

Miljøprojekt Nr. 827 2003

Metodeafprøvning af metode til analyse af kationiske detergenter

Anders Favrebo og Nis Hansen
Eurofins A/S

Miljøstyrelsen vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling.

Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter.

Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Indhold

FORORD	4
1 METODEAFPRØVNING	6
1.1 PROGRAM OG BEGRÆNSNINGER	6
1.2 RESULTATER	7
1.3 SPØRGESKEMAUNDERSØGELSE	7
1.4 HOMOGENITETSTEST	8
1.5 VURDERING AF METODEN	8
1.5.1 Korrekthed (genfindning)	9
1.5.2 Præcision (repetérbarhed og reproducerbarhed)	12
1.5.3 Detektionsgrænse	13
1.5.4 Vurdering af brugen af intern standard til korrektion	13
2 KONKLUSIONER OG ANBEFALINGER	15
3 REFERENCER	16
Bilag A: Metodeforskrift – <i>udkast til metodeafprøvningen</i> –	
Bilag B: Metodeforskrift	
Bilag C: Rådata for metodeafprøvningen	
Bilag D: Spørgeskema	
Bilag E: Resultater fra spørgeskemaundersøgelse	
Bilag F: Genberegnete resultater	
Bilag G: Homogenitetstest	
Bilag H: Korrespondance med laboratorierne	
Bilag I: Symboler og forkortelser	

Forord

Detergenter, anioniske og kationiske, anvendes i store mængder i danske husholdninger og i industriprodukter, primært i vaske- og rengøringsprodukter. Derfor er belastningen i spildevandet og af renseanlæggene stor. I overvågningsprogrammet for vandmiljøet, NOVA 2003, er det ønsket at vurdere, hvilken belastning der er på miljøet fra renseanlæggene. Derfor er det nødvendigt på afløb fra renseanlæggene at kunne måle for såvel kationiske som anioniske detergenter.

Der anvendes mange forskellige typer af kationiske og anioniske detergenter. Derfor er en ikke-specifik metode ønskelig for først at konstatere, hvad det totale indhold af detergenter er i prøven. Hvis der findes detergenter med den ikke-specifikke metode, kan prøven evt. efterfølgende analyseres med en specifik metode.

En metode til opkoncentrering og separation af kationiske detergenter fra anioniske og nonioniske detergenter i afløbsspildevand blev udviklet på baggrund af et litteraturstudie af J. Merry et al, (1999) /1/, A. Favrbø et al (2002) /2/ samt analyseforarbejdet af K.-H. Theil (2001) /3/. Metoden bygger på princippet beskrevet af Kloster et al (1994) /4/ og N. Buschmann et al (1992) /5/.

Princippet i den udviklede metode er, at detergenterne i prøven opkoncentreres ved, at de tilbageholdes på en PPL-kolonne. Herefter elueres med 50:50 metanol/ethylacetat i 10 mM ammoniumacetat, efterfulgt af en inddampning og genopløsning i ethylacetat. Nonioniske, kationiske og anioniske detergenter kan derefter separeres ved en fastfaseekstraktion på en alumina-kolonne. Detergenterne elueres med forskellige organiske solventer i den nævnte rækkefølge. Kationiske detergenter elueres med 95:5 metanol/trifluoreddikesyre og bestemmes spektrofotometrisk ved 628 nm ved en detektionsmetode svarende til DIN 38409 Teil 20 (1989) /8/. De enkelte deltrin er undersøgt og optimeret separat /2/.

Den udviklede metode skulle opfylde krav svarende til kvalitetsklasse 3 i bekendtgørelse 637 (Miljø- og Energiministeriet, 1997) /6/ samt have et måleområde mellem 10 µg/L og 200 µg/L.

Den udviklede metode blev valideret af A. Favrbø et al (2002) /2/ efter principperne i "Håndbog for metodevalidering for miljølaboratorier" /7/. Her blev fundet, at metoden var lineær til 200 µg/L.

Detektionsgrænseundersøgelsen viste, at en detektionsgrænse på 10 µg/L var realistisk. Den relative standardafvigelse blev fundet til at variere mellem 8,2 og 12,5%. Dette var højere end kravet på $\pm 7\%$ til kvalitetsklasse 3. Da kravet i bekendtgørelsen bygger på en beregning af mere end 20 kontrolprøvepar, og der i denne undersøgelse kun indgik 4-5 prøvepar, vil kravet formentligt kunne overholdes, når antallet af bestemmelser stiger også som følge af en større rutine.

Genfindingen af middelværdien for kontrolprøver må i kvalitetsklasse 3 højst variere $\pm 5\%$ (for prøver over 5 gange detektionsgrænsen). Resultaterne fra

valideringsforsøgene viste, at vi generelt fandt 8,7% til 12,6% mindre end det forventede.

Metodeafprøvningen i denne rapport skal derfor være med til at belyse, om det er nødvendigt at korrigere for dette tab, enten ved at spike en af prøverne eller ud fra en medianalyseret syntetisk prøve. Endvidere skal metodeafprøvningen belyse, om den udviklede metode er generelt anvendelig til analyser af kationiske detergenter i spildevand, og om analysekvaliteten er tilstrækkelig god, til at analysen kan indgå i overvågningsprogrammet.

En speciel tak til Henning Fallesen (Steins Laboratorium A/S) og Torben Knudsen (ROVESTA Miljø I/S) for deltagelsen i denne metodeafprøvning og for den konstruktive feedback før, under og efter metodeafprøvningen.

1 Metodeafprøvning

1.1 Program og begrænsninger

12 danske, 1 finsk, 1 norsk og 1 svensk laboratorium blev inviteret med i metodeafprøvningen, der var gratis. Kun 2 eksterne danske laboratorier (ROVESTA Miljø I/S og Steins Laboratorium A/S) ønskede at deltage. Det blev derfor besluttet, at Eurofins A/S laboratoriet i Hørsholm også skulle deltage og indgå i metodeafprøvningen.

I metodeafprøvningen var det et mål at undersøge både syntetiske og naturlige matricer i hele metodens dynamiske måleområde. Det begrænsede antal deltagere gjorde, at antallet af frihedsgrader i de statistiske tests var meget få, og antallet af bestemmelser på de enkelte prøver måtte øges. Da laboratoriet i Hørsholm skulle deltage, var det nødvendigt at designe afprøvningen, så den samtidigt kun teste, om prøverne var homogene. Da kapaciteten af metoden gør, at der maksimalt kan analyseres 16 prøver/dag, blev følgende afprøvningsprogram opstillet og gennemført.

Analysedag	Prøve	Indhold ^{D)}	Antal bestemmelser	Prøvemærkning
1	Syntetisk prøve	50 µg/L	2+2 ^{A)}	A + B
1	Spildevand 1 ^{C)}	30 µg/L	2+2	C + D
1	Blind ^{B)}	-	2	
1	Kontrol ^{B)}	100 µg/L	2	
1	Kalibreringskontrol ^{B)}	50 µg	2	
2	Spildevand 2 ^{C)}	50 µg/L	2+2	E + F
2	Spildevand 2 ^{C)}	100 µg/L	2+2	G + H
2	Blind ^{B)}	-	2	
2	Kontrol ^{B)}	100 µg/L	2	
2	Kalibreringskontrol ^{B)}	50 µg	2	

Tabel 1-1 Program for metodeafprøvningen.

^{A)} For at kunne teste homogeniteten med det maksimale antal frihedsgrader, sendes ens prøvepar ud til dobbeltbestemmelse for alle prøverne. Derved fås 2 dobbeltbestemmelser. ^{B)} Blindprøve- og kontrolprøveresultaterne stammer fra laboratoriernes egne bestemmelser (jf. afsnit 6.3 i bilag A) ^{C)} Her var spildevand 1 (Hårslev renseanlæg (Fyn), afløb) og spildevand 2 (Havndal renseanlæg i Mariager, afløb). Begge blev filtreret med 0,45 µm membranfilter inden spikening. ^{D)} Indholdet blev bestemt ud fra de tilsatte mængder af ADMBAC. Ved tidligere undersøgelser (ikke gengivet her) blev det vist, at indholdet af kationiske detergenter i spildevand 1 og 2 ikke var detekterbart.

I metodeundersøgelsen blev alkyldimethylbenzylammoniumchlorid (ADMBAC) benyttet til spikening af prøverne, da erfaringen viser, at denne er væsentligt mere stabil end disteryldimethylammoniumchlorid (DSDMAC), som blev benyttet som standardstof i metoden.

De to analysedage var henholdsvis torsdag den 23. og 30. oktober. Prøverne blev fremstillet henholdsvis mandag den 21. og 28. oktober 2002. Prøverne blev aftappet i specielt rensede glasflasker og fremsendt til laboratorierne i køletasker. Metoden blev udsendt til laboratorierne inden analysedagene. Metoden, der blev udsendt til laboratorierne er gengivet i bilag A. Metodevalideringen i /2/ gav anledning til nogle små ændringer i metoden.

Ændringerne var hovedsageligt en justering af mængderne af reagenser, der skulle fremstilles. Disse ændringer blev markeret med "Track Changes"-funktionen i bilag A. Korrespondancen, der fulgte prøverne, er gengivet i bilag H.

1.2 Resultater

De deltagende laboratoriers resultater er gengivet i bilag C.

Der blev observeret en klar tendens til, at laboratorierne fandt systematisk forskellige resultater, således at laboratorium 1 fandt højere resultater end laboratorium 2, som igen fandt højere resultater end laboratorium 3. Brugtes resultaterne i bilag C til en homogenitetstest med programmet ISO 5725 (bygger på robusthedsstatistik fra bl.a. DS/ISO 5725-5 /9/), blev prøverne fundet homogene. Dette skyldes, at variationen mellem laboratorierne var meget stor sammenlignet med variationen mellem prøveparrene inden for laboratorierne.

Tendensen gik igen for alle prøver og også for kontrolprøverne. For at få belyst denne tendens blev der sendt et spørgeskema til de deltagende laboratorier.

1.3 Spørgeskemaundersøgelse

Det udsendte spørgeskema fremgår af bilag D. Svarene fra de 3 laboratorier er gengivet i bilag E.

Laboratorium 3 skrev til spørgsmålet om kuvettestørrelse "5 cm (ikke nok prøve til 10 cm kuvette)". I afsnit 6.1 i metoden skrives, at der skal anvendes en 10 mm kuvette. Denne afvigelse fra metoden vil der blive korrigeret for gennem brugen af kalibreringskurven.

I spørgsmål 3 har laboratorium 3 skrevet, at de "afvejer 100 mg/500 mL, som de fortynder til 10 mg/L". Da dette laboratorium har opnået afvigende resultater fra de to andre, vil denne ændring ikke indgå i den reviderede metodeforskrift (bilag B).

Af svarene omkring brugen af standard- og kontrolstoffer fremgik det, at laboratorium 1 og 2 brugte samme fabrikat for begge stoffer. Denne forskel kan tænkes at medføre en systematisk påvirkning af resultater mellem laboratorierne.

Spørgeskemaundersøgelsen viste endvidere, at der var forskellige måder at udregne resultaterne på. Derfor blev alle resultaterne genberegnet ud fra absorbanterne i originaldata. Dette gav en væsentlig forskel for laboratorium 3.

I disse beregninger er benyttet følgende udregninger for prøverne. Disse nye formler implementeres i metodeforskriften for at sikre en ensartet udregning:

$$X = \frac{A_{\text{prøve}} - A_{\text{blindprøve}}}{\text{Vol}_{\text{prøve}} \cdot \alpha} \cdot 1000$$

hvor:

X er resultatet i µg/L

$A_{\text{prøve}}$ er absorbansen ved 628 nm for prøven
 $A_{\text{blindprøve}}$ er gennemsnittet af absorbanserne ved 628 nm for blindanalyserne, der er analyseret sammen med prøverne
 $Vol_{\text{prøve}}$ er volumenet i mL af prøve benyttet til analysen
 α er hældningen af standardkurven fra punkt 6.2 i metodeforskriften

Til udregning af blindværdierne blev benyttet:

$$X_{\text{blindprøve}} = \frac{A_{\text{blindprøve}} - A_{\text{blindstandard}}}{Vol_{\text{blindprøve}} \cdot \alpha} \cdot 1000$$

hvor:

X er resultatet i $\mu\text{g/L}$
 $A_{\text{blindprøve}}$ er absorbansen ved 628 nm for de medianalyserede blindprøver
 $A_{\text{blindstandard}}$ er absorbansen ved skæringen af standardkurven med y-aksen
 $Vol_{\text{blindprøve}}$ er volumenet i mL af blindprøven benyttet til analysen
 α er hældningen af standardkurven fra punkt 6.2 i metodeforskriften.

