

Een snelle screening van oppervlaktewater op 2,4-D met een immunoassay

Inleiding

Circa eenderde deel van ons drinkwater wordt geproduceerd uit rivier- of oppervlaktewater. Zo wordt bijvoorbeeld door de WRK (n.v. Watertransportmaatschappij Rijn-Kennemerland) bij Nieuwegein Rijnwater gewonnen dat – na voorzuivering – wordt gebruikt voor de drinkwaterproductie voor een groot gedeelte van Noord-Holland.



M. F. M. BEENAKKERS
Wetenschappelijk Adviesbureau
ELTI Support



MW. P. M. M. MEULENBERG
Wetenschappelijk Adviesbureau
ELTI Support



P. G. M. STOKS
NV WRK

In tegenstelling tot grondwater, dat meestal een redelijk constante kwaliteit heeft, kan de samenstelling van oppervlaktewater in de loop van de tijd aanzienlijk variëren. De zuivering zoals deze wordt toegepast bij de WRK is effectief in de verwijdering van alle vaste deeltjes en de slecht-wateroplosbare verbindingen. De verwijdering van de goed in water oplosbare verbindingen is echter lastiger. Een mogelijkheid hiervoor is bijvoorbeeld chemische afbraak. Dit levert echter (mogelijk) een introductie van nieuwe contaminanten op, naast het feit dat er extra installaties voor nodig zijn. Voor het drinkwater zijn, net zoals voor het oppervlaktewater overigens, Europese normen opgesteld. Voor stoffen, die in het toegepaste zuiveringsproces niet of nauwelijks uit het drinkwater verwijderd kunnen worden, is een screening van het uitgangsmateriaal van belang. Als hierin de normen overschreden worden, zal dat in het eindproduct waarschijnlijk ook zo zijn. Door een tijdige alarmering kan men door een aanpassing van de waterinname, een mogelijke bij-menging van niet-vervuild water of (desnoods) een tijdelijke stopzetting van de waterinname een normoverschrijding voorkomen. De mogelijke verontreiniging van het rivierwater met pesticiden wordt doorgaans met behulp van GC-MS en HPLC gemeten. Zowel de gebruikte HPLC als

Samenvatting

De kwaliteitscontrole bij de drinkwaterbereiding uit oppervlaktewater vereist een frequente analyse van de grondstof op pesticiden. Hiervoor geldt een EG-norm van 0,1 µg/l. De analyse van polaire, goed wateroplosbare, verbindingen (GC, HPLC) vraagt meestal een arbeidsintensieve extractie, waardoor de totale analyse-duur tijdrovend is. De immunoassay daarentegen biedt een mogelijkheid om snel een groot aantal monsters te screenen op de aanwezigheid van het analyt. Aan de hand van 2,4-D als voorbeeldverbinding is een evaluatie uitgevoerd van de beschikbare (commerciële) immunoassay-kits. De uitvoering wordt op enkele punten aangepast. De assays bieden de mogelijkheid om van grote aantallen monsters de concentratie 2,4-D binnen korte tijd (2 uur) te bepalen. Er is een goede correlatie tussen de immunoassay en een referentiemethode (GC-MS) gevonden. De detectielimiet (ongeveer 0,05 µg/l) ligt ruim onder de normconcentratie, de kruisreactiviteit (een respons van een verwante stof) blijkt niet meer dan enkele procenten te zijn. Hierdoor kan men de 'conventionele' analyse beperken tot de monsters die met de immunoassay een concentratie rond de normconcentratie of hoger vertoonden. Een veel frequentere monsternamen gaat hierdoor tot de mogelijkheden behoren.

GC-technieken hebben in het algemeen als nadeel dat er een extractie van de polaire verbindingen uit de watermatrix noodzakelijk is. Dit maakt de bepaling tijdrovend en daarmee kostbaar. Bij een screening met een immunoassay is een dergelijke extractie niet noodzakelijk. Een watermonster kan direct gemeten worden. Hiermee lijkt de immunoassay een alternatief te zijn dat een goedkope en frequente screening mogelijk maakt. De 'dure' bepaling zou dan beperkt kunnen blijven tot de momenten waarop er alarmerende concentraties voorkomen. Deze toepassing van een immunoassay is al eerder onderzocht [1, 2, 3], er heeft echter nog geen praktijkonderzoek plaats gehad.

