

Miljøprojekt Nr. 828 2003

Metodeudvikling og -validering kationiske detergenter

Anders Favrebo, Christian Grøn 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	5
1 LITTERATURSTUDIE	7
1.1 STANDARDER OG METODER TIL IKKE-SPECIFIK DETERGENTANALYSE	7
1.2 SØGEKRITERIER I LITTERATURUNDERSØGELSEN FOR 1998-2001	9
1.3 RESULTATER AF LITTERATURUNDERSØGELSE	9
1.3.1 Ikke-specifikke analyser	9
1.3.2 Specifikke analyser	9
1.3.3 Konklusion på litteraturundersøgelsen	9
1.4 FASTFASE EKSTRAKTION (SPE)	9
2 METODEUDVIKLING	11
2.1 DEN ANVENDTE METODE	11
2.2 GENERELLE BETINGELSER OG APPARATUR I UNDERSØGELSEN	12
2.3 INDLEDENDE UNDERSØGELSER	13
2.4 OPKONCENTRERINGSTRIN (PPL-KOLONNE)	14
2.4.1 Blind	14
2.4.2 Applikationshastighed og elueringsvolumen	15
2.4.3 Applikationsvolumenet	15
2.4.4 Delkonklusion	16
2.5 GENOPLØSNINGSTRIN MELLEM PPL- OG ALUMINA-KOLONNE	16
2.6 SEPARATIONSTRINNET (MEGA BE-AL-B ALUMINA-KOLONNE)	17
2.6.1 Isolering af kationiske detergenter	17
2.6.2 Interferensundersøgelse fra anioniske detergenter (LAS)	18
2.6.3 Genfinding af anioniske detergenter (LAS) i 3. fraktion	18
2.6.4 Delkonklusion	19
2.7 DETEKTIONSTRINNET	19
2.7.1 Linearitet, følsomhed og præcision	19
2.7.2 Sammenligning af ADMBAC og DSDMAC	19
2.7.3 Effekten af ufuldstændig inddampning	20
2.7.4 Delkonklusion	20
2.8 ALTERNATIVE SOLVENTER	21
2.9 METODEAFPRØVNING	22
2.9.1 Inddampningsvolumen	23
2.9.2 Kolonnestørrelse af PPL-kolonnen	23
2.9.3 Delkonklusion	24
2.10 ENDELIG METODEUDFORMNING	24
3 METODEVALIDERING	27
3.1 ANALYSEPROGRAM OG RESULTATER FOR METODEVALIDERINGEN	27
3.1.1 Analyseprogram og resultater for linearitetsundersøgelsen	27
3.1.2 Analyseprogram for undersøgelse af præcision, rigtighed og detektionsgrænse	28
3.1.3 Resultater for undersøgelsen af præcision, rigtighed og detektionsgrænse	28

4	SAMMENFATNING OG KONKLUSION	31
5	REFERENCER	35
	Bilag A: Metodeforskrift – UDKAST til metodevalidering -	
	Bilag B-P: Rådata for metodeudvikling	
	Bilag Q: Litteraturundersøgelse for ikke-specifikke detergentanalyser	
	Bilag R: Litteraturundersøgelse for specifikke detergentanalyser	
	Bilag S-U: Resultater fra metodevalideringen	

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 renselanlæggene stor. I overvågningsprogrammet for vandmiljøet, NOVA 2003, er det ønsket at vurdere, hvilken belastning der er på miljøet fra renselanlæggene. Derfor er det nødvendigt på afløb fra renselanlæggene 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 efterfølgende analyseres med en specifik metode. Fagdatacentret for Punktkilder har ønsket, at der måles for kationiske detergenter som 3 specifikke stoffer (dimethylammoniumchloridforbindelser).

Da der anvendes både kationiske og anioniske detergenter, vil spildevandet indeholde begge typer. Anioniske og kationiske detergenter kan binde sig til hinanden, og derfor er det vigtigt for et fornuftigt resultat, at der foretages en adskillelse af de to typer detergenter forud for analyse.

VKI (nu Eurofins A/S) har i litteraturstudiet "Overview of Analytical Methods for Determination of Anionic and Cationic Surfactants in Danish Drinking Water and Ground Water" /1/ beskrevet en række metoder til bestemmelse af detergenter i rent vand (grundvand og drikkevand). Formålet med denne rapport var at undersøge nyere (efter 1998) litteratur for metoder til analyser for kationiske detergenter samt at undersøge litteratur om detergentanalyse i spildevand (afsnit 1). Endvidere var målet at udvikle en metode til ikke-specifik kationanalyse i afløbsvand (afsnit 2) og at evaluere denne metode (afsnit 3).

Metoden skal opfylde et detektionsgrænsekraft (DL) på 10 µg/L og have et måleområde fra detektionsgrænsen til 200 µg/L. Endvidere skal metoden opfylde krav svarende til kvalitetsklasse 3 i bekendtgørelse 637 /2/ samt være robust over for interferenser fra anioniske detergenter. Det vil også være ønskeligt, at metoden har mulighed for en senere kvantitativ opdeling i anioniske, kationiske og nonioniske detergenter. Kravene er opsummeret i Tabel 0-1.

	DL (µg/L)	Måleområde (µg/L)	Total relativ standardafvigelse ved 20 kontrolprøvepar ($>5*DL$)	Genfindning af middelværdi af kontrolprøver ($>5*DL$)
Krav	10	10-200	$\pm 7\%$ ^{A)}	$\pm 5\%$ ^{A)}

Tabel 0-1 Krav til metoden for bestemmelse af kationiske detergenter i afløbsspildevand.

^{A)} Svarende til kvalitetskrav 3 i bekendtgørelse 637 (Miljø- og Energiministeriet, 1997) /2/.

Disse krav blev fastsat ud fra det forventede indhold i afløbsspildevand (se Tabel 0-2).

	Indhold (mg/L)	Metode	Reference
Husholdningsspildevand i indløb (Danmark)	Maks. værdi: 3.9 Min. værdi: 1.9 Gennemsnit: 2.5	VKI, 1988	MST Miljøprojekt 357, 1997 /3/
Estimeret indhold i afløb (Danmark) ^{A)}	Maks. værdi: <0,20 Min. værdi: <0,01 Gennemsnit: <0,13	VKI, 1998	MST Miljøprojekt 166, 1991 /4/
Afløb (Tyskland)	0,082	DIN 38409 Teil 20, 1989	Metodeafprøvning DIN 38409 Teil 20, 1989 /5/
Lüdingenhausen i udløb (Tyskland, 1986)	0,07	DIN 38409 Teil 20, 1989	Gerike et al, 1994 /6/
Kommunalt renseanlæg (Indien)	3-5	FIA (Patel et al, 1999)	Patel et al, 1999 /7/

Tabel 0-2 Forventet indhold i spildevand. ^{A)} I Miljøprojekt 166 /4/ blev det konkluderet, at mere end 95% af de kationiske detergenter blev fjernet i renseanlæggene. Derfor er et estimat udregnet ud fra oplysningerne på husholdningsspildevand givet i Miljøprojekt 357 /3/.

Af hensyn til miljøet og arbejdsmiljøet blev det undersøgt, om chloroform, som anvendes i eksisterende metoder, kunne udfases. Endvidere var det ønsket at udvikle en metode, som ikke benyttede en udrustning med belastende arbejdsstillinger (vedvarende monotone bevægelser).

Som led i optimeringen af metoden blev en alternativ farvereaktion i metodens detektionstrin undersøgt. Den undersøgte farvereaktion svarede til en eksisterende DIN-standard /5/, hvor de kationiske detergenter bestemmes spektrofotometrisk ved 628 nm efter reaktion med disulfidblåt.

Metoden blev herefter evalueret efter principperne beskrevet i "Håndbog i Metodevalidering for Miljølaboratorier" /13/.

1 Litteraturstudie

Hovedvægten i litteraturundersøgelsen blev lagt på litteratur vedrørende analyser af kationiske detergenter publiceret i perioden primo 1998 til ultimo 2001. Endvidere blev der lagt vægt på analyser af spildevand.

Litteraturstudiet og metodeudviklingen i denne rapport bygger videre på litteraturundersøgelsen "Overview of Analytical Methods for Determination of Anionic and Cationic Surfactants in Danish Drinking Water and Ground Water" (Merry et al, 1999) /1/. Denne litteraturundersøgelse blev foretaget for perioden 1989 til 1998, og det blev konkluderet, at:

- en modifikation af den tyske standard (DIN 38409 teil 20, 1989 /5/) til kationiske detergentanalyser bør implementeres i Danmark
- der er indici på, at forbehandlingstrinnene (gasstripping og ionbytning) i den tyske standard kan ændres til solid fase ekstraktion (SPE) og derved forbedre detektionsgrænsen
- alternative solventer til chloroform i den tyske standard bør undersøges. Methylisobutylketon (MIBK) kunne være en mulighed
- der skal benyttes det samme standardstof i den danske standard som i den tyske (Disteryldimethylammoniumchlorid, DSDMAC). DSDMAC er meget lidt bionedbrydelig og vil derfor være aktuelt i mange år fremover.

Litteraturstudiet er opdelt i metoder og standarder, der bliver benyttet til ikke-specifikke kationiske og anioniske detergentanalyser (afsnit 1.1). Herefter vises resultaterne af litteraturundersøgelsen af detergentanalyser nyere end 1998 (afsnit 1.2). I afsnit 1.3 vises resultaterne fra specialet "Bestemmelse af ioniske og nonioniske detergenter i spildevand og spildevandsslam" (K.-H. Theil, 2002) /8/, der ligger til grund for metodeudviklingen i denne rapport.

1.1 Standarder og metoder til ikke-specifik detergentanalyse

Tabellen nedenfor viser nøgletallene for de danske og internationale standarder, som findes for ikke-specifikke detergentanalyser.

Metode	Analyse-parametre	Matricer	Opkoncentration	Oprensning	Detektion	Måleområde (µg/L)
VKI, 1999 ^{A)}	Kationiske detergenter	Drikkevand grundvand overfladevand	Fastfaseekstraktion med kationbytter. Eluering med vand/ethanol-blanding		Reaktion med bromthymolblåt. Udrystning med chloroform i skilletragt. Standardstof ADMBAC. Spektrofotometri (416 nm)	5-100
DIN 38409 Teil 20, 1989	Kationiske detergenter	Afløbsvand overfladevand drikkevand	Gasstripping af detergenter med N ₂ eller luft. Inddampning ^{B)}	Fjernelse af anioniske detergenter med anionbytter	Reaktion med disulfinblåt. Udrystning med chloroform/butanol på magnetomrører. Standardstof DSDMAC. Spektrofotometri (628 nm)	10-1000
DS 237: 1976 /10/	Anioniske detergenter	Alle vandtyper	Reaktion med methylenblåt. Udrystning med chloroform i skilletragt.		Standardstof natriumarylarsulfat. Spektrofotometri (652 nm)	25-100000
DS/EN 903:1994 /11/	Anioniske detergenter	Drikkevand overfladevand spildevand	Gasstripping af detergenter med N ₂ . Inddampning. Genopløsning og tilsætning af metyhlenblåt		Standardstof dodecylbenzensulfonsyremethylester. Spektrofotometri (650 nm)	100-5000
SM ^{C)} 5540B	Alle detergentlignende stoffer	Vand spildevand ^{E)}	Gasstripping af detergenter med N ₂ til ethylacetat	Inddampning af ethylacetat	Vejning af stofmængde efter inddampning ^{D)}	200-2000
SM ^{C)} 5540C	Anioniske detergenter	Drikkevand spildevand ^{E)}	Som DS 237:1976 /10/		Standardstof natriumarylarsulfat. Spektrofotometri (652 nm)	10-200

Tabel 1-1: Metoder og standarder til ikke-specifik analyse af kationiske og anioniske detergenter.

^{A)} Østergaard et al, 1999. /9/ ^{B)} Indampningen af prøven foregår efter fjernelse af de anioniske detergenter. ^{C)} Standard Methods, 1999 /12/ ^{D)} Metoden bestemmer alle stoffer, der med gasstripping overføres til ethylacetat fasen. ^{E)} I spildevand vil mange andre stoffer interferere.

Som det fremgår af Tabel 1-1, vil den tyske standard med gasstripping kunne anvendes til analyse af kationiske detergenter i spildevand i Danmark. Da denne metode er besværlig at automatisere, er det ønskeligt at finde en anden metode (Merry et al, 1999 /1/). En metodevalidering (U. Lund et al, 1994 /13/) for VKI-metoden med spildevand vil kunne afgøre, om metoden er egnet til spildevandsanalyser. De to metoder kan ikke umiddelbart udvides til analyse af andre detergenttyper, som det er ønskeligt.

1.2 Søgekriterier i litteraturundersøgelsen for 1998-2001

Litteratursøgningen blev foretaget på interne (VKI-basen for rapporter, bøger, artikler) og eksterne baser (Re:search, DTV's søgemaskine og STN Easy, international søgemaskine omfattende blandt andet Chemical Abstracts på <http://stneasy.fiz-karlsruhe.de/>).

I VKI-basen blev der foretaget søgning med kriterierne (kationisk or cationic) and (detergent or surfactant) samt en søgning på (anionic or anionisk) and (detergent or surfactant).

På de eksterne baser blev der benyttet søgekriterierne (analys? or determination?) and cationic? and 1997-2001 samt (wastewater? or waste water?) and (detergent? or surfactant?) and 1990-2001. "?" angiver, at der medtages alle ord, der starter med de anførte ord (trunkering).

1.3 Resultater af litteraturundersøgelse

For at øge overskueligheden af resultaterne fra litteraturundersøgelsen blev disse indført i tabeller i Bilag Q og R.

1.3.1 Ikke-specifikke analyser

Af Bilag Q fremgår det, at ingen af metoderne har et måleområde, der er interessant i denne rapport (jf. krav til metoden i Forordet). Det kan derfor konkluderes, at der ikke efter litteraturstudiet af Merry et al (1999) /1/ er udgivet artikler, som vil ændre konklusionerne fra denne rapport (se afsnit 1).

1.3.2 Specifikke analyser

Formålet med at medtage specifikke analyser i denne rapport var at undersøge, om metoderne anvendt til opkoncentrering og oprensning kunne overføres til en ikke-specifik metode. I Bilag R ses de mest interessante resultater fra litteraturundersøgelsen af de specifikke metoder. I ingen af de viste metoder indgår opkoncentrerings- eller oprensningstrin, der blev fundet egnet til ikke-specifikke detergentanalyser. Derfor behandles de ikke mere i denne rapport.

1.3.3 Konklusion på litteraturundersøgelsen

Ingen af de eksisterende standarder eller artikler fra litteraturundersøgelsen viser metoder, der opfylder kravene opstillet i Forordet. Derfor følges konklusionen af Merry et al (1999) /1/. Her blev blandt andet konkluderet, at DIN 38409 Teil 20 /5/ formentlig kunne forbedres med en fastfase ekstraktion (SPE).

1.4 Fastfase ekstraktion (SPE)

Det var ønskeligt at udvikle en metode, der efterfølgende ville kunne videreudvikles til separation af detergenter i de 3 detergentklasser. N.

Buschmann et al (1992) /14/ og Kloster et al (1994, 1997) /15, 16/ har vist, at denne separation var mulig. På baggrund af disse artikler har K.-H. Theil (2002) /8/ undersøgt forskellige SPE-kolonner og eluenter til oprensning og adskillelse af nonioniske, anioniske og kationiske detergenter.

K.-H. Theil (2002) /8/ undersøgte genfindingen af lineære alkylbenzen-sulfonater (anion, LAS 8,2 og LAS 15,2), alkyldimethylbenzylammonium (kation, ADMBAC) og nonylphenolpolyethoxylat (nonion, NPP) på forskellige kolonnetyper. K.-H. Theil undersøgte forskellige ionbyttermaterialer: octadecyl substitueret silicat kolonner (C18), grafitiseret carbon black kolonner (GCB), styrendivinybenzen kolonner (SDVB) og modificerede styrendivinybenzen kolonner (PPL) til opkoncentreringstrinnet. I denne undersøgelse blev detergenterne analyseret med specifikke metoder. De forskellige ionbyttermaterialer, C18 og GCB, blev fravalgt pga. irreversibel binding af detergenterne og dårlig genfinding samt brugen af chloroform til eluering. I sammenligningen af SDVB og PPL-kolonnerne blev det fundet, at PPL-kolonnerne gav de bedste genfindinger for de fire undersøgte stoffer. For ADMBAC var genfindingen 84-93%. En alumina-kolonne blev undersøgt til separation i detergenttyper. De bedste genfindinger blev fundet ved brug af eluenter svarende til dem, der er beskrevet i afsnit 2.6.