Endelig skal resultatet af kalibreringskontrollen beregnet efter:

$$X_{\text{kalibreringskontrol}} = \frac{A_{\text{kalibreringskontrol}} - A_{\text{blindstandard}}}{\alpha}$$

hvor:

X er resultatet i μg
 $A_{\text{kalibreringskontrol}}$ er absorbansen ved 628 nm for kalibreringskontrollerne
 $A_{\text{blindstandard}}$ er absorbansen ved skæringen af standardkurven med y-aksen
 α er hældningen af standardkurven fra punkt 6.2 i metodeforskriften.

De genberegnete resultater findes i bilag F. Efter metodevalideringen /2/ blev det på grund af en lav genfinding (87-91 %) besluttet at undersøge om en korrektion med en medianalyseret kontrolprøve kunne forbedre denne genfinding. Derfor er der i bilag F også gengivet resultaterne efter en sådan korrektion. Denne blev foretaget ud fra laboratoriernes resultater fra kontrolprøve 100.

1.4 Homogenitetstest

De genberegnete data blev benyttet til en homogenitetstest med programmet ISO 5725 (version 3.31, september 2002). Nøgletallene fra homogenitetstesten findes i bilag G. For at validere, om prøveparrene var homogene, divideredes spredningen fra homogeniteten ($s^2(H)$) med spredningen mellem laboratorierne ($s^2(L)$). Denne teststørrelse blev sammenlignet med en F-test værdi (95%-niveau). Da $s^2(H)/s^2(L)$ var mindre end 1 for alle prøvepar (både ikke-korrigeret og korrigeret) var de homogene på et 95%-niveau. Derfor kan resultaterne for prøvepar A og B, prøvepar C og D, prøvepar E og F samt resultaterne fra prøvepar G og H pooleres således, at der kan opnås bedre estimater for de statistiske nøgleparametrene.

1.5 Vurdering af metoden

Tabel 1-2 viser en oversigt over statistiske nøgleparametre udregnet både med og uden korrektion for den medianalyserede kontrolprøve.

Prøve	Uden korrektion				Med korrektion			
	A/B	C/D	E/F	G/H	A/B	C/D	E/F	G/H
p, antal laboratorier	3	3	3	3	3	3	3	3
n, antal replikater	2+2	2+2	2+2	2+2	2+2	2+2	2+2	2+2
, nominal værdi, µg/L	50	30	50	100	50	30	50	100
m, middelværdi, µg/L	50,5	29,6	63,2	113	46,9	27,6	62,5	113
genfindings, %	101	99	127	113	94	93	125	113
s, µg/L	3,1	5,7	11,3	4,7	3,1	6,3	12,7	3,6
s _r , µg/L	13,0	11,8	13,2	26,1	4,2	7,4	22,9	46,4
s _r , µg/L	13,4	13,1	17,3	26,5	5,2	9,7	26,2	46,5
CV _r , %	6,2	19	23	4,7	6,1	21	26	3,6
CV _i , %	26	39	26	26	8,4	15	46	46
CV _r , %	27	44	35	27	10,4	32	52	47

Tabel 1-2 Generel analysekvalitet for kationiske detergenter bestemt med og uden korrektion for medianalyseret kontrolprøve 100. Originaldata findes i bilag F og G.

I de næste afsnit undersøges korrekthed, præcision (reproducerbarhed og reproducerbarhed) og detektionsgrænse.

1.5.1 Korrekthed (genfindings)

Genfindingen af prøverne og den tilsatte spike-opløsning er vist nedenfor i Tabel 1-3.

Prøve	Teoretisk værdi µg/L	Uden korrektion		Med korrektion	
		Fundet middelværdi µg/L	Genfindings %	Fundet middelværdi µg/L	Genfindings %
A/B	50	50,5	101	46,9	94
C/D	30	29,6	99	27,6	93
E/F	50	63,2	127	62,5	125
G/H	100	113	113	113	113
(G/H)-(E/F)	50	49,8	100	51	102
Middelgenfindings, %		-	108	-	105
Spredningen på genfindings		-	12	-	14

Tabel 1-3: Genfindings af tilsatte spikeopløsninger og af kvalitetskontrolopløsning med og uden korrektion med genfindings af medianalyseret kontrolprøve (her kontrolprøve 100).

Middelgenfindings, når der korrigeres med kontrolprøve 100, er fundet til 105%, hvilket er bedre end hvis der ikke bliver korrigeret (108%), men forskellen er ikke stor. Sammenlignes middelgenfindings med en parret t-test, er der ikke signifikant forskel på de to (95%-signifikansniveau). Der er derfor intet i disse tal der tyder på at en korrektion med kontrolprøve 100 giver en signifikant bedre genfindings.

Genfindings uden korrektion varierede i intervallet 99-127%.

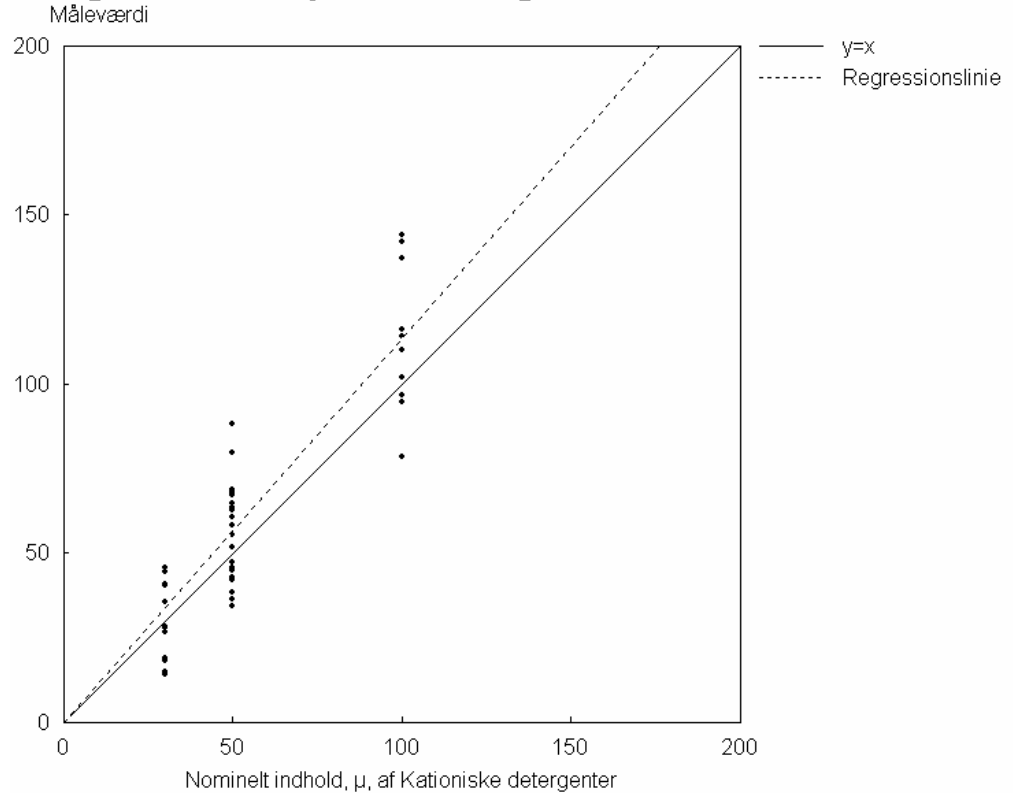
Genfindings på spildevand 2 (Havndal renseanlæg i Mariager, afløb), findes generelt for højt (113 og 127%). Råspildevandet blev undersøgt i forundersøgelserne og ved metodeudviklings /2/. Her blev der ikke detekteret et indhold af kationiske detergenter, der kunne forklare den højere genfindings. Da detektionsgrænsen for metoden forventes at være 10 µg/L kan der godt være et indhold af kationiske detergenter i prøven under de 10 µg/L. Dette kan forklare de lidt høje genfindings. Denne teori understøttes af at forskellen mellem prøvepar G/H og E/F var 49,8 µg/L, hvilket var en 100% genfindings af et spike på 50 µg/L. Ved at se på forskellen negligeres bidraget fra prøven. Genfindings varierer derfor mellem 99-101 %. Denne konklusion skal tages

med et stort forbehold, da spredningen på gennemsnittet er af en betydelig størrelse (se afsnit 1.5.2).

Kravet til genfindingen af middelværdien af interne kontrolprøver i kvalitetsklasse 3 er $\pm 5\%$. Dette krav overholdes for nogle prøver (A/B og C/D) og for splittet mellem G/H og E/F.

Sammenhængen mellem nominel værdi og laboratoriernes måleværdier er vist i figur 1-1.

Regressionsanalyse af samtlige laboratorier



Figur 1-1 Sammenhæng mellem nominel værdi og målt værdi.

Som det fremgår af figuren, var der en lineær sammenhæng mellem de nominelle og de målte værdier. Figuren viser også tendens til, at metoden giver større resultater end de nominelt fastsatte værdier og viser en betydelig spredning for hvert målepunkt. Ligningen fundet ved regressionsanalysen var $Y=1,15X-1,8$. Altså ca. 15% højere resultater end den nominelle værdi. En regressionsanalyse for resultaterne korrigeret med kontrolprøve 100 gav ligningen $Y=1,17X-1,2$, altså tilsvarende for højt. En korrektion med genfindingen af en medianalyseret kontrolprøve (kontrolprøve 100) giver derfor ikke en bedre middelgenfinding.

Det er ønskeligt, at den udviklede metode opfylder kravene i kvalitetsklasse 3 i bekendtgørelse 637 /2/. Her er kravet til ekstern kvalitetskontrol (præstationsprøvninger), at enkelt prøver højst må afvige 30% fra den nominelle værdi.

Prøve	Teoretisk værdi µg/L	Laboratorium 1 (%)		Laboratorium 2 (%)		Laboratorium 3 (%)	
		Uden korrektion	Med korrektion	Uden korrektion	Med korrektion	Uden korrektion	Med korrektion
A/B	30	125-134	99-106	69-84	75-84	92-110	91-110
C/D	50	134-152	106-120	61-120	67-131	47-93	47-93
E/F	50	129-137	99-103	137-144	90-127	116-176	191-240
G/H	100	102-114	78-87	78-96	82-101	137-144	165-173

Tabel 1-4 Genfindingsintervaller for enkeltprøver for hvert laboratorium. Originaldata findes i bilag F. Med fed skrift er markeret de intervaller, der overholdt kravene i kvalitetsklasse 3 /2/.

Tabel 1-4 viser, at antallet af prøvepar, der overholdt kravet til bekendtgørelse 637 er markant større, når der korrigeres for kontrolprøvens genfinding. Med korrektion kan laboratorium 1 og 2 overholde kravet for 32 ud af 34 analyseresultater mod kun 23 uden korrektion.

I næste afsnit undersøges, om korrektionen giver anledning til en bedre præcision i form af bedre reproducerbarhed for metoden.

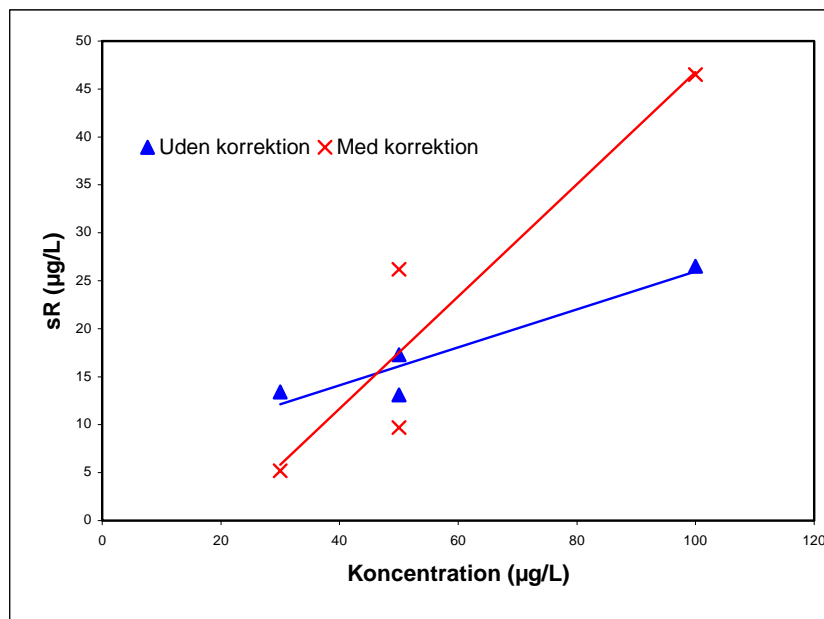
1.5.2 Præcision (repeterbarhed og reproducerbarhed)

Præcisionen opnået med og uden korrektion med genfindingen af en medianalyseret kontrolprøve ses i tabel 1-5.

