



Miljøministeriet
Miljøstyrelsen

PESTICID

Næste-generation fingeraftrykmetode til måling af miljøfremmede stoffer i drikkevand MUDP-projekt

MUDP

September 2026

Udgiver: Miljøstyrelsen

Redaktion:

Peter Mortensen (Eurofins Miljø A/S)

Sofie Falk Vinther (Eurofins Miljø A/S)

Claus Kjøller (GEUS)

Selina K. Tisler (Københavns Universitet)

Jan H. Christensen (Københavns Universitet)

Ulla B. Trettenes (VandCenter Syd)

Peter Møller (AarhusVand)

Bo C. Christiansen (HOFOR)

Karin Randrup Christensen (HOFOR)

Ulla E. Bollmann (GEUS)

ISBN: 978-87-7564-150-5

Miljøstyrelsen offentliggør rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, som er finansieret af Miljøstyrelsen. 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.

Må citeres med kildeangivelse.

Miljøteknologisk Udviklings- og Demonstrationsprogram

Projektet, som er beskrevet i denne rapport, er støttet af Miljøteknologisk Udviklings- og Demonstrationsprogram (MUDP) under Miljøministeriet, der støtter udvikling, test og demonstration af miljøteknologi.

MUDP investerer i udvikling af fremtidens miljøteknologi til gavn for klima og miljø i Danmark og globalt, samtidig med at dansk vækst og beskæftigelse styrkes. Programmet understøtter dels den bredere miljødagsorden, herunder rent vand, ren luft og sikker kemi, men understøtter også regeringens målsætninger inden for klima, biodiversitet og cirkulær økonomi.

Det er MUDP's bestyrelse, som beslutter, hvilke projekter der skal modtage tilskud. Bestyrelsen betjenes af MUDP-sekretariatet i Miljøstyrelsen.

MUDP-sekretariatet i Miljøstyrelsen
Lerchesgade 35, 5000 Odense J Tlf. +45 72 54 40 00

Mail: ecoinnovation@mst.dk
[MUDP's hjemmeside](#)

Denne slutrapport er godkendt af MUDP, men det er alene rapportens forfatter/projektlederen, som er ansvarlige for indholdet. Rapporten må citeres med kildeangivelse.

Indhold

1.	Indledning	7
2.	Resume	9
3.	Summary	11
4.	Baggrund og formål	12
5.	Afgrænsning af projektet	14
6.	Principiel beskrivelse af den kemiske analyse	15
6.1	Design af LC-HRMS undersøgelser	15
6.2	Beskrivelse af prøveforberedelse/opkoncentrering	15
6.2.1	Direkte injektion kontra opkoncentrering	15
6.2.2	Fastfaseekstraktion (SPE)	15
6.2.3	Vakuuminddampning (VEC)	16
6.3	Valg af fastfase til SPE ekstraktion	16
6.4	Beskrivelse af princip ved HRMS-detektion	17
6.5	Det kemiske rum	18
6.6	DIA kontra DDA	18
6.6.1	LC-HRMS og dets begrænsninger	19
7.	Forsøg med det kromatografiske set-up	21
7.1	Valg af kolonner	21
7.2	Valg af standardstoffer til brug i test af kolonner	23
7.3	Test af kolonner	24
7.4	Udvikling af HILIC-metode	28
7.4.1	Temperatur/Gradient	28
7.4.2	Injektionssolvent	29
7.4.3	Effekt af pH i injektionsopløsning og mobilfase	30
7.4.4	Instrumentel detektionsgrænse – sammenligning mellem RP og HILIC	32
7.5	Overførsel af det kromatografiske setup	33
7.5.1	Hypercarb kolonne	35
7.6	Undersøgelse af repeterbarheden ved gentagne injektioner	35
7.7	Sammenfatning	37
8.	Prøveforberedelse og opkoncentrering	38
8.1	Valg af fastfase til SPE	38
8.2	Optimering af eluering og inddampning	40
8.2.1	Inddampning	42
8.3	Evaluering af nye SPE kolonner	42
8.4	Vakuuminddampningsforsøg	44
8.5	Optimering af genopløsningsmiddel	45
8.6	Sammenligning af fastfaseekstraktion og vakuuminddampning	46
8.7	Valg af interne standarder	48
8.8	Sammenfatning	50

9.	Udvikling af kvantificering og datalagring	52
9.1	Kvantificering ved HRMS-metoder	52
9.2	Datalagring	55
9.2.1	Retrospektive analyser	56
9.2.2	Analysedata	56
9.2.3	Back-up	57
9.2.4	Meta-data	58
9.2.5	LIMS	58
9.2.6	Sammenfatning	58
10.	Kvalitetssikring af HRMS analyser	60
10.1	Kvalitetskrav til HRMS-metode	60
10.1.1	Analyse og kontrolkort for SST	61
10.1.2	Metodespecifikke kontrolprøver	62
10.1.3	Analyse af triplikater	62
10.1.4	Blindprøver	63
10.2	Databehandling	63
10.3	Rapportering	64
10.3.1	Rapportering af identifikationssikkerhed	65
11.	Den udviklede metode	66
11.1	SPE oprensning	66
11.2	Analyse; Dual kromatografisk separation	66
12.	Validering	68
12.1	Omfang og design af valideringen	68
12.2	Valideringsresultater	69
12.2.1	Detektion	69
12.2.2	Effekt af polaritet	71
12.2.3	Teknisk variation	72
12.3	Reperterbarhed af prøveforberedelse	73
12.3.1	Resultater prøveforberedelse	73
12.4	Interlaboratorie sammenligning	74
12.4.1	Harmonisering og standardisering	74
12.4.2	Deltagere	74
12.4.3	Set-up	75
12.4.4	Resultater	76
12.4.4.1	Den kendte prøve	76
12.4.4.2	Den ukendt prøve	78
12.4.4.3	Opsummering af interlaboratoriestudie	78
12.5	Sammenfatning	79
13.	Suspect-screeningsliste	80
14.	Konklusion og perspektivering	82
14.1	Konklusion	82
14.2	Perspektivering og næste skridt	83
15.	Referencer	85
Bilag 1.SOP for Prøveforberedelse		89
Bilag 2.SOP for Analyse og databehandling		94
Bilag 3.Kvantificering med QSPR-modellering		99

1. Indledning

Rent drikkevand er en af de mest essentielle ressourcer for samfundets trivsel, folkesundhed og miljømæssige bæredygtighed. I Danmark, hvor næsten alt drikkevandet stammer fra grundvand, har vi historisk set været privilegerede med høj kvalitet og adgang til rigelige mængder rent vand. Men de seneste år har afsløret en stigende trussel fra miljøfremmede stoffer, herunder pesticidrester og deres nedbrydningsprodukter, som nu påvises i stigende antal grundvandsboringer og i koncentrationer, der ofte overskrider gældende grænseværdier (Nanusha et al., 2025; Tisler et al., 2025). Disse fund skaber bekymring blandt forbrugerne og udfordrer forsyningsselskabernes ambition om at levere rent drikkevand uden uønskede stoffer.

Denne udvikling understreger et presserende behov for nye, avancerede metoder til at overvåge, analysere og forstå forureningsmønstre i grund- og drikkevand. Dette projekt adresserer denne udfordring ved at udvikle en avanceret analysemetode, der kan give en mere omfattende indsigt i den kemiske sammensætning af vandet. Den nye metode, baseret på højtopløselig massespektrometri (HRMS), vil fungere som et avanceret værktøj til at detektere både kendte og ukendte miljøfremmede stoffer.

I dag er analyser og reguleringen af drikkevand og grundvand baseret på såkaldte target-analyser for specifikke kendte stoffer. Der analyseres efter lister over stoffer med kendte mulige forureninger, og reguleres efter fastsatte grænseværdier for disse stoffer (Hollender et al., 2017). De senere år er der kommet en del nye stoffer på listerne over mulige forureninger. Årsagen til, at man først får kendskab til nye stoffer nu, er alene, at der ikke tidligere er analyseret for dem (Nanusha et al., 2025; Tisler et al., 2025). Potentielt kan der være flere ukendte stoffer i vandet, der kan give anledning til helbreds-mæssige effekter. Det må forventes, at udviklingen med, at der kontinuerligt opdages nye stoffer kan fortsætte, og der er derfor brug for et analyseværktøj, som kan skabe et bedre overblik hurtigere. Her har HRMS stort potentiale, da metoden kan anvendes til at give et såkaldt kemisk fingeraftryk af en prøve og dermed give et mere komplet billede af stofindholdet.

Udviklingen af den kemiske fingeraftryksmetode er et vigtigt skridt mod at sikre, at det livsnødvendige indtag af drikkevand ikke bidrager til en negativ sundhedseffekt i befolkningen. Metoderne er under kraftig udvikling på verdensplan, og i flere europæiske lande diskuteres potentialet for at anvende kemisk fingeraftryk til overvågning af miljøfremmede stoffer som et supplement til konventionelle target-analyser af udvalgte stoffer (Hollender et al., 2017). Flere universiteter og forskningsinstitutioner over hele verden har set potentialet i anvendelse af avancerede kemiske fingeraftryksmetoder indenfor miljøområdet. Københavns Universitet har f.eks. for nyligt demonstreret metodernes potentiale på rentvandsområdet via analyser af vand i drikkedunke (Tisler & Christensen, 2022).

For at opnå succes med metoderne er det nødvendigt at arbejde målrettet med både prøveoprensning og det kromatografiske setup. Disse elementer er afgørende for at udvide det kemiske rum og dermed øge antallet af stoffer, der kan detekteres i vandprøver (Huynh et al., 2021). En effektiv oprensning fjerner matrixkomponenter, som ellers kan undertrykke signalet, samtidig med at den opkoncentrerer lavt koncentrerede stoffer, så de bliver målbare. Valget af kromatografiske betingelser – herunder kolonne, mobilfase og gradient – har stor betydning for, hvilke stofklasser der separeres effektivt (Reemtsma et al., 2016). Et optimeret setup øger både følsomheden og bredden af detekterbare forbindelser. Samtidig kan valg af oprensnings- og kromatografisk setup medføre, at visse stoffer udelukkes fra analysen og

dermed ikke detekteres, hvilket kan føre til falsk-negative resultater i miljøprøver. Derfor er både prøveoprensning og kromatografiske setups centrale for at opnå et repræsentativt kemisk fingeraftryk.

I dette projekt har ambitionen været at udvikle metoder til at bestemme det kemiske fingeraftryk af grund- og drikkevand og at gøre metoderne så tilpas robuste, at de kan implementeres i den kommercielle analyseindustri. Metodikken er baseret på anvendelse af LC-HRMS og fokuserer på såkaldt Suspect Screening, dvs. screening for et meget stort antal på forhånd udpegede stoffer, som kan forekomme i drikke/grundvand. Formålet er at give vandselskaberne mulighed for at få et bedre billede af vandkvaliteten end ved traditionel target-screening og derigennem muliggøre en omkostningseffektiv udnyttelse af ressourcerne samt styrke forbrugertrygheden omkring vores drikkevand.

2. Resume

Projektet PESTICID har udviklet en metode til prøveforberedelse og analyse af et såkaldt kemisk fingeraftryk af grund- og drikkevand baseret på LC-HRMS. Behovet er tydeliggjort af hyppige fund af miljøfremmede stoffer, som ville have været opdaget tidligere, såfremt de anvendte analysemetoder havde kunne måle dem. Formålet har derfor været at etablere en bred, robust og kommercielt anvendelig screeningsmetode, der kan detektere både kendte og uventede forbindelser.

Metoden kombinerer opkoncentrering ved fastfaseekstraktion (SPE) med en dual kromatografisk opsætning. På prøveforberedelsessiden blev flere fastfasematerialer testet. Kulbaserede sorbenter viste sig at give den bredeste dækning. På baggrund af en række kriterier blev

"Sep-Pak AC2" valgt. Eluering viste sig mest effektiv ved sekventiel basisk og sur eluering i acetonitril kombineret med kontrolleret inddampning. Vakuuminddampning (VEC) blev afprøvet som alternativ metode til SPE, men SPE gav flere sikre fund ved lave niveauer.

En systematisk screening for kolonner med 38 repræsentative stoffer førte til en dual opsætning med C18 Reversed Phase (RP) for bred robust dækning og BEH-Amide hydrophilic interaction kromatografi (HILIC) for små og polære forbindelser. For HILIC blev pH, buffer og injektionssolvens optimeret.

Validering på et testsæt af 89 miljørelevante stoffer viste, at den samlende metode (prøveforberedelse med SPE og LC-HRMS analyse) påviser 26% af stofferne på et koncentrationniveau på 0,01 µg/L, 54% af stofferne på et koncentrationniveau på 0,1 µg/L og 67% ved et koncentrationniveau på 1 µg/L. Til sammenligning kan nævnes, at kvalitetskravet for pesticider i drikkevand er 0,10 µg/L. Det er primært små, meget polære forbindelser, som er udfordrende for metoden.

Projektet har udviklet en samlet QA/QC-pakke med system suitability testing (SST)-kontroller, isotopmærkede interne standarder, triplikatanalyser, blankprøver og forslag til rapportering af identifikationssikkerhed.

For første gang i Danmark er der blevet udført et interlaboratorie sammenligningsstudie indenfor HRMS-screeninger. Sammenligningen viste, at metoden giver betydelig træfsikkerhed på tværs af tre laboratorier med 8-11 af 12 tilsatte stoffer genfundet i både kendt og blindt sæt.

Projektet har samtidig beskrevet rammerne for datalagring af HRMS-rådata og introduceret en kvantitativ non-target analyse (qNTA)-tilgang, der kan estimere koncentrationer uden referencestandarder.

HILIC-metoden viste sig at kunne udvide det kemiske rum, som metoden dækker, mod stoffer med høj polaritet. Gennem projektet og under valideringen var det imidlertid også tydeligt, at HILIC-metoden ikke på nuværende tidspunkt er så robust som den del af metoden, som er baseret på Reversed-Phase C18 kromatografi. Overførsel af HILIC-delen mellem laboratorier viste sig også at kræve en tidskrævende laboratoriespecifik optimering.

Der er udviklet og beskrevet en Suspect screening metode, som muliggør påvisning af ukendte miljøfremmede stoffer i grundvands- og drikkevandsprøver. Det er vigtigt at understrege, at metoder af denne type ikke med sikkerhed påviser alle tilstedeværende stoffer og at følsomheden og dermed detektionsgrænser vil variere mellem stoffer. Projektet har da

også vist, at specielt mindre og polære molekyler fortsat udgør en udfordring. Hvis der ønskes detektion af en større andel af miljøfremmede stoffer, vil det kræve yderligere optimering af HILIC-metoden og muligvis introduktion af supplerende analytiske platforme. Det vil dog også fordyre analyserne betydeligt i et kommercielt marked.

Der er i forbindelse med projektet udarbejdet en liste over relevante udvalgte stoffer i grundvand og drikkevand baseret på indmeldinger fra vandforsyningerne.

3. Summary

The PESTICID project has developed a method for sample preparation and analysis of chemical fingerprint of groundwater and drinking water based on LC-HRMS. The need arises from recurring new findings of pesticides and other anthropogenic contaminants, where classical target analyses do not provide sufficient insight into the substances present in the sample. The aim has therefore been to establish a broad, robust, and commercially viable screening method capable of detecting both known and unexpected compounds.

The method combines concentration by solid-phase extraction (SPE) with a dual chromatographic setup. On the sample preparation side, several SPE sorbent materials were tested. Carbon-based sorbents provided the broadest coverage, and based on a number of criteria, "Sep-Pak AC2" was selected. Elution proved most effective using sequential basic and acidic elution in acetonitrile combined with controlled evaporation. Vacuum evaporation (VEC) was evaluated as an alternative to SPE, but SPE produced more reliable detections at low concentration levels.

A systematic screening of columns using 38 representative compounds led to a dual system comprising C18 reversed-phase (RP) chromatography for broad and robust coverage, and BEH-Amide hydrophilic interaction chromatography (HILIC) for small and polar compounds. For HILIC, pH, buffer composition, and injection solvent were optimized.

Validation using a test set of 89 environmentally relevant substances showed that the combined method (SPE sample preparation and LC-HRMS analysis) detects 26% of the compounds at 0.01 µg/L, 54% of the compounds at 0.1 µg/L, and 67% at 1 µg/L. For comparison, the regulatory quality requirement for pesticides in drinking water is 0.1 µg/L. The method's main challenges lie with small, highly polar compounds.

The project has developed a full QA/QC package including system suitability testing (SST) controls, isotope-labelled internal standards, triplicate analyses, blank samples, and guidance for reporting levels of identification confidence.

For the first time in Denmark, an interlaboratory comparison study within HRMS screening has been conducted. The comparison showed that the method yields substantial detection consistency across three laboratories, with 8–11 of 12 spiked compounds being recovered in both the known and blind sample sets.

The project has also described the framework for HRMS raw-data storage and introduced a quantitative non-target analysis (qNTA) approach capable of estimating concentrations without reference standards.

The HILIC method demonstrated an ability to expand the chemical space covered by the overall method toward highly polar substances. However, throughout the project and during validation, it also became clear that the HILIC setup is not yet as robust as the reversed-phase C18 part of the method. Transferring the HILIC setup between laboratories also required time-consuming laboratory-specific optimization.

A Suspect Screening method has been developed and documented that enables the detection of unknown anthropogenic contaminants in groundwater and drinking water samples. It is important to emphasize that methods of this type cannot guarantee detection of all compounds present, and that sensitivity and detection limits will vary among substances. The project has shown that particularly small and polar molecules remain challenging. Detecting a larger proportion of anthropogenic contaminants would require further optimization of the HILIC method and possibly the introduction of additional analytical platforms, though this would also significantly increase analysis costs in a commercial context.

As part of the project, a list of selected relevant substances in groundwater and drinking water has been prepared.

4. Baggrund og formål

Danmark har længe haft en stærk tradition for at beskytte grundvandet og sikre en høj drikkevandskvalitet. Ikke desto mindre har det stigende antal fund af pesticidrester og andre miljøfremmede stoffer vist at vores drikkevandsressourcer er under pres. Flere tiltag til forbedring af grundvandsbeskyttelsen er taget af Miljøministeriet - f.eks. blev der i en årrække gennemført store screeninger for nye stoffer i grundvandet.

Fundene har givet anledning til debat i en lang række medier og på en lang række sociale platforme. Forbrugernes tillid til drikkevandets sikkerhed er således udfordret og de løbende fund af nye miljøfremmede stoffer har givet anledning til bekymring.

Ifølge de seneste undersøgelser findes pesticidrester i 56,4 % af landets undersøgte indvindingsboringer, og i 15 % af borerne er grænseværdierne for mindst ét stof overskredet (GEUS, 2026). I takt med at der er blevet inddraget flere stoffer i myndighedernes undersøgelser af drikkevand, er der fundet nye forurenende stoffer. Når man får kendskab til nye pesticider/hedbrydningsprodukter i vores drikkevand nu, skyldes det primært, at der ikke tidligere har været analyseret for dem.

Hidtil har drikkevandsanalyser været udført som såkaldte target-analyser, hvilket betyder, at der er analyseret for på forhånd udvalgte stoffer med kendt molekylmasse og struktur. Til analyserne er der således anvendt målrettede metoder, som alene har søgt efter de pågældende stoffer. Indenfor de seneste ca. 5 år er de såkaldte HRMS-metoder (højtopløst massespektrometri) imidlertid begyndt at vinde indpas til brug for bredere og ikke-målrettede miljøanalyser i forskning (Diera et al., 2023; Nanusha et al., 2025; Tisler et al., 2025).

HRMS-metoder har også et stort potentiale på drikkevandsområdet. Sammenlignet med andre miljøprøver er de forurenende stoffer i grund- og drikkevand imidlertid til stede i meget lavere koncentrationer. Dette er analytisk udfordrende, ikke mindst fordi grundvand normalt også indeholder opløst organisk stof, metaller og salte, der kan undertrykke påvisningen af de meget lave koncentrationer af en kompleks blanding af organiske miljøfremmede stoffer (Kiefer et al., 2019).

HRMS-baserede metoder kan ikke blot detektere en bred vifte af stoffer (30-1200 Da), men giver også mulighed for lagring af rådata til fremtidig brug. Dette er afgørende i en tid, hvor nye forureningsstoffer kontinuerligt dukker op, og behovet for fleksible overvågningsværktøjer stiger (Creusot et al., 2020).

Analyse for kemiske stoffer vil udover identifikation også som regel omfatte en kvantificering af de påviste stoffer. Kvantifikation efter den normale procedure med ekstern kalibrering forudsætter, at der anvendes såkaldt referencestandarder, dvs. rene stoffer i kendte koncentrationer, som kan med-analyses sammen med prøverne. Dette er en udfordring i forbindelse med HRMS analyser, fordi det antal stoffer, der screenes for, er meget stort og fordi man ikke på forhånd ved, hvilke stoffer der vil dukke op. Det kan desuden være vanskeligt/umuligt at tilvejebringe standarder for alle stoffer.

HRMS-metoder tillader således brede screeninger for mange stoffer ved den samme analyse, men metoderne har som alle andre metoder også begrænsninger.

Formålet med nærværende projekt er at udvikle og validere en eller flere analysemetoder baseret på HRMS-teknologi. Det er formålet med projektet, at de udviklede metoder skal dække så mange miljøfremmede stoffer som muligt og samtidigt være tilstrækkeligt robuste og økonomisk tilgængelige til at gøre en udbredelse på det danske miljømarked mulig. Projektet vil udvikle standardprocedurer for kemisk analyse og databehandling af primært pesticider og pesticidrester ved HRMS-metoder og vil samtidigt udforske metodernes omfang i form af det såkaldte kemiske rum og muligheden for kvantificering af stoffer, hvor der ikke – i hvert fald i første omgang – findes referencestandarder.

Projektet vil:

1. Give vandselskaber og myndigheder mulighed for at screene for et meget stort antal stoffer som erfaringsmæssigt vides at kunne optræde i drikkevand og grundvand

herunder persistente, mobile og toksiske forbindelser (PMT-stoffer), som udgør en særlig trussel mod vandressourcen.

2. Anvise en metodik for lagring af datafiler mhp. senere dataanalyse, idet analysedata fra HRMS-metoder kan genbesøges mhp. fremtidige retrospektive undersøgelser for indholdsstoffer og for tidsstudier.
3. Udforske mulighederne for kvantificering af stoffer, som påvises ved HRMS-analyser og som ikke dækkes af traditionelle kvantificeringsmåder med referencestandarder.