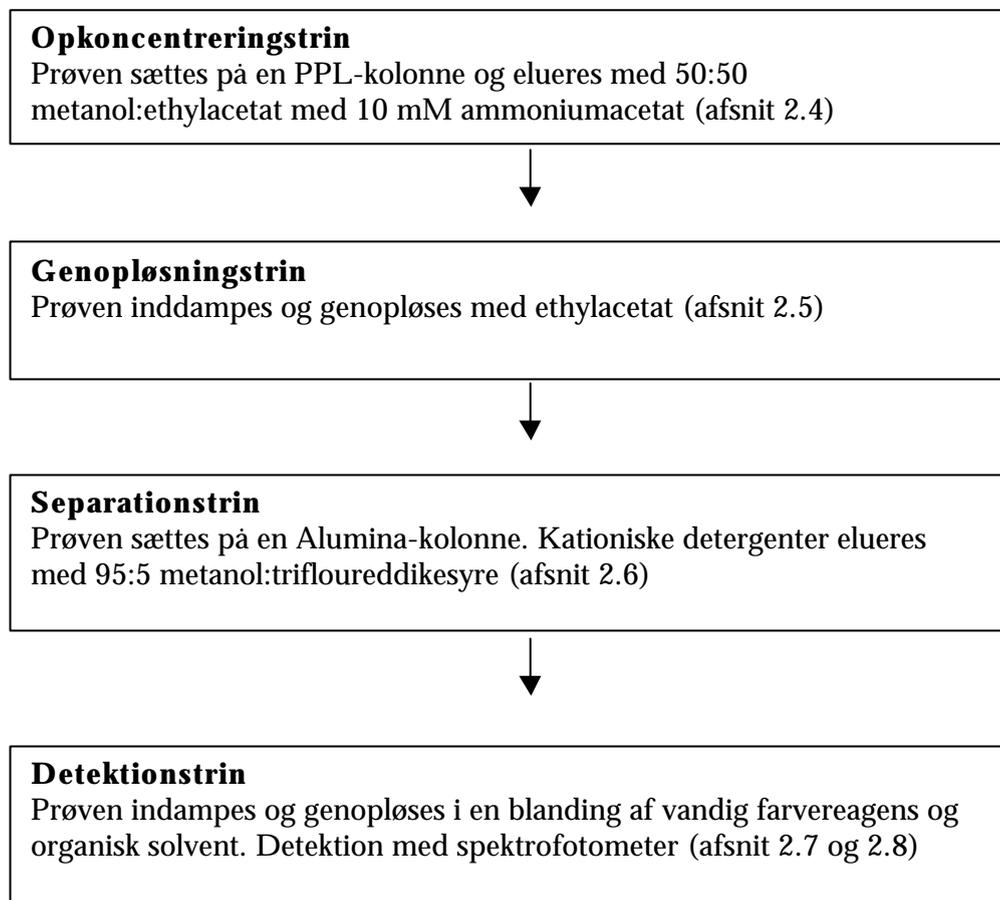
I metodeafprøvningen af K.-H. Theil (2002) /8/ blev fundet en genfinding af kationiske detergenter i spildevandsprøver på 51-76% og for anioniske detergenter på 76-106%. Det blev vurderet, at denne metode havde potentiale til at opfylde de krav, vi har opstillet for en ikke-specifik metode. Derfor blev metoden beskrevet af K.-H. Theil (2002) /8/ modificeret mht. detektionsmetode og benyttet i denne metodeudvikling.

2 Metodeudvikling

2.1 Den anvendte metode

Metoden i denne metodeundersøgelse bygger på en adskillelse i 3 detergenttyper. Princippet er beskrevet af Kloster et al (1994) /15/ og N. Buschmann et al (1992) /14/. K.-H. Theil (2002) /8/ har på baggrund heraf undersøgt forskellige kolonnetyper og eluenter, og det er dette arbejde, denne metodeudvikling bygger videre på.

De enkelte trin og principperne for denne metode er vist i nedenstående figur.

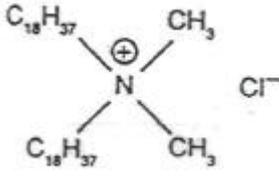
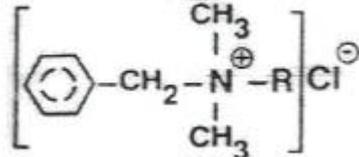


Figur 2.1-1 Principperne og grundtrinnene i metoden.

Metodeundersøgelsen blev gennemført således, at de enkelte deltrin blev undersøgt og optimeret enkeltvis (jf. Figur 2.1-1 og afsnit 2.3 til 2.8). Når der for enkeltrin blev fundet acceptable genfindinger og repeterbarheder, blev hele metoden undersøgt samlet (afsnit 2.9).

I metodeundersøgelsen blev alkyldimethylbenzylammoniumchlorid (ADMBAC) benyttet som modelstof. Denne kationiske detergent bliver benyttet som standardstof i den danske metode (Østergaard et al, 1999) /9/.

Disteryldimethylammoniumchlorid (DSDMAC) blev benyttet som standardstof. DSDMAC er standardstoffet, der benyttes i den tyske standard (DIN 38409 Teil 20, 1989) /5/. I Tabel 2.1-1 er strukturformlerne for de to kationiske detergenter gengivet.

alkyldimethylbenzylammoniumchlorid d (benzalkoniumchlorid) ADBAC	disteryldimethylammoniumchlorid DSDMAC
R : C ₈₋₁₈ 	RR ₁ (CH ₃)N ⁺ Cl ⁻ R og R ₁ : C ₁₈ 

Tabel 2.1-1 Strukturformler for de anvendte kationiske detergenter (Merry et al, 1999) /1/.

2.2 Generelle betingelser og apparatur i undersøgelsen

For at forenkle beskrivelsen af forsøgsbetingelserne ved de enkelte delundersøgelser i metodeudviklingen er de generelle betingelser og anvendt apparatur beskrevet her. Hvis intet andet er anført i teksten nedenfor, er undersøgelserne udført under disse betingelser.

De anvendte kemikalier og reagenser er svarende til dem, der er beskrevet i metodeforskriften i Bilag A. Alt glasudstyr var detergentvasket inden brug efter metoden, der ligeledes er beskrevet i Bilag A.

Syntetiske prøver blev fremstillet med en stofmængde svarende til 50 µg ADBAC i 500 mL Milli-Q vand. Alle genfindinger blev udregnet på baggrund af den tilsatte stofmængde og ikke koncentrationerne. Grunden til denne fremgangsmetode var, at prøvevolumenet varierede i mange af de undersøgte deltrin. Stofmængderne blev sammenlignet for at tage højde for disse volumenændringer.

Det anvendte udstyr til fastfaseekstraktionen var en VAC ELUT SPS 24 vacuum manifold fra Varian. Herpå blev Bond Elut PPL-kolonner (3 mL, 200 mg) benyttet til opkoncentreringstrinnet og Mega BE-AL-B alumina-kolonner (6 mL, 1g) til separationstrinnet.

Detektionstrinnet i metodeudviklingen blev gennemført efter følgende princip: Prøven blev udrystet med bromthymolblåt i 250 mL skilletragt med chloroform. Et gulfarvet kompleks blev derved ekstraheret over i chloroformfasen, der blev bestemt med spektrofotometri ved 416 nm. Metoden er beskrevet af Østergaard et al (1999) /9/. I afsnit 2.7 undersøges en alternativ detektionsmetode svarende til den tyske standard (DIN 38409 Teil 20, 1989) /5/. I undersøgelserne efter afsnit 2.7 blev denne metode benyttet.

2.3 Indledende undersøgelser

For at kunne undersøge de enkelte trin i analysen blev det først undersøgt, om modelstoffet (ADMBAC) og standardstoffet (DSDMAC) gav identiske molære absorptionskoefficienter i forskellige matricer efter udfarvningen med bromthymolblåt.

Resultaterne i matricerne blev undersøgt over for den molære absorptionskoefficient udregnet fra en 4-punkts kalibreringskurve for både ADMBAC og DSDMAC i methanol. Methanol svarer til matricen i den eksterne kalibreringskurve, når den fremstilles efter tysk /5/.

Matricerne blev valgt svarende til prøvematricen i de forskellige trin i den planlagte procedure for opkoncentrering og separation. Dette var henholdsvis 50:50 methanol/ethylacetat med 10 mM ammoniumacetat svarende til trinnet for opkoncentrering og 95:5 methanol/trifloureddikesyre svarende til trinnet for separation i proceduren.

	Molær abs.koefficient ($\text{abs}\cdot\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)	Beskrivende faktorer	Genfinding af ADMBAC i methanol (%)
ADMBAC i methanol	$1,50\cdot 10^6$	$R^2=0,9953$	100
ADMBAC i 50:50 methanol/ethylacetat med 10 mM ammoniumacetat	$1,65\cdot 10^6$	$CV^A)=7,0\%$	110
ADMBAC i 95:5 methanol/trifloureddikesyre	$1,20\cdot 10^6$	$CV=11,6\%$	80
			Genfinding af DSDMAC i methanol (%)
DSDMAC i methanol	$1,31\cdot 10^6$	$R^2=0,9988$	100
DSDMAC i 50:50 methanol/ethylacetat med 10 mM ammoniumacetat	$1,59\cdot 10^6$	$CV=11,5\%$	122
DSDMAC i 95:5 methanol/trifloureddikesyre	$1,25\cdot 10^6$	$CV=6,2\%$	96

Tabel 2.3-1 Sammenligning af molære absorptionskoefficienter for bromthymolblåt i forskellige matricer. Resultaterne for methanol var udregnet på baggrund af en 4-punkts kalibreringskurve. Andre matricer var undersøgt med 3-dobbelte bestemmelser på en 50 µg prøve.^{A)} Variationskoefficienten (CV) er givet som standardafvigelsen/gennemsnittet*100%. Originaldata findes i Bilag B.

Undersøgelsen viste, at den molære absorptionskoefficient varierede med matricen. Sammenlignes i stedet de molære absorptionskoefficienter for ADMBAC og DSDMAC inden for den samme matrice, blev der fundet en genfinding på 96% ($1,59\cdot 10^6 / 1,65\cdot 10^6$) af DSDMAC relativt til ADMBAC i 50:50 methanol/ethylacetat med 10 mM ammoniumacetat og 105% ($1,25\cdot 10^6 / 1,20\cdot 10^6$) i 95:5 methanol/trifloureddikesyre. Dette viste, at ADMBAC og DSDMAC havde tilnærmelsesvis ens molære absorptionskoefficienter inden for de forskellige matricer.

I undersøgelsen af de enkelte deltrin blev samme matrice derfor benyttet for den eksterne kalibreringskurve som prøvematrixen efter det undersøgte deltrin. I den endelige metode er det nødvendigt, at den eksterne kalibreringskurve fremstilles og måles i samme matrice som prøverne.

2.4 Opkoncentreringstrin (PPL-kolonne)

I dette trin foregik en applikation af prøven på en PPL-kolonne, efter at kolonnen var blevet konditioneret. Ved applikation menes, at detergenterne i prøven tilbageholdes på kolonnen. Prøven blev fremstillet direkte i 500 mL målekolbe og blev overført til PPL-kolonnen med et slangesystem i teflon fra Supelco. PPL-kolonnen blev herefter tørret med luft. Elueringen skete med 50:50 methanol/ethylacetat med 10 mM ammoniumacetat. I de første undersøgelser blev elueringen som udgangspunkt foretaget med 5 mL eluent over i 10 mL spidsglas. Opkoncentreringstrinnet blev undersøgt for blindniveau, optimeret med hensyn til elueringsvolumen, eluering med stop, applikationshastighed og applikationsvolumen.

2.4.1 Blind

I indledende forsøg (ikke medtaget her) blev der observeret en stigende blindværdi igennem en række forsøgsserier. Proceduren for vask af glasudstyr blev gennemgået og endte svarende til forskriften angivet i Bilag A. For at sikre, at problemet var løst, og eventuelt finde andre kilder til blindværdier blev følgende forsøg udført.

	Gennemsnit (abs.)	Standard- afvigelse
Hele trinnet (konditionering med 5 mL eluent ^{A)})	0,005	0,003
Hele trinnet - uden brug af slangesystemet. Direkte eluering af kolonne (konditionering med 5 mL eluent ^{A)})	0,009	0,005
Hele trinnet - uden brug af slangesystemet. Direkte eluering af kolonne (konditionering med 10 mL eluent ^{A)})	0,006	0,002
Hele trinnet - uden brug af slangesystemet. Direkte eluering af kolonne (konditionering med 15 mL eluent ^{A)})	0,005	0,006
Eluering uden kolonne (konditionering med 5 mL eluent ^{A)})	0,010	0,003
Ekstern kontrol (50 µg)	0,218	0,031
Ekstern blind	0,004	0,005

Tabel 2.4-1 Absorbanser ved 416 nm for blindforsøg på PPL-kolonne. Resultaterne bygger på 4 bestemmelser for blindforsøgene og dobbeltbestemmelser for den eksterne blind og kontrol. ^{A)} Angiver den benyttede mængde af 50:50 methanol/ethylacetat med 10 mM ammoniumacetat i konditioneringstrinnet.

Som det fremgår af Tabel 2.4-1, var blindniveauerne lave. Idet en svag reduktion i blindniveau blev observeret ved stigende volumen anvendt til konditionering, blev 15 mL eluent benyttet i det efterfølgende.

2.4.2 Applikationshastighed og elueringsvolumen

For at fastlægge applikationshastigheden blev to forskellige hastigheder på PPL-kolonnen undersøgt. Disse var henholdsvis 25 og 45 minutter til applikation af 500 mL prøve. Samtidig blev elueringsvolumenet undersøgt. Det anvendte udstyr gjorde, at der maksimalt kunne benyttes 10 mL eluent.

Applikationshastighed (min/500 mL prøve)	Elueringsvolumen (mL)	Genfinding af eksternt standard (%)	CV (%)
25	10	76 / - ^{A)}	0,5
45	5	84 / 66	7 / 9
45	10	100 ^{B)} / 83	- ^{B)} / 7

Tabel 2.4-2 Genfinding af eksterne standarder ved forskellige kombinationer af applikationshastighed og elueringsvolumen. De to forskellige genfindingsresultater henfører til to forskellige analysedage. Originaldata findes i Bilag C og D. ^{A)} Denne kombination blev ikke medtaget på forsøgsdag 2. ^{B)} Dette resultat er en enkeltbestemmelse.

Det fremgår af Tabel 2.4-2, at en langsom applikation (45 minutter eller 30 dråber på 10 sekunder) sammen med det maksimale elueringsvolumen (10 mL) gav den bedste genfinding. Genfindingen var dog ikke tilfredsstillende på begge forsøgsdage, og derfor blev det forsøgt at opdele elueringen i 4 del-elueringer med 3 pauser på hver 5 minutter. De opnåede resultater er opstillet i Tabel 2.4-3.

Elueringsmetode	Elueringsvolumen (mL)	Genfinding af eksternt standard (%)	CV (%)
Uden pause	10	74	2
Med 3 pauser på hver 5 minutter	4 gange 2,5	73	2

Tabel 2.4-3 Genfinding af eksternt standard med og uden pauser i elueringen. Originaldata findes i Bilag E.

Som det fremgår af Tabel 2.4-3, påvirkede indlagte pauser (og dermed længere tid til at opnå ligevægt imellem kolonnematerialet og eluat) ikke genfindingsresultatet. Derfor blev eluering med 10 mL uden pauser på 45 minutter bibeholdt. Genfindingen er stadig uacceptabelt lav.

2.4.3 Applikationsvolumenet

For at undersøge, om den relativt lave genfinding skyldtes, at ADMBAC blev vasket ud af PPL-kolonnen på grund af det høje prøvevolumen (500 mL), blev prøver med forskellige prøvevolumener, men med konstant stofmængde undersøgt.

Prøvevolumen (mL)	Genfindingsprocent af ekstern standard ^{A)} (%)	CV (%)
15 ^{B)}	108	4
100	107	2
250	105	1
500	106	1
500 (25 µg ^{C)})	107	6

Tabel 2.4-4 Genfindingsprocent af 50 µg ADMBAC-prøver med variabel prøvevolumen fremstillet direkte i målekolber. I undersøgelsen blev der sammenlignet med ^{A)} Ekstern standard fremstillet i 50:50 methanol/ethylacetat med 10 mM ammoniumacetat. ^{B)} Applikation direkte på kolonne, først 5 mL standard efterfulgt af 10 mL Milli-Q vand. ^{C)} 25 µg ADMBAC prøve i 500 mL. Originaldata findes i Bilag F.

Tabel 2.4-4 viser, at ADMBAC ikke blev vasket ud af kolonnen ved store prøvevolumener. Da disse genfindingsprocenter var acceptable i forhold til kravene i Forordet, blev de andre trin i metoden undersøgt. De forbedrede genfindingsprocenter i forhold til Tabel 2.4-3 blev tillagt øget rutine med metoden hos teknikeren, der udførte forsøgene. Endvidere blev det fundet vigtigt at undersøge, hvorvidt de efterfølgende trin gav anvendelige resultater, før dette trin eventuelt blev endeligt optimeret.

2.4.4 Delkonklusion

Undersøgelserne viste, at en lang applikationstid (45 minutter) sammen med et højt elueringsvolumen (10 mL) gav de bedste genfindinger af den eksterne standard. Endvidere blev det vist, at pauser i eleringen ikke gav mærkelig forbedring af genfindingsprocent, og at et øget prøvevolumen ikke bidrog negativt til resultaterne. En øget mængde af 50:50 methanol/ethylacetat med 10 mM ammoniumacetat i konditioneringsstrinnet af PPL-kolonnen reducerede antydningens blindværdi. Derfor konditioneres i metodeforskriften i Bilag A med 15 mL.

En acceptabel genfindingsprocent blev fundet for dette deltrin i de afsluttende forsøgsserier.

2.5 Genopløsningsstrin mellem PPL- og alumina-kolonne

Når prøven var elueret fra PPL-kolonnen, var den opløst i en 50:50 methanol/ethylacetat med 10 mM ammoniumacetat opløsning. Den blev inddampet til tørhed og genopløst i 5 mL ethylacetat på ultralydsbad i 5 minutter. Herefter kunne detergenterne i prøven sættes på en alumina-kolonne efter opvarmning. Til undersøgelse af dette trin blev prøver i en 50:50 methanol/ethylacetat med 10 mM ammoniumacetat fremstillet direkte i spidsglassene. Disse blev inddampet til tørhed og genopløst. Genfindingsprocenterne over for eksterne standarder er vist i nedenstående tabel.