Prøve	Teoretisk værdi $\mu\text{g/L}$	s_r ($\mu\text{g/L}$)		s_R ($\mu\text{g/L}$)	
		Uden korrektion	Med korrektion	Uden korrektion	Med korrektion
A/B	30	3,1	3,1	13,4	5,2
C/D	50	5,7	6,3	13,1	9,7
E/F	50	11,3	12,7	17,3	26,2
G/H	100	4,7	3,6	26,5	46,5

Tabel 1-5 Præcision med og uden korrektion fra tilsat standard.

Tabel 1-5 viser for repeterbarhedsstandardafvigelsen (s_r) dels, at der ikke skete en entydig stigning af s_r med stigende koncentration, og dels, at s_r uden korrektion er sammenlignelig med s_r for de korrigerede resultater. I modsætning hertil viser reproducerbarhedsstandardafvigelsen (s_R) stigning med stigende koncentration for begge rækker af analyseresultater. Dette er illustreret med figur 1-2.



Figur 1-2 Reproducerbarhedsstandardafvigelse (s_R) for resultaterne med og uden korrektion med genfindingen af en medianalyseret kontrolprøve (her kontrolprøve 100).

I præstationsprøvninger viser erfaringen /10/, at hvis s_r (eller CV_r) fundet ved præstationsprøvningen er større end kravet i bekendtgørelse 637, kan det med

sikkerhed konkluderes, at kravet ikke er opfyldt. Det kan imidlertid ikke konkluderes modsat, at krav til standardafvigelse kan overholdes, såfremt s_r , henholdsvis CV_r , er mindre end kravet i Bekendtgørelse nr. 637, idet laboratoriernes dag-til-dag variation ikke belyses ved en præstationsprøvning. Hvis man projekterer denne viden over på denne metodeafprøvning, ses ud fra tabel 1-6, at kravet til standardafvigelsen på $\pm 7\%$ ikke er overholdt for prøvepar C/D og E/F, mens kravet er overholdt (med ovenstående forbehold) for de resterende prøvepar. CV_r er forventeligt overensstemmende med og uden korrektion.

Prøve	Teoretisk værdi $\mu\text{g/L}$	CV_r (%)	
		Uden korrektion	Med korrektion
A/B	30	6,2	6,1
C/D	50	19	21
E/F	50	23	26
G/H	100	4,7	3,6

Tabel 1-6 Præcision med og uden korrektion fra tilsat standard.

1.5.3 Detektionsgrænse

Detektionsgrænsen er her defineret som

$$DL = t_{0,995}(df) \cdot s_r$$

hvor s_r er standardafvigelse for repeterbarhed for prøver med koncentration tæt på den forventede detektionsgrænse, $t_{0,995}$ er Student's t-værdi på 99,5% konfidensniveau, og df er antallet af frihedsgrader for s_r (jf. Miljøstyrelsens anbefalinger). Til udregning af detektionsgrænsen benyttes prøverne mindre end 5 gange den ønskede detektionsgrænse. Her benyttes prøvepar A/B. Repeterbarhedsstandardafvigelsen (s_r) for prøveparret A/B var $3,1 \mu\text{g/L}$ (jf. Tabel 1-5). Antallet af frihedsgrader er her $(4-1)+(4-1)+(3+1) = 8$, og ved tabelopslag blev $t_{0,995}$ fundet til 3,355.

Detektionsgrænsen blev derfor udregnet til $10 \mu\text{g/L}$, hvorfor metoden opfylder det opstillede krav om en detektionsgrænse på $10 \mu\text{g/L}$.

1.5.4 Vurdering af korrektion med genfinding af kontrolprøve

I den ovenstående tekst er det forsøgt at klarlægge, om der skal korrigeres med en genfinding af en kontrolprøve i metoden for at opnå en bedre genfinding. I afsnit 1.5.1 er det fundet, at denne korrektion ikke ændrede middelgenfindingen signifikant. Ligeledes er der ikke signifikant forskel på ligningerne i regressionsanalysen for sammenhængen mellem nominel værdi og den analyserede værdi. For at metoden skal overholde kravene til ekstern kontrol i kvalitetsklasse 3 /2/, må resultaterne for enkeltprøver kun afvige 30% fra den nominelle værdi. Korrektionen påvirker ikke resultaterne fra laboratorium 3, mens med korrektion kan laboratorium 1 og 2 overholde kravet for 32 ud af 34 analyseresultater mod kun 23 uden korrektion.

I afsnittet om præcision (1.5.2) er det fundet, at reproducerbarhedsstandardafvigelsen (s_r) er væsentligt højere for prøver med høje koncentrationer for det tilfælde, hvor der er korrigeret med genfindingen af en medianalyseret kontrolprøve.

Konklusion er, at korrektionen giver en bedre genfinding, når der ses på enkelte resultater, mens reproducerbarhedsstandardafvigelsen er dårligere. Det er vurderet, at stigningen af reproducerbarhedsstandardafvigelsen (s_R) er værre end gevinsten ved den forbedrede genfinding af den nominelle værdi, samt at en korrektion med genfindingen af en medianalyseret kontrolprøve vil gøre metoden endnu tungere. Derfor er denne korrektion ikke indført i metoden.

2 Konklusioner og anbefalinger

Metodeafprøvningen viste, at den udviklede metode til bestemmelse af kationiske detergenter i afløbsvand var egnet til formålet. Denne konklusion skal dog tages med et forbehold på grund af det meget begrænsede deltagerantal, kun tre inklusiv Eurofins A/S. Det blev på baggrund af resultaterne konkluderet, at der ikke skal korrigeres i metoden med genfindingen af en medianalyseret kontrolprøve. Metodeafprøvningen viste kvalitetsparametre for metoden som anført nedenfor.

Korrekthed:

Middelgenfinding 108%, varierende fra 100 til 127% (4 prøvepar og 1 prøvepar med spike).

Repetierbarhed:

3,1 – 11 µg/L ved koncentrationer op til og med 5 gange detektionsgrænsen 50 µg/L (3 prøvepar).
5% i koncentrationsområdet over detektionsgrænsen på 50 µg/L (1 prøvepar).

Reproducerbarhed:

13-17 µg/L ved koncentrationer op til og med 5 gange detektionsgrænsen 50 µg/L (3 prøvepar).
27 % i koncentrationsområdet over detektionsgrænsen på 50 µg/L (1 prøvepar).

Detektionsgrænse:

Ud fra standardafvigelsen for repeterbarhed ved lav koncentration (mindre end 5 gange detektionsgrænsen) blev fundet, at en detektionsgrænse på 10 µg/L kan overholdes.

Detektionsgrænsen er her defineret som

$$DL = t_{0,995}(df) \cdot s_r$$

hvor s_r er standardafvigelse for repeterbarhed for prøver med koncentration tæt på den forventede detektionsgrænse, $t_{0,995}$ er Student's t-værdi på 99,5% konfidensniveau, og df er antallet af frihedsgrader for s_r .

Det anbefales at udgive metoden, som anført i bilag B, som metode fra Miljøstyrelsens referencelaboratorium for kemiske miljøanalyser og afprøve den i en præstationsprøvning med henblik på udpegning af laboratorier til analyse af kationiske detergenter under overvågningsprogrammet. Metoden i bilag B svarer til metoden (bilag A) udsendt i metodeafprøvningen, dog med ændringer i afsnit 6.4 og 6.5.

Den relativt store variation mellem laboratorierne kan formentlig forklares med, for det første, at det er en ny og relativt kompliceret metode og, for det andet, det meget beskedne deltagerantal i metodeafprøvningen. Det anbefales at opsamle yderligere data om variation mellem laboratorierne efter den anbefalede præstationsprøvning. Såfremt disse data giver grundlag herfor, revideres metodens angivelse af reproducerbarhed.

3 Referencer

- /1/ Merry, J., Bøwadt, S., Dybdahl, H.P., Madsen, T. (1999). **Overview of Analytical Methods for Determination of Anionic and Cationic Surfactants in Danish Drinking Water and Ground Water**. VKI
- /2/ Favrbø, A., C. Grøn, Hansen, N. (2002). **Udvikling og validering af metode til analyse af kationiske detergenter**. Eurofins A/S, Hørsholm
- /3/ Theil K.-H., (2002) **"Bestemmelse af ioniske og nonioniske detergenter i spildevand og spildevandsslam"**. Speciale ved Københavns Universitet
- /4/ Kloster, G. et al., (1994) **Entwicklung eines einheitlichen trennungsganges zur anreicherung aller drei tensidklassen aus umweltsproben.**, Tenside Surf. Det., 31(1), 23-28.
- /5/ Buschmann, N., Kruse, A., Schulz, R., (1992) **Separation of surfactants using solid phase extraction (SPE)**. Jornadas del Comite Espanol de la Detergencia., 23, 317-322
- /6/ Miljø- og Energiministeriets Bekendtgørelse nr. 637 (1997). **Bekendtgørelse om kvalitetskrav til miljømålinger udført af akkrediterede laboratorier, certificerede personer m.v.**
- /7/ Lund, U., Andersen, K., Settergren, P., (1994). **Håndbog i metodevalidering for miljølaboratorier**. VKI, Hørsholm.
- /8/ DIN 38409 Teil 20 (1989). **Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H) – Bestimmung der disulfidblau-aktiven Substanzen (H 20)**.
- /9/ DS/ISO 5725-5, (2000). **Nøjagtighed (korrekthed og præcision) af målemetoder – Del 5: Alternative metoder til bestemmelse af præcisionen af en standardiseret målemetode**
- /10/ Lund, U., (2001), **Sammenstilling af analysekvalitet fra præstationsprøvnings 1990-2001**, DHI, Hørsholm.

Metodeforskrift

Bestemmelse af kationiske overfladeaktive stoffer i spildevand

Oktober 2002

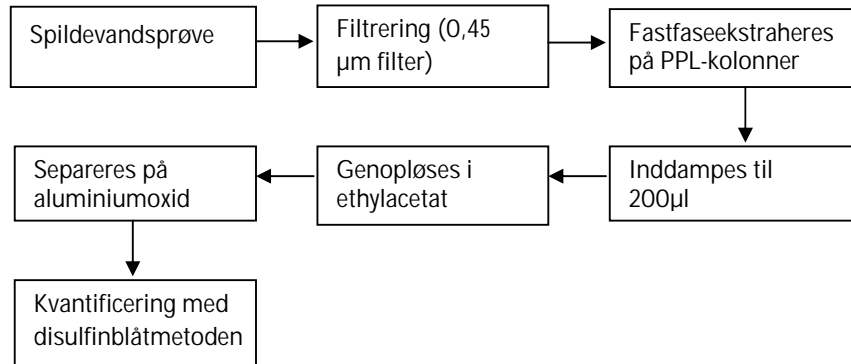
1 Anvendelsesområde

Følgende metode kan anvendes til bestemmelse af opløste disulfinblåaktive stoffer i spildevand, her specielt kationiske detergenter. Metodens kan anvendes til bestemmelse af kationiske detergenter i koncentrationsområdet 10-1000 µg/L. Det endelige koncentrationsområde fastlægges efter en metodevalidering.

2 Princip

En kendt mængde vandprøve (maksimum 500 mL) filtreres og sættes på en PPL-kolonne. Herved opkoncentreres detergenterne i prøven, og interfererende komponenter i grundprøven fjernes. De kationiske detergenter separeres fra de nonioniske og anioniske detergenter på basiske aluminiumoxid-kolonner. Kvantificering udføres med en kolorimetrisk metode, der benytter disulfidblåt til dannelse af farvede komplekser. Absorbansen måles ved en bølgelængden 628 nm.

3 Metodeoversigt



4 Udstyr og kemikalier

4.1 Spe-udstyr

Bond Elut, PPL-kolonner, 3 mL, 500 mg kolonnemateriale.
Mega BE-AL-B, alumina-kolonner, 6 mL, 1 g kolonnemateriale. Begge typer kolonner er straight barrel fra Varian.

SPE-kolonnerne anbringes på en VAC ELUT SPS 24 vacuum manifold fra Varian.

Slangesystemet består af 1/8" Teflon tubes, tube adapters (3 mL) og stainless steel weights fra Supelco.