Projektet vil fokusere på organiske stoffer, som vides at kunne forekomme i drikkevand og grundvand. Projektet vil desuden skabe et udgangspunkt for videreudvikling af metoderne til også at omfatte helt ukendte forbindelser (egentlige non-target metoder).

Projektet er gennemført i et samarbejde mellem Eurofins Miljø A/S, GEUS, Københavns Universitet, VandCenter Syd, HOFOR og Aarhus Vand.

5. Afgrænsning af projektet

I dette projekt har partnerne arbejdet for at videreudvikle, teste og validere en kemisk fingeraftryk metode baseret på højopløst massespektrometri (HRMS) til analyse af grund- og drikkevand. I udviklingsprocessen er der lagt fokus på, at metoden skal kunne anvendes til at detektere og koncentrationsbestemme miljøfremmede stoffer med specifikt fokus på miljøfremmede stoffer der er persistente, mobile og toksiske (PMT'er) forureninger i lave koncentrationer.

Da et af formålene med projektet har været at lave en standardiseret metode, som er kommercielt anvendelig på det danske marked, har det været vigtigt for projektgruppen at sikre dels 1) at metoden leverer pålidelige, reproducerbare og anvendelige resultater, dels at 2) prisen for analyserne efterfølgende kommer til at ligge på et niveau der tillader bred anvendelse. Derfor har f.eks. tilgængelighed af indgående kemikalier og utensilier og et ønske om at reducere kompleksiteten af metoderne spillet ind på beslutninger i forhold til metode til prøveforberedelse, analyse og databehandling.

Der findes forskellige HRMS teknologier, og disse kan anvendes i kombination med en række forskellige kromatografiske metoder. I nærværende projekt anvendes væskekromatografi (LC) i kombination med Quadrupole Time of Flight (QTOF) massespektrometre. Dermed afgrænses metoden til at dække de stoffer, der er compatible med dette set-up. Metoden tilstræber at opnå en detektionsgrænse på 0,01 µg/L for relevante stoffer, men højere detektionsgrænser vil også være anvendelige i en lang række tilfælde. Gældende grænseværdi for pesticider i drikkevand er således 0,10 µg/L på nuværende tidspunkt.

For at simplificere databehandlingen begrænses metoden i dette projekt til at omfatte suspect screening for potentielt forekommende stoffer. Som tidligere nævnt kan rådata fra analyserne gemmes og gennemgås senere med henblik på senere retrospektive analyser. Datafilerne fra analyserne kan også bruges til en fuld non-target analyse for ukendte stoffer på et eventuelt senere tidspunkt.

Der er i forbindelse med projektet udarbejdet en liste over udvalgte relevante stoffer i grundvand og drikkevand. Listen er præsenteret i kapitel 13 og er vedlagt rapporten som excel-fil.

6. Principiel beskrivelse af den kemiske analyse

6.1 Design af LC-HRMS undersøgelser

En LC-HRMS-analyse af miljøprøver omfatter langt mere end selve den instrumentelle måling. Når man screener for et bredt spektrum af (ofte ukendte) miljøfremmede stoffer, er en lang række valg afgørende for det endelige resultat - lige fra hvordan prøverne udtages til valg af analysemetode og databehandling af datafilerne. Hvert trin i forløbet påvirker resultatet og kvaliteten af slutresultatet – de rapporterede data.

Eksempelvis har valg af opkoncentreringsstrategi (fastfase-ekstraktion, vakuum-inddampning, direkte injektion etc.) direkte konsekvenser for det kemiske dækningsområde og for detektionsgrænserne. Hver proces har potentiale for at tabe analytter, der ikke er kompatible med den anvendte metode, hvilket medfører, at disse aldrig vil blive detekteret i vandprøven. På samme måde kan håndtering af prøver også tilføre stoffer, så resultatet ikke bliver repræsentativt for den pågældende prøve.

I det følgende beskrives nogle af de elementer nærmere.

6.2 Beskrivelse af prøveforberedelse/opkoncentrering

Identifikation af stoffer i koncentrationer omkring drikkevandskvalitetskrav med HRMS kræver ofte, at prøven undergår en omhyggelig forbehandling. Typiske trin omfatter filtrering, opkoncentrering og ekstraktion. Hver håndtering udgør en potentiel kilde til kontaminering eller tab af

analytter. Protokollen skal derfor minimere disse risici og vil udover specifikation af prøveforberedelsesmetodik også typisk omfatte blank-prøver og funktionskontroller, der afslører eventuelle tab eller baggrunde (Hollender et al., 2023).

6.2.1 Direkte injektion kontra opkoncentrering

Ved direkte injektion minimeres prøveforberedelsen, idet der typiske kun tilsættes interne standard før analysen, eventuelt filtreres prøven og tilsættes en smule organisk solvent. Metoden eliminerer således næsten alle forbehandlingstrin og minimerer dermed risiko for fejlbehæftede resultater forårsaget af f.eks. tab af flygtige forbindelser, kontaminering fra anvendte materialer, adsorptions-/desorptionsproblematikker etc. Uden prøveforberedelse kan lave koncentrationer og matrix-effekter dog forhindre detektion ligesom salte fra den vandige matrix kan påvirke analyseudstyret. Direkte injektion er derfor mest fordelagtig ved moderate-høje koncentrationer.

6.2.2 Fastfaseekstraktion (SPE)

Fastfaseekstraktion (SPE) bygger på selektiv binding af analytter til et sorbentmateriale. Efter prøve-påførsel fjernes matrixkomponenter, mens analytterne fastholdes, hvorefter de elueres med et organisk opløsningsmiddel og om nødvendigt inddampes. Sorbentens kemi

bestemmer, hvilke forbindelser der tilbageholdes. Ved for "snævre" egenskaber mister man den brede dækning, mens for stærk binding hæmmes elueringen. Nogle analytter binder potentielt irreversibelt til fastfasen. Til suspect- og non-target-screening vælges derfor ofte polymerbaserede blandede sorbenter eller kombinationer, så både polære, upolære og ioniserede stoffer ekstraheres. En bred SPE-metode trækker dog mere matrix med, hvilket øger risikoen for ion-suppression og hyppigere instrumentvedligehold. Balancen mellem dækningsgrad og matrix-renhed er derfor central (Hollender et al., 2023; Huynh et al., 2021).

6.2.3 Vakuuminddampning (VEC)

Ved vakuuminddampning (VEC) koncentrerer prøven ved fordampning til tørhed eller et fast restvolumen. Metoden omgår problemer som mætning af sorbent, breakthrough og ufuldstændig eluering (Mechelke et al., 2019). Til gengæld koncentrerer salte og øvrige matrixkomponenter sammen med analytterne, hvilket kan forstærke ion-suppression og kræve flere rengøringer af instrumenter. Fordampning til et restvolumen (i stedet for komplet udtørring) reducerer tab af flygtige stoffer og udfældning af salte, men den samlede opkoncentreringsfaktor begrænses af det endelige volumen. Da restfasen er vandig, passer metoden umiddelbart til reversed-phase LC. Analyse med f.eks. HILIC kræver inddampning til tørhed og genopløsning i organisk solvent (Hollender et al., 2023; Huynh et al., 2021).

6.3 Valg af fastfase til SPE ekstraktion

Ved konventionelle target-analyser kan både fastfase og eluenter vælges målrettet ud fra analyttens specifikke kemiske egenskaber. I modsætning hertil er målet med suspect- og non-target-screening typisk at opnå tilbageholdelse af flest mulige stoffer fra prøven uden på forhånd at definere målgruppen. Derfor anvendes der i denne type undersøgelser ofte uspecifikke SPE-fastfaser, eksempelvis Oasis HLB (Angeles et al., 2021; Diera et al., 2023). Oasis HLB har en bred anvendelighed, men udfordres ved mindre polære, små organiske forbindelser, såsom 1,2,4-triazol og N,N-dimethylsulfamid (DMS), som ikke tilbageholdes effektivt (Bollmann & Badawi, 2020). Andre studier anvender metoder, hvor flere forskellige fastfaser kombineres, enten i samme SPE-kolonne (blandede fastfaser) eller i en sekventiel opsætning for at opnå komplementære retentionsegenskaber og dermed dække en større spændvidde af forbindelser, der kan fanges af de anvendte fastfaser.

I dette projekt blev der indledningsvis foretaget litteraturgennemgang med fokus på SPE materialer, som dækker så bredt som muligt, samt særligt materialer, der effektivt tilbageholder små, polære forbindelser som 1,2,4-triazol og N,N-dimethylsulfamid (TABEL 1). Litteraturgennemgangen viste generelt, at undersøgelser baseret på HRMS analyser ofte udføres med kombinationer af flere forskellige SPE-fastfaser. Imidlertid kan en sådan kombineret tilgang være vanskelig at implementere og skalere i praksis, især hvis der ikke findes kommercielt tilgængelige, færdigpakkede SPE-kolonner med kombinerede fastfaser. Det er således både tidskrævende og svært at pakke robuste og reproducerbare SPE-kolonner.

TABEL 1. Eksempler på SPE metoder anvendt LC-HRMS analyser i litteraturen.

Type	Kolonne	Begrundelse
Mix	<u>Nederst</u> : Blanding af Strata-X-AW, Strata-X-CW og Isolute ENV+. <u>Øverst</u> : 200 mg Oasis HLB	Et studie af sammenlignede forskellige SPE-metoder med henblik på non-target screening af organisk mikroforurening i overfladevand (Huynh et al., 2021). I undersøgelsen blev en mixed-bed SPE-metode sammenlignet med flere single-bed-metoder samt en enkelt dual-bed-metode. Resultaterne viste, at mixed-bed-metoden identificerede det største antal forbindelser, dækkede det bredeste masseområde og generelt resulterede i mere intense chromatografiske toppe sammenlignet med de øvrige metoder. Disse resultater understøtter således fordelene ved at kombinere flere fastfaser i én kolonne med henblik på at opnå bredere dækning ved non-target- og suspect-screening.
Mix	<u>Nederst</u> : Supelclean ENVI-Carb. <u>Øverst</u> : Blanding af WAX, WCA og evt. Isolute ENV+	En mixed-bed SPE-metode blev anvendt til undersøgelse af potentielt persistente og mobile forbindelser ved hjælp af suspect screening (Neuwald et al., 2021). Denne metode kombinerer en kulstofbaseret fastfase (Supelclean ENVI-Carb) med ionbyttermaterialerne Oasis Weak Anion Exchange (WAX) og Weak Cation Exchange (WCX). Tisler et al. udbyggede denne kombination yderligere ved at inkludere Isolute ENV+ (Tisler & Christensen, 2022). Da Supelclean ENVI-Carb er kendt for effektiv tilbageholdelse af både polære og upolære forbindelser i vandige prøver og tidligere er anvendt i forbindelse med analyse af blandt andet pesticider, kan det forventes, at mixed-bed-metoder baseret på disse materialer vil være egnede til en bred vifte af forbindelser ved suspect- og non-target-screening.
Mix	<u>Nederst</u> : Blanding Isolute ENV+, WAX, WCX. <u>Øverst</u> : HR-X (reversed phase, Chromabond)	Schymanski et al. har udviklet en metode hvor nederste lag består af en blanding af Isolute ENV+ (Biotage), weak anion exchanger (Chromabond HR-XAW, Macherey-Nagel), og weak cation exchanger (Chromabond HR-XCW, Macherey-Nagel) og øverste lag er Chromabond HR-X (Macherey-Nagel), (Schymanski et al., 2015).
Generel	Supelclean ENVI-Carb Plus	Bollmann og Badawi har udviklet en metode til analyse af 1,2,4-triazol, N,N-dimethylsulfamid og andre små polære organiske forbindelser i grundvand. I undersøgelsen sammenlignes forskellige SPE-metoder, herunder Oasis HLB, forskellige ionbyttermaterialer og kulstofbaserede materialer. Det konkluderes, at de kulstofbaserede materialer er mest lovende, og der er udarbejdet en optimeret metode baseret på brugen af Supelclean ENVI-Carb Plus (Bollmann & Badawi, 2020).

6.4 Beskrivelse af princip ved HRMS-detektion

High-resolution massespektrometri (HRMS) muliggør præcis måling af masse-til-ladning-forhold (m/z) med høj opløsning og lav massefejl, typisk under 5 ppm. Dette er centralt i brede screeninger, hvor formålet er at detektere og foreslå strukturer for både kendte og ukendte forbindelser uden brug af referencestandarder. HRMS-instrumenter som QTOF eller Orbitrap måler både precursor- og fragmentioner med høj nøjagtighed, hvilket gør det muligt at skelne mellem forbindelser med næsten identiske nominalmasser. Data måles ofte i bredt spektralområde og i fuld-scan mode, hvilket sikrer, at alle ioner detekteres.

6.5 Det kemiske rum

Det kemiske rum, der dækkes af en analytisk metode, refererer til bredden af kemiske forbindelser, som metoden effektivt kan detektere eller identificere under givne betingelser. Ingen analytisk platform kan på nuværende tidspunkt dække samtlige potentielle miljøfremmede forbindelser, der forekommer i drikkevand og grundvand. Derfor er det afgørende klart at definere og forstå det kemiske rum, som den valgte metode omfatter, for at sikre pålidelige resultater og korrekt fortolkning af fundene.

For target-analyser er det kemiske rum veldefineret og består af specifikke stoffer med fastlagte detektionsgrænser. Metodeudviklingen baseres på analyser af rene standarder, og metoderne optimeres specifikt efter disse stoffer. Dette er en hovedårsag til, at target-analyser generelt har lavere detektionsgrænser end suspect- og non-target-screening, da analysen kan skræddersys til de udvalgte analytter. Omvendt er man ved non-target- og suspect-screening interesseret i at analysere et bredere udvalg af stoffer, og metoderne udvikles derfor ud fra et miks af forbindelser inden for den ønskede målgruppe.

Ved udvikling af screeningsmetoder skal der tages stilling til flere trin: prøvetagning, prøveforberedelse, separationsmetode, analysemetode (herunder ioniseringsmetode og kromatografisk separation) samt databehandling. Disse parametre har alle direkte betydning for metodens kemiske rum. Hvis flere metoder kombineres med forskellige oprensningsteknologier, er det muligt at afdække et større område, dvs. at udvide det samlede kemiske rum. Derfor kan forhåndskendskab til prøvens potentielle indhold eller til specifikke stofgrupper i fokus være meget vigtig for, designet af den samlede analyse og dermed for at de opstillede spørgsmål kan besvares.

6.6 DIA kontra DDA

Ved QTOF-analyser kan data opsamles på to forskellige måder hhv. data-uafhængig (DIA) og data-afhængig (DDA) akkvisition.

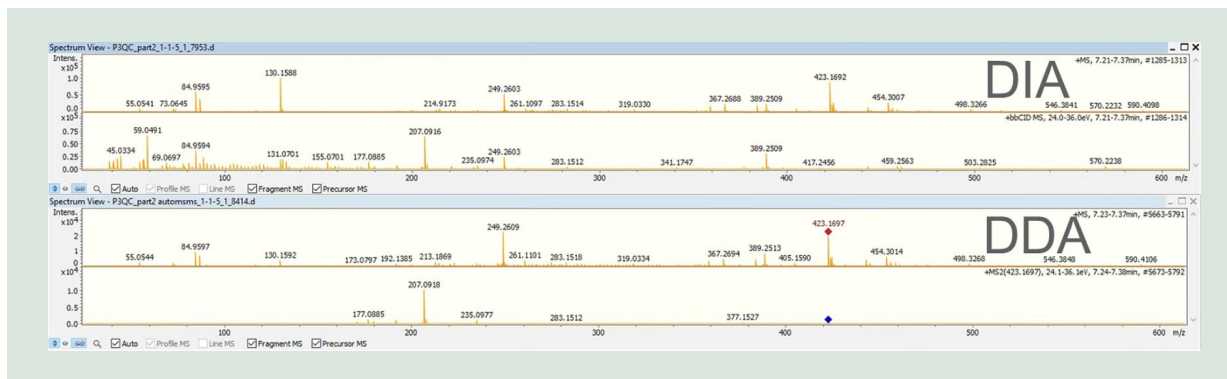
I **DDA** vælges precursor-ioner til fragmentering i MS2-scannet baseret på intensitet fra MS1-scannet. Det betyder, at stoffer med lav intensitet potentielt ikke fragmenteres, hvilket kan begrænse muligheden for at detektere stoffer i lav koncentration. Til gengæld for stoffer med høj intensitet opnås dog et bedre fragmentationsmønster, hvorved identifikationen bliver forbedret.

DIA fragmenterer derimod alle ioner inden for brede, prædefinerede m/z-intervaller uafhængigt af intensitet. Det sikrer omfattende dækning af prøvens kemiske sammensætning. Da der skal køres mindre selektiv detektion, giver DIA ofte bedre følsomhed end DDA. DIA giver dog mere komplekse fragmenteringsspektre med flere interferenser end DDA, hvilket gør den efterfølgende identifikation mere udfordrende.

Herunder i FIGUR 1 er der vist DIA og DDA-spektre optaget for lægemidlet losartan. Øverst er vist et DIA-spekter, øverst for MS1 uden fragmentering og nedenunder for MS2 med fragmentering. I DIA-spektret er fragmenteringen sket for alle ioner i et bredt m/z-vindue, hvilket giver flere signaler og dermed et mere komplekst spektrum med overlap mellem fragmentioner fra forskellige stoffer. Det afspejler den højere følsomhed og bredere dækning, men også den større udfordring i datafortolkningen.

I DDA-spektret ses øverst et MS1 spekter uden fragmentering, nedenunder ses et rent fragmenteringsmønster med tydelige fragmentioner, da kun én udvalgt precursor-ion er blevet fragmenteret. Dette giver høj specificitet og gør identifikation lettere.

Ved sammenligning af MS1 spektre, vil man kunne se, at disse ligner hinanden for DIA og DDA. Dog er sensitiviteten en smule bedre for DIA end DDA.



FIGUR 1. DIA og DDA-spektre optaget for losartan, kopieret fra Kilpinen (2025). Figuren viser en følsomhed for DIA, som er ca. 10 gange højere sammenlignet med DDA.

For undersøgelser, hvor der ønskes fleksibilitet til retrospektivt at identificere miljøfremmede stoffer med lav koncentration, kan DIA være fordelagtigt. Metoden kan dog besværliggøre eventuelt identifikation af ukendte forbindelser, hvor der er brug for et klart fragmentationsmønster. Det understreger behovet for nøje overvejelse af dataopsamlingsstrategi forud for analysen.

6.6.1 LC-HRMS og dets begrænsninger

Dette projekt har fokuseret på analyseplatforme baseret på LC koblet til HRMS, som er en udbredt og kraftfuld analytisk platform til detektion og identifikation af miljøfremmede stoffer. Selvom LC-HRMS har mange fordele, eksisterer der betydelige begrænsninger med hensyn til, hvilke forbindelser der kan detekteres.

Analysen med LC-HRMS er afhængige af, at forbindelserne ioniseres effektivt i ionkilden, her anvendes typisk en ESI (elektrospray-ionisering) kilde. Forbindelser, der ioniseres dårligt, kan ikke detekteres med denne metode, hvilket medfører, at en række miljøfremmede stoffer ekskluderes.

Stoffers polaritet har også en betydelig indflydelse på muligheden for detektion i et LC-baseret kromatografisk system. Meget polære forbindelser har eksempelvis begrænset retention i konventionel RP LC, hvilket resulterer i en begrænset detektion. Ligeledes spiller størrelsen af de undersøgte stoffer en rolle, da såvel meget små som meget store molekyler ikke lader sig påvise.

Dette kan delvist kompenseres ved at anvende et eller flere supplerende kromatografiske separationssystemer. Eksempelvis kan ionkromatografi (IC) eller LC-HILIC anvendes for meget polære forbindelser, mens GC-metoder kan benyttes til flygtige og semivolatile forbindelser.

Udvidelse af mængden af kromatografiske metoder forøger imidlertid mængden af analyser proportionalt og forøger den samlede pris for analysen betragteligt.

7. Forsøg med det kromatografiske set-up

Det kromatografiske setup er afgørende for succesfuld analyse for miljøfremmede stoffer i grund- og drikkevand. Disse stoffer varierer bredt i deres kemiske egenskaber, og effektiv detektion afhænger derfor ofte af kolonner med forskellige interaktionsmekanismer.

Reversed Phase (RP) væskechromatografi har gennem mange år været den mest anvendte metodik og er generelt accepteret, som en robust og velafprøvet metode. RP er den metode som stort set alle laboratorier i dag anvender til analyse for miljøfremmede stoffer. RP er på grund af den store udbredelse og veldokumenterede performance til analyse for vandige miljøprøver valgt som udgangspunktet for metodevalget i dette projekt.

Metoden er imidlertid også velkendt for at være mindre effektiv overfor små meget polære stoffer, som nedbrydningsprodukter fra eksempelvis pesticider typisk kan være (Reemtsma et al., 2016). Der er derfor parallelt med RP søgt efter supplerende metoder/alternativer, som potentielt muliggør analyse af disse små polære molekyler.

Ud fra et ønske om en kombination af så få analytiske platforme som muligt og bred dækning af det kemiske fingeraftryk blev kombinationen RP-LC, HILIC og mixed-mode-LC valgt som set-up for metodeudviklingen i dette projekt.

7.1 Valg af kolonner

Der blev indledningsvis gennemført en litteratursøgning for valg af velegnede kolonner til test. Litteratursøgningen fokuserede primært på artikler omhandlende analysemetoder for PMT- og vMvP-stoffer (TABEL 1). Litteratursøgningen blev kombineret med laboratorierne (GEUS og Eurofins) egne erfaringer med kolonner af disse typer. TABEL 2 herunder viser en oversigt over foreslåede kolonner og kolonner udvalgt til test i projektet.

TABEL 2. Oversigt over kolonner til test. Tabellen indeholder oplysninger om kolonnetype, stationær-fase (kemi), begrundelse eller reference for udvælgelsen, samt hvilke kolonner der endeligt blev udvalgt til test. Specifikationer for de udvalgte kolonner fremgår af bilag 6.4.