ADMBAC (μg)	Genfindings af ekstern standard (%)	CV (%)
50	109	2
100	118	3

Tabel 2.5-1 Genfindings af 50 μg og 100 μg ADMBAC prøver efter inddampning fra 50:50 methanol/ethylacetat med 10 mM ammoniumacetat og genopløsning i ethylacetat. I undersøgelsen blev der sammenlignet med en ekstern standard fremstillet i ethylacetat. Originaldata findes i Bilag G.

Som det fremgår af Tabel 2.5-1, var genfindings for høj i forhold til kravet i Forordet.

I undersøgelsen fandt vi en gennemsnitlig blindabsorbans på 0,005 svarende til 3% af absorbansen i en 50 μg prøve. Altså var der intet betydeligt blindbidrag fra dette trin. Genfindingsprocenter større end 100 skyldtes usikkerheden i fremstillingen af standarderne.

Konklusionen var, at der kunne opnås en acceptabel genfindings sammen med en lav blindabsorbans. Resultaterne viste, at dette trin kunne benyttes i analysemetoden. Her blev kun undersøgt syntetiske prøver. I afsnit 2.9 blev problemer i dette trin for spildevandsprøver observeret. Derfor blev dette trin efterfølgende modificeret, se afsnit 2.9.

2.6 Separationstrinnet (Mega BE-AL-B alumina-kolonne)

Separationen af nonioniske, kationiske og anioniske detergenter foregår i dette trin på Mega BE-AL-B alumina-kolonner. Efter applikation af prøven på kolonnen kunne de forskellige detergentfraktioner isoleres i forskellige eluenter:

- 1) 95:5 ethylacetat/methanol til nonioniske detergenter
- 2) 95:5 methanol/trifluoreddikesyre til kationiske detergenter
- 3) 75:25 methanol/2 M HCl til anioniske detergenter

Der blev elueret med 6 mL af hver eluent.

I det følgende undersøges, om isoleringen af kationiske detergenter fra anioniske detergenter er effektiv. Endvidere undersøges om anioniske detergenter kan genfindes efter eluering med 75:25 methanol/2 M HCl.

2.6.1 Isolering af kationiske detergenter

De tre eluentfraktioner blev undersøgt for kationiske detergenter.

Fraktion	Genfindning af ekstern standard (%)	CV (%)
95:5 ethylacetat/methanol (nonioniske detergenter)	5 ^{A)}	- ^{A)}
95:5 methanol/trifloureddikesyre (kationiske detergenter)	106	6
75:25 methanol/2 M HCl (anioniske detergenter)	1 ^{A)}	- ^{A)}

Tabel 2.6-1 Genfindning af kationiske detergenter i de tre fraktioner i separationstrinnet over for en ekstern standard af 95:5 methanol/trifloureddikesyre. Originaldata findes i Bilag H.

^{A)} Enkeltbestemmelse.

Som det fremgår af Tabel 2.6-1, blev hovedparten af de kationiske detergenter genfundet i den forventede fraktion. I de to andre fraktioner var absorptionsniveauet af samme størrelsesorden som blindbidraget.

2.6.2 Interferensundersøgelse fra anioniske detergenter (LAS)

Genfindingen af kationiske detergenter i prøver tilsat forskellige niveauer af anioniske detergenter (LAS) er gengivet i Tabel 2.6-2.

Tilsat LAS	Genfindning af kationiske detergenter (%) ^{A)}	CV (%)
0 µg	97	10
60 µg	108	4
120 µg	104	2
300 µg	97	2

Tabel 2.6-2 Genfindning af kationiske detergenter i separationstrinnet efter tilsætningen af anioniske detergenter over for en ekstern standard i 95:5 methanol/trifloureddikesyre.

Originaldata findes i Bilag I. ^{A)} På baggrund af en 50 µg ADMBAC opløsning.

Undersøgelsen viste, at genfindingen ikke blev systematisk påvirket af tilstedeværelsen af anioniske detergenter, og at den overholdt kravene fra Forordet.

2.6.3 Genfindning af anioniske detergenter (LAS) i 3. fraktion

For at dokumentere, at de anioniske detergenter blev separeret fra de kationiske detergenter i fraktion 2 og opsamlet i 3. fraktion, blev LAS undersøgt i de forskellige fraktioner. Resultaterne af denne undersøgelse vises i Tabel 2.6-3. Til analyse af LAS blev en specifik analyse anvendt (HPLC med UV- og fluorescensdetektion (UV-FLD) /32/).

LAS i prøven	1. fraktion (%)	2. fraktion (%)	3. fraktion (%)
0 µg/L	0 ^{A)}	0 ^{A)}	0 ^{A)}
127 µg/L	- ^{B)}	2,8	97,2
222 µg/L	- ^{B)}	2,0	98,0
317 µg/L	Ingen påvisning	0,5	99,5

Tabel 2.6-3 Fordeling af LAS i de forskellige fraktioner efter separationstrinnet. 1. fraktion er nonioniske detergenter, 2. trin er kationiske detergenter og 3. fraktion er anioniske detergenter. Resultaterne er i procent af den total målte mængde fra den specifikke analyse af LAS målt med HPLC med UV-FLD /15/. ^{A)} målingen af LAS i denne prøve gav intet resultat.

^{B)} Disse målinger blev ikke udført.

Undersøgelsen viste, at hovedparten af LAS blev elueret i 3. fraktion. Den del, der blev elueret med i 2. fraktion, udgjorde mindre end 3%. Derfor blev det konkluderet, at separationen af kationiske og anioniske detergenter var tilfredsstillende.

2.6.4 Delkonklusion

Undersøgelserne dokumenterede, at hovedparten (97%-108%) af de kationiske detergenter blev elueret i 2. fraktion (95:5 methanol/trifloureddikesyre), og at metoden fjernede interferensen fra anioniske detergenter i tilstrækkeligt omfang. Endvidere blev det vist, at anioniske detergenter blev elueret i 3. fraktion (>97%).

En acceptabel genfindning af eksten standard blev fundet i dette deltrin.

2.7 Detektionstrinnet

Et detektionsprincip svarende til den tyske standard (DIN 38409 Teil 20, 1989) /5/ blev undersøgt. Prøven blev først inddampet i et 50 mL bægerglas. Herefter blev 10 mL disulfinblåtbuffer og 25 mL 95:5 chloroform/butanol tilsat, og der blev omrørt kraftigt i 5 minutter på magnetomrører. Det blå kompleks i den organiske fase blev bestemt spektrofotometrisk ved 628 nm.

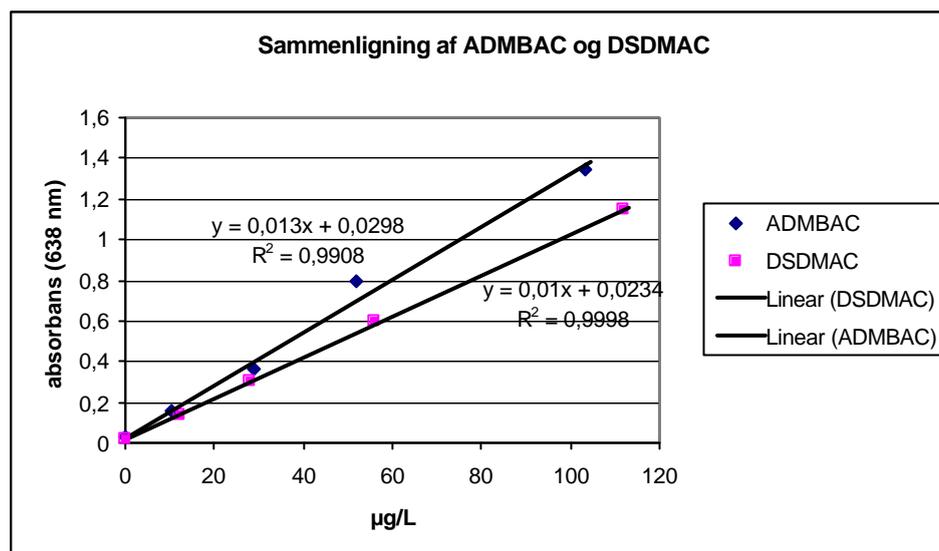
Detektionstrinnet blev først undersøgt for linearitet, følsomhed og præcision. Dernæst blev de molære absorptionskoefficienter for ADMBAC og DSDMAC sammenlignet. Effekten af ufuldstændig inddampning blev også undersøgt.

2.7.1 Linearitet, følsomhed og præcision

Det sås ud fra 4-punkts kalibreringskurven givet i Bilag J, at den testede detektionsmetode gav en god lineær sammenhæng ($R^2=0,9999$). Endvidere gav metoden en god følsomhed. Sammenlignede man følsomheden i absorptionsenheder med den eksisterende VKI-metode (Østergaard et al, 1999 /9/), sås en forbedring med ca. en faktor 10. Variationskoefficienten (CV) på de enkelte punkter i kalibreringskurven var maksimalt 2%, hvilket var tilfredsstillende.

2.7.2 Sammenligning af ADMBAC og DSDMAC

Absorptionskoefficienterne for ADMBAC og DSDMAC blev sammenlignet.



Figur 2.7-1. Kalibreringskurver med ADMBAC og DSDMAC. Originaldata er gengivet i Bilag K.

I Figur 2.7-1 ses det, at kalibreringskurven for ADMBAC gav en højere absorbans og dermed en bedre følsomhed end kalibreringskurven for DSDMAC. Absorptionskoefficienten for DSDMAC udgjorde kun ca. 80% af den for ADMBAC. Det fremgår af kalibreringskurven for ADMBAC, at R^2 var dårligere end resultatet fundet i afsnit 2.7.1. Dette skyldtes det næsthøjeste punkt. Ved at udelade dette punkt kunne samme linearitet ($R^2=0,9993$) findes. Denne udeladelse ændrer ikke på andre af konklusionerne.

Da det var ønskeligt, at resultaterne med denne metode kunne sammenlignes med den tyske standard (DIN 38409 Teil 20, 1989) /5/, skulle standardkurven med DSDMAC benyttes i den endelige metode.

2.7.3 Effekten af ufuldstændig inddampning

Effekten af en ufuldstændig inddampning af 95:5 methanol/trifloureddikesyre (solvent fra eluering af alumina-kolonne) inden tilsætningen af disulfinblå og 95:5 chloroform/butanol til bæreglasset er vist i Tabel 2.7-1.

	Gennemsnit (abs.)	CV (%)
Fuldstændig inddampning	0,770	3
Ufuldstændig inddampning	0,551	11

Tabel 2.7-1 Absorbanser for 3-dobbeltbestemmelse af 50 µg ADMBAC.

Det fremgår af Tabel 2.7-1, at følsomheden faldt til 72%, hvis der ikke blev inddampet fuldstændigt. Endvidere blev præcisionen dårligere. Dette skyldtes formentlig, at remanensen var trifloureddikesyre, som ændrede pH i farvereaktionen. Derfor var en fuldstændig inddampning nødvendig.

2.7.4 Delkonklusion

Udfarvningsmetoden svarende til den tyske standard /5/ med disulfinblåt blev undersøgt. Undersøgelsen viste en forbedret følsomhed (over 10 gange

højere målt i absorbansenheder i forhold til den nuværende VKI-metode /9/. Ligeledes blev der fundet en god præcision (CV på de enkelte punkter i kalibreringskurven på 2%).

I undersøgelsen af kalibreringskurver for ADMBAC og DSDMAC viste det sig, at følsomheden for DSDMAC kun er ca. 80% af den for ADMBAC.

I denne metode blev en magnetomrører benyttet til væske-væske ekstraktionen, og derved blev den manuelle udrykning af en 250 mL skilletragt i tre gange 30 sekunder undgået. Dette gjorde metoden betydeligt mere arbejdsmiljøvenlig og mindre arbejdsintensiv end den eksisterende metode.

2.8 Alternative solventer

Det er ønskeligt at undgå chloroform i laboratoriet. Derfor blev det undersøgt, om det var muligt at substituere den benyttede 95:5 chloroform/butanol-blanding med et andet organisk solvent med lignende egenskaber (specielt polaritet). Substitutionen blev forsøgt med butylacetat, ethylacetat, methylisobutylketon (MIBK) og N-butanol.

Undersøgelsen blev udført kvalitativt, ved at 5 mL standard (50 µg ADMBAC) blev overført til et 50 mL bægerglas. Efterfølgende blev 10 mL disulfinblåtbufferopløsning og 25 mL organisk solvent overført. Herefter blev der omrørt kraftigt i 5 minutter på magnetomrøreren. De organiske faser blev vurderet visuelt og på UV-spektrofotometret. Samme procedure blev fulgt for alle de organiske solventer for blindprøver. De kvalitative resultater er gengivet i Tabel 2.8-1.

Solvent	50 µg ADMBAC	Blind
95:5 chloroform/butanol-blanding	Farvekompleks blev ekstraheret til organisk fase. Absorbans ca. 1,0 svarende til tidligere forsøg	Ingen farveændring i organisk fase
Buthylacetat	Minimal ekstraktion af kompleks. Absorbans ca. 0,007 svarende til blind	Ingen farveændring i organisk fase
Ethylacetat	Minimal ekstraktion af kompleks. Absorbans ca. 0,011 svarende til blind	Ingen farveændring i organisk fase
MIBK	Minimal ekstraktion af kompleks. Absorbans ca. 0,007 svarende til blind	Ingen farveændring i organisk fase
N-butanol	Blå farve havde samme intensitet i den vandige fase som i butanolfasen	Blå farve havde samme intensitet i den vandige fase som i butanolfasen

Tabel 2.8-1 Observationer ved undersøgelse af alternative solventer til 95:5 chloroform/butanol-blanding i detektionstrinnet med disulfinblåt som farvekompleks.

I Tabel 2.8-1 ses en ubetydelig ekstraktion af farvekompleks fra den vandige fase til den organiske fase. Kun for N-butanol sås en farveændring. Da denne farveændring var ligesom farveændringen observeret for blindprøven, kunne dette solvent ikke benyttes.

Generelt blev det også observeret, at faseadskillelse mellem den organiske fase og vandfasen var både hurtigere og mere fuldstændig for 95:5 chloroform/butanol-blanding end for de andre undersøgte solventer.

Samme forsøgsdesign blev gennemført for bromthymolblåt. Her blev der observeret en betydelig ekstraktion af gul farvekompleks over i den organiske fase, når der blev anvendt butylacetat, ethylacetat og MIBK. Desværre var det også tilfældet for blindprøverne. Efter ekstraktionen indeholdt N-butanol-fasen samme blå farve både for 50 µg standarden og for blindprøverne.

Konklusionen var, at det ikke umiddelbart vil være muligt at erstatte chloroform med andre solventer. Derfor blev chloroform ikke erstattet. Da udrystningen foregik på en magnetomrører, kunne en reduktion af chloroform fra 50 mL i den eksisterende VKI-metode (Østergaard et al, 1999 /9/) til 25 mL i den nye udformning opnås. Yderligere undersøgelser kunne klarlægge, om det ville være muligt at ændre forholdet mellem chloroform og butanol fra 95%-chloroform til en mindre andel.

2.9 Metodeafprøvning

Da de enkelte deltrin i metoden nu viste acceptable genfindinger og en acceptabel repeterbarhed, blev en afprøvning af hele metoden gennemført. Til metodeafprøvningen blev der benyttet rensset spildevand fra Sjælsø Renseanlæg udtaget den 5. november 2001. Inden analyse blev spildevandet filtreret gennem et 0,45 µm filter. Indledende forsøg med denne metode (ikke medtaget her) viste, at indholdet af kationiske detergenter var mindre end 5 µg pr. 500 mL spildevand. I nedenstående undersøgelser blev spildevandet derfor spiket.

Hele metoden blev testet med dobbeltbestemmelser af blindprøve, syntetiske prøver (7,5 µg og 80 µg ADMBAC), naturlige prøver (spildevand spiket med 20 µg og 60 µg ADMBAC) og en kontrolprøve (syntetisk prøve 40 µg ADMBAC). Disse prøver vil svare til dem, der skal medtages i en endelig metodevalidering (U. Lund et al, 1994 /13/).

	Absorbans	Beregnet mængde (µg)	Forventet mængde (µg)	Genfinding (%)
Blind (Milli-Q vand)	0,019	0	0	-
	0,042	0	0	-
Syntetisk 7,5 µg	0,11	4,12	7,5	55
	0,123	4,99	7,5	67
Spildevand + 20 µg spike	0,354	20,48	20	102
	0,17	8,14	20	41 ^{A)}
Spildevand + 60 µg spike	0,408	24,10	60	40
	0,432	25,71	60	43
Syntetisk 80 µg	0,537	32,76	80	41
	0,874	55,35	80	69
Kontrol (syntetisk) 40µg	0,491	29,67	40	74
	0,468	28,13	40	70

Tabel 2.9-1 Genfinding af spikede naturlige og syntetiske prøver efter hele analysemetoden. Originaldata findes i Bilag L. ^{A)} Farvebuffer var grøn efter udrystning

Det fremgår af Tabel 2.9-1, at genfindingen af tilsatte ADMBAC-standarder ikke var acceptabel efter analyse efter hele proceduren. I inddampningstrinnet efter PPL-kolonnen (beskrevet i afsnit 2.5) blev der for de naturlige prøver observeret brune/sorte udfældninger i spidsglasset efter inddampningen. Dette kunne være en medvirkende årsag til den dårlige genfinding. Dette bliver undersøgt i afsnit 2.9.1. For at undersøge, hvorvidt PPL-kolonnen volumener kunne være for lille og dermed bidrage til den lave genfinding, er der i 2.9.2 undersøgt to forskellige kolonnestørrelser.