Vraagstelling

Uit het grote aantal verbindingen waarvoor een screening van de concentratie wenselijk zou zijn (alleen voor de pesticiden gaat het al om honderdtallen) is er een als modelstof gekozen; 2,4-dichloorfenoxy-azijnzuur (2,4-D). Deze stof is als model gekozen omdat de chloorfenoxy-zuren soms in verhoogde gehalten aangetroffen werden bij de reguliere monitoring. Een mogelijkheid voor een 'early warning' voor de aanwezigheid van deze stoffen lijkt daarom belangrijk. De bepaling van de chloorfenoxy-zuren gebeurt nu (bij de WRK) met GC-MS, wat de meetfrequentie vanwege de kosten beperkt.

De ELISA-kits

In het onderzoek zijn twee verschillende ELISA-kits betrokken; de Millipore EnviroGard 2,4-D Plate kit (Millipore, Etten Leur) en de Ohmicron 2,4-D RaPID-assay (J. T. Baker, Deventer). Beide zijn gebaseerd op een competitieve ELISA. De 2,4-D-kits zijn ontwikkeld voor metingen van (oppervlakte)water. Het

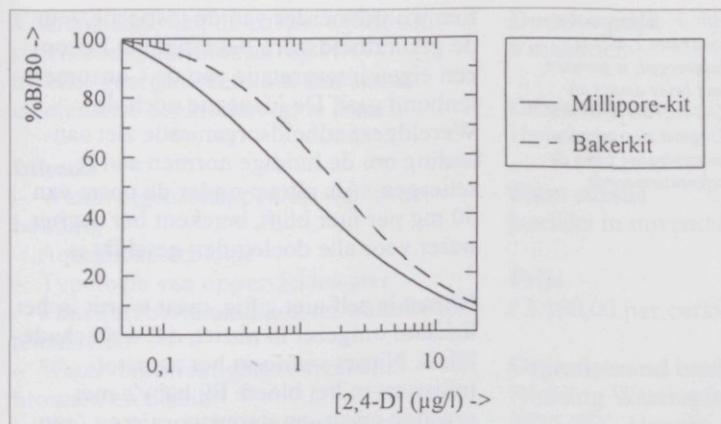
meetbereik volgens de voorschriften is echter afgestemd op de eisen in de Verenigde Staten. Hierdoor is de detectielimiet te hoog voor onze doelstelling. Ook is bij beide kits het aantal meegeleverde standaarden te klein om een goede ijklijn voor een immunoassay te krijgen.

Werkwijze

De uitvoering van beide kits is enigszins verschillend. Bij de kit van Baker wordt gebruik gemaakt van antilichamen die gekoppeld zijn aan magnetische deeltjes. Na de binding van antigeen aan antilichaam worden de antilichamen van de overige vloeistof gescheiden met behulp van een sterke magneet. De assay wordt uitgevoerd in reageerbuizen, de uiteindelijke kleuring wordt met een voor reageerbuizen geschikte spectrofotometer gemeten. Bij de Milliporekit zijn de antilichamen gekoppeld aan de wand van een microtiterplaat. De uiteindelijke kleuring wordt gemeten met een microtiterplaat-reader. De reagentia in deze kit zijn in druppelflesje verpakt, zodat het toedienen hiervan vergemakkelijkt wordt. De uitvoering van beide kits is aangepast aan de door ons gestelde eisen. Deze aanpassingen zijn al beschreven [4]. Beide bepalingen blijven, ook na de aanpassingen, in 2 à 3 uur uitvoerbaar, waarbij de benodigde apparatuur beperkt blijft tot een spectrofotometer.

Meetbereik

Ter illustratie zijn ijklijnen zoals deze met beide kits worden verkregen weergegeven in de afbeelding 1. Om de laagst detecteerbare dosis te verbeteren is bij beide kits het aantal standaarden uitgebreid en worden standaarden in een lager concentratiegebied gekozen. De zo verkregen detectielimieten



Afb. 1 - Ijklijnen, verkregen met de immunoassays

van beide kits lopen nogal sterk uiteen. Terwijl de detectielimiet van de Milliporekit tijdens al onze experimenten varieerde tussen 0 en 0,05 µg/l 2,4-D, liep de detectielimiet van de Bakerkit uiteen van 0,04 tot 1,4 µg/l 2,4-D. Een detectielimiet boven 0,1 µg/l (de Europese norm) maakt een meting uiteraard niet geschikt voor het door ons gestelde doel.