Navn	Type	Kemi	Begrundelse	Testet
Acquity UPLC HSS C18	RP	C18	Afprøvet til DMS og 1,2,4-TRZ, som har lidt retention (dog høj LOD)	X
Intensity Solo	RP	C18	Bruker screening method udviklet til lægemidler, pesticider, toxiner og et udvalg af miljøfremmede stoffer i forskellige matricer derunder vand.	X
Acquity UPLC HSS T3	RP	C18 with T3-endcapping	Target-metode anvendt til PMT-stoffer vandprøver (overflade & grundvand) (Schulz et al., 2019)	X

Navn	Type	Kemi	Begrundelse	Testet
Atlantis® T3	RP	C18 with T3-endcapping	Metode anvendt til grundvandsscreening i Schweitz (Kiefer et al., 2019), den er meget lignende HSS-T3 og blev derfor undladt.	
Kinetex® F5	RP (core shell)	Pentafluorphenol	Forslået til PMT-stoffer i vand (Thermo Accucore PFP), men som viste meget højt baggrundsstoffer fra kolonnematerialet (B. Schulze et al., 2020).	X
Hypercarb	RP	Spherical, Porous Graphitic Carbon	Targetmetode udviklet til: 1,2,4-triazole & DMS (Bollmann & Badawi, 2020).	X
Venusil	HILIC	Amide	Leverandøren oplyser at den er egnet til Glyphosate, AMPA, ClO ₃ , ClO ₄ , Fosetyl, phosphonic acid, Maleic hydrazide, Ethephon, Gluphosinate	X
Acquity BEH-NH2	HILIC	Amide	Target-metode anvendt til PMT-stoffer vandprøver (overflade & grundvand) (Schulz et al., 2019)	X
Luna NH2	HILIC	Amide	Leverandøren oplyser at den er egnet til Glyphosate, AMPA. Den blev undladt, da den er lignende til Acquity BEH-NH2	
VDSpher PUR-HILIC	HILIC	Silica	Target-metode til sulfamic acid (Seitz et al., 2018), den blev undladt da den var svært at skaffe og havde meget begrænset performance for de andre testede stoffer fx TFA	
RPPX	HILIC	Proprietary	Targetmetode til ClO ₄ & TFA (Seitz et al., 2018) den blev undladt da den var svært at skaffe og havde meget begrænset performance for de andre testede stoffer fx sulfamic acid	
bioZen Glycan	HILIC	Amide polyol	Leverandøren oplyser at den er egnet til TFA, men svært at skaffe og derfor undladt.	
Acclaim Trinity P1	MMLC	SCX, WAX, and RP mixed-mode	Forslået til PMT-stoffer, men polare stoffer uden ladning ved pH 6 har begrænset tilbageholdelse (Montes et al., 2019; S. Schulze et al., 2019)	X
Primesep 100	MMLC	RP with embedded acidic ion-pairing groups	Leverandøren oplyser at den er egnet til 1,2,4-TRZ, Metformin	X

Nogle af de foreslåede kolonner minder meget om hinanden, eksempelvis Acquity HSS T3 og Atlantis T3, som tidligere er blevet anvendt af hhv. Schulze et al. (2019) og Kiefer et al. (2019) til analyse af PMT-stoffer (Kiefer et al., 2019; S. Schulze et al., 2019). For at begrænse tidsforbruget blev der derfor udvalgt et repræsentativt udsnit af de foreslåede kolonner (TABEL 2), omfattende forskellige kolonnetyper, der spænder bredt fra RP til HILIC og mixed-mode. Kolonnerne blev testet med gradienter og solventer i henhold til referencerne og som passer til kemien af kolonnerne (Bilag 6.1). Alle kolonner blev testet ved 40°C. Både HILIC (BEH-NH2) og HSS-T3 blev efterfølgende testet yderligere ved 20°C og 10°C.

7.2 Valg af standardstoffer til brug i test af kolonner

Et sæt af 38 standarder blev udvalgt til at teste og udvælge kolonner og prøveforberedelsesmetoder. Udvalg blev baseret på følgende kriterier:

- Kendte stoffer fundet i dansk grundvand med høj frekvens / koncentration
- Andre relevante meget mobile og vandopløselige stoffer.

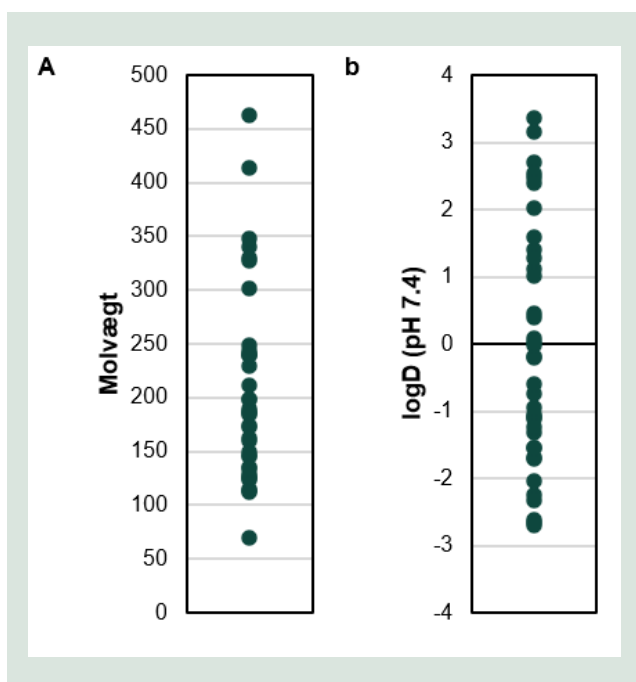
Det første kriterie blev afdækket ved at vælge de 10 stoffer med højest fundprocent i GRUMO-monitoring og boringskontrollen (Thorling et al. 2023).

Udvalget af stofferne til det andet kriterie blev først og fremmest baseret på UBA's PMT/vMvP-klassificering og prioritering af REACH stoffer "A prioritization framework for PMT/vPvM Substances under REACH for registrants, regulators, researchers and the water sector" (Peter Arp et al., 2023).

Det endelige udvalg af stoffer blev afdækket ved en kombination af:

- Schulze m.fl. (2019) har analyseret 57 højtprioriterede stoffer fra UBA's PMT-liste med target analyser i udvalgte overfladevands- og grundvandsprøver. Stofferne med højeste fund-procent er anvendt i denne undersøgelse.
- Fries m.fl. (2022) har fokuseret udelukkende på kendte monomerer og additiver fra plast på UBA's PMT-liste og vurderet deres emissions- og grundvandsrisiko. Udvalgte stoffer med højest emissions- og grundvandsrisiko blev anvendt til denne undersøgelse.
- PFAS-stoffer blev udvalgt på baggrund af bl.a. Joerss et al., 2022.
- Listen blev sluttelig suppleret med stoffer, som blev oplyst som prioriterede af de involverede vandforsyninger i projektet.

Det endelige stofsæt til metodeudviklingen omfattede 38 stoffer (Bilag 6.1). Stofferne dækker et bredt massespektrum (69-462 g/mol) med hovedandelen omkring 100-250 g/mol. Polariteten spænder fra logD -3 til 3 (FIGUR 2).

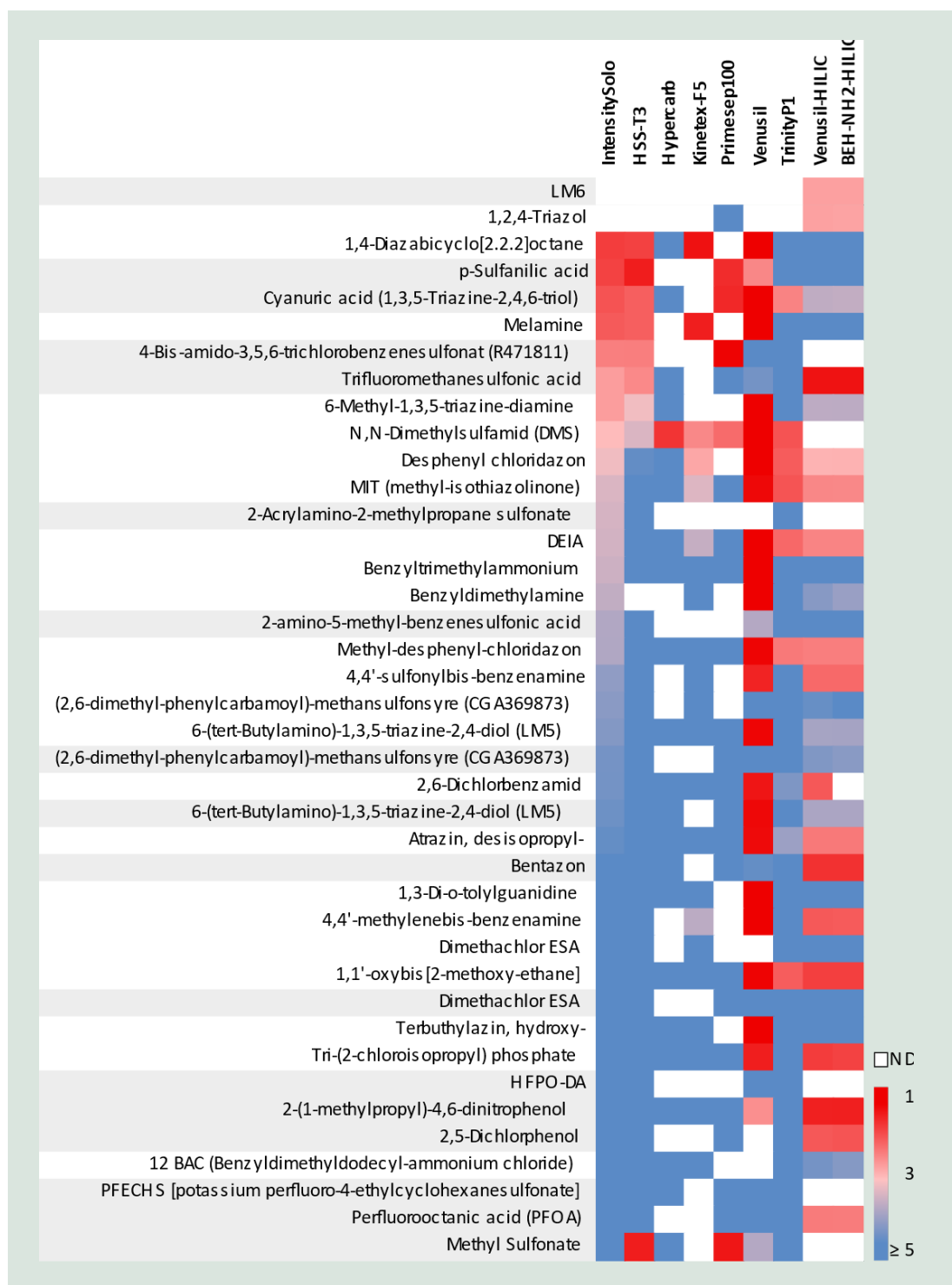


FIGUR 2. Spredning af (a) molvægt og (b) logD af de udvalgte 38 stoffer.

7.3 Test af kolonner

Vurderingen af de forskellige kolonner blev foretaget på baggrund af deres evne til at tilbageholde og adskille de udvalgte stoffer (retention) samt topkvalitet vurderet ud fra højde, bredde, areal og symmetri.

FIGUR 3 viser en oversigt over retentionstid for teststofferne på de udvalgte kolonner.



FIGUR 3. Heatmap over retentionstider på de undersøgte kolonner (rød lav retention og blå høj retention). De viste injektioner stammer fra henholdsvis vandig opløsning eller acetonitril-opløsning (for HILIC-kolonner), detekteret enten i positiv mode (hvid) eller negativ mode (grå). TFA er ikke inkluderet i vurderingen på grund af for høj baggrund. Hvide felter indikerer, at der ikke blev detekteret noget signal for det pågældende stof.

Som vist i FIGUR 3 kunne RP-kolonnerne Hypercarb, Kinetex-F5 og Primesep100 fravælges, da mange af stofferne ikke blev detekteret ved anvendelse af disse kolonner. Disse kolonner egner sig således ikke til analyse af det kemiske fingeraftryk, som netop kræver en bred

analytisk dækning. De kan dog stadig være det foretrukne valg til specifikke enkeltstoffer, fx 1,2,4-triazol. Venusil-kolonnen viste i RP-modus generelt dårlig retention for en stor del af de undersøgte stoffer.

De to amid-baserede HILIC-kolonner, Venusil og BEH-NH₂, viste meget sammenlignelige resultater, og derfor blev kun én udvalgt til videre forsøg. BEH-NH₂-kolonnen blev valgt, da den leveres af en veletableret og hyppigt anvendt producent, hvilket øger sandsynligheden for stabil forsyning.

Dermed fremstod de tre mest lovende alternative kolonner til Intensity Solo som HSS-T3, Trinity-P1 og BEH-NH₂. Kolonnerne er sammenlignet i TABEL 3.

Stoffer med god retention på Intensity Solo-kolonnen (retentionstid, RT > 4 min) blev ikke yderligere vurderet, da disse uden problemer ville kunne tilbageholdes på andre C18-baserede RP kolonner. Disse kolonner tilbageholder primært stoffer baseret på hydrofobicitet, dvs. jo mere hydrofobt et stof er, desto bedre retention opnås. Formålet med de alternative kolonner var derimod at opnå forbedret retention og bedre topkvalitet for stoffer med kort retentionstid (RT < 4 min). Hvis en alternativ kolonne samtidig kunne anvendes til de øvrige stoffer, blev dette vurderet positivt, da det ville gøre det muligt at anvende én metode frem for at skulle kombinere to forskellige metoder for at dække hele stofspektret.

TABEL 3. Sammenligning af retentionstid og arealet af signalerne på de fire mest lovende kolonner (øvrige kolonner i Bilag 6.2).

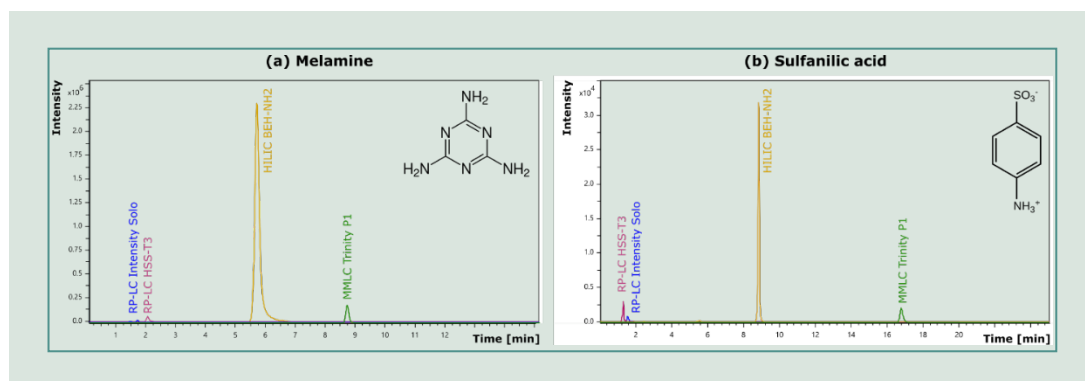
Kolonne	ESI	Retentionstid [min]				Areal [cps]			
		Int. Solo	HSS-T3	Trinity P1	BEH-NH ₂	Int. Solo	HSS-T3	Trinity P1	BEH-NH ₂
p-Sulfanilic acid	NEG	1.7	1.3	16.9	8.8	3598	10372	26043	182824
Cyanuric acid (1,3,5-Triazine-2,4,6-triol)	NEG	1.9	2.0	2.4	3.8	12447	9075	42164	1941510
4-Bis-amido-3,5,6-trichlorobenzenesulfonat (R471811)	NEG	2.3	2.3	17.4		13337	5029	24668	
Trifluoromethanesulfonic acid	NEG	2.6	2.4	19.8	1.2	279674	157748	582592	33668436
2-Acrylamino-2-methylpropane sulfonate	NEG	3.5	6.0	15.8		1578	1398	4113	
2-amino-5-methyl-benzenesulfonic acid	NEG	4.0	6.7	21.8	5.8	71829	89078	55579	30843414
(2,6-dimethyl-phenylcarbamoyl)-methansulfonsyre (CGA369873)	NEG	4.7	8.9	20.2	4.4	277363	369081	232358	11267654
6-(tert-Butylamino)-1,3,5-triazine-2,4-diol (LM5)	NEG	4.8	9.6	5.6	4.0	178849	250471	280330	6266464
Bentazon	NEG	5.0	9.7	21.5	1.5	1433917	1746578	1214073	23711062
Dimethachlor ESA	NEG	6.1	11.8	20.4	7.8	65897	110135	70309	372246
HFPO-DA [2,3,3,3-tetrafluoro-2-(1,1,2,2,3,3,3-heptafluoropropoxy)propanoic acid]	NEG	9.8	14.8	17.6		48078	66028	94532	
2-(1-methylpropyl)-4,6-dinitrophenol	NEG	9.9	14.8	21.6	1.3	2281650	2393677	3966	40468268
2,5-Dichlorphenol	NEG	10.6	15.6	15.7	1.9	7941	7470	3754	5140875

Kolonne	ESI	Retentionstid [min]				Areal [cps]			
		Int. Solo	HSS-T3	Trinity P1	BEH-NH2	Int. Solo	HSS-T3	Trinity P1	BEH-NH2
PFECHS [potassium perfluoro-4-ethylcyclohexanesulfonate]	NEG	12.4	17.1	22.0		232294 2	3327	2874759	
Perfluorooctanic acid (PFOA)	NEG	12.5	16.3	22.5	2.3	271623	394085	4124	4324
Methyl Sulfonate	NEG	16.6	1.3	13.0		93623	30209	139284	
4-(tert-Buthylamino)-6-hydroxy-1-methyl-1,3,5-triazin-2(1H)-one (LM6)	NEG				2.7				4456
TFA	NEG	For meget baggrund til at vurdere							
1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane	POS	1.6	1.7	12.8	17.8	628032	637192	2494589	35204
Melamine	POS	1.9	2.0	8.6	5.6		409653	1428089	25002314
6-Methyl-1,3,5-triazine-diamine	POS	2.6	3.2	6.1	3.8	609767	542626	945577	14905262
N,N-Dimethylsulfamid (DMS)	POS	2.9	3.5	1.9		3463	2942	853	
Desphenyl chloridazon	POS	3.2	4.9	2.0	2.9	185790	133109	326411	154092
MIT (methyl-isothiazolinone)	POS	3.5	5.8	1.9	2.4	525260	456889	339104	228317
DEIA	POS	3.6	5.9	2.1	2.4	22428	18933	80646	21568
Benzyltrimethylammonium	POS	3.6	7.2	12.8	6.7	364030	325475	702137	18401976
Benzylidimethylamine	POS	3.8		13.5	4.2	188089		344818	12173634
Methyl-desphenyl-chloridazon	POS	4.0	7.5	2.3	2.3	206380 7	1588853	1240354	155066
4,4'-sulfonylbis-benzenamine	POS	4.4	9.6	8.6	2.1	194418 4	2034153	651928	254110
(2,6-dimethyl-phenylcarbamoyl)-methansulfonsyre (CGA369873)	POS	4.4	9.1	20.2	5.1	69471	79594	30734	9229
6-(tert-Butylamino)-1,3,5-triazine-2,4-diol (LM5)	POS	4.5	9.6	5.6	4.1	17295	23801	24456	26839
2,6-Dichlorbenzamid	POS	4.7	9.9	4.6		576605	551366	182142	
Atrazin, desisopropyl-	POS	4.9	10.5	4.2	2.3	488494	469219	611947	86995
1,3-Di-o-tolylguanidine	POS	5.1	12.0	13.6	6.3	252295 8	2943211	2898986	41409128
4,4'-methylenbis-benzenamine	POS	5.2	11.5	13.5	2.0	991370	767166	364238	6713491
Dimethachlor ESA	POS	5.2	12.0	20.4	7.6	100930	128140	22289	48671
1,1'-oxybis[2-methoxy-ethane]	POS	5.8	13.0	2.0	1.7	6310	7599	1231	25565
Terbuthylazin, hydroxy-	POS	6.1	13.4	12.5	6.8	477633	586782	435727	4456676
Tri-(2-chloroisopropyl) phosphate	POS	9.0	16.6	11.7	1.7	611562	1122968	42427	10853
12 BAC (Benzylidimethyldodecyl-ammonium chloride)	POS	10.6	18.0	14.2	4.5	484324	695949	38415	47861184
1,2,4-Triazol	POS				2.7				1876

Trinity-P1 kolonnen kræver en meget høj bufferkoncentration, som kunne give udfordringer med instrumentet og reproducerbarheden af injektioner.

Ingen af de undersøgte RP kolonner kunne effektivt tilbageholde de mest polære stoffer. Under de anvendte forsøgsbetingelser (gradient, solventer, temperatur mv.) var HSS-T3-kolonnen ikke optimal, hvilket især ses ved melamin og sulfanylsyre. Som illustreret i FIGUR 4

var retentionen af disse stoffer markant bedre med Trinity-P1 (mixed-mode) og BEH-NH₂ (HILIC).



FIGUR 4. Kromatografi for kolonner ved analyse af melamin (positiv mode) og sulfanylsyre (negativ mode).

Som forventet viste resultaterne, at ingen enkelt kolonnetype ville give tilstrækkelig bred analytisk dækning til screening af, grund- og drikkevandsprøver. RP og HILIC synes komplementære og synes tilsammen at give en bredere kromatografisk dækning.

Som RP kolonne blev valgt Intensity Solo og den eksisterende metode udviklet af Bruker Corporation (Target Screener), fordi ingen af de andre testede RP kolonner viste bedre analytiske egenskaber og fordi metoden på projekttidspunktet allerede blev anvendt som standardmetode til HRMS-analyser på andre laboratorier (i Danmark bl.a. hos Eurofins og GEUS).

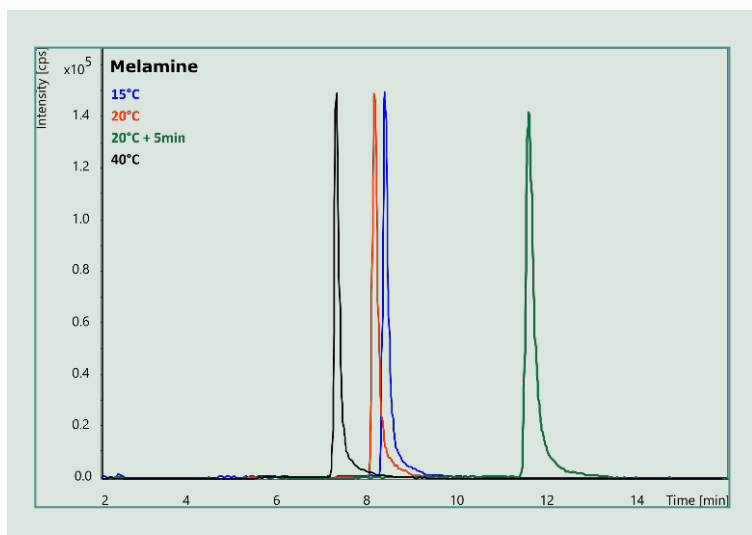
Projektets fokus blev lagt på at optimere og validere HILIC-metoden, mens det blev besluttet ikke at videreudvikle RP metoden yderligere. Videre arbejde med optimering af RP kromatografien er ført videre i det innovationsfundsstøttede projekt AQUAPLEXUS.