2.9.1 Inddampningsvolumen

For at undersøge, om den dårlige genfinding kunne skyldes udfældninger af kationiske detergenter, der ikke kunne genopløses, blev følgende undersøgelse udført. Både spiket spildevand og syntetiske prøver blev inddampet i spidsglas til henholdsvis tørhed, ca. 100 µL restvolumen og ca. 200 µL restvolumen. Derudover var forsøgsbetingelserne identiske med dem beskrevet i afsnit 2.5 på nær udfarvningsmetoden, hvor princippet i afsnit 2.7 blev benyttet. Resultaterne fra disse undersøgelser er gengivet i Tabel 2.9-2.

	Restvolumen (µL)	Genfinding (%)
Spildevand + 50 µg spike	0	55 49
Spildevand + 50 µg spike	100	74 72
Spildevand + 50 µg spike	200	72 76
Syntetisk prøve (50 µg)	0	80 98
Syntetisk prøve (50 µg)	100	84 98
Syntetisk prøve (50 µg)	200	83 97

Tabel 2.9-2 Genfinding af spike til naturlige og syntetiske prøver ved varierende grad af inddampning inden genopløsning. Forsøgsbetingelserne er beskrevet i afsnit 2.5, dog med detektionsmetoden beskrevet i afsnit 2.7. Originaldata findes i Bilag M og N.

Tabel 2.9-2 viser, at genfindingen af spiket til den naturlige prøve blev forbedret fra ca. 40% til ca. 75%, når inddampning ikke var fuldstændig. Genfindingsprocenterne af den syntetiske prøve blev ikke påvirket af den ufuldstændige inddampning. Genfindingen af den syntetiske prøve viste stor spredning og en lidt mindre generel genfinding end forventet. Denne spredning kunne ikke umiddelbart forklares. Der blev i afsnit 2.5 fundet en genfinding på ca. 100% på syntetiske prøver.

2.9.2 Kolonnestørrelse af PPL-kolonnen

I trinnet til opkoncentrering blev der benyttet Bond Elut PPL-kolonner (3 mL, 200 mg). I et forsøg på at øge genfindingen blev Bond Elut PPL-kolonner (3 mL, 500 mg) undersøgt over for denne.

	Kolonnestørrelse (mg)	Genfinding (%)
Syntetisk prøve (50 µg)	200	84 68
Spildevand + 50 µg spike	200	66 54
Syntetisk prøve (50 µg)	500	77 82
Spildevand + 50 µg spike	500	72 83

Tabel 2.9-3 Genfinding af spike til naturlige og syntetiske prøver ved varierende kolonnestørrelse for PPL-kolonnen. Forsøgsbetingelserne er beskrevet i afsnit 2.4, dog med detektionsmetoden beskrevet i afsnit 2.7. Originaldata findes i Bilag O.

Det fremgår af Tabel 2.9-3, at genfindingen af den syntetiske prøve ikke blev påvirket af ændringen i kolonnestørrelsen. For spildevandsprøven sås en klar forbedring fra en gennemsnitlig genfindingsprocent på 60% til 78%. Da blindbidraget ikke blev påvirket af den øgede kolonnestørrelse, blev det konkluderet, at der skulle skiftes kolonnestørrelse.

2.9.3 Delkonklusion

For naturlige prøver viste resultaterne, at en inddampning til total tørhed i trinnet efter PPL-kolonnen gav dårlig genfinding. Dette blev i 2.9.1 undersøgt, og konklusionen var, at der skulle inddampes, til et restvolumen på 200 µL. Endvidere blev det i 2.9.2 vist, at en PPL-kolonne med 500 mg kolonnemateriale gav bedre genfinding af spike til spildevand end ved 200 mg. 500 mg PPL-kolonne blev derfor benyttet i det efterfølgende.

2.10 Endelig metodeudformning

I det sidste forsøg i metodeafprøvningen blev i begge genopløsningstrin i proceduren indført et grundigere skylletrin end tidligere. Først blev henholdsvis 2 mL ethylacetat/4 mL MeOH anbragt i spidsglasset. Bund og sider blev skyllet grundigt ved at trække solventet op i en pasteurpipette 10 gange og mellem hver gang at lade det løbe ned langs siderne på spidsglasset.

	Genfinding (%)	CV (%)	Detektionsgrænse (µg/L)
Syntetisk prøve (50 µg)	87	2,5	12
Spildevand + 50 µg spike	89	6,2	40

Tabel 2.10-1 Genfinding af spike til naturlige og syntetiske prøver. Metoden beskrevet i Bilag A blev benyttet. Resultaterne blev baseret på 4 replikater for de syntetiske prøver og 3 replikater for det spikede spildevand. Originaldata findes i Bilag P.

Resultaterne i Tabel 2.10-1 viste, at metoden gav samme genfinding for syntetiske (87%) og naturlige prøver (89%). Genfindingen af syntetiske prøver opfylder ikke det ønskede krav på $\pm 5\%$ svarende til kvalitetsklasse 3 i bekendtgørelse 637 /2/. Formentligt vil teknikerens øgede rutine kunne forbedre genfindingen. Hvis det i den efterfølgende metodevalidering viser

sig, at metoden generelt giver en lavere genfinding end krævet for kvalitetsklasse 3, kan der korrigeres for genfinding af syntetisk standard.

Repeterbarheden for metoden var henholdsvis 2,5% for syntetiske prøver og 6,2% for spike til naturlige prøver. Kravet fra bekendtgørelse 637 /2/ er $\pm 7\%$, hvilket derfor blev opfyldt.

Den foreløbige detektionsgrænse (endelig detektionsgrænse fastlægges i metodevalideringen) var henholdsvis 12 $\mu\text{g/L}$ for syntetiske prøver og 40 $\mu\text{g/L}$ for spike til naturlige prøver. Den foreløbige detektionsgrænse for de syntetiske prøver var meget tæt på kravet på 10 $\mu\text{g/L}$, mens resultaterne for de naturlige prøver viser et højere resultat. Der er relativ stor usikkerhed på disse resultater, da der kun indgår 4 og 3 replikater i beregningerne. Normalt skal der benyttes mindst 6 replikater i udregningen af en foreløbig detektionsgrænse /13/. Samtidigt var koncentrationerne i prøverne 10 gange den forventede detektionsgrænse. Normalt skal der benyttes prøver med en koncentration 5 gange den forventede detektionsgrænse /13/.

Det kan derfor konkluderes, at metoden er klar til en metodevalidering /13/.

3 Metodevalidering

3.1 Analyseprogram og resultater for metodevalideringen

Metodevalideringen blev gennemført efter "Håndbog i Metodevalidering for Miljølaboratorier" /13/ og gav et mål for linearitet, præcisionen, rigtigheden og analysedetektionsgrænsen. Til udregningerne blev programmet MetVal (VKI, Version 1.1, 16/7-99) benyttet. Dette program benytter teorien fra Håndbog i Metodevalidering for Miljølaboratorier" /13/. Til metodevalideringen blev metodeudkastet i Bilag A benyttet.

3.1.1 Analyseprogram og resultater for linearitetsundersøgelsen

Målet med metoden er et lineært område fra detektionsgrænsen og op til 200 µg/L. Derfor blev følgende undersøgelse gennemført. Ideelt skal lineariteten undersøges for mindst 6 punkter med dobbeltbestemmelse samt et punkt over det ønskede måleområde. På grund af begrænsninger i metodens kapacitet er 100 µg/L kun udført som enkeltbestemmelse.

	Niveau (µg/L ADMBAC)	Duplikater	Resultater (absorbans)
Syntetisk prøve	0	2	0,029 / 0,038
Syntetisk prøve	20	2	0,103 / 0,043
Syntetisk prøve	50	2	0,264 / 0,240
Syntetisk prøve	100	1	0,540
Syntetisk prøve	150	2	0,802 / 0,812
Syntetisk prøve	200	2	1,046 / 0,966
Syntetisk prøve	250	1	1,295

Tabel 3.1-1 Absorbanser fundet ved linearitetsundersøgelsen.

Som det fremgår af linearitetsplottet og af testen med MetVal (begge vist i bilag S), kunne linien antages at være lineær. Endvidere viste testen foretaget i MetVal, at 0 var indeholdt i konfidensintervallet for skæringen. Punktet for 250 µg/L blev medtaget for at kontrollere, om kurven var lineær ud over det ønskede interval fra detektionsgrænsen til 200 µg/L. Dette var tilfældet, og det må derfor forventes, at metoden er lineær ud over det ønskede interval. Men da koncentrationerne i rensset spildevand hovedsageligt ligger væsentligt under 200 µg/L, blev et større interval ikke undersøgt. Hvis en prøve skulle være uden for det ønskede interval må den genanalyseres, hvor der tages en mindre prøvemængde i arbejde end de 500 mL, der foreskrives i metoden.

Når residualplottene afbildedes som funktion af den sande værdi med MetVal, var der ingen systematik (se Bilag S).

Konklusionen var derfor, at metoden var lineær i det mindste i intervallet fra 0 til 200 µg/L, men formentlig også i et større interval.

3.1.2 Analyseprogram for undersøgelse af præcision, rigtighed og detektionsgrænse

Til fastlæggelse af præcisionen, rigtigheden og analysedetektionsgrænsen blev et analyseprogram bestående af 5 analyseserier udført i perioden fra 30. august til 20. september 2002 benyttet. I Tabel 3.1-2 ses det benyttede forsøgsdesign.

Formålet var at dække hele måleområdet for forskellige matricer. 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 spikering og analyse. NVOC er undersøgt i de benyttede spildevand og er henholdsvis 7,2 mg/L C og 8,2 mg/L C for spildevand 1 og 2.

Prøve	Spiket af Stamopløsning ADMBAC (ml) ^{A)}	Bestemmelser/serie	Forventet niveau (µg/L) ^{B)}
Milli-Q vand (blind)	0	2	0
Milli-Q	2,5	2	50
Spildevand 1	5,0	2	100
Spildevand 2	1,5	2	30
Spildevand 2	7,5	2	150

Tabel 3.1-2 Oversigt over serierne i valideringsprogrammet. ^{A)} Milli-Q vand eller spildevandsprøver fyldes op til 500 mL efter tilsætning de angivne mængder 10,0 mg/L ADMBAC standardopløsning i vand. ^{B)} Indledende forsøg viste (ikke medtaget her), at bidraget fra spildevand 1 og 2 var negligibelt, således at den spikede værdi var identisk med den forventede værdi.

3.1.3 Resultater for undersøgelsen af præcision, rigtighed og detektionsgrænse

Resultaterne og udregningerne for de forskellige analyseserier kan findes i bilag T og betegnes her som serie A, B, C, D og E.

Metodevalideringsrapporten, som blev udregnet med programmet MetVal, er vist i bilag U.

Tabel 3.1-3 viser en opsummering af resultaterne i bilag T til U for detektionsgrænse, repeterbarhed, reproducerbarhed og genfindning af tilsat spike.

	Resultater
Detektionsgrænse beregnet ud fra blindprøven ($\mu\text{g/L}$)	2,7
Detektionsgrænse beregnet ud fra den syntetiske prøve (50 $\mu\text{g/L}$) ($\mu\text{g/L}$)	4,1
Detektionsgrænse beregnet ud fra spildevand 2 (30 $\mu\text{g/L}$) ($\mu\text{g/L}$)	13 ^{A)} (29)
Repetérbarhed (%)	1,6-14,8
Repetérbarhed for resultater $>5*DL$ (%)	1,6-10,1
Reproducerbarhed (%)	6,6-67,7
Reproducerbarhed for resultater $>5*DL$ (%)	7,7-12,2
Den relative totale standardafvigelse for resultater $>5*DL$ (%)	8,2-12,5 ^{B)}
Genfindingsinterval (%)	67-182
Genfindingsinterval for resultater $>5*DL$ (%)	67-112
Blind ($\mu\text{g/L}$)	5,1 \pm 3,3
Syntetisk kontrol (50 $\mu\text{g/L}$)	43,8 \pm 5,2 (87,6 %) ^{C)}
Spildevand 1 (spike til 100 $\mu\text{g/L}$)	90 \pm 13 (90,0 %) ^{C)}
Spildevand 2 (spike til 30 $\mu\text{g/L}$)	39 \pm 6,3 (130%) ^{C)}
Spildevand 2 (spike til 150 $\mu\text{g/L}$)	137 \pm 14 (91,3%) ^{C)}

Tabel 3.1-3 Nøgletal for metodevalideringen. ^{A)} I parentes er detektionsgrænsen inklusiv alle analyseresultaterne. For detektionsgrænsen på 13 $\mu\text{g/L}$ er resultat 54,7 $\mu\text{g/L}$ udelukket. ^{B)} Beregnet på baggrund af standardafvigelserne for reproducerbarheden (s_r) og repetérbarheden (s_b)
^{C)} Genfinding af spike.

Detektionsgrænseberegningerne viste, som det fremgår af Tabel 3.1-3, at målsætningen om, at metoden skal have en detektionsgrænse på 10 $\mu\text{g/L}$, blev overholdt både for blindprøve og for den syntetiske prøve, der var 5 gange den forventede detektionsgrænse. Hvis detektionsgrænsen blev udregnet på baggrund af spildevand 1 spiket med 30 $\mu\text{g/L}$ (altså kun 3 gange den forventede detektionsgrænse), blev der fundet en detektionsgrænse på 13 $\mu\text{g/L}$. Altså tæt på den ønskede detektionsgrænse. Da detektionsgrænserne for de syntetiske prøver var henholdsvis 2,7 og 4,1 $\mu\text{g/L}$, må det antages, at en detektionsgrænse på 10 $\mu\text{g/L}$ er realistisk.

For at metoden kunne opfylde kravene i kvalitetsklasse 3 i bekendtgørelse 637 /2/, blev der også krævet en total relativ standardafvigelse på højst \pm 7%. Det fremgik, at den totale relative standardafvigelse var mellem 8,2 og 12,5 %. Dette krav bygger i bekendtgørelse 637 på mere end 20 kontrolprøvepar. Da der i denne undersøgelse kun indgik 4-5 prøvepar, vil dette tal formentligt falde, når antallet af målinger stiger.

Kvalitetsklasse 3 kræver også, at en genfinding af middelværdien for kontrolprøver højst må variere \pm 5% (for prøver 5 gange detektionsgrænsen). Resultaterne fra valideringsforsøgene viste, at vi generelt fandt 8,7% til 12,6% mindre end det forventede. Dette gør, at det må overvejes, om man skal korrigere for dette tab enten ved at spike en af prøverne eller ved at medanalysere en syntetisk prøve. Den endelige beslutning kan dog vente til efter metodeafprøvningen. Hvis der i denne generelt genfindes for lidt, og resultaterne fra laboratoriernes kontrolprøver viser, at man kan korrigere for det med den medanalyserede kontrol eller spikede prøve, bør denne ændring gennemføres i metoden.

I hver analyseserie måtte mindst ét resultat udelukkes, fordi analyseresultatet var gået tabt. Derfor indgik kun mellem 8 og 10

analyseresultater i udregningen af resultaterne i metodevalideringen. Det var ikke været muligt at identificere, hvorfor analyserne mislykkedes. Den efterfølgende metodeafprøvning vil vise, om denne tendens også ses på andre laboratorier.

4 Sammenfatning og konklusion

En metode til analyse af kationiske detergenter i afløbsvand er udviklet. Der blev opstillet krav til metoden, for at den kan benyttes til kationiske detergenter i afløbsvand. Metoden skal opfylde et detektionsgrænsekraft (DL) på 10 µg/L og have et måleområde fra detektionsgrænsen til 200 µg/L. Endvidere skal metoden opfylde krav svarende til kvalitetsklasse 3 i bekendtgørelse 637 /2/ samt være robust over for interferenser fra anioniske detergenter. Metoden skal kunne udvides til analyse for anioniske, kationiske og nonioniske detergenter.

Med baggrund i de stillede krav blev en litteraturundersøgelse udført med hovedvægt på kationiske detergentanalyser, både specifikke og ikke-specifikke. Litteraturundersøgelsen blev foretaget for perioden 1998 til ultimo 2001 og byggede derved videre på undersøgelsen udført af Merry et al (1999) /1/. Litteraturundersøgelsen viste, at ingen artikler eller standarder i denne periode beskriver metoder, der kunne opfylde alle de stillede krav. Derfor blev konklusionerne af Merry et al (1999) fulgt i udformningen af metoden. K.-H. Theil (2002) /8/ optimerede en metode til en opdeling i de 3 detergenttyper ved brug af fastfaseekstraktion (SPE). Metodeudviklingen bygger videre på dette arbejde.

Princippet i den udviklede metode er, at detergenterne i prøven opkoncentreres ved, at de tilbageholdes på en PPL-kolonne. Herefter elueres med 50:50 methanol/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 methanol/trifluoreddikesyre og bestemmes spektrofotometrisk ved 628 nm ved en detektionsmetode svarende til DIN 38409 Teil 20 (1989) /5/. De enkelte deltrin er undersøgt og optimeret separat.

