kit kunnen monsters die positief zijn voor isoproturon duidelijk onderscheiden worden van monsters die deze verbinding niet bevatten.

Cyclodiënen

13. De cyclodiënen vormen een aparte groep verbindingen, die vrij apolair zijn. Hierdoor zou een immunoassaykit niet echt geschikt zijn voor de detectie. Uit de resultaten blijkt echter dat de kit wat betreft de parameters detectielimiet (1,0 µg/l), intra-assay variatie, lineariteit en recovery goed voldoet aan de eisen.
14. De inter-assay variatie was slecht en het effect van filtratie dramatisch. Dit kan echter verklaard worden uit de fysisch-chemische eigenschappen van de verbindingen. Wanneer deze goed binden aan vaste deeltjes in het water, worden ze door filtratie voor een groot deel verwijderd. Dit blijkt duidelijk uit de veel lagere waarden die na filtratie gevonden worden. Adsorptie verklaart ook de slechte inter-assay variatie.
15. Standaardisatie van monsternamen, opslag en hanteren zal waarschijnlijk een goede verbetering in de immunoassay geven.
16. Uit de resultaten van de onbekende monsters blijkt dat, hoewel de gevonden waarden veel hoger waren dan verwacht, positieve monsters duidelijk onderscheiden kunnen worden van negatieve.

Algemeen

17. Geconcludeerd kan worden dat immunoassays heel goed gebruikt kunnen worden voor de snelle detectie van pesticiden en andere milieuverontreinigende stoffen. Binnen zeer korte tijd kunnen meerdere monsters tegelijkertijd beoordeeld worden op de aanwezigheid van een groep van verbindingen of een bepaalde doelverbinding.
18. Vooral in het geval van een groot monsteraanbod biedt de immunoassay ten opzichte van de conventionele methoden de voordelen van:
 - een uitstekende gevoeligheid
 - veel lagere kosten
 - minder arbeidsintensief
 - zeer korte analysetijd
19. Opgemerkt moet worden dat de meeste analytische parameters vergelijkbaar zijn met die van de conventionele methoden.
20. Bovendien voldoen de hier geteste immunoassays voor het grootste gedeelte aan de normen zoals die opgesteld zijn in Duitsland als DIN normen en die waarschijnlijk ook als ISO normen zullen gaan gelden.

Samengevat kan gesteld worden dat immunoassays met name geschikt zijn voor de screening van watermonsters, waarin eventueel een bepaalde verbinding of groep van verbindingen verwacht kan worden. Toepassing is bijvoorbeeld mogelijk in een bepaalde tijdsperiode om na te gaan of en wanneer een verhoging van bepaalde verbindingen optreedt. Daarnaast kan de immunoassay bijvoorbeeld toegepast worden in een bepaald monsternamegebied om na te gaan in hoeverre een bepaalde verbinding of groep van verbindingen in het betreffende gebied voorkomt.

5.2 HPLC Fingerprint methoden

5.2.1 Conclusies

Ten aanzien van het gebruik van de HPLC/UV-fingerprint als indicatieve parameter voor de herkenning en identificatie van verontreiniging van oppervlaktewater met organische microverontreinigingen kunnen de volgende conclusies getrokken worden:

Apparatuur en werkwijze

1. Het gebruik van on-line vaste fase extractie en HPLC met diode array detectie (on-line SPE-HPLC/DAD) is in de voorgestelde configuratie een robuust, gebruikersvriendelijk en betrouwbaar meetinstrument.

Indicatieve somparameter

2. HPLC/UV-fingerprint is goed bruikbaar als indicatieve analysetechniek voor verontreiniging. Voor het gebruik als somparameter bleken de in dit onderzoek gedefinieerde pieksom (PS) en relatieve pieksom (PS/TDOM) bij 215 nm het meest geschikt.

PS is met name geschikt voor het herkennen van waterkwaliteitsveranderingen voor hetzelfde monsterpunt. Variaties in de totaalconcentratie van individuele verbindingen ter grootte van en equivalent met 0,25 µg/l atrazine zijn op basis van PS goed aantoonbaar.

Voor het onderling vergelijken van uiteenlopende watertypen is PS minder geschikt vanwege de bijdrage aan PS door natuurlijk organisch materiaal. Indien hiervoor gecorrigeerd wordt in de vorm van de parameter PS/TDOM levert dit een beter bruikbare parameter op, zij het dat vanwege van de beperkte onderzoeksgegevens en door het ontbreken van aanvullende informatie (een soort "kwaliteitsindex" voor de onderzochte watertypen) een nadere onderbouwing nodig is (zie "Aanbevelingen").

3. Ten aanzien van de prestatiekenmerken van de bepaling van PS en PS/TDOM werd het volgende vastgesteld:

- de herhaalbaarheid van PS en PS/TDOM heeft een relatieve standaarddeviatie kleiner dan 10%
- de blancowaarden zijn klein (1-5%) ten opzichte van de waarden in praktijkmonsters
- er treedt geen meetbaar memory-effect op

4. De HPLC/UV-fingerprint levert een grote hoeveelheid aan detailinformatie op. De methode maakt het mogelijk om organische stoffen, gekarakteriseerd door hun retentietijd en eventueel UV-spectrum, te volgen:

- in plaats (vergelijken HPLC-chromatogrammen van verschillende locaties),
- in tijd (zelfde plaats, verschillende tijdstippen),
- in waterbehandeling (verschillende stappen in zuiveringsproces) zónder dat de identiteit van de verbinding persé bekend is.

Een dergelijke gedetailleerde evaluatie van analyseresultaten is evenwel erg arbeidsintensief als dit handmatig wordt uitgevoerd.

5. Bij het onderzoek naar 15 praktijkmonsters konden op basis van PS, TDOM en de vorm van het HPLC/UV chromatogram de vijf verschillende monstertypen (verschillende herkomst) direct herkend worden. Op basis van de toename in PS en in PS/TDOM konden de gespikete monsters eveneens direct herkend worden.

Doelstofanalyse

6. Aanvullend op het gebruik als indicatieve somparameter kan de HPLC/UV-fingerprint ook gebruikt worden voor de meting van een aantal doelstoffen. Het gebruik van een diode-array detector in plaats van een UV-detector met één golflengte is hierbij noodzakelijk om vals-positieve resultaten tot een minimum te beperken.

7. De bevestiging van de identiteit van doelstoffen aan de hand van UV-absorptiespectra is, in combinatie met de HPLC-retentietijd van de verbinding, veelal goed mogelijk. Bij een hoog gehalte opgelost organische koolstof levert de herkenning van lage concentraties (<0,5 µg/l) van de vroegst eluerende verbindingen problemen op, resulterend in een vals-negatief analyseresultaat.
De verwerking en interpretatie van UV-absorptiespectra kost, indien dit handmatig moet gebeuren, een relatief grote inspanning.
8. Met uitzondering van vinclozolin is de methode bruikbaar voor de meting van de in dit onderzoek betrokken doelstoffen. De volgende prestatiekenmerken werden hiervoor vastgesteld:
- herhaalbaarheid van retentietijden: beter dan 0,05 minuten (0,05-0,2%)
 - recovery ten opzichte van werkstandaarden beter dan 80%
 - herhaalbaarheid (bij afwezigheid van storende verbindingen) beter dan 5%; bij relatief hoge concentraties van storende verbindingen kan dit oplopen tot 25%.
 - lineariteit: responscurven hebben een correlatie-coëfficiënt groter dan 0,99 in het gebied van 0,05 tot 2,5 µg/l
 - aantoonbaarheidsgrenzen (bij afwezigheid van storende verbindingen) in Lekkanaalwater lager dan 0,05 µg/l. Afhankelijk van de grootte van de achtergrond en de aanwezigheid van storende verbindingen kan in praktijkwater een grens van 0,1 µg/l gehanteerd worden.
9. Bij het onderzoek naar praktijkmonsters worden 24 van de 29 addities goed teruggevonden (gemiddelde terugvinding 96% met een standaarddeviatie van 16%). De vijf niet teruggevonden addities betreffen in twee gevallen vinclozolin, waarvoor al in het vooronderzoek geconcludeerd is dat de methode niet geschikt is, en in één monster lage concentraties van drie vroeg eluerende verbindingen die gemaskeerd worden door de zeer hoge achtergrond van natuurlijk organisch materiaal. Eén keer is er een vals positief resultaat gerapporteerd.
10. De doelstofanalyse is uit te breiden met een zeer groot aantal bestrijdingsmiddelen en andere organische microverontreinigingen. Op basis van de literatuur zouden hiervoor in principe een 100-tal bestrijdingsmiddelen in aanmerking komen. Afhankelijk van de lokale situatie kunnen waterbeheerders besluiten hieruit een relevante selectie op te nemen in een analysemethode.

5.2.2 Aanbevelingen

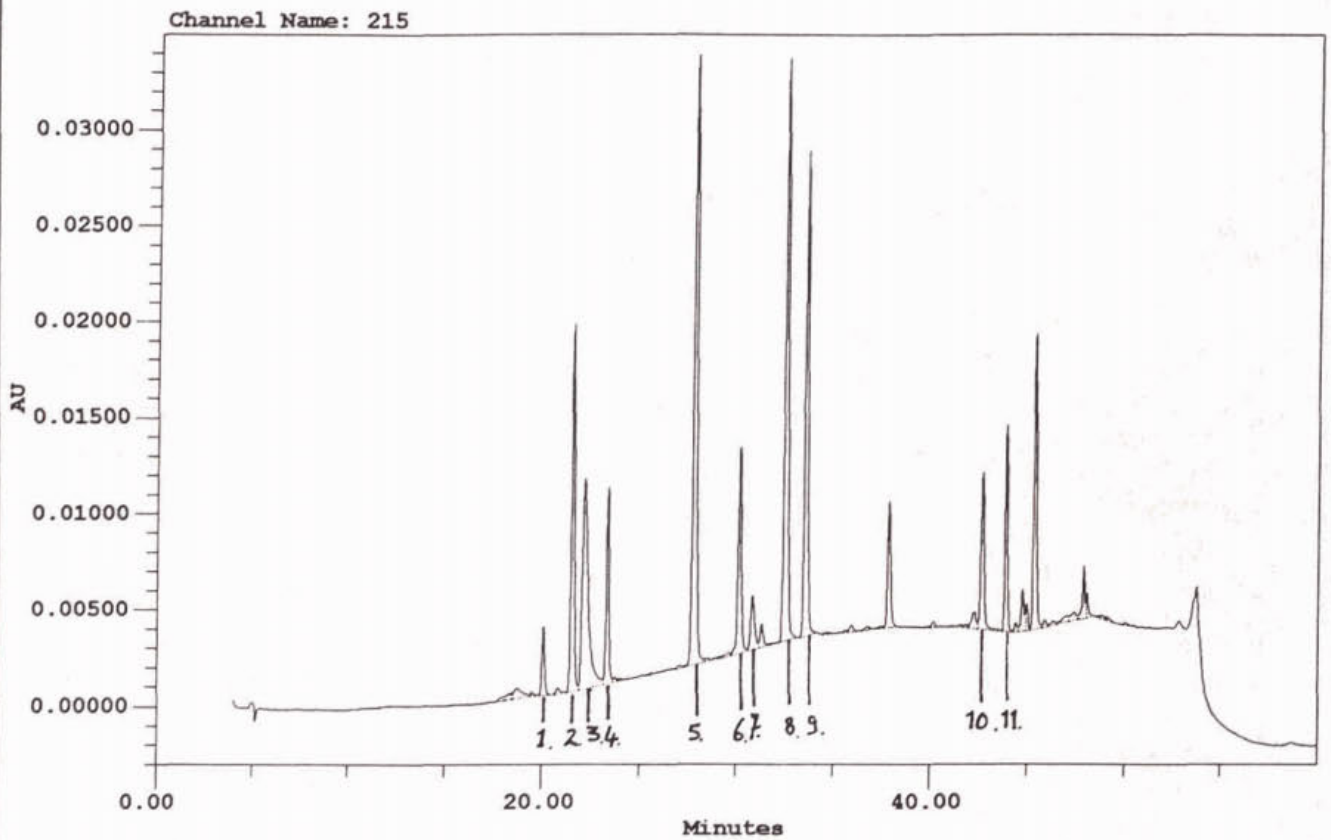
Ten behoeve van de implementatie van de methode bij waterlaboratoria en aanvullend onderzoek worden de volgende aanbevelingen gedaan:

1. In het uitgevoerde onderzoek zijn de somparameters PS en PS/TDOM slechts voor een zeer beperkt aantal monsters bepaald. Het verdient aanbeveling om PS te volgen in de tijd voor één of enkele monsterpunten om verder te kunnen onderbouwen of hiermee daadwerkelijk waterkwaliteitsveranderingen opgespoord kunnen worden.
2. Hetzelfde geldt voor PS/TDOM bij de vergelijking van uiteenlopende watertypen. Om te kunnen beoordelen of PS/TDOM voldoende in staat is om een indicatie te geven van de "algehele waterkwaliteit" voor organische stoffen, moet dan wel van de te onderzoeken watertypen een "kwaliteitsindex" beschikbaar gesteld worden, gebaseerd op resultaten van momenteel uitgevoerd waterkwaliteitsonderzoek.

3. Afhankelijk van de resultaten van 1 en 2 moet een verfijning van de definitie van de somparameter gemaakt worden. Zo kan gedacht worden aan de parameter $PS \times PS/TDOM$, die in elk geval meer recht doet aan de aanwezigheid van pieken in het chromatogram en daarmee beter dan $PS/TDOM$ in staat is om bijvoorbeeld verdunningen te herkennen. Nadeel is dat deze parameter geen fysische betekenis heeft.
4. Zowel voor PS als voor $PS/TDOM$ (of $PS \times PS/TDOM$) moeten richtwaarden opgesteld worden die een waardering geven over waterkwaliteit (niet, gering, matig, sterk en zeer sterk verontreinigd).
5. Voor een routinematige toepassing van de methode dient de verwerking van de gegevens (integratie PS , integratie $TDOM$, UV-spectra, piekherkenning onbekende stoffen op basis van retentietijd en UV-spectra) geautomatiseerd te worden.



Millennium Results Report	Printed: October 9, 1996	Page: 1 of 1
Report Method: stowa_chrom	Version: 2.15	
For Sample: 3-std 6 9/5	Vial: 16	Injection: 1
Proc Chan: 215	Processed: 10/09/96 12:22:17	Channel: 996
Date Acquired 05/09/96 08:21:30		Channel Name 215

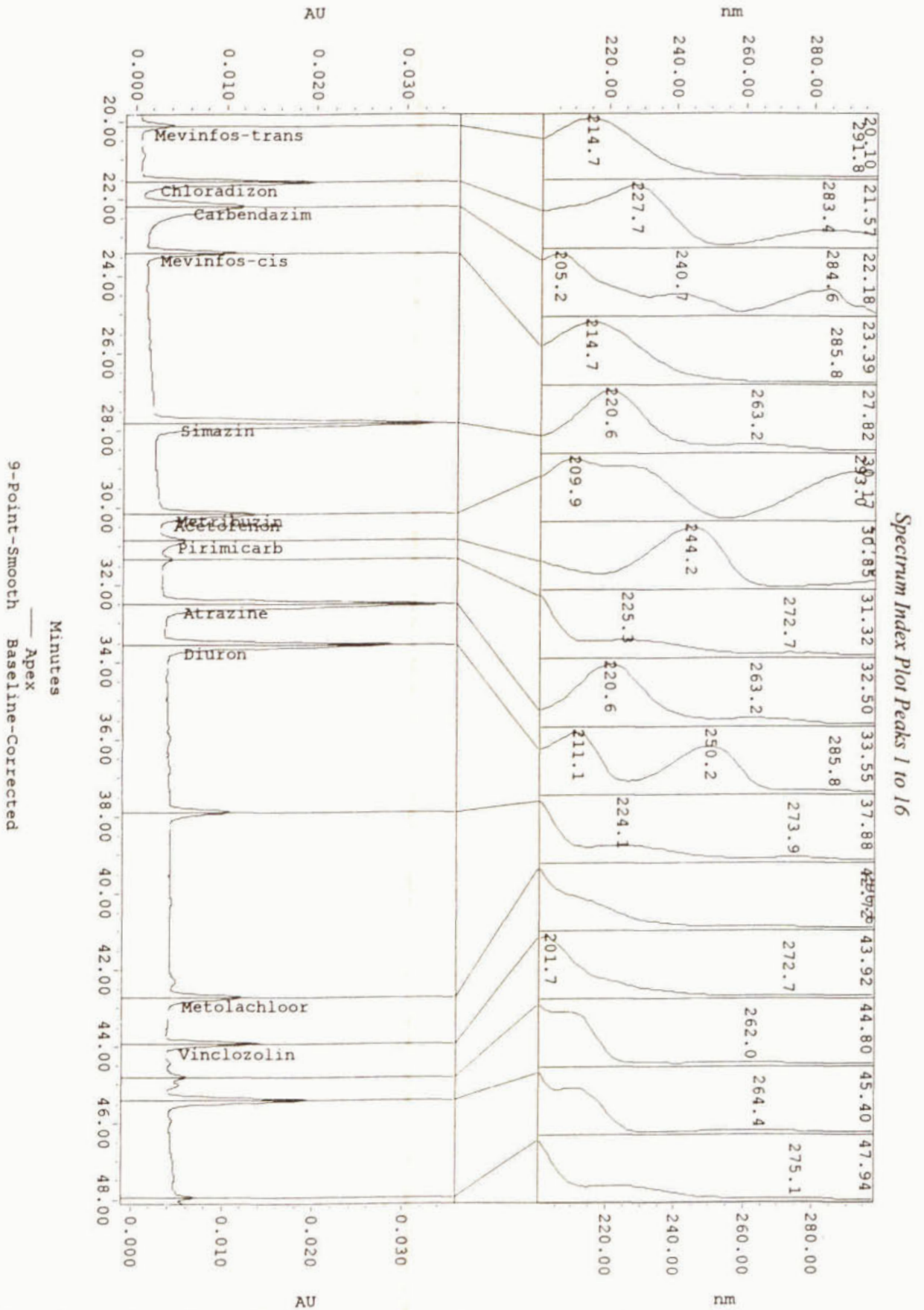


Standaard 2 µg/l

- 1 = Mevinfos (1)
- 2 = Chloradizon
- 3 = Carbendazim
- 4 = Mevinfos (2)
- 5 = Simazin
- 6 = Metribuzin
- 7 = Pirimicarb
- 8 = Atrazine
- 9 = Diuron
- 10 = Vinchlozolin
- 11 = Metolachloor

Figuur 1b

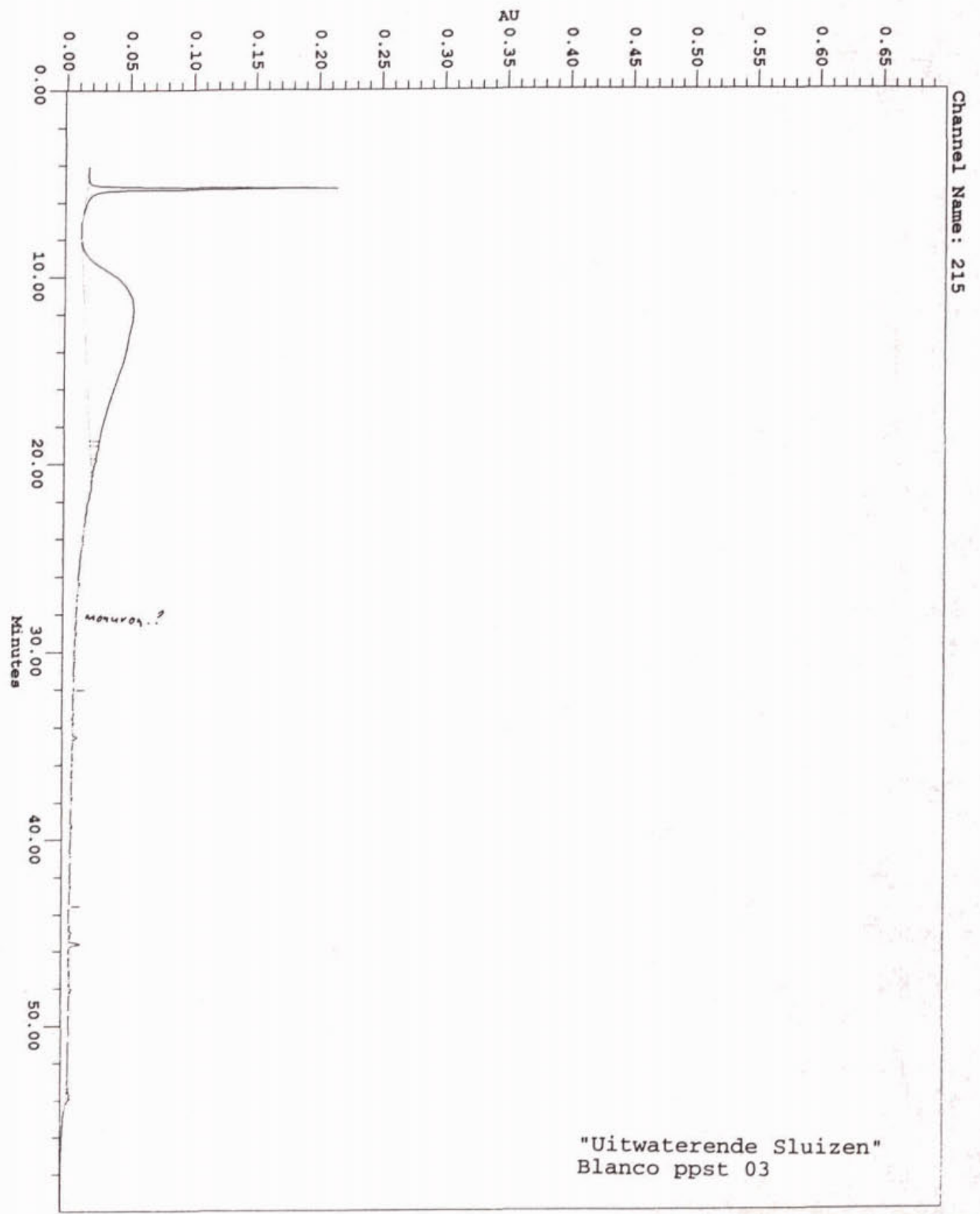
Standaard 2 µg/l met bijbehorende spectra.



Figuur 2a

HPLC/UV-chromatogrammen van de vijf onderscheiden blanco watermonsters. Zowel de hoogte van de "humeuze bult" als de vorm ervan maakt een duidelijk onderscheid mogelijk.

Millennium Results Report	Printed: March 18, 1996	Page: 1 of 1
Report Method: stowa_chrom	Version: 2.10	
For Sample: O-960601	Vial: 13	Injection: 1
Proc Chan: 215	Processed: 03/13/96 04:53:54	Channel: 996
Date Acquired 03/13/96 03:51:33		Channel Name 215



Millennium Results Report

Printed: March 18, 1996

Page: 1 of 1

Report Method: stowa_chrom

Version: 2.10

For Sample: O-960602

Vial: 15

Injection: 1

Channel: 996

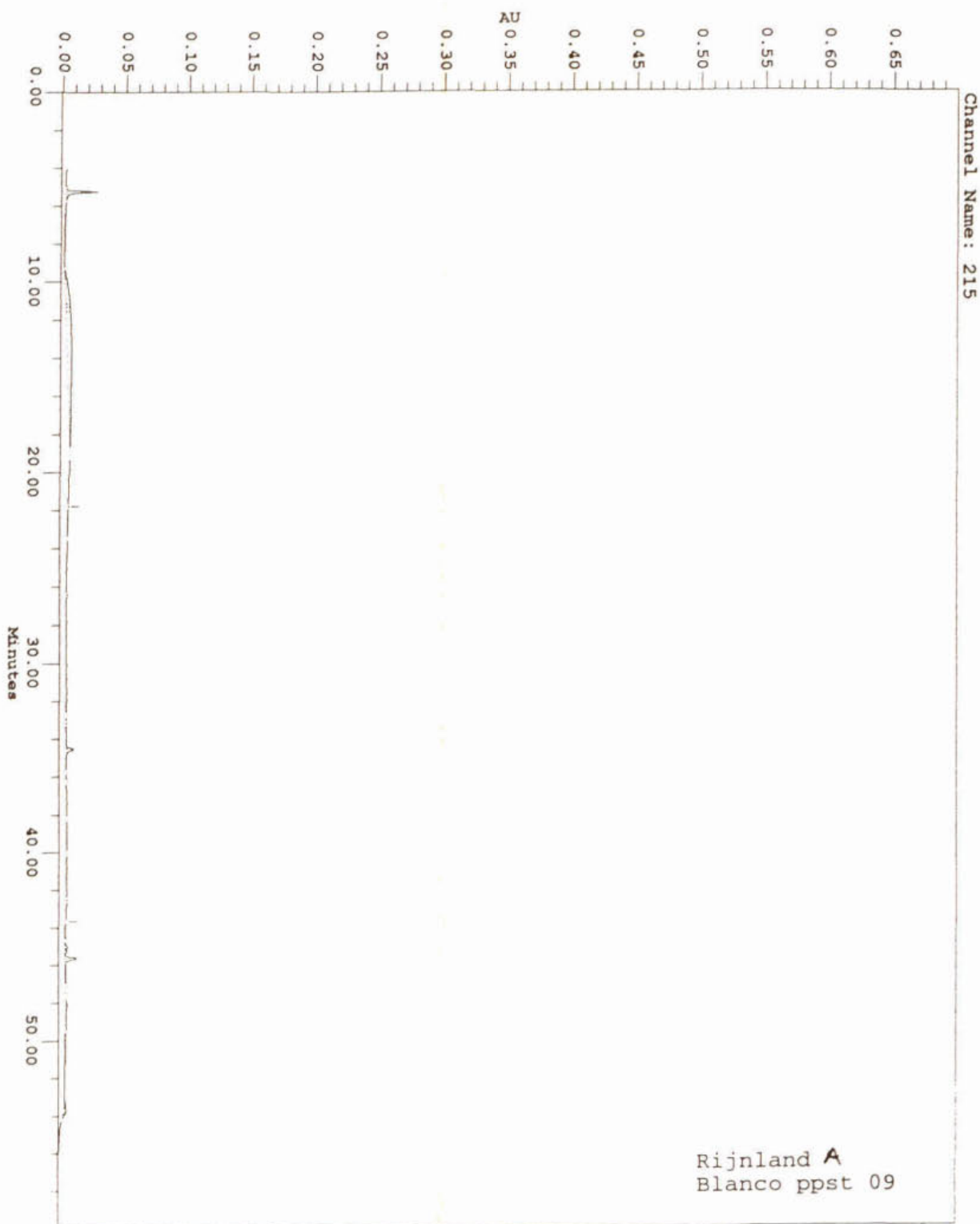
Proc Chan: 215

Processed: 03/13/96 07:36:32

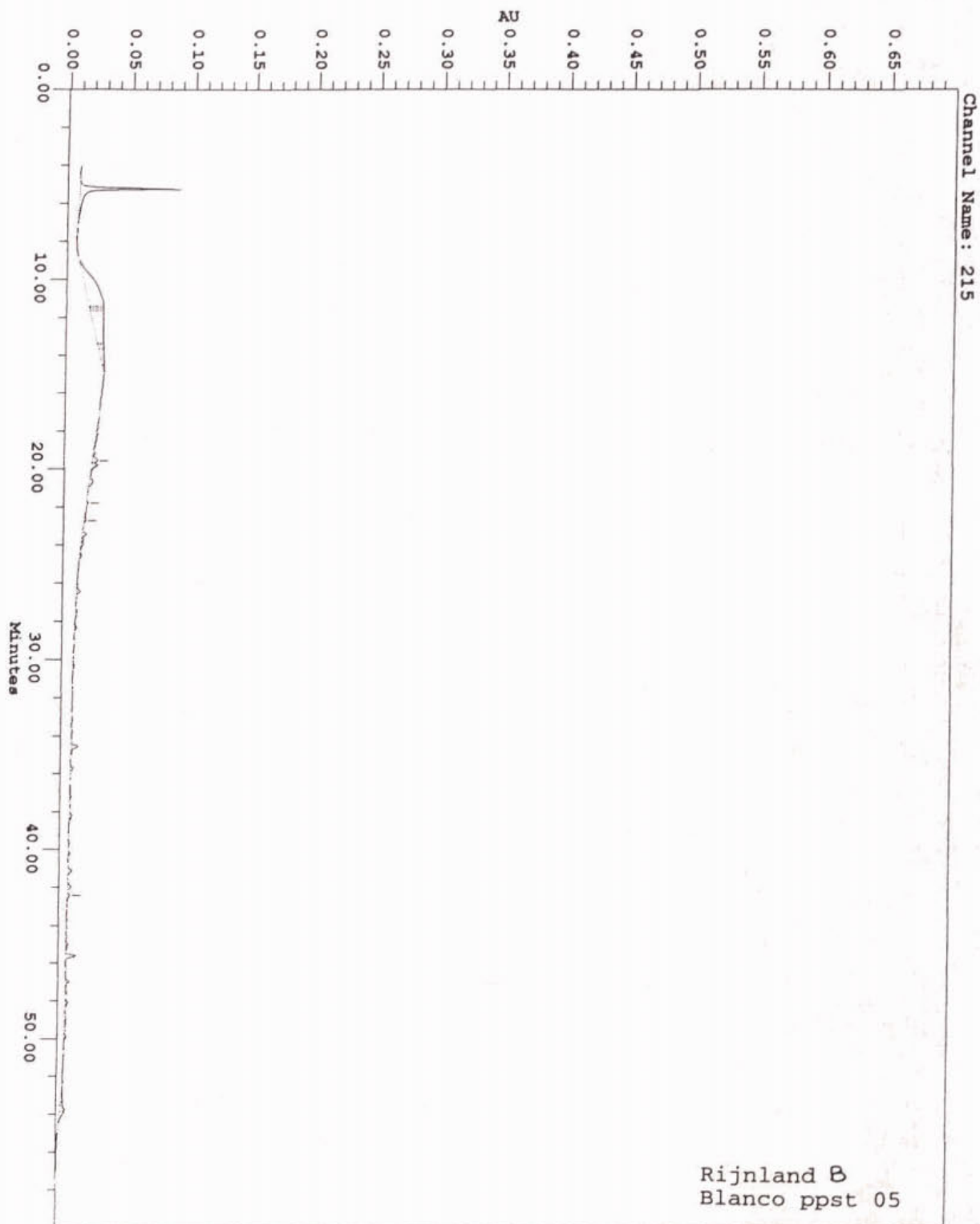
Channel Name

Date Acquired 03/13/96 06:34:43

215



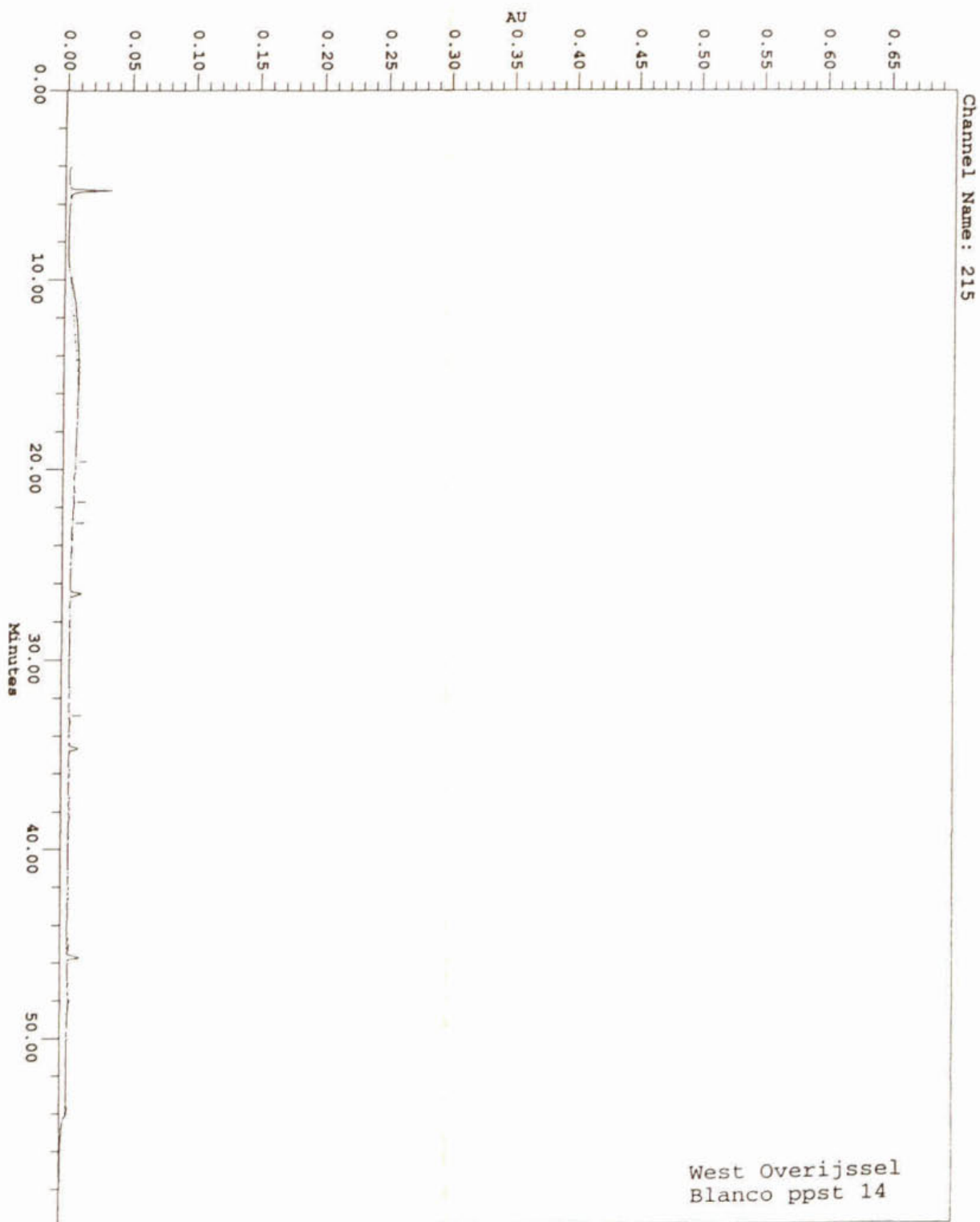
Millennium Results Report Printed: March 18, 1996 Page: 1 of 1
Report Method: stowa_chrom Version: 2.10
For Sample: O-960608 Vial: 29 Injection: 1 Channel: 996
Proc Chan: 215 Processed: 03/14/96 02:39:47
Date Acquired 03/14/96 01:36:39 Channel Name
215