7.4 Udvikling af HILIC-metode

Nedenstående beskrives de yderligere forsøg, der er lavet på optimering af HILIC metoden.

7.4.1 Temperatur/Gradient

For at øge retentionen på den anvendte HILIC-kolonne (BEH-NH₂) blev der udført yderligere forsøg med lavere kolonnetemperaturer (20 °C og 15 °C). Derudover blev effekten af en isokratisk fase på 5 minutter i starten af kørslen evalueret.



FIGUR 5. Effekt af kolonnetemperatur og 5 minutters isokratisk start på retentionen af melamin (detekteret med ESI i positiv tilstand).

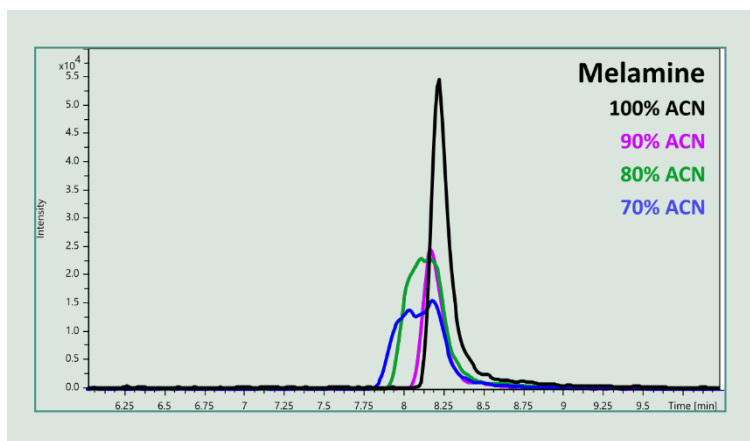
Resultaterne viste, at hverken sænkning af kolonnetemperaturen fra 20 °C til 15 °C eller en forlænget isokratisk start havde væsentlig effekt på retentionen – særligt ikke for tidligt eluende forbindelser. I tilfældet med melamin (FIGUR 5) kunne en mindre stigning i retention observeres ved lavere temperatur, men forskellen var marginal. Til gengæld medførte en sænkning af temperaturen til 15 °C en markant forøgelse af kolonnens modtryk, hvilket ikke kunne retfærdiggøres ud fra den begrænsede forbedring i kromatografi.

Tilsvarende havde en 5 minutters isokratisk start minimal effekt på retention og peakform for flertallet af de undersøgte forbindelser. For melamin blev der desuden observeret en let topbredning. På den baggrund blev den endelige metode fastholdt med en 2 minutters isokratisk start (Bilag 6.4).

7.4.2 Injektionssolvent

Valget af solvent til prøverne skal både tage højde for prøveforberedelsen samt det kromatografiske setup. For HILIC blev de indledende analyser udført med en standardopløsning bestående af ren acetonitril som solvent. Da prøveforberedelsen i praksis kan resultere i varierende vandindhold i prøven, blev effekten af stigende vandindhold (0–60 % v/v vand i acetonitril) undersøgt. Der blev anvendt en injektionsvolumen på 50 µL og en analytkoncentration på 10 µg/L (FIGUR 6).

Resultaterne viste, at selv lave koncentrationer af vand i prøven havde en markant negativ effekt på den kromatografiske separation. Specifikt blev der observeret bredere toppe og reduceret topintensitet med stigende vandindhold, hvilket indikerer forringet opløselighed og/eller lavere interaktion med den stationære fase. Et vandindhold på op til 10 % v/v blev vurderet som acceptabelt. Højere koncentrationer medførte væsentlig kromatografisk forringelse.

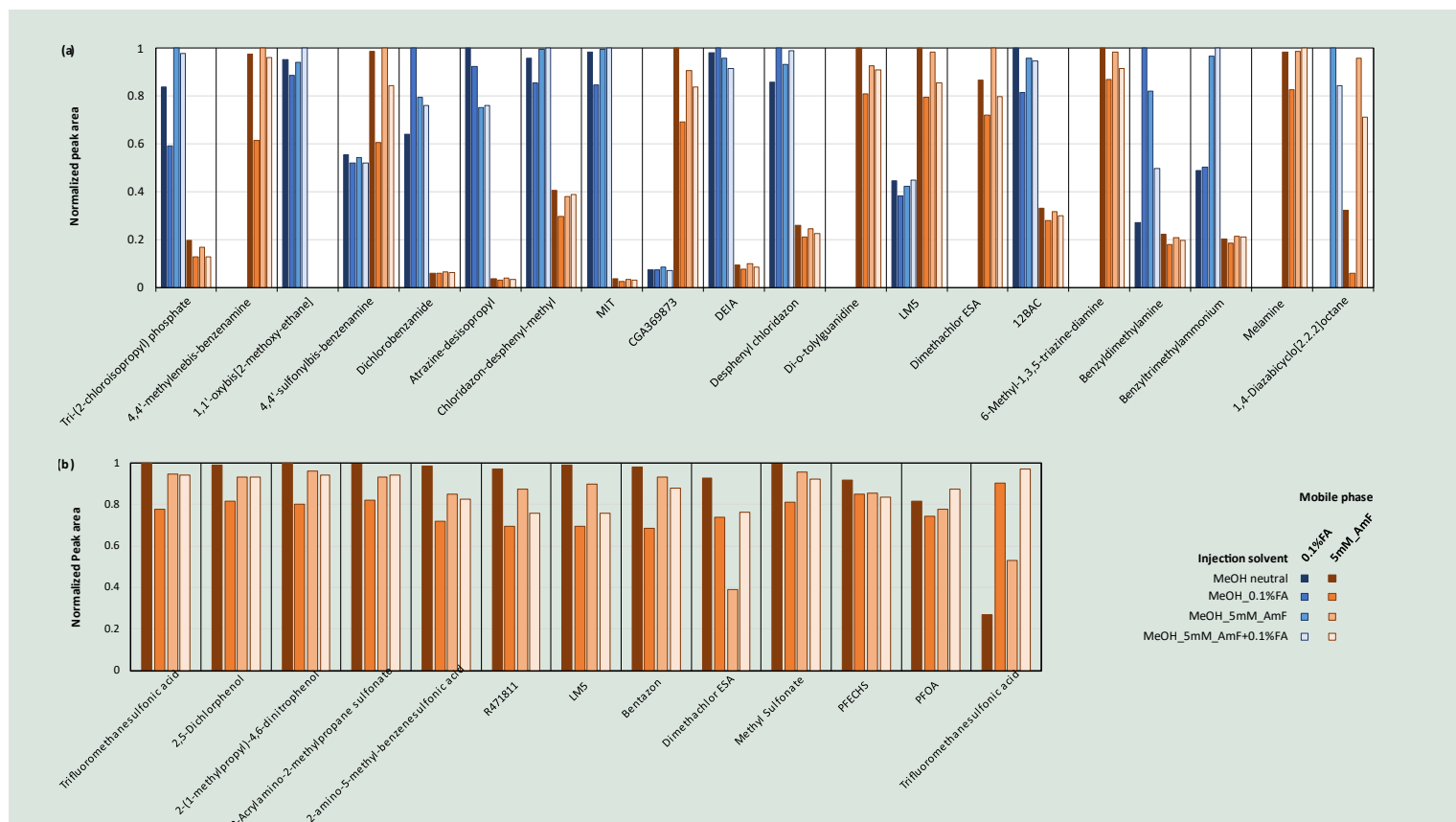


FIGUR 6. Effekt af vandindhold i prøven illustreret med melamin som modelstof. Data sammenligner en prøve i 100 % acetonitril med prøver i fortyndinger ned til 70 % acetonitril (30 % vand).

7.4.3 Effekt af pH i injektionsopløsning og mobilfase

Der blev foretaget yderligere undersøgelser af, hvordan variation i pH-niveauet i henholdsvis injektionsopløsningen og mobilfasen påvirker den chromatografiske performance. pH-værdien blev justeret i injektionsopløsningen ved hjælp af forskellige buffere og additiver, som angivet nedenfor, mens mobilfasen bestod af ACN/H₂O med hhv. 0.1% myresyre eller 5 mM ammoniumformat.

- 1: pH 3,24: 0,1 % myresyre (MeOH_0.1%FA)
- 2: pH 3,62: 0,1 % myresyre + 5 mM ammoniumformat (MeOH_5mM_AmF+0.1%FA)
- 3: pH 7,71: 5 mM ammoniumformat (MeOH_5mM_AmF)
- 4: Samt kontrol uden buffer (vand eller methanol) (MeOH neutral)



FIGUR 7. Målt respons for udvalgte forbindelser (målt i a) ESI+ og b) ESI-) i fire forskellige pH-miljøer (neutral, 0,1 % myresyre, 5 mM ammoniumformat og 0,1 % myresyre + 5 mM ammoniumformat), normaliseret til det højeste signal, testet med to forskellige mobilfaser: 0,1 % myresyre eller 5 mM ammoniumformat i vand/ACN. Elueringsrækkefølge følger HILIC elueringen fra først til sidst.

Som det fremgår af FIGUR 7, har pH-værdien i injektionsopløsningen en markant indflydelse på signalintensiteten. Det samme gælder pH-værdien af mobilfasen, hvor der er markant færre stoffer detekteret, hvis pH værdien sænkes. Den højeste peak-respons i kombination med så mange detektioner som muligt på tværs af standardstofsættet og dermed den bedste analytiske sensitivitet blev opnået ved anvendelse af injektionssolvens justeret til pH 7,71 med 5 mM ammoniumformat, i kombination med en mobilfase indeholdende samme buffer. Alternativet ville være at bruge injektionssolvent uden buffer i kombination med mobilfasen med 5 mM ammoniumformat. Dette tyder på, at højere pH fremmer ionisering og/eller interaktion med den stationære fase under de givne HILIC- betingelser.

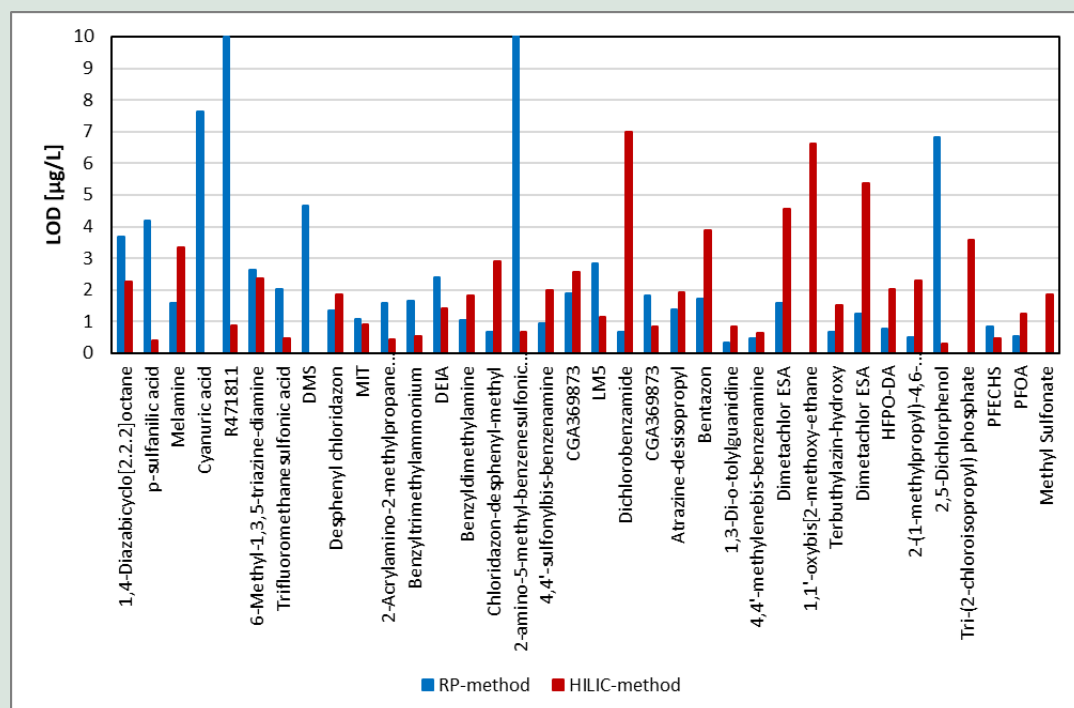
7.4.4 Instrumentel detektionsgrænse – sammenligning mellem RP og HILIC

Som en indledende vurdering af metodernes detektionsgrænse (Limit of Detection, LOD), blev der udført kalibreringer i både organiske og vandige matricer – herunder LC-grade vand, hanevand, grundvand og methanol. Detektionsgrænserne blev beregnet ud fra kalibreringskurver i koncentrationsintervallet 0,1–100 µg/L, baseret på følgende formel:

$$\text{LOD} = \frac{3 * \sigma_{\text{intercept}}}{\text{hældning}}$$

$\sigma_{\text{intercept}}$ er standardfejlen for skæringspunktet med y-aksen.

FIGUR 8 viser instrumentelle detektionsgrænser for de undersøgte stoffer opløst i methanol ved hhv. RP- og HILIC-separation. Generelt lå LOD-værdierne under 4 µg/L for størstedelen af stofferne, når der blev injiceret fra organiske opløsningsmidler (methanol).



FIGUR 8. Instrumentelle detektionsgrænser (LOD) for RP- og HILIC-metoderne ved injektion af standarder i methanol (0,1–100 µg/L, injektionsvolumen 2 µL).

Som forventet forværres den kromatografiske kvalitet med stigende detektionsgrænser til følge, når vandige opløsninger anvendes ved HILIC, selv ved reduceret injektionsvolumen (2 µL kontra 50 µL anvendt i tidligere forsøg, jf. afsnittet Injektionssolvent).

Særligt hanevand viste sig at påvirke signalerne negativt, hvilket formodentlig skyldes høje mineralindhold, der kan påvirke både ionisering og kolonneinteraktion.

For at opnå projektets målsætning om detektion i reelle prøver ved koncentrationer under 0,1 µg/L – og gerne ned til 0,01 µg/L – vil det som det fremgår være nødvendigt med en opkoncentreringsfaktor på minimum 100 i prøveforberedelsen.

7.5 Overførsel af det kromatografiske setup

Arbejdet med udvikling og optimering af analysemetoden blev foretaget af GEUS og resulterede i en kombination af LC-RP med Intensity Solo kolonne (1,8 C18-2, 2.1x100mm, Bruker Daltonics) og LC-HILIC med Acquity BEH-NH2 Amide kolonne (1,7µm, 2.1 x 100 mm kolonne, Waters).

De kromatografiske metoder blev herefter overført til Eurofins for dels at undersøge performance ved overførsel til et andet udstyr, dels mulighed for skalering i et kommercielt set.up.

Metoden for RP analyse krævede ikke yderligere optimering, da den allerede var implementeret.

HILIC metoden derimod gav betydelige udfordringer, da det viste sig at metoden ikke direkte kunne overføres på trods af at de anvendte LC-HRMS systemer er fra samme leverandør. Den eneste forskel på de anvendte apparater er således ionkilden, som viste sig at have større indflydelse end først antaget.

Der blev generelt observeret betydeligt lavere sensitivitet, og flere stoffer kunne slet ikke detekteres efter overførsel. Metoden synes også generelt mere følsom over for selv små afvigelser i set up.

For at identificere årsagen til disse forskelle blev der gennemført en systematisk gennemgang af metodeparametre, inklusive apparatopsætning, mobilfaser og kolonne. Eurofins' HILIC-kolonne blev testet på GEUS udstyr, hvor den viste tilsvarende resultater som GEUS kolonnen, hvilket udelukkede kolonnen som årsag. Analysedata optaget hos Eurofins viste ingen ændringer, når de blev analyseret af GEUS, hvilket udelukkede forskelle i databehandling som årsag til afvigelserne.

For at afgøre, om de observerede forskelle skyldtes LC- eller MS-delen, blev ioniseringen af to udvalgte stoffer testet ved direkte infusion ind i massespektrometret. Testen bekræftede, at forskellen i sensitivitet skyldtes MS-delen, specifikt ionkilden. Da sensitiviteten ved RP-metoden samtidig var lige så god eller bedre hos Eurofins end hos GEUS, blev det konkluderet, at MS-instrumentet generelt fungerede korrekt, men at ionkilden krævede metode-specifik optimering til HILIC.

Ionkildeparametrene blev derfor optimeret hos Eurofins. Optimeringen blev først udført ved direkte infusion af en 20 ppb-opløsning af methyl-isothiazolinone (MIT) i HILIC-mobilfaser. Forskellige parametre blev undersøgt, herunder nebulizer pressure, capillary voltage, dry gas temperature og probe gas temperature. Især justering af nebulizer pressure og capillary voltage viste stor effekt på signalintensiteten. De optimerede parametre fremgår af TABEL 4.

TABEL 4. Startbetingelser og optimerede ESI parametre ved Eurofins.

Ionkildeparameter	Startbetingelser	Optimerede HILIC betingelser
End Plate Offset	500 V	500 V
Capillary Voltage	4500 V	2000 V
Nebulizer	2.5 bar	3.1 bar
Dry Gas Flow	10 mL/min	10 mL/min
Dry Gas Temp	250 °C	250 °C
Probe Gas Temp	350 °C	400 °C
Probe Gas	4.0 mL/min	4.0 mL/min
Exhaust:	ON	ON

Herefter blev den optimerede metode testet på et indledende STDmix med HILIC-kolonnen, hvor parametrenes samlede effekt på signalresponsen blev evalueret for de forskellige stoffer (TABEL 5).

Som det ses, resulterede optimeringen i markant øget signalintensitet for en række komponenter, selvom visse stoffer stadig ikke kunne detekteres tilfredsstillende. Yderligere forbedring af kromatografien blev opnået ved efterfølgende skift til nyindkøbt kolonne.

Det skal bemærkes, at tilsvarende optimeringer forventes at være nødvendige, når metoden skal implementeres på andre apparater.

TABEL 5. Målte signaler ved startbetingelser og ved optimerede HILIC betingelser målt for STDmix.

HILIC pos 10 ppb mix, ACN, 50 µL	Startbetingelse (signal)	Optimerede HILIC betingelser (signal)
1,2,4-Triazol	2844	322849
1,3-Di-o-tolylguanidine	1592975	30553794
1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane	3413197	35166964
4,4'-sulfonylbis-benzenamine	6212	32205
4,4--methylenbis-benzenamine		209128
6-Methyl-1,3,5-triazine-diamine	4260	520485
Atrazine D5	1833	3754
Atrazine-desethyl-desisopropyl		9769
Atrazine-desisopropyl		61767
BAC 12	3416262	132352584
Benzyl dimethylamine	67935	3965204
Benzyltrimethylammonium	961697	25483482
CGA369873		
Chloridazon-desphenyl-methyl		22802
Desisopropyl Atrazine-d5	3015	2271
Desphenyl chloridazon		4041
Dichlorobenzamide		
Melamine	13879	12686
MIT (methyl-isothiazolinone)		16247
N,N-Dimethylsulfamide (DMS)		4639

HILIC pos 10 ppb mix, ACN, 50 µL	Startbetingelse (signal)	Optimerede HILIC betingelser (signal)
Terbutylazine-2-hydroxy	82555	5992393
Terbutylazine-TP CSCD648241 (LM6)		24729
Terbutylazine-TP MT23 (LM5)		27970
Tri-(2-chloroisopropyl) phosphate (TCPP)	3029	2931

7.5.1 Hypercarb kolonne

Da set-uppet med HILIC-kolonnen viste sig vanskelig at overføre, blev der parallelt med de tidligere nævnte optimeringsforsøg også udført nye test med Hypercarb kolonnen mhp detektion af polære forbindelser. Tidligere erfaringer havde vist at Hypercarb kolonnen er egnet til specifikke polære forbindelser (Bollmann & Badawi, 2020)

En blanding med 8 polære forbindelser i koncentration på 50 ppb blev injiceret direkte på tre forskellige kolonnetyper: RP, HILIC og Hypercarb. For HILIC blev testet med både methanol (MeOH) og acetonitril (ACN) som opløsningsmiddel.

Kromatogrammerne gennemgået med henblik på at identificere komponenter, der gav positiv detektion (TABEL 6). Ud af de otte undersøgte stoffer kunne tre identificeres ved brug af HILIC med ACN, mens to kunne identificeres med Hypercarb-kolonnen. Den samlede forskel mellem kolonnerne var ikke stor, men der var forskel på, hvilke specifikke stoffer der kunne detekteres. Eksempelvis blev DMS kun detekteret med Hypercarb, mens melamin og cyanursyre kun blev detekteret med HILIC ACN.

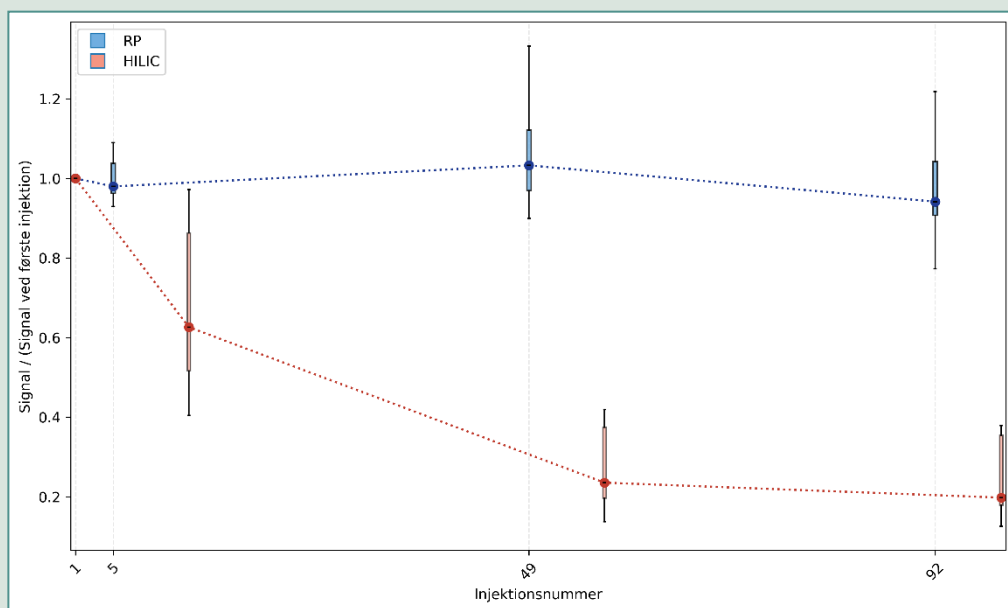
HILIC med ACN viste samlet set potentiale for detektion af flere komponenter. Da optimeringsbestræbelserne samtidigt viste at HILIC-metoden lod sig overføre til Eurofins blev det besluttet at fortsætte med HILIC ACN som analysemetode.