Genfindingen af kationiske detergenter efter separationstrinnet på alumina-kolonnen var 106% (CV=6%) i 95:5 methanol/trifluoreddikesyre og henholdsvis 5 og 1% i de to andre fraktioner. Prøver tilsat anioniske detergenter fra 0 til 600 µg/L LAS viste ingen systematisk påvirkning med genfindinger i intervallet 97-108%. Yderligere undersøgelse af separationstrinnet viste, at mere end 97% af de anioniske detergenter blev elueret af 75:25 methanol/2 M HCl. Det kan derfor konkluderes, at metoden giver en acceptabel adskillelse af anioniske og kationiske detergenter.

Undersøgelsen af detektionstrinnet viste en forbedring i følsomhed på en faktor 10 i forhold til den eksisterende metode målt i absorbansenheder. Det blev endvidere vist, at absorptionskoefficienten for DSDMAC kun udgjorde ca. 80% af den for ADMBAC. Det var på forhånd ønsket at bruge DSDMAC for at kunne sammenligne med den tyske standard, og

DSDMAC bruges som standard i kalibreringskurven i metoden. Kalibreringskurverne for de to standardstoffer viste en god lineær sammenhæng (R^2 større end 0,999) og en god præcision ($CV=2\%$ på de enkelte punkter). Da metoden benyttede en væske-væske ekstraktion med en magnetomrører, kunne man undgå den nuværende metode med manuelle udrystninger med en 250 mL skilletragt, der er meget arbejdsintensiv og med gentaget monotont arbejde.

For at undgå 95:5 chloroform/butanol-blandingen i metoden blev detektionstrinnet undersøgt for muligheden for en substitution med alternative solventer: butylacetat, ethylacetat, methylisobutylketon (MIBK) og N-butanol. Ingen af solventerne var egnede til en substitution, og derfor fortsattes med chloroform. Brugen af denne metode betyder dog en reduktion af chloroformforbruget fra mere end 50 mL til lige under 25 mL pr. analyse. Yderligere undersøgelser vil kunne klarlægge, om forholdet mellem chloroform og butanol kunne ændres, så en mindre andel af chloroform anvendes.

Fra konklusionerne af de enkelte deltrin blev metodeudkastet i Bilag A skrevet. En foreløbig evaluering af hele metoden blev gennemført på en syntetisk og en spiket spildevandsprøve (afløbsvand fra Sjælsø Renseanlæg udtaget 5. november 2001). Resultaterne heraf var en genfinding af den syntetiske prøve på 87% og af den naturlige på 89%. Repeterbarheden for metoden var henholdsvis 2,5% for syntetiske og 6,2% for naturlige prøver. En foreløbig detektionsgrænse blev udregnet ud fra 4 og 3 replikater for både de syntetiske og naturlige prøver. Her blev fundet henholdsvis 12 µg/L og 40 µg/L. Dette resultat er behæftet med stor usikkerhed på grund af det begrænsede datagrundlag. Den øgede følsomhed af metoden i forhold til eksisterende metoder gjorde, at detektionsgrænsekravet må forventes at kunne overholdes. De opnåede resultater viser, at de opstillede krav vil kunne nås med metoden.

Derfor blev metoden underkastet en generel metodevalidering efter Håndbog i Metodevalidering for Miljølaboratorier /13/.

Resultaterne af metodevalideringen viste, at metoden var lineær i intervallet fra 0 til 200 µg/L, men formentlig også i et større interval.

Detektionsgrænsen udregnet efter metodevalideringen på baggrund af både syntetiske og naturlige prøver viste detektionsgrænser på 13; 2,7 og 4,1 µg/L. Disse resultater verificerede, at en detektionsgrænse på 10 µg/L er realistisk.

Et andet krav fra kvalitetsklasse 3 i bekendtgørelse 637 /2/ er, at den totale relative standardafvigelse skal være inden for $\pm 7\%$. Metodevalideringen viste en variation mellem 8,2 og 12,5 %. Da kravet i bekendtgørelse 637 bygger på mere end 20 kontrolprøvepar, og der i denne undersøgelse kun indgik 4-5 prøvepar, vil kravet formentlig kunne overholdes, når antallet af bestemmelser stiger.

Genfindingen af middelværdien for kontrolprøver må højst variere $\pm 5\%$ (for prøver 5 gange detektionsgrænsen). Resultaterne fra validerings-

forsøgene viste, at vi generelt fandt 8,7% til 12,6% mindre end det forventede. Dette betyder, at det må overvejes, om man skal korrigere for dette tab, enten ved at spike en af prøverne eller ved at medanalysere en syntetisk prøve. Den endelige beslutning kan dog vente til efter metodeafprøvningen. Hvis der i denne generelt genfindes for lidt, og resultaterne fra laboratoriernes kontrolprøver viser, at man kan korrigere for det ved den medanalyserede kontrol eller spikede prøve, bør denne ændring gennemføres i metoden.

Konklusionen var derfor, at den pågældende metode opfyldte de opstillede krav i tilstrækkelig grad. Derfor blev en metodeafprøvning iværksat i efteråret 2002. Resultaterne af denne findes i en efterfølgende rapport til Miljøstyrelsen /33/.

5 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, Hørsholm
- /2/ Miljø- og Energiministeriets Bekendtgørelse nr. 637 (1997). *Bekendtgørelse om kvalitetskrav til miljømålinger udført af akkrediterede laboratorier, certificerede personer m.v.*
- /3/ Miljøprojekt 357 (1997). *Miljøfremmede stoffer i husholdningsspildevand*. Miljøstyrelsen
- /4/ Miljøprojekt 166 (1991). *Overfladeaktive stoffer – spredning og effekter i miljøet*. Miljøstyrelsen
- /5/ DIN 38409 Teil 20 (1989). *Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H) – Bestimmung der disulfinblau-aktiven Substanzen (H 20)*.
- /6/ Gerike, P., Klotz, H., Kooijman, J.G.A., Matthijs, E., Waters, J. (1994). *The determination of dihardenedtallowdimethyl ammonium compounds (DHTDMAC) in environmental matrices using trace enrichment techniques and high performance liquid chromatography with conductometric detection*. *Wat. Res.*, 28(1), 147-154.
- /7/ Patel, R., Patel, K.S., (1999). *Simple and specific method for flow injection analysis determination of cationic surfactants in environmental and commodity samples*, *Talanta* 48, 923-931.
- /8/ Theil K.-H., (2002) *”Bestemmelse af ioniske og nonioniske detergenter i spildevand og spildevandsslam”*. Speciale ved Københavns Universitet
- /9/ Østergaard, J. Sønderkær, S., (1999), *Bestemmelse af anioniske overfladeaktive stoffer i slam, Del B:LAS*, VKI, Hørsholm
- /10/ DS 237, (1976). *Vandundersøgelse – Bestemmelse af anioniske overfladeaktive stoffer*.
- /11/ DS/EN 903, (1994). *Vandundersøgelse – Bestemmelse af anioniske overfladeaktive stoffer – Måling af methylenblåindeks, MBAS*
- /12/ Standard Method. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th edition (1999). American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.

- /13/ Lund, U., Andersen, K., Settergren, P., (1994). *Håndbog i Metodevalidering for Miljølaboratorier*. VKI, Hørsholm.
- /14/ Buschmann, N., Kruse, A., Schulz, R., (1992) *Separation of surfactants using solid phase extraction (SPE)*. Jornadas del Comité Espanol de la Detergencia., 23, 317-322
- /15/ Kloster, G. et al., (1994) *Entwicklung eines einheitlichen trennungsganges zur anreicherung aller drei tensidklassen aus umweltsproben.*, Tenside Surf. Det., 31(1), 23-28.
- /16/ Kloster, G. (1997). *Analytical Methods for Surfactants and Complexing Agents at Concentrations Relevant to Environmental Occurrence*. Detergents in the Environment, Surfactant Science Series, Marcel Dekker, N.Y., USA, 65, 65-123.
- /17/ He, Q., Chen, H., (2000). *Flow injection spectrophotometric determination of anionic surfactants using methyl orange as chromogenic reagent*. Fresenius' J. Anal. Chem. (2002), 367(3), 270-274.
- /18/ Jing-fu, L., Gui-bin J., (2001). *Determination of anionic surfactants in detergents by microporous membrane liquid-liquid extraction and flow injection spectrophotometry*. Elsevier Microchemical Journal 68 (2001) 29-33.
- /19/ Bohnen, J., Föllner, B., Rohm, G., Krüssmann, (1998). *Some Chromatographic Determinations of Surfactants in Cleaning Agents*. SÖFW-Journal 11/98.
- /20/ Taguchi, S., Morisaku, K., Sengoku, Y., Kasahara, I., (1999). *A transparent membrane filter for the solid-phase spectrophotometric determination of trace cationic surfactant in water*. The Analyst 1999, 124, 1489-1492.
- /21/ Gerhards, R., Schulz, R., (1999). *Analysis of traces of amphoteric surfactants in water*. Tenside Surf. Det. 36 (1999), Hanser Publishers, München.
- /22/ Campanella, L., Aiello, L., Colapicchioni, C., Tomassetti, M., (1996). *Analysis of cationic surfactants in environmental aqueous matrices by new ISFET devices*. Analytical Letters (Oct 1997) Vol. 30, No. 9, 1611-1629.
- /23/ Waldhoff, H., Scherler, J., Jacobi, M., Schulz, R., (2000). *Potentiometric two-phase titration. A new method for automated determination of ionic surfactants*. Lativista italiana delle sostanze grasse, Vol. LXXVII.
- /24/ Matesic-Puac, R., Stojanovic, M., Sak-Bosnar, M., Hasenay, D., Seruga, M., (2000). *Cationic-surfactant response of ion-selective,*

N,N,N',N'-tetracyclohexyl-3-oxapentanediamide-based PVC membrane electrode. *Tenside Surf. Det.* 37 (2000), Hanser Publishers, München.

- /25/ Borrego, E., Sicilia, D., Rubio, S., Pérez-Bendito, D., (1999). *Determination of Dialkyldimethylammonium Surfactants in Consumer Products and Aqueous Environmental Samples Using the Mixed Micelle-Based Methodology.* *Intern. J. Environ. Anal. Chemistry*, Vol. 75 (1-2), pp. 181-200.
- /26/ Nair, L.M., Saari-Nordhaus, R., (1998). *Recent developments in surfactant analysis by ion chromatography.* *Elsevier Journal of Chromatography A*, 804 (1998) 233-239.
- /27/ Zhou, Y., Chen, D., (1998). *Analysis of surfactants commonly used in detergents by NMR.* *Jingxi Huagong* (1998), 15(Suppl.), 196-198.
- /28/ Riu, J., Eichhorn, P., Guerrero, J.A., Knepper, Th.P., Barceló, D., (2000). *Determination of linear alkylbenzenesulfonates in wastewater treatment plants and coastal waters by automated solid-phase extraction followed by capillary electrophoresis-UV detection and confirmation by capillary electrophoresis-mass spectrometry.* *Elsevier Journal of Chromatography A*, 889 (2000) 221-229
- /29/ Hind, A.R., Bhargava, S.K., Cullis, P.G., (1998). *Quantitation of quaternary ammonium compounds using electrospray mass spectrometry.* *Elsevier Analytica Chimica Acta* 377 (1998) 39-45.
- /30/ Shibukawa, M., Eto, R., Kira, A., Miura, F., Oguma, K., Tatsumoto, H., Ogura, H. Uchiumi, A., (1999). *Separation and determination of quaternary ammonium compounds by high-performance liquid chromatography with a hydrophilic polymer column and conductometric detection.* *Elsevier Journal of Chromatography A*, 830 (1999) 321-328.
- /31/ Voigt, C., Heinig, K., (1999). *Trace analysis of surfactants using chromatographic and electrophoretic techniques.* *Fresenius J. Anal. Chem.* (1999) 363:612-618.
- /32/ Bennetzen, S. (1998). *Chemical analysis of LAS in Sludge, Sediment, Soil and Water Samples*, Intern metode O-44.
- /33/ Favrbø, A., Hansen, N. (2002). *Metodeafprøvning af metode til analyse af kationiske detergenter*, Eurofins, Hørsholm – under udarbejdelse –

Metodeforskrift

Bestemmelse af kationiske
overfladeaktive stoffer
i spildevand

**UDKAST til
metodevalidering**

1 Anvendelsesområde

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

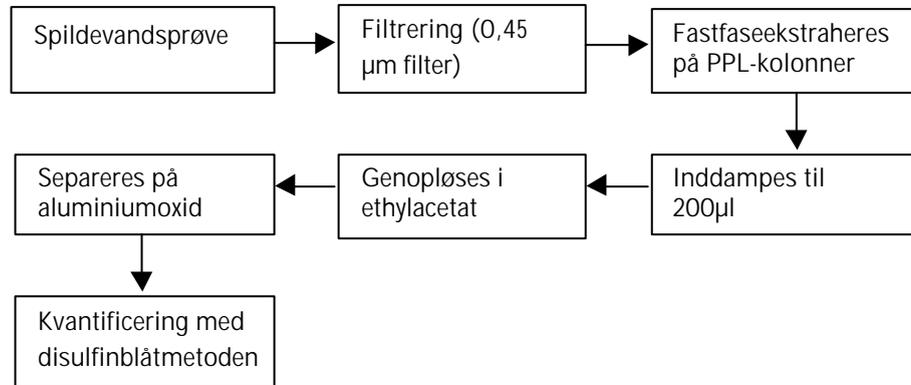
**UDKAST til
metodevalidering**

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 disulfinblåt til dannelsen af farvede komplekser. Absorbansen måles ved en bølgelængden 628 nm.

**UDKAST til
metodevalidering**

3 Metodeoversigt



**UDKAST til
metodevalidering**

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 Disulfidblau, Chromatiese
Ammoniumacetat, Merck, Pro Analyti

4.4 Reagenser

Det anvendte vand skal være demineraliseret, destilleret eller afioniseret vand. Følgende reagenser fremstilles:

4.4.1 0,05 M H_2SO_4

Tilsæt forsigtigt og under omrøring 2,75 mL koncentreret svovlsyre, H_2SO_4 (densitet 1,84 g/mL) til ca. 500 mL vand i et afkølet 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

25 mL butanol anbringes i en 500 mL målekolbe. Fortyndes til 500 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). Fortyndt til 1000 mL med vand.

40 mL af denne opløsning blandes med ca. 60 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

50 mL disulfinblåt-stamopløsning (4.4.3) blandes med 100 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 (benzylammoniumchlorid, 4-(4-alkyldimethylbenzyl)ammoniumchlorid) i 100 mL vand.

4.5.2 Stamopløsning 0,01 mg/L DS-DMAC

Opløs 100 mg DS-DMAC (distearyl-dimethyl-ammoniumchlorid) i 100 mL methanol.

4.6 Elueringsolventer

4.6.1 50:50 v/v methanol/ethylacetat med 10 mg/mL ammoniumacetat

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

4.6.2 95:5 v/v ethylacetat/ethanol

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.

**UDKAST til
metodevalidering**

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

- 2 mL methanol (4.3, til tørhed)
- 6*2,5 mL 50:50 v/v methanol/ethylacetat med 10 mM ammoniumacetat (4.6.1, til tørhed)
- 2 mL methanol (4.3, må ikke udtørre)
- 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 flow hastighed (minimum 45 min for 500 mL, hvilket er ca. 30 dråber pr 10 min). 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). Eluerings solventet anbringes i målekolbe. Hvis prøven var opstillet i køleskab skylles grundigt. Derpå suges det oprindelige slangesystem og kolonnen, spidsglas og der indføres et nyt rettvolumen på 200 µL.

Separation af de kationiske

5.4 Eluatet opsamles i et retegnskar

5.4.1 Klargøring og konditionering af BE-AL-B kolonne

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

- 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/2 M HCl.

**UDKAST til
metodevalidering**

6 Kvantificering

6.1 Udfarvning af kationiske detergenter

Fraktion med de kationiske detergenter, anbringes i et 50 mL bægerglas. Spidsglasset skylles med 4 mL methanol. Skyllproceduren fra 5.4.2 gentages. 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.

OVand 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-standard (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) Ligesledes analyseres 2 blindprøver. Blindprøverne er 500 mL Methanol.

Der fremstilles 2 stk. kontrolprøver ved at fortynde 5,0 mL ADMBAC standard (4.5.1) op til 500 mL med vand. Disse behandles som de inddampede prøver (6.1).

6.4 Resultat

Ud fra prøvens nettoabsorbans (prøvens absorbans minus blindprøvenes absorbans) aflæses af kalibreringskurven den målte opløsnings indhold af kationiske detergenter. Herefter beregnes 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 stinksabet natten over. Glasudstyr, der har været i forbindelse med chloroform, damper af natten over i stinkskab.

**UDKAST til
metodevalidering**

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)*.