Matrixeffect

Voor beide kits hoeven de monsters geen voorbewerking te ondergaan. De kits zijn geschikt voor alle monsters met een waterige matrix. De precieze samenstelling van de matrix kan echter wel de meetresultaten beïnvloeden. Dit zogeheten matrix-effect zal zich bij deze immunoassays voordoen aangezien de matrix van de standaarden (kitbuffer) afwijkt van de (steeds wisselende) rivierwatermatrix. De effecten van verschillende matrices zijn onderzocht. Hiertoe zijn aan rivierwater, gefiltreerd rivierwater, demiwater en leidingwater verschillende concentraties 2,4-D toegevoegd (0,0 - 0,08 - 0,4 - 2,0 - 20,0 - 200,0 µg/l). Al deze oplossingen zijn gemeten ten opzichte van een normale ijklijn. De resultaten zijn samengevat in afbeelding 2.

In afbeelding 2 is te zien dat de waarden van de oplossingen in de rivierwatermatrix bij de Milliporekit overeenkomen met de verwachte waarden. De metingen met de Bakerkit laten een veel grotere afwijking zien.

Kruisreactiviteit

Een van de eigenschappen van een immunoassay is dat de antilichamen die voor de herkenning van de te meten stof zorgen, ook verwante stoffen zullen herkennen. De vraag is echter in welke mate dit gebeurt. Het is van belang te weten hoe goed 'andere' stoffen ook gemeten worden met de assay: de kruisreactiviteit. Afhan-

kelijk van het doel van de meting kan men een specifiekere bepaling (weinig kruisreactiviteit) of juist een bepaling met veel kruisreactieve verbindingen prefereren. Voor een goede interpretatie van de gemeten waarden is het echter altijd nodig te weten door welke stoffen en in welke mate kruisreactiviteit kan optreden. Een (klein) aantal stoffen is gecontroleerd op kruisreactiviteit. Het is een greep uit de stoffen die lijken op 2,4-D en in het rivierwater voor (kunnen) komen. Ook zijn het de verbindingen die bij de conventionele GC-MS-analyse worden bepaald. De resultaten zijn vermeld in tabel I.

TABEL I - Kruisreactiviteiten van enkele verbindingen.

Verbinding	% kruisreactiviteit	
	Baker-Kit	Milliporekit
2,4-D	100	100
MCPA	11	4
MCPP	1	0,4
2,4,5-T	7,5	
2,4-DP	0,04	
2,3-dichloorfenol	0,04	

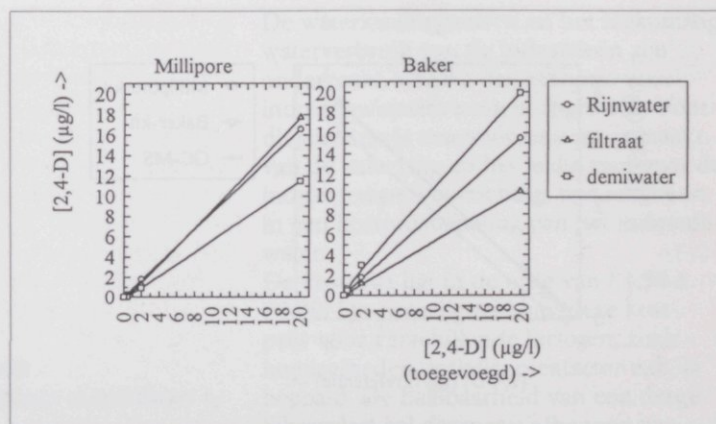
Uit de tabel blijkt dat de assays stofspecifiek genoemd kunnen worden. De kruisreactiviteit van de onderzochte stoffen is klein. Als de te verwachten concentraties van deze stoffen in het oppervlaktewater in ogenschouw worden genomen zullen de meetresultaten door deze verbindingen niet of nauwelijks beïnvloed worden.

Intra-assayvariatie

Naast de vraag of de met de assay bepaalde concentratie klopt, is ook de meetvariatie van belang. Als een Rivierwatermonster in zesvoud wordt genomen, is voor beide kits de variatie in de gemeten extincties van de verschillende samples 2 à 3% CV.