TABEL 6. Oversigt over detektionsresultater for udvalgte polære komponenter ved brug af forskellige kolonnetyper (RP, HILIC med ACN eller MeOH samt Hypercarb) og ioniseringsformer (positiv/negativ). "X" angiver positiv detektion.

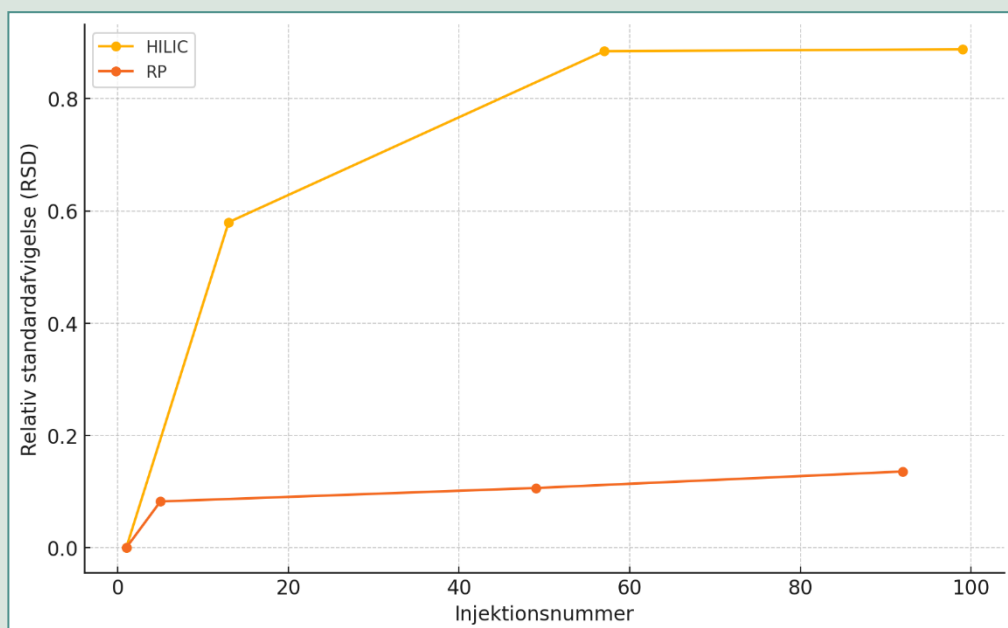
Komponent	Ionisering	RP	HILIC ACN	HILIC MeOH	Hypercarb
1,2,4-Triazol	POS		X		X
Melamin	POS		X		
DMS	POS				X
Trifluoroacetic acid	NEG	X			
R471811	NEG				
2,4+2,5-Dichlorphenol	NEG	X			
Cyanuric acid	NEG		X		
PFECHS	NEG				

7.6 Undersøgelse af repeterbarheden ved gentagne injektioner

Signalstabiliteten af RP og HILIC blev testet ved 100 gentagne injektioner af spiked standard. For hver kolonne blev signalet fra flere repræsentative målestoffer normaliseret til den første injektion. Middelintensitet og RSD pr. injektion blev beregnet mhp. vurdering af drift (FIGUR 9), derudover blev der foretaget en beregning af spredning mellem analyter til evaluering af hvor forskelligt analytterne opfører sig (FIGUR 10).



FIGUR 9. Repetérbarhed af RP og HILIC.



FIGUR 10. Spredningen for henholdsvis HILIC og RP.

Resultaterne viser tydeligt, at signalerne ved RP er væsentligt mere stabilt end signalerne ved HILIC, som falder betydeligt igennem sekvensen (FIGUR 9). For RP ligger medianen af målingerne inden for 10 % af signalet fra første injektion gennem hele sekvensen, mens signalet for HILIC falder med mere end 70 % fra første til injektion nummer 54.

Samtidig stiger den relative standardafvigelse markant mere for HILIC end for RP, hvor værdien aldrig overstiger 0,2. Dette indikerer, at analyterne ved HILIC påvirkes forskelligt af signalfaldet.

igennem sekvensen. Hvis påvirkningen havde været ens for alle analytter, ville det være betydeligt lettere at korrigere for de observerede signalvariationer.

Langtidsholdbar signalrespons er afgørende, når man analyserer store prøveserier, som det vil være nødvendigt at gøre for at kommercialisere og holde prisen på analysen nede. Drift reducerer den reelle sensitivitet, mens stigende og faldende varians gør intern standard-korrektion vanskelig.

I praksis kan problemerne med stabilitet muligvis løses/begrænses ved (1) længere rekalkibrering af kolonnen, (2) regelmæssig kolonneregeneration med vand og isopropanol-skyl, (3) mindre batchstørrelser med hyppige QC- og interne standard-kontroller samt (4) eventuelt valg af mere robust amid- eller diol-baseret HILIC-fase.

Resultaterne bekræfter RP metodens robusthed og velegnethed i et kommercielt set-up. Resultaterne viser også, at HILIC-metoden på trods af de opnåede resultater ved optimering er mindre robust og med fordel kan optimeres yderligere inden udrulning til et kommercielt set-up.

7.7 Sammenfatning

Kombinationen af flere kromatografiske set-up viste sig nødvendig for at dække de valgte teststoffer og dermed det kemiske rum, som er skønnet relevant for metoden. En metode, som kombinerer RP- og HILIC-kolonner, viste sig nødvendig for at opnå analytisk dækning for de valgte teststoffer.

Af de 38 undersøgte stoffer kunne størstedelen detekteres med acceptabel følsomhed ($LOD \leq 1 \mu g/L$), men enkelte stoffer (DMS og melamin i HILIC-mode) udgjorde problemer,

Forsøgene viste også at opkoncentrering er nødvendig for de fleste af de valgte stoffer for at opnå den ønskede detektionsgrænse ($0,1 \mu g/L$ eller lavere). Som forventet er det de små meget polære stoffer, som er udfordringen.

Metodeoptimeringen viste, at HILIC-metoden krævede betydelig justering ved overførsel mellem laboratorier. Det kan skyldes forskelle i MS-ionkilden eller at samme ionkilde kan have forskellig optimal setting i forskellige apparater. Forsøgene viste også, at metodeforbedringer af HILIC-metoden for at øge robusthed og stabilitet er ønskværdige og nødvendige.

8. Prøveforberedelse og opkoncentrering

Metodeindkøringen viste, at de analytiske metoders detektionsgrænse nødvendiggør prøveforberedelse forud for analyse for at kunne nå de ønskede detektionsgrænser i de aktuelle prøvetyper (grundvand og drikkevand).

I de følgende afsnit beskrives de forsøg, der er udført i forbindelse med prøveforberedelse i projektet. Det blev besluttet at undersøge både SPE og VEC. De første afsnit nedenfor fokuserer på arbejdet med SPE. Sidst i kapitlet sammenlignes den optimerede SPE-metode med vakuum-inddampning.

8.1 Valg af fastfase til SPE

Baseret på litteraturstudiet (se afsnit 6.3) blev det vurderet relevant at teste flere forskellige SPE-materialer, herunder Supelclean ENVI-Carb Plus, WCX, WAX samt mixed-bed-metoder, som kombinerer WAX og WCX med en kulstofbaseret fastfase. Desuden blev også mere generelle fastfaser som Isolute ENV+ og HLB inkluderet til sammenligning. TABEL 7 viser en oversigt over testede SPE materialer og deres karakteristika.

SPE-metodernes effektivitet blev evalueret ud fra genfinding og intensitet for 15 udvalgte teststoffer (bilag 7.1 og 7.2) med varierende fysisk-kemiske egenskaber, herunder polaritet, molekylvægt og stofklasse. Disse indledende tests blev gennemført, inden det endelige kromatografiske set-up var fastlagt. Derfor blev vurderingen baseret på stoffer, som viste tilstrækkelig kromatografisk adskillelse og detektion ved den valgte Reversed Phase (RP) metode. Som analyseinstrument blev der ved alle forsøg anvendt Bruker Impact 2 (QTOF).

SPE-kolonnerne blev loadet med 500 mL hanevand spiket med teststoffer til en koncentration på 0,4 µg/L. For at sikre effektiv eluering blev kolonnerne elueret sekventielt som følger: først methanol (4 mL), herefter acetonitril (4 mL), og til sidst 1 % ammoniakvand i methanol (25 %, 4 mL). For udvalgte kolonner blev yderligere elueret med 1 % myresyre i methanol (4 mL).

Hvert elueringsstrin blev opsamlet separat og analyseret individuelt ved RP LC-MS i både positiv og negativ ioniseringsmode. Alle kolonner blev testet i duplikat, og for hver kolonne blev en enkelt blindprøve (500 mL ikke-spiket hanevand) medtaget til kontrol af baggrundskontaminering.

Resultaterne for analysen i positiv mode er præsenteret i FIGUR 11 og i Bilag 7.3. Ved analysen i negativ mode var der betydelige blindværdier for nogle stoffer, hvilket vanskeliggjorde en præcis vurdering af genfindingen (se bilag 7.4). Derfor blev kolonnerne primært vurderet ud fra resultaterne i positiv mode med henblik på senere evaluering af stoffer, der ioniserer optimalt i negativ mode.

TABEL 7. Oversigt over testede SPE-kolonner i den indledende screening.

Kolonner	Navn	Info
A	WCX	Oasis WCX, 6 cc Vac Cartridge, 150 mg Sorbent per Cartridge, 30 µm

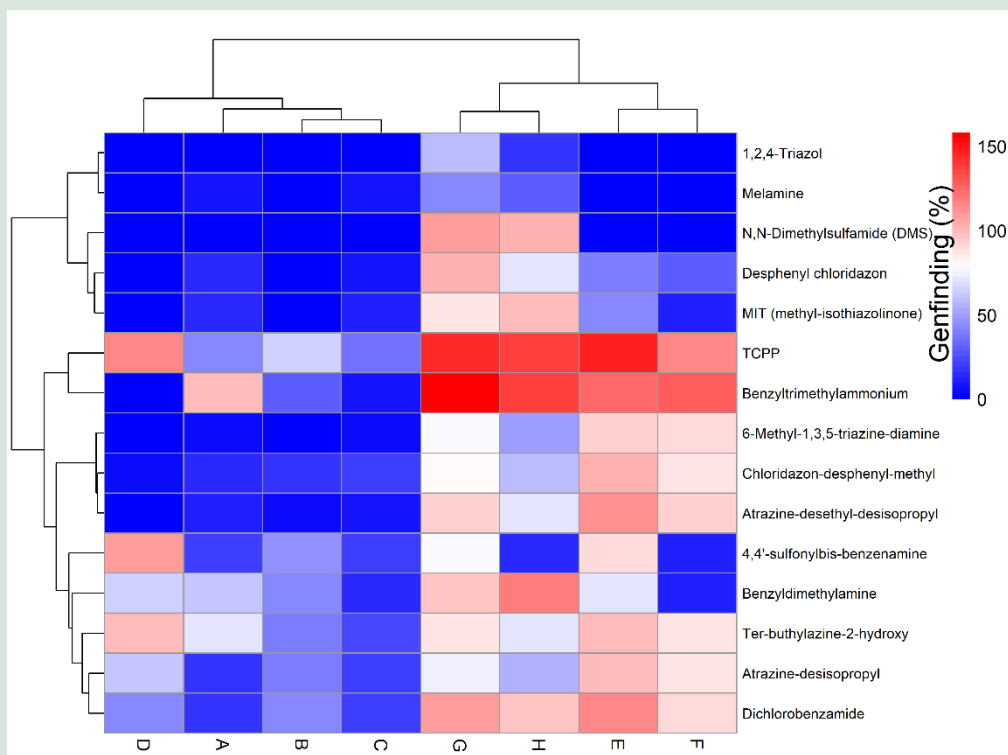
Kolonner	Navn	Info
B	HLB	Oasis HLB 6 cc Vac Cartridge, 200 mg Sorbent per Cartridge, 30 µm
C	isoluteENV+	ISOLUTE ENV+ 200 mg/6 mL (Biotage Part No. 915-0020-C
D	WAX	Bond Elut PFAS WAX, 150 mg, 6 mL
E	Mix	<u>Nederste lag</u> : ENVI-Carb (200 mg; Merck Darmstadt, Germany), <u>Øverste lag</u> : Blanding (560 mg (± 10 mg); ratio 1:1:0.8) af Oasis Weak Anion Exchange (WAX), Cationic Exchange (WCX) (Waters, Taastrup, Denmark) og Isolute ENV+ (Biotage Uppsala, Sweden
F	Supelclean™ ENVI-Carb	Supelclean™ ENVI-Carb™ SPE Tube, 500 mg/6 mL
G	Supelclean™ ENVI-Carb Plus	Supelclean™ ENVI-Carb™ Plus SPE Tube, reversible Tube, bed wt. 400 mg, volume 1 mL (Supelco. Merch). Ingen syrer tilsat prøverne inden SPE.
H	Supelclean™ ENVI-Carb Plus	ENVI-Carb plus (with acid): Supelclean™ ENVI-Carb™ Plus SPE Tube, reversible Tube, bed wt. 400 mg, volume 1 mL (Supelco. Merch). 1 ml Myresyre per halve liter vand blev tilsat prøverne inden SPE. Høj baggrund for BAC 12 gør at de høje værdier ikke afspejler den reelle genfinding

FIGUR 11 indeholder en hierarkisk gruppering af analyter og kolonner. Den hierarkiske gruppering afslører først og fremmest to tydelige grupper af SPE-kolonner: en høj-genfindings-gruppe bestående af de kul-baserede sorbenter (E, F, G og H) og en lav-genfindings-gruppe med ion-bytter- og polymerkolonnerne (A–D). Inden for kul-gruppen danner G og H den tætteste underklynge. Mixedbed-kolonnen (E) ligger tæt på ren ENVI-Carb (F), men dens WAX/WCX-lag giver lidt bedre fastholdelse af de stærkt polære og ladede forbindelser. I den anden hovedgren klumper WCX, HLB og ENV+ tæt sammen, mens WAX skiller sig en smule ud, fordi den selektivt giver høje genfindinger for visse anioniske eller aromatiske stoffer som TCP, dichlorobenzamide og 4,4'-sulfonylbis-benzenamin.

Ser man på selve forbindelserne, tegner der sig fire kemiske mønstre: (1) de meget polære triazol, melamin og DMS, fanges især af ENVI-Carb Plus, (2) de kationiske aminer fanges effektivt på både kulkolonner og WCX, (3) triazin- og fosfat-derivaterne fanges bedst på kul- og til dels WAX-sorbenten, og (4) de mere hydrofobe aromater, som primært holdes tilbage af kul- og mix-kolonnerne. Kulmaterialerne udmærker sig altså ved at favne hele spektret nogenlunde jævnt, mens ion-bytter-kolonnerne er mere selektive og har tydelige "blinde pletter" – WCX falder igennem på neutrale/anioniske forbindelser, og WAX udviser dårlige egenskaber for de fleste baser og for meget polære molekyler.

I praksis betyder det, at ENVI-Carb Plus uden syre (G) viste sig at være den bedst egnede individuelle SPE-kolonne til bred screening med syre-varianten (H) som supplement, hvis man vil maksimere genfindingen af specifikke stoffer. Mix-kolonnen (E) er et brugbart kompromis, hvis man ønsker lidt forbedret tilbageholdelse af ladede forbindelser uden at miste de hydrofobe stoffer. Ionbytterkolonnerne synes mindre velegnede til brede screeninger.

ENVI-Carb Plus har den fordel for senere kommerialisering af metoden, at kolonnerne er kommercielt fremstillet og ikke skal pakkes manuelt, som det er tilfældet med Mix. Derfor blev Supelclean™ ENVI-Carb™ Plus udvalgt som den bedste kandidat og medtaget i videre optimering.



FIGUR 11. Heatmap over genfindning (%) for 15 udvalgte teststoffer ved anvendelse af forskellige SPE-kolonner (A-H i TABEL 7) i positiv ion-mode. Farveskalaen angiver genfindning i procent uden korrektion for baggrund. Data er baseret på analyse af 500 mL hanevand spiket til 0,4 µg/L.

8.2 Optimering af eluering og indampning

For at optimere elueringen af de forbindelser, der tilbageholdes på SPE-kolonnen, blev der udført et sammenlignende forsøg med forskellige eluenter. Base/syre forholdet i eluenten blev forøget fra 1% til 5% da et indhold på 5% er anvendt i litteraturen for denne kolonne (Bollmann & Badawi, 2020). Fire Supelclean™ ENVI-Carb™ Plus-kolonner blev loadet og elueret med hver sin eluent: (i) 5 % ammoniakvand (25 %) i MeOH, (ii) 5 % myresyre i MeOH, (iii) 5 % ammoniumformat i ACN og (iv) 5 % myresyre i ACN. For alle eluenter blev anvendt 4 ml. Eluenterne blev opsamlet i 2 mL-fraktioner. Fra hver fraktion blev 1 mL udtaget, tilsat intern standard og analyseret med RP-metoden i positiv ionisering. Resultater for genfindning fremgår af bilag 7.6.

For de fleste analytter uanset eluent lå > 70 % af den samlede genfindning allerede i de første 2 mL. Methanol gav generelt en hurtigere eluering (mindre tailing) end ACN; Det stationære niveau blev nået ved mindre volumen, og den maksimale genfindning indtraf tidligere.

Som forventet kræves både sur og basisk eluent for effektiv eluering af hele stofpanelet. Et ekstremt tilfælde var 4,4'-sulfonylbis-benzenamin, hvor sur eluering med myresyre/ACN kun gav 1 % genfindning, mens f.eks. methyl-desphenylchloridazon eluerede hurtigere under sure betingelser. Analytter, der måles i negativ ionisering, forventes generelt at eluere bedst med syretilsætning. Valget af solvent var også afgørende. ACN gav således samlet set den bedste eluering for flest komponenter, selv om MeOH ofte gav en hurtigere frigivelse fra kolonnematerialet.

De valgte betingelser blev efterfølgende testet jf. bilag 7.7. 500 mL hanevand blev spiket til 0,4 µg/L, opkoncentreret ved SPE (Supelclean™ ENVI-Carb™ Plus) og elueret sekventielt med 3 mL 5 % ammoniakvand i ACN efterfulgt af 3 mL 5 % myresyre i ACN. Eluenterne blev samlet, 1 mL udtaget, tilsat intern standard og analyseret. Forsøget blev udført som dobbeltbestemmelse (forsøg 1 og 2) og én blindprøve. Genfindinger, opgjort mod en 50 ppb standard uden SPE-oprensning, fremgår af TABEL 8 og TABEL 9.

TABEL 8. Genfindinger (dobbelbestemmelse) i procent for SPE-eluat efter eluering med først 3 mL 5 % ammoniakvand (25 %) i ACN efterfulgt af 3 mL 5 % myresyre i ACN. Genfindingerne er beregnet ud fra en 50 ppb standard i MeOH og analyseret ved reversed-phase LC i positiv mode.

Stof	Forsøg 1 (%)	Forsøg 2 (%)	Blind
1,2,4-Triazol	27	36	0
BAC 12	94	87	20
Benzyldimethylamin	94	99	0
Methyl-desphenylchloridazon	94	97	0
Melamin			
TCPP	127	127	26
Benzyldimethylammonium	110	113	0
4,4' sulfonylbis-benzenamin	85	88	0
6-Methyl-1,3,5-triazine-diamin	50	53	0
Atrazine-desethyl-desisopropyl	98	114	0
Atrazine-desisopropyl	81	86	0
Desphenylchloridazon	96	107	0
Dichlorobenzamid	107	112	0
MIT	52	48	0
DMS	103	87	0
Terbutylazine-2-hydroxy	54	48	0

TABEL 9. Genfindinger (%) for SPE-eluat efter eluering med først 3 mL 5 % ammoniakvand (25 %) i ACN efterfulgt af 3 mL 5 % myresyre i ACN. Genfindingerne er beregnet ud fra en 50 ppb standard i MeOH og analyseret ved reversed-phase LC i negativ mode.

Stof	Forsøg 1 (%)	Forsøg 2 (%)	Blind
2-(1-methylpropyl)-4,6-dinitrophenol	62	73	19
PFOA	112	116	0
Bentazone	113	118	0
Cyanuric acid	25	29	0
p-Sulfanilic acid	21	17	0

Metoden gav generelt god genfinding for de fleste forbindelser, der kunne vurderes med det anvendte kromatografiske set-up. Terbutylazine-2-hydroxy (16) eluerede dog generelt langsomt fra SPE-kolonnen (bilag 7.6); genfindingen kan muligvis øges med større elueringsvolumener eller ved at kombinere med flere SPE fastfaser i serie (fx WAX). Da

kolonnen ikke køres tør mellem eluenterne blev det vurderet at det var tilrådeligt med et elueringsstrin med ren ACN imellem elueringen med base og syre. Dette blev gjort for at minimere risikoen for udfældning af salte på SPE kolonnen, og for at sikre at basen ikke neutralisere syren i det sidste elueringsstrin. Da det også blev vurderet at større elueringsvoluminer ville forbedre elueringen for nogle komponenter (f.eks. Terbutylazine-2-hydroxy). Blev den endelige elueringsprocedure 4 mL 5 % ammoniakvand (25 %) i ACN efterfulgt af 2 mL ACN og 4 mL 5 % myresyre i ACN.