**UDKAST til
metodevalidering**

Sammenligning af organiske eluenter

BILAG B: Sammenligning af organiske eluenterADMBAC i
50:50 Metanol:ethylacetat

1 B	abs.416	abs/mol	genfinding af 1A
	0,232	1,52E+06	101
	0,263	1,72E+06	115
	0,262	1,72E+06	114
Gennem	0,252	1,65E+06	110
CV (%)	7,0	7,0	

ADMBAC i
5% trifloureddikesyre
i metanol

1 C	abs.416	abs/mol	genfinding af 1A
	0,159	1,04E+06	69
	0,200	1,31E+06	87
	0,188	1,23E+06	82
Gennem	0,182	1,20E+06	80
CV (%)	11,6	11,6	

DSDMAC
50:50 Metanol:ethylacetat

2 B	abs.416	abs/mol	genfinding af 2A	genfinding af 1B
	0,185	1,38E+06	106	
	0,231	1,73E+06	132	
	0,223	1,67E+06	128	
Gennem	0,213	1,59E+06	122	96
CV (%)	11,5	11,5		

DSDMAC
5% trifloureddikesyre
i metanol

2 C	abs.416	abs/mol	genfinding af 2A	genfinding af 1C
	0,158	1,17E+06	90	
	0,168	1,25E+06	95	
	0,179	1,33E+06	102	
Gennem	0,168	1,25E+06	96	105
CV (%)	6,2	6,2		

Standardkurve 1A (ADMBAC i methaol)

Hældning 1,50E+06 abs/mol

r² 0,9953

Standardkurve 2A (DSDMAC i methaol)

Hældning	1,31E+06 abs/mol	(genfinding	87 %)
r ²	0,9988		

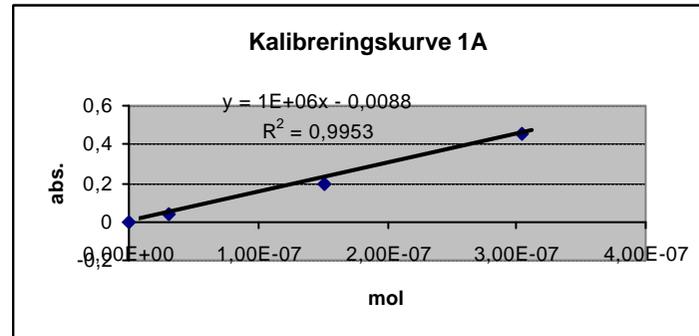
Standardkurve 1A (ADMBAC i methaol)

Afvejet mængde 0,0221 g Molvægt 364 g/mol

Koncentration i std. opløsning 22,1 mg/L
6,07143E-05 mol/L

Tilsat standard	mL	mol	Absorbans	µg
	0	0,00E+00	-0,004	0
	0,5	3,04E-08	0,043	11,05
	2,5	1,52E-07	0,197	55,25
	5	3,04E-07	0,455	110,5

Hældning 1,50E+06 abs/mol



Forsøg 1B

Afvejet mængde 0,0222 g

Koncentration i std. opløsning 22,2 mg/L
6,0989E-05 mol/L

Tilsat standard	mL	mol	Absorbans	abs/mol	genfindning af 1A
	2,5	1,52E-07	0,232	1,52E+06	101
	2,5	1,52E-07	0,263	1,72E+06	115
	2,5	1,52E-07	0,262	1,72E+06	114
	Gennemsnit			1,65E+06	110
	CV (%)			7	

Forsøg 1C

Afvejet mængde 0,0195 g

Koncentration i std. opløsning

19,5 mg/L

5,35714E-05 mol/L

Tilsat standard

mL	mol	Absorbans	abs/mol	genfinding af 1A
2,5	1,52E-07	0,159	1,04E+06	69
2,5	1,52E-07	0,200	1,31E+06	87
2,5	1,52E-07	0,188	1,23E+06	82
	Gennemsnit		1,20E+06	80
	CV (%)		12	

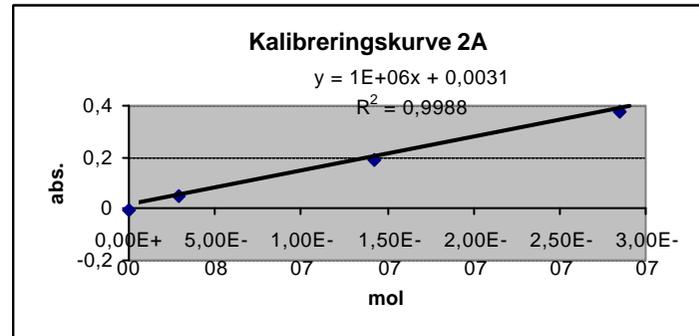
Standardkurve 2A (DSDMAC i methaol)

Afvejet mængde 0,0333 g Molvægt 585,5 g/mol

Koncentration i std. opløsning 33,3 mg/L
5,68745E-05 mol/L

Tilsat standard	mL	mol	Absorbans	µg
	0	0,00E+00	-0,004	0
	0,5	2,84E-08	0,047	16,65
	2,5	1,42E-07	0,191	83,25
	5	2,84E-07	0,373	166,5

Hældning 1,31E+06 abs/mol



Forsøg 2B

Afvejet mængde 0,0313 g

Koncentration i std. opløsning 31,3 mg/L
5,34586E-05 mol/L

Tilsat standard	mL	mol	Absorbans	abs/mol	genfinding af 2A	Genfinding af 1B
	2,5	1,34E-07	0,185	1,38E+06	106	84
	2,5	1,34E-07	0,231	1,73E+06	132	104
	2,5	1,34E-07	0,223	1,67E+06	128	101
		Gennemsnit		1,59E+06	122	96
		CV (%)		12		

Forsøg 2C

Afvejet mængde 0,0315 g

Koncentration i std. opløsning

31,5 mg/L

5,38002E-05 mol/L

Tilsat standard

mL	mol	Absorbans	abs/mol	genfinding af 2A	Genfinding af 1C
2,5	1,35E-07	0,158	1,17E+06	90	98
2,5	1,35E-07	0,168	1,25E+06	95	104
2,5	1,35E-07	0,179	1,33E+06	102	111
	Gennemsnit		1,25E+06	96	105
	CV (%)		6		

Applikationshastighed og elueringsvolumen

BILAG C: Applikationshastighed og elueringsvolumen

Standard (ADMBAC i vand)

Afvejet mængde	0,0109 g	Molvægt	364 g/mol
Koncentration i std. opløsning	10,9 mg/L 2,99451E-05 mol/L		

Applikationshastighed 45 minutter

Tilsat standard	mL	mol	Absorbans-1	Absorbans-2	Absorbans-3	Gennemsnit	CV (%)	µg
Blind	0	0,00E+00	-0,002			-0,002		0
50 µg (10 mL Eluent)	5	1,50E-07			0,195	0,195		54,5
50 µg (5 mL Eluent)	5	1,50E-07	0,153	0,176	0,16	0,163	7	54,5

Genfinding af

50 µg (10 mL Eluent)	100%
50 µg (5 mL Eluent)	84%

Standardopløsninger

50 µg ADMBAC i vand (tilsat 50:50 methanol:acetylacetat)

Tilsat standard	mL	mol	Absorbans	abs/mol	gennemsnit	CV(%)
	5	1,50E-07	0,188	1,26E+06	0,194	4
	5	1,50E-07	0,199	1,33E+06		

Blind

Absorbans	gennemsnit	CV(%)
-0,007	-0,004	-106
-0,001		

BILAG C: Applikationshastighed og elueringsvolumen

Standard (ADMBAC i vand)

Afvejet mængde	0,0109 g	Molvægt	364 g/mol
Koncentration i std. opløsning	10,9 mg/L 2,99451E-05 mol/L		

Applikationshastighed 25 minutter

Tilsat standard	mL	mol	Absorbans-1	Absorbans-2	Absorbans-3	Gennemsnit	CV (%)	µg
Blind	0	0,00E+00		-0,006		-0,006		0
50 µg (10 mL Eluent)	5	1,50E-07	0,148	0,149		0,149	0,5	54,5

Genfinding af

50 µg (10 mL Eluent) **76%**

Standardopløsninger

50 µg ADMBAC i vand (tilsat 50:50 methanol:acetylacetat)

Tilsat standard	mL	mol	Absorbans	abs/mol	gennemsnit	CV(%)
	5	1,50E-07	0,188 0,199	1,26E+06	0,194	4

Blind

Absorbans	gennemsnit	CV(%)
-0,007	-0,004	-106
-0,001		

Kationforsøg d. 4. oktober 2001 (6. serie)

Samme forsøg som 2. og 3. oktober. På samme dag og med sug fra glaskolber.

		Gennemløbstid
1. ryst	1. blind og 1. kontrol og prøve 1-4	25 min
2. ryst	2. blind og 2. kontrol og prøve 5-8	42-44 min

Hvor tallene er fjernet for metoden med hurtigt gennemløb

Konklusion :

Da der ses en tendens til at den med lang gennemløbstid giver bedre resultater.
Gentagelse af forsøg hvor alle har lang gennemløbstid

Standardkurve 1D (ADMBAC i vand) efter opkoncentreringstrinnet

Afvejet mængde	0,0109 g	Molvægt	364 g/mol
Koncentration i std. opløsning	10,9 mg/L 2,99451E-05 mol/L		

Udstyr	fraktion	Tilsat standard		Absorbans-1	Absorbans-2	Absorbans-3	Gennemsnit	CV (%)	µg
Blind		0 mL	0,00E+00	-0,002	-0,006		-0,004	-71	0
50 µg (10 mL Eluent)		5 mL	1,50E-07			0,195	0,195	#####	54,5
50 µg (5 mL Eluent)		5 mL	1,50E-07	0,153	0,176	0,16	0,163	7	54,5

Genfinding af

50 µg (10 mL Eluent)	98%
50 µg (5 mL Eluent)	82%

Standardopløsninger

50 µg ADMBAC i vand (tilsat 50:50 methanol:acetylacetat)

Tilsat standard	mL	mol	Absorbans	abs/mol	gennemsnit	CV(%)
5		1,50E-07	0,199	0,00E+00	0,199	#DIVISION/0!
5		1,50E-07		1,33E+06		

Blind

Absorbans	gennemsnit	CV(%)
-0,007	-0,004	-141
0		

Kationforsøg d. 4. oktober 2001 (6. serie)

Samme forsøg som 2. og 3. oktober. På samme dag og med sug fra glaskolber.

1. ryst	1. blind og 1. kontrol og prøve 1-4	Gennemløbstid 25 min
2. ryst	1. blind og 1. kontrol og prøve 5-8	42-44 min

Konklusion :

Standardkurve 1D (ADMBAC i vand) efter opkoncentreringstrinnet

Afvejet mængde	0,0109 g	Molvægt	364 g/mol
Koncentration i std. opløsning	10,9 mg/L 2,99451E-05 mol/L		

Udstyr	fraktion	Tilsat standard		Absorbans-1	Absorbans-2	Absorbans-3	Gennemsnit	CV (%)	µg
		mL	mol						
Blind		0	0,00E+00	-0,002	-0,006		-0,004	-71	0
50 µg (10 mL Eluent)		5	1,50E-07	0,148	0,149	0,195	0,164	16	54,5
50 µg (5 mL Eluent)		5	1,50E-07	0,153	0,176	0,16	0,163	7	54,5

Genfinding af

50 µg (10 mL Eluent)	85%
50 µg (5 mL Eluent)	84%

Standardopløsninger**50 µg ADMBAC i vand (tilsat 50:50 methanol:acetylacetat)**

Tilsat standard	mL	mol	Absorbans	abs/mol	gennemsnit	CV(%)
5	1,50E-07		0,188	1,26E+06	0,194	4
5	1,50E-07		0,199	1,33E+06		

Blind

Absorbans	gennemsnit	CV(%)
-0,007	-0,004	-141
0		

Applikationshastighed

BILAG D: Aplikationshastighed**Standard ADBAC i vand**

Afvejet mængde			0,0109 g		Molvægt		364 g/mol	
Koncentration i std. opløsning			10,9 mg/L					
			2,99451E-05 mol/L					
Tilsat standard								
	mL	mol	Absorbans-1	Absorbans-2	Absorbans-3	Gennemsnit	CV (%)	µg
Blind	0	0,00E+00	0,012	0,014		0,013	11	0
50 µg (10 mL Eluent)	5	1,50E-07	0,189	0,183	0,164	0,179	7	54,5
50 µg (5 mL Eluent)	5	1,50E-07	0,156	0,13	0,151	0,146	9	54,5

Genfinding af

50 µg (10 mL Eluent)	83%
50 µg (5 mL Eluent)	66%

Standardopløsninger**50 µg ADBAC i vand (tilsat 50:50 methanol:acetylacetat)**

Tilsat standard						
	mL	mol	Absorbans	abs/mol	gennemsnit	CV(%)
	5	1,50E-07	0,201	1,34E+06	0,207	2
	5	1,50E-07	0,21	1,40E+06		
	5	1,50E-07	0,206	1,38E+06		
	5	1,50E-07	0,212	1,42E+06		
Blind						
			Absorbans		gennemsnit	CV(%)
			0,005		0,008	9
			0,004			
			0,012			
			0,01			

Eluering med pauser

BILAG E: Eluering med pauser

Standard (ADMBAC) i vand

Afvejet mængde	0,0109 g	Molvægt	364 g/mol
Koncentration i std. opløsning	10,9 mg/L 2,99451E-05 mol/L		

Standard ADMBAC i 50:50 methanol:acetylacetat med 10 mM ammoniumacetat

Afvejet mængde	0,00204 g	Molvægt	364 g/mol
Koncentration i std. opløsning	10,2 mg/L 2,8022E-05 mol/L		

Udstyr	fraktion	Tilsat standard								
		mL	mol	Absorbans-1	Absorbans-2	Absorbans-3	Gennemsnit	CV (%)	µg	abs/mol
Blind		0	0,00E+00	0,008	0,005		0,007	33	0	
50 µg (uden pause)		5	1,50E-07	0,182	0,188	0,191	0,187	2	54,5	1,21E+06
50 µg (med pause)		5	1,50E-07	0,188	0,181	0,182	0,184	2	54,5	1,18E+06

Genfinding af

50 µg (uden pause)	74%
50 µg (med pause)	73%

Ekstern standard

50 µg ADMBAC i 50:50 methanol:acetylacetat med 10 mM ammoniumacetat

Tilsat standard

mL	mol	Absorbans	abs/mol	gen. abs/mol	CV(%)
5	1,40E-07	0,226	1,60E+06	1,63E+06	0
5	1,40E-07	0,236	1,67E+06		

Blind

Absorbans	gennemsnit	CV(%)
0,004	0,003	85
0,001		

Variabel applikationsvolumen

BILAG F: Variabel applikationsvolumen

Standard (ADMBAC) i vand

Afvejet mængde	0,0109 g	Molvægt	364 g/mol
Koncentration i std. opløsning	10,9 mg/L 2,99451E-05 mol/L		

Standard ADMBAC i 50:50 methanol:acetylacetat med 10 mM ammoniumacetat

Afvejet mængde	0,00204 g	Molvægt	364 g/mol
Koncentration i std. opløsning	10,2 mg/L 2,8022E-05 mol/L		

Tilsat standard

	mL	mol	Absorbans-1	Absorbans-2	Gennemsnit	Gen. - blind	CV (%)	µg	abs/mol
Blind	0	0,00E+00	0,006	0,007	0,007		11	0	
50 µg (15 ml*)	5	1,50E-07	0,196	0,184	0,190	0,184	4	54,5	1,27E+06
50 µg (100 ml)	5	1,50E-07	0,184	0,19	0,187	0,181	2	54,5	1,25E+06
50 µg (250 ml)	5	1,50E-07	0,189	0,179	0,184	0,178	4	54,5	1,23E+06
25 µg (500 ml)	2,5	7,49E-08	0,097	0,098	0,098	0,091	1	27,25	1,30E+06
50 µg (500 ml)	5	1,50E-07	0,179	0,194	0,187	0,180	6	54,5	1,25E+06

*Først 5 ml ren standard, der næst 10 ml milliQ-vand.

Genfindning af

50 µg (15 ml*)	108%
50 µg (100 ml)	107%
50 µg (250 ml)	105%
25 µg (500 ml)	107%
50 µg (500 ml)	106%

Standardopløsninger

50 µg ADMBAC i 50:50 methanol:acetylacetat med 10 mM ammoniumacetat

Tilsat standard

mL	mol	Absorbans	abs/mol	gen. abs/mol	CV(%)
5	1,40E-07	0,152	1,08E+06	1,13E+06	6
5	1,40E-07	0,165	1,18E+06		

Blind

Absorbans	gennemsnit	CV(%)
0,002	0,001	424
-0,001		

Genopløsningstrin mellem PPL- og alumina-kolonnerne

BILAG G: Genopløsningstrin mellem PPL- og alumina-kolonnerne

Standard ADBAC i 50:50 methanol:acetylacetat med 10 mM ammoniumacetat

Afvejet mængde	0,00204 g	Molvægt	364 g/mol
Koncentration i std. opløsning	10,2 mg/L 2,8022E-05 mol/L		

Standard i ethylacetat

Afvejet mængde	0,0019 g	Molvægt	364 g/mol
Koncentration i std. opløsning	9,5 mg/L 2,60989E-05 mol/L		

	mol	Absorbans-1	Absorbans-2	Absorbans-3	Absorbans-4	gennemsnit abs	CV(%)	gennemsnit abs/mol		
Blind	0	0,00E+00	0	0,008	0,008	0	0,005	87	0	
50 µg	5	1,40E-07	0,215	0,211	0,205	0,214	0,210	2	51	1,46E+06
100 µg	10	2,80E-07	0,436	0,464	0,444	0,444	0,448	3	102	1,58E+06

Genfinding	50 µg	50:50 methanol:acetylacetat	50:50 methanol:acetylacetat*	acetylacetat
		85%	96%	109%
	100 µg	92%	104%	118%

* efter udelukkelse af den ekstremt høje absorbans for den ene standard.