Millennium Results Report
Report Method: stowa_chrom
For Sample: O-960609
Proc Chan: 215
Date Acquired 03/14/96 05:41:16

Printed: March 18, 1996
Version: 2.10
Injection: 1
Vial: 32

Page: 1 of 1
Channel: 996
Processed: 03/14/96 06:43:42
Channel Name
215



Millennium Results Report

Printed: March 18, 1996

Page: 1 of 1

Report Method: stowa_chrom

Version: 2.10

For Sample: O-960612

Vial: 37

Injection: 1

Channel: 996

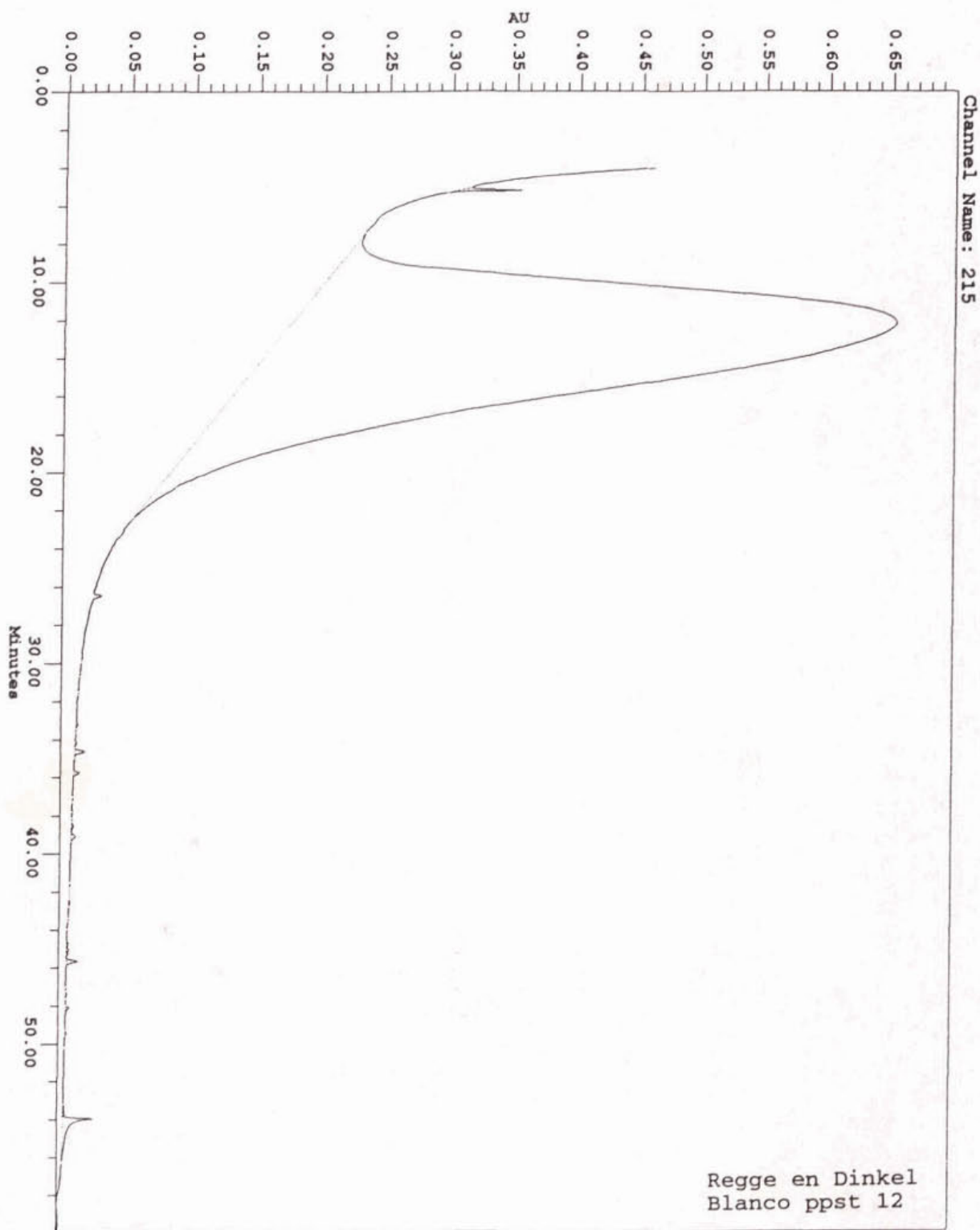
Proc Chan: 215

Processed: 03/14/96 14:52:27

Channel Name

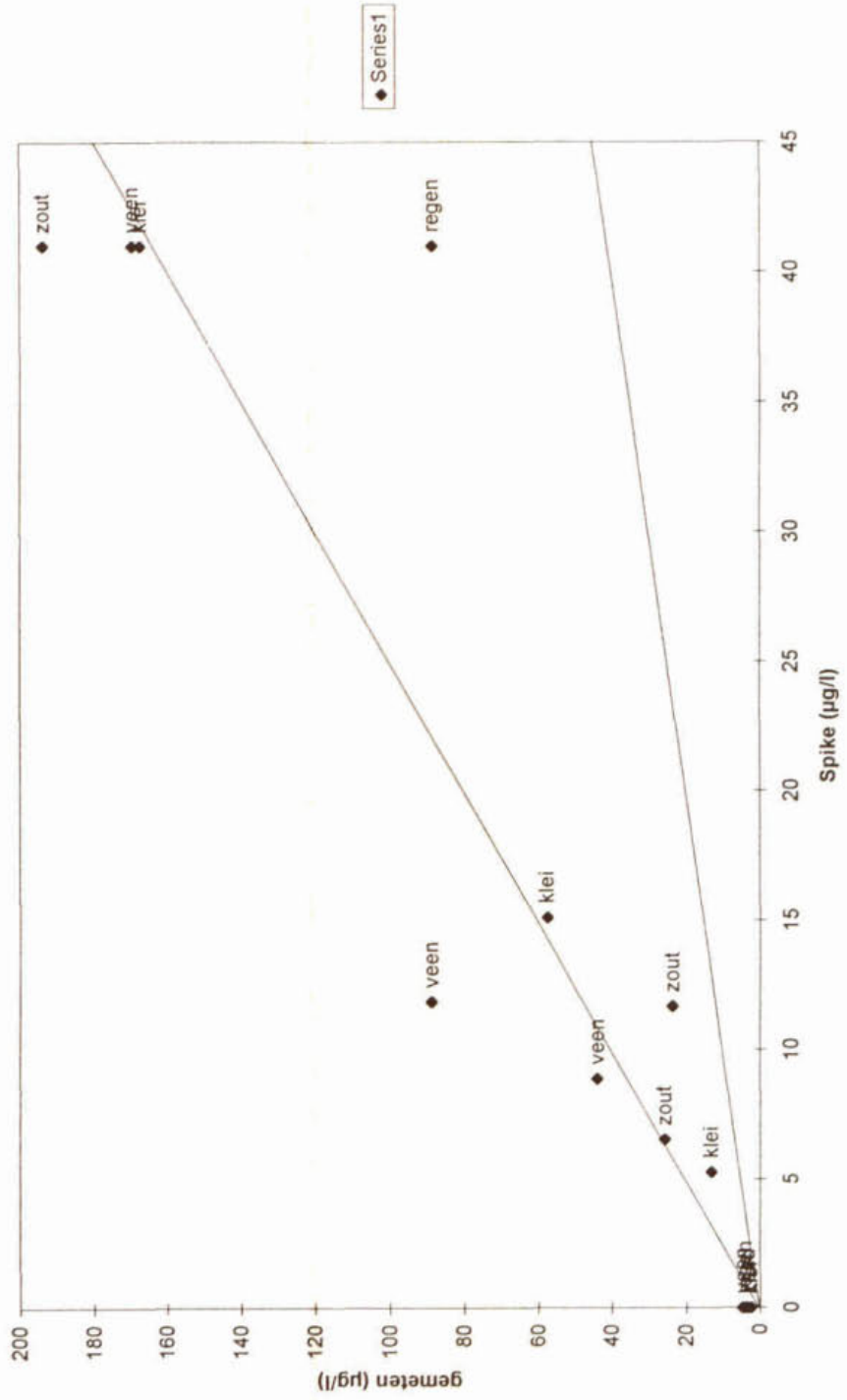
Date Acquired 03/14/96 13:50:27

215

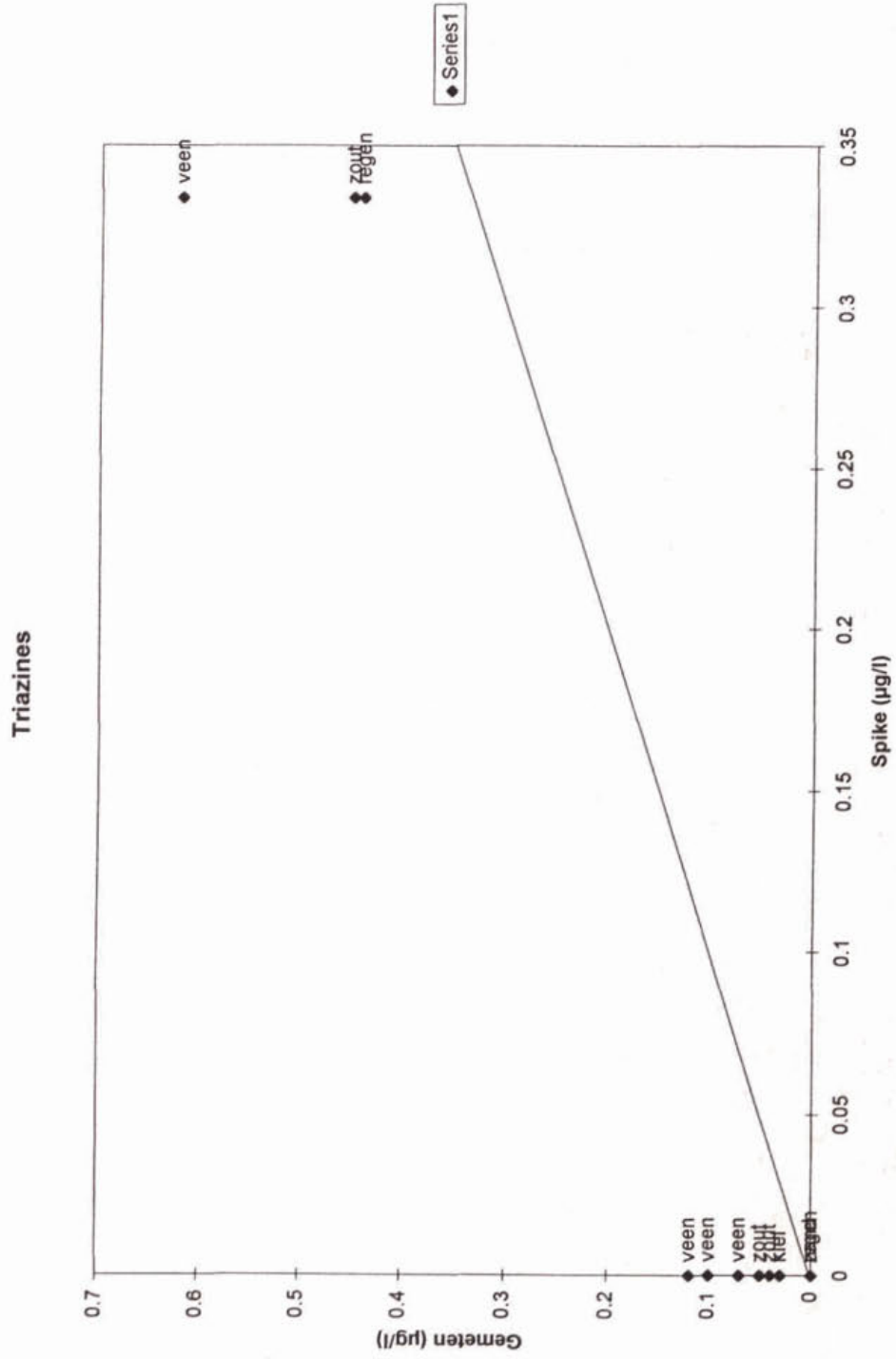


Figuur 3

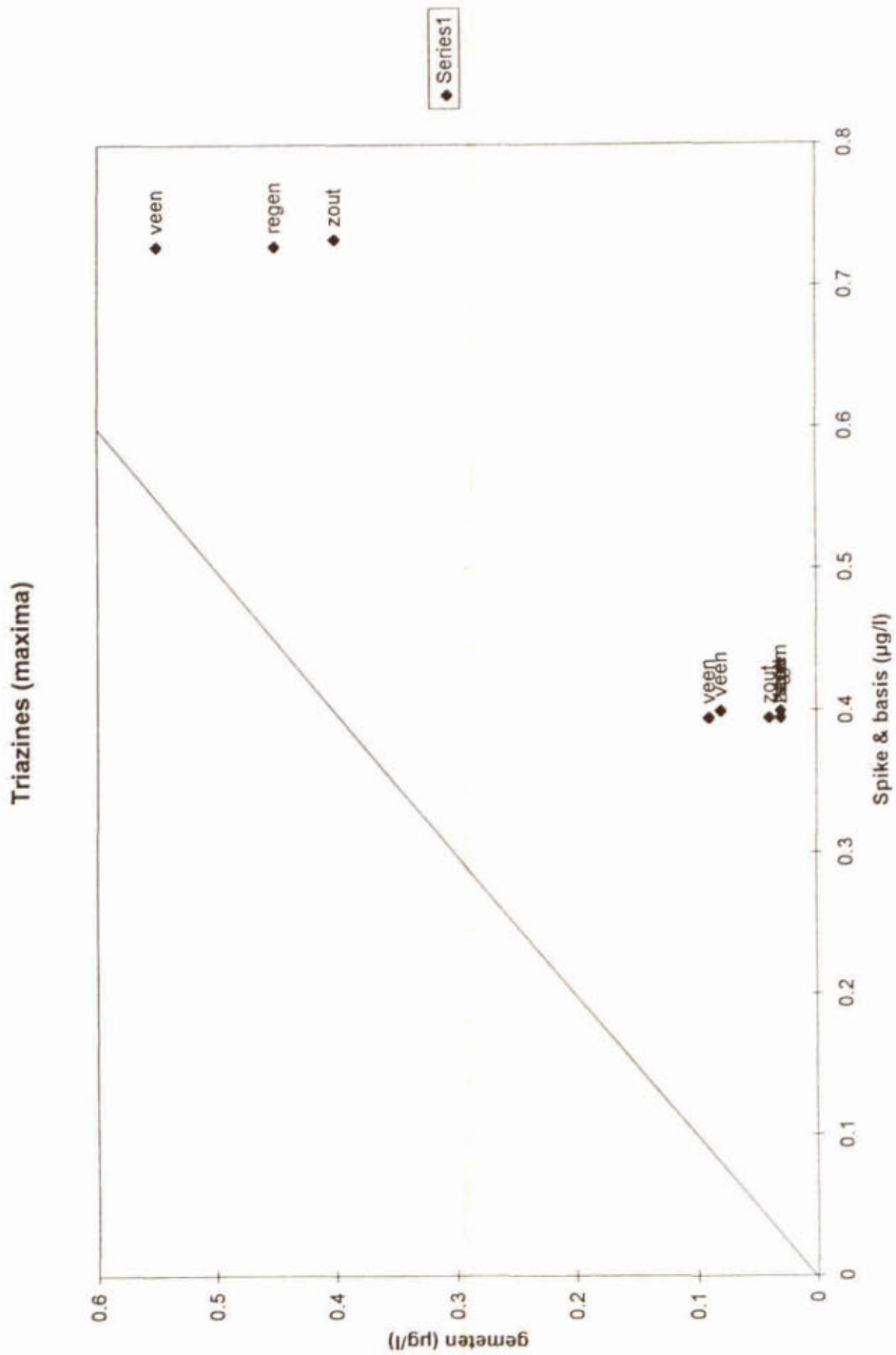
Cyclodienen



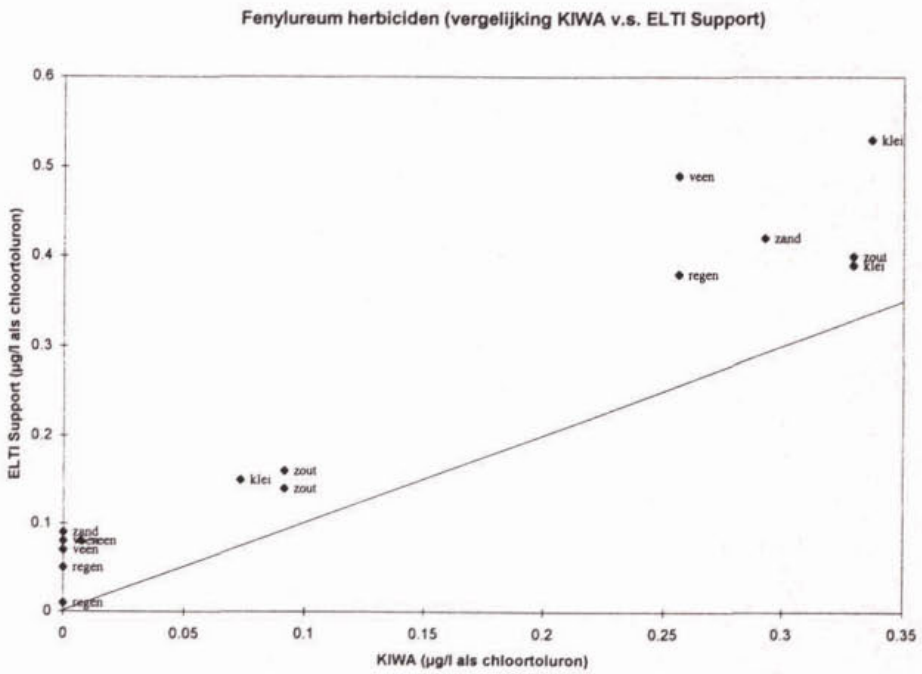
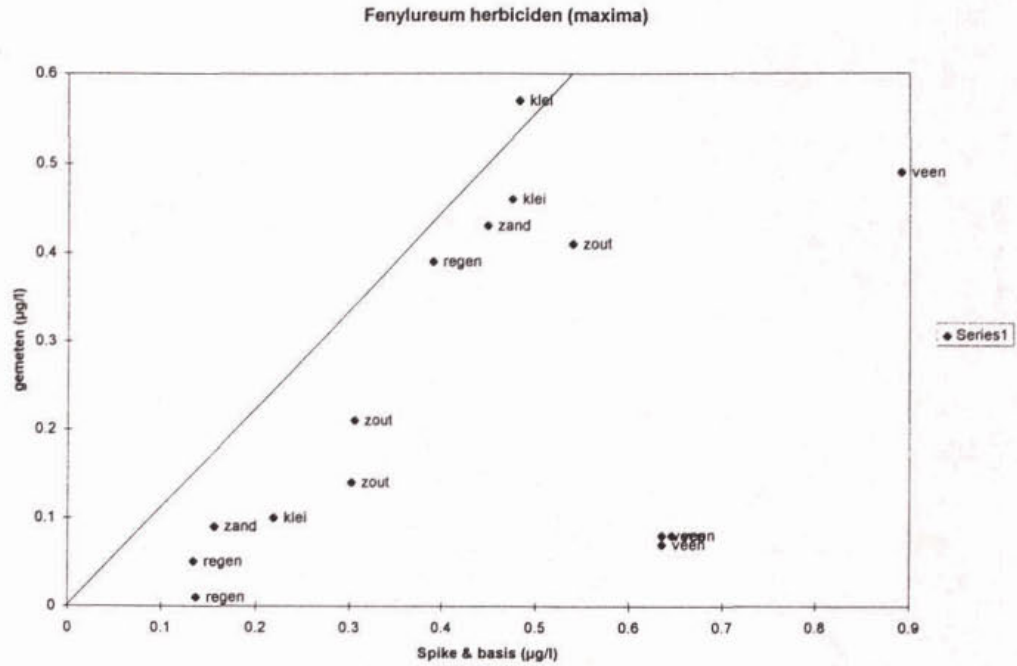
Figuur 4



Figuur 5

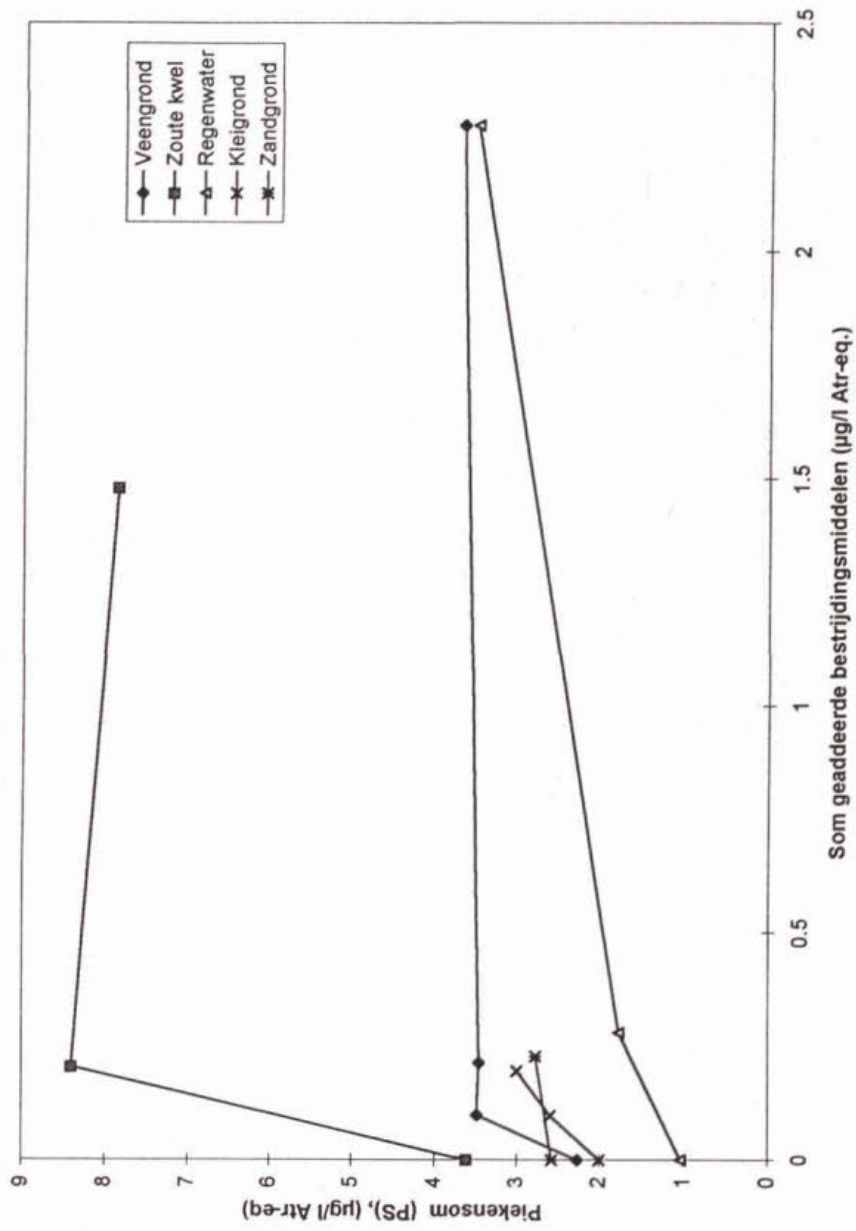


Figuur 6



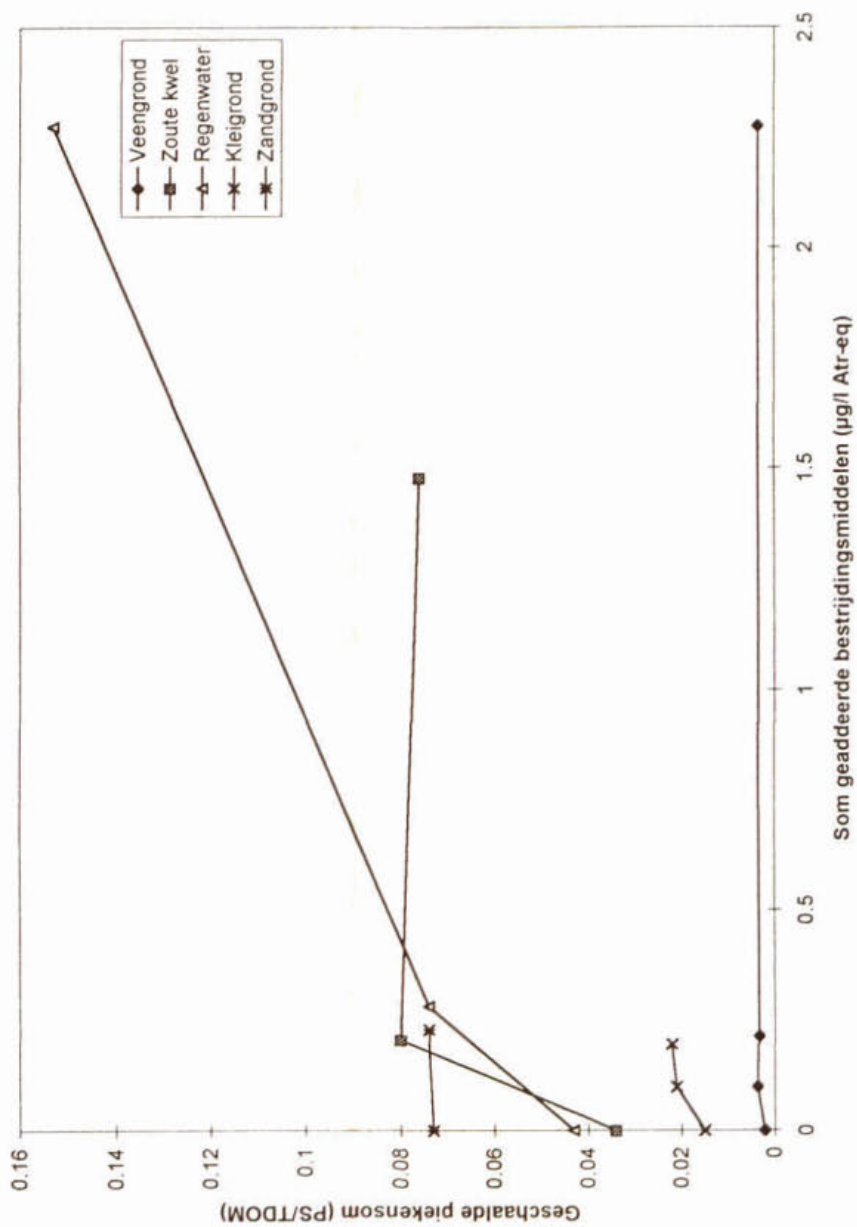
Figuur 8

Gemeten piekensom v.s. sommatie standaarddities



Figuur 9

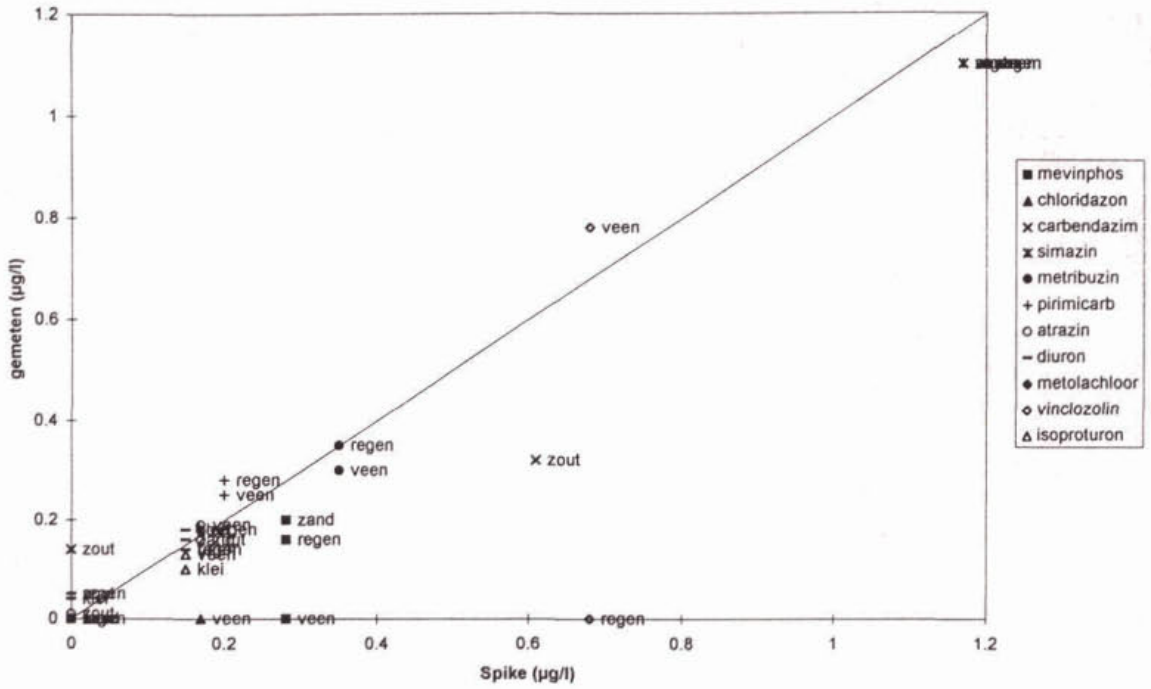
Gemeten geschaalde piekensom v.s. sommatie standaarddeits