4.2 Filtrering

Ved filtreringen anvendes 0,45 µm membranfilter, med en diameter på 47 mm af typen HVLP (Durapore) fra Millipore eller tilsvarende. Filtreringen udføres på en 1 L sugokolbe.

4.3 Kemikalier

Methanol, Merck, LiChrosolv
Ethylacetat, Merck, LiChrosolv
Chloroform, Merck, Pro Analysi
1-Butanol, Merck, Pro Analysi
Trifluoreddikesyre, Merck, for synthesis.

1 B447 Disulfinblau, Chroma-Gesellschaft.
Ammoniumacetat, Merck, Pro Analysi

4.4 Reagenser

Det anvendte vand skal enten være demineraliseret, destilleret eller Milli-Q vand. Følgende reagenser fremstilles:

4.4.1 0,05 M H₂SO₄

Tilsæt forsigtigt og under omrøring 2,75 mL koncentreret svovlsyre, H₂SO₄ (densitet 1,84 g/mL) til ca. 500 mL vand. Afkøl til stuetemperatur og fortynd til 1000 mL.

4.4.2 1 M NaOH

40,00 g NaOH opløses i 1000 mL vand.

4.4.3 Disulfinblåt-stamopløsning

60 mg disulfinblåt overføres til en 100 mL målekolbe og opløses i 10 mL ethanol. Fortyndes til 100 mL med vand. Denne opløsning har 1 måneds holdbarhed.

4.4.4 95:5 v/v chloroform/butanol-opløsning

| 50 mL butanol anbringes i en 1000 mL målekolbe. Fortyndes til 1000 mL med chloroform.

4.4.5 0,04 M citrat-buffer

21 g citronsyre monohydrat anbringes i en 1 l målekolbe, efterfulgt af 200 mL 1 M NaOH (4.4.2). Fortynd til 1000 mL med vand.

| 80 mL af denne opløsning blandes med ca. 120 mL 0.05 M H₂SO₄ (4.4.1). Den endelige pH skal være ca. 3. Denne opløsning har 1 uges holdbarhed.

4.4.6 Disulfinblåt-farvereagens

| 100 mL disulfinblåt-stamopløsning (4.4.3) blandes med 200 mL citrat-buffer (4.4.5) i en 500 mL skilletragt. Blandingen vaskes ved udrystning i skilletragt 3 gange med 50 mL butanol/chloroform-opløsning (4.4.4).

4.4.7 Renseopløsning

4500 mL 99% ethanol op til 5000 mL med koncentreret HCl (36%).

4.5 Standarder og kontroller

4.5.1 Stamopløsning 10,0 mg/L ADMBAC

Opløs 10,0 mg ADMBAC (benzalkoniumchlorid, alkyldimethylbenzylammoniumchlorid) i 1000 mL vand.

4.5.2 Stamopløsning 10,0 mg/L DSDMAC

Opløs 10,0 mg DSDMAC (distearyl-dimethyl-ammoniumchlorid) i 1000 mL methanol

4.6 Elueringssolventer

4.6.1 50:50 v/v methanol/ethylacetat med 10 mM ammoniumacetat

0,77 g ammoniumacetat overføres kvantitativt til en 1000 mL målekolbe med 500 mL methanol. Når alt ammoniumacetat er opløst tilsættes 500 mL ethylacetat.

4.6.2 95:5 v/v ethylacetat/methanol

5 mL methanol fortyndes op til 100 mL med ethylacetat.

4.6.3 95:5 v/v methanol/trifluoreddikesyre

5 mL trifluoreddikesyre fortyndes op til 100 mL med methanol.

4.7 Glasudstyr

50 mL høje bægerglas

Urglas (50 mm)

10 mL graduerede spidsglas (graduering på 100 µL)

50 mL målekolber

Små glastragte

500 mL skilletragte

Standard laboratorieglassudstyr

4.7.1 Vaskeprocedure

Alt glasudstyr vaskes i renseopløsningen (4.4.7) og skylles i Milli-Q vand 3 gange. Tørres i varmeskab (105°C).

4.8 Apparatur

Fotometrisk udstyr til måling ved en bølgelængde på 628 nm.

Magnetomrørbord med plads til mindst 6 stk. 50 mL bægerglas.

5 Fremgangsmåde

5.1 Prøveudtagning og opbevaring

Prøverne udtages i Pyrex 1 L Blue Cap flasker. Prøverne skal analyseres staks.

5.2 Prøvefiltrering

Alle prøver filtreres før applikation med 0,45 µm membranfilter (4.2)

5.3 Opkoncentrering af detergenter i prøve

5.3.1 Klargøring og konditionering af PPL-kolonner

- a. 2 mL methanol (4.3, til tørhed)
- b. 6*2,5 mL 50:50 v/v methanol/ethylacetat med 10 mM ammoniumacetat (4.6.1, til tørhed)
- c. 2 mL methanol (4.3, må ikke udtørre)
- d. 2,75 mL Milli-Q vand (vandet står i kolonne til prøven trækkes over. Løber systemet tør, startes forfra fra c.)

5.3.2 Applikation (opkoncentrering)

Prøven anbringes på PPL-kolonne med lav flowhastighed (minimum 45 min for 500 mL, hvilket er ca. 30 dråber per 10 sek.). Prøven overføres fra målekolber til kolonne med PTFE-slangesystem (Supelco). Kolonne tørres ved at sænke trykket til 0.5 bar. Kolonnen er tør når adsorbenten er blevet lys.

5.3.3 Eluering

Der elueres med 10 mL af 50:50 v/v methanol/ethylacetat med 10 mM ammoniumacetat (4.6.1). Elueringssolventet anbringes i målekolben hvor prøven var og siderne skylles grundigt. Derpå suges det over gennem slangesystemet og kolonnen.

Eluatet opsamles i et spidsglas (Efter dette trin er det muligt at gemme eluatet til næste dag i køleskabet) og der inddampes til et restvolumen på 200 µL.

5.4 Separation af de kationiske detergenter

5.4.1 Klargøring og konditionering af BE-AL-B kolonne

Kolonnen (Mega BE-AL-B) konditioneres med methanol og ethylacetat. Det er vigtigt, at kolonnematerialet er i kontakt med methanolen i længere tid (min. 30 min.):

- a. 2 mL ethylacetat (4,3, til tørhed)

- b. 3*5 mL methanol (4.3, udføres over 30 min. i 6 nedtræk, må ikke løbe tør)
- c. 2 mL ethylacetat (4.3, må ikke løbe tør)

5.4.2 Genopløsning og applikation

Prøven (200 µL) genopløses i 5 mL ethylacetat og anbringes på ultralydsbad i 5 min.

Efterfølgende anbringes prøverne på vandbad ved 40°C.

Prøven overføres kvantitativt til kolonnen med pasteurpipette. Spidsglasset skylles grundigt med 2 mL ethylacetat ved at trække solventet op i en pasteurpipette 10 gange og mellem hver gang lade det løbe ned langs siderne på spidsglasset. De 2 mL anbringes kvantitativt på kolonnen.

Til applikation anvendes ikke undertryk. Kolonnen må ikke løbe tør.

5.4.3 Eluering (isolering)

Elueringen udføres i to trin. I første trin fjernes de nonioniske detergenter. Denne fraktion kasseres. Herefter elueres de kationiske detergenter.

a) Fjernelse af nonioniske detergenter

Eluer kolonnen med 6 mL eluent (4.6.2). Kolonnen må løbe tør.

b) Isolering af kationiske detergenter

Eluer kolonnen med 6 mL eluent (4.6.3). Opsaml eluatet i et 10 mL spidsglas.

På kolonnen findes stadig anioniske detergenter. Denne fraktion kan elueres med 6 mL 75:25 v/v methanol/2M HCl.

6 Kvantificering

6.1 Udfarvning af kationiske detergenter

Fraktion med de kationiske detergenter, anbringes i et 50 mL bægerglas. Spidsglasset skyldes med kvantitativt med 4 mL methanol. . Inddampes i vandbad ved 50° C, under en svag nitrogen strøm. Efter en fuldstændig inddampning anbringes 10 mL disulfinblåt-farve i bægerglasset (4.4.6), 25 mL chloroform/1-butanol (4.4.4) og en magnet tilsættes. Urglasset placeres oven på bægerglasset. Blandingen omrøres kraftigt i 5 min, så vortex når ned til bunden i glasset.

Vand fjernes fra chloroformfraktionen ved at filtrere den igennem en tragte med en tot glasuld i bunden. Overføringen udføres med en 5 mL finpipette. Tragten er anbragt i en 50 mL målekolbe. Der måles direkte på filtratet. Der måles ved 628 nm med en 10 mm kuvette.

6.2 Standardkurve

Der kvantificeres ud fra en 4 punkts kalibreringskurve, med koncentrationer i intervallet 0-75 µg. Af DSDMAC-standarden (4.5.2) med en koncentration på 10,0 mg/L udtages 0; 2,5; 5,0 og 7,5 mL (svarende til 0; 25; 50 og 75 µg) som anbringes i 50 mL bægerglas. Disse behandles som de inddampede prøver (6.1). En kalibreringskurve fremstilles ud fra de sammenhørende værdier af mængder og absorbanser.

6.3 Kontrolprøver

Der fremstilles 2 stk. kontrolprøver ved at fortynde 5,0 mL ADMBAC-standard (4.5.1) op til 500 mL med vand. Disse analyseres identisk med spildevandsprøver. (5) Ligeledes medanalyseres 2 blindprøver. Blindprøverne er 500 mL Milli-Q vand.

Der fremstilles 2 stk. kalibreringskontrolprøver. Hver kontrolprøve fremstilles ved at udtage og anbringe 5,0 mL ADMBAC-standard (4.5.1) i et 50 mL bæreglas. Herefter behandles de som de indampede prøver (6.1).

6.4 Resultat

Ud fra prøvens nettoabsorbans (prøvens absorbans minus blindprøvernes absorbans) aflæses af kalibreringskurven den målte opløsnings indhold af kationiske detergenter. Beregn indholdet i den originale prøve ved

$$X = \frac{A}{B}$$

hvor X = prøvens indhold af kationiske detergenter, µg/L

A = indholdet af kationiske detergenter aflæst af kalibreringskurven, μg
B = rumfang prøve taget i arbejde, L (normalt 0,50 L)

7 Sikkerhed

Alt arbejde med organiske opløsningsmidler foregår i stinkskab. Ved arbejde med chloroform anvendes 4H sikkerhedshandsker (PLUM Hudsikkerhed) eller tilsvarende. Vandige fraktioner, der har været i kontakt med chloroform, bobles igennem i stinkskabet natten over. Glasudstyr, der har været i forbindelse med chloroform, damper af natten over i stinkskab.

8 Litteraturliste

Theil, K.-H., (2002). ***Bestemmelse af ioniske og nonioniske detergenter i slam og spildevand.*** Speciale ved Københavns Universitet

Kloster, G., Schoester, M. Prast, H., (1994). ***Entwicklung eines einheitlichen trennungsganges zur anreicherung aller drei tensidklassen aus umweltsproben.*** Tenside Surf. Det., 31(1), 23-28.

DIN 38409 Teil 20 (1989). ***Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H) – Bestimmung der disulfidblau-aktiven Substanzen (H 20).***

Metodeforskrift

Bestemmelse af kationiske overfladeaktive stoffer i spildevand

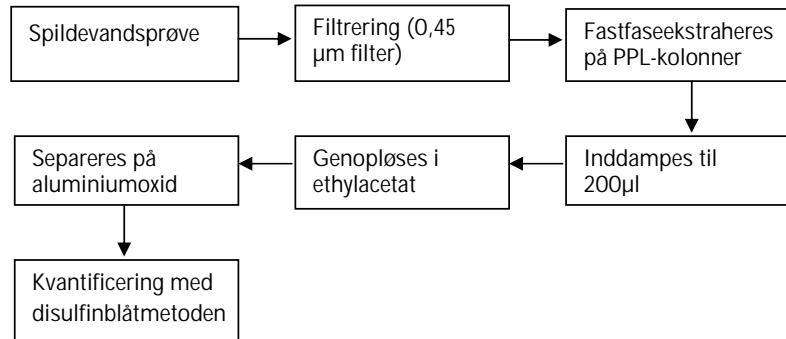
1 Anvendelsesområde

Følgende metode kan anvendes til bestemmelse af opløste disulfinblåaktive stoffer i spildevand, her specielt kationiske detergenter. Metoden kan anvendes til bestemmelse af kationiske detergenter i koncentrationsområdet 10-200 µg/L.