Standardopløsninger

50 µg ADBAC i 50:50 methanol:acetylacetat med 10 mM ammoniumacetat

Tilsat standard	mL	mol	Absorbans	abs/mol	gennemsnit	gennemsnit	CV(%)
	5	1,40E-07	0,216	1,52E+06	0,245	1,72E+06	17
	5	1,40E-07	0,274	1,93E+06			

*(0,269 måling af 0,274 igen)

Blind

Absorbans	gennemsnit	CV(%)
0	0,004	141
0,007		

50 µg ADMBAC i acetylacetat

Tilsat standard							
mL	mol	Absorbans	abs/mol	gennemsnit		CV(%)	
				abs/mol	abs/mol		
5	1,30E-07	0,184	1,39E+06	0,177	1,34E+06	6	
5	1,30E-07	0,169	1,28E+06				

Blind					
	Absorbans	gennemsnit		CV(%)	
	0,007	0,002		354	
	-0,003				

Separation af kationiske detergenter

BILAG H: Separation af kationiske detergeneter

Standard i acetylacetat

Afvejet mængde	0,0019 g	Molvægt	364 g/mol
Koncentration i std. opløsning	9,5 mg/L		
	2,60989E-05 mol/L		

Standard i 95:5 metanol:trifloureddikesyre

Afvejet mængde	0,00207 g	Molvægt	364 g/mol
Koncentration i std. opløsning	10,35 mg/L		
	2,84341E-05 mol/L		

	Ekstrakt	mol	Absorbans-1	Absorbans-2	Absorbans-3	gennemsnit abs	CV(%)	gennemsnit abs/mol	gennemsnit abs-blind		
Blind	2	0	0,00E+00	0,004	0,006	0,006	0,005	22	0		
50 µg	2	5	1,30E-07	0,147	0,136	0,152	0,145	6	47,5	1,11E+06	1,07E+06
50 µg	1	5	1,30E-07	0,012			0,012		47,5	9,20E+04	5,11E+04
50 µg	3	5	1,30E-07	0,007			0,007		47,5	5,36E+04	1,28E+04

Genfinding

ADMBAC	Ekstrakt	95:5 metanol:trifloureddikesyre
50µg	2	106%
50µg	1	5%
50µg	3	1%

Standardopløsning

50 µg ADMBAC i 95:5 metanol:trifloureddikesyre

Tilsat standard	mL	mol	Absorbans	abs/mol	gennemsnit	gennemsnit abs/mol	CV(%)	gennemsnit abs-blind
	5	1,42E-07	0,142	9,99E+05	0,149	1,05E+06	7	1,01E+06
	5	1,42E-07	0,156	1,10E+06				

Blind

Absorbans
0,005
0,007

gennemsnit
0,006

CV(%)
24

Interferensundersøgelse af separationstrinnet

BILAG I: Interferensundersøgelse af separationstrinnet

Standard i acetylacetat

Afvejet mængde	0,00414 g	Molvægt	364 g/mol
Koncentration i std. opløsning	20,7 mg/L		
	5,68681E-05 mol/L		

Standard 95:5 metanol:trifluoreddikesyre

Afvejet mængde	0,00207 g	Molvægt	364 g/mol
Koncentration i std. opløsning	10,35 mg/L		
	2,84341E-05 mol/L		

	LAS	mol	Absorbans-1	Absorbans-2	gennemsnit abs	CV(%)	gennemsnit abs/mol	gennemsnit abs-blind
Blind	µg/l	0	0,00E+00	0,008	0,006	0,007	20	0
50 µg	0	2,5	1,42E-07	0,135	0,118	0,127	10	51,75
50 µg	60	2,5	1,42E-07	0,137	0,144	0,141	4	51,75
50 µg	120	2,5	1,42E-07	0,137	0,133	0,135	2	51,75
50 µg	300	2,5	1,42E-07	0,125	0,128	0,127	2	51,75

Genfinding

ADMBAC	LAS	95:5 metanol:trifluoreddikesyre
	µg/l	
50µg	0	97%
50µg	60	108%
50µg	120	104%
50µg	300	97%

Standardopløsning

50 µg ADMBAC i 95:5 metanol:trifluoreddikesyre

Tilsat standard	mL	mol	Absorbans	abs/mol	gennemsnit abs/mol	gennemsnit abs-blind
5	1,42E-07	0,129	9,07E+05	9,25E+05	8,67E+05	
2,5	7,11E-08	0,067	9,43E+05			

Blind

Absorbans	gennemsnit	CV(%)
0,005	0,006	13
0,006		

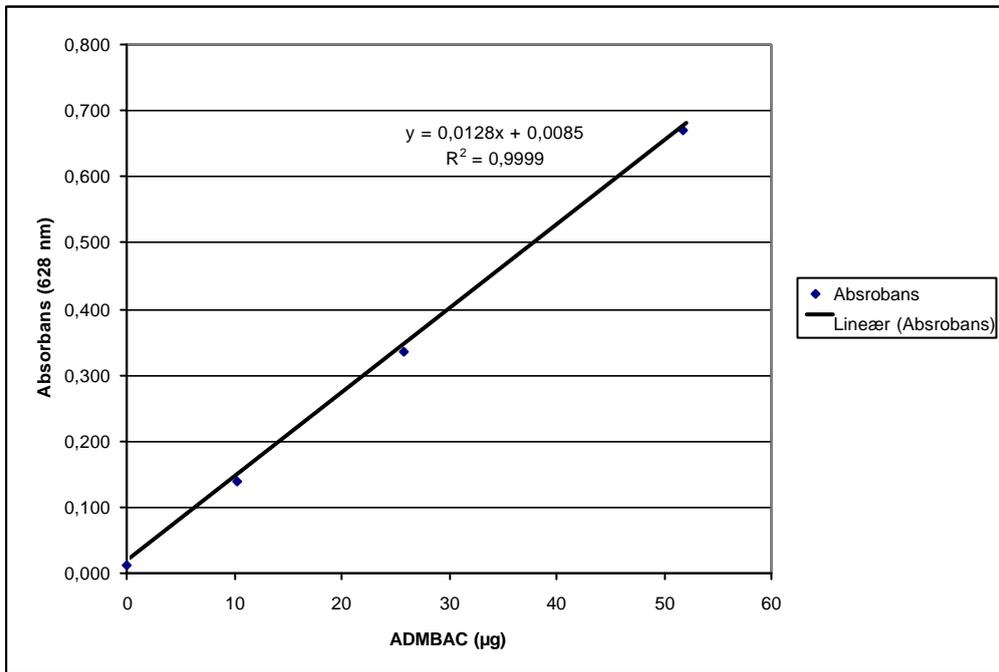
Linearitet med disulfinblåt-metoden

BILAG J: Linearitet med disulfinblåt-metoden

Standard 95:5 metanol:trifloureddikesyre

Afvejnet mængde 0,00207 g Molvægt 364 g/mol
 Koncentration i std. opløsning 10,35 mg/L
 2,84341E-05 mol/L

prøve	mL	mol	Absorbans-1	Absorbans-2	Absorbans-3	Absorbans-4	gennemsnit		CV(%)	gennemsnit	
							abs	abs		abs/mol	abs-blind/mol
Blind	0	0,00E+00	0,013	0,012	0,011	0,011	0,012	0,012	8	0	
10 µg	1	2,84E-08	0,14	0,136	0,139	0,139	0,139	0,139	1	10	4,87E+06
25 µg	2,5	7,11E-08	0,337	0,333	0,334	0,337	0,335	0,335	1	26	4,72E+06
50 µg	5	1,42E-07	0,655	0,681	0,671	0,675	0,671	0,671	2	52	4,72E+06



Sammenligning af ADMBAC og DSDMAC

BILAG K: Sammenligning af ADMBAC og DSDMAC

ADMBAC

						Molvægt		364 g/mol	
µg/L	mol/L	Absorbans-1	Absorbans-2	gennemsnit abs	CV(%)	gennemsnit abs/µg	gennemsnit abs-blind		
0	0	0,025	0,028	0,027	8				
10,35	2,8E-08	0,158	0,152	0,155	3	1,5E-02	1,2E-02		
28,88	7,9E-08	0,356	0,368	0,362	2	1,3E-02	1,2E-02		
51,75	1,4E-07	0,798	0,785	0,792	1	1,5E-02	1,5E-02		
103,5	2,8E-07	1,340	1,356	1,348	1	1,3E-02	1,3E-02		

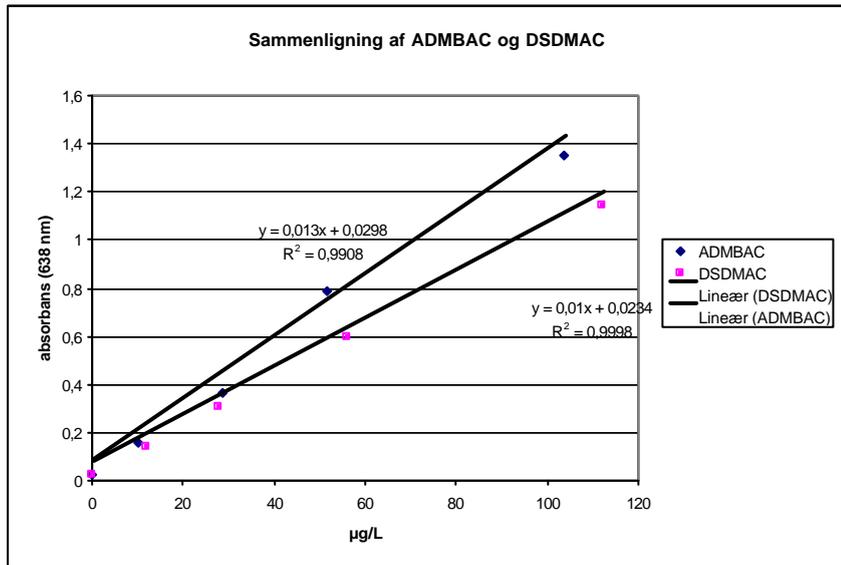
DSDMAC

						Molvægt		586,5 g/mol	
µg/L	mol/L	Absorbans-1	Absorbans-2	gennemsnit abs	CV(%)	gennemsnit abs/µg	gennemsnit abs-blind		
0	0	0,024	0,021	0,023	9				
12	2,0E-08	0,134	0,142	0,138	4	1,2E-02	9,3E-03		
28	4,8E-08	0,321	0,294	0,308	6	1,1E-02	1,0E-02		
56	9,5E-08	0,599	0,589	0,594	1	1,1E-02	1,0E-02		
112	1,9E-07	1,169	1,119	1,144	3	1,0E-02	1,0E-02		

Gennemsnitlig absorbanskoefficient

	abs/µg
ADMBAC	1,3E-02
DSDMAC	9,9E-03

Absorbanskoefficienten for DSDMAC er 76% af ADMBAC i udfarvningsstrinnet.



Genfindingsforsøg for hele analysemetoden

BILAG L: Genfindingsforsøg for hele analysemetodenAnalyseresultater hele proceduren

	Prøvemærkning	Absorbans	Beregnet konc.	Forv. Konc.	Genfinding %
Blind	B1	0,019	0	0	0
	B2	0,042	0	0	0
Syntetisk 7,5 µg	N11	0,11	4,12	7,5	55
	N12	0,123	4,99	7,5	67
Spildevand + 20 µg spike	N21	0,354	20,48	20	102
	N22	0,17	8,14	20	41
Spildevand + 60 µg spike	N31	0,408	24,10	60	40
	N32	0,432	25,71	60	43
Syntetisk 80 µg	N41	0,537	32,76	80	41
	N42	0,874	55,35	80	69
Kontrol (syntetisk) 40 µg	K1	0,491	29,67	40	74
	K2	0,468	28,13	40	70

* Farvebuffer havde en grøn farve.

Ekstern kalibreringskurve (ADMBAC)

Stofmængde	Absorbans
75 µg	1,204
75 µg	1,106
50 µg	0,752
50 µg	0,741
25 µg	0,363
25 µg	0,376
0 µg	0,037
0 µg	0,039

Data for kalibreringskurven

Skæring med y-akse	0,01805
Hældning	0,014912

Inddampningsforsøg for spildevand

BILAG M: Inddampningsforsøg for spildevandInddampningsforsøg for spildevand

	Reminens	Absorbans	Beregnet konc.	Forv. Konc.	Genfinding
	μL	-	μg	μg	%
Spildevand	0	0,07 0,119	0 0	0 0	- -
Spildevand	100	0,154 0,183	2,21 4,04	0 0	- -
Spildevand	200	0,136 0,211	1,07 5,81	0 0	- -
Spildevand + 50 μg spike	0	0,531 0,483	27,60 24,57	50 50	55 49
Spildevand + 50 μg spike	100	0,75 0,74	36,77 36,14	50 50	74 72
Spildevand + 50 μg spike	200	0,743 0,771	36,01 37,78	50 50	72 76

Genfindingsprocenterne er korrigeret for absorbansen fra spildevand med samme volumen reminens.

Ekstern kalibreringskurve (ADMBAC)

Stofmængde	Absorbans
75 μg	1,273
75 μg	1,174
50 μg	0,831
50 μg	0,769
25 μg	0,423
25 μg	0,401
0 μg	0,034
0 μg	0,036

Data for kalibreringskurven

Skæring med y-akse	0,0246
Hældning	0,015814

Inddampningsforsøg for syntetisk prøve

BILAG N: Inddampningsforsøg for syntetisk prøveInddampningsforsøg for syntetisk prøve.

	Reminens	Absorbans	Beregnet konc.	Förv. Konc.	Genfinding
	µL	-	µg	µg	%
Blind	0	0,061 0,073	0 0	0 0	- -
Blind	100	0,057 0,058	-5,04 -4,98	0 0	- -
Blind	200	0,065 0,087	-4,50 -3,01	0 0	- -
Syntetisk prøve (50 µg)	0	0,661 0,793	40,22 49,15	50 50	80 98
Syntetisk prøve (50 µg)	100	0,68 0,781	42,15 48,98	50 50	84 98
Syntetisk prøve (50 µg)	200	0,691 0,795	41,64 48,68	50 50	83 97

Genfindingsprocenterne er korrigeret for absorbansen fra spildevand med samme volumen reminens.

Ekstern kalibreringskurve (ADMBAC)

Stofmængde	Absorbans
75 µg	1,123
75 µg	1,217
50 µg	0,800
50 µg	0,801
25 µg	0,441
25 µg	0,45
0 µg	0,052
0 µg	0,063

Data for kalibreringskurven

Skæring med y-akse	0,0645
Hældning	0,01477

Kolonnevolumen af PPL-kolonnen

BILAG O: Kolonnevolumen af PPL-kolonnen

Inddampningsforsøg for syntetisk prøve

	Kolonnevolumen	Absorbans	Beregnet konc.	Forv. Konc.	Genfinding
	mg	-	µg	µg	%
Blind	200	0,014 0,021	- -	0 0	- -
Syntetisk prøve (50 µg)	200	0,601 0,488	42,18 34,01	50 50	84 68
Spildevand + 50 µg spike	200	0,471 0,391	32,78 27,00	50 50	66 54
Blind	500	0,014 0,017	- -	0 0	- -
Syntetisk prøve (50 µg)	500	0,550 0,583	38,64 41,02	50 50	77 82
Spildevand + 50 µg spike	500	0,516 0,593	36,18 41,74	50 50	72 83

Ekstern kalibreringskurve (ADMBAC)

Stofmængde	Absorbans
75 µg	1,044
75 µg	1,052
50 µg	0,653
50 µg	0,659
25 µg	0,294
25 µg	0,299
0 µg	0,015
0 µg	0,015

Data for kalibreringskurven

Skæring med y-akse	-0,0149
Hældning	0,013834

Metodeafprøvning

BILAG P: Metodeafprøvning

Inddampningsforsøg for syntetisk prøve

	Absorbans	Beregnet konc.	Forv. Konc.	Genfinding	CV
	-	µg	µg	%	
Syntetisk prøve (50 µg)	0,568	42,87	50	86	2,5%
Syntetisk prøve (50 µg)	0,589	44,45	50	89	
Syntetisk prøve (50 µg)	0,563	42,49	50	85	
Syntetisk prøve (50 µg)	0,591	44,60	50	89	
Spildevand + 50 µg spike	0,559	42,19	50	84	6,1%
Spildevand + 50 µg spike	0,578	43,62	50	87	
Spildevand + 50 µg spike *	0,630	47,55	50	95	

Forsøget bestod af 4 syntetiske og 4 spildevandsprøver spiket med 50 µg. En spildevandsprøve er gået tabt.

Bemærkninger: Spildevandsprøverne var gullige.