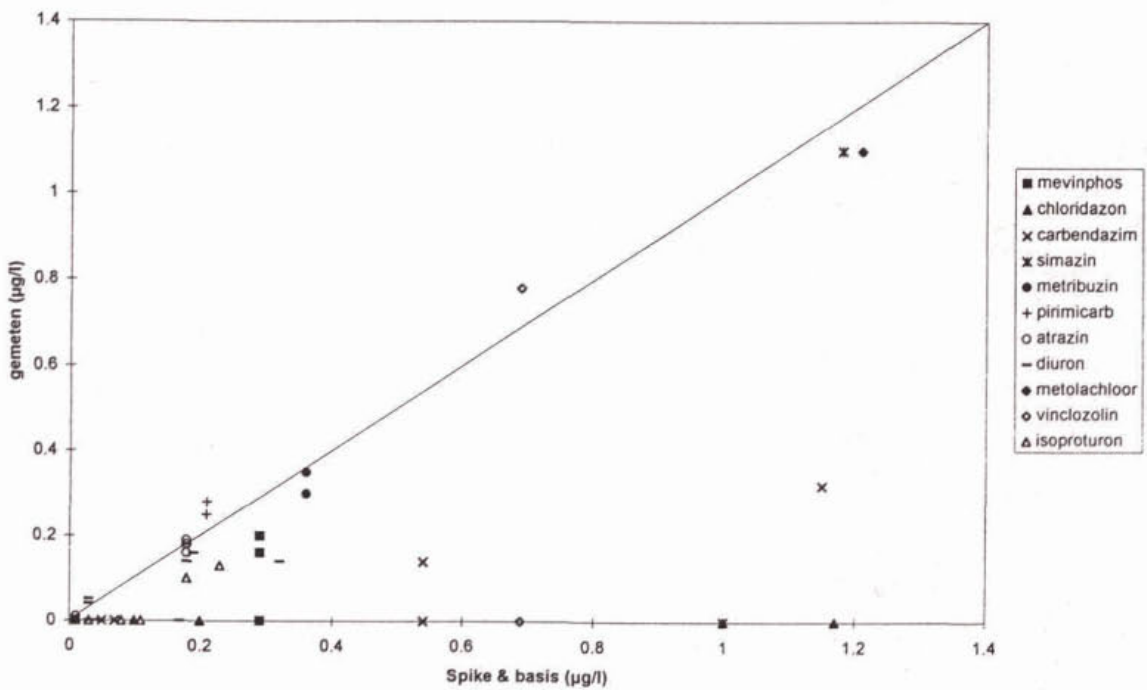
Figuur 10

=Sheet1!\$
B\$

HPLC fingerprint



HPLC fingerprint (maxima)

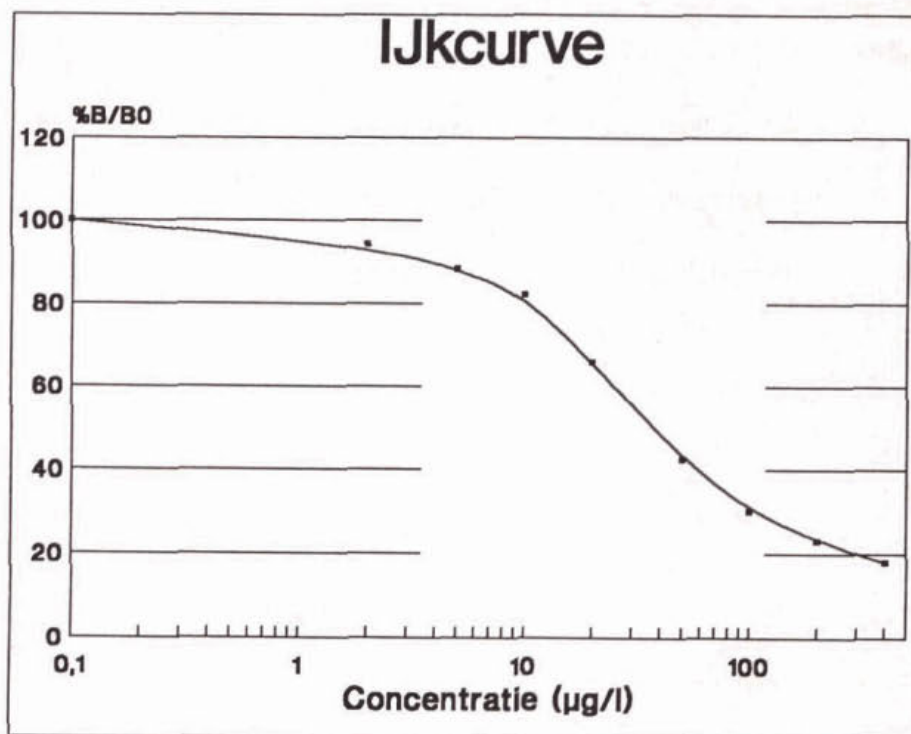


BIJLAGE I: IJKCURVES VOOR IMMUNOASSAYS

Bij immunoassays worden de concentraties voor relevante verbindingen, uitgedrukt als equivalenten van de standaard van de betreffende assay, berekend aan de hand van een specifiek type ijkcurve. Daarnaast kan ook de detectiegrens, voor de betreffende assay, bepaald worden aan de hand van deze ijkcurve. De manier waarop een dergelijke ijkcurve wordt samengesteld wordt hieronder beschreven.

De absorptie van de 0-standaard wordt op 100 % gesteld ($% B_0$) en de absorpties van de andere standaarden worden als $% B/B_0$ berekend. De berekende percentages B/B_0 worden grafisch uitgezet op de y-as tegen de concentraties van de standaarden op de x-as. Het 50 % B/B_0 punt is een maat voor de concentratie, waarbij de assay gewoonlijk het meest betrouwbaar is. Een voorbeeld van een standaardcurve is weergegeven in Figuur I.1.

Figuur I.1 Standaardcurve in Immunoassay



Figuur 1.2 Formule logit-log berekening

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

Toelichting: $y = B/B_0$

$x = \log Ag'$

$a =$ de meetwaarde onder de conditie Ag'

$b =$ de stijtheid van de curve, deze komt overeen met de negatieve waarde van de helling verkregen uit de twee-parameter log-logit transformatie

$c =$ de meetwaarde, respons van het systeem, bij 50% binding

$d =$ de meetwaarde bij zeer grote overmaat Ag' .

Literatuur

1. Hunter, W.M., Corrie, J.E.T.; Immunoassays for Clinical Chemistry, 2nd ed.; Churchill Livingstone, Edinburgh, 1983.
2. Roitt, I.; Essential Immunology, 6th ed.; Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1988.
3. Catty, D.; Antibodies, Vol. I and II; IRL Press, Oxford, 1989.
4. Benjamini, E.; Immunology: A Short Course; 2nd ed.; Wiley-Liss, New York, 1991.

BIJLAGE II: IMMUNOCHEMISCHE METHODEN

Voortvloeiend uit de resultaten van de 1ste fase van het onderhavige STOWA project komen een aantal commercieel verkrijgbare immunoassaykits in aanmerking voor evaluatie en validatie. Naast de in de respectievelijke bijsluiters vermelde specificaties en de resultaten van eerdere onderzoeken uitgevoerd bij ELTI Support zijn er voor de verschillende kits additionele gegevens noodzakelijk voordat ze in de praktijk door waterbeheerders gebruikt kunnen worden als indicatieve methode voor de bepaling van de mate van waterverontreiniging. De immunoassaykits die tijdens deze tweede fase in aanmerking zijn gekomen voor evaluatie en validatie zijn:

- de groepspecifieke kit voor fenylureumherbiciden;
- de groepspecifieke kit voor de triazines;
- de stofspecifieke kit voor isoproturon; en
- de groepspecifieke kit voor cyclodiënen.

De opzet van het uitgevoerde evaluatie en validatie onderzoek werd in de hoofdtekst van deze rapportage besproken. Een uitgebreid overzicht van de verkregen resultaten wordt in deze bijlage gegeven.

II.1 RESULTATEN

Voor het opstellen van ijkcurves en de berekening van de gemeten concentraties werd gebruik gemaakt van een vier-parametrisch logit-log transformatie (programma van Dr. J. Weusten) zie tevens bijlage 1.

II.1.1 Fenylureum-herbiciden

Omdat in deze kit chlortoluron wordt gebruikt als de standaard, moeten alle gevonden waarden beschouwd worden als chlortoluron-equivalenten. In de geadeerde monsters zitten twee fenylureumherbiciden, te weten diuron en isoproturon. De laatste zal volgens de kitbijsluiter niet (< 1%) kruisreageren in de assay. Diuron daarentegen heeft een kruisreactiviteit van 183 %. Diuron zal daarom mogelijk hogere concentraties opleveren dan verwacht.

II.1.1.1 Detectielimiet

Volgens het logit-log programma kan een laagst detecteerbare dosis bij meting in triplo berekend worden. Tevens wordt de concentratie bij 90% B/B0 berekend. Deze laatste is vergelijkbaar met die, welke in de kitbijsluiter wordt gegeven.

	concentratie (µg/l)
90 % B/B0 ¹	0,02
D.L ¹	0,006
90 % B/B0 (bijsluiter)	0,04

¹ de gemiddelde waarde genomen van de assays (n = 5).

Het blijkt dat de berekende detectielimiet in de assay gemiddeld lager ligt dan in de bijsluiter wordt vermeld. Dit is te verklaren uit de gebruikte berekeningswerkwijze, waarbij rekening gehouden wordt met de spreiding in de gemeten absorptiewaarden.

II.1.1.2 *Intra-assay variatie*

De intra-assay variatie van de fenylureum-herbicidenkit is in totaal met vier verschillende monsters bepaald, namelijk:

- 1 - Stowa "hoog" 10 keer verdund in blanco ongefiltreerd
10 ml Stowa "hoog" + 90 ml Stowa "blanco".
- 2 - Stowa "laag" gefiltreerd
Stowa "laag" gefiltreerd over een 0,45 µm filter.
- 3 - Stowa "laag" ongefiltreerd.
- 4 - Stowa "hoog" 3 keer verdund in leidingwater ongefiltreerd
1 ml Stowa "hoog" + 2 ml leidingwater.

Deze intra-assay variatie is in drie verschillende assays bepaald door eenzelfde monster meerdere keren in 1 run te meten.

In onderstaande tabel staan de berekende waarden.

Monster	N	Gemiddelde waarde (µg/l)	Standaard deviatie (µg/l)	C.V. (%)
1	5	0,46	0,05	10,88
2	5	0,53	0,06	10,47
3	5	0,59	0,03	4,24
4	5	0,64	0,07	10,69

Een intra-assay variatiecoëfficiënt van ongeveer 10% is voor een ELISA zeer acceptabel.

Het blijkt dat filtratie van het monster met lage concentraties geen effect heeft op de berekende gemiddelde waarde; wel is spreiding bij het ongefiltreerde monster lager dan die bij het gefiltreerde monster, hetgeen tegengesteld is aan de verwachte effecten. Mogelijk zitten er in dit monster weinig vaste deeltjes, die door filtratie verwijderd worden en eventueel in de assay zouden kunnen storen.

II.1.1.4 *Lineariteit*

De lineariteit in de fenylureum-herbicidenkit is 2 keer bepaald met een verdunningsreeks van Stowa "hoog", dat verdund werd met leidingwater en met Stowa "blanco" water.

Verdunningsreeks:

- A: Stowa "hoog" onverdund
- B: 1 ml A + 1 ml Stowa "blanco" of leidingwater (2 keer verdund)
- C: 1 ml B + 1 ml Stowa "blanco" of leidingwater (4 keer verdund)
- D: 1 ml C + 1 ml Stowa "blanco" of leidingwater (8 keer verdund)
- E: 1 ml D + 1 ml Stowa "blanco" of leidingwater (16 keer verdund)

In onderstaande tabel staan de verwachte waarden en de gevonden waarden ($\mu\text{g/l}$).

Lineariteit in de fenylureum-assay:

Oplossing	Verdunningsfactor	Verwacht ($\mu\text{g/l}$) blanco/leid.	Gevonden waarden ($\mu\text{g/l}$)	
			Stowa "blanco"	Leidingwater
A 0,79 $\mu\text{g/l}$ D 0,77 $\mu\text{g/l}$ I	0	1,62/1,62	3,93	3,93
B	2	0,90/0,81	1,20	1,48
C	4	0,53/0,41	0,56	0,54
D	8	0,35/0,20	0,33	0,36
E	16	0,26/0,10	0,26	0,21
blanco	-	0,17/0	0,17	niet gemeten

D = diuron; I = isoproturon; dit zijn de enige fenylureumverbinding die toegevoegd werden. Isoproturon heeft een kruisreactiviteit van $< 1\%$.

De verwachte waarde, gemeten in chloortoluron-equivalenten, is de concentratie van diuron, die geadderd werd en waarvan de kruisreactiviteit 183% is, waarbij in de verdunningsreeks rekening gehouden is met de achtergrond van $0,17\ \mu\text{g/l}$ fenylureumverbindingen in het blanco Stowa-monster.

Wanneer de gevonden resultaten tegen elkaar worden uitgezet in een lijn ($Y = aX + b$) met op de x-as de verwachte waarden ($\mu\text{g/l}$) en op de y-as de gevonden waarden ($\mu\text{g/l}$) dan worden de volgende lijnen gevonden:

Stowa "blanco".

$$Y = 2,6 X - 0,57 \text{ met als correlatiefactor } R = 0,9719$$

Leidingwater.

$$Y = 2,5 X - 0,25 \text{ met als correlatiefactor } R = 0,9888$$

De gevonden correlatie is in principe goed, hoewel er vooral in het hoge concentratiebereik meer gemeten wordt dan verwacht op grond van de toegevoegde en reeds aanwezig hoeveelheid fenylureumverbindingen. Dat deze waarden hoger zijn dan de verwachte waarden kan het gevolg van kruisreactie door andere geadderde of aanwezige pesticiden. Omdat dergelijke verbindingen waarschijnlijk een lagere affiniteit voor het antilichaam hebben, zal de invloed bij verdunning steeds kleiner worden. Inderdaad is te zien dat bij hogere verdunningen de gevonden en verwachte waarden

vergelijkbaar zijn. Opgemerkt moet worden dat deze hoge concentraties buiten het bereik van de ijklijn liggen, zodat deze waarden niet geheel betrouwbaar zijn.

II.1.1.5 Effect van filtratie

Om na te gaan of een voorbehandeling zoals filtreren effect heeft op de metingen met fenylureum-herbicidenkit, wat zou kunnen duiden op een matrixeffect, zijn er drie verschillende watertypes (Rijnwater (Stowa), Maas-Waalkanaalwater en slootwater uit de Ooypolder) geaddeerd en ongeaddeerd (blanco) zowel gefiltreerd als ongefiltreerd gemeten met de fenylureumkit.

In onderstaande tabel staan de "verwachte" waarden ($\mu\text{g/l}$) en de gevonden waarden ($\mu\text{g/l}$). De verwachte waarde is evenals hierboven beschreven de concentratie diuron.

Watertype	Ongefiltreerd ($\mu\text{g/l}$)	Gefiltreerd ($\mu\text{g/l}$)
Rijnwater (0.079 $\mu\text{g/l}$)	0,29	0,35
Rijnwater (blanco)	0,15	0,14
Maas-Waalkanaalwater (0.079 $\mu\text{g/l}$)	0,49	0,59
Maas-Waalkanaalwater (blanco)	0,42	0,41
Slootwater (0.079 $\mu\text{g/l}$)	0,29	0,28
Slootwater (blanco)	0,06	0,09

N.B. De concentraties die vermeld worden bij het watertype, zijn de verwachte concentraties, waarbij uitgegaan wordt van diuron als enige kruisreagerende verbinding.

Het blijkt dat in blanco Rijnwater en blanco Maaswater een vrij hoge achtergrond gemeten wordt. Deze achtergrondwaarde is voor de Rijn vergelijkbaar met die welke bij de bepaling van de lineariteit werd gemeten. Filtreren heeft op de blanco monsters weinig effect, hetgeen erop duidt dat er in dit geval weinig matrixeffecten zijn. Het effect op de geaddeerde Rijn- en Maas monsters is duidelijk waar te nemen. De concentraties nemen na filtreren toe. Dit zou kunnen duiden op een negatief effect van bijvoorbeeld vaste deeltjes op de immunoassay, waarbij vers geaddeerde verbindingen anders reageren dan verbindingen die reeds in het monster aanwezig waren.

II.1.1.6 Bezinken

Om te kijken of een voorbehandeling als bezinken invloed heeft op de fenylureum-herbicidenkit is Maas-Waalkanaalwater geaddeerd en onaddeerd zowel bezonken als geschud gemeten met de kit.

Het geaddeerde monster is:

Stowa "hoog" 10 keer verdund in Maas-Waalkanaalwater (10 ml Stowa "hoog" + 90 ml Maas-Waalkanaalwater).

In onderstaande tabel staan de gevonden waarden ($\mu\text{g/l}$).

Watertype	Geschud ($\mu\text{g/l}$)	Bezonken ($\mu\text{g/l}$)
Stowa "hoog" verdund (0,079 $\mu\text{g/l}$)	0,54	0,48
Maas-Waalkanaal (blanco)	0,48	0,45

Bezinken van een geaddeerd monster heeft blijkbaar op geaddeerde monsters een tegengesteld effect in vergelijking met filtreren. Mogelijk worden (kruis)reagerende stoffen samen met vast materiaal neergeslagen. In dit geval wordt na bezinken de toegevoegde hoeveelheid niet meer teruggevonden.

II.1.1.7 Inter-assay variatie

De inter-assay variatie is bepaalde door twee verschillende monsters in meerdere runs te meten.

Deze twee monsters waren:

- 1 - Stowa "hoog" 10 keer verdund in Stowa "blanco"
10 ml Stowa "hoog" + 90 ml Stowa "blanco".
- 2 - Stowa "laag" ongefiltreerd.

In de volgende tabel staan de gevonden waarden ($\mu\text{g/l}$).

Assay	Stowa "hoog" 10 • verd. ($\mu\text{g/l}$)	Stowa "laag" ($\mu\text{g/l}$)
1ste keer	0,39	niet gemeten
2de keer	0,24	0,60
3de keer	0,29	0,60
4de keer	0,29	0,60
5de keer	0,37	0,59 gem ¹⁾
gemiddelde	0,32	0,60
SD	0,06	0,01
CV (%)	17,5	0,9

¹⁾in deze assay werd de intra-assay bepaald met Stowa "laag" en hiervan is het gemiddelde genomen.

Blijkbaar geeft een verdund monster een hoge spreiding van keer tot keer. Een waarde voor het % C.V. van 17% is voor een ELISA echter acceptabel. Het maximaal toegestane % C.V. is 20 %. Het % C.V. in het "lage" monster is heel laag. Het verschil in gevonden percentages is niet te verklaren.

II.1.2 Triazines

Voor de evaluatie van de triazine-kit is de uitvoering op dezelfde manier gedaan als voor de fenylureum-herbicidenkit. Opgemerkt moet worden dat, omdat atrazine gebruikt wordt als standaard in de kit, alle waarden gezien moeten worden als atrazine-equivalenten. In de loop van de experimenten bleek bovendien, dat de bij de kit geleverde plastic buizen onbetrouwbare resultaten en een hoge spreiding in de gevonden waarden opleverden. Daarom werden metingen herhaald met glazen buizen.

II.1.2.1 Detectie limiet

Voor de bepaling van de detectielimiet in de triazine-assay is op dezelfde manier te werk gegaan als voor de fenylureumherbiciden.

	concentratie ($\mu\text{g/l}$)
90 % B/B0 ¹	0,08
D.L. ¹	0,03
90 % B/B0 (bijsluiters)	0,046

¹ de gemiddelde waarde genomen van de assays (n = 6).

Het blijkt dat de laagst detecteerbare concentratie volgens de logit-log transformatie iets lager ligt dan in de bijsluiters wordt aangegeven, terwijl die welke bij 90% B/B0 berekend wordt iets hoger ligt. Dit kan gedeeltelijk te wijten zijn aan een hogere spreiding bij het gebruik van plastic buizen.

II.1.2.2 Intra-assay variatie

De intra-assay variatie van de triazinekit is in totaal vijf keer bepaald met vier verschillende monsters, namelijk:

- 1 - Stowa "hoog" 10 keer verdund in blanco ongefiltreerd water (slechte triplo's)
10 ml Stowa "hoog" + 90 ml Stowa "blanco".
- 2 - Idem als (1) Stowa "hoog" 10 keer verdund in blanco ongefiltreerd water
- 3 - Stowa "laag" ongefiltreerd
- 4 - Stowa "laag" gefiltreerd
Stowa "laag" gefiltreerd over een 0,45 μm filter.

In onderstaande tabel staan de berekende waarden.

Monster	N	Gemiddelde waarde ($\mu\text{g/l}$)	Standaarddeviatie ($\mu\text{g/l}$)	C.V. (%)
1	5	0,28	0,05	16,34
2	5	0,33	0,02	4,98
3	5	0,71	0,03	4,61
4	5	0,79	0,03	3,56

In het algemeen is de spreiding binnen een assay zeer laag. Uitzondering vormt het monster met slechte triplowaarden.

II.1.2.3 *Lineariteit*

De lineariteit van de triazinekit is 3 keer bepaald met een verdunningsreeks van Stowa "hoog" (gefiltreerd en ongefiltreerd) verdund in Stowa "blanco" (gefiltreerd en ongefiltreerd) water en van Stowa "laag" verdund in Stowa "blanco" (ongefiltreerd).

Verdunningsreeks:

- A: Stowa "hoog" onverdund (gefiltreerd of ongefiltreerd)
- B: 1 ml A + 1 ml Stowa "blanco" (gefiltreerd of ongefiltreerd) (2 keer verdund)
- C: 1 ml B + 1 ml Stowa "blanco" (gefiltreerd of ongefiltreerd) (4 keer verdund)
- D: 1 ml C + 1 ml Stowa "blanco" (gefiltreerd of ongefiltreerd) (8 keer verdund)
- E: 1 ml D + 1 ml Stowa "blanco" (gefiltreerd of ongefiltreerd) (16 keer verdund)
- F: Stowa "laag" onverdund (ongefiltreerd)
- G: 1 ml F + 1 ml Stowa "blanco" (ongefiltreerd) (2 keer verdund)
- H: 1 ml G + 1 ml Stowa "blanco" (ongefiltreerd) (4 keer verdund)
- I: 1 ml H + 1 ml Stowa "blanco" (ongefiltreerd) (8 keer verdund)
- J: 1 ml I + 1 ml Stowa "blanco" (ongefiltreerd) (16 keer verdund)

In onderstaande twee tabellen staan achtereenvolgens de verwachte waarden en de gevonden waarden van de verdunningsreeks van Stowa "hoog" en Stowa "laag".

Lineariteit in de atrazine-assay:

Oplossing	Verdunningsfactor (µg/l)	Verwachte waarde F/O	Gevonden waarden (µg/l)	
			Gefiltreerd	Ongefiltreerd
A A 2,0 µg/l S 1,9 µg/l	0	2,37/2,55	2,70	2,59
B	2	1,23/1,40	1,42	1,40
C	4	0,65/0,82	0,79	0,68
D	8	0,37/0,54	0,48	0,39
E	16	0,22/0,39	0,24	0,21
blanco	-	0,08/0,25	0,08	0,25

A = atrazine; S = simazine; F = gefiltreerd; O = ongefiltreerd.

Oplossing	Verdunningsfactor	Verwachte waarde (µg/l)	Gevonden waarde (µg/l)
F A 0,50 µg/l S 0,48 µg/l	0	0,63	0,69
G	2	0,35	0,41
H	4	0,20	0,24
I	8	0,13	0,15
J	16	0,10	0,11
blanco	-	0,06	0,06

A = atrazine; S = simazine.

Voor de verwachte waarden is de concentratie atrazine + simazine genomen. Simazine heeft een kruisreactiviteit van 15 % in deze assay. De verwachte waarden zijn berekend op basis van de percentages kruisreactiviteit van de toegevoegde triazines en de achtergrondhoeveelheid. Vooral het ongefiltreerde monster heeft een vrij hoog achtergrondniveau.

Wanneer de gevonden resultaten tegen elkaar worden uitgezet in een lijn ($Y = aX + b$) met op de x-as de verwachte waarden (µg/l) en op de y-as de gevonden waarden (µg/l) dan worden de volgende lijnen gevonden:

Stowa "hoog" gefiltreerd:

$$Y = 1,14 X + 0,02 \text{ met als correlatiefactor } 0,9995$$

Stowa "hoog" ongefiltreerd:

$$Y = 1,07 X - 0,14 \text{ met als correlatiefactor } 0,9969$$

Stowa "laag":

$$Y = 1,10 X + 0,01 \text{ met als correlatiefactor } 0,9986$$

De hoge correlatie duidt erop dat de lineariteit in deze kit heel goed is. Bovendien lijkt het erop dat de andere toegevoegde pesticiden in ieder geval niet kruisreageren.

II.1.2.4 *Inter-assay variatie*

De inter-assay variatie is met twee verschillende monsters bepaald. Deze monsters werden elke assay meegemeten. Ook is het bijgeleverde controlemonster van de kit in elke assay meegemeten.

Deze drie monsters waren:

- 1 - Stowa "hoog" 10 keer verdund in Stowa "blanco"
10 ml Stowa "hoog" + 90 ml Stowa "blanco".
- 2 - Stowa "laag" ongefiltreerd.
- 3 - Controlemonster ± 3 ppb, wordt bij de kit geleverd.

In onderstaande tabel staan de gevonden waarden en de berekende waarden.

Assay	Stowa "hoog" 10 * verd. (µg/l)	Stowa "laag" (µg/l)	Controle (µg/l)
1ste keer	0,36	0,75	3,4
2de keer	(0,42) ¹	(0,75) ¹	(3,29) ¹
3de keer	0,29	0,71	2,92
4de keer	(0,31) ¹	(0,76) ¹	(3,22) ¹
5de keer	0,34	0,70	2,91
6de keer	0,41	0,79	3,01
7de keer	0,31	0,87	3,29
8ste keer	0,33 gem ²	0,67	2,66
gem	0,34	0,75	3,02
SD	0,04	0,06	0,24
CV (%)	10,9	8,6	7,8

¹ Het bleek dat de met de kit meegeleverde buizen van een slechte kwaliteit waren; in deze assay gaf dat slechte triplo's en daarom worden de gevonden waarden niet meegenomen in de berekeningen.

² In deze assay is de ook intra-assay variatie bepaald van Stowa "hoog" 10 keer verdund en hiervan is het gemiddelde genomen.

De gevonden % C.V. zijn voor een ELISA heel acceptabel.

II.1.2.5 Effect van filtratie

Om te bepalen of een voorbehandeling zoals filtreren effect heeft op de waarden die gevonden worden met de triazinekit, zijn er drie verschillende watertypes (Rijn, Maas-Waalkanaalkanaal en slootwater) geaddeerd en ongeaddeerd zowel gefiltreerd als ongefiltreerd gemeten met de triazinekit.

In onderstaande tabellen staan de gevonden waarden (µg/l). Opgemerkt moet worden dat 2 keer een assay gedaan is met plastic buizen en verder met glazen buizen vanwege de kwaliteit van de plastic buizen. De bij het watertype vermelde concentratie is die van atrazine. Zoals eerder vermeld zullen door aanwezig simazine de waarden iets hoger uitkomen dan verwacht.