8.2.1 Inddampning

For at muliggøre højere opkoncentrering blev effekten af nitrogeninddampning undersøgt. Opløsninger af teststoffer i MeOH og ACN blev inddampet ved 30 °C under N₂ til hhv. tørhed, 1 mL eller næsten tørhed (én dråbe) og sammenlignet med ikke-inddampede opløsninger (bilag 7.9). Inddampning til tørhed gav lavere genfindning for enkelte stoffer, mens der ikke sås betydelige tab ved inddampning til 1 mL eller én dråbe. Ved stop ved 1 mL lå genfindingen for hovedparten af de 15 vurderede analyter (melamin udeladt pga. kromatografi) i intervallet ~85–115 % med god reproducerbarhed mellem replikater. "1 dråbe" gav for de fleste analyter niveauer sammenlignelige med 1 mL (fx benzyldimethylammonium ~115 %, 4,4'-sulfonylbis-benzenamin ~103 %, atrazin-afledte ~100–104 %). To aminer skilte sig ud med lavere genfindning ved "1 dråbe": benzyldimethylamin (61 %) og MIT (78 %). Det blev derfor besluttet fremover at inddampe til 1 mL efter SPE. Metodisk er det mest sikkert at stoppe inddampningen ved ~1 mL og genopløse til 1 mL ved behov. "1 dråbe" kan anvendes for de fleste forbindelser, men frarådes da det kan medføre høj variation grundet uklar definition af stoppunkt ("1 dråbe").

8.3 Evaluering af nye SPE kolonner

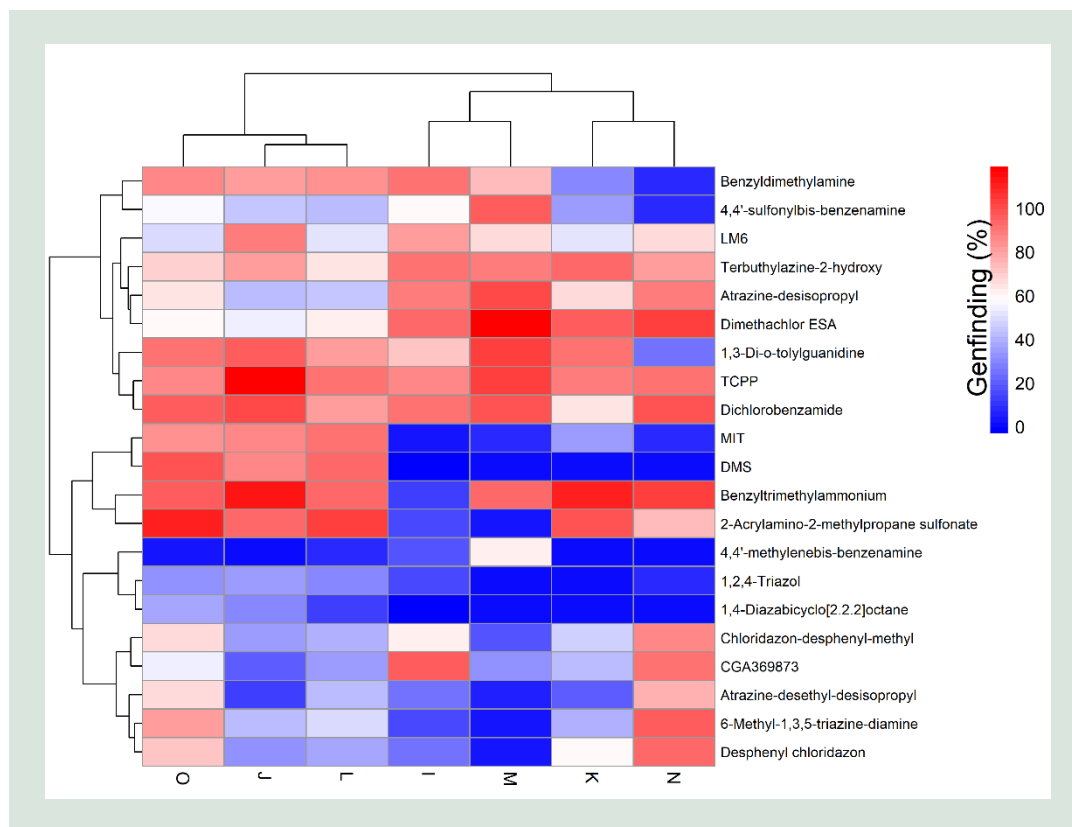
Da SPE-metoden var fastlagt, og kun den afsluttende optimering manglede, opstod der imidlertid problemer i form af usikre leverancer med særdeles lange leveringstider (måneder) for de valgte SPE-kolonner. Leverandøren var ikke i stand til at stille sikre leverancer med reducerede leveringstider i udsigt, og da der kun fandtes én leverandør af den pågældende kolonne, blev det vurderet uhensigtsmæssigt at basere den endelige metode udelukkende på disse specifikke SPE-kolonner.

Da ingen af de øvrige afprøvede SPE-kolonner havde vist sig effektive til opkoncentrering af DMS og 1,2,4-triazol i det valgte set-up, blev de besluttet at søge efter alternativer. Der blev derfor foretaget en fornyet litteratursøgning, ligesom forskellige leverandører af SPE-materialer blev kontaktet. Resultatet af denne undersøgelse var, at seks SPE-kolonner blev udvalgt og efterfølgende evalueret i en ny indledende screeningsundersøgelse.

TABEL 10. SPE kolonner medtaget i indledende screening i runde 2.

I	Strata PFAS(GCB/WAX), 50mg/200mg/6mL (Phenomenex)
J	Strata activated carbon (400 mg/1cc) (Phenomenex)
K	Cleanert PestiCarb/NH ₂ , 300mg/500mg/6mL (Phenomenex)
L	Sep-Pak AC2 Plus Short Cartridge, 400 mg, 85 µm (Waters)
M	Sep-Pak Vac 6cc (500 mg) PS-2 (Waters)
N	Strata GCB, 500mg/6mL (Phenomenex)
O	Supelclean ENVI-Carb plus (sigma) – til sammenligning

Kolonnerne blev udvalgt med henblik på lighed med Supelclean ENVI-Carb plus samt generel anvendelighed over for små polære forbindelser. Enkelte kolonner kombinerer en kulsorbent med WAX, hvilket potentielt giver bedre genfinding af komponenter som ioniserer bedst i negativ mode. Kolonnerne blev testet efter metoden beskrevet i bilag 7.11 med analyse vha. RP-metoden. Resultaterne fremgår af FIGUR 12 og i bilag 7.3, for positiv ionisering og bilag 7.4 for negativ ionisering.



FIGUR 12. Genfinding for nye SPE kolonner RP POS. Bogstaverne henviser til kolonner nævnt i TABEL 10.

Overordnet set er der en del af de moderat polære stoffer, hvor alle kolonnerne performer godt, dvs. udviser høj genfinding. Carbonbaserede kolonner (O, J, L og N) udviser meget ens genfinding. Forskellene mellem kolonne J og L versus N og O er porøsitet, idet J og L er porøse kolonnematerialer, mens N og O er non-porøse materialer. Ionbytter-kolonner (I, K) udviser genfinding på samme niveau. Kolonne I adskiller sig dog en smule grundet forskelle i kation-retention. Kolonne M (PS-2) adskiller sig fra de øvrige grundet det er en ren hydrofob reversed-phase.kolonne.

Kun de rene carbonbaserede kolonner (O, J, L) var i stand til at tilbageholde de små meget polære analytter: 1,2,4-triazol, dimethyl sulfide (DMS), 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane og methyl-isothiazolinone (MIT). DMS elueres fuldt fra ENVI-Carb (O) og AC2 (L) (98 % / 93 % genfinding). For den rene kulkolonne Strata GCB (N) ses ingen genfinding. Det skyldes enten at den binder så effektivt, at stofferne ikke kan elueres igen eller at tilbageholdelsen er minimal. 1,2,4-triazol viste sig generelt meget vanskelig. Højeste genfinding var 36 % (kolonne J). Det afspejler, at selv kul ikke er helt tilstrækkelig for dette stof.

For Strata PFAS (I) observeredes lav genfinding af positivt ladede stoffer som benzyltrimethylammonium, grundet elektrostatisk frastødning kombineret med en begrænset

mængde GCB (50 mg). Denne kolonne synes derfor mindre egnet til brede screeninger. Cleanert PestiCarb/NH₂ (K), der ligeledes indeholder både WAX og GCB, har større sorbentmængde og klarer derfor kationiske forbindelser som benzyltrimethylammonium bedre, da elektrostatiske effekter her reduceres. Ingen af disse kolonner (I og K) viste sig dog effektive til meget polære forbindelser som DMS og triazol. Overordnet set performer andre kolonner bedre for en bred vifte af analytter og I og K fravælges derfor til en bred screeningsmetode.

PS-2 (M) er en ren hydrofob polystyren-divinylbenzen-matrix, hvilket giver høje genfindinger (ca. 90-120 %) for moderat polære analytter, såsom TCPP, benzyltrimethylammonium, dichlorobenzamid og Dimethachlor-ESA. Dog har den også problemer for meget polære/ioniske stoffer, hvor pi-planaritet eller ionbytte egenskaber mangler, fx triazol, DMS, atrazine-desethyl-desisopropyl og desphenyl-chloridazon. PS-2 er derfor ikke egnet som eneste kolonne ved bred screening, men oplagt til analyser af mere hydrofobe eller middelpolære pesticider.

Ud fra disse resultater blev det besluttet at gå videre med Strata activated carbon (kolonne J) og Sep-Pak AC2 Plus (kolonne L). Disse SPE kolonner viste meget sammenlignelige resultater, tilbageholder de fleste stoffer og er sammenlignelige med Supelclicn ENVI-Carb plus i forhold til DMS og 1,2,4-triazol.

Senere test viste, at Sep-Pak AC2 Plus (L) havde lavere baggrunds niveauer, hvilket blev afgørende for det endelige valgt mellem de to sammenlignelige kolonner. Den endelige metode blev derfor baseret på denne kolonne.

8.4 Vakuuminddampningsforsøg

Vakuuminddampning (VEC) udgør et potentielt alternativ til fastfaseekstraktion (SPE). Der er derfor udført forsøg til at belyse fordele og ulemper ved de to metoder.

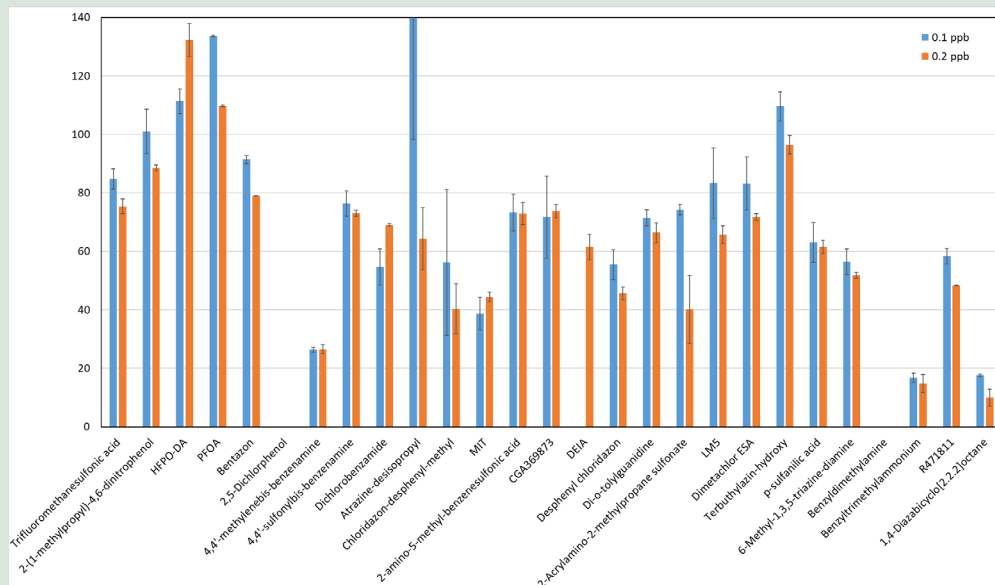
VEC-protokollen udviklet af Mechelke et al. (12) har dannet udgangspunkt for forsøgene i dette projekt. Protokollen blev modificeret, idet prøverne inddampet til tørhed og genopløst i MeOH indeholdende 5 mM ammoniumformat.

Til forsøget blev et mix indeholdende de 38 teststoffer tilsat 100 mL postevand i koncentrationer på henholdsvis 0,1 µg/L og 0,2 µg/L. Efter inddampning og genopløsning opnåedes en opkoncentreringsfaktor på 50.

Resultaterne viste, at hovedparten af forbindelserne havde en genfinding på over 60 % uafhængigt af den anvendte koncentration (FIGUR 13). Genfindingen afhang af stoffernes flygtighed. Stofferne 2,5-dichlorphenol og benzyldimethylamin blev ikke genfundet efter inddampning, da begge er letflygtige og derfor hurtigt fordamper under tørring. Stofferne 4,4'-metylenbis-benzenamin, benzyltrimethylammonium og 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octan havde genfindinger på under 30 %. Som forventet var det vanskeligt at vurdere genfindingen for TFA, TCPP og BAC-12 på grund af en meget høj baggrund. Ligeledes gav melamin og methylsulfonat for svagt signal og for høj baggrund til, at genfindingen kunne vurderes pålideligt i dette forsøg.

De største udfordringer ved opkoncentrering via inddampning (VEC) er dels matrixeffekter, dels den begrænsede opkoncentreringsfaktor: jo større inddampningsvolumenet, desto større er opkoncentreringsfaktoren, men desto større er ligeledes matrixeffekterne, da alle komponenter opkoncentreres ved VEC. Allerede ved inddampning af blot 100 mL postevand blev signalstyrken for flere stoffer markant reduceret sammenlignet med rene

standardopløsninger (10%-60%, men enkelte stoffer op til 100%). Det gør det yderst vanskeligt at opnå den nødvendige detektionsgrænse på 0,1 µg/L i analyser af grund- og drikkevand ved denne metode.



FIGUR 13. Genfinding (%) af analyter (ESI+ og ESI-) efter inddampning til tørhed og genopløsning i MeOH/5 mM ammoniumformat (50 gange opkoncentrering). Sorteret efter elueringsrækkefølge i HILIC. Errorbars angiver standardafvigelse (n = 2).

8.5 Optimering af genopløsningsmiddel

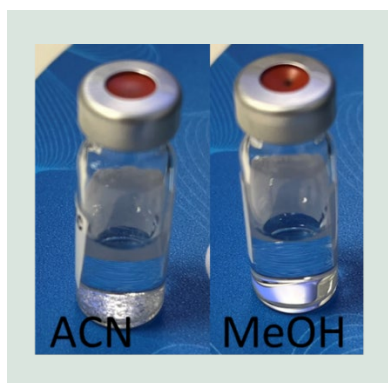
Indledende test indikerede, at valget af opløsningsmiddel ved HILIC analyserne havde markant indflydelse på resultaterne. Derfor blev det undersøgt, om et skifte fra MeOH til ACN som genopløsningsmiddel kunne forbedre den chromatografiske separationen for HILIC.

Først blev effekten af et solventskefte på den eksisterende RP-metode evalueret.

Sammenligningen viste kun en minimal forskel i de chromatografiske profiler, idet brug af ACN kun afslørede én yderligere komponent sammenlignet med MeOH. Det skal dog bemærkes, at en specifik komponent, 4,4'-metylenbis-benzenamin, kun kunne detekteres, når MeOH blev anvendt som opløsningsmiddel. Samlet set blev det vurderet, at et skifte til ACN ikke ville have en væsentlig negativ indflydelse på RP-analysen.

I de inddampede ACN--opløste prøver blev der i nogle tilfælde observeret udfældning enten straks eller efter køleopbevaring. Udfældning blev også observeret i blindprøver og stammer dermed ikke fra teststofferne (FIGUR 14). Reduktion af syre- og baseindhold (5 %, 3 % og 1 %) eliminerede ikke udfældningen. Der blev ikke observeret udfældning ved brug af MeOH eller MeOH/ACN-eluenten.

På trods af udfordringen med udfældning og den manglende detektion af én specifik komponent i RP-metoden blev det besluttet at fortsætte med ACN som det primære opløsningsmiddel. Beslutningen er baseret på den markante forbedring, ACN gav for HILIC-analysen, hvor der opnåedes en langt bedre separation og et betydeligt større antal detekterbare toppe.



FIGUR 14. Ekstrakter opløst i hhv. acetonitril (ACN) og methanol (MeOH). Prøven i ACN (venstre) viser tydelig udfældning, mens prøven i MeOH (højre) er klar.

8.6 Sammenligning af fastfaseekstraktion og vakuuminddampning

For at vurdere den analytiske performance af de to opkoncentreringsstrategier under realistiske matrixforhold blev 38 teststoffer analyseret i både hanevand og drænvand ved tre nominale koncentrationsniveauer (0,02, 0,1 og 1 µg/L). For hver vandtype indgik en matrixblind, og alle prøver blev opkoncentreret i duplikat med både VEC og den nyudviklede SPE-protokol.

Af de 38 stoffer blev fire udelukket fra sammenligningen (DMS, 1,2,4-triazol, TFA og melamin) enten fordi de ikke kunne detekteres i standarder eller fordi deres detektionegrænse var så høj, at selv en opkoncentringsfaktor på 500 ikke muliggjorde detektion. Sammenligningen omfatter således 34 teststoffer. DL er sat som tre gange signal-to-noise ratio, hvor blankprøven bruges til bestemmelse af noise.

Den udviklede SPE-metode giver en maksimal opkoncentrering på en faktor 500, mens VEC her giver en opkoncentrering på faktor 50. Derfor er det forventet, at der vil være forskel på metoderne alene af denne årsag. TABEL 11 og TABEL 12 viser antallet af stoffer ud af de 34 teststoffer der kunne detekteres ved de pågældende koncentrationer og analysemetode.

TABEL 11. Antal stoffer detekteret efter SPE opkoncentrering.

SPE	RP		Hilic		Total	
DL [µg/L]	Drænvand	Hanevand	Drænvand	Hanevand	Drænvand	Hanevand
≤ 0,02	19	19	18	22	26	28
≤ 0,1	22	23	25	27	30	30
≤ 1	25	25	28	29	31	31

TABEL 12. Antal stoffer detekteret efter VEC opkoncentrering.

VEC	RP		Hilic		Total	
DL [µg/L]	Drænvand	Hanevand	Drænvand	Hanevand	Drænvand	Hanevand

VEC	RP	Hilic	Total
≤ 0,02	16	13	19
≤ 0,1	21	18	23
≤ 1	25	20	30

På tværs af de 24 direkte sammenligninger (4 LC-polaritetsmode × 2 matricer × 3 koncentrationsniveauer) gav SPE lige så mange eller flere fund sammenlignet med VEC i samtlige tilfælde og overgik VEC i 22 af 24. Der var to tilfælde med identisk antal fund (RP i drænvand ved ≤1 µg/L samt HILIC i hanevand ved ≤ 1 µg/L). SPE finder også flere fund, når man ser på det totale fund af de 34 teststoffer.

Fordelen ved SPE er størst ved de laveste koncentrationer (≤0,02 µg/L), hvor den højere opkoncentrationsfaktor mest effektivt omsættes til lavere metode-DL og dermed flere positive fund, særligt i hanevand.

For SPE-oprensede prøver blev to stoffer (4,4'-methylenbis-benzenamin og PFECHS) ikke genfundet efter opkoncentrering, selvom de kunne detekteres i standarden med DL ≤ 1 µg/L. PFECHS kunne dog heller ikke påvises efter VEC-opkoncentrering. Ét stof (DEIA) opnåede en DL ≤ 0,1 µg/L i hanevand, men ikke i drænvand, mens et andet stof (benzyltrimethylamin) omvendt opnåede DL ≤ 0,1 µg/L i drænvand, men ikke i hanevand. De resterende 30 stoffer blev alle detekteret med DL ≤ 0,1 µg/L i både hanevand og drænvand.

På tværs af metoder ses lavere variation i drænvand end i hanevand (TABEL 13). Andelen af duplikater med RSD > 20 % stiger fra 5,6 % til 18,0 % for SPE og fra 9,3 % til 28,3 % for VEC, når der skiftes fra drænvand til hanevand. Tilsvarende falder andelen af duplikater med RSD < 20 % fra 94,4 % til 82,0 % (SPE) og 90,7 % til 71,7 % (VEC). Dette underbygger, at prøvetypen i højere grad end metoden påvirker reproducerbarheden.

I drænvand er forskellen mellem metoderne lille. Dog har SPE færre stoffer med høj variation mellem duplikater (5,6 % vs. 9,3 %). I hanevand blev denne forskelle forstærket (18,0 % vs. 28,3 %). Resultaterne indikerer, at SPE leverer mindst lige så god og ofte bedre reproducerbarhed sammenlignet med VEC.

Sammenligningen dokumenterer, at den udviklede SPE-metode giver en robust og signifikant bedre samlet detektionsydelse end VEC. SPE leverer gennemgående flere fund ved både ≤0,1 µg/L og især ved ≤0,02 µg/L, uden at reproducerbarheden kompromitteres.

TABEL 13. RSD beregnet for duplikater målt ved positiv ionisering. Total antal duplikat-målinger (N) og fordelingen af disse i 3 klasser afhængig af størrelsen på RSD (hhv < 10%, 10-20% og > 20%). Hvis et stof detekteres på flere platforme, indgår det flere gange.

Matrix	Metode	N	RSD <10 %	RSD 10–20 %	RSD >20 %
Drænvand	SPE	72	25 (34,7 %)	43 (59,7 %)	4 (5,6 %)
Drænvand	VEC	75	29 (38,7 %)	39 (52,0 %)	7 (9,3 %)
Hanevand	SPE	61	15 (24,6 %)	35 (57,4 %)	11 (18,0 %)
Hanevand	VEC	46	10 (21,7 %)	23 (50,0 %)	13 (28,3 %)

8.7 Valg af interne standarder

Interne standarder er et eller flere isotopmærkede referencestoffer, som tilsættes prøverne forud for analysen. Stofferne anvendes til at korrigere for eventuelle matrixeffekter, skred i retentionstid og i sensitivitet.

Da det ikke er muligt i brede screeninger at anvende en specifik intern standard for alle komponenter, skal det efterstræbes at inkludere interne standarder der dækker det aktuelle formål med analysen i henhold til RT, stoftyper og kemiske/fysiske egenskaber (Broadhurst et al., 2018). Intensiteten for hvert detekteret stof korrigeres efter den interne standard der vurderes at være mest egnet (f.eks. lignende retentionstid mm).

Massenøjagtigheden af interne standard bruges desuden til at vurdere om analysen af de enkelte injektioner er pålidelig.