* Ved genopløsningen af prøven, blev ikke alt genopløst. Lidt blev siddende på pasteurpipetten

Ekstern kalibreringskurve (ADMBAC)

Stofmængde	Absorbans
75 µg	1,003
75 µg	0,994
50 µg	0,688
50 µg	0,681
25 µg	0,295
25 µg	0,302
0 µg	0,023
0 µg	0,023

Data for kalibreringskurven

Skæring med y-akse	0,00425
Hældning	0,01325

Litteraturundersøgelse for ikke-specifikke detergentanalyser

BILAG Q: Litteraturundersøgelse for ikke-specifikke detergentanalyser

Reference	Matrice	Detergent-type	Opkoncentrering	Oprensning	Detektion	måleområde (mg/L)	DL (mg/L)
R. Patel et al (1999) /7/	gr, ov, sv, ip	ka	ingen	ingen	FIA spektrofotometrisk kompleksdannelse med Fe(III)-SCN ⁻ (475 nm)	0,5-30	0,25
Q. He et al (2000) /17/	sv	an	ingen	ingen	FIA spektrofotometrisk kompleksdannelse med methyloorange (465 nm)	-25	0,22
L. Jing-fu et al (2001) /18/	sv, ip	an	FIA væske-væske ekstraktion over en microporøs membran (MMLLE)		FIA spektrofotometrisk kompleksdannelse med methylenblåt (660 nm)	30-700	30
J. Bohnen et al (1998) /19/	ip	an, ka, non	ingen	ingen	kvalitativ detektion med thin layer chromatografi (TLC)	-	10000-100000
S. Taguchi et al (1999) /20/	ov, dr	ka	fastfase ekstraktion på membranfilter, ka tilbageholdes på membran efter dannelse af farvekompleks med [Co(III)(hqns) ₂] ⁺	ingen. LAS interferens for koncentrationer over 0,4 mg/L	spektrofotometrisk måling <u>direkte</u> på membranfiltrene (593 nm)	0,4-2,0	0,4
R. Gerhards et al (1999) /21/	sv	am	prøvens pH ændres til under 1. gasstripping som i DIN 38409 Teil 20 og opsamling i ethylacetat	ingen. Interferens fra kationiske detergenter som medbestemmes	spektrofotometrisk kompleksdannelse med orange II	0,01	0,01-0,5
L. Campanella et al (1996) /22/	ikke oplyst	ka	ingen	ingen	ion-selektiv elektrode (ISE)	ca. 0,6-600 g/L ^{A)}	ca. 0,6 g/L
H. Waldhoff et al (2000) /23/	ip	an, ka	ingen	ingen	tofase titrering med potentiometrisk måling af endpoint (ISE)	ikke oplyst ^{B)}	ikke oplyst ^{B)}
R. Matesic-Puac et al (2000) /24/	ip	ka	ingen	ingen	titrering med potentiometrisk måling af endpoint (ISE)	0,5-2300	0,5

Reference	Matrice	Detergent-type	Opkoncentrering	Oprensning	Detektion	måleområde (mg/L)	DL (mg/L)
E. Borrego et al (1999) /25/	ip, sv, ov	ka	an fjernes med anionbytter (Doewx 2XB) ka fjernes fra non på kationbytter (Alumina B) og elueres med chloroform:methanol-blanding. Inddampning til tørhed og opløsning i vand		Farvereaktion mellem ka og Coomassie Brilliant Blå G (CBBG). Titrering med LAS og samtidig spektrofotometrisk måling ved 600 nm	0,1-0,3 ^{C)}	0,1

Tabel Q. Opsummering af resultater fra litteraturundersøgelse. I søjlen for matricer er der benyttet følgende forkortelser: sv for spildevand, dv for drikkevand, ov for overfladevand, gv for grundvand og ip for industriprodukter som shampoo, sæbe og rengøringsmidler. I detergenttypesøjlen er an forkortelsen for anioniske detergenter, ka er anioniske detergenter, non er nonioniske detergenter og am er amfotere detergenter. ^{A)} Beregnet. ^{B)} Artiklen viser resultater fra en interlaboratorieundersøgelse, hvor prøverne både er analyseret med ISO 2271 og med ISE. Resultaterne viser en god overensstemmelse mellem resultaterne. Prøverne i interlaboratorieundersøgelsen er på ppm-niveau. ^{C)} for DSDMAC. 3 andre kationiske detergenter er også undersøgt med varierende alkyl-kædelængder. For didodecyldimethylammoniumbromid findes det lineære område fra 0,1-1,6 mg/L.

Litteraturundersøgelse for specifikke detergentanalyser

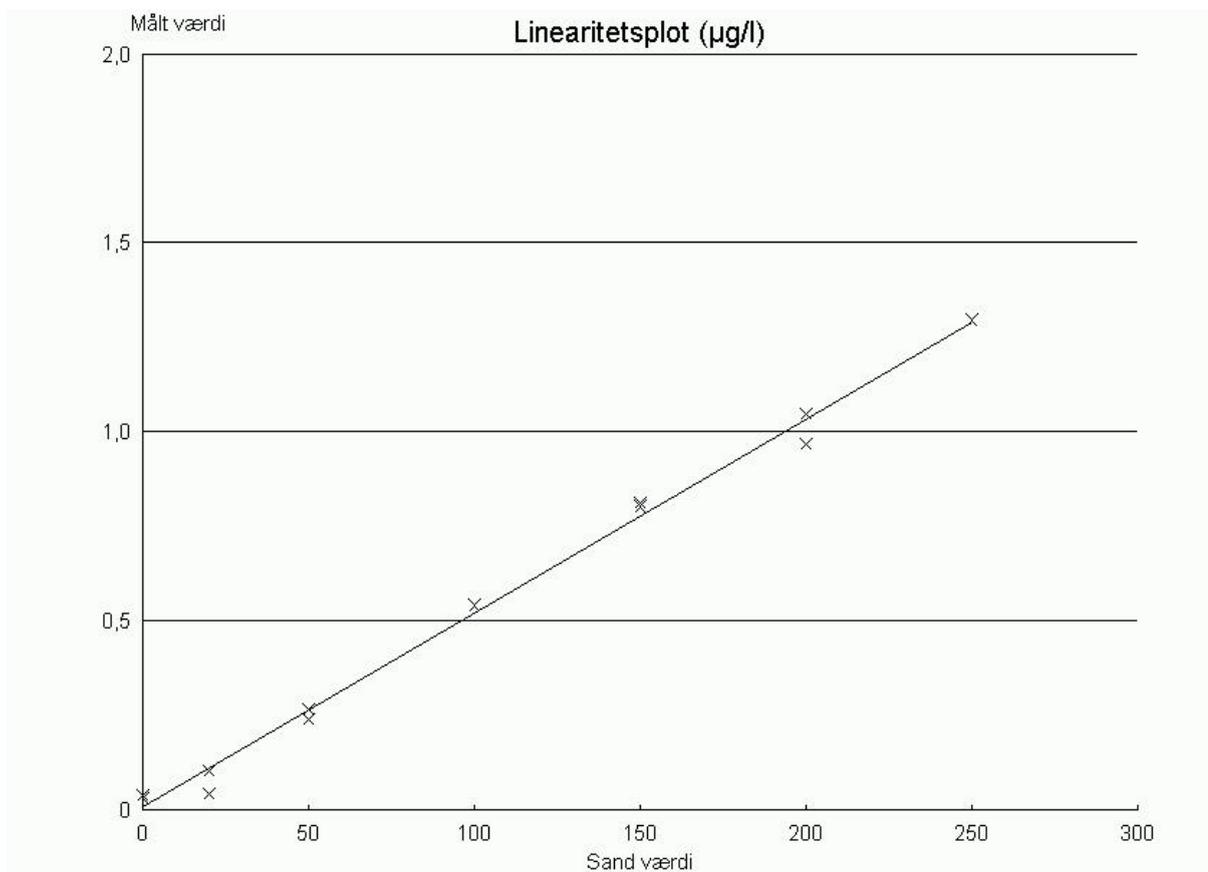
BILAG R: Litteraturundersøgelse for specifikke detergentanalyser

Reference	Matric e	Detergent- type	Opkoncentrering	Oprensning/adskillelse	Detektion	måleområde (µg/L)	DL (µg/L)
L.M. Nair et al (1998) /26/	sv, ip	an, ka	Ion chromatografi (IC) med en Altech Surfacant/R-kolonne	IC med gradient eluering	Konduktivitet	ikke oplyst	an: 1300-3300 ka: 23-800
Y. Zhou et al (1998) /27/	ikke oplyst	an, ka, non, am	ingen	ingen	NMR. Kvalitativ analyse	Kvalitativ analyse	Kvalitativ analyse
J. Riu et al (2000) /28/	sv, ov	an	SPE	SPE	CE-UV, CE-MS ^{A)}	1-53 25-495 ^{B)}	1
A.R. Hind et al (1998) /29/	ikke oplyst	ka	ingen	ingen	Elektronspray massespektroskopi (ES-MS)	50-300	50
M. Shibukawa et al (1999) /30/	sv, ov	ka	ingen	HPLC på hydrofob polymer kolonne (Shodex Asahipak FG-310 HQ)	Konduktivitet	-16000	40
C. Voigt et al (1999) /31/	sv, ov, ip	an ka	HPLC GC CE ^{C)}	HPLC GC CE ^{C)}	MS ^{C)}	an: 0,01- ka 3-	ikke oplyst

Tabel R: Opsummering af resultater fra litteraturundersøgelse. I søjlen for matricer er der benyttet følgende forkortelser: sv for spildevand, ov for overfladevand og ip for industriprodukter som shampoo, søbe og rengøringsmidler. I detergenttypesøjlen er an forkortelsen for anioniske detergenter, ka er anioniske detergenter, non er nonioniske detergenter og am er amfroterende detergenter. ^{A)} CE er kapillær elektroforese med henholdsvis ultraviolet (UV) og massespektroskopi (MS) detektion. ^{B)} forskellige lineære områder afhængning af specie. ^{C)} Oversigtsartikel. Litteraturstudie med forskellige metoder til specifikke analyser med HPLC, GC og CE kombineret med forskellige detektionsmetoder som MS.

Linearitetsundersøgelse

BILAG S: Linearitetsundersøgelse

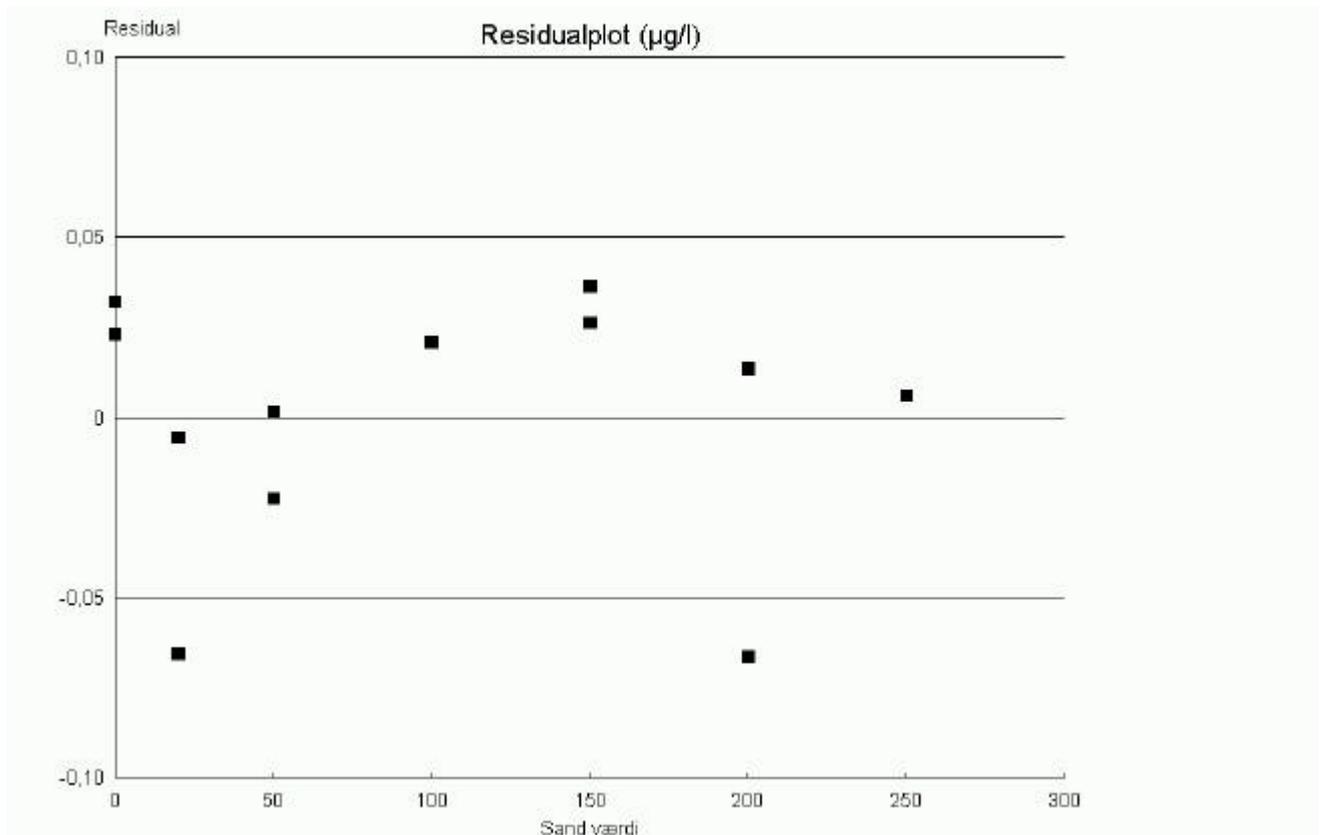


BILAG S: Linearitetsundersøgelse

Linearitet og følsomhed

Måleinterval	0 - 250 µg/l		
Regressionslinie	$Y = 0,0059 + 0,0051x$		
Evt. anvendt vægtfunktion	ingen		
Antal niveauer	7	Antal prøver	12
S(yx)	0,0367	Korrelationskoefficient	0,9970
Z	1,5036		
Parameter	Estimat	Standardafvigelse	Konfidensinterval
Hældning	0,0051		
Skæring med y-akse	0,0059	0,0164	-0,0305 - 0,0423
Kan linien antages at være lineær (Z ej signifikant)?			Ja
Er 0 indeholdt i konfidensintervallet for skæring?			Ja

BILAG S: Linearitetsundersøgelse



Resultater fra metodevalideringen

BILAG T: Resultater fra metodevalideringen**Forsøgsdag A (30. august 2002)**

	ADMBAC *	Absorbans	Absorbans kor.	Resultat	Forv. Konc.	Genfindings
	mL	-	for blind	µg/L	µg	%
Milli-Q vand (blind)	0	0,025	-	5,0	0	-
		0,028	-	5,5	0	-
Milli-Q vand (syntetisk kontrol)	2,5	0,294	0,268	41,8	50	84
		0,300	0,274	42,7	50	85
Spildevand 1 (spike til 100 µg/L)	5,0	0,490	0,464	72,4	100	72
		0,583	0,557	86,9	100	87
Spildevand 2 (spike til 30 µg/L)	1,5	0,241	0,215	33,5	30	112
		0,270	0,244	38,0	30	127
Spildevand 2 (spike til 150 µg/L)	7,5	0,893	0,867	135,3	150	90
		0,994	0,968	151,1	150	101

* Tilsat mængde af 10,0 mL ADMBAC standard i vand fyldt op til 500 mL med prøve.

Gennemsnit af Milli-Q vand (blind) 0,0265

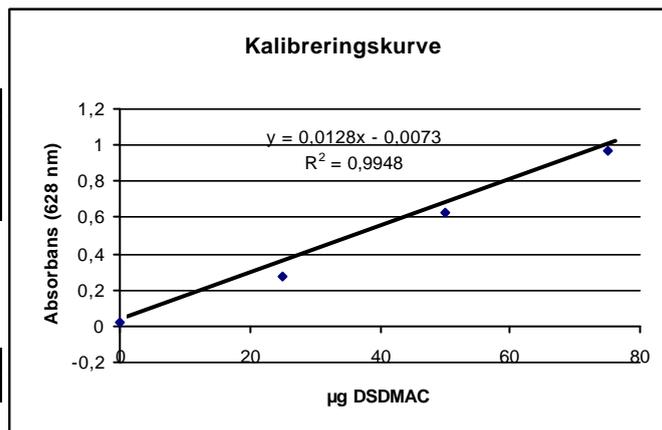
Genfindingsprocenterne er korrigeret for absorbansen fra spildevand med samme volumen reminens.

Ekstern kalibreringskurve (DSDMAC)

Stofmængde (µg)	Absorbans
0	0,021
25	0,274
50	0,626
75	0,971

Data for kalibreringskurven

Skæring med y-akse	-0,0073
Hældning	0,0128

**Bemærkninger**

Ingen

Resultater for detektionsgrænse, repetérbarhed, reproducérbarhed

BILAG U: Resultater for detektionsgrænse, repeterbarhed, reproducerbarhed

Detektionsgrænse (µg/l)

Prøve	Gennemsnit	Std.afv.	Antal prøver	Detektionsgrænse
Blind	5,14	0,51	9	2,66

Nøjagtighed og præcision

Prøvetype	Niveau		Genfindning %	Antal prøver	Præcision			
	Tilsat	Fundet			Repeterbarhed		Std.afv. mellem dage	
	µg/l	µg/l			s(r) µg/l	CV(r) %	s(b) µg/l	CV(b) %
Blind	-	-0,4 - 9,1	-	9	0,51	9,9	3,48	67,7
Syntetisk	50	33,7 - 50,7	67 - 101	8	0,71	1,6	5,35	12,2
Spild I+100	100	72,4 - 112,0	72 - 112	8	9,06	10,1	9,62	10,7
Spild II+30	30	33,3 - 54,7	111 - 182	10	5,78	14,8	2,56	6,6
Spild II+150	150	113,4 - 151,1	76 - 101	10	9,20	6,7	10,48	7,7

Selektivitet

	Blind	Syntetisk	Spild I+100	Spild II+30	Spild II+150
Gennemsnit	5,1	43,8	90,0	39,0	136,8
Sand koncentration	-	50	100	30	150
Test størrelse Z	-	2,6329	1,0110	-2,8961	1,2715
Sandsynlighed for Z	-	0,0338*	0,3457	0,0177*	0,2354

*: Sandsynlighed <0,05