Assay met plastic buizen:

Watertype	Ongefiltreerd ($\mu\text{g/l}$)		Gefiltreerd ($\mu\text{g/l}$)	
	1ste keer	2de keer	1ste keer	2de keer
Rijnwater (0,20 $\mu\text{g/l}$)	0,42	0,31	0,30	0,33
Rijnwater (blanco)	0,20	0,18	0,09	0,12
Maas-Waalkanaalwater (0,20 $\mu\text{g/l}$)	0,52	0,39	0,30	0,46
Maas-Waalkanaalwater (blanco)	0,06	0,29	0,17	0,17
Slootwater (0,20 $\mu\text{g/l}$)	0,20	0,29	0,19	0,32
Slootwater (blanco)	0,07	0,17	<0,03	0,12
Stowa "laag" (0,50 $\mu\text{g/l}$)	0,76	-	0,72	-

Uit bovenstaande tabel blijkt, dat er soms vrij grote verschillen zitten tussen de waarden van de eerste en de tweede meting. De oorzaak ligt voor een groot deel in het gebruik van de bij de kit geleverde plastic buizen, waardoor de spreiding in de metingen hoog zijn. De herhaling met glazen buizen is in de volgende tabel weergegeven.

Assay gedaan met glazen buizen:

Watertype	Ongefiltreerd ($\mu\text{g/l}$)	Gefiltreerd ($\mu\text{g/l}$)
Rijnwater (0,20 $\mu\text{g/l}$)	0,31	0,30
Rijnwater (blanco)	0,08	0,09
Maas-Waalkanaalwater (0,20 $\mu\text{g/l}$)	0,44	0,40
Maas-Waalkanaalwater (blanco)	0,13	0,15
Slootwater (0,20 $\mu\text{g/l}$)	0,47	0,32
Slootwater (blanco)	0,04	0,04
Stowa "laag" (0,50)	0,87	0,84

Hoewel het effect van filtreren niet eenduidig is in de assays met plastic buizen, kan uit die met glazen buizen geconcludeerd worden, dat filtratie van geaddeerde monsters een lichte verlaging in de gevonden waarden tot gevolg heeft. De blanco monster laten daarentegen een heel lichte verhoging van de waarden zien. Waarschijnlijk worden samen met vaste deeltje kruisreagerende

stoffen resp. in de assay storende stoffen verwijderd. Zoals hierboven reeds opgemerkt, reageren geaddeerde monster anders dan natuurlijke monsters, hoewel het aantal metingen te klein is om hierover harde uitspraken te doen.

II.1.2.6 *Effect van bezinken*

Om te bepalen of een voorbehandeling zoals bezinken invloed heeft op de met de triazinekit gevonden waarden, is Maas-Waalkanaalwater en Rijnwater (Stowa) geaddeerd en ongeaddeerd zowel bezonken als onbezonken gemeten met de triazinekit.

De geaddeerde monsters zijn:

- 1 - Stowa "hoog" 10 keer verdund in Stowa "blanco"
10 ml Stowa "hoog" + 90 ml Stowa "blanco".
- 2 - Stowa "hoog" 10 keer verdund in Maas-Waalkanaalwater
10 ml Stowa "hoog" + 90 ml Maas-Waalkanaalwater.

In onderstaande tabel staan de gevonden waarden ($\mu\text{g/l}$).

Monster	Bezonken ($\mu\text{g/l}$)	Onbezonken ($\mu\text{g/l}$)
Maas-Waalkanaal (0,20 $\mu\text{g/l}$)	0,42	0,54
Maas-Waalkanaal (blanco)	0,13	0,13
Rijn (0,20 $\mu\text{g/l}$)	0,34	0,41
Rijn (blanco)	0,07	0,07

Bezinken heeft op de blanco monster praktisch geen effect; geaddeerde monsters leveren na bezinken een lagere waarde op vergelijkbaar met filteren. Ook dit zal waarschijnlijk het gevolg zijn van het feit dat samen met vast materiaal kruisreagerende stoffen bezonken worden.

II.1.2.7 *Kruisreactiviteit*

Er werd van Atrazine, Propazine, Terbutylazine en Prometryn een stockoplossing gemaakt in methanol met respectievelijk de volgende concentraties: 584, 588, 568 en 628 mg/l. Deze stockoplossingen werden achtereenvolgens toegevoegd aan Maas-Waalkanaalwater, zodat de volgende oplossingen ontstonden.

- A. Maas-Waalkanaalwater (blanco)
- B. Maas-Waalkanaalwater + Atrazine
- C. Maas-Waalkanaalwater + Atrazine + Propazine
- D. Maas-Waalkanaalwater + Atrazine + Propazine + Terbutylazine
- E. Maas-Waalkanaalwater + Atrazine + Propazine + Terbutylazine + Prometryn

De eindconcentraties worden vermeld in de tweede onderstaande tabel. Deze oplossingen (A t/m E) werden ieder gemeten met de triazinekit om de kruisreactiviteit van de verschillende triazines in de kit te bepalen en te vergelijken met de in de kitbijsluiter gegeven waarden voor kruisreactiviteit.

In onderstaande tabel staan de gevonden concentraties ($\mu\text{g/l}$).

Oplossing	Gevonden concentratie (- $\mu\text{g/l}$)
A. Maas-Waalkanaalwater (blanco)	0,11
B. Maas-Waalkanaalwater + atrazine	0,55
C. Maas-Waalkanaalwater + atrazine + propazine	0,97
D. Maas-Waalkanaalwater + atrazine + propazine + terbutylazine	1,03
E. Maas-Waalkanaalwater + atrazine + propazine + terbutylazine + prometryn	1,60

In volgende tabel staan de verwachte concentraties ($\mu\text{g/l}$) voor de individuele verbindingen, de gevonden concentraties ($\mu\text{g/l}$) na correcties en het percentage kruisreactiviteit (%) van de triazines apart.

Triazine	Verwachte concentratie ($\mu\text{g/l}$)	Gevonden concentratie ($\mu\text{g/l}$)	Kruisreactiviteit (%)
Atrazine	0,47	0,44 (B - A)	94
Propazine	0,48	0,41 (C - B)	86
Terbutylazine	0,47	0,06 (D - C)	13
Prometryn	0,53	0,57 (E - D)	107

In onderstaande tabel staan de concentraties ($\mu\text{g/l}$) van de triazines bij 50 % B/B0 volgens de bijsluiter en het berekende percentage kruisreactiviteit (%).

Berekende percentages kruisreactiviteit:

Triazine	50 % B/B0 ($\mu\text{g/l}$)	% Kruisreactiviteit
Atrazine	0,72	100
Propazine	0,74	97
Terbutylazine	15,5	4,6
Prometryn	0,64	113

Het blijkt, dat de berekende kruisreactiviteit voor de gemeten triazines vergelijkbaar is met die, welke in de kitbijsluiter gegeven worden.

II.1.3 Isoproturon

De isoproturonkit is heel specifiek voor deze verbinding. De standaard is in dit geval isoproturon zelf.

II.1.3.1 Detectielimiet

Vergelijkbaar met de voorgaande immunoassays werden de detectielimieten berekend op 90% B/B0 en volgens de logit-log transformatie en vergeleken met die in de kitbijsluiter.

	Concentratie ($\mu\text{g/l}$)
90 % B/B0 ¹	0,02
D.L ¹	0,01
85 % B/B0 (bijsluiter)	0,02

¹ de gemiddelde waarde genomen van de assays (n = 6).

De in de kitbijsluiter vermelde laagst detecteerbare concentratie is genomen bij 85% B/B0, hetgeen niet gebruikelijk is. De overeenkomstige concentratie is vergelijkbaar met de berekende detectielimieten bij 90% B/B0. De met de logit-log transformatie berekende detectielimiet voor waarnemingen in triplo lag in dit geval uiterst laag.

II.1.3.2 Intra-assay variatie

De intra-assay variatie van de isoproturonkit is in totaal vier keer bepaald met vier verschillende monsters, namelijk:

- 1 - Stowa "hoog" 10 keer verdund in blanco ongefiltreerd
10 ml Stowa "hoog" + 90 ml Stowa "blanco".
- 2 - Stowa "laag" gefiltreerd
Stowa "laag" gefiltreerd over een 0,45 μm filter

3 - Stowa "laag" ongefiltreerd

4 - Stowa "hoog" 3 keer verdund in leidingwater ongefiltreerd
1 ml Stowa "hoog" + 2 ml leidingwater.

Dit is in vier verschillende assays gedaan. In onderstaande tabel staan de berekende waarden.

Berekende % intra-assay variatiecoëfficiënt:

Monster	N	Gemiddelde waarde (µg/l)	Standaard deviatie (µg/l)	C.V. (%)
1	5	0,10	0,01	9,1
2	5	0,22	0,01	4,1
3	5	0,24	0,01	5,3
4	5	0,31	0,01	2,8

Uit deze tabel blijkt, dat het % C.V. voor de intra-assay variatie voor een ELISA met alle vier de monsters zeer acceptabel is.

II.1.3.3 *Lineariteit*

De lineariteit van de isoproturonkit is 2 keer bepaald met een verdunningsreeks van Stowa "hoog" verdund in leidingwater en in Stowa "blanco" water.

Verdunningsreeks:

A: Stowa "hoog" onverdund

B: 1 ml A + 1 ml Stowa "blanco" of leidingwater (2 keer verdund)

C: 1 ml B + 1 ml Stowa "blanco" of leidingwater (4 keer verdund)

D: 1 ml C + 1 ml Stowa "blanco" of leidingwater (8 keer verdund)

E: 1 ml D + 1 ml Stowa "blanco" of leidingwater (16 keer verdund)

In onderstaande tabel staan de verwachte waarden en de gevonden waarden ($\mu\text{g/l}$).

Oplossing	Verwachte waarde ($\mu\text{g/l}$) B/L	Gevonden waarden ($\mu\text{g/l}$)	
		Stowa "blanco"	leidingwater
A I = 0,77 $\mu\text{g/l}$ D = 0,79 $\mu\text{g/l}$	0,79/0,77	0,64	0,64
B	0,41/0,39	0,52	0,42
C	0,21/0,19	0,21	0,22
D	0,12/0,10	0,11	0,11
E	0,07/0,05	0,07	0,06
blanco	0,02/0	0,02	niet gemeten

I = isoproturon; D = diuron; B = Stowa-blanco; L = leidingwater.

Wanneer de gevonden resultaten tegen elkaar worden uitgezet in een lijn ($Y = aX + b$) met op de x-as de verwachte waarden ($\mu\text{g/l}$) en op de y-as de gevonden waarden ($\mu\text{g/l}$) dan worden de volgende lijnen gevonden:

Stowa "blanco":

$$Y = 0,85 X + 0,03 \text{ met als correlatiefactor } 0,9609$$

Leidingwater:

$$Y = 0,81 X + 0,05 \text{ met als correlatiefactor } 0,9876$$

De correlatie tussen verwachte en gevonden waarden is goed. Zeker in het lage concentratiegebied komen deze waarden praktisch overeen. Opgemerkt moet worden, dat de hoogste concentraties buiten het bereik van de ijklijn liggen en daardoor af kunnen wijken.

II.1.3.4 Inter-assay variatie

De inter-assay variatie is met twee verschillende monsters bepaald. Deze monsters werden elke assay meegemeten.

Deze twee monsters waren:

- 1 - Stowa "hoog" 10 keer verdund in Stowa "blanco" (10 ml Stowa "hoog" + 90 ml Stowa "blanco").
- 2 - Stowa "laag" ongefiltreerd.

In onderstaande tabel staan de gevonden waarden ($\mu\text{g/l}$).

Assay	Stowa "hoog" 10 * verd. (µg/l)	Stowa "laag" (µg/l)
1ste keer	0,11	niet gemeten
2de keer	0,09	0,22
3de keer	0,10	0,25
4de keer	0,10	0,23
5de keer	0,13	0,25 gem ¹
6de keer	0,13	0,28
Gemiddelde	0,11	0,24
SD	0,01	0,02
CV (%)	11,5	9,4

¹ In deze assay is de ook intra-assay variatie van Stowa "laag" bepaald en hiervan is het gemiddelde genomen.

Het blijkt dat de inter-assay variatie in deze kit heel acceptabel is.

II.1.3.5 Recovery

Om iets over de recovery te zeggen is er aan drie watertypen een bepaalde hoeveelheid isoproturon (kitstandaard) toegevoegd. Om vergelijkbare matrices te verkrijgen is niet alleen de waterblanco gemeten, maar ook de waterblanco die op dezelfde manier als de geaddeerde monsters verdund was met 0-standaard.

De gemeten monsters waren als volgt:

A: blanco: Stowa "blanco", Maas-Waalkanaalwater en slootwater zonder toevoegingen.

B: blanco + 0 ppb: 800 µl van A + 200 µl 0 ppb kitstandaard.

C: blanco + 0,1 ppb: 800 µl van A + 200 µl 0,5 ppb kitstandaard.

In onderstaande tabel de gevonden waarden (µg/l) weergegeven.

Oplossing	Stowa (Rijn)	Maas-Waalkanaalwater	Sloot
Blanco	<0,01	0,11	0,02
Blanco + 0 ppb	<0,01	0,09	0,02
Blanco + 0,1 ppb	0,13	0,18	0,12
Blanco + 0,1 - blanco 0 ppb	0,13	0,09	0,10
Recovery (%)	130	90	100

De recovery van isoproturon ligt in de buurt van de 100%. Uit de tabel blijkt echter, dat in Maaswater een achtergrondhoeveelheid van isoproturon aanwezig is.

II.1.3.6 *Effect van filtratie*

Om te bepalen of een voorbehandeling zoals filtreren effect heeft op de isoproturonbepaling zijn er drie verschillende watertypes (Rijn [Stowa], Maas-Waalkanaalwater en slootwater) geaddeerd en ongeaddeerd zowel gefiltreerd als ongefiltreerd gemeten met de isoproturonkit.

In onderstaande tabel staan de verwachte waarden en de gevonden waarden ($\mu\text{g/l}$).

De verwachte waarde is de toegevoegde concentratie van isoproturon, omdat volgens de bijsluiter deze kit zeer specifiek is voor isoproturon.

Effect van voorbehandeling:

Watertype	Ongefiltreerd ($\mu\text{g/l}$)	Gefiltreerd ($\mu\text{g/l}$)
Rijnwater (0,077 $\mu\text{g/l}$)	0,09	0,09
Rijnwater (blanco)	<0,01	<0,01
Maas-Waalkanaalwater (0,077 $\mu\text{g/l}$)	0,16	0,15
Maas-Waalkanaalwater (blanco)	0,09	0,08
Slootwater (0,077 $\mu\text{g/l}$)	0,10	0,10
Slootwater (blanco)	<0,01	<0,01

Uit de gevonden waarden blijkt dat een voorbewerking zoals filtratie geen verschillen in resultaten geeft. Wat opvalt is dat de recovery zoals hieruit berekend kan worden voor de Rijn- en Maasmonster opnieuw ongeveer 100% is, terwijl die voor slootwater iets hoger ligt. Bovendien blijkt ook nu weer, dat in de Maas waarschijnlijk isoproturon aanwezig is.

II.1.3.7 *Effect van bezinken*

Om na te gaan of een voorbehandeling zoals bezinken invloed heeft op de isoproturonbepaling is Maas-Waalkanaalwater geaddeerd en ongeaddeerd zowel bezonken als geschud gemeten. Het geaddeerde monster is:

Stowa "hoog" 10 keer verdund in Maas-Waalkanaalwater
(10 ml Stowa "hoog" + 90 ml Maas-Waalkanaalwater).

In de onderstaande tabel staan de gevonden waarden ($\mu\text{g/l}$)

Monster	Bezonken ($\mu\text{g/l}$)	Geschud ($\mu\text{g/l}$)
Maas-Waalkanaalwater (0,077 $\mu\text{g/l}$)	0,18	0,18
Maas-Waalkanaalwater (blanco)	0,12	0,10

Ook nu weer heeft de voorbehandeling geen effect op het resultaat.

II.1.4 Cyclodiënen

II.1.4.1 *Uitvoering van de immunoassay*

Omdat de kit voor de bepaling van cyclodiënen anders was dan aangegeven in de module, namelijk een microtiterplaat-kit in plaats van een buizenkit, staat de werkwijze hieronder in detail beschreven.

De immunoassaykit voor cyclodiënen in microtiterplaatuitvoering is verkrijgbaar bij millipore, Penningweg 33, Postbus 166, 4870 AD Etten-Leur. De produktcode is ENVR P00 05.

a) Benodigde materialen

Naast de in de kit geleverde materialen zijn nodig:

- pipet voor een volume van 10 μl , 80 μl , 200 μl , 250 μl , 750 μl , 800 μl en 990 μl .
- kraanwater of gedestilleerd water
- microtiterplaatreader

Alle materialen behalve de reader zijn normaal aanwezig op het lab. Voor de reader zie module 1.

b) Uitvoering van de test:

In de kit worden de volgende materialen geleverd:

- 8 met antilichaam beklede strips met elk 12 putjes
- 1 flesje met 0-standaard
- 1 flesje met 10 mg/ml chloordaan
- 1 flesje chloordaan-enzym-conjugaat
- 1 flesje substraat
- 1 flesje chromogeen
- 1 flesje stopoplossing

N.B. Voor het gebruik moeten alle materialen op omgevingstemperatuur gebracht worden. Maak de verdunningen van de standaarden vlak voor de assay omdat chloordaan adsorbeert aan glas en plastic.

De assay omvat de volgende stappen:

- verdunnen van de standaard 10 mg/ml chloordaan tot 1, 5, 25 en 100 µg/l met water van labkwaliteit
- toevoegen in achtereenvolgende putjes van de strips in duplo/triplo van 80 µl standaarden of monsters
- toevoegen van 80 µl (2 druppels) enzymconjugaat
- goed mengen
- bedekken met parafilm
- 1 uur incuberen
- krachtig decanteren van de inhoud van de putjes
- 5 keer wassen van de putjes met stromend water
- toevoegen van 80 µl (2 druppels) substraat
- toevoegen van 40 µl (2 druppels) chromogeen
- goed mengen
- bedekken met parafilm
- 30 minuten incuberen
- toevoegen van 40 µl (1 druppel) stopoplossing
- goed mengen
- meten van de absorptie bij 450 nm
- berekenen van de standaardcurve en aan de hand daarvan de concentraties van de monsters.

De assay is een competitieve ELISA vergelijkbaar met die van de fenylureumherbiciden-kit. Voor het principe van de reactie zie module 1. De berekening geschiedt op dezelfde manier als vermeld in module 1.

c) Duur van de assay

Bij gebruik van een volle microtiterplaat (8 strips) zijn 96 putjes beschikbaar. Naast de standaarden kunnen dan 27 watermonsters in triplo gemeten worden. Bij een lager monsteraanbod kan de kit ook 2 of meer keren gebruikt worden, waarbij echter het totale aantal monsters relatief minder wordt omdat elke keer de standaarden meegenomen moeten worden. Een assay neemt inclusief berekeningen in totaal ongeveer 4 uur in beslag.

d) Relevante parameters

De cyclodiënenkit is een groepspecifieke kit voor de kwalitatieve detectie van cyclodinen. De standaard in de kit is chloordaan en heeft volgens de bijsluiter een detectielimiet van 5 µg/l chloordaan, bepaald bij 90 % B/B₀. Andere verbindingen uit deze groep kunnen echter gedetecteerd worden in lagere concentraties. Deze gegevens zijn weergegeven in de volgende tabel. Aan de hand van de 50% B₀ waarden zijn ook de percentages kruisreactiviteit berekend.

<u>Verbinding</u>	<u>50%B₀</u>	<u>90%B₀ d.l. (µg/l)</u>	<u>% Kruisreactiviteit</u>
Aldrin	84	17	36
Chloordaan	30	5	100
Dieldrin	27	2	111
Endosulfan	6	0,6	500
Endrin	3	0,15	1000
Heptachloor	33	4	91

Het meetbereik voor chloordaan is 5 - 100 µg/l, terwijl volgens de kitbijsluiter de detectielimiet voor de verschillende cyclodienenverbindingen verschilt van 0,15 - 17 µg/l (extrapolatie). Meer gegevens worden niet in de bijsluiter van de kit vermeld. Omdat er met deze kit geen eerder praktijkonderzoek werd uitgevoerd, zijn ook geen eigen gegevens bekend.

II.1.4.2 Detectie limiet

De berekening van de detectielimiet werd gedaan op dezelfde manier als voor de andere kits.

	Concentratie (µg/l)
90 % B/B0 ¹	3,6
D.L ¹	1,0
90 % B/B0 (bijsluiter)	5,0

¹ De gemiddelde waarde genomen van de assays (n = 6).

Het blijkt dat de laagst detecteerbare concentratie voor triplometingen aanzienlijk lager ligt dan die, welke gegeven wordt in de bijsluiter. De detectielimiet bij 90% B/B0 is slechts iets lager.

II.1.4.3 Intra-assay variatie

De intra-assay variatie van de Cyclodiënenkit is in totaal drie keer bepaald met drie verschillende monsters, namelijk:

- 1 - Maas-Waalkanaalwater + 2 µg/l, 4 keer verdund in Maas-Waalkanaalwater (ongefiltreerd)
(500 µl Maas-Waalkanaalwater 2 µg/l + 1500 µl blanco Maas-Waalkanaalwater).
- 2 - Maas-Waalkanaalwater + 2 µg/l (ongefiltreerd)
- 3 - Maas-Waalkanaalwater + 20 µg/l (gefiltreerd)
(Maas-Waalkanaalwater + 20 µg/l gefiltreerd over een 0,45 µm filter)

In onderstaande tabel zijn de resultaten en de berekende waarden weergegeven.

Monster	N	Gemiddelde waarde (µg/l)	Standaard deviatie (µg/l)	C.V. (%)
1	5	4,8	0,8	16,3
2	5	12,2	1,4	11,3
3	5	66,5	2,1	3,2

De berekende intra-assay variatie is bij een lage concentratie redelijk hoog; bij hoge concentratie is deze variatie heel acceptabel.

II.1.4.4 Lineariteit

De lineariteit van de cyclodiënenkit is 3 keer bepaald met drie verschillende monsters waar verdunningsreeksen van gemaakt zijn.

Monster 1.

- A: Maas-Waalkanaalwater + 20 µg/l gefiltreerd
- B: 1 ml A + 1 ml leidingwater (2 keer verdund)
- C: 1 ml B + 1 ml leidingwater (4 keer verdund)
- D: 1 ml C + 1 ml leidingwater (8 keer verdund)
- E: 1 ml D + 1 ml leidingwater (16 keer verdund)

Monster 2.

- F: Waalwater + 20 µg/l ongefiltreerd
- G: 1 ml F + 1 ml Waalwater ongefiltreerd (2 keer verdund)
- H: 1 ml G + 1 ml Waalwater ongefiltreerd (4 keer verdund)
- I: 1 ml H + 1 ml Waalwater ongefiltreerd (8 keer verdund)
- J: 1 ml I + 1 ml Waalwater ongefiltreerd (16 keer verdund)

Monster 3.

- K: Maas-Waalkanaalwater + 2 µg/l ongefiltreerd
- L: 1 ml K + 1 ml Maas-Waalkanaalwater ongefiltreerd (2 keer verdund)
- M: 1 ml L + 1 ml Maas-Waalkanaalwater ongefiltreerd (4 keer verdund)
- N: 1 ml M + 1 ml Maas-Waalkanaalwater ongefiltreerd (8 keer verdund)
- O: 1 ml N + 1 ml Maas-Waalkanaalwater ongefiltreerd (16 keer verdund)

In onderstaande tabellen staan de verwachte waarden en de gevonden waarden.

Oplossing	Toegevoegd (µg/l per stof)	Verwachte concentratie (µg/l)*	Gevonden waarden (µg/l)	
			leidingwater	Waalwater
A en F	20,0	348	20,4	34,4
B en G	10,0	174	13,1	20,1
C en H	5,0	87	7,1	12,8
D en I	2,5	43	3,8	9,3
E en J	1,25	22	2,8	6,8

* De hier vermelde concentratie is berekend aan de hand van de percentages kruisreactiviteit van de relevante toegevoegde verbindingen. Er is geen rekening gehouden met een eventuele achtergrondwaarde.

Oplossing	Toegevoegd (µg/l per stof)	Verwachte concentratie (µg/l)	Gevonden waarden (µg/l)
K	2,0	35	9,8
L	1,0	17,4	6,4
M	0,5	8,7	5,7
N	0,25	4,3	4,1
O	0,13	2,2	3,7

* zie hierboven

Wanneer de gevonden resultaten tegen elkaar worden uitgezet in een lijn ($Y = aX + b$) met op de x-as de verwachte waarden (µg/l) en op de y-as de gevonden waarden (µg/l) dan worden de volgende lijnen gevonden:

Monster 1:

$$Y = 0,05 X + 2,1 \text{ met als correlatiefactor } 0,9919$$

Monster 2:

$$Y = 0,08 X + 5,4 \text{ met als correlatiefactor } 0,9997$$

Monster 3:

$$Y = 0,18 X + 3,5 \text{ met als correlatiefactor } 0,9888$$

Blijkbaar is de lineariteit in deze assay heel goed. Wat opvalt is dat:

- de gevonden concentraties veel lager zijn dan verwacht;
- er duidelijk effect is van het filtreren van het water, waarbij de concentraties na filtratie lager zijn;
- opvallend is verder dat monster 1 een helling heeft van praktisch 0,96 wanneer geen rekening wordt gehouden met de kruisreactiviteit van de diverse verbinding.

Het feit dat lagere concentraties worden gevonden dan verwacht kan het resultaat zijn van enerzijds adsorptie aan de wand van de fles en de verdunningsbuizen, anderzijds speelt ook de oplosbaarheid van de verbindingen een rol. De cyclodiënen zijn slecht of nauwelijks oplosbaar in een waterige oplossing.

II.1.4.5 *Inter-assay variatie*

De inter-assay variatie is met twee verschillende monsters bepaald. Deze monsters werden in elke assay meegemeten.

Deze twee monsters waren:

- 1 - Maas-Waalkanaalwater + 2 µg/l ongefiltreerd.
- 2 - Maas-Waalkanaalwater + 20 µg/l gefiltreerd
(Maas-Waalkanaalwater + 20 µg/l gefiltreerd over een 0,45 µm filter).

In onderstaande tabel staan de gevonden concentraties en de berekende waarden.

Assay	Maas-Waalkanaalwater + 2 µg/l. (µg/l)	Maas-Waalkanaalwater + 20 µg/l (µg/l)
1ste keer	niet gemeten	niet gemeten
2de keer	7,2	niet gemeten
3de keer	10,9	20,4
4de keer	21,2	34,8
5de keer	35,4	68,7
6de keer	9,8	niet gemeten
7de keer	14,0	25,1
Gem.	16,4	37,3
SD	9,6	18,9
CV (%)	58	51

De hier berekende inter-assay variatie is heel hoog. Er kan geen conclusie getrokken worden over de oorzaak hiervan. Het is namelijk heel goed mogelijk dat het bewaren en hanteren van het monster van grote invloed is op de gevonden waarden. Voor de bepaling van de inter-assay variatie werd steeds van dezelfde twee monsters uitgegaan (een soort eigen controle). Omdat cyclodiënen zeer apolair zijn, kan er adsorptie optreden aan de wand van de buis. Door vóór gebruik meer of minder hard te schudden zou mogelijk meer of minder van de verbindingen terug in oplossing kunnen komen. Gezien de stabiliteit van de cyclodiënen is het niet waarschijnlijk dat ze in de tussentijd afgebroken worden. Mogelijk kan door strikte standaardisering van de omstandigheden van bewaren en hanteren deze spreiding verlaagd worden.

II.1.4.6 Recovery

Om iets over de recovery te zeggen is er aan Waalwater een bepaalde hoeveelheid chloordaan (kistandaard) toegevoegd. Opgemerkt moet worden dat deze kitstandaard een oplossing van chloordaan in vrij hoge concentratie in methanol is.

Waalwater + 10 ppb:

er is 10 µl van 10 mg/ml chloordaan kitstandaard bij 990 µl Waalwater gepipetteerd, hiervan is 100 µl bij 900 µl Waalwater gepipetteerd.

Waalwater + 0 ppb:

er is 10 µl methanol bij 990 µl Waalwater gepipetteerd, hiervan is 100 µl bij 900 µl Waalwater gepipetteerd.

In onderstaande tabel staan de gevonden waarden en de berekende waarden.

Oplossing	Gevonden waarden ($\mu\text{g/l}$)
Waalwater blanco	3,4
Waalwater + 0 ppb	3,4
Waalwater + 10 ppb	15,0
Waalwater + 10 ppb - 0 ppb	11,6
Recovery (%)	116

De recovery van chloordaan is vrij goed. 1% methanol heeft blijkbaar geen invloed op de gevonden waarde. Gezien het feit dat de monsters na additie nog minimaal 24 uur geëquilibreerd zijn, duiden de bovenstaande resultaten erop dat methanol blijkbaar een gunstige invloed heeft op eventuele adsorptie van chloordaan aan de wand van de buis.

De achtergrondconcentratie in Waalwater is blijkbaar ongeveer 3 $\mu\text{g/l}$.

II.1.4.7 *Effect van filtratie*

Om te kijken of een voorbehandeling zoals filtreren effect heeft op de cyclodiënenbepaling zijn er drie verschillende watertypes (Waal, Maas-Waalkanaalwater en slootwater) geaddeerd en ongeaddeerd zowel gefiltreerd als ongefiltreerd gemeten met de cyclodinenkit.

In onderstaande tabel staan de gevonden waarden ($\mu\text{g/l}$).

Watertype	Ongefiltreerd ($\mu\text{g/l}$)	Gefiltreerd ($\mu\text{g/l}$)
Waalwater (20,00 $\mu\text{g/l}$)	73,3	33,4
Waalwater (blanco)	5,8	8,0
Maas-Waalkanaalwater (20,00 $\mu\text{g/l}$)	68,5	34,8
Maas-Waalkanaalwater (blanco)	3,9	8,4
Slootwater (20,00 $\mu\text{g/l}$)	77,4	52,5
Slootwater (blanco)	4,3	14,0

Uit deze tabel kan geconcludeerd worden dat filtreren een vrij grote invloed heeft op de gevonden waarden. Geaddeerde monsters vertonen na filtratie een veel lagere waarde, terwijl de blanco monsters in concentratie omhoog gaan. Dit verschijnsel werd ook reeds gezien met de andere kits. Zeer waarschijnlijk wordt door filtratie een groot gedeelte van de geaddeerde verbindingen verwijderd samen met vaste deeltjes. Het is wel bekend dat cyclodiënen door hun apolariteit aan vaste deeltjes gebonden worden. In de blanco monsters neemt daarentegen de concentratie toe na filtreren. Mogelijk is dit het gevolg van de verwijdering van vaste deeltjes die storen in de assay. Ook nu weer reageren geaddeerde monsters anders dan natuurlijke monsters.