Anvendelsen af isotopmærkede interne standarder betragtes som guldstandarden inden for kvantitativ analyse med massespektrometri. Disse standarder er kemisk identiske med de undersøgte analytter, men indeholder stabile isotoper (fx ^2H , ^{13}C eller ^{15}N), hvilket medfører en karakteristisk masseforskydning uden at ændre stoffets kemiske egenskaber. Masseforskydningen gør, at de ved massespektrometri kan adskilles fra de undersøgte analytter.

Fordelen ved at anvende disse standarder er, at de opfører sig næsten identisk med de ikke-mærkede analytter gennem hele den analytiske proces. Dette inkluderer prøveforberedelse, kromatografisk separation og ionisering i massespektrometeret. Ved at tilsætte en kendt mængde af den isotopmærkede standard til prøven fra start, kan man effektivt korrigere for tab af analyt under opkoncentrering og for variationer i instrumentets respons.

Ved suspect og non-target screening er det ikke muligt at medtage en intern standard som er et præcist match for alle de stoffer, der analyseres for. Derfor udvælges et sæt af stoffer der repræsenterer de stoffer, der er kompatible med analysemetoden. Stofferne er udvalgt, så de repræsenterer et bredt retentionstidsinterval og forskelle i polaritet og molekylestørrelse. Stofferne er desuden udvalgt fra, at der skulle foreligge tilgængelige analysestandarder/referencestoffer. I dette tilfælde blev en række stoffer udvalgt efter retentionstid på RP og HILIC (TABEL 14 og TABEL 15). Indledningsvis blev det besluttet at benytte to mix af interne standarder. Et der skulle tilsættes før SPE oprensning (Mix 1), og et der skulle tilsættes efter (Mix 2). Formålet var at have interne standarder der kan korrigere for tab i forbindelse med SPE-oprensningen og sikre at oprensningen er udført korrekt (Mix 1), derudover at medtage interne standarder der kan bruges til at undersøge matrixeffekter med lignende på det analytiske setup.

Flere af stofferne i Mix 1 kunne ikke detekteres i prøverne, og der var særligt problemer ved negativ ionisering hvor ingen af stofferne kunne detekteres i alle prøver. Derfor var det nødvendigt at hæve koncentrationerne samt tilføje flere stoffer før SPE oprensning.

TABEL 14. Oversigt over sammensætning og koncentrationer for de interne standarder i Mix 1, som blev tilsat prøverne før SPE-oprensning. Tabellen viser koncentrationen i prøven og den maksimale koncentration efter opkoncentrering via SPE ved 100 % genfindning.

STD_Mix 1	C i prøven (µg/L)	C max efter SPE (µg/L)
1,2,4-Triazole Labeled $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N	0,005	2,5
Desethyl-atrazine-D6	0,005	2,5
Atrazine D5	0,005	2,5

STD_Mix 1	C i prøven (µg/L)	C max efter SPE (µg/L)
D3-Propyzamid	0,005	2,5
Terbutryn-d5	0,005	2,5
Sodium trifluoroacetate-1-13C	0,005	2,5
MCPA-D3	0,005	2,5
Carbamazepine-d10	0,005	2,5

TABEL 15. Oversigt over sammensætning og koncentrationer for de interne standarder i Mix 2, som blev tilsat efter SPE-oprensning. Tabellen angiver de anvendte koncentrationer i prøveekstraktet.

STD_Mix 2	C i prøven (µg/L)
Nicotine-D4	10
Atrazine-desisopropylhydroxy-13C3	10
CGA 324007-D9	10
Desisopropyl Atrazine-d5	10
Diuron-D6	10
Diclofenac-d4	10
6PPD-quinone-d5	10
CGA 369873-D9	10
Bentazon-D6	10
4-Nitrophenol-D4	10
PFDA-13C9	10
DPC-15N2 (Desphenyl Chloridazon-15N2)	10

Efterfølgende blev det vurderet, at det var tilstrækkeligt med ét mix, som tilsættes inden SPE. Da mix 2 indeholder flere stoffer, der ioniserer bedst i negativ ionisering, blev de to mix samlet og testet ved at tilsætte inden SPE i forskellige koncentrationer. Ud fra disse tests blev der lavet et endeligt mix af interne standarder, som anvendes til valideringen af metoden (TABEL 16).

TABEL 16. Sammensætning og koncentrationer for det endelige mix af interne standarder, som blev anvendt i metodevalideringen. Dette mix blev tilsat inden SPE-oprensning og kombinerer stoffer fra Mix 1 og 2, optimeret for både positiv og negativ ionisering.

	C i prøven (µg/L)	C max efter SPE (µg/L)
Nicotine-D4	0,05	25
CGA 324007-D9	0,05	25
CGA 369873-D9	0,05	25
Desethyl-atrazine-D6	0,02	10
Atrazine D5	0,05	25
Diuron-D6	0,05	25
D3-Propyzamid	0,05	25
Terbutryn-d5	0,02	10
Salicylic acid-d6	0,05	25
Bentazon-D6	0,02	10
4-Nitrophenol-D4	0,05	25
PFDA-13C9	0,02	10
6PPD-quinone-d5	0,05	25

8.8 Sammenfatning

Indledende test af en række forskellige SPE viste, at kulbaserede sorbenter, især Supelclean™ ENVI-Carb™ Plus udmærkede sig ved god genfinding af analytter med forskellig polaritet og ioniske egenskaber. Kolonnen blev dog fravalgt grundet leveranceforhold. Supplerende evaluering af alternative kulbaserede materialer viste, at Sep-Pak AC2 Plus kunne bruges som et alternativ med delvis sammenlignelige resultater.

Undersøgelse af vakuumdestillering som alternativ til SPE viste, at den udviklede SPE-metode generelt havde højere effektivitet og mulighed for lavere detektionsgrænser ved lave koncentrationer ($\leq 0,02 \mu\text{g/L}$) grundet en højere opkoncentreringsfaktor og mindre matrixeffekt. Den endelige metode til opkoncentrering blev derfor baseret på SPE med Sep-Pak AC2 Plus.

Desuden blev indflydelsen af valg af opløsningsmiddel undersøgt. ACN udviste en betydelig forbedring i det kromatografiske resultat for HILIC-analysen sammenlignet med methanol og blev derfor valgt som opløsningsmiddel i den endelige metode.

Optimering af elueringsbetingelser viste, at en kombination af både sure og basiske solventer i ACN gav høj genfinding ved reversed phase for størstedelen af analytterne.

Der er dog stadig behov for yderligere undersøgelse af mulighederne for at reducere udfældningen ved tilpasning af opløsningsmidlets sammensætning, hvilket vil kunne lette praktisk håndtering af prøverne.

Der er udviklet et mix bestående af 13 drikkevandsrelevante stoffer som eventuel kan anvendes som internt standardmix (IS) for denne type analyse.

Der er endvidere behov for optimering af SPE-set-up mhp. analyse for særligt vanskelige forbindelser som eksempelvis 1,2,4-triazol.

9. Udvikling af kvantificering og datalagring

Et centralt fokus i dette projekt har været at udvikle en analysemetode, der kan gøre HRMS-analyser anvendelige i bl.a. den løbende miljøovervågning. For at opnå dette er der behov for yderligere udvikling på flere fronter. To af de vigtigste indsatsområder, som overordnet har været berørt i dette projekt, er: (1) udviklingen af en kvantificeringsramme (qNTA), der gør det muligt at omsætte signalintensiteter til pålidelige koncentrationsestimater på tværs af analytiske platforme – hvilket er afgørende for risikovurdering af identificerede stoffer, og (2) etableringen af en datainfrastruktur, der muliggør sporbar, standardiseret og langsigtet lagring af HRMS-data. Dataplatformen skal kombinere rådata i åbne formater med strukturerede metadata og dermed skabe grundlag for retrospektive analyser.

Disse to områder præsenteres i det følgende.

9.1 Kvantificering ved HRMS-metoder

HRMS gør det muligt at detektere et bredt spektrum af kemiske forbindelser i en prøve – uanset om stofferne er kendte eller på forhånd definerede. Denne egenskab gør analysen til et stærkt værktøj til at opdage nye forurenende stoffer, forstå komplekse kemiske blandinger og støtte miljømæssige risikovurderinger. Dog har metoden én væsentlig ulempe: Selvom metoden kan påvise tilstedeværelsen af kemikalier, giver den ikke i sig selv information om deres koncentrationer.

Inden for miljøanalyse anvendes screeninger ofte til at identificere forekomsten af miljøfremmede stoffer i forskellige matricer. Men selve tilstedeværelsen af et stof betyder ikke nødvendigvis, at det har miljømæssig eller toksikologisk betydning. For at vurdere risikoen ved et stof er det essentielt at kende dets koncentration. For eksempel kan en meget giftig substans i spormængder være harmløs, mens høje koncentrationer af et mindre giftigt stof stadig kan være skadelige. Uden koncentrationsdata bliver det vanskeligt at sammenligne forureningsniveauer mellem lokaliteter eller tidspunkter, prioritere hvilke kemikalier der kræver regulering, eller vurdere eksponeringsrisici for mennesker og økosystemer.

En af de største udfordringer ved at kvantificere ukendte forbindelser i massespektrometri er, at signalintensiteten – eller peak-arealet – afhænger af stoffets ioniseringseffektivitet. Forskellige kemikalier ioniseres med varierende effektivitet afhængigt af deres molekylstruktur. For eksempel ioniserer forbindelser med sulfosyregrupper generelt mere effektivt end dem med carboxylsyregrupper selv ved samme koncentration. Derfor kan to stoffer ved samme koncentration give signaler, der varierer med flere størrelsesordener. I mangel af en referencestandard findes der ingen enkel metode til at omsætte signalintensitet til en pålidelig koncentrationsvurdering.

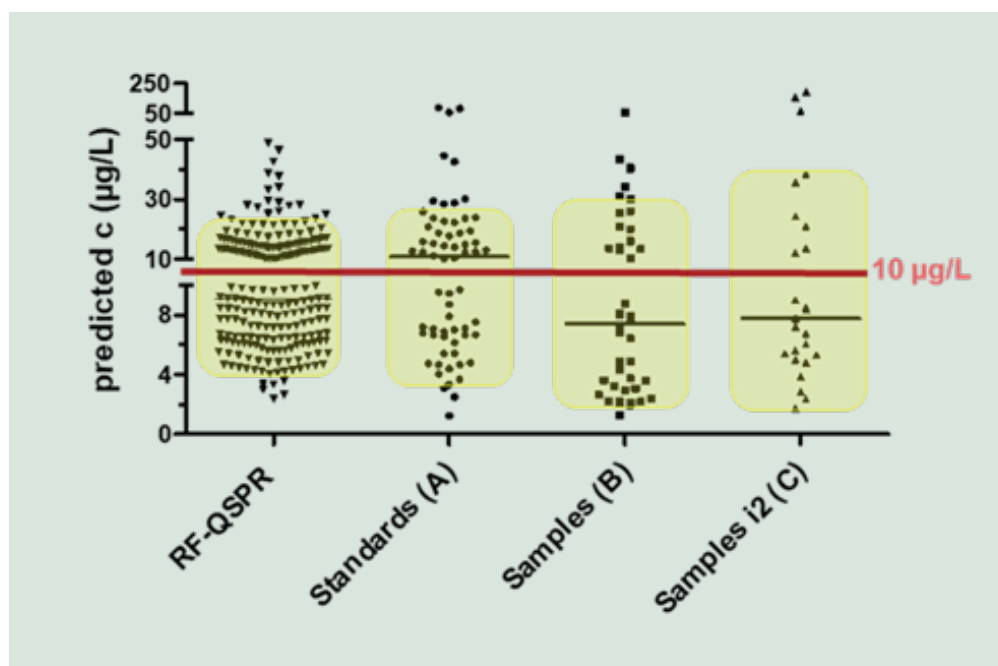
Kvantitativ ikke-målet analyse (qNTA) søger at estimere koncentrationer for ukendte forbindelser ved at relatere molekylære egenskaber til instrumentel respons via QSPR-modeller (model for ioniseringseffektivitet). I bilag 3 er vedlagt et workflow for modellen. Historisk har qNTA-modeller primært antaget én ionform (typisk eller $[M-H]^-$), hvilket ikke afspejler den faktiske fordeling af addukter i ESI. Mange forbindelser danner flere addukter (f.eks. $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$), og hvis disse ikke modelleres, vil en del af signalet mangle og

koncentrationsestimerne potentielt blive biased. TABEL 17 opsummerer publicerede qNTA-studier og viser, hvilke ionformer der er inkluderet i modellerne. I tabellen angiver bogstaverne de ionformer, der indgår ($H = [M+H]^+$; $-H = [M-H]^-$; $Na = [M+Na]^+$; $NH_4 = [M+NH_4]^+$; $K = [M+K]^+$), og tallene angiver det samlede antal ionformer, der indgår i modellen. Ikke alle studier inkluderer alternative addukter eller salte — studier med én ionform inkluderer ikke addukter, mens studier med fx "H+Na (2)" gør. Dette forklarer også variationen mellem studierne og peger på behovet for qNTA-modeller, der håndterer flere addukter samtidigt.

For at imødegå disse problemer blev der i det aktuelle studie (26) introduceret flere centrale forbedringer. For det første blev alle væsentlige addukter taget i betragtning for hver forbindelse i stedet for kun den protonerede form, hvilket gav et mere komplet billede af forbindelsens signalintensitet. For det andet blev der udviklet en forbedret QSPR-model, baseret på et datasæt af 216 miljørelevante kemikalier. Denne model kunne estimere koncentrationer inden for en faktor 1,6 af den sande værdi – dvs. forudsigelserne lå typisk inden for 60 % af den reelle koncentration (se FIGUR 15, første søjle). Da instrumentpræstation kan variere mellem laboratorier og over tid, blev der for det tredje udviklet en sekundær korrektion, som tager højde for denne variation. Korrektionen øger metodens robusthed og anvendelighed.

Metoden blev valideret både med standardopløsninger og med reelle prøver, herunder analyser udført på et andet LC-HRMS-instrument i et andet laboratorium (FIGUR 15). De fleste forudsigelser lå inden for en faktor 2 til 3 af de faktiske koncentrationer, hvilket viser god evne under realistiske betingelser til at forudsige/estimere koncentrationer i miljøprøver alene ud fra stoffernes fysisk/kemiske egenskaber og uden brug af referencestandarder. Metoden blev sammenlignet med andre metoder udgivet indenfor de seneste år, ved Root Mean Square Error (RMSE) der et mål for, hvor godt en model passer til data. RMSE beregnes som kvadratroden af gennemsnittet af de kvadrerede fejl og Q^2 en kvalitetsscore af models forudsigelser.

Modellen er løbende udviklet og tilpasset over projekterne VANDALF, AQUAPLEXUS OG PESTICID og publiceret som videnskabelig artikel, hvor den også er beskrevet i detaljer (Tisler et al., 2023). Modellen har seneste været anvendt til kvantificering af miljøfremmede stoffer i drikkevand (Tisler et al., 2025).



FIGUR 15. Plottet viser modellens forudsigelsesfejl for alle testede miljøfremmede stoffer ved en fastsat koncentration på 10 µg/L. Den første søjle ("RF-QSPR") viser modellens iboende fejl. Den anden og tredje søjle angiver variation ved gentagne analyser af standarder og prøver på samme instrument over en periode på tre år. Den fjerde søjle viser, hvordan qNTA-modellen, trænet på instrument 1, klarer sig, når den anvendes på data fra et andet instrument (Figuren er kopieret fra (Tisler et al., 2023)).

Denne forbedrede qNTA-metodik har stort potentiale i miljøovervågning. Den muliggør mere præcise estimater af koncentrationer for ukendte forurenende stoffer – uden behov for referencestandarder – hvilket i høj grad øger nytteværdien af ikke-målrettet analyse i rutine- og storskalaanvendelser. Ved at levere koncentrationsdata sammen med identifikation styrker metoden risikovurderingen og understøtter bedre beslutningstagning i miljøforvaltning og regulering.

TABEL 17. Sammenligning af forskellige qNTA-modeller offentliggjort i løbet af de seneste otte år. "Ionformer" angiver hvilke ionformer der indgår i responsmodellen ($H = [M+H]^+$, $-H = [M-H]^+$, $Na = [M+Na]^+$, $NH_4 = [M+NH_4]^+$). "Addukter inkluderet" angiver, om alternative addukter/salte indgår i modellen. Nøjagtighed angives som RMSE (Root Mean Squared Error), der beskriver den gennemsnitlige afvigelse mellem model og observation (lavere er bedre), og/eller Q^2 (Predictive Squared Correlation), der beskriver modellens prædiktive forklaringsgrad ved krydsvalidering (værdier tæt på 1 er bedre). Tabellen viser, at kun få publicerede modeller inkluderer alternative addukter, mens majoriteten udelukkende modellerer protonerede eller deprotonerede ionformer.

Publikation	Antal stoffer	Antal descriptorer	Type af kemikalier	Nøjagtighed	Summen af addukter anvendt
Liigand et al. 2020	380	450	Pesticider, mycotoxiner	RMSE (Training)= 0.29 RMSE (Test)= 0.48	Nej
Abrahamsson et al. 2020	517	1859	Miljøfremmede stoffer	Q^2 (Training)= 0.94 Q^2 (Test)= 0.4	Nej

Publikation	Antal stoffer	Antal descriptorer	Type af kemikalier	Nøjagtighed	Summen af addukter anvendt
Cramer et al. 2017	66	2	Lægemiddel lignende stoffer	Q^2 (Training)= 0.79 Q^2 (Test)= 0.9	Nej
Hermans et al. 2017	70	2	PEG aminosyrer	Q^2 (Training)= 0.91 Q^2 (Test)= 0.7	Nej
Aalizadeh et al. 2022	103	7	Miljøfremmede stoffer	RMSE (Training)= 0.4 RMSE (Test)= 0.31 Q^2 (Training)= 0.83 Q^2 (Test)= 0.81	Nej
Vores model	205	1800	Miljøfremmede stoffer	RMSE (Test)= 0.275 Q^2 (Training)= 0.80 Q^2 (Test)= 0.78	Ja

Den publicerede model anvendes i nærværende strategi, fordi metoden muliggør kvantificering af forbindelser uden tilgængelige standarder og dermed understøtter projektets formål om prioritetsbaseret screening af miljøfremmede stoffer. Tilgangen er desuden kompatibel med LC-HRMS-data og valideret i flere publicerede case-studier, hvilket er centralt for implementering i et rutineorienteret analyse-setup.

Det har grundet projektets tidsramme ikke været muligt at afprøve modellen på matrixspecifikke prøver fra dette projekt. I en implementeringsfase vil anvendelse på relevante prøvetyper være nødvendig. Det skal dog bemærkes, at alternative kommercielt tilgængelige løsninger (fx Ligand-modellen) også kan anvendes, hvis laboratoriet allerede har sådanne workflows tilgængelige. Strategien er således ikke begrænset til én bestemt mode

Metoden opfylder projektets krav om kvantificering af ikke-target forbindelser (M3.3) og muliggør prioritering uden tilgængelige analytiske standarder.

9.2 Datalagring

Københavns Universitet, De Nationale Geologiske Undersøgelser for Danmark og Grønland (GEUS), Danmarks Miljøportal (DMP) og en række andre partnere har gennem en række projekter (herunder PESTICID) etableret et grundlag for en national datalagringsplatform for NTS data.

Formålet er at muliggøre lagring af NTS data for på den måde at skabe et grundlag for at udvide og forbedre overvågningen af miljøfremmede stoffer. Med en sådan platform vil det principielt være muligt at skabe et forbedret grundlag for at understøtte myndighedsbeslutninger, prioritere stofundersøgelser, evaluere effektiviteten af afværgeforanstaltninger og potentielt give tidlige varsler. Et centralt element i den forbindelse er muligheden for at give interessenter mulighed for at udføre retrospektiv analyse af historiske analysedata.

Som tidligere nævnt vil denne rapport ikke beskrive opbygning, databasestruktur og den bagvedliggende programmering for den nationale datalagringsplatform, fordi dette for det første behandles og beskrives i AQUAPLEXUS, som er et parallelt udviklingsprojekt, som udføres med støtte fra Innovationsfonden - og for det andet fordi de aktører på markedet, som arbejder med NTS-analyser (kommercielle laboratorier og forskningsinstitutioner) kan tænkes

at opbygge egne datalagringsplatforme til opbevaring af forskningsdata/kundedata. Det kan dog bemærkes, at den nuværende danske løsning som udgangspunkt er udført som en platform, hvor data udelukkende lagres, mens fx sammenligning af forskellige datasæt, der er analyseret på forskellige tidspunkter eller af forskellige laboratorier, foretages lokalt ved download af de datasæt, der ønskes sammenlignet. Den internationale udvikling i fx Tyskland og Schweiz synes at gå mod egentlige data-portaler, hvor databehandling og sammenligninger i større grad kan foretages i selve platformen og meget tyder på, at dette også bør tænkes ind i fremtidige danske projekter, der ønsker at videreudvikle mulighederne for etablering af nationalt tilgængelige datasæt - alternativt kobling til internationale portaler i eksempelvis EU-regi.

Denne rapport vil i stedet fokusere på beskrivelse af de data, som bør sikres i en sådan lagringsplatform for at efterfølgende retrospektive analyse kan gennemføres med et brugbart kvalitetsniveau.

9.2.1 Retrospektive analyser

HRMS-analyser, som er grundlaget for retrospektive analyser, adskiller sig fra traditionelle target-analysemetoder ved at HRMS-analyser i princippet kan opsamle informationer om alle de stoffer, som er i en given prøve, og som den pågældende metode kan detektere. Metoderne dækker således potentielt tusindvis af stoffer.

I modsætning hertil registrerer traditionelle target-metoder i de fleste tilfælde kun data om det eller de få forud specificerede stoffer, som metoden er indstillet til at måle.

Retrospektive analyser adskiller sig desuden ved som navnet siger at foregå på et tidsmæssigt senere tidspunkt end, da prøven blev analyseret i laboratoriet. Den retrospektive analyse af opsamlede analysedata kan ofte foregå måneder eller år efter, at den enkelte prøve for længst er analyseret og kasseret. Dette stiller nogle særlige krav til, hvilke data der gemmes og til de kvalitetssikringsprocedurer, der bør iagttages, fordi det kan være særdeles vanskeligt at afklare f.eks. tvivlsspørgsmål, når man kigger på data lang tid efter prøven er indsamlet og analyseret.