2 Princip

En kendt mængde vandprøve (maksimum 500 mL) filtreres og sættes på en PPL-kolonne. Herved opkoncentreres detergenterne i prøven, og interfererende komponenter i grundprøven fjernes. De kationiske detergenter separeres fra de nonioniske og anioniske detergenter på basiske aluminiumoxid-kolonner. Kvantificering udføres med en kolorimetrisk metode, der benytter disulfinblåt til dannelse af farvede komplekser. Absorbansen måles ved en bølgelængden 628 nm.

3 Metodeoversigt



4 Udstyr og kemikalier

4.1 Spe-udstyr

Bond Elut, PPL-kolonner, 3 mL, 500 mg kolonnemateriale.
Mega BE-AL-B, alumina-kolonner, 6 mL, 1 g kolonnemateriale. Begge typer kolonner er straight barrel fra Varian.

SPE-kolonnerne anbringes på en VAC ELUT SPS 24 vacuum manifold fra Varian.

Slangesystemet består af 1/8" Teflon tubes, tube adapters (3 mL) og stainless steel weights fra Supelco.

4.2 Filtrering

Ved filtreringen anvendes 0,45 µm membranfilter med en diameter på 47 mm af typen HVLP (Durapore) fra Millipore eller tilsvarende. Filtreringen udføres på en 1 L sugokolbe.

4.3 Kemikalier

Methanol, Merck, LiChrosolv
Ethylacetat, Merck, LiChrosolv
Chloroform, Merck, Pro Analyti
1-Butanol, Merck, Pro Analyti
Trifluoreddikesyre, Merck, for synthesis.

1 B447 Disulfinblau, Chroma-Gesellschaft.
Ammoniumacetat, Merck, Pro Analyti

4.4 Reagenser

Det anvendte vand skal enten være demineraliseret, destilleret eller Milli-Q vand. Følgende reagenser fremstilles:

4.4.1 0,05 M H₂SO₄

Tilsæt forsigtigt og under omrøring 2,75 mL koncentreret svovlsyre, H₂SO₄ (densitet 1,84 g/mL) til ca. 500 mL vand. Afkøl til stuetemperatur og fortynd til 1000 mL.

4.4.2 1 M NaOH

40,00 g NaOH opløses i 1000 mL vand.

4.4.3 Disulfinblåt-stamopløsning

60 mg disulfinblåt overføres til en 100 mL målekolbe og opløses i 10 mL ethanol. Fortyndes til 100 mL med vand. Denne opløsning har 1 måneds holdbarhed.

4.4.4 95:5 v/v chloroform/butanol-opløsning

50 mL butanol anbringes i en 1000 mL målekolbe. Fortyndes til 1000 mL med chloroform.

4.4.5 0,04 M citrat-buffer

21 g citronsyre monohydrat anbringes i en 1 l målekolbe, efterfulgt af 200 mL 1 M NaOH (4.4.2). Fortynd til 1000 mL med vand.

80 mL af denne opløsning blandes med ca. 120 mL 0.05 M H₂SO₄ (4.4.1). Den endelige pH skal være ca. 3. Denne opløsning har 1 uges holdbarhed.

4.4.6 Disulfinblåt-farvereagens

100 mL disulfinblåt-stamopløsning (4.4.3) blandes med 200 mL citrat-buffer (4.4.5) i en 500 mL skilletragt. Blandingen vaskes ved udrystning i skilletragt 3 gange med 50 mL butanol/chloroform-opløsning (4.4.4).

4.4.7 Renseopløsning

4500 mL 99% ethanol op til 5000 mL med koncentreret HCl (36%).

4.5 Standarder og kontroller

4.5.1 Stamopløsning 10,0 mg/L ADMBAC

Opløs 10,0 mg ADMBAC (benzalkoniumchlorid, alkyldimethylbenzylammoniumchlorid) i 1000 mL vand.

4.5.2 Stamopløsning 10,0 mg/L DSDMAC

Opløs 10,0 mg DSDMAC (distearyl-dimethyl-ammoniumchlorid) i 1000 mL methanol

Formatted: English (U.S.)

4.6 Elueringsolventer

4.6.1 50:50 v/v methanol/ethylacetat med 10 mM ammoniumacetat

0,77 g ammoniumacetat overføres kvantitativt til en 1000 mL målekolbe med 500 mL methanol. Når alt ammoniumacetat er opløst tilsættes 500 mL ethylacetat.

4.6.2 95:5 v/v ethylacetat/methanol

5 mL methanol fortyndes op til 100 mL med ethylacetat.

4.6.3 95:5 v/v methanol/trifluoreddikesyre

5 mL trifluoreddikesyre fortyndes op til 100 mL med methanol.

4.7 Glasudstyr

50 mL høje bægerglas

Urglas (50 mm)

10 mL graduerede spidsglas (graduering på 100 µL)

50 mL målekolber

Små glastragte

500 mL skilletragte

Standard laboratorieglassudstyr

4.7.1 Vaskeprocedure

Alt glasudstyr vaskes i renseopløsningen (4.4.7) og skylles i Milli-Q vand 3 gange. Tørres i varmeskab (105°C).

4.8 Apparatur

Fotometrisk udstyr til måling ved en bølgelængde på 628 nm.

Magnetomrørbord med plads til mindst 6 stk. 50 mL bægerglas.

5 Fremgangsmåde

5.1 Prøveudtagning og opbevaring

Prøverne udtages i Pyrex 1 L Blue Cap flasker. Prøverne skal analyseres staks.

5.2 Prøvefiltrering

Alle prøver filtreres før applikation med 0,45 µm membranfilter (4.2)

5.3 Opkoncentrering af detergenter i prøve

5.3.1 Klargøring og konditionering af PPL-kolonner

- a. 2 mL methanol (4.3, til tørhed)
- b. 6*2,5 mL 50:50 v/v methanol/ethylacetat med 10 mM ammoniumacetat (4.6.1, til tørhed)
- c. 2 mL methanol (4.3, må ikke udtørre)
- d. 2,75 mL Milli-Q vand (vandet står i kolonne til prøven trækkes over. Løber systemet tør, startes forfra fra c.)

5.3.2 Applikation (opkoncentrering)

Prøven anbringes på PPL-kolonne med lav flowhastighed (minimum 45 min. for 500 mL, hvilket er ca. 30 dråber per 10 sek.). Prøven overføres fra målekolber til kolonne med PTFE-slangesystem (Supelco). Kolonne tørres ved at sænke trykket til 0.5 bar. Kolonnen er tør, når adsorbenten er blevet lys.

5.3.3 Eluering

Der elueres med 10 mL af 50:50 v/v methanol/ethylacetat med 10 mM ammoniumacetat (4.6.1). Elueringssolventet anbringes i målekolben, hvor prøven var, og siderne skylles grundigt. Derpå suges det over gennem slangesystemet og kolonnen.

Eluatet opsamles i et spidsglas (efter dette trin er det muligt at gemme eluatet til næste dag i køleskabet), og der inddampes til et restvolumen på 200 µL.

5.4 Separation af de kationiske detergenter

5.4.1 Klargøring og konditionering af BE-AL-B kolonne

Kolonnen (Mega BE-AL-B) konditioneres med methanol og ethylacetat. Det er vigtigt, at kolonnematerialet er i kontakt med methanolen i længere tid (min. 30 min.):

|

- a. 2 mL ethylacetat (4.3, til tørhed)
- b. 3*5 mL methanol (4.3, udføres over 30 min. i 6 nedtræk, må ikke løbe tør)
- c. 2 mL ethylacetat (4.3, må ikke løbe tør)

5.4.2 Genopløsning og applikation

Prøven (200 µL) genopløses i 5 mL ethylacetat og anbringes på ultralydsbad i 5 min.

Efterfølgende anbringes prøverne på vandbad ved 40°C.

Prøven overføres kvantitativt til kolonnen med pasteurpipette. Spidsglasset skyldes grundigt med 2 mL ethylacetat ved at trække solventet op i en pasteurpipette 10 gange og mellem hver gang lade det løbe ned langs siderne på spidsglasset. De 2 mL anbringes kvantitativt på kolonnen.

Til applikation anvendes ikke undertryk. Kolonnen må ikke løbe tør.

5.4.3 Eluering (isolering)

Elueringen udføres i to trin. I første trin fjernes de nonioniske detergenter. Denne fraktion kasseres. Herefter elueres de kationiske detergenter.

- a) Fjernelse af nonioniske detergenter

Eluer kolonnen med 6 mL eluent (4.6.2). Kolonnen må løbe tør.

- b) Isolering af kationiske detergenter

Eluer kolonnen med 6 mL eluent (4.6.3). Opsaml eluatet i et 10 mL spidsglas.

På kolonnen findes stadig anioniske detergenter. Denne fraktion kan elueres med 6 mL 75:25 v/v methanol/2M HCl.

6 Kvantificering

6.1 Udfarvning af kationiske detergenter

Fraktion med de kationiske detergenter, anbringes i et 50 mL bægerglas. Spidsglasstykket skylles med kvantitativt med 4 mL methanol. Inddampes i vandbad ved 50°C under en svag nitrogen strøm. Efter en fuldstændig inddampning anbringes 10 mL disulfinblåt-farve i bægerglasset (4.4.6), 25 mL chloroform/1-butanol (4.4.4), og en magnet tilsættes. Urglasset placeres oven på bægerglasset. Blandingen omrøres kraftigt i 5 min., så vortex når ned til bunden i glasset.

Vand fjernes fra chloroformfraktionen ved at filtrere den igennem en tragt med en tot glasuld i bunden. Overføringen udføres med en 5 mL finpipette. Tragten er anbragt i en 50 mL målekolbe. Der måles direkte på filtratet. Der måles ved 628 nm med en 10 mm kuvette.

6.2 Standardkurve

Der kvantificeres ud fra en 4 punkts kalibreringskurve, med koncentrationer i intervallet 0-75 µg. Af DSDMAC-standarden (4.5.2) med en koncentration på 10,0 mg/L udtages 0; 2,5; 5,0 og 7,5 mL (svarende til 0; 25; 50 og 75 µg) som anbringes i 50 mL bægerglas. Disse behandles som de inddampede prøver (6.1). En kalibreringskurve fremstilles ud fra de sammenhørende værdier af mængder og absorbanser.

6.3 Kontrolprøver

Der fremstilles 2 stk. kontrolprøver ved at fortynde 5,0 mL ADMBAC-standard (4.5.1) op til 500 mL med vand. Disse analyseres identisk med spildevandsprøver. (5) Ligeledes medanalyseres 2 blindprøver. Blindprøverne er 500 mL Milli-Q vand.

Der fremstilles 2 stk. kalibreringskontrolprøver. Hver kontrolprøve fremstilles ved at udtage og anbringe 5,0 mL ADMBAC-standard (4.5.1) i et 50 mL bægerglas. Herefter behandles de som de inddampede prøver (6.1).

6.4 Resultat

Indholdet i prøver, kontrolprøver og kalibreringsprøver bestemmes ud fra formlerne i de følgende afsnit.

6.4.1 Prøver og kontroller

$$X = \frac{A_{\text{prøve}} - A_{\text{blindprøve}}}{\text{Vol}_{\text{prøve}} \cdot \alpha} \cdot 1000$$

hvor

X = resultatet i $\mu\text{g/L}$
 $A_{\text{prøve}}$ = absorbansen ved 628 nm for prøven
 $A_{\text{blindprøve}}$ = gennemsnittet af absorbanserne ved 628 nm for blindanalyserne, der er analyseret sammen med prøverne
 $\text{Vol}_{\text{prøve}}$ = volumenet af prøve i mL benyttet til analysen
 α = hældningen af standardkurven fra punkt 6.2 i metodeforskriften

6.4.2 Blindprøver

Til udregning af blindværdierne er benyttet:

$$X_{\text{blindprøve}} = \frac{A_{\text{blindprøve}} - A_{\text{blindstandard}}}{\text{Vol}_{\text{blindprøve}} \cdot \alpha} \cdot 1000$$

hvor

X = resultatet i $\mu\text{g/L}$
 $A_{\text{blindprøve}}$ = absorbansen ved 628 nm for de medanalyserede blindprøver
 $A_{\text{blindstandard}}$ = absorbansen i skæringen af standardkurven med y-aksen
 $\text{Vol}_{\text{blindprøve}}$ = volumenet i mL af blindprøven benyttet til analysen
 α = hældningen af standardkurven fra punkt 6.2 i metodeforskriften.