BIJLAGE III HPLC FINGERPRINT METHODEN

III.1 HPLC-apparatuur en -condities

Voor de keuze van HPLC-condities is gebruik gemaakt van de gegevens uit de vakliteratuur (zie onder andere de referenties uit het overzicht van de met HPLC/DAD meetbare bestrijdingsmiddelen, Bijlage 1) en eigen ervaringen bij het laboratorium van Kiwa. Er is gebruik gemaakt van de bij Kiwa operationele methodiek gebaseerd op on-line concentrering en HPLC-analyse.

Een schematische voorstelling van de gebruikte opstelling is weergegeven in Figuur III.1. Dit is dezelfde configuratie die ook bij andere door Kiwa (mede-) ontwikkelde methoden is toegepast: N-methylcarbamaten, dinitrofenolen, glyfosaat en AMPA, diverse mengsels van bestrijdingsmiddelen [Noij en Brandt, 1995].

Als HPLC-instrument is een LC-250 binaire pomp van Perkin Elmer gebruikt, gekoppeld aan een Waters UV-Vis Diode Array Detector Type 996, waarmee UV-spectra worden opgenomen in het golflengtebereik van 200 tot 300 nm. De bandbreedte is 4,8 nm en de opnamefrequentie is 1 scan/s. Er is steeds een achtergrondcorrectie van het UV-spectrum uitgevoerd.

Alle monsters worden eerst handmatig gefiltreerd over een 0,45 µm Spartan 30/B geregeneerd cellulosefilter en vervolgens in 20 ml vials geplaatst in de autosampler (Gilson 401-232). Door de sampler wordt 15 ml van het monster over de concentreringskolom geleid. Deze concentreringskolom (10 mm lengte x 2 mm i.d., gevuld met PLRP-S adsorbens (15-25 µm)) is geïnstalleerd op de HPLC-injectiekraan als vervanging van de monsterlus. Na belading wordt deze PLRP-kolom, eveneens door de sampler, gespoeld met 1 ml water met 5 % acetonitril teneinde anorganisch materiaal te verwijderen en tevens een deel van het storende humeuze materiaal. Daarna wordt de PLRP-kolom in de eluensstroom geschakeld, waarbij de geadsorbeerde componenten in tegenstroom van de kolom geëluëerd worden naar de analytische kolom (Inertsil ODS-80A van 250 mm lengte en 4,6 mm id, met een deeltjesgrootte van 5 µm), waar de componenten gescheiden worden. Het gebruikte eluens-programma is weergegeven in Tabel III.1.

Na de laatste stap volgt een regeneratiestap met 100% KH_2PO_4 -oplossing (1 g/l) gedurende 4 minuten en gaat vervolgens het eluens in 15 minuten terug naar de oorspronkelijke samenstelling.

Tabel III.1 *Eluensprogramma: tijdsduur van het betreffende deel van het eluensprogramma, de eluensflow en de samenstelling van het eluens, uitgedrukt als %A (water) en %B (acetonitril)*

tijdsduur (min)	flow (ml/min)	%A (H ₂ O)	%B (ACN)
10	0,7	90	10
40	0,7	20	80
2	0,7	0	100
6	1,0	0	100
2	1,0	100	0
2	1,0	100	0

III.2 Resultaten Somparameter

De definitie van de somparameter, alsmede een aantal alternatieve mogelijkheden, worden in de hoofdttekst van deze rapportage besproken (Hoofdstuk 3). Ook een overzicht van de gehanteerde modelmonsters is in de hoofdttekst opgenomen. Een uitgebreid overzicht van de behaalde resultaten, op deelaspecten, wordt hieronder gegeven.

III.2.1 Herhaalbaarheid

De somparameter PS_m is in 6-voud bepaald in één van de door de begeleidingscommissie geselecteerde watermonsters (Rho 98 van Zuiveringschap West-Overijssel "Einde Honden Wetering"). Behalve de HPLC/UV-pieksom is ook het totaalgehalte detecteerbaar organisch materiaal ($TDOM_m$) bepaald. De resultaten zijn in onderstaande tabel weergegeven.

Tabel III.2 Herhaalbaarheid van de pieksom (PS) en van het totaalgehalte detecteerbaar organisch materiaal (TDOM). Gemeten waarde van PS en TDOM in μVs . Tussen haakjes is het equivalente gehalte atrazin weergegeven ($\mu g/l$)¹⁾.

Parameter	waarde ($\times 10^3 \mu Vs$)	rsd (%)
PS_m	1006 (5,9)	5,3
$TDOM_m$	33836 (199)	3,6
$PS_m/TDOM_m$	0,0298	8,2

1) 1 $\mu g/l$ atrazin komt overeen met $170 \times 10^3 \mu Vs$.

De herhaalbaarheid van zowel PS als van TDOM is beter dan 6%, hetgeen voor een chromatografische analyse een gangbare waarde is. Voor de relatieve pieksom wordt een iets hogere waarde gevonden, die evenwel nog steeds lager is dan 10%. De hogere waarde geeft aan dat de variaties in PS en TDOM onafhankelijk zijn.

Overigens is geconstateerd dat bij de bepaling van TDOM de vorm van de "bult" mede van invloed is op hoe nauwkeurig deze parameter bepaald kan worden.

III.2.2 Blanco's En Memory-Effect

In het onderzoek is per meetserie steeds tenminste één blanco HPLC-run meegenomen. Typische blancowaarden voor PS (PS_{bl}) en TDOM ($TDOM_{bl}$) zijn (referentie: blancorun 22 december 1995):

$$PS_{bl} = 26 \times 10^3 \mu Vs$$
$$TDOM_{bl} = 342 \times 10^3 \mu Vs$$

en zijn daarmee slechts enkele %'en van de parameters in praktijkmonsters.

Voor analyses direct na een praktijkmonster worden geen verhoogde waarden gevonden, zodat gesteld kan worden dat het memory-effect nihil is.

III.2.3 Somparameter Voor Verschillende Watertypen

De HPLC/UV-pieksom is bepaald voor de in Tabel III.3 vermelde watertypen, welke door de begeleidingscommissie zijn aangeleverd. Ter vergelijking is tevens Lekkanaalwater toegevoegd. Ook zijn hier de waarden voor TDOM opgenomen en de relatieve pieksom $PS/TDOM$.

Tabel III.3 PS en TDOM voor de verschillende watertypes.

Watertype	PS ($\times 10^3 \mu\text{Vs}$)	TDOM ($\times 10^3 \mu\text{Vs}$)	PS/TDOM
Blanco HPLC-run	26	342	0,076
Blanco MilliQ	41	388	0,106
Lekkanaal (Kiwa; 13 nov.)	722	7777	0,093
Lekkanaal (Kiwa; 29 nov.)	540	7288	0,074
Rho 38 (ZWO)	2048	57192	0,036
Rho 98 (ZWO)	1314	33187	0,040
Rho 65 (ZWO)	988	25280	0,039
ROP 5307 (Rijnland)	607	44968	0,013
ROP 040A07 (Rijn- land)	542	39614	0,014
Humusrijk (US)	823	63105	0,013
Effluent-arm (US)	338	8085	0,042
Effluent-rijk (US)	760	22870	0,033

Hoewel er van deze monsters geen aanvullende waterkwaliteitsparameters beschikbaar waren voor dit onderzoek, is wel vastgesteld dat de twee meest kenmerkende monsters, te weten Humusrijk (US) en Effluent-rijk (US) ten aanzien van de organische verontreiniging zeer verschillend zijn: de eerste nauwelijks verontreinigd, de tweede sterk(er).

Uit het overzicht blijkt dat de absolute piekensom (PS) als parameter niet in staat is om voor sterk uiteenlopende watertypen een indicatie te geven van de mate van verontreiniging. De relatieve piekensom (PS/TDOM) lijkt hiervoor beter geschikt te zijn: er is een significant verschil tussen de waarden voor humusrijk water met een geringe mate van verontreiniging (PS/TDOM = 0,013) en bijvoorbeeld effluent-rijk water (PS/TDOM = 0,033). Bij de beoordeling hiervan speelt echter de samenstelling van het onderzochte water een cruciale rol: zo zal voor effluent-rijk water, waarbij de samenstelling van het effluent vooral gekenmerkt wordt door de biologische zuivering van rioolwater, een lage PS-waarde gemeten worden en een hoge TDOM-waarde, waardoor een zeer lage PS/TDOM-waarde resulteert, terwijl effluent-arm water, afkomstig van een industrieel proces, een hoge PS-waarde hebben en een lage TDOM, en dienovereenkomstig een hoge PS/TDOM-waarde. Voor de interpretatie van PS, TDOM en PS/TDOM is kennis van de herkomst en belasting van het water noodzakelijk. Vergelijkbare watertypen kunnen dan met behulp van de PS-waarde en de PS/TDOM-waarde gekarakteriseerd worden.

Aanvullend betekent dit dat PS en PS/TDOM voor hetzelfde monsterpunt als indicator voor een toe- of afname van verontreiniging gebruikt kunnen worden. Hiervoor moeten dan voor elk monsterpunt referentiewaarden bepaald worden, waaraan actuele meetwaarden getoetst kunnen worden. Bij een indicatie van een verslechtering van de kwaliteit kan, al dan niet met aanvullend chemisch onderzoek, ingegrepen worden.

Op dit moment zijn voor de beoordeling van afvalwater en van diverse typen oppervlaktewater met deze meetmethode nog onvoldoende referentiegegevens beschikbaar.

Om te beoordelen of een aangepaste verwerking van de HPLC/DAD-gegevens een beter onderscheid tussen wel en niet belast oppervlaktewater van zeer verschillende herkomst mogelijk maakt, zijn opnieuw analyses van humusrijk water en effluent-rijk water uitgevoerd, waarbij PS en TDOM zijn bepaald bij verschillende golflengtes (215, 244 en 280 nm), en tevens het aantal discrete pieken in de beoordeling is betrokken (aantal pieken met een equivalente concentratie groter dan 0,01 µg/l atrazin ($n_{>0,01}$) respectievelijk groter dan 0,1 µg/l atrazin ($n_{>0,1}$)). Deze gegevens zijn vermeld in Tabel III.4 en Tabel III.5.

Tabel III.4 *Vergelijking van humusrijk water en effluent-rijk water aan de hand van PS en PS/TDOM bij verschillende golflengtes.*

l(nm)	humusrijk			effluent-rijk		
	PS	TDOM	PS/T-DOM	PS	TDOM	PS/TDOM
215	970	35200	0,028	900	12800	0,070
244	290	20900	0,014	470	7300	0,064
280	200	12800	0,016	200	4500	0,044

Tabel III.5 *Vergelijking van humusrijk water en effluent-rijk water aan de hand van $n_{>0,01}$ en $n_{>0,1}$ bij verschillende golflengtes.*

l(nm)	humusrijk		effluent-rijk	
	$n_{>0,01}$	$n_{>0,1}$	$n_{>0,01}$	$n_{>0,1}$
215	41	16	51	14
244	49	29	60	43
280	51	43	68	60

Hoewel er bij de diverse golflengtes verschillen optreden voor de geselecteerde parameters, geeft dit niet een beter onderscheidend vermogen ten aanzien van de verontreinigingsgraad voor beide watertypen. Omdat de gevoeligheid van de meting bij 215 nm het grootst is en deze golflengte ook de voorkeur heeft bij de doelstofanalyse (zie paragraaf 3.3) worden voornamelijk PS en PS/TDOM bij 215 nm voorgesteld als indicatieve somparameter.

Bij het vergelijkingsonderzoek van praktijkmonsters en gespikete monsters (Hoofdstuk 4) wordt nog uitgebreid teruggekomen op deze somparameter.

In Figuur III.2a, III.2b, en III.2c zijn chromatogrammen weergegeven van een praktijkmonster (Rho 98), Lekkanaal en een blanco ultrazuiver water (MilliQ).

III.2.4 Beoordeling Chromatogrammen

Beoordeling van de chromatogrammen van de 8 onderzochte praktijkwaters leverde het volgende overzicht op voor wat betreft de (mogelijke) aanwezigheid van de 11 doelstoffen. Ook waren in de watermonsters enkele verbindingen aanwezig die een kenmerkend UV-spectrum hadden, en in verschillende watertypen aanwezig waren. Een overzicht van de aanwezigheid van de 11 doelstoffen is weergegeven in Tabel III.6 (concentraties zijn grootte-orde indicaties), een overzicht van de onbekende verbindingen in Tabel 3.8. Uit Tabel 3.8 volgt dat een vrij groot aantal verbindingen wijd verbreid voorkomt in uiteenlopende oppervlaktewateren.

Tabel III.6 Aanwezigheid van de 11 doelstoffen in de ten behoeve van de somparameter onderzochte praktijkmonsters. Aanwezigheid op basis van de overeenstemming tussen retentietijden en UV-spectrum. Concentraties in $\mu\text{g/l}$ zijn indicatief.

component	rho3 8	rho9 8	rho6 5	rop 5307	rop- 040- a07	hu- mus - rijk	effl. arm	effl. rijk
mevinfos-tr								
chloridazon								
carbendazim				0,5				
mevinfos-c				0,1 ?				
simazin					1			
metribuzin								
pirimicarb								
atrazin							0,04	
diuron	0,2	0,1	0,1		0,2		0,07	0,3
metolachloor								
vinclozolin								

Tabel III.7 Aanwezige onbekende verbindingen met kenmerkend UV-spectrum dan wel in meerdere monsters voorkomend. Piekhogtes zijn uitgedrukt in $10^3 \mu V$ en zijn grootte-orde indicaties (ter vergelijking: voor atrazin geldt dat een piekhoogte van $10 \times 10^3 \mu V$ overeenkomt met $0,6 \mu g/l$).

component retentietijd	rho3 8	rho9 8	rho6 5	rop 5307	rop- 040- a07	hu- mus - rijk	effl. arm	effl. rijk
18,24 *	14	0,3	10			10	0,5	0,5
25,61 **	8 ¹⁾	0,5	6	1	1	8	5	5
26,17 **						1	1	1
26,94 *	6 ¹⁾	2	4			6	0,3	2
27,87 **	5	0,5	3					2
29,14 *	2		1			0,4	0,4	
29,98				0,6	0,4		0,2	0,2
31,61	1	0,5	0,5					1
32,52 *	1	0,8	0,5			1	0,5	0,8
33,89 **	4		4	3	4	5	5	4
34,87 **	3		0,7	1	0,8	5	0,2	0,8
35,44 *	2		2				0,1	0,5
36,16				1				
36,47	2	1	1		1,5			
37,07				1				
37,29								0,2
38,91				0,6				
39,27								3
40,06								0,8

- * piek is ook aanwezig in Lekkanaalwater in een hoogte tussen $0,1$ en $1 \times 10^3 \mu V$
 ** piek is ook aanwezig in Lekkanaalwater in een hoogte tussen 1 en $5 \times 10^3 \mu V$
 1) piek is op basis van het UV-spectrum een andere verbinding dan de pieken in de overige monsters op deze retentietijd

Zonder de identiteit van de verschillende pieken te kennen levert een gedetailleerde beoordeling van de chromatogrammen aanvullende informatie op over de aanwezigheid van organische stoffen in watermonsters. De frequentie van vóórkomen, de gemeten concentraties en de verspreiding van de verbinding in uiteenlopende watertypen kan sturend zijn voor een nader onderzoek naar de identiteit van de verbinding.

III.3 Resultaten Doelstofanalyse

III.3.1 Herhaalbaarheid Retentietijden

Omdat piekidentificatie plaatsvindt op basis van retentietijden en UV-spectra, is het van belang dat de chromatografische condities zodanig zijn dat de variatie in de retentietijden binnen één meetserie minimaal is. De herhaalbaarheid is vastgesteld voor zowel standaarden als voor addities aan oppervlaktewater (Lekkanaal). De resultaten zijn weergegeven in Tabel III.8. Een chromatogram van een additie is weergegeven in Figuur III.3.

Tabel III.8 Herhaalbaarheid van retentietijden; standaarddeviatie absoluut (min) en relatief (%) voor zowel standaarden als addities aan oppervlaktewater. De concentraties in de standaarden lagen tussen 0,05 en 2 µg/l (calibratiereeks in duplo), die in de oppervlaktewatermonsters tussen 1 en 2 µg/l.

component	in standaarden (n=12)		in oppervlaktewater (n=6)	
	min	%	min	%
mevinfos-trans	0,02	0,10	0,04	0,20
chloridazon	0,03	0,12	0,04	0,20
carbendazim	0,05	0,25	0,04	0,18
mevinfos-cis	0,02	0,20	0,04	0,18
simazin	0,03	0,10	0,05	0,17
metribuzin	0,03	0,10	0,04	0,13
pirimicarb	0,03	0,10	0,05	0,15
atrazin	0,02	0,06	0,04	0,13
diuron	0,03	0,08	0,04	0,11
metolachloor	0,05	0,11	0,03	0,07
vinclozolin	0,02	0,06	0,03	0,08

voor vinclozolin wordt in de standaarden een gemiddelde retentietijd gevonden van 43,6 minuten, en in de addities aan oppervlaktewater 39,8 minuten. Dit verschijnsel doet zich alleen voor bij vinclozolin; een verklaring hiervoor is niet gevonden. Aangezien dit fenomeen zich herhaalt in het latere onderzoek, moet geconcludeerd worden dat vinclozolin niet analyseerbaar is met de huidige werkwijze.

De resultaten voor de herhaalbaarheid van de retentietijden voldoen geheel aan wat bij dergelijke methoden verwacht kan worden, en geeft voldoende mogelijkheden om op basis van retentietijd in combinatie met het UV-spectrum pieken te benoemen.

III.3.2 Recovery

In Tabel III.9 zijn de recoveries gegeven van de bepalingsmethode van addities op twee niveaus aan oppervlaktewater (Lekkanaal, 0,2-0,5 µg/l respectievelijk 1-2 µg/l) ten opzichte van een waterige werkstandaard (die dezelfde procedure heeft doorlopen als de monsters), en ten opzichte van een directe injectie van een kleine hoeveelheid (20 µl) van een meer geconcentreerde standaard.

Tabel III.9 Recoveries (in %) ten opzichte van waterige werkstandaarden voor addities aan oppervlaktewater van 0,2-0,5 µg/l en 1-2 µg/l na concentrering van 15 ml over de PLRP-concentringskolom, en de werkstandaard ten opzichte van een directe injectie van 20 µl van een geconcentreerde standaard zonder concentrering.

Component	ow (0,2-0,5)	ow (1-2 µg/l)	tov directe injectie

	µg/l)		
mevinfos-trans	115	108	77
chloridazon	103	93	76
carbendazim	129	98	51
mevinfos-cis	81	81	97
simazin	95	90	94
metribuzin	95	90	79
pirimicarb	104	98	64
atrazin	92	92	101
diuron	97	92	84
metolachloor	68	90	91
vinclozolin*	33	43	96

* Door het afwijkende gedrag van vinclozolin (zie ook paragraaf 3.3.1), is de kwantificering niet betrouwbaar uit te voeren.

Met uitzondering van vinclozolin kan gesteld worden dat de recoveries ten opzichte van de waterige werkstandaarden ruim voldoende zijn; gemiddeld voor alle componenten beter dan 80%. Ten opzichte van de directe injectie van een klein volume geconcentreerde standaard voldoet de recovery eveneens voor de meeste componenten; voor carbendazim en voor pirimicarb worden evenwel waarden gevonden die lager zijn dan 75%. Aangezien gekwantificeerd wordt aan de hand van de waterige werkstandaarden heeft dit voor de betrouwbaarheid van de gemeten concentraties geen nadelige gevolgen (hetgeen ook blijkt uit de herhaalbaarheid zoals weergegeven in paragraaf 3.3.3). Wel kan hierdoor de gevoeligheid van de methode voor deze stoffen tot een factor 2 minder zijn dan bij 100% recovery.

Overigens moet hierbij opgemerkt worden dat de bepaling van de recovery ten opzichte van een directe injectie is uitgevoerd met 10 afzonderlijke geconcentreerde standaarden van elk van de doelstoffen, in plaats van met een mengstandaard.

III.3.3 Kwantitatieve Herhaalbaarheid

In Tabel III.10 zijn de gegevens over de herhaalbaarheid van de gemeten concentraties van de addities aan Lekkanaalwater (zie onder "Recovery") weergegeven.

Tabel III.10 Herhaalbaarheid (uitgedrukt als relatieve standaarddeviatie, rsd) van de meting voor addities van 0,2-0,5 µg/l en 1-2 µg/l in oppervlaktewater

component	rsd (%) ow (0,2-0,5 µg/l)	rsd (%) ow (1-2 µg/l)
mevinfos-trans	13	13
chloridazon	2,5	1,1
carbendazim	2,5	4,8
mevinfos-cis	21	1,5
simazin	2,6	1,9
metribuzin	2,6	2,3
pirimicarb	2,5	0,9
atrazin	3,3	0,8
diuron	3,1	0,9
metolachloor	10	1,4
vinclozolin	17	1,3

Zoals eerder is aangegeven is vinclozolin vanwege het afwijkende gedrag niet betrouwbaar met deze methode te meten.

Voor het merendeel van de verbindingen is de relatieve standaarddeviatie beter dan 5%, hetgeen in overeenstemming is met de prestatiekenmerken zoals die voor vergelijkbare methoden gevonden worden [Noij en Brandt, 1995]. De hogere waarden voor mevinfos-cis en metolachloor worden veroorzaakt door de relatief grote achtergrondstoring voor deze verbindingen (stoorpieken) bij de addities aan Lekkanaalwater op laag concentratieniveau. Voor mevinfos-trans wordt de kwantificering bemoeilijkt doordat deze bovenop de "humeuze bult" elueert.

Overigens moet gesteld worden dat Lekkanaalwater ten opzichte van de meeste door de begeleidingscommissie aangeleverde praktijkwaters een relatief lage NOM-achtergrond heeft. Voor de betrouwbaarheid van de resultaten in dergelijke sterker belaste monsters moet dan ook rekening gehouden worden met relatieve standaarddeviaties van 10% of meer.

III.3.4 Lineariteit

De relevante gegevens over de responsiecurven voor de 11 doelstoffen zijn samengevat in Tabel III.11: de correlatie-coëfficiënt van de lineaire regressie, de y-as afsnede en de richtingscoëfficiënt (tevens een maat voor de gevoeligheid). Figuur III.4 geeft als voorbeeld de responsiecurve voor Pirimicarb (bij 244 nm).

Tabel III.11 Gegevens over de responsiecurves op basis van piekhoogte van de in duplo gemeten calibratiestandaarden, gekwantificeerd bij de aangegeven golflengte; r = correlatie-coëfficiënt van de lineaire regressie, a = y -as afsnede (in μV), b = richtingscoëfficiënt (in $\mu\text{V}\times\text{l}/\mu\text{g}$) (meetdatum: 5 december 1995).

component	λ (nm)	r	a (μV)	b ($\mu\text{V}\times\text{l}/\mu\text{g}$)
mevinfos-trans	215	0,997	-46	4218
chloridazon	215	0,994	148	6613
carbendazim	215	0,997	-92	1686
mevinfos-cis	215	0,998	48	4763
simazin	215	0,9997	-136	10756
metribuzin	215	0,999	57	3281
pirimicarb	244	0,998	-43	3784
atrazin	215	0,9995	-55	9620
diuron	244	0,9996	7,8	6284
metolachloor	215	0,996	1372	2301
vinclozolin	215	0,97	54	2594

Op basis van de grootte van de correlatie-coëfficiënten en de visuele beoordeling van de responsiecurves is er geen aanleiding om met behulp van een F- of t-toets aanvullend de lineariteit te toetsen. De responsiecurves voldoen ruimschoots aan de eisen die aan HPLC/UV-methoden gesteld kunnen worden, met uitzondering van vinclozolin.

De y -as afsnedes zijn steeds klein (corresponderend met een concentratie van de doelstof van kleiner dan $0,02 \mu\text{g/l}$) met uitzondering van metolachloor, die coelueert met een stoorpiek ter grootte van circa $0,5 \mu\text{g/l}$.

Aan de hand van de richtingscoëfficiënten van de responsiecurves kan geconcludeerd worden dat voor deze selectie van stoffen de gevoeligheid bij 215 nm tot een factor 6 verschillend is: voor atrazin en simazin is de gevoeligheid circa 6 keer groter dan voor carbendazim.

III.3.5 Aantoonbaarheidsgrenzen

De aantoonbaarheidsgrenzen zijn volgens afspraak bepaald op basis van de herhaalbaarheid van een lage concentratie van de doelstof in praktijkwater (Lekkanaalwater). Tevens is een schatting gemaakt voor ultrapuur water. Aanvankelijk werden op basis van de gegevens over herhaalbaarheid in Lekkanaalwater (niveau $0,2$ - $0,5 \mu\text{g/l}$) aantoonbaarheidsgrenzen berekend die lager waren dan $0,1 \mu\text{g/l}$. Omdat deze waarden ver liggen van die van de additie, is het experiment herhaald op het niveau van $0,04$ - $0,2 \mu\text{g/l}$ in Lekkanaal. De resultaten zijn vermeld in Tabel III.12.

Tabel III.12 Aantoonbaarheidsgrenzen in oppervlaktewater (in $\mu\text{g/l}$) op basis van de resultaten voor de herhaalbaarheid van de additie van 0,04-0,2 $\mu\text{g/l}$. Tevens zijn vermeld de geschatte aantoonbaarheidsgrenzen op basis van de addities van 0,2-0,5 $\mu\text{g/l}$ in Lekkanaalwater en de geschatte aantoonbaarheidsgrenzen in ultrazuiver water op basis van een lage concentratie werkstandaard (circa 0,05 $\mu\text{g/l}$).

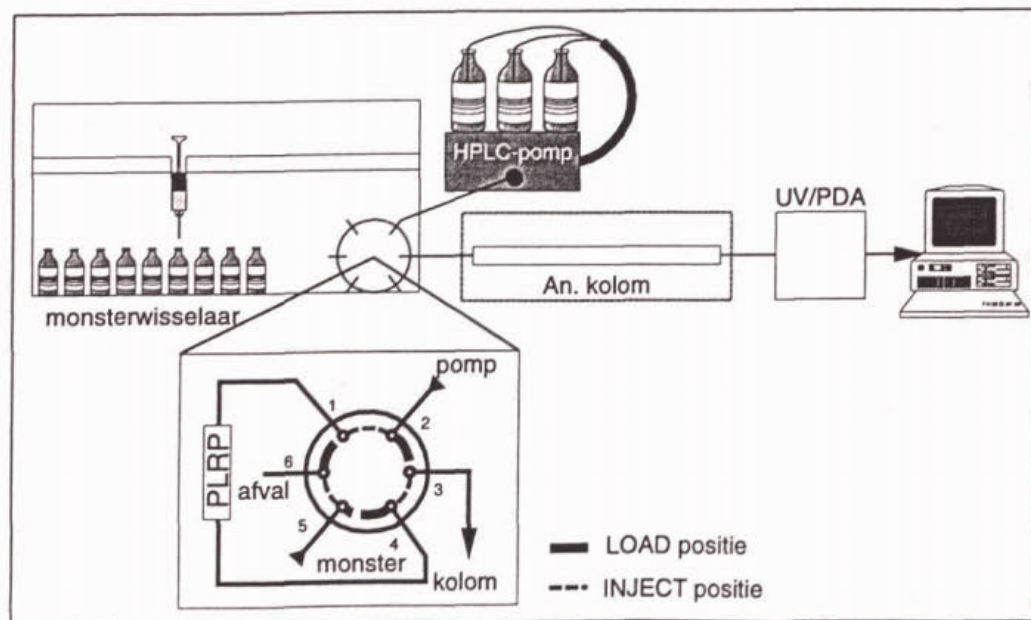
component	ag ($\mu\text{g/l}$) op basis van addities aan ow van 0,04-0,2 $\mu\text{g/l}$	geschatte waarden uit aanvullend onderzoek (zie tekst)	
		in ow op basis van addities 0,2-0,5 $\mu\text{g/l}$	in MilliQ op basis van werkstandaard 0,05 $\mu\text{g/l}$
mevinfos-trans	0,03	0,05	0,04
chloridazon	0,02	0,04	0,03
carbendazim	0,15	0,2	0,05
mevinfos-cis	0,02	0,06	0,04
simazin	0,03	0,05	0,03
metribuzin	0,02	0,1	0,05
pirimicarb	0,08	0,05	0,05
atrazin	0,02	0,04	0,03
diuron	0,04	0,03	0,02
metolachloor	0,03	0,3*	0,15*
vinclozolin	0,03	0,2	0,06

* Hoge geschatte waarden voor metolachloor vanwege een coeluerende stoopiek ten tijde van dit deel van het onderzoek; bij later onderzoek trad deze stoopiek niet meer op.

Voor alle doelstoffen met uitzondering van carbendazim geldt dat deze in praktijkwater aantoonbaar zijn in concentraties lager dan 0,1 $\mu\text{g/l}$. Dit wordt ondersteund door de resultaten uit het vergelijkingsonderzoek van praktijkmonsters (Hoofdstuk 4) waar gehalten rondom en lager dan 0,1 $\mu\text{g/l}$ gemeten werden in monsters met een aanzienlijk hogere organische belasting dan het hier gebruikte Lekkanaalwater. Voor carbendazim werd in dit onderzoek een relatief hoge waarde voor de aantoonbaarheidsgrens vastgesteld vanwege de aanwezigheid van storende verbindingen in Lekkanaalwater.