Inter-assayvariatie; monster(-voor)behandeling

De variatie in de bepaling zelf is redelijk



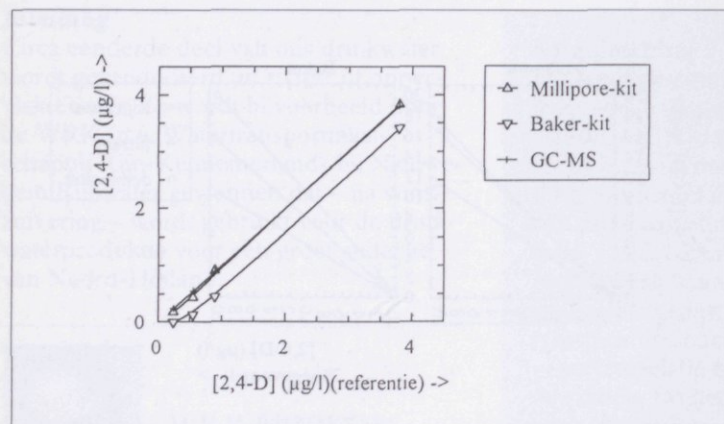
Afb. 2 - Matrixeffecten bij beide kits (2,4-D-oplossingen in de kitbuffer zijn aan de hand van verschillende ijklijnen gemeten)

klein. De gemeten waarden worden echter wel sterk beïnvloed door de voorbehandeling. Ondanks dat de voorbehandeling zich beperkt tot monsternamen, transport en opslag blijken (identieke) monsters die verschillend zijn behandeld grote verschillen te vertonen in de meetwaarde. De verschillen kunnen oplopen tot bijna een factor 10, een fout waar terdege rekening mee gehouden moet worden. Storingen die zo zouden kunnen ontstaan, kunnen natuurlijk gemakkelijk geëlimineerd worden door de monsterbehandeling (net zoals bij de andere bepalingen) te standaardiseren. De vraag is echter wat de meest gunstige voorbehandeling is. Bacteriën die in het water aanwezig zijn kunnen mogelijk tot versnelde afbraak van het 2,4-D leiden. Bacteriegroei kan onder meer geremd worden door een lage pH.

De monsters die voor een HPLC- of GC-bepaling geëxtraheerd worden (solid-phase extractie) moeten voor de extractie aangezuurd worden. Dit aanzuren (tot pH = 2) gebeurt zo vroeg mogelijk om direct de bacteriegroei in het monster te remmen. Om de effecten van aanzuren op de immunoassay te bepalen is een serie monsters zowel onbewerkt, als aangezuurd (en vlak voor de bepaling geneutraliseerd) gemeten. De aangezuurde monsters leveren een sterke overschatting van de concentratie 2,4-D. Aangenomen moet dus worden, dat de monsters het beste alleen gekoeld kunnen worden.

Nauwkeurigheid

De vraag is natuurlijk of de concentraties die met de immunoassay worden bepaald overeenkomen met de 'werkelijke' waarde. Als referentie is een GC-MS-bepaling naast de immunoassay uitgevoerd. Hiertoe zijn verschillende concentraties 2,4-D aan rivierwater toegevoegd, waarna ze met beide meetmethoden zijn gemeten. Grafisch uitgezet levert dit afbeelding 3.



Afb. 3 - Rivierwater waaraan 2,4-D is toegevoegd, is gemeten met beide assays en GC-MS als referentie. Uitgezet zijn gemeten concentraties tegen de referentiewaarde.

Duidelijk is dat de waarden van de GC-MS-analyse en de immunoassay goed overeenkomen als bij de immunoassay de kit-buffer als matrix voor de standaarden wordt gebruikt.

Praktijkmonsters

In de loop van het jaar is een groot aantal watermonsters (Rijn- en Maaswater) verzameld waarvan bij de WRK met GC-MS de 2,4-D-concentratie is bepaald.

Van al deze monsters is ook met een ELISA de 2,4-D-concentratie bepaald. Bijna alle bepaalde concentraties zijn echter met GC-MS niet detecteerbaar, waardoor een vergelijking moeilijk wordt.

Conclusie

Beide kits leveren een mogelijkheid om de doelverbinding, 2,4-D, met een lage detectielimiet te meten. Uit de referentiemetingen blijkt dat de overeenkomst met de GC-MS-bepaling goed te noemen is. De detectielimiet van de Bakerkit is echter (soms) te hoog voor het gestelde doel, de Milliporekit kent dit probleem niet.

De gemeten concentraties 2,4-D worden sterk beïnvloed door de wijze van monstername en monsteropslag. Dit probleem zal zich in de praktijk duidelijk manifesteren aangezien verdere monster-voorbewerking achterwege blijft. Alleen strikte standaardisatie van de monstername en de opslagcondities kunnen deze beïnvloeding voorkomen.

De gemeten concentraties zullen natuurlijk enigszins beïnvloed worden door kruisreagerende stoffen. Dit valt bij een immunoassay niet of nauwelijks te voorkomen, maar van de belangrijkste verbindingen kan worden vastgesteld dat zij het meetresultaat slechts voor enkele procenten beïnvloeden. De onderzochte assays zijn dus stofgericht en missen derhalve het stofgroep-gerichte karakter.