6.4.3 Kalibreringskontrol

Resultatet af kalibreringskontrollen beregnet efter:

$$X_{\text{kalibreringskontrol}} = \frac{A_{\text{kalibreringskontrol}} - A_{\text{blindstandard}}}{\alpha}$$

hvor

X = resultatet i μg
 $A_{\text{kalibreringskontrol}}$ = absorbansen ved 628 nm for kalibreringskontrollerne
 $A_{\text{blindstandard}}$ = absorbansen i skæringen af standardkurven med y-aksen
 α = hældningen af standardkurven fra punkt 6.2 i metodeforskriften.

6.5 Korrekthed, præcision og detektionsgrænse

Ved en interlaboratorieundersøgelse i 2002 blev rigtighed, standardafvigelse for repeterbarhed og reproducerbarhed samt opnåelig detektionsgrænse bestemt. Interlaboratorieundersøgelsen omfattede 4 prøvepar, som blev analyseret med dobbeltbestemmelse. I undersøgelsen deltog 3 danske laboratorier.

Korrekthed:

Middelgenfinding 108% varierende fra 100 til 127% (4 prøvepar og 1 prøvepar med spike).

Repeterbarhed:

3,1 – 11 µg/L ved koncentrationer op til og med 5 gange detektionsgrænsen 50 µg/L (3 prøvepar).

5 % i koncentrationsområdet over detektionsgrænsen på 50 µg/L (1 prøvepar).

Reproducerbarhed:

13-17 µg/L ved koncentrationer op til og med 5 gange detektionsgrænsen 50 µg/L (3 prøvepar).

27 % i koncentrationsområdet over detektionsgrænsen på 50 µg/L (1 prøvepar).

Detektionsgrænse:

Ud fra standardafvigelsen for repeterbarhed ved lav koncentration (mindre end 5 gange detektionsgrænsen) blev fundet, at en detektionsgrænse på 10 µg/L kan overholdes.

Detektionsgrænsen er her defineret som

$$DL = t_{0,995}(df) \cdot s_r$$

hvor s_r er standardafvigelse for repeterbarhed for prøver med koncentration tæt på den forventede detektionsgrænse, $t_{0,995}$ er Student's t-værdi på 99,5% konfidensniveau, og df er antallet af frihedsgrader for s_r .

7 Sikkerhed

Alt arbejde med organiske opløsningsmidler foregår i stinkskab. Ved arbejde med chloroform anvendes 4H sikkerhedshandsker (PLUM Hudsikkerhed) eller tilsvarende. Vandige fraktioner, der har været i kontakt med chloroform, bobles igennem i stinkskalet natten over. Glasudstyr, der har været i forbindelse med chloroform, damper af natten over i stinkskab.

8 Litteraturliste

Favrbo, A., Hansen, N. (2003). **Metodeafprøvning af metode til analyse af kationiske detergenter.** Eurofins A/S, Hørsholm

Favrbo, A., C. Grøn, Hansen, N. (2002). **Udvikling og validering af metode til analyse af kationiske detergenter.** Eurofins A/S, Hørsholm

Theil, K.-H., (2002). **Bestemmelse af ioniske og nonioniske detergenter i slam og spildevand.** Speciale ved Københavns Universitet

Kloster, G., Schoester, M. Prast, H., (1994). **Entwicklung eines einheitlichen trennungsganges zur anreicherung aller drei tensidklassen aus umweltproben.** Tenside Surf. Det., 31(1), 23-28.

DIN 38409 Teil 20 (1989). **Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H) – Bestimmung der disulfidblau-aktiven Substanzen (H 20).**

Rådata for metodeafprøvningen

BILAG C: Resultater fra metodeafprøvningenResultater fra metodeafprøvningen den 23. oktober 2002

	Prøvemærkning	Laboratorium 1	Laboratorium 2	Laboratorium 3	Gennemsnit
		µg/L	µg/L	µg/L	
Syntetisk 50 µg/L	A	63,8	41,9	29	46
	A	62,8	38,5	33	
	B	67,2	34,4		
	B	63,7	36,4	30	
Spildevand 1 spiket med 30 µg/L	C	44,8	28,3	18	28
	C	45,9	18,3	10	
	D	40,7	35,7	13	
	D	40,5	26,7	11	
Kontrolprøve 100	-	122		59	
	-	132	91,2	58	
Blind	-	1,62	1,54	2	
	-	1,36	2,49	2	
Kalibreingskontrol	-	141	122	83	
	-	142	115	89	

Resultater fra metodeafprøvningen den 30. oktober 2002

	Prøvemærkning	Laboratorium 1	Laboratorium 2	Laboratorium 3	Gennemsnit
		µg/L	µg/L	µg/L	
Spildevand 2 spiket med 50 µg/L	E	69,6	63,2	43	54
	E	70,9	45,3	27	
	F	69,9	48,0		
	F	66,9	54,3	39	
Spildevand 2 spiket med 100 µg/L	G	105	98,8		95
	G	120	95,4	70	
	H	117	80,9	73	
	H	114		74	
Kontrolprøve 100	-	136		82	
	-	133	95,4	80	
Blind	-	1,92	0,99	5	
	-	1,65	1,44	5	
Kalibreingskontrol	-	146	98	76	
	-	149	102	74	

Spørgeskema

**Metodeafprøvning -
Ny metode for kationiske detergenter i afløbsvand**

Da der i metodeafprøvningen er konstateret systematiske forskelle mellem de deltagende laboratorier, vil jeg bede jer om at svare på nedenstående spørgsmål hurtigst muligt for om muligt at kunne finde grunden til denne forskel.

1) Har laboratoriet afviget fra metodeforskriften (hvordan):

2) Hvordan er stamopløsning 10,0 mg/L ADMBAC (4.5.1) blevet fremstillet:

Kemikalie navn:

Cas nr.:

Fabrikant.:

Batch no.:

Mængde afvejet (mg):

Opløst i vand eller metanol:

3) Hvordan er stamopløsning 10,0 mg/L DSDMAC (4.5.2) blevet fremstillet:

Kemikalie navn:

Cas nr.:

Fabrikant.:

Batch no.:

Mængde afvejet (mg):

Opløst i vand eller metanol:

4) Spektrofotometer

Hvilke bølgelængde er benyttet (nm):

Kuvette længde (mm):

5) Filtreringsudstyr

Hvilket filtreringsudstyr er anvendt:

**Metodeafprøvning -
Ny metode for kationiske detergenter i afløbsvand**

5) Standardkurve (6.2)

Vil I anføre absorbanterne, hvad der er målt med spektrofotometeret:

Standard	Absorbans Analysedag 23. oktober	Absorbans Analysedag 30. oktober
0 µg DSDMAC		
25 µg DSDMAC		
50 µg DSDMAC		
75 µg DSDMAC		
evt. andre:		
evt. andre:		

6) Resultater

Vil I anføre absorbanterne, hvad der er målt med spektrofotometeret:

Standard	Absorbans 1. bestemmelse	Absorbans 2. bestemmelse
Prøve A		
Prøve B		
Prøve C		
Prøve D		
Prøve E		
Prøve F		
Prøve G		
Prøve H		
Kontrolprøve 50 (23/10-02)		
Kontrolprøve 50 (30/10-02)		
Blind (23/10-02)		
Blind (30/10-02)		
Kalibreringskontrol(23/10-02)		
Kalibreringskontrol(30/10-02)		

**Metodeafprøvning -
Ny metode for kationiske detergenter i afløbsvand**

7) Beregning

Ligningen for kalibreringskurven den 23/10-2002:

Ligningen for kalibreringskurven den 30/10-2002:

Hvordan er resultaterne for prøverne beregnet (giv et eksempel):

Hvordan er resultaterne for kontrolprøve 50 beregnet (giv et eksempel):

Hvordan er resultaterne for kalibreringskontrolprøverne beregnet (giv et eksempel):

Hvordan er resultaterne for blindprøverne beregnet (giv et eksempel):

8) Andre kommentarer udover dem, der allerede er givet på resultatskemaerne

Med venlig hilsen

Anders Favrbø
Eurofins A/S
anf@eurofins.dk
fax: 7022 4255

Resultater fra spørgeskemaundersøgelse

**Metodeafprøvning -
Ny metode for kationiske detergenter i afløbsvand**

Da der i metodeafprøvningen er konstateret systematiske forskelle mellem de deltagende laboratorier, vil jeg bede jer om at svare på nedenstående spørgsmål hurtigst muligt for om muligt at kunne finde grunden til denne forskel.

1) Har laboratoriet afviget fra metodeforskriften (hvordan):

LAB 1:

5.3.3 Eluater opsamlet i 50 mL bægerglas og inddampet heri

5.4.3 Eluater opsamlet i 50 mL bægerglas

6.1 Der er ikke anvendt målekolber. Vandfasen suget af og chlorofomfraktionen overført til kuvette med 5 mL finpipette

LAB 2: ingen kommentarer

LAB 3:

1. forsøg stod på køl efter punktet 5.4.3 pga. sygdom

*5.3.3 Inddampningen af prøven til 200 µL, det varede mere end 2 timer

*5.4.1 Konditionering med methanol, kan ikke strække over 30 minutter – 6 nedtræk med 3*5 mL er uforståelig

*6.1 Det er svært, at få ordentlig opblanding uden, at hele prøven sad på urglasset.

* Disse kommentarer blev afleveret sammen med resultaterne, men er medtaget her.

2) Hvordan er stamopløsning 10,0 mg/L ADMBAC (4.5.1) blevet fremstillet:

Kemikalie navn:

LAB1: Fik tilsendt af LAB 2:

LAB2: Benzalkoniumchlorid

LAB3: Benzalkonium chloride 97%

Cas nr.:

LAB 1 og 2: 139-08-2

LAB 3: 121-54-0

Fabrikant.:

LAB 1 og 2: SIGMA

LAB 3: Acros organics

Batch no.:

LAB 1 og 2: 76H2626

LAB 3: AO1555-0401

Mængde afvejet (mg):

LAB 1 og 2: 10,0 mg

LAB 3: 100 mg-> 500 mL (200 mg/L) -> 5 mL -> 100 mL (10 mg/L)

**Metodeafprøvning -
Ny metode for kationiske detergenter i afløbsvand**

3) Hvordan er stamopløsning 10,0 mg/L DSDMAC (4.5.2) blevet fremstillet:

Kemikalie navn:

LAB1: Dimethyldioctadecylammoniumchlorid

LAB2: Dimethyldisterylammoniumchlorid

LAB3: Dimethyldisterylammoniumchlorid

Cas nr.:

LAB1: 107-64-2

LAB2: 107-64-2

LAB3: D1630

Fabrikant.:

LAB1: Fluka

LAB2: Fluka

LAB3: TCI-trademark

Batch no.:

LAB1: Lot and filling code 424225/1 31702

LAB2: Lot and filling code 393251/1 40901

LAB3: 19910B

Mængde afvejet (mg):

LAB 1: 0,0130 g = 13,0 mg er korrigeret i kurven

LAB 2: 10,0 mg

LAB 3: 100 mg-> 500 mL (200 mg/L) -> 5 mL -> 100 ml/L (10 mg/L)

Opløst i vand eller metanol:

LAB1, LAB2, LAB3: Metanol

4) Spektrofotometer

Hvilke bølgelængde er benyttet (nm): **LAB1, LAB2, LAB3:** 628

Kuvette længde (mm):

LAB1: 10

LAB2: 10

LAB3: 5 cm (ikke nok prøve til en 10 cm kuvette)

5) Filtreringsudstyr

Hvilket filtreringsudstyr er anvendt:

LAB1, LAB2, LAB3: ingen af prøverne er filteret jf. følgebrev med prøverne

**Metodeafprøvning -
Ny metode for kationiske detergenter i afløbsvand**

5) Standardkurve (6.2)

LAB1, LAB2, LAB3: Resultaterne for dette spørgsmål er gengivet og beregnet på bilag F.

Vil I anføre absorbanterne, hvad der er målt med spektrofotometeret:

Standard	Absorbans Analysedag 23. oktober	Absorbans Analysedag 30. oktober
0 µg DSDMAC		
25 µg DSDMAC		
50 µg DSDMAC		
75 µg DSDMAC		
evt. andre:		
evt. andre:		

6) Resultater

LAB1, LAB2, LAB3: Resultaterne for dette spørgsmål er gengivet og beregnet på bilag F.