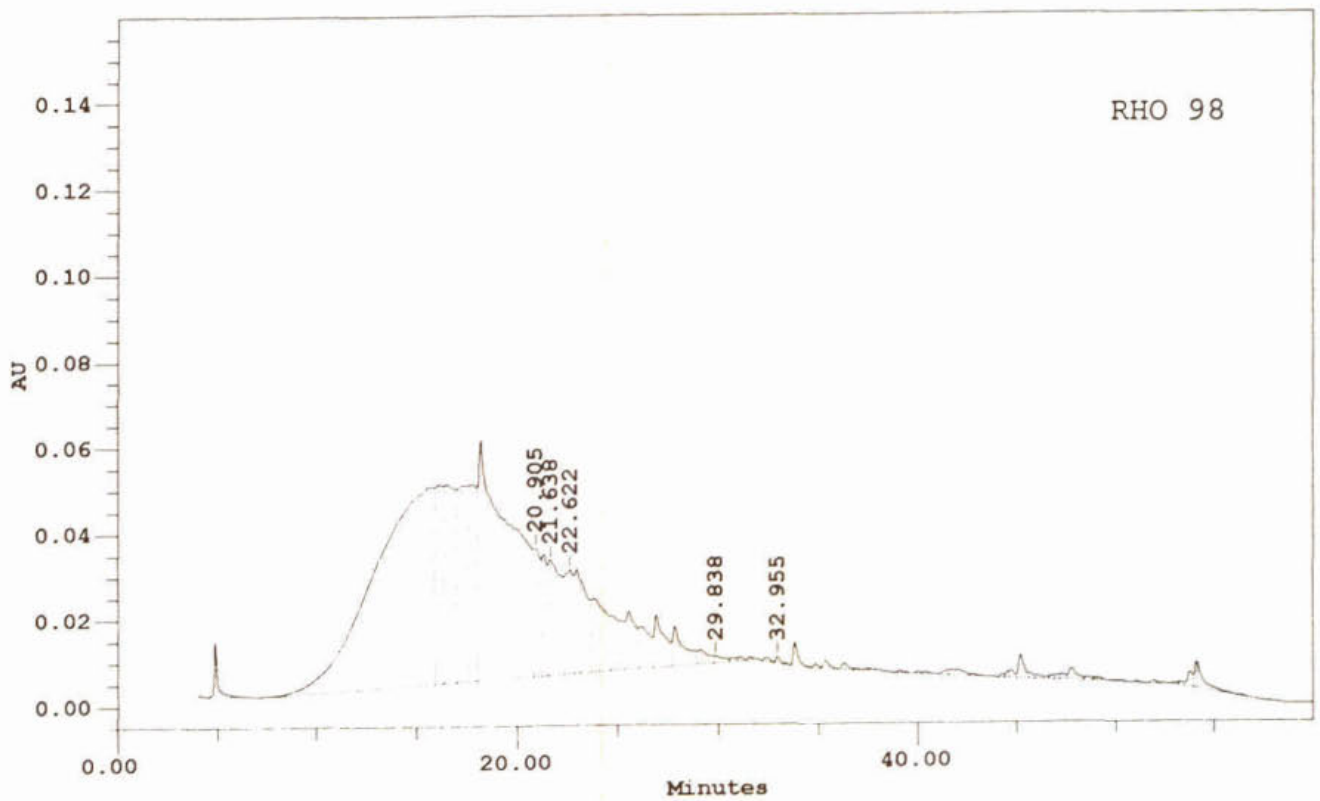
Uit de vergelijking met de geschatte waarden in oppervlaktewater en in MilliQ-water blijkt dat deze redelijk overeenstemmen. De schattingen op basis van een (te) hoge concentratie van de additie geven, zoals te verwachten, vaak een te hoge waarde voor de aantoonbaarheidsgrens.

Schematische weergave van de SPE/HPLC/DAD-opstelling, met de twee posities van de schakelkraan: beladen met monster en elutie + analyse.

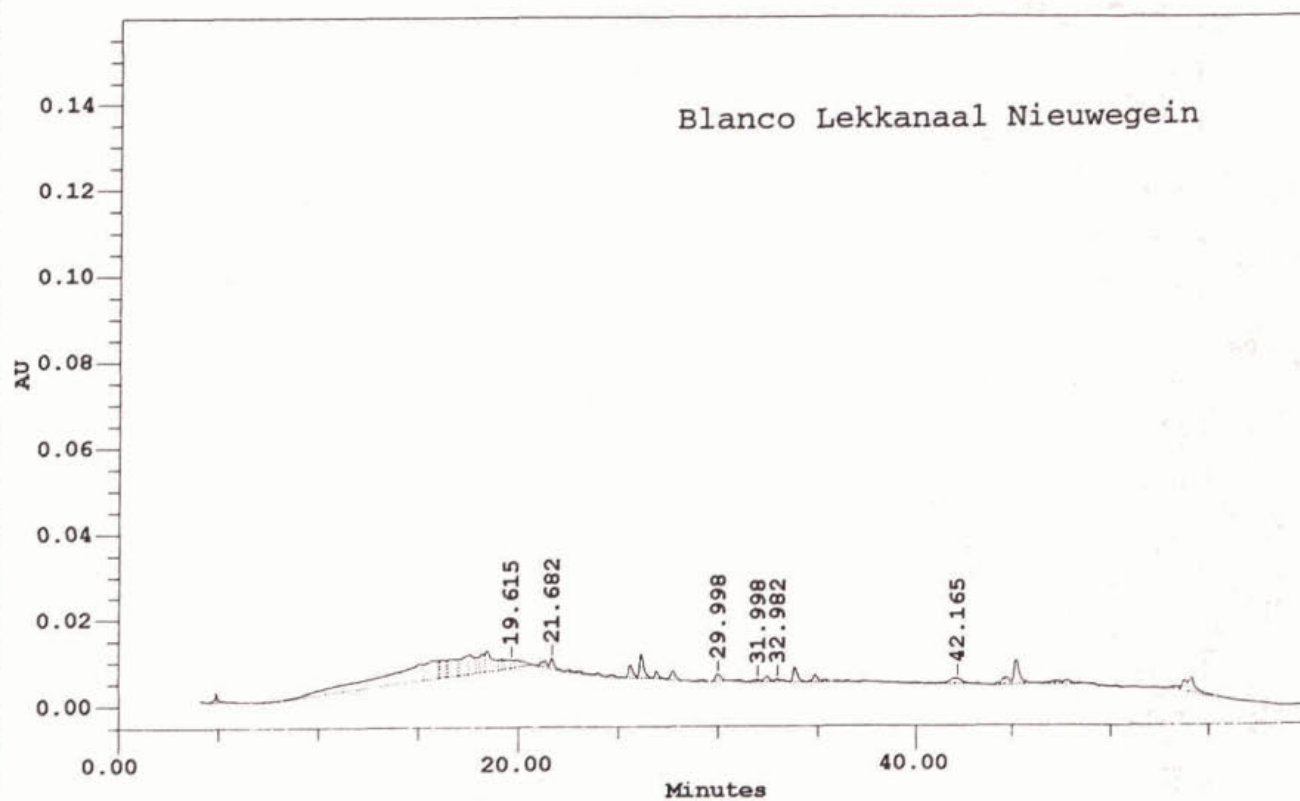


Chromatogrammen van Rho 98, Lekkanaal en blanco ultrazuiver water (MilliQ).

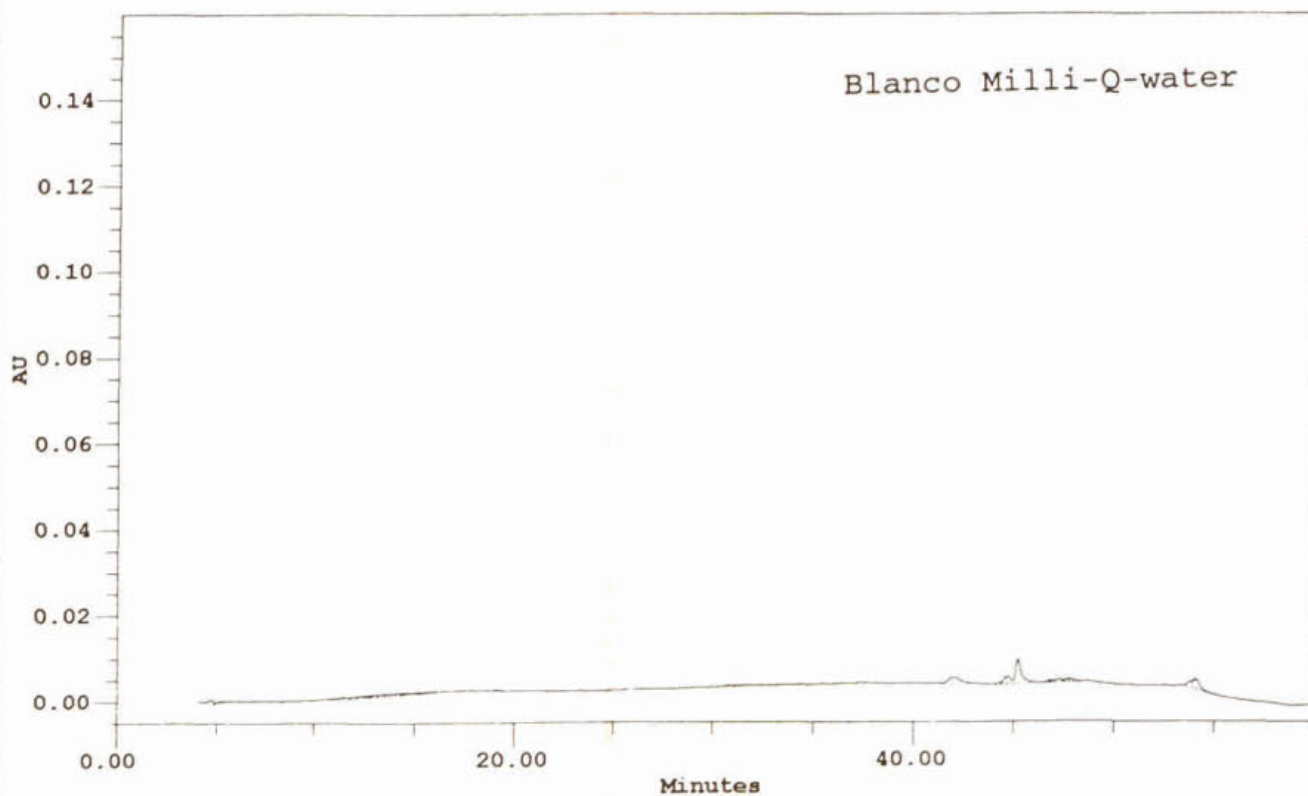
Millennium Results Report	Printed: November 30, 1995	Page: 1 of 1
Report Method: stowa_chrom	Version: 2.10	
For Sample: O-952604	Vial: 15	Injection: 1
Proc Chan: 215		Channel: 996
Date Acquired 11/28/95 10:45:20		Processed: 11/29/95 16:36:03



Millennium Results Report Printed: November 30, 1995 Page: 1 of 1
Report Method: stowa_chrom Version: 2.10
For Sample: Bl O.W. 29/11 Vial: 10 Injection: 1 Channel: 996
Proc Chan: 215 Processed: 11/29/95 16:20:07
Date Acquired 11/28/95 03:57:22

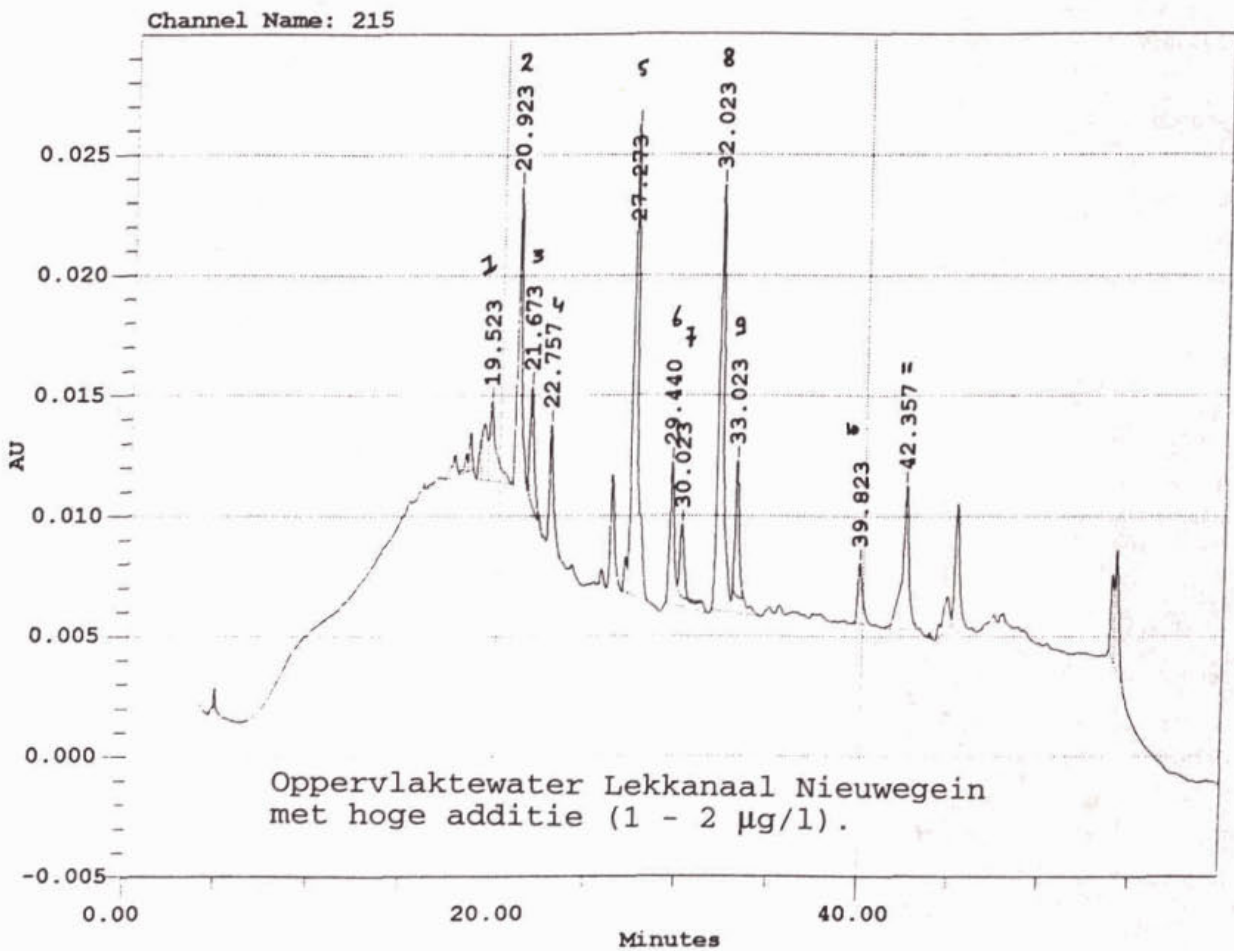


Millennium Results Report Printed: November 30, 1995 Page: 1 of 1
Report Method: stowa_chrom Version: 2.10
For Sample: bl mq 12 Vial: 28 Injection: 1 Channel: 996
Proc Chan: 215 Processed: 11/29/95 18:29:49
Date Acquired 11/29/95 04:25:38



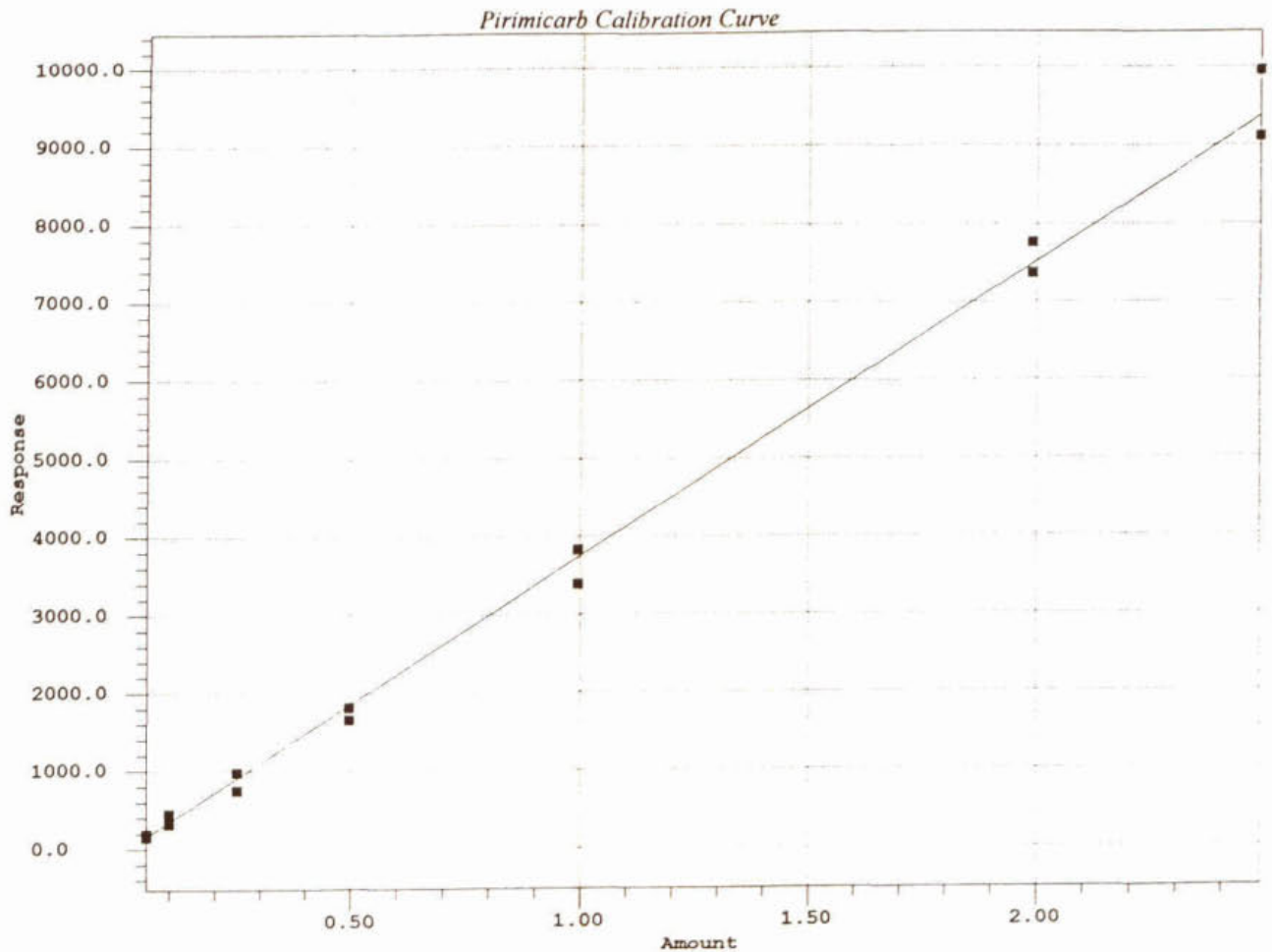
Chromatogram van de additie van de 11 doelstoffen aan Lekkanaal-water (additie 1-2 mg/l).

Millennium Acquisition Report	Printed: December 6, 1995	Page: 1 of 5
Report Method: stowa_index_chrom	Version: 2.10	
Sample: ow hoog 10 3	Processed: 12/06/95 14:08:18	
Vial: 36	Inj: 1	Channel: 996



- 1 = Mevinfos (1)
- 2 = Chloradizon
- 3 = Carabendazim
- 4 = Mevinfos (2)
- 5 = Simazin
- 6 = Metribuzin
- 7 = Pirimicarb
- 8 = Atrazine
- 9 = Diuron
- 10 = Vinchlozolin
- 11 = Metolachloor

Responsiecurve voor Pirimicarb (bij 244 nm).



Pirimicarb Calibration Information

Processing Method	stowa	System	fuh
Channel	244nm	Date	05-DEC-95
Type	LC	Name	Pirimicarb
Retention Time	29.995 min	Order	1
A	-42.597577	B	3783.675451
C	0.000000	D	0.000000
E	0.000000	F	0.000000
R	0.998335	R ²	0.996674
Standard Error	217.378299		

Bijlage IV Met on-line PLRP/HPLC/DAD analyseerbare verbindingen.

vet = verbindingen opgenomen in geëvalueerde methode voor doelstoffen-analyse

m = metaboliet

nr	stofnaam	groep	isol.	UV	lit	opm
	alachloor	AcAn	+	o	7,8,11	
	aldicarb	NMC	+	o	3,7,8,11,16	
m	aldicarb-sulfon	NMC	o	o	3,8	
m	aldicarb-sulfoxide	NMC	o	o	3	
	alloxydim natrium		+	o	8	
m	AMPA		o	6	b	
	anilazine	T	+	+	10	
	asulam	Carb	+	o	8	
	atraton		+	+	9,10	
	atrazin	T	+	+	1,7,8,9,10, 11,12,15,16	
	azinphos-ethyl	OPP	+	+	16	
	azinphos-methyl	OPP	+	+	16	
	barban		+	+	7,8,10	
	benazolin		+	+	11	
	bentazon		+	o	1,8,16 a	
	benzothiazol		+	+	8	
	bifenyl	Ar	+	+	9	
	bioallethrin	Pyr	+	+	10	
	bromacil	Cil	+	+	7,8,9,10, 15,16	
	broomfenoxim		+	o	11	
	broomoxynil	F	+	o	8,14,16 a	
	bromophos-ethyl	OPP	+	+	16	
	butocarboxim	NMC	+	o	3	
m	butocarboxim-sulfon	NMC	o	o	3	
m	butocarboxim-sulfoxide	NMC	o	o	3	
	buturon	FUH	+	+	9	
	butylaat	TC	+	+	16	
	captafol		+	+	13	
	captan		+	+	13	
	carbaryl	NMC	+	+	3,11,12,16	
	carbendazim		+/o	+/o	7,8,13	
	carbofuran	NMC	+	o	3,11,16	
m	2-chlooraniline	An	+	+	8	
	chloorbromuron	FUH	+	+	2,7,10,16	
	chloor-2,4-dinitrobenzeen	HAr	+	+	11	
	chlooroxuron	FUH	+	+	9,15,16	
	chloorpropham	Carb	+	+	10,16	
	chloorthalonil	HAr	+	+	13	
	chloortoluron	FUH	+	+	2,7,9, 10,11,14, 15,16	
	chloridazon		+	+	7,8,9,11, 15,16	
	chlorpyrifos	OPP	+	+	16	
	CHPDMU		+	+	7	
	coumaphos	OPP	+	+	16	
	coumafuryl		+	+	16	a
	crimidin		+	+	9,10	
	cyanazin	T	+	+	1,7,10,12,16	
	cycloaat	TC	+	+	16	

	DDT	OCP	+	+	16
m	desethylatrazin	T	+	+	9,10,15
m	desethylterbutylazin	T	+	+	15
m	desisopropylatrazin	T	o	+	10,15
	diazinon	OPP	+	+	10,16
	dicamba		+	+	8,14,16 a
	dichlobenil	HAr	+	+	16
	3,3-dichloorbenzidine		+	+	8
m	2,6-dichloorfenol	F	+	+	8
	dichloorvos	OPP	+	o	16
	2,4-D	CFCZ	+	+	14,16 a
	2,4-DB	CFCZ	+	+	16 a
	2,4-DP (dichloorprop)	CFCZ	+	+	8,10,16 a
	diethyltalaat	Ft	+	o	9
	difenoxuron	FUH	+	+	16
	diflubenzuron	FUH	+	+	14
	dimefuron	FUH	+	+	15
	dimethoaat	OPP	+	o	7,8,16
m	2,4-dinitrofenol	F	+	+	5 a
	dinoseb	F	+	+	1,5,7, a 8,16
	dinoterb	F	+	+	5,7,8, 14,16 a
	dipropetryn	T	+	+	10
	disulfoton	OPP	+	+	16
	diuron	FUH	+	+	1,2,7,8,9, 10,11,14, 15,16
	DNOC	F	+	+	1,5,8,16 a
	eptam	TC	+	+	16
m	ethiofencarb	NMC	+	o	3,16
	ethiofencarb-sulfoxide	NMC	+	o	3
	ethofumesaat		+	o	11
	fenamiphos	OPP	+	o	11,12,16
	fenitrothion	OPP	+	+	12,16
	fenmedifam	Carb	+	+	11
	fenpropathrin	Pyr	+	+	10
	fenthion	OPP	+	+	16
	fenuron	FUH	+	+	9,15
	fenvaleraat	Pyr	+	+	16
	fluometuron	FUH	+	+	7,16
	folpet		+	+	13
	glyfosaat		o	o	6 b
	hexazinon	T	+	+	9,10,15,16
m	2-hydroxyatrazin	T	o	+	10
m	3-hydroxycarbofuran	NMC	+	o	3
	ioxynil	F	+	+	14,16 a
m?	isocarbamide		+	+	8
	isoproturon	FUH	+	+	2,9,10,14, 15,16
	linuron	FUH	+	+	2,7,8,9,10, 11,12,14, 15,16
	malathion	OPP	+	+	16
	MCPA	CFCZ	+	+	4,14,16 a
	MCPB	CFCZ	+	+	16 a
	mecoprop (MCP)	CFCZ	+	+	4,8,14,16 a
	metalaxyl		+	+	4,13
	metamitron	T	+	+	4,8,9,10,15
	metazachloor	AcAn	+	+	7,9,10
	methabenzthiazuron	FUH	+	+	2,9,10,15
	methiocarb	NMC	+	o	3

m	methiocarbsulfon	NMC		+	0	3
m	methylisothiocyanaat			0	0	8
	metobromuron	FUH		+	+	2,7,10,15,16
	metolachloor	AcAn		+	0	8,9,10,16
	metoprotbyn			+	+	9
	metoxuron	FUH		+	+	2,7,9,10, 15,16
	metoxychloor			+	+	16
	metribuzin	T		+	+	4,9,15,16
	methomyl	NMC		+	0	3,16
	mevinphos	OPP		+	+	16
	molinaat	TC		+	+	16
	monolinuron	FUH		+	+	2,7,8, 9,10,15,16
	monuron	FUH		+	+	2,7,11,16
	naftaleen	Ar		+	+	9
	neburon	FUH		+	+	10,16
	nitralin	An		+	0	7
	nitrofen		+	+	7	
m	2-nitrofenol	F		+	0	8
	norflurazon			+	+	9
	oxadixyl		+	+	4	
	oxamyl	NMC		+	0	3,16
	paraoxon	OPP		+	+	16
	parathion ethyl	OPP		+	0	9,12,16
	parathion methyl	OPP		+	0	9,16
	pencycuron			+	+	9
	pendimethalin	An		+	+	9,16
	pentachloorfenol	F		+	+	8,16
	phoraat	OPP		+	+	16
	phoxim	OPP		+	0	7,8,16
	pirimicarb	Carb		+	+	4,16
	pirimiphos-ethyl	OPP		+	+	16
	pirimiphos-methyl	OPP		+	+	16
	procymidon			+	+	16
	prometon			+	+	9
	prometryn	T		+	+	9
	propachloor	AcAn		+	0	8,16
	propanil		+	+	12,16	
	propazin	T		+	+	7,9,10,15,16
	propham	Carb		+	+	16
	propoxur	NMC		+	0	3,16
	propyzamide			+	+	16
	rotenon		+	+	16	
	sebuthylazin			+	+	9,10
	sethoxydim			+	0	8
	simazin	T		+	+	1,8,9,10,11, 12,15,16
	sulfallaat	DTC		+	+	16
	2,4,5-T	CFCZ		+	+	16 a
	2,4,5-TP	CFCZ		+	+	16 a
	terbutryn	T		+	+	9
	terbutylazin	T		+	+	9,10,15,16
	tetrachloorvinphos	OPP		+	+	12
	tetradifon	HAr		+	+	10
m	thiofanox-sulfon	NMC		+	0	3
m	thiofanox-sulfoxide	NMC		+	0	3
	thiram	DTC		+	0	8
m	2,4,5-trichlooraniline	An		+	+	8
	triclopyr		+	+	8	
	trifluralin	An		+	0	7,9,10,16
	vinclozolin			+	0	4,13
	warfarin		+	+	7,8,16 a	

opmerkingen

- a. zure verbindingen; dienen bij voorkeur bij verlaagde pH of in combinatie met een ionpaar-vormer geïsoleerd en geanalyseerd te worden
- b. isolatie na derivatisering; detectie bij voorkeur met fluorescentie-detectie
- c. isolatie met behulp van "extraction disk" (ref. 12 en ref. 13)
- d. isolatie met behulp van "Carbopack" adsorbens (ref. 16)

vermelde stofgroepen

AcAn	=	aceetanilide
An	=	aniline
HAr	=	gehalogeneerde aromatische koolwaterstof
Ar	=	aromatische koolwaterstof
Cil	=	uracil verbindingen
CFCZ	=	chloorfenoxy carbonzuur
DTC	=	dithiocarbamaat
F	=	fenolverbinding
Ft	=	ftalaat
FUH	=	fenylureumherbicide
NMC	=	N-methylcarbamaat
OPP	=	organofosfor bestrijdingsmiddel
Pyr	=	pyrethroïde
T	=	triazine of triazinon
TC	=	thiocarbamaat

referenties

1. Kiwa huismethode LOA-... (Mix 1)
2. Kiwa huismethode "fenylureum herbiciden" LOA-...
3. Kiwa huismethode "N-methylcarbamat" LOA-...
4. Kiwa huismethode LOA-... (Mix 2)
5. Kiwa huismethode "dinitrofenolen" LOA-...
6. Kiwa huismethode "glyfosaat en AMPA" LOA-...
7. J. Slobodnik, M.G.M. Groenewegen, E.R. Brouwer, H. Lingeman and U.A.Th. Brinkman, *Journ. of Chrom.* 642 (1993) 359-370
8. I. Liska, E.R. Brouwer, A.G.L. Ostheimer, H. Lingeman, U.A.Th. Brinkman, R.B. Geerdink and W.H. Mulder, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 47 (1992) 267-291
9. R. Reupert and G. Brausen, *Gewässerschutz, Wasser, Abwasser*, 127 (1992) 25-48
10. J.M. Huen, R. Gillard, A.G. Mayer, B. Baltensperger and H. Kern, *Fres. J. Anal. Chem.* 348 (1994) 606-614
11. R. Eisert, K. Levsen and G. Wünsch, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 58 (1995) 103-120
12. D. Barceló, G. Durand, V. Bouvot and M. Nielen, *Environ.Sci.Techn.* 27 (1993) 271-277
13. J.S. Salau, R. Alonso, G. Batlló and D. Barceló, *Anal.Chim.Acta* 293 (1994) 109-117
14. B. Nouri, B. Fouillet, G. Toussaint, P. Chambon and R. Chambon, *Analyst* 120 (1995) 1133-1136
15. C. Schlett, *Acta Hydrochim. Hydobiol.* 21 (1993) 102-109
16. A. di Corcia and M. Marchetti, *Environ. Sci. Techn.* 26 (1992) 66-74

Bijlage V: Controleresultaten basismonsters "veld"monster programma.