De assays kunnen zonder enige monster-

voorbewerking worden uitgevoerd. Dit betekent dat men binnen 2 à 3 uur (de tijd die men voor de assay nodig zal hebben), vrijwel zonder speciale voorzieningen de bepaling kan uitvoeren. Er bestaat een mogelijkheid om, met behulp van een draagbare spectrofotometer de gehele bepaling 'in het veld' uit te voeren.

Literatuur

1. Mulder, W. H., Hofman, J. A., Stoks, P. G. M. en Rosmalen, F. M. A. (1991). *Toepassing van de immunochemie in het waterkwaliteitsonderzoek: immuno-affiniteitschromatografie en ELISA van Triazines in oppervlaktewater*. H₂O (24) nr. 3 pp. 56-59
2. Meulenbergh, P. M. M., Stoks, P. G. M. en Mulder, W. H. (1993). *Immunoassays: toepassing in waterkwaliteitsonderzoek*. H₂O (26) nr. 20 pp. 588-593
3. Beveren, J. van en Noij, T. H. M. (1991). *Oriënterend onderzoek immunoassays voor triazines in water*. Kiwa SWI 91.137.
4. Beenackers, M. en Meulenbergh, P. (1994). *Schermen van het gehalte 2,4-D in Rijnwater met een immunoassay*. ELTI Support.

Vewin: Nitraat in drinkwater niet schadelijk voor baby's

Zuigelingen en jonge kinderen lopen in Nederland geen gevaar door nitraat in het drinkwater. Het gehalte in het drinkwater is altijd onder de norm van 50 milligram per liter, waardoor ieder gezondheidsrisico wordt uitgesloten. Alleen zuigelingen met ernstige maag- en darmstoornissen kunnen beter flesvoeding met nitraatarm water drinken.

De waterleidingexploitanten (Vewin) zeggen dat in reactie op berichten van de Consumentenbond, die beweert dat een nitraatgehalte van meer dan 10 mg per liter een risico voor baby's met zich meebengt. De informatie berust volgens de Vewin op een verkeerde interpretatie van medische gegevens.

Een woordvoerder van de inspectie voor de gezondheidszorg bevestigt dat het om een eigen interpretatie van de Consumentenbond gaat. De inspectie noch de Wereldgezondheidsorganisatie ziet aanleiding om de huidige normen aan te scherpen. 'Als nitraat onder de norm van 50 mg per liter blijft, betekent het dat het water voor alle doeleinden geschikt is'.

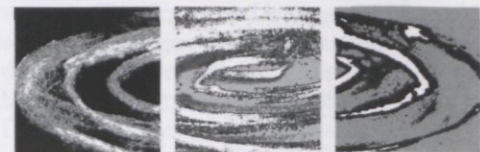
Nitraat is zelf niet giftig, maar wordt in het lichaam omgezet in nitriet, dat wel schadelijk is. Nitriet verstoort het zuurstoftransport in het bloed. Bij baby's met ernstige maag- en darmstoornissen (een kleine groep) bestaat de mogelijkheid dat meer nitraat wordt omgezet. Daarom moet in hun flesvoeding wel nitraatarm water worden gebruikt. Consultatiebureaus, huisartsen en kinderartsen zijn hiervan volgens de Vewin al geruime tijd op de hoogte. (ANP)

15e IAWR Arbeitstagung

De IAWR organiseert van 21 mei tot en met 25 mei 1996 de 15e Arbeitstagung met als thema 'Neue Anforderungen an den Rhein'. Tijdens de Arbeitstagung zullen de problemen bij bescherming van het oppervlaktewater en de drinkwaterwinning uit de Rijn en andere rivieren aan de orde komen.

Nadere inlichtingen: RIWA/IAWR, dr. W. Jülich, Postbus 8160, 1005 AD Amsterdam, telefoon 020 - 580 23 33.

Wateropleidingen



Cursus Kwaliteitsbeheer Oppervlaktewater

Doelgroep

De cursus is bedoeld voor medewerkers van oppervlaktewaterbeheerders, milieu- en waterafdelingen van provincies en gemeenten, enzovoorts. De cursus is niet alleen bedoeld voor biologen en chemici, maar ook voor juridisch en financieel-economisch opgeleide medewerkers is de cursus geschikt.

De cursus wordt op HBO-niveau gegeven. Basiskennis van scheikunde is vereist.