Vil I anføre absorbanterne, hvad der er målt med spektrofotometeret:

Standard	Absorbans 1. bestemmelse	Absorbans 2. bestemmelse
Prøve A		
Prøve B		
Prøve C		
Prøve D		
Prøve E		
Prøve F		
Prøve G		
Prøve H		
Kontrolprøve 50 (23/10-02)		
Kontrolprøve 50 (30/10-02)		
Blind (23/10-02)		
Blind (30/10-02)		
Kalibreringskontrol(23/10-02)		
Kalibreringskontrol(30/10-02)		

**Metodeafprøvning -
Ny metode for kationiske detergenter i afløbsvand**

7) Beregning

LAB1, LAB2, LAB3: Resultaterne for dette spørgsmål er ikke gengivet her. I stedet er resultaterne fra spørgsmål 5 og 6 benyttet til genberegning i bilag F.

Ligningen for kalibreringskurven den 23/10-2002:

Ligningen for kalibreringskurven den 30/10-2002:

Hvordan er resultaterne for prøverne beregnet (giv et eksempel):

Hvordan er resultaterne for kontrolprøve 50 beregnet (giv et eksempel):

Hvordan er resultaterne for kalibreringskontrolprøverne beregnet (giv et eksempel):

Hvordan er resultaterne for blindprøverne beregnet (giv et eksempel):

8) Andre kommentarer udover dem, der allerede er givet på resultatskemaerne

Med venlig hilsen

Anders Favrbø
Eurofins A/S
anf@eurofins.dk
fax: 7022 4255

Genberegnete resultater

BILAG F: Genberegning af resultater (genfindning af forventet værdi)Analyse dag 23/10-2002

	Laboratorie 1 %	Laboratorie 2 %	Laboratorie 3 %	Forventet værdi µg/L
Prøve A	127% 125%	77% 84%	94% 110%	50
Prøve B	134% 127%	69% 73%	92% -	50
Prøve C	148% 152%	94% 61%	93% 47%	30
Prøve D	136% 134%	119% 89%	63% 49%	30
Kontrolprøve 100	131% 122%	- 91%	101% 100%	100
Blind	- -	- -	- -	-
Kalibreringskontrol 50	71% 71%	61% 58%	76% 82%	50

Resultater fra metodeafprøvningen den 23. oktober 2002 KORRIGERET MED KONTROPRØVEN 100

	Laboratorie 1 %	Laboratorie 2 %	Laboratorie 3 %	Forventet værdi µg/L
Prøve A	100% 99%	84% 92%	94% 110%	50
Prøve B	106% 100%	75% 80%	91% -	50
Prøve C	117% 120%	104% 67%	93% 47%	30
Prøve D	107% 106%	131% 98%	62% 49%	30
Kontrolprøve 100	104% 96%	- 100%	101% 99%	100
Blind	- -	- -	- -	-
Kalibreringskontrol 50	112% 112%	134% 126%	152% 163%	50
Korrektionsfaktor *	0,790	1,097	0,997	

* Defineret som den faktor der skal ganges på kontrolprøve 100 for at få resultatet 100.

BILAG F: Genberegning af resultater (genfindning af forventet værdi)

Analyse dag 30/10-2002

	Laboratorie 1 %	Laboratorie 2 %	Laboratorie 3 %	Forventet værdi µg/L
Prøve E	135% 137%	122% 86%	176% 116%	50
Prøve F	135% 129%	91% 104%	159% -	50
Prøve G	102% 116%	96% 95%	137% -	100
Prøve H	114% 110%	78% -	142% 144%	100
Kontrolprøve 100	132% 129%	95% -	83% 83%	100
Blind	- -	- -	- -	-
Kalibreringskontrol 50	142% 145%	100% 105%	158% 153%	50

Resultater fra metodeafprøvningen den 30. oktober 2002 KORRIGERET MED KONTROPRØVEN 100

	Laboratorie 1 %	Laboratorie 2 %	Laboratorie 3 %	Forventet værdi µg/L
Prøve E	103% 105%	127% 90%	211% 140%	50
Prøve F	104% 99%	96% 109%	191% #VALUE!	50
Prøve G	78% 89%	101% 99%	165% #VALUE!	100
Prøve H	87% 85%	82% #VALUE!	171% 173%	100
Kontrolprøve 100	101% 99%	100% #VALUE!	100% 100%	100
Blind	- -	- -	- -	-
Kalibreringskontrol 50	109% 111%	105% 110%	189% 184%	50
Korrektionsfaktor *	0,766	1,048	1,201	

* Defineret som den faktor der skal ganges på kontrolprøve 100 for at få resultatet 100.

BILAG F: Genberegning af resultater

Analyse dag 23/10-2002

	Laboratorie 1 µg/L	Laboratorie 2 µg/L	Laboratorie 3 µg/L	Forventet værdi µg/L
Prøve A	63,4 62,5	38,5 41,9	47,1 55,2	50
Prøve B	66,9 63,3	34,4 36,4	45,8 -	50
Prøve C	44,4 45,5	28,3 18,3	28,0 14,1	30
Prøve D	40,8 40,3	35,7 26,8	18,8 14,7	30
Kontrolprøve 100	131,4 121,7	- 91,2	101,1 99,6	100
Blind	1,1 0,8	3,1 5,0	9,4 9,4	-
Kalibreringskontrol 50	70,6 71,0	61,2 57,6	76,2 81,5	50

Resultater fra metodeafprøvningen den 23. oktober 2002 KORRIGERET MED KONTROPRØVEN 100

	Laboratorie 1 µg/L	Laboratorie 2 µg/L	Laboratorie 3 µg/L	Forventet værdi µg/L
Prøve A	50,1 49,4	42,2 46,0	46,9 55,0	50
Prøve B	52,8 50,0	37,7 39,9	45,7 -	50
Prøve C	35,1 35,9	31,1 20,1	27,9 14,1	30
Prøve D	32,2 31,9	39,2 29,4	18,7 14,6	30
Kontrolprøve 100	103,9 96,1	- 100,0	100,7 99,3	100
Blind	0,9 0,7	3,4 5,5	9,3 9,3	-
Kalibreringskontrol 50	55,8 56,1	67,1 63,2	76,0 81,3	50
Korrektionsfaktor *	0,790	1,097	0,997	

* Defineret som den faktor der skal ganges på kontrolprøve 100 for at få resultatet 100.

BILAG F: Genberegning af resultater

Analyse dag 30/10-2002

	Laboratorie 1 µg/L	Laboratorie 2 µg/L	Laboratorie 3 µg/L	Forventet værdi µg/L
Prøve E	67,3 68,6	60,8 42,9	88,0 58,2	50
Prøve F	67,7 64,7	45,6 51,9	79,5 -	50
Prøve G	102,0 116,1	96,5 94,5	137,2 -	100
Prøve H	113,6 110,4	78,5 -	142,1 144,4	100
Kontrolprøve 100	132,4 128,7	95,4 -	83,5 83,0	100
Blind	1,4 1,1	2,0 2,9	8,5 9,3	-
Kalibreringskontrol 50	71,0 72,3	50,0 52,5	78,9 76,6	50

Resultater fra metodeafprøvningen den 30. oktober 2002 KORRIGERET MED KONTROPRØVEN 100

	Laboratorie 1 µg/L	Laboratorie 2 µg/L	Laboratorie 3 µg/L	Forventet værdi µg/L
Prøve E	51,6 52,6	63,7 45,0	105,7 70,0	50
Prøve F	51,8 49,6	47,8 54,4	95,5 -	50
Prøve G	78,1 88,9	101,1 99,1	164,8 -	100
Prøve H	87,0 84,6	82,2 -	170,7 173,4	100
Kontrolprøve 100	101,4 98,6	100,0 -	100,3 99,7	100
Blind	1,0 0,8	2,1 3,0	10,2 11,1	-
Kalibreringskontrol 50	54,4 55,4	52,4 55,0	94,7 92,1	50
Korrektionsfaktor *	0,766	1,048	1,201	

* Defineret som den faktor der skal ganges på kontrolprøve 100 for at få resultatet 100.

BILAG F: Genberegning af resultater

Laboratorium 1 - 23/10-2002

	Absorbans	Absorbans	Beregnet konc.
	-	korr for blind.	µg/L
Prøve A	0,3456	0,311	63,4
	0,3409	0,306	62,5
Prøve B	0,3625	0,328	66,9
	0,3451	0,310	63,3
Prøve C	0,2521	0,217	44,4
	0,2576	0,223	45,5
Prøve D	0,2346	0,200	40,8
	0,2323	0,198	40,3
Kontrolprøve 100	0,679	0,644	131,4
	0,631	0,596	121,7
Blind	0,0353	-	1,1
	0,034	-	0,8
Kalibreringskontrol 50	0,7219	-	70,6
	0,7259	-	71,0

Gennemsnits absorbans for blindprøven: 0,03465

Prøvevolumen (mL) 500

Ekstern kalibreringskurve (DSDMAC)

Stofmængde	Absorbans
75 µg	
75 µg	
50 µg	0,511
50 µg	0,5296
25 µg	
25 µg	
0 µg	0,029
0 µg	0,0308

Data for kalibreringskurven

Skæring med y-akse	0,0299
Hældning	0,009804

Bemærkninger:

Ingen

BILAG F: Genberegning af resultater

Laboratorium 2 - 23/10-2002

	Absorbans	Absorbans	Beregnet konc.
	-	korr for blind.	µg/L
Prøve A	0,27	0,224	38,5
	0,29	0,244	41,9
Prøve B	0,246	0,200	34,4
	0,258	0,212	36,4
Prøve C	0,211	0,165	28,3
	0,153	0,107	18,3
Prøve D	0,254	0,208	35,7
	0,202	0,156	26,8
Kontrolprøve 100	-	-	-
	0,576	0,530	91,2
Blind	0,041	-	3,1
	0,052	-	5,0
Kalibreringskontrol 50	0,734	-	61,2
	0,692	-	57,6

Gennemsnits absorbans for blindprøven: 0,0465

Prøvevolumen (mL) 500

Ekstern kalibreringskurve (DSDMAC)

Stofmængde	Absorbans
75 µg	
75 µg	0,9
50 µg	0,595
50 µg	
25 µg	
25 µg	
0 µg	0,026
0 µg	

Data for kalibreringskurven

Skæring med y-akse	0,023071429
Hældning	0,011614286

Bemærkninger:

Standard 25 µg er udelukket i kalibreringskurven.

Den ene kontrol 100 er udelukket da den blev grøn mod normalt blå ved udfarvningen

BILAG F: Genberegning af resultater

Laboratorium 3 - 23/10-2002

	Absorbans	Absorbans	Beregnet konc.
	-	korrig. for blind.	µg/L
Prøve A	0,84	0,756	47,1
	0,97	0,886	55,2
Prøve B	0,82	0,736	45,8
	-	-	-
Prøve C	0,533	0,449	28,0
	0,311	0,227	14,1
Prøve D	0,386	0,302	18,8
	0,32	0,236	14,7
Kontrolprøve 100	1,707	1,623	101,1
	1,683	1,599	99,6
Blind	0,084	-	9,4
	0,084	-	9,4
Kalibreringskontrol 50	2,382	-	76,2
	2,552	-	81,5

Gennemsnits absorbans for blindprøven: 0,084

Prøvevolumen (mL) 500

Ekstern kalibreringskurve (DSDMAC)

Stofmængde	Absorbans
65 µg	2,451
65 µg	2,571
32,5 µg	1,369
32,5 µg	1,204
25 µg	
25 µg	
0 µg	0,018
0 µg	0,018

Data for kalibreringskurven

Skæring med y-akse	-0,066321429
Hældning	0,032115714

Bemærkninger:

Målingerne er udført med 5 cm kuvette.