Verbinding	QA	Anal.	Een-	Zs West		Hhs		Hhs		Hhs		Ws	
	1)	Meth.	heden	Overijssel	Rijnland B	Rijnland A	Uitw.Sluizen	Regge&Dinkel	Veengrond)				
		2)		(Zandgrond)	(Zandwinput)	(Zoute kwel)	(Kleigrond)	(Veengrond)					
chloroxuron	Q	FUH	µg/l	<	0.03	<	0.03	<	0.03	<	0.15	<	0.03
chlortoluron	Q	FUH	µg/l	<	0.03	<	0.03	<	0.1	<	0.03	<	0.15
diuron	Q	FUH	µg/l		0.04	<	0.03	<	0.03	<	0.03	<	0.17
fenuron	Q	FUH	µg/l	<	0.03	<	0.03	<	0.12	<	0.03	<	0.5
isoproturon	Q	FUH	µg/l	<	0.03	<	0.03	<	0.11	<	0.03	<	0.08
linuron	Q	FUH	µg/l	<	0.03	<	0.03	<	0.03	<	0.03	<	0.03
methabenzthiazuron	Q	FUH	µg/l	<	0.03	<	0.03	<=	0.21	<	0.03	<	0.15
metobromuron	Q	FUH	µg/l	<	0.03	<	0.03	<	0.03	<	0.03	<	0.03
metoxuron	Q	FUH	µg/l	<	0.15	<	0.03	<	0.03	<	0.03	<	0.5
mevinphos	Q	FUH	µg/l	<	0.03	<	0.03	<	0.11	<	0.03	<	0.08
monolinuron	Q	FUH	µg/l	<	0.03	<	0.03	<	0.05	<	0.1	<	0.03
monuron	Q	FUH	µg/l	<	0.03	<	0.03	<	0.03	<	0.03	<	0.5
pencycuron	Q	FUH	µg/l	<	0.22	<	0.16	<	0.35	<	0.5	<	0.18
aldrin	Q	OCLB	µg/l	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001
alpha-HCH	Q	OCLB	µg/l	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001
alpha endosulfan	Q	OCLB	µg/l	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001
beta-HCH]	Q	OCLB	µg/l	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<=	0.001
cis-chloordaan		OCLB	µg/l	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001
cis-heptachloorepoxide	Q	OCLB	µg/l	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001
dieldrin	Q	OCLB	µg/l	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001
endrin	Q	OCLB	µg/l	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001
gamma-HCH	Q	OCLB	µg/l	<	0.001	<=	0.002	<	0.001	<=	0.001	<	0.001
heptachloor	Q	OCLB	µg/l	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001
Hexachloorbenzeen	Q	OCLB	µg/l	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001
hexachloorbutadieen	Q	OCLB	µg/l	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001
hexachloorethaan	Q	OCLB	µg/l	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001
isodrin	Q	OCLB	µg/l	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001
o,p-DDD	Q	OCLB	µg/l	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001
o,p-DDE	Q	OCLB	µg/l	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001
o,p-DDT	Q	OCLB	µg/l	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001
p,p-DDD	Q	OCLB	µg/l	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001
p,p-DDE	Q	OCLB	µg/l	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001
p,p-DDT	Q	OCLB	µg/l	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001
pentachloorethaan	Q	OCLB	µg/l	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001
som drins		OCLB	µg/l	<	0.002	<	0.002	<	0.002	<	0.002	<	0.002
som HCHs		OCLB	µg/l	<	0.002	<	0.002	<	0.002	<	0.002	<	0.002
somDDT/DDE/DDD		OCLB	µg/l	<	0.003	<	0.003	<	0.003	<	0.003	<	0.003
telodrin	Q	OCLB	µg/l	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001
trans-chloordaan		OCLB	µg/l	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001
trans-heptachloorepoxide	Q	OCLB	µg/l	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001	<	0.001
alachlor		ONB	µg/l	<	0.01	<	0.01	<	0.01	<	0.01	<	0.01
atrazine		ONB	µg/l	<	0.01	<	0.01	<	0.01	<	0.01	<	0.01
chloorthalonil		ONB	µg/l	<	0.01	<	0.01	<	0.01	<	0.01	<	0.01
chlorpropham		ONB	µg/l	<	0.01	<	0.01	<	0.05	<	0.02	<	0.02
fenpropiomorf		ONB	µg/l	<	0.02	<	0.02	<	0.02	<	0.01	<	0.02
metazachlor		ONB	µg/l	<	0.01	<	0.01	<	0.01	<	0.01	<	0.01
metolachlor		ONB	µg/l	<	0.01	<	0.01	<	0.01	<	0.01	<	0.01
metribuzin		ONB	µg/l	<	0.01	<	0.01	<	0.01	<	0.01	<	0.01
pirimicarb		ONB	µg/l	<	0.01	<	0.01	<	0.01	<	0.01	<	0.01
prochloraz		ONB	µg/l	<	0.1	<	0.1	<	0.1	<	0.1	<	0.1
procimidon		ONB	µg/l	<	0.01	<	0.01	<	0.01	<	0.01	<	0.01
propham		ONB	µg/l	<	0.01	<	0.01	<	0.01	<	0.03	<	0.03
simazine		ONB	µg/l	<	0.01	<	0.01	<	0.01	<	0.01	<	0.01
terbutylazine		ONB	µg/l	<	0.01	<	0.01	<	0.01	<	0.01	<	0.01
tri-allaat		ONB	µg/l	<	0.01	<	0.01	<	0.01	<	0.01	<	0.01
vinclozolin		ONB	µg/l	<	0.01	<	0.01	<	0.01	<	0.01	<	0.01
azinphos-ethyl		OPB	µg/l	<	0.01	<	0.01	<	0.01	<	0.01	<	0.01

Verbinding	QA	Anal.	Een- heden	Zs West		Hhs		Hhs		Hhs		Ws
	1)	2)		Overijssel (Zandgrond)	Rijnland B (Zandwinput)	Rijnland A (Zoute kwel)	Uitw.Sluizen (Kleigrond)	Regge&Dinkel (Veengrond)				
chloroxyron	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
chlorpropham	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
chlorpyrazophos	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
chlorthalonil	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
chlortoluron	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
coumaphos	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
cyanazine	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
cymoxanil	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
desethylatrazine	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
dicamba	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
dichlobenyl	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
dimethachlor	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
dinobuton	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
dinoseb	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
dinoseb-acetaat	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
dinoterb	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
diuron	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
DNOC	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
ethiofencarb	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
fenchloorfos	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
fenuron	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
fluazinam	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
folpet	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
fonofos	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
fosfamidon	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
furathiocarb	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
ioxynil	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
iprodion	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
isocarbamid	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
isoproturon	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
landrin	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
linuron	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
MCPA	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
MCPB	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
MCPP	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
medioterb-acetaat	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
metabenzthiazuron	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
metalaxyl	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
metamitron	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
metazachlor	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
methiocarb	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
methomyl	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
metobromuron	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
metolachlor	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
metoxuron	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
metribuzin	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
metsulfuron-methyl	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
monolinuron	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
monuron	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
oxamyl	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
parathion-ethyl	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
pencycuron	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
phoxim	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
picloram	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
pirimicarb	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
pirimifos-ethyl	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
pirimifos-methyl	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
prochloraz	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
procimidon	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
prometon	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
propachlor	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
propanil	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1

Verbinding	QA Anal. Een-		Zs West		Hhs		Hhs		Hhs		Ws	
	1)	2)	Overijssel (Zandgrond)		Rijnland B (Zandwinput)		Rijnland A (Zoute kwel)		Uitw.Sluizen (Kleigrond)	Regge&Dinkel (Veengrond)		
propazine	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
propham	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
propoxur	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
prosulfocarb	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
pyrazophos	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
simazine	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
terbutylazine	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
tetrachloorfenvos	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
tolclofos-methyl	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
tolueensulfonamide	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
triallaat	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
triclopyr	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
trifluralin	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1
vinclozolin	Scree	µg/l	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1	< ca.	0.1

- 1) QA (Quality Assurance): een Q in deze kolom geeft aan dat de gehanteerde methode, bij het uitvoerende laboratorium, sterlab gekwalificeerd is.
- 2) FUH = HPLC methode voor fenylureum herbiciden; OCLB = GC/ECD methode voor organochloor bestrijdingsmiddelen; ONB en OPB = GC/MS methode voor organostikstof en -fosfor bestrijdingsmiddelen; PB en Scree = HPLC-DAD methode voor polaire bestrijdingsmiddelen.

Bijlage VI: Overzicht spikes

Monster	Herkomst basisonster	Toegevoegde verbinding	Conc. µg/l
PPST01ELTI	Uitw. Sluizen	diuron	0.15
PPST02ELTI	Regge en Dinkel	isoproturon	0.15
PPST03ELTI	Uitw. Sluizen	-	-
PPST04ELTI	Uitw. Sluizen	diuron	0.15
PPST05ELTI	Rijnland lokatie B	isoproturon	0.15
PPST06ELTI	Rijnland lokatie A	atrazin	0.17
PPST07ELTI	Rijnland lokatie A	simazin	1.17
PPST08ELTI	Rijnland lokatie A	diuron	0.15
PPST09ELTI	Rijnland lokatie B	carbendazim	0.61
PPST10ELTI	Rijnland lokatie B	diuron	0.15
PPST11ELTI	Rijnland lokatie A	vinclozolin	0.68
PPST12ELTI	Regge en Dinkel	diuron	0.15
PPST13ELTI	Regge en Dinkel	chloridazon	0.17
PPST14ELTI	West-Overijssel	diuron	0.15
PPST15ELTI	Regge en Dinkel	mevinphos	0.28
PPST16ELTI	Regge en Dinkel	-	-
PPST17ELTI	Rijnland lokatie B	atrazin	0.17
PPST18ELTI	Rijnland lokatie B	simazin	1.17
PPST19ELTI	Rijnland lokatie B	vinclozolin	0.68
PPST20ELTI	Rijnland lokatie B	mevinphos	0.28
PPST21ELTI	Rijnland lokatie B	metribuzin	0.35
PPST22ELTI	Rijnland lokatie B	pirimicarb	0.20
PPST23ELTI	Rijnland lokatie B	metolachloor	1.20
PPST24ELTI	West-Overijssel	-	-
PPST25ELTI	Regge en Dinkel	atrazin	0.17
PPST26ELTI	Regge en Dinkel	simazin	1.17
PPST27ELTI	Regge en Dinkel	vinclozolin	0.68
PPST28ELTI	Regge en Dinkel	mevinphos	0.28
PPST29ELTI	Regge en Dinkel	metribuzin	0.35
PPST30ELTI	Regge en Dinkel	pirimicarb	0.20
PPST31ELTI	Regge en Dinkel	metolachloor	1.20

Monster	Herkomst basisonster	Toegevoegde verbinding	Conc. µg/l
PPST01KIWA	Uitw. Sluizen	diuron	0.15
PPST02KIWA	Regge en Dinkel	isoproturon	0.15
PPST03KIWA	Uitw. Sluizen	-	-
PPST04KIWA	Uitw. Sluizen	diuron	0.15
PPST05KIWA	Rijnland lokatie B	isoproturon	0.15
PPST06KIWA	Rijnland lokatie A	atrazin	0.17
PPST07KIWA	Rijnland lokatie A	simazin	1.17
PPST08KIWA	Rijnland lokatie A	diuron	0.15
PPST09KIWA	Rijnland lokatie B	carbendazim	0.61
PPST10KIWA	Rijnland lokatie B	diuron	0.15
PPST11KIWA	Rijnland lokatie A	vinclozolin	0.68
PPST12KIWA	Regge en Dinkel	diuron	0.15
PPST13KIWA	Regge en Dinkel	chloridazon	0.17
PPST14KIWA	West-Overijssel	diuron	0.15
PPST15KIWA	Regge en Dinkel	mevinphos	0.28
PPST16KIWA	Regge en Dinkel	-	-
PPST17KIWA	Rijnland lokatie B	atrazin	0.17
PPST18KIWA	Rijnland lokatie B	simazin	1.17
PPST19KIWA	Rijnland lokatie B	vinclozolin	0.68
PPST20KIWA	Rijnland lokatie B	mevinphos	0.28
PPST21KIWA	Rijnland lokatie B	metribuzin	0.35
PPST22KIWA	Rijnland lokatie B	pirimicarb	0.20
PPST23KIWA	Rijnland lokatie B	metolachloor	1.20
PPST24KIWA	West-Overijssel	-	-
PPST25KIWA	Regge en Dinkel	atrazin	0.17
PPST26KIWA	Regge en Dinkel	simazin	1.17
PPST27KIWA	Regge en Dinkel	vinclozolin	0.68
PPST28KIWA	Regge en Dinkel	mevinphos	0.28
PPST29KIWA	Regge en Dinkel	metribuzin	0.35
PPST30KIWA	Regge en Dinkel	pirimicarb	0.20
PPST31KIWA	Regge en Dinkel	metolachloor	1.20

Monster	Herkomst basisonster	Toegevoegde verbinding	Conc. µg/l
CYCL01ELTI	Uitw. Sluizen	chloordaan	15.12
CYCL02ELTI	Regge en Dinkel	aldrin	32.99
CYCL03ELTI	Uitw. Sluizen	-	-
CYCL04ELTI	Rijnland lokatie A	dieldrin	5.91
CYCL05ELTI	Uitw. Sluizen	endrin	0.53
CYCL06ELTI	Rijnland lokatie A	-	-
CYCL07ELTI	Rijnland lokatie A	alfa-endosulfan	2.34
CYCL08ELTI	Regge en Dinkel	heptachloor	9.77
CYCL09ELTI	Uitw. Sluizen	chloordaan	15.12
CYCL10ELTI	Uitw. Sluizen	endrin	0.53
CYCL11ELTI	Uitw. Sluizen	alfa-endosulfan	2.34
CYCL12ELTI	Uitw. Sluizen	heptachloor	9.77
CYCL13ELTI	Rijnland lokatie B	-	-
CYCL14ELTI	Rijnland lokatie B	chloordaan	15.12
CYCL15ELTI	Rijnland lokatie B	endrin	0.53
CYCL16ELTI	Rijnland lokatie B	alfa-endosulfan	2.34
CYCL17ELTI	Rijnland lokatie B	heptachloor	9.77
CYCL18ELTI	Regge en Dinkel	-	-
CYCL19ELTI	Regge en Dinkel	chloordaan	15.12
CYCL20ELTI	Regge en Dinkel	endrin	0.53
CYCL21ELTI	Regge en Dinkel	alfa-endosulfan	2.34
CYCL22ELTI	Regge en Dinkel	heptachloor	9.77
CYCL23ELTI	West-Overijssel	-	-

BIJLAGE VII VELDMONSTERS; RESULTATEN IMMUNOCHEMISCHE METHODEN

Voor de validatie van de immunoassaykits werden monsters van onbekende samenstelling aangeleverd. Deze omvatten 2 series van elk 15 monsters; 1 serie voor de cyclodiënenbepaling, 1 serie voor de bepaling van de herbiciden. Omdat de kits het toelieten, is na de eerste meting een aantal monsters een tweede keer gemeten. Hierbij werden de monsters voor de cyclodiënenbepaling zowel ongefiltreerd als gefiltreerd in duplo gemeten. De monsters voor de andere kits werden alle gefiltreerd. Door een beperkt aantal plaatsen in de atrazinekit zijn de monsters hierin in duplo in plaats van in triplo gemeten.

VII.1 Resultaten

De resultaten van de respectievelijke metingen zijn in de onderstaande tabellen weergegeven. Aan de hand van de in de kitbijsluiting gegeven percentages kruisreactiviteit werden de verwachte waarden berekend. In de onderstaande tabellen worden de gevonden waarden van de eerste en herhaalde metingen gegeven.

Voor de eerste serie metingen was de detectielimiet ($\mu\text{g/l}$), berekend bij 90 % B/B0 en bij een triplo meting volgens een vier-parameter logit transformatie, als volgt:

	<u>90 % B/B0</u>	<u>triplo meting</u>
Atrazine	0,07	0,03
Fenylureum	0,04	0,02
Isoproturon	0,02	0,01
Cyclodiënen	1,5	0,3

De detectie limiet ($\mu\text{g/l}$) voor de herhaalserie, berekend bij 90 % B/B0 en bij een duplo of triplo meting volgens een vier-parameter logit transformatie, zijn als volgt:

	<u>90 % B/B0</u>	<u>duplo meting</u>
Atrazine	0,06	0,03
Cyclodiënen	1,0	0,2

	<u>90 % B/B0</u>	<u>triplo meting</u>
Fenylureum	0,03	0,01
Isoproturon	0,02	0,005

Cyclodiënen

Monster	Toevoegingen	Conc. (µg/l)	Verwacht (µg/l)	Gevonden (µg/l) ^a	Gevonden (µg/l) ^b
Cyclo01 U.S.	chloordaan	15,1	15,1	57,5	36,0/1,8
Cyclo02 R&D	aldrin	33,0	11,9	88,7	37,2/12,1
Cyclo03 U.S.	-	-	-	2,4	
Cyclo04 R.A.	dieldrin	5,9	6,6	25,8	17,2/1,7
Cyclo05 U.S.	endrin	0,5	5,3	13,2	
Cyclo06 R.A.	-	-	-	3,2	
Cyclo07 R.A.	alfa-endosulfan	2,3	11,7	23,7	
Cyclo08 R&D	heptachloor	9,8	8,9	43,7	
Cyclo09 U.S.	chloordaan endrin alfa-endosulfan heptachloor	15,1 0,5 2,3 9,8	41,0	168	79,2/4,8
Cyclo10 R.B.	-	-	-	4,0	
Cyclo11 R.A.	chloordaan endrin alfa-endosulfan heptachloor	15,1 0,5 2,3 9,8	41,0	194	63,8/9,4
Cyclo12 R.B.	chloordaan endrin alfa-endosulfan heptachloor	15,1 0,5 2,3 9,8	41,0	88,4	41,2
Cyclo13 R&D	-	-	-	4,8	
Cyclo14 R&D	chloordaan endrin alfa-endosulfan heptachloor	15,1 0,5 2,3 9,8	41,0	170	64,3/25,0
Cyclo15 W.O.	-	-	-	3,2	

Atrazine

Monster	Toevoegingen	Conc. (µg/l)	Verwacht (µg/l)	Gevonden (µg/l) ^a	Gevonden (µg/l) ^b
PPST01 U.S.	diuron	0,15	-	0,03 (<0,03)	
PPST02 R&D	isoproturon	0,15	-	0,07 (<0,03)	0,08
PPST03 U.S.	-	-	-	0,03 (<0,03)	
PPST04 U.S.	diuron isoproturon	0,15 0,15	-	0,03 (<0,03)	
PPST05 R.B.	-	-	-	<0,03 (<0,03)	
PPST06 R.A.	atrazine simazine	0,17 1,17	0,31	0,45 (0,62)	0,40
PPST07 R.A.	diuron carbendazim	0,15 0,61	-	0,05 (<0,03)	
PPST08 R.B.	diuron vinclozolin	0,15 0,68	-	<0,03 (<0,03)	
PPST09 R.A.	-	-	-	0,04 (0,14)	
PPST10 R&D	diuron chloridazon	0,15 0,17	-	0,10 (0,15)	0,09
PPST11 W.O.	diuron mevinphos	0,15 0,28	-	<0,03 (<0,03)	
PPST12 R&D	-	-	-	0,12 (<0,03)	0,09
PPST13 R.B.	atrazine simazine vinclozin mevinphos metribuzine pirimicarb metolachloor	0,17 1,17 0,68 0,28 0,35 0,20 1,20	0,31	0,44 (0,47)	0,45
PPST14 W.O.	-	-	-	<0,03 (<0,03)	
PPST15 R&D	atrazine simazine vinclozin mevinphos metribuzine pirimicarb metolachloor	0,17 1,17 0,68 0,28 0,35 0,20 1,20	0,31	0,62 (0,66)	0,55

Fenylureum

Monster	Toevoegingen	Conc. (µg/l)	Verwacht (µg/l)	Gevonden (µg/l) ^a	Gevonden (µg/l) ^b
PPST01 U.S.	diuron	0,15	0,27	0,39	0,46
PPST02 R&D	isoproturon	0,15	0,31	0,08	
PPST03 U.S.	-	-	-	0,15	0,10
PPST04 U.S.	diuron isoproturon	0,15 0,15	0,28	0,53	0,57
PPST05 R.B.	-	-	-	0,01	
PPST06 R.A.	atrazine simazine	0,17 1,17	-	0,14	0,21
PPST07 R.A.	diuron carbendazim	0,15 0,61	0,27	0,40	0,41
PPST08 R.B.	diuron vinclozolin	0,15 0,68	0,27	0,38	0,39
PPST09 R.A.	-	-	-	0,16	0,14
PPST10 R&D	diuron chloridazon	0,15 0,17	0,59	0,49	
PPST11 W.O.	diuron mevinphos	0,15 0,28	0,35	0,42	0,43
PPST12 R&D	-	-	0,31	0,07	
PPST13 R.B.	atrazine simazine vinclozin mevinphos metribuzine pirimicarb metolachloor	0,17 1,17 0,68 0,28 0,35 0,20 1,20	-	0,05	
PPST14 W.O.	-	-	0,07	0,09	
PPST15 R&D	atrazine simazine vinclozin mevinphos metribuzine pirimicarb metolachloor	0,17 1,17 0,68 0,28 0,35 0,20 1,20	-	0,08	

Isoproturon

Monster	Toevoegingen	Conc. (µg/l)	Verwacht (µg/l)	Gevonden (µg/l) ^a	Gevonden (µg/l) ^b
PPST01 U.S.	diuron	0,15	-	<0,01	
PPST02 R&D	isoproturon	0,15	0,32	0,15	0,23
PPST03 U.S.	-	-	-	<0,01	
PPST04 U.S.	diuron isoproturon	0,15 0,15	0,15	0,15	0,19
PPST05 R.B.	-	-	-	<0,01	
PPST06 R.A.	atrazine simazine	0,17 1,17	-	<0,01	
PPST07 R.A.	diuron carbendazim	0,15 0,61	-	<0,01	<0,005
PPST08 R.B.	diuron vinclozoline	0,15 0,68	-	<0,01	0,02
PPST09 R.A.	-	-	-	<0,01	
PPST10 R&D	diuron chloridazon	0,15 0,17	-	<0,01	0,025
PPST11 W.O.	diuron mevinphos	0,15 0,28	-	<0,01	
PPST12 R&D	-	-	-	<0,01	
PPST13 R.B.	atrazine simazine vinclozine mevinphos metribuzine pirimicarb metolachloor	0,17 1,17 0,68 0,28 0,35 0,20 1,20	-	0,01	
PPST14 W.O.	-	-	-	<0,01	
PPST15 R&D	atrazine simazine vinclozine mevinphos metribuzine pirimicarb metolachloor	0,17 1,17 0,68 0,28 0,35 0,20 1,20	-	0,01	

Toelichting:

U.S. = Uitwaterende Sluizen; R&D = Regge en Dinkel; R.A. Rijnland lokatie A; R.B. = Rijnland lokatie B; W.O. = West-Overijssel; A = atrazine; F = fenylureumherbiciden; I = isoproturon.

Het basismonster van Regge en Dinkel bevat 0,17 µg/l diuron, terwijl de detectielimiet voor fenuron, metoxuron en monuron verhoogd was (0,5 µg/l); het basismonster van West-Overijssel bevat 0,04 µg/l diuron.

^a = eerste meting; waarden voor triazines tussen haakjes zijn die welke gevonden werden met plastic buizen.

^b = herhaalde meting. Bij de herhalingsmetingen werden de monsters volgens standaardprocedure gefiltreerd over een 0,45 µm filter. Voor de cyclodiënenanalyse werden de herhaalde monster zowel ongefiltreerd als gefiltreerd gemeten, weergegeven als respectievelijk voor en na de schuine streep.

VII.2 Toelichting/bespreking

Voorlopige conclusies uit de bovenstaande tabellen zijn:

- de gemeten concentraties cyclodiënen zijn hoger dan verwacht, hetgeen overeenkomt met de resultaten van de evaluatie;
- de cyclodiënenconcentraties zijn in de tweede meting een stuk lager geworden; mogelijk is absorptie en/of bezinken hiervan de oorzaak;
- filtratie van de monsters vóór de cyclodiënenbepaling verwijdert het grootste deel van de reagerende verbindingen uit de monsters;
- de gemeten concentraties atrazine/triazines is in de geaddeerde monsters hoger dan verwacht, hetgeen verklaard kan worden aan de hand van de achtergrondwaarden in de niet-geaddeerde monsters;
- de herhalingen met de atrazine- en fenylureumkit geven vergelijkbare waarden; filtratie van de monsters had blijkbaar geen effect op de gevonden waarden;
- in de niet-geaddeerde monsters van U.S. en R.A. worden fenylureumherbiciden gevonden; deze achtergrondwaarde verklaart ook het feit, dat vaak hogere waarden worden gevonden dan verwacht;
- de concentraties aan isoproturon bleken bij de eerste meting bijna alle beneden de detectielimiet;
- herhalingen met de isoproturonkit gaf iets hogere waarden; een verklaring hiervoor kan niet gegeven worden; eerder was namelijk gevonden dat filtratie geen effect heeft op isoproturonwaarden in de immunoassay.

BIJLAGE VIII VELDMONSTERS; RESULTATEN HPLC FINGERPRINT METHODEN

Na ontvangst van de 15 monsters op 11 maart 1996 zijn deze gefiltreerd over een 0,45 μm geregenereerde cellulose-membraanfilter, en is 15 ml met behulp van de SPE-HPLC/DAD-methode geanalyseerd (zie paragraaf 3.1). De meetserie is uitgebreid met analyses van blanco ultrazuiver water (MilliQ) na elk monster, een zestal standaardoplossingen van de 11 doelstoffen, een voorbehandeld oppervlaktewater (snelfiltraat WRK Lekkanaal) en hetzelfde oppervlaktewater met een additie van circa 0,5 $\mu\text{g/l}$.

In de verkregen chromatogrammen van de 15 monsters, van het oppervlaktewater met en zonder additie en van de blanco's MilliQ is allereerst de somparameter bepaald, zowel de piekensom van elk monster (PS_m) alsook het totaaloppervlak (pieken + humusbult; TDOM_m) conform de in de paragrafen 1.2 en 2.1 beschreven procedure en rekenwijze. Op basis hiervan is de relatieve piekensom ($\text{PS}_m/\text{TDOM}_m$) bepaald.

Vervolgens is de doelstofanalyse uitgevoerd, waarbij in de chromatogrammen op basis van de retentietijd de piekherkenning voor de 11 doelstoffen heeft plaatsgevonden (pieken vallend binnen een ingesteld venster van 0,16-0,32 min. rondom de retentietijd van de doelstof). Daarna is aan de hand van een meer gedetailleerde beoordeling van de retentietijd (o.a. met behulp patroonherkenning door middel van chromatogrammen-overlay) en de overeenstemming van het UV-absorptiespectrum vastgesteld of de piek juist benoemd was. In vrij veel gevallen leidde dit overigens tot het alsnog verwerpen van de benoeming, hetgeen de meerwaarde van diode array detectie boven UV-detectie (bij één golfengte) voor dit onderzoek aangeeft. De op deze wijze aangetoonde doelstoffen zijn gekwantificeerd op basis van een responsiecurve van waterige standaarden, die dezelfde procedure hebben ondergaan als de monsters.

VIII.1 Resultaten

Op basis van de ruwe chromatogrammen (hoogte en vorm van de humus-achtergrond) waren een vijftal monstertypes te onderscheiden (zie Figuur 6a-e). In de navolgende tabellen zijn de resultaten steeds per monstertype weergegeven. Later werd deze onderverdeling bevestigd door de door ICWS aangeleverde gegevens over de monsters en de addities. Op basis hiervan is de naam van het monstertype (achteraf) toegevoegd. In de eerste kolom is steeds het niet gespikete monster weergegeven. De met SPE-HPLC/DAD gemeten concentraties die, bij de vergelijking achteraf met de gespikete concentraties, significant afweken van de spikes, zijn cursief weergegeven en worden in de begeleidende tekst nader besproken.

VIII. 1.1 Monsters "Uitwaterende Sluizen"

Resultatenoverzicht "Uitwaterende Sluizen" (doelstoffen in µg/l, PS en TDOM in 1000 µVs; blanco = niet aangetoond):

component	ppst03	ppst01	ppst04
mevinfos-trans			
chloridazon			
carbendazim			
mevinfos-cis			
simazin			
metribuzin			
pirimicarb			
atrazin			
diuron	0,04	0,18	0,18
metolachloor			
vinclozolin			
isoproturon			ca. 0,1
PS	340	441	510
TDOM	22399	20861	22838
PS/TDOM	0,015	0,021	0,022

In het blanco monster wordt circa 0,04 µg/l diuron aangetoond, in beide geadderde monsters is dit 0,18 µg/l (spike is volgens opgave 0,15 µg/l; terugvinding voor beide monsters is daarmee 93%). Hoewel isoproturon niet tot de 10 te onderzoeken doelstoffen behoort, is bekend dat deze verbinding onder de gebruikte HPLC-condities coëluëert met atrazin. Op basis van deze wetenschap en de bekendheid met het UV-spectrum van isoproturon (alle fenylureumherbiciden hebben een sterk gelijkend, kenmerkend spectrum) werd in monster PPST04 isoproturon aangetroffen in een gehalte van circa 0,1 µg/l (een precieze kwantificering kon niet uitgevoerd worden omdat isoproturon niet is opgenomen in de kwantificeringsstandaard). Dit bleek goed overeen te stemmen met de spike van 0,15 µg/l in dit monster.

De piekensom (bij 215 nm) in het blanco monster is 340.000 µVs (equivalent met 2 µg/l atrazin). In relatie tot het totaalgehalte detecteerbaar organisch materiaal (TDOM) is dit een indicatie voor een geringe mate van verontreiniging. De toename van verontreiniging in de beide gespikete monsters is aan de hand van de piekensom duidelijk vast te stellen: een verhoging met 101.000 µVs (equivalent met 0,6 µg/l atrazin) respectievelijk 170.000 µVs (1 µg/l atrazin). Overigens leert een nadere beschouwing van de chromatogrammen dat de piekensom van de gespikete monsters niet alleen verhoogd wordt door de toevoegingen van diuron en isoproturon, maar dat er ook andere stoffen gespiket zijn: ten opzichte van het blanco monster laten de gespikete monsters extra pieken zien op retentietijden van ruim 26 minuten (PPST1) respectievelijk 24 minuten en ruim 26 minuten (PPST4). De toename in de piekensom is niet zichtbaar in het totaaloppervlak: de spreiding in de oppervlaktemeting van de humeuze bult is groter dan de toename door de spikes.