Sat på køl i 5 døgn efter punkt 5.4.3 pga. sygdom

BILAG F: Genberegning af resultater

Laboratorium 1 - 30/10-2002

	Absorbans	Absorbans	Beregnet konc.
	-	korr for blind.	µg/L
Prøve E	0,3738	0,339	67,3
	0,3804	0,346	68,6
Prøve F	0,3755	0,341	67,7
	0,3608	0,326	64,7
Prøve G	0,5487	0,514	102,0
	0,6199	0,585	116,1
Prøve H	0,6071	0,573	113,6
	0,5912	0,557	110,4
Kontrolprøve 100	0,702	0,668	132,4
	0,6833	0,649	128,7
Blind	0,0351	-	1,4
	0,0338	-	1,1
Kalibreringskontrol 50	0,7445	-	71,0
	0,7571	-	72,3

Gennemsnits absorbans for blindprøven: 0,03445

Prøvevolumen (mL) 500

Ekstern kalibreringskurve (DSDMAC)

Stofmængde	Absorbans
75 µg	
75 µg	
50 µg	0,526
50 µg	0,539
25 µg	
25 µg	
0 µg	0,0272
0 µg	0,0293

Data for kalibreringskurven

Skæring med y-akse	0,02825
Hældning	0,010082

Bemærkninger:

Ingen

BILAG F: Genberegning af resultater

Laboratorium 2 - 30/10-2002

	Absorbans	Absorbans	Beregnet konc.
	-	korr for blind.	µg/L
Prøve E	0,44	0,405	60,8
	0,321	0,286	42,9
Prøve F	0,339	0,304	45,6
	0,381	0,346	51,9
Prøve G	0,678	0,643	96,5
	0,665	0,630	94,5
Prøve H	0,558	0,523	78,5
	-	-	-
Kontrolprøve 100	0,671	0,636	95,4
	0,456	0,421	63,2
Blind	0,032	-	2,0
	0,038	-	2,9
Kalibreringskontrol 50	0,685	-	50,0
	0,719	-	52,5

Gennemsnits absorbans for blindprøven: 0,035

Prøvevolumen (mL) 500

Ekstern kalibreringskurve (DSDMAC)

Stofmængde	Absorbans
75 µg	
75 µg	1,023
50 µg	0,679
50 µg	
25 µg	
25 µg	
0 µg	0,021
0 µg	

Data for kalibreringskurven

Skæring med y-akse	0,018857143
Hældning	0,013331429

Bemærkninger:

Prøve H blev tabt

BILAG F: Genberegning af resultater

Laboratorium 3 - 30/10-2002

	Absorbans	Absorbans	Beregnet konc.
	-	korr for blind.	µg/L
Prøve E	1,49	1,413	88,0
	1,012	0,935	58,2
Prøve F	1,354	1,277	79,5
	-	-	-
Prøve G	2,28	2,203	137,2
	-	-	-
Prøve H	2,358	2,281	142,1
	2,395	2,318	144,4
Kontrolprøve 100	1,417	1,340	83,5
	1,41	1,333	83,0
Blind	0,071	-	8,5
	0,083	-	9,3
Kalibreringskontrol 50	2,466	-	78,9
	2,395	-	76,6

Gennemsnits absorbans for blindprøven: 0,077

Prøvevolumen (mL) 500

Ekstern kalibreringskurve (DSDMAC)

Stofmængde	Absorbans
65 µg	2,571
65 µg	2,451
32,5 µg	1,204
32,5 µg	1,369
25 µg	
25 µg	
0 µg	0,018
0 µg	0,019

Data for kalibreringskurven

Skæring med y-akse	-0,065857143
Hældning	0,032108571

Bemærkninger:

Målingerne er udført med 5 cm kuvette.

Resultaterne for standardkurven for 97,5 µg er IKKE medtaget.
De er henholdsvis 2,799 og 2,799. De er tydeligvis i et ikke lineært område af det anvendte udstyr.

Homogenitetstest

Januar 2003

**Metodeafprøvning -
Ny metode for kationiske detergenter i afløbsvand**

Bilag G: Homogenitetsanalyse af genbereggede resultater

Estimation af varianskomponenter

Varianskomponent	Prøvepar A1A2 + B1B2	Prøvepar C1C2 + D1D2	Prøvepar E1E2 + F1F2	Prøvepar G1G2 + H1H2
$s^2(t)$	3.08 ²	5.71 ²	11.25 ²	4.69 ²
$s^2(H)$	2.15 ²	0.75 ²	-	6.68 ²
$s^2(L)$	13.02 ²	11.75 ²	13.19 ²	26.05 ²
$s^2(R)$	13.38 ²	13.06 ²	17.34 ²	26.47 ²

ISO 5725 Nøgleparametre

ISO 5725 parameter	Prøvepar A1A2 + B1B2	Prøvepar C1C2 + D1D2	Prøvepar E1E2 + F1F2	Prøvepar G1G2 + H1H2
Antal lab., p	3	3	3	3
Antal repl., n	2+2	2+2	2+2	2+2
μ	50	30	50	100
m	50.49	29.64	63.15	113.45
$s(t)$	3.08	5.71	11.25	4.69
$s(R)$	13.38	13.06	17.34	26.47
r	8.63	15.98	31.51	13.13
R	37.46	36.57	48.56	74.12
$cv(t)$	6.2 %	19.0 %	22.5 %	4.7 %
$cv(R)$	26.8 %	43.5 %	34.7 %	26.5 %

**Metodeafprøvning -
Ny metode for kationiske detergenter i afløbsvand**

Bilag G: Homogenitetsanalyse af genberegnete resultater (korrigeret for Kontrol 100)

Estimation af varianskomponenter

Varians-komponent	Prøvepar A1A2 + B1B2	Prøvepar C1C2 + D1D2	Prøvepar E1E2 + F1F2	Prøvepar G1G2 + H1H2
$s^2(\hat{r})$	3.05 ²	6.28 ²	12.74 ²	3.61 ²
$s^2(H)$	2.25 ²	-	-	7.46 ²
$s^2(L)$	4.21 ²	7.36 ²	22.89 ²	46.37 ²
$s^2(R)$	5.20 ²	9.67 ²	26.20 ²	46.51 ²

ISO 5725 Nøgleparametre

ISO 5725 parameter	Prøvepar A1A2 + B1B2	Prøvepar C1C2 + D1D2	Prøvepar E1E2 + F1F2	Prøvepar G1G2 + H1H2
Antal lab., p	3	3	3	3
Antal repl., n	2+2	2+2	2+2	2+2
μ	50	30	50	100
m	46.88	27.68	62.45	112.99
$s(\hat{r})$	3.05	6.28	12.74	3.61
$s(R)$	5.20	9.67	26.20	46.51
r	8.55	17.58	35.68	10.10
R	14.57	27.08	73.35	130.23
cv(\hat{r})	6.1 %	20.9 %	25.5 %	3.6 %
cv(R)	10.4 %	32.2 %	52.4 %	46.5 %

**Metodeafprøvning -
Ny metode for kationiske detergenter i afløbsvand**

**Metodeafprøvning -
Ny metode for kationiske detergenter i afløbsvand**

**Korrespondance
med laboratorierne**

1 Resultatskema – analysedag 23. oktober 2002

NB! Af hensyn til den statistiske databehandling angives resultater med 3 betydende cifre.

	Enhed	Prøve A		Prøve B	
		1. analyse	2. analyse	1. analyse	2. analyse
Resultat	µg/L				

	Enhed	Prøve C		Prøve D	
		1. analyse	2. analyse	1. analyse	2. analyse
Resultat	µg/L				

	Enhed	Kontrolprøve 50 hele metoden (punkt 6,3)		Blind hele metoden (punkt 6,3)	
		1. analyse	2. analyse	1. analyse	2. analyse
Resultat	µg/L				

	Enhed	Kalibreringskontrolprøve (punkt 6,3)	
		1. analyse	2. analyse
Resultat	µg/L		

Kommentarer:

Underskrift og dato:

Laboratorium:

Adresse:

Resultatskemaet sendes til Eurofins A/S, Agern Allé 11, 2970 Hørsholm att.: Anders Favrbo eventuelt pr. fax 7022 4230, **senest den 8. november 2002.**

**Metodeafprøvning -
Ny metode for kationiske detergenter i afløbsvand**

2 Resultatskema – analysedag 30. oktober 2002

**NB! Af hensyn til den statistiske databehandling angives resultater med 3 betydende
ciffr.**

Bilag H

	Enhed	Prøve E		Prøve F	
		1. analyse	2. analyse	1. analyse	2. analyse
Resultat	µg/L				

	Enhed	Prøve G		Prøve H	
		1. analyse	2. analyse	1. analyse	2. analyse
Resultat	µg/L				

	Enhed	Kontrolprøve 50 hele metoden (punkt 6,3)		Blind hele metoden (punkt 6,3)	
		1. analyse	2. analyse	1. analyse	2. analyse
Resultat	µg/L				

	Enhed	Kalibreringskontrolprøve (punkt 6,3)	
		1. analyse	2. analyse
Resultat	µg/L		

Kommentarer:

Underskrift og dato:

Laboratorium:

Adresse:

Resultatskemaet sendes til Eurofins A/S, Agern Allé 11, 2970 Hørsholm att.: Anders Favro eventuelt pr. fax 7022 4230, **senest den 8. november 2002.**

**Metodeafprøvning -
Ny metode for kationiske detergenter i afløbsvand**

Eurofins A/S
Agern Allé 11
2970 Hørsholm

Tlf: 7022 4230
Fax: 7022 4255
E-mail: anf@eurofins.dk
Web: www.eurofins.dk

Ref: 20020
Init: anf

Dato: 28. oktober 2002

**Metodeafprøvning – ny metode for kationiske
detergenter i afløbsvand**

Hermed fremsendes 4 prøver mærket E, F, G og H til ovennævnte metodeafprøvning, som afholdes med start

den 30. oktober 2002

Information om prøverne er tidligere udsendt.

Tidsfristen for afrapportering af resultater er den 8. november 2002.

Vi er naturligvis til rådighed, såfremt De har spørgsmål i forbindelse med gennemførelsen af metodeafprøvningen.

Med venlig hilsen
Eurofins A/S

Anders Favrbo

Nis Hansen

**Metodeafprøvning -
Ny metode for kationiske detergenter i afløbsvand**

3 INFORMATIONSNOTAT

1. Analysen af prøverne skal indledes **den 23. oktober 2002** for prøve A, B, C, D og den **30. oktober 2002** for prøverne E, F, G og H. Prøverne vil blive sendt fra Eurofins A/S i Hørsholm henholdsvis den 21. oktober og den 28. oktober 2002.
2. I tidsrummet mellem modtagelse af prøverne og analyseringen skal prøverne opbevares mørkt i køleskab.
3. Prøverne er filteret med et 0,45 µm membranfilter. De skal derfor **IKKE FILTERES** svarende til punkt 5.2 i metodeforskriften.
4. Der skal kun foretages **ægte dobbelt bestemmelse** på hver af de 4 prøver. Det er vigtigt, alle analyseresultater bliver afleveret
5. Resultater og kommentarer til analysemetoden anføres i resultatskemaet.
6. Resultater skal være Eurofins A/S i hænde på nedenstående adresse **senest den 8. november 2002**.

Eurofins A/S, Agern Allé 11, 2970 Hørsholm, Att: Anders Favrbø, Fax: 7022 4255

**Metodeafprøvning -
Ny metode for kationiske detergenter i afløbsvand**

Eurofins A/S
Agern Allé 11
2970 Hørsholm

Tlf: 7022 4230
Fax: 7022 4255
E-mail: anf@eurofins.dk
Web: www.eurofins.dk

Ref: 20020
Init: anf

Dato: 21. oktober 2002

**Metodeafprøvning – ny metode for kationiske detergenter i
afløbsvand**

Hermed fremsendes 4 prøver mærket A, B, C og D til ovennævnte
metodeafprøvning, som afholdes med start

den 23. oktober 2002

Information om prøverne er tidligere udsendt.

Tidsfristen for afrapportering af resultater er den 8. november 2002.

Vi er naturligvis til rådighed, såfremt De har spørgsmål i forbindelse med
gennemførelsen af metodeafprøvningen.

Med venlig hilsen
Eurofins A/S

Anders Favrbo

Nis Hansen

**Metodeafprøvning -
Ny metode for kationiske detergenter i afløbsvand**

Symboler og forkortelser

Metodeafprøvning - Ny metode for kationiske detergenter i afløbsvand

Bilag I: Symboler og forkortelser

μ	Nominal værdi
p	Antal laboratorier der indgår i beregningerne. Dette svarer til antal rapporterede resultater minus eventuelle udelukkelse efter sagkyndig vurdering (***) minus Cochran outliers (UC) og minus Grubbs outliers (UG)
n	Antal resultater medtaget i beregningerne
m	Middelværdi af alle ikke-udelukkede resultater
M	Median
d	Den gennemsnitlige differens mellem resultater fra et prøvepar, korrigeret for split
t	Test størrelse ved Student's t-test
p	Et sandsynlighedsniveau for en statistisk test
s	Standardafvigelse
F	Test størrelse for F-test
s_i	Den enkelte deltagers standardafvigelse, svarende til variationen ved gentagne bestemmelser af en prøve
s_r	Standardafvigelse inden for ét laboratorium
s_r^2	Repeterbarhed
s_L	Standardafvigelse mellem laboratorierne
s_L^2	Laboratorievarians
s_R	Standardafvigelse på reproducerbarheden
s_R^2	Reproducerbarhed $s_R^2 = s_r^2 + s_L^2$
CV_r	Variationskoefficient inden for ét laboratorium $(s_r \cdot 100)/\mu$
CV_R	Total variationskoefficient $(s_R \cdot 100)/\mu$