VIII. 1.2 Monsters "Rijnland Locatie A"

Resultatenoverzicht "Rijnland Locatie A" (doelstoffen in µg/l, PS en TDOM in 1000 µVs; blanco = niet aangetoond):

component	ppst09	ppst06	ppst07
mevinfos-trans			
chloridazon			
carbendazim		0,14	0,32
mevinfos-cis			
simazin		1,1	
metribuzin			
pirimicarb			
atrazin		0,16	
diuron	0,05	0,05	0,18
metolachloor			
vinclozolin			
isoproturon			
PS	613	1336	1427
TDOM	17824	17620	17862
PS/TDOM	0,034	0,076	0,080

Ook hier wordt in het blanco monster een laag gehalte diuron gemeten (0,05 µg/l), de spike van 0,15 µg/l in PPST7 wordt goed teruggevonden (terugvinding 87%). In PPST6 worden beide toegevoegde triazines goed teruggevonden (simazin op een niveau van 1,17 µg/l voor 94%, atrazin (0,17 µg/l) eveneens voor 94%).

In PPST6 wordt carbendazim aangetoond zonder dat deze is toegevoegd. Een nadere beschouwing leert dat op de retentietijd van carbendazim een piek aanwezig is, die storing ondervindt van de achtergrond (onvolledige scheiding met een andere in het monster aanwezige component). Het op de retentietijd van carbendazim opgenomen UV-spectrum heeft weliswaar gelijkenis met het bibliotheekspectrum van carbendazim, maar bij een preciezere achtergrondcorrectie van het spectrum moet geconcludeerd worden dat beide spectra onvoldoende overeenstemmen. Gebruikmakend van de kennis over de samenstelling kan achteraf door een extra inspanning de juiste conclusie getrokken worden. Bij meer routinematige toepassing van de methode voor onbekende monsters zullen dit soort misinterpretaties of twijfelgevallen blijven bestaan.

In PPST7 wordt het toegevoegde carbendazim wel aangetoond, echter in een te laag gehalte (gemeten 0,32 µg/l, toegevoegd 0,61 µg/l). Wordt echter gecorrigeerd voor de dagwaarde van de recovery van carbendazim (63% in het in dezelfde monsterserie gemeten controle-monster), dan komen het gemeten gehalte en de spike wél goed overeen (terugvinding 85%).

De piekensom in het ongespikete monster (613.000 µVs, overeenkomend met 3,6 µg/l atrazin) in relatie tot het TDOM geeft aan dat hier sprake is van een matig verontreinigd monster (PS/TDOM = 0,034). De spikes aan PPST6 en PPST7 geven een zeer significante verhoging van zowel PS als PS/TDOM te zien, en zijn aldus op basis van deze somparameter zeer goed herkenbaar.

Overigens worden ook bij deze monsterserie in de spikes pieken aangetoond die niet afkomstig zijn

van de gespikete doelstoffen: zo is in PPST6 een verhoging van een piek op 34,5 minuten te zien, en in PPST7 op ruim 26 minuten.

VIII. 1.3 Monsters "Rijnland Locatie B"

Resultatenoverzicht "Rijnland Locatie B" (doelstoffen in µg/l, PS en TDOM in 1000 µVs; blanco = niet aangetoond):

component	ppst05	ppst08	ppst13
mevinfos-trans			0,11
chloridazon			
carbendazim			
mevinfos-cis			0,05
simazin			1,1
metribuzin			0,35
pirimicarb			0,28
atrazin	0,01		0,18
diuron		0,14	
metolachloor			1,1
vinclozolin		<i>nihil</i>	<i>nihil</i>
isoproturon			
PS	175	301	598
TDOM	4047	4057	3903
PS/TDOM	0,043	0,074	0,153

In het blanco monster wordt een spoortje atrazin aangetoond in een nauwelijks nog meetbaar gehalte (0,01 µg/l). Met uitzondering van vinclozolin worden de toevoegingen aan de gespikete monsters alle goed teruggevonden: diuron 93%, mevinfos (som van -cis en -trans) 57%, simazin 94%, metribuzin 100%, pirimicarb 140%, atrazin 100% en metolachloor 92%. Van vinclozolin is al in het vooronderzoek vastgesteld dat de methode voor deze verbinding minder geschikt is vanwege niet constante retentietijden en sterk variërende piekgroottes. Beide spikes worden niet teruggevonden.

De piekensom in het ongespikete water (PS = 175.000 µVs, equivalent met 1 µg/l atrazin) geeft een geringe mate van verontreiniging weer. In relatie tot het TDOM (PS/TDOM = 0,043) zou evenwel sprake kunnen zijn van een matige verontreiniging.

De gespikete monsters geven wel opnieuw een duidelijke verhoging van PS en PS/TDOM te zien (corresponderend met 0,7 respectievelijk 2,5 µg/l atrazin). Ook hier worden, naast de geaddeerde doelstoffen, ook andere pieken teruggevonden in de gespikete monsters: in PPST8 bijvoorbeeld extra pieken op 20, 24 en 41 minuten (zie Figuur 7).

VIII.1.4 Monsters "West-Overijssel"

Resultatenoverzicht "West-Overijssel" (doelstoffen in µg/l, PS en TDOM in 1000 µVs; blanco = niet aantoonbaar):

component	ppst14	ppst11
mevinfos-trans		0,15
chloridazon		
carbendazim		
mevinfos-cis		0,05
simazin		
metribuzin		
pirimicarb		
atrazin		
diuron		0,16
metolachloor		
vinclozolin		
isoproturon		
PS	438	471
TDOM	6142	6360
PS/TDOM	0,073	0,074

In het blanco monster worden geen van de 11 doelstoffen aangetoond. Wel zijn enkele andere pieken aanwezig. In het geaddede monster wordt diuron goed teruggevonden (107%), en ook de som van beide mevinfos-isomeren wordt voor 71% teruggevonden.

De piekensom in het blanco monster (438.000 µVs) komt overeen met circa 2,5 µg/l atrazin, en is een indicatie voor een matige verontreiniging. In relatie tot TDOM (PS/TDOM = 0,073) wordt dit bevestigd. De additie aan het gespikete monster wordt door PS enigszins, en door PS/TDOM nauwelijks herkend (PS geeft een verhoging van 31.000 µVs, corresponderend met 0,2 µg/l atrazin). Dit houdt verband met de lage concentraties van de additie (totaal 0,4 µg/l) en de, ten opzichte van atrazin, zwakke respons van de geaddeerde verbindingen (circa 20% voor diuron en 50% voor mevinfos).

VIII.1.5 Monsters "Regge en Dinkel"

Resultatenoverzicht "Regge en Dinkel": (doelstoffen in $\mu\text{g/l}$, PS en TDOM in 1000 μVs ; blanco = niet aantoonbaar):

component	ppst12	ppst2	ppst10	ppst15
mevinfos-trans				nihil
chloridazon			nihil	
carbendazim				
mevinfos-cis				nihil
simazin				1,1
metribuzin				0,30
pirimicarb				0,25
atrazin				0,19
diuron			0,14	
metolachloor				1,1
vinclozolin				0,78
isoproturon		ca. 0,13		
PS	385	592	588	626
TDOM	180×10^3	166×10^3	176×10^3	180×10^3
PS/TDOM	0,0021	0,0036	0,0033	0,0035

In het blanco monster worden geen van de 11 doelstoffen aangetoond. Vanwege het zeer hoge gehalte aan organische stof zijn de vroegst eluerende verbindingen (mevinfos, chloridazon en carbendazim) niet goed meetbaar in gehalten lager dan $0,5 \mu\text{g/l}$. Dit blijkt ook uit het niet terugvinden van deze stoffen in de addities. Op de plaats van mevinfos wordt in PPST15 wel een piek gemeten, maar door de hoge achtergrond wordt het UV-spectrum niet herkend als zijnde het spectrum van mevinfos. Voor chloridazon in PPST10 geldt dat *achteraf* een preciezere achtergrondcorrectie van het UV-spectrum aangeeft dat hier wel sprake is van chloridazon ($0,17 \mu\text{g/l}$, 100% terugvinding). Bij de toepassing van deze methode voor dergelijke monsters zal zonder voorkennis een laag gehalte van deze stoffen echter niet aangetoond worden. De overige addities in PPST10 en PPST15 worden goed teruggevonden: simazin (94%), metribuzin (86%), pirimicarb (125%), atrazin (112%), diuron (93%), metolachloor (92%) en hier ook vinclozolin (115%). In PPST2 wordt isoproturon aangetroffen (86% terugvinding), hoewel deze stof niet behoort tot de 11 doelstoffen. De bekendheid met de retentietijd en het UV-spectrum van isoproturon biedt ook hier de mogelijkheid om deze stof aan te tonen.

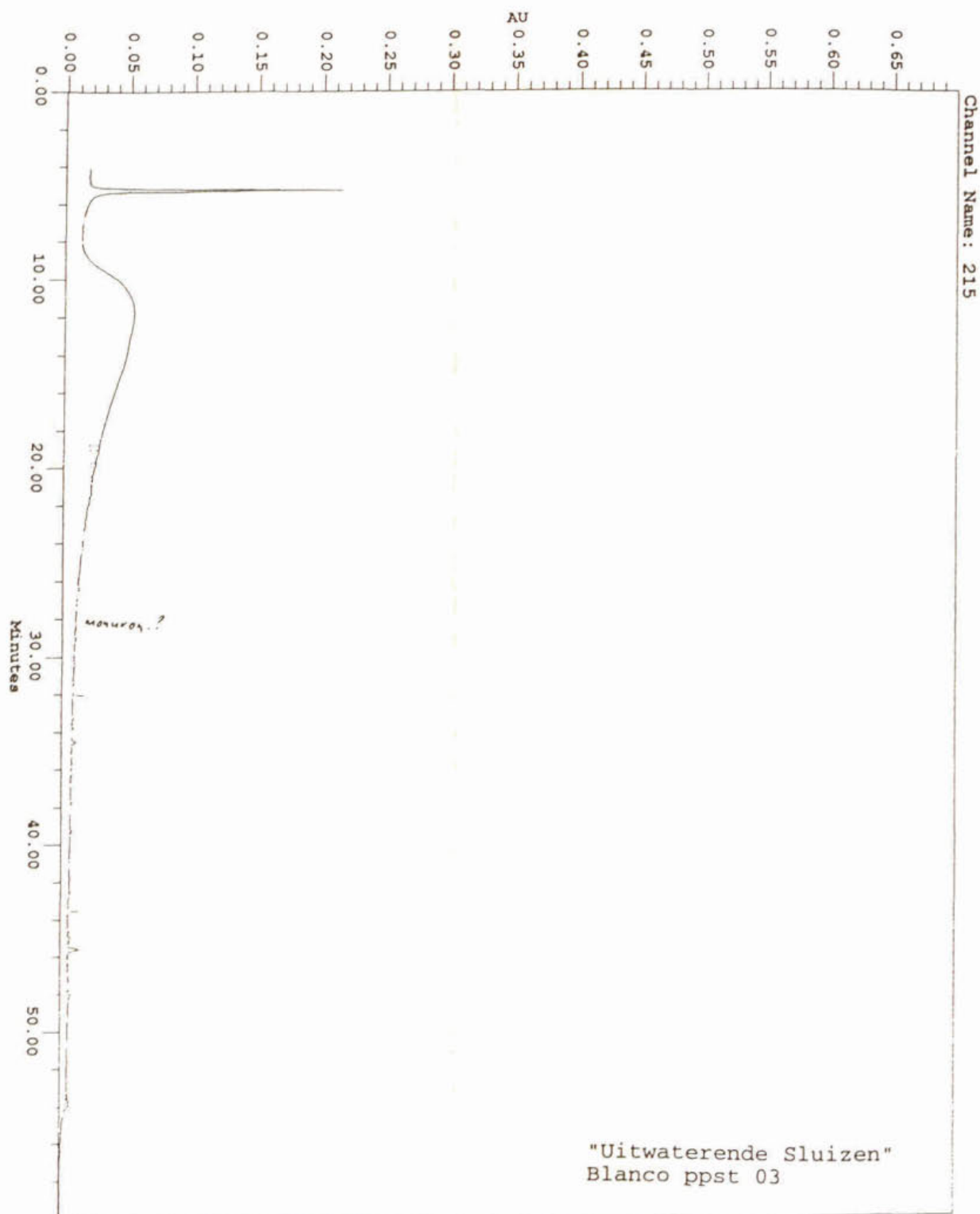
Het onderzochte monster wordt gekenmerkt door een zeer hoge achtergrond van NOM: de TDOM-waarde van het blanco monster is $180 \times 10^6 \mu\text{Vs}$, en is daarmee 10 tot 50 keer hoger dan van de andere monsters. De absolute waarde van de piekensom (PS = $385.000 \mu\text{Vs}$) geeft een geringe verontreinigingsgraad aan (equivalent met $2,2 \mu\text{g/l}$ atrazin), in relatie met TDOM (PS/TDOM = 0,0021) is sprake van een niet-vervuild monster.

De addities aan de gespikete monsters zijn ook voor dit monster goed te herkennen aan de hand van de verhogingen in zowel PS als PS/TDOM. Opnieuw worden in de gespikete monsters meer pieken aangetoond dan alleen degene afkomstig van de geaddeerde doelstoffen.

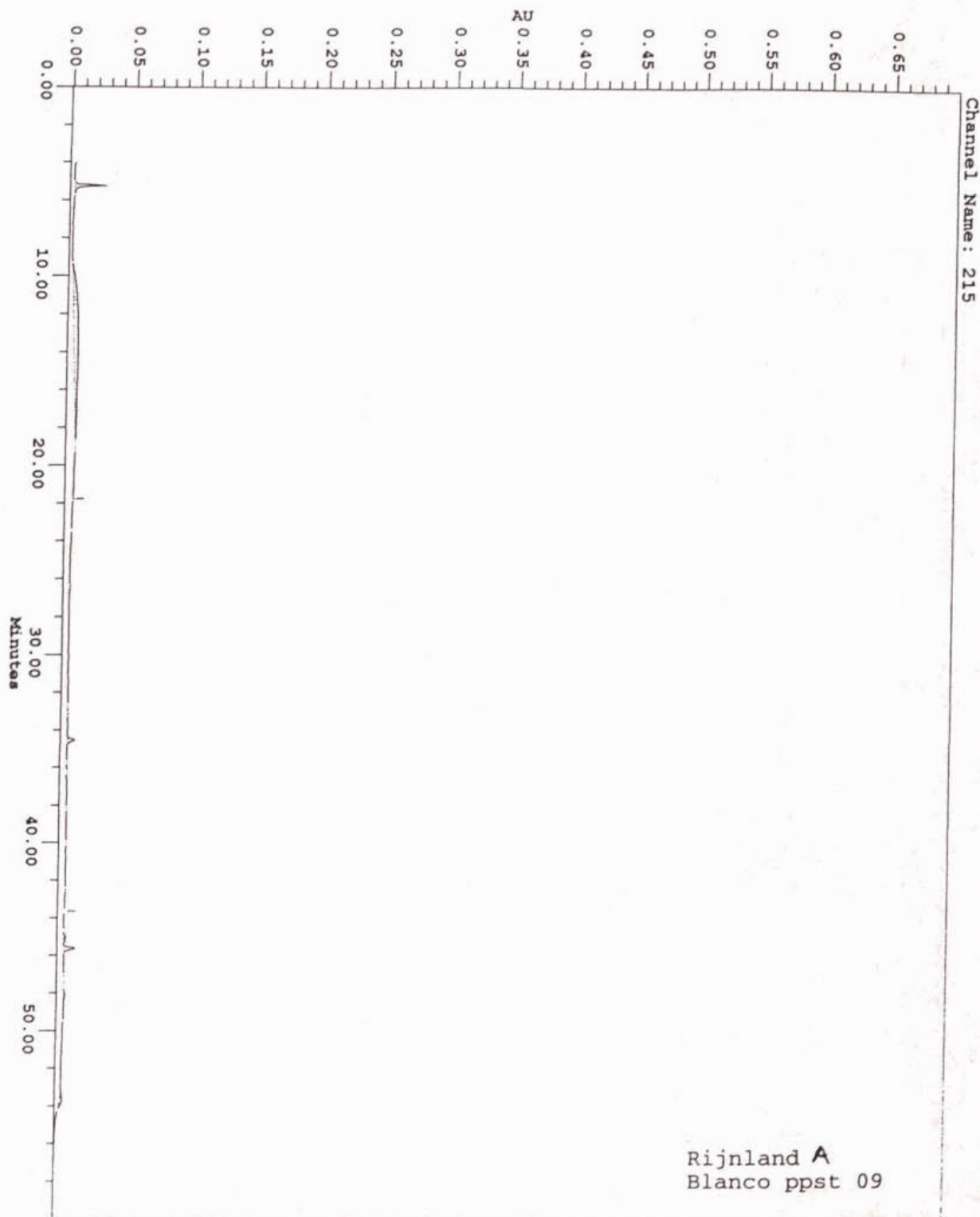
HPLC/UV-chromatogrammen van de vijf onderscheiden blanco watermonsters. Zowel de hoogte van de "humeuze bult" als de vorm ervan maakt een duidelijk onderscheid mogelijk.

BIJLAGE VIII,
Figuur 6a

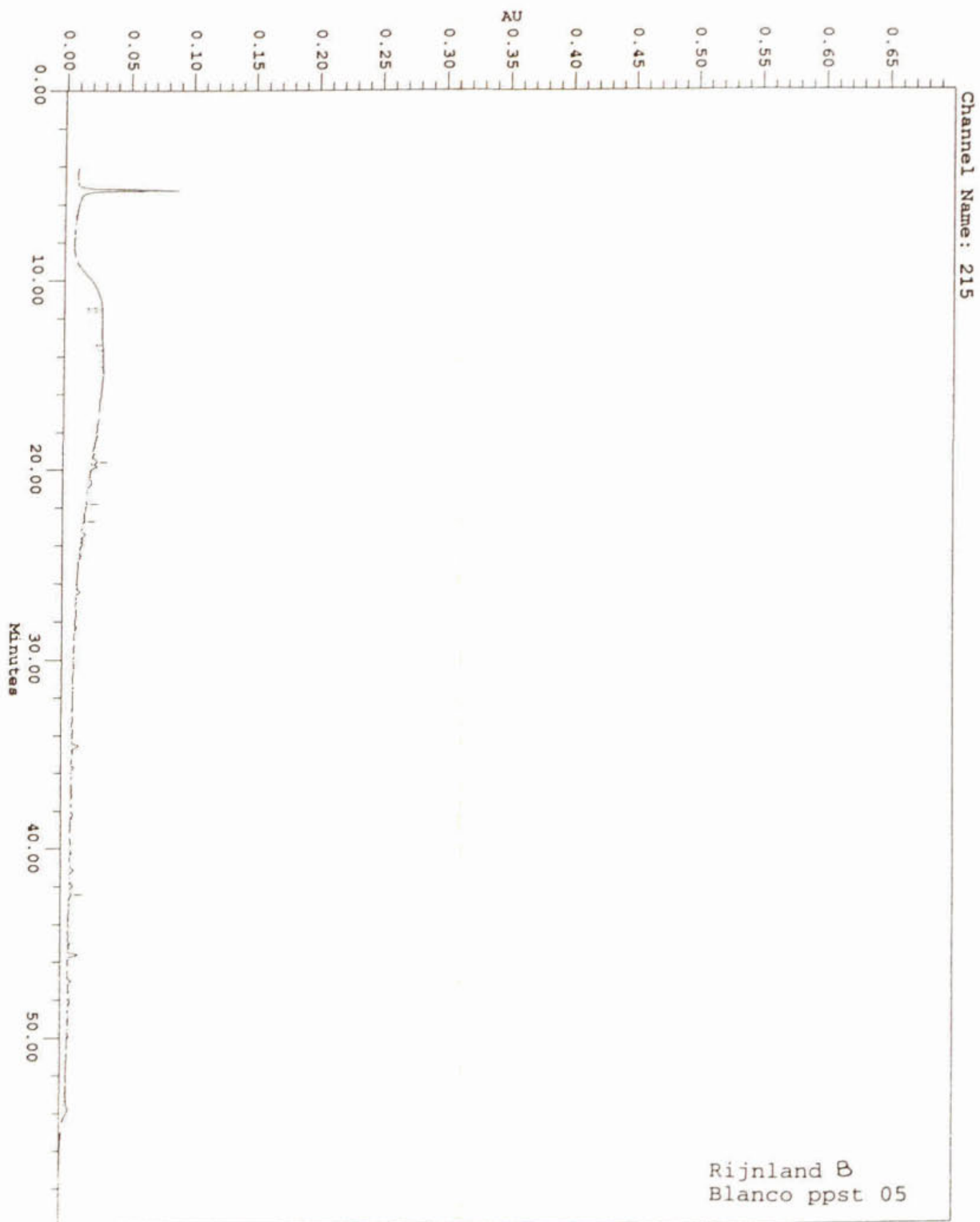
Millennium Results Report	Printed: March 18, 1996	Page: 1 of 1
Report Method: stowa_chrom	Version: 2.10	
For Sample: O-960601	Vial: 13	Injection: 1
Proc Chan: 215	Processed: 03/13/96 04:53:54	Channel: 996
Date Acquired 03/13/96 03:51:33		Channel Name 215



Millennium Results Report Printed: March 18, 1996 Page: 1 of 1
Report Method: stowa_chrom Version: 2.10
For Sample: 0-960602 Vial: 15 Injection: 1 Channel: 996
Proc Chan: 215 Processed: 03/13/96 07:36:32
Date Acquired 03/13/96 06:34:43 Channel Name: 215



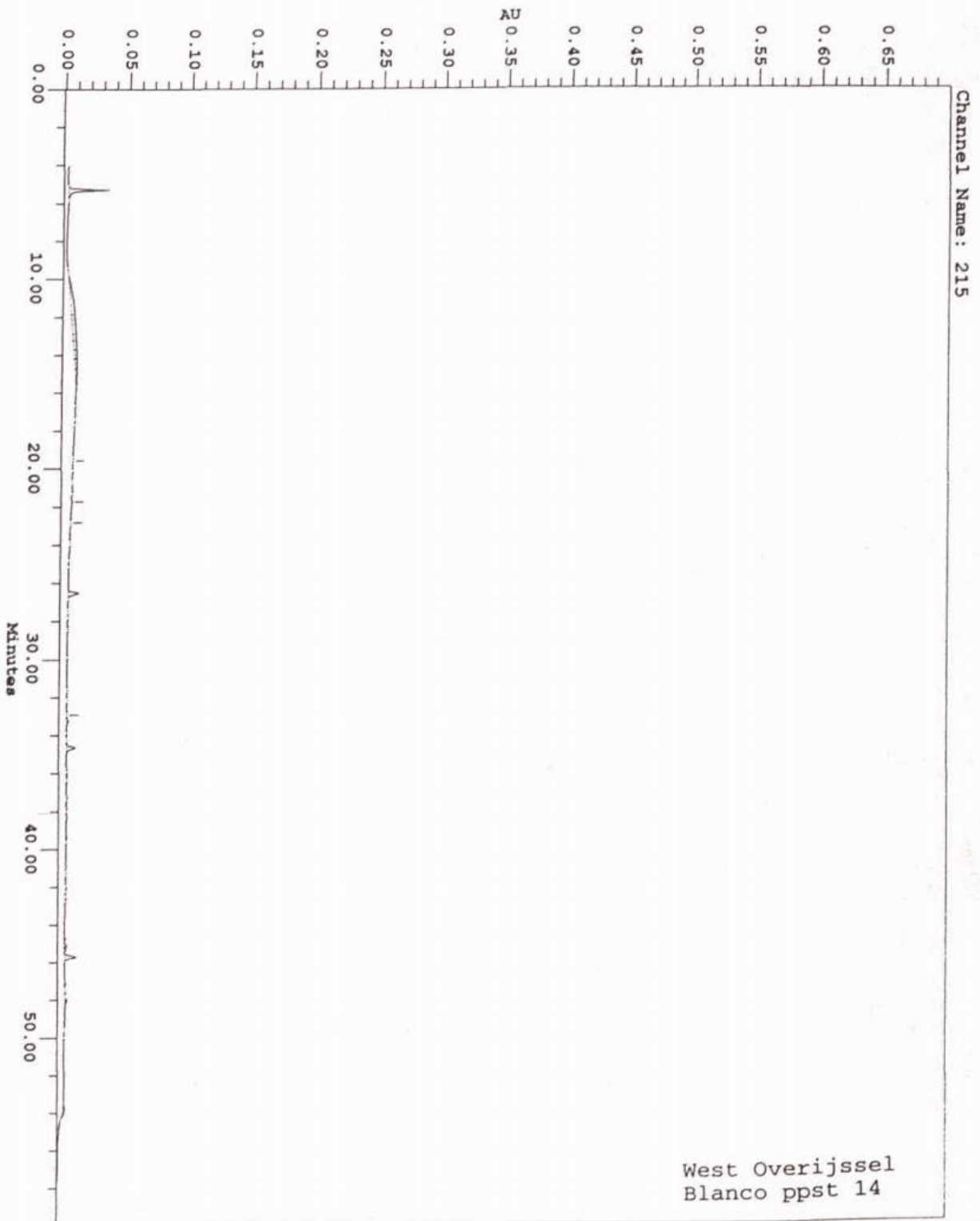
Millennium Results Report Printed: March 18, 1996 Page: 1 of 1
Report Method: stowa_chrom Version: 2.10
For Sample: O-960608 Vial: 29 Injection: 1 Channel: 996
Proc Chan: 215 Processed: 03/14/96 02:39:47
Date Acquired 03/14/96 01:36:39 Channel Name: 215



Millennium Results Report
Report Method: stowa_chrom
For Sample: O-960609
Proc Chan: 215
Date Acquired 03/14/96 05:41:16

Printed: March 18, 1996
Version: 2.10
Injection: 1
Processed: 03/14/96 06:43:42
Channel Name
215

Page: 1 of 1



Millennium Results Report

Printed: March 18, 1996

Page: 1 of 1

Report Method: stowa_chrom

Version: 2.10

For Sample: O-960612

Vial: 37

Injection: 1

Channel: 996

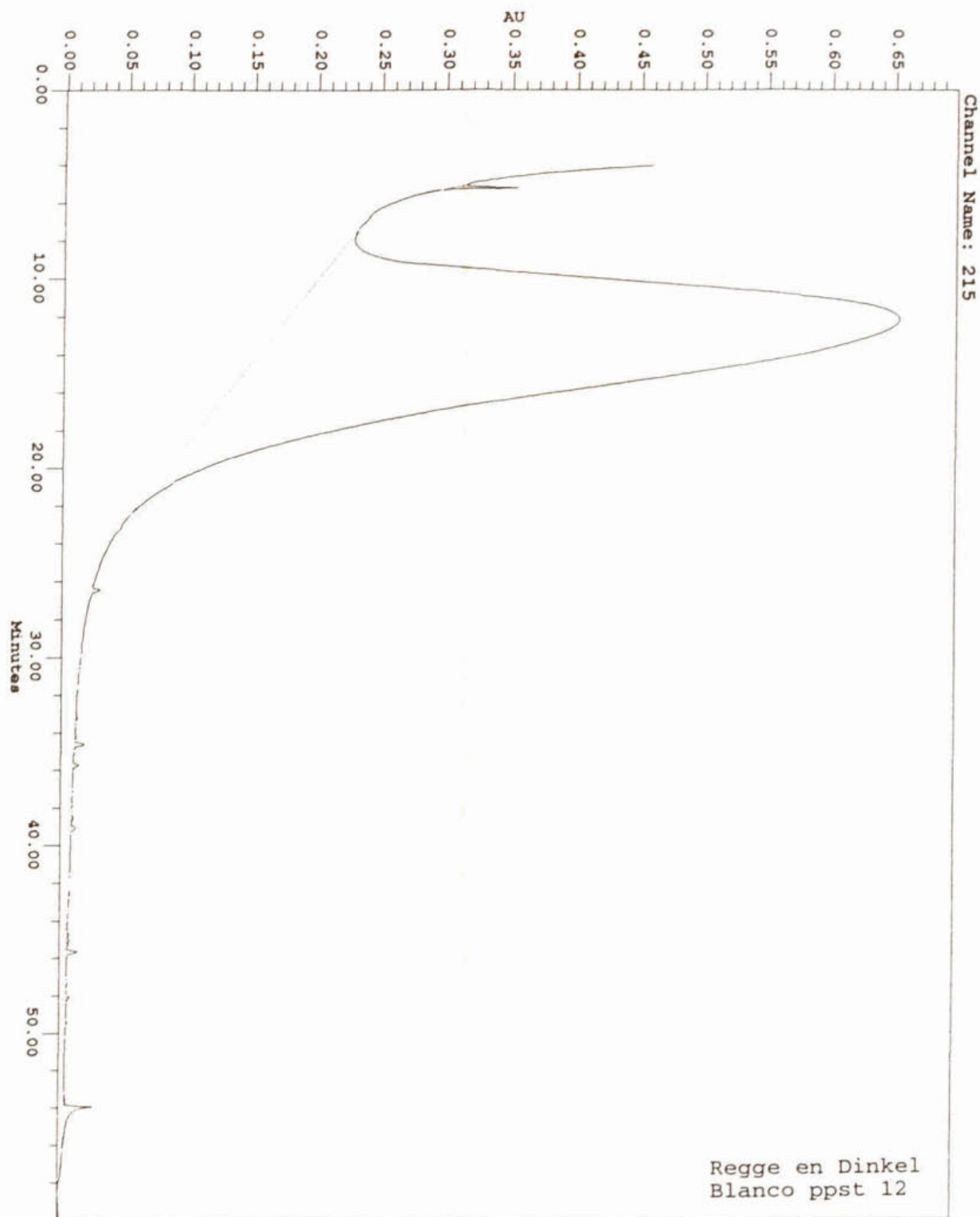
Proc Chan: 215

Processed: 03/14/96 14:52:27

Channel Name

Date Acquired 03/14/96 13:50:27

215



Vergelijking van het chromatogram zonder en met spike (PPST05 versus PPST08).
Met "*" zijn de extra pieken aangegeven die niet overeenkomen met de doelstoffen.