En af de meget store fordele ved HRMS-metoder er, at de gør det muligt meget hurtigt og illustrativt at påvise forskelle mellem prøver. I grundvand-/drikkevandssammenhæng kan denne egenskab f.eks. udnyttes til at påvise forskelle mellem prøver udtaget på forskellige tidspunkter eller efter forskellige processer. Etablering af et arkiv af denne type baseline-data for danske borer og vandforsyninger kan fremadrettet anvendes til at vurdere den tidsmæssige udvikling for både den enkelte vandforsyning og i en større sammenhæng for landets drikkevandsressourcer. Baseline-data for vandforsyninger kan også indgå som vigtig viden til brug for beredskabssituationer.

9.2.2 Analysedata

Datalagringen er visualiseret i FIGUR 16. Data fra alle analyser bør gemmes som skrivebeskyttede rådatafiler. Her bør det sikres, at filerne gemmes i åbne formater som mzml, der sikrer, at filerne senere vil kunne læses uden adgang til specifik kommerciel software. Sideløbende kan processerede datafiler for den enkelte prøve gemmes parallelt med rådatafiler.

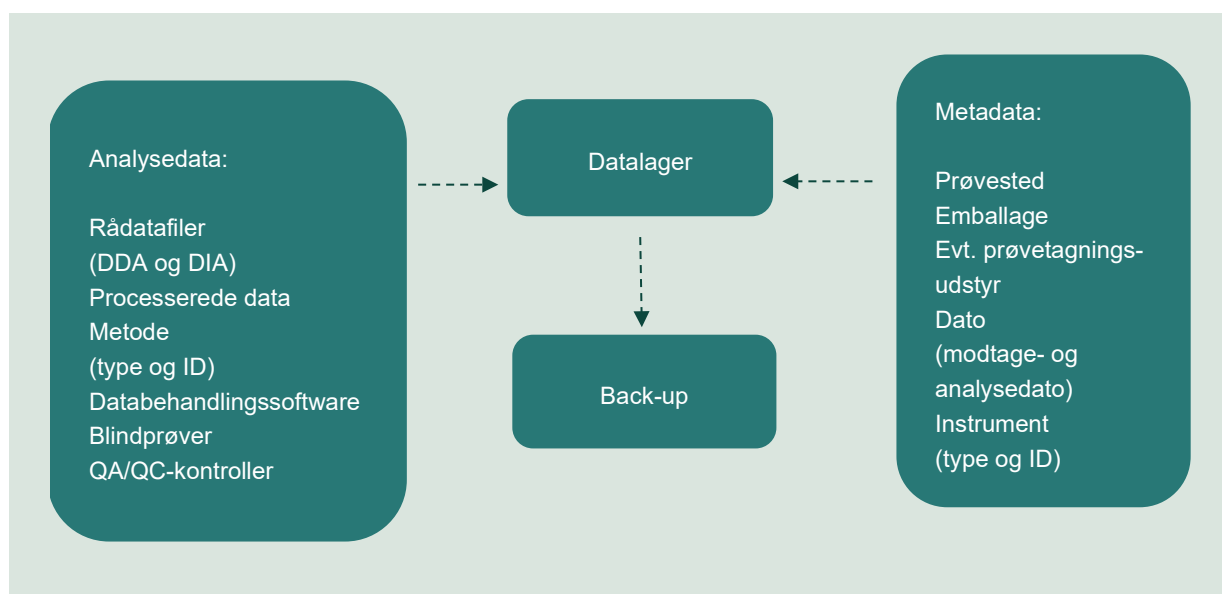
Fordelen ved at gemme rådatafiler er, at det muliggør re-analyse af originaldata. Det vil på den måde også være muligt at udnytte, at databehandlingssoftware hele tiden forbedres, og at senere versioner evt. kan uddrage værdifulde informationer, som blev overset i første omgang. Studier har vist, at der opnås meget forskellige resultater afhængigt af den valgte software (Höcker et al., 2021; Wang et al., 2023).

Datafiler af denne type er meget store (typisk 0,5-2 GB), men priserne for lagerkapacitet er stærkt faldende og vil som regel ikke være afgørende for den samlede økonomi i forbindelse med datalagring og retrospektive analyser.

Prøver kan ved selve analysen analyseres enten med data-dependent (DDA) og data-independent akquisition (DIA). DIA-tilgangen sikrer, at alle relevante ioner opsamles og kan hentes frem igen ved nye retrospektive spørgsmål. DDA sikrer, at der opnås rene fragmentationsmønstre for de største signaler i prøven (jf. også afsnit 6.6).

Sammen med analysedata for prøver gemmes også data for alle kontrol- og SST-prøver fra samme analysesekvens. Til alle prøver tilsættes et intern-standard-mix med forskellige kemiske/fysiske egenskaber. Det bruges til at sikre masse-nøjagtighed, overvåge retentionstidsskred og bekræfte tilstrækkelig sensitivitet, så data er robuste ved senere re-analyse. Kontrolprøverne kan bestå af blandinger af flere hundrede stoffer. Ikke alle databehandles nødvendigvis ved optagelsen, men ved at inkludere flere stoffer er det muligt senere f.eks. at lave bedre qNTA metoder for stoffer fundet ved retrospektiv analyse, ved inddragelse af stoffer der kemisk/fysisk ligner disse.

Som det fremgår af SOP for Prøveforberedelse (bilag 1) anbefales det, at der i forbindelse med alle prøver til NTS-analyse også indhentes laboratorie- og emballageblindprøver. Disse analyseres parallelt med prøverne og data kobles til den aktuelle prøve i datalageret.



FIGUR 16. Visualisering af datalagring.

9.2.3 Back-up

Der skal sikres back-up ved at anvende redundante lagringskapaciteter. Det kan f.eks. ske ved at bruge eksterne datalagringsplatforme som eksempelvis Azure Blob Storage Archive (Microsoft) eller tilsvarende.

9.2.4 Meta-data

Retrospektive analyser gennemføres som sagt ofte lang tid efter prøvetagningen er gennemført og prøverne analyseret. Det gør, at det er meget vigtigt, at så mange data som overhovedet muligt i forbindelse med den enkelte prøve gemmes.

Metadata, som har stor betydning for en efterfølgende data-analyse og resultatevaluering, fremgår af nedenstående. Så mange som muligt og helt alle af denne type data bør gemmes sammen med de egentlige analysedata for at sikre kvaliteten af efterfølgende vurderinger

- Undersøgelsens formål
- prøvetagningssted,
- prøvetagnings- og modtagelsestidspunkt
- analysetidspunkt
- anvendt prøvetagningsudstyr
- omstændigheder ved prøvetagningen som eksempelvis anvendt SOP, forpumpning (ved grundvandsprøver) etc.
- transportforhold
- anvendt emballage
- observationer på prøvestedet i forbindelse med prøvetagningen
- personale
- vejrlig

9.2.5 LIMS

De fleste kommercielle laboratorier anvender et automatiseret LIMS system (Laboratory Information and Management System) til styring af prøver, metoder, analyseflow, beregninger, resultater, kvalitetsdata, udførende personale etc. Disse systemer kan foruden de optagne analysedata også gemme de fleste klassiske metadata. Systemerne kan normalt tilpasses, så også oplysninger om f.eks. emballagetyper og prøvetagningsudstyr kan gemmes i forbindelse med den enkelte prøve.

9.2.6 Sammenfatning

HRMS-analyser tilfører en helt ny mulighed i forbindelse med miljøanalyser nemlig muligheden for at genbesøge og re-analysere analysedata for tidligere analyserede prøver. Denne mulighed er ikke til stede ved traditionelle target-analyser.

Hvorvidt det bliver obligatorisk for vandforsyningsbranchen at udføre og lagre HRMS-analyser i fremtiden er uvist på nuværende tidspunkt, men der er næppe tvivl om, at denne type analyser i fremtiden kan blive et værdifuldt værktøj for myndighederne til overvågning på grund- og drikkevandsområdet. Hvis et repræsentativt udsnit af landets grundvandsboringer på et tidspunkt er dækket af baseline HRMS-analyser, vil det være muligt at følge tidstrends for langt flere stoffer end nuværende data giver mulighed for. For den enkelte forsyning vil egne HRMS-data foruden kendskab til tidstrends også kunne tjene som en hurtig og effektiv måde at vurdere påvirkninger udefra i forbindelse med f.eks. indbrud eller andre beredskabssituationer.

Det er ikke alle analyser som gennemføres med HRMS teknologi, som udføres med henblik på senere at kunne bruges retrospektivt, men i de tilfælde, hvor analyser foretages med det formål senere at kunne re-analyseres, er det projektgruppens anbefalinger, at der etableres en systematisk opsamling og lagring af metadata parallelt med analysedata. Metadata er i den forbindelse alle oplysninger omkring prøvetagning og analyse, som potentielt kan have en betydning ved en senere evaluering af analyseresultaterne.

I dette projekt og en række parallelle projekter er der arbejdet med en lagerløsning placeret i forbindelse med Danmarks Miljøportal. I den forbindelse er det vigtigt, at upload af datafiler er udformet, så upload kan ske automatisk fra IT-baserede Laboratory Information and Management Systemer (LIMS), fordi data i stor udstrækning kan forventes at komme fra kommercielle analyselaboratorier

Kommercielle laboratorier forventes i stigende omfang fremover at tage HRMS teknikker i brug. Disse laboratorier vil normalt altid anvende et IT-baseret LIMS og for disse anbefales det, at systemerne tilpasses, så de også kan rumme metadata som beskrevet i 9.2.4., hvis de udførte analyser gennemføres med det formål senere at kunne bruges til retrospektive undersøgelser.

10. Kvalitetssikring af HRMS analyser

For at LC-HRMS kan implementeres som en standardiseret metode til analyse af miljøprøver, er det helt essentielt, at der genereres pålidelige og reproducerbare data. Derfor er Quality Assurance (QA) og Quality Control (QC) essentielle dele for udvikling af metoderne. I klassiske akkrediterede targetanalyser medtages en referencestandard samt en intern standard i analysen. Disse tillader nøjagtige koncentrationsbestemmelser, samt korrigering for f.eks. varians i sensitivitet fra batch til batch samt i løbet af en sekvens (ISO/CASCO, 2017). Da der som tidligere nævnt ikke medtages standarder for alle stoffer i en suspect og non-target screening, skal der findes alternative løsninger.

De vigtigste QA/QC udfordringer, når det gælder HRMS analyser er at undgå falsk-positive og falsk-negative resultater (Hollender et al., 2023). Disse fejl kan opstå under hele processen og er særligt svære at undgå i brede screeninger grundet antallet af stoffer, man kigger efter og det faktum, at man ikke direkte kan holde analysen op imod en referencestandard. Falsk-negative resultater udgør et særligt problem, fordi de ikke kan verificeres modsat falsk positive resultater som i det mindste teoretisk kan afdækkes via target-analyser.

10.1 Kvalitetskrav til HRMS-metode

Flere forsøg med interlaboratorie-sammenligninger har vist, at der kan være store variationer ved analyse af de samme prøver på forskellige laboratorier (Dürig et al., 2023; Malm et al., 2024; B. Schulze et al., 2021). I et studie med fisk som matrix, hvor der deltog 16 laboratorier, blev prøverne tilsat 32 LC-egnede og 19 GC-egnede stoffer. Identifikationsraten for de tilsatte LC-stoffer varierede mellem 9 % og 69 %, mens GC-stoffer lå mellem 20 % og 60 %. Antallet af ikke-tilsatte stoffer, der blev rapporteret, varierede fra 0 til 185 (LC) og fra 2 til 34 (GC), hvilket viser udfordringer med manglende standardisering mellem laboratorierne (Dürig et al., 2023). I dette projekt er der derfor indlagt en mindre interlaboratorie-sammenligning for at afprøve metodens robusthed testet overfor en række potentielt forekommende stoffer i drikkevand.

For at en kommerciel metode skal være anvendelig, er det vigtigt at minimere variation mellem laboratorier så meget som muligt. Tabellen herunder (TABEL 18) viser en oversigt over kvalitetselementer, der som minimum er relevante i forbindelse med en HRMS-analyse.

TABEL 18. Oversigt over krav til QA/QC i forbindelse med HRMS analyser.

QA/QC tiltag	Funktion
Passende antal indkøringer	Konditionering af systemet for at sikre at systemet er stabilt i sine responser inden analyse af prøver. Som eksempel kan der være brug for opbygning af matrix på aktive sider i instrumentet, for at forhindre interaktion mellem analyt og aktive sider på instrumentet, der vil give lavere signaler.
Masse-kalibrering	Regelmæssig massekalibrering af apparatet. Der kalibreres efter et antal stoffer med m/z, der dækker det relevante masseinterval. Foreslået daglig ekstern massekalibrering og løbende genberegning. Eventuelt ved infusion af kalibreringsvæske inden hver injektion, eller infusion i løbet af injektionen (kan medføre øgede matrixeffekter).

QA/QC tiltag	Funktion
Analyse og kontrolkort for SST (10.1.1)	Funktionskontrol som sikrer, at analysesystemet er klart i forhold til sensitivitet og stabilitet. Denne medtages altid og der føres kontrolkort med intensiteter, massenøjagtighed og FWHM for stofferne. Intensiteter: Må ikke falde under en fastsat minimumsgrænse. Massenøjagtighed ($\Delta m/z$): Må ikke falde udenfor et fastsat interval (± 5 ppm). FWHM*: Tjekkes løbende og bruges til at vurdere om der skal skiftes kolonne. Der bør ved opstart af ny kolonne etableres et krav, bør ikke afvige mere end + 30 %
Metodespecifik kontrolprøve "PESTICID Knt" (10.1.2)	Kontrolprøve som køres parallelt med prøver Bruges til at sikre at hver kørsel/sekvens lever op til metodens minimumskrav. Medtages både i HILIC og RP. Der føres kontrolkort over intensiteter. Giver mulighed for at informere rekvirent, om hvorvidt der har været tale om en sekvens med signifikant højere følsomhed end normalt, eller om kørslen ligger indenfor normalen. Bør afrapporteres sammen med prøverne.
Interne standarder	Tilsættes prøver forud for analyse. Anvendes til korrektion for matrixeffekter, til vurdering om massenøjagtigheden er god for alle injektioner og til vurdering af eventuelle variationer i prøveforberedelsen ud fra intensiteten af interne standarder i replikater. Hvis interne standarder ikke kan genfindes efter prøveforberedelse, bør prøveforberedelsen gentages.
Prøveforberedelse og analyse af triplikater (10.1.3)	Alle prøver køres i ægte triplikater. Anvendes til at vurdere repeterbarhed og reproducerbarhed og til vurdering af eventuelle carry-over effekter Anvendes også til at vurdere af eventuelle falsk-positive fund. Som hovedregel skal et stof være påvist i alle tre triplikater for at det rapporteres som sikkert fund.
Injektion af prøver i forskellig rækkefølge	Vurdering af risiko for carry-over effekter.
Analyse af blindprøver (10.1.4)	Korrigeret for falsk-positive fund/kontaminering. Signalet i prøven skal være minimum 3 x signalet i den blindprøve med højest signal.

I TABEL 18 er der opstillet en række forslag til krav for de enkelte kontroller. Det kan naturligvis variere fra laboratorie til laboratorie. Det anbefales, at kvalitetskravene fremgår af bilag i rapporten eller evt. i form af henvisning til f.eks. en hjemmeside.

I det følgende er nogle af elementerne i TABEL 21 beskrevet lidt mere indgående.

10.1.1 Analyse og kontrolkort for SST

Funktionskontrol eller "suitability test" (SST) består af en standard med kendte koncentrationer af kendte stoffer, som bruges til at sikre apparatets præcision (Broadhurst et al., 2018). Kontrollen udføres forud for og efter hver analyseserie og anvendes til at sikre, at analyseapparatet har tilstrækkelig sensitivitet, samt at systemet er konditioneret og giver stabile resultater. Denne anvendes som QC, idet intensiteten ikke må falde under et givet

niveau. Den kan også bruges til at vurdere, om der er skred i RT, der kan påvirke resultaterne, og om massenjagtigheden samt kromatografien er acceptabel. Minimumskravet for sensitiviteten kan bestemmes ud fra, hvad der er nødvendigt for at nå metodens minimumskrav. En mulig SST er Agilent pesticidmix, 2,5 µg/L MeOH, som er blevet brugt i dette projekt.

10.1.2 Metodespecifikke kontrolprøver

Til udvikling og løbende kontrol er der brug for et kontrolmix, som kan sikre, at metoden løbende er i kontrol. Som tidligere vist kan der være store skred i løbet af en sekvens.

Som kontrolmix foreslås den blanding af 38 miljøfremmede stoffer (bilag 6.1) som blev fremstillet i forbindelse med udviklingen af denne metode. Dette mix er udvalgt, så det dækker bredt over det kemiske rum. Det anbefales desuden, at det samme mix bruges ved indkøring af metoder, så nye metoder hurtigt kan evalueres på et ensartet grundlag og så det bliver muligt at sammenligne på tværs af laboratorier.

10.1.3 Analyse af triplikater

HRMS-analyse adskiller sig fra traditionelle target-analyser ved, at identifikationen af eventuelle fund ikke understøttes af med-analyserede referencestandarder og af at koncentrationerne, når der er tale om rentvandsprøver, ofte er lave. Resultaterne af denne type prøver kan derfor være forbundet med større usikkerhed end normalt for miljøprøver. Risikoen er knyttet til både falsk-positive fund (at en identifikation ikke er korrekt) og falsk-negative fund (at noget overses).

Problematikken forstærkes af, at de analyserede prøver ofte stammer fra sager med begrænset historik. dvs. sager, hvor der ikke er forudgående erfaring med, hvad man kan forvente.

Risici af denne type kan begrænses ved at analysere flere identiske delprøver fra samme prøve.

Som udgangspunkt anbefaler dette projekt, at prøver analyseres som ægte triplikater, dvs. tre uafhængige prøvehåndteringer og analyser, hvor delprøverne undergår hele prøveforberedelsen og efterfølgende LC-HRMS-måling. Ønsket om triplikat-analyser er en afvejning af risiko for falsk negative resultater og omkostninger ved analysen. Falsk positive resultater vil ikke være så alvorlige som falsk negative resultater, idet falsk positive med stor sandsynlighed opdages ved opfølgende specifikke analyse, hvor imod falsk negative resultater i sagens natur ikke opdages. Triplikater gør det desuden muligt at kvantificere metodens repeterbarhed på prøveniveau og at opdage single-event fejl (pipettering, SPE-breakthrough, ionkildedrift, carry-over etc.). Triplikatbestemmelse giver således et realistisk mål for metodepræcision i den aktuelle matrix.

Triplikatbestemmelse bør som minimum anvendes i nye sager, hvor historikken er begrænset. Dublikater og enkeltbestemmelse kan eventuelt anvendes på sager, hvor der er større kendskab til prøven eller matricen. Det skal bemærkes, at det ved forskel mellem dobbeltbestemmelser kan det være svært at afgøre, hvilken af to prøver der skal tildeles størst troværdighed.

10.1.4 Blindprøver

Falsk-positive resultater kan stamme fra kontaminering under hele processen fra prøveforberedelsen til analyse på apparatet (Hollender et al., 2023). Det er derfor vigtigt at inkludere passende blindprøver, så stoffer der detekteres, men som ikke stammer fra den originale prøve, kan sorteres fra.

Laboratorie/instrumentblindprøver kan f.eks. fremstilles med hanevand eller i særlige tilfælde vha. vand i analytisk kvalitet som eksempelvis HPLC-grade.

For analyse af grundvand og drikkevand er der en betydelig risiko for kontaminering i forbindelse med prøvetagning og transport. Det anbefales derfor at medtage en feltblind/emballageblind i forbindelse med alle undersøgelser. Feltblindprøve består af rent vand i analytisk kvalitet (HPLC-grade), som ophældes til den anvendte emballage af prøvetager på prøvestedet. Herefter behandles feltblind som prøverne igennem hele processen.

Hvis der anvendes prøvetagningsudstyr som f.eks. pumper eller slanger i forbindelse med prøvetagningen anbefales det at det omfattes af feltblindprøven. Der kan eventuelt som alternativ føres en regelmæssig kontrol for afsmitning fra det pågældende udstyr.

10.2 Databehandling

HRMS-analyser indeholder som regel behov for identifikation af fundne signaler (features). Valg af peak-picking-software er en væsentlig kilde til variation i disse features.

Et sammenlignende studie (B. Schulze et al., 2023), hvor samme datafiler, der blev analyseret med fem forskellige peak-picking software, viste, at kun 7,2 % af de samme features blev fundet ved minimum tre forskellige software og hele 74 % blev fundet af kun ét software, hvilket er kritisk i relation til risikoen for falsk-negative resultater.

I forbindelse med denne rapport viste sammenligning mellem databehandling i den generelle software MSDial (v4.92) og det af udstyrsleverandøren optimerede software (TASQ) en betydelig forskel. En forskel på en faktor 10 eller mere kunne påvises ved sammenligning af ekstraherede ionkromatogrammer. De mest konsistente resultater blev således opnået med den udstyrsspecifikke software. En udfordring i den forbindelse er imidlertid, at mange udstyrsspecifikke programmer til peak-picking ikke er transparente og at data vanskeligt lader sig overføre mellem forskellige apparattyper og software.

Derfor er validering af feature-detektion mindst lige så vigtig som validering af prøveforberedelse og analysemetode. Som anbefalet andetsteds i rapporten anbefales brug af triplikater for at øge datakvaliteten. Det forlænger instrumenttiden, men gør det lettere at identificere outliers og målretter den manuelle gennemgang.

Valget af EIC-masseintervaller er også centralt, idet snævrere intervaller reducerer interferens og kan forbedre automatisk peak-picking. For snævre intervaller kan dog påvirke reproducerbarheden.

Der er fortsat behov for udvikling og standardisering af peak-picking-algoritmer. For nuværende vurderes det ikke muligt at foreslå et specifikt dataworkflow som markant bedre end andre. I stedet anbefales det systematisk at indføre brug af standardmix ved alle analyser og valideringer. På den måde vil det være muligt at sammenligne om de samme stoffer kan

genfindes på tværs af laboratorier og på den måde fungere som en test af databehandlingsworkflowet.

10.3 Rapportering

Som udgangspunkt anvendes én kørsel (delprøve) for hver analyse til rapportering med mindre triplikatbestemmelserne, afvigelser i interne standarder etc. gør det relevant at se på flere injektioner.

Et fund anses for repræsentativt for den pågældende prøve, hvis det er påvist i alle tre triplikater. Hvis fundet er gjort i 1 eller 2 af triplikaterne, bemærkes det i rapporten. Fund af denne type bør følges op af yderligere tiltag mhp verificering, f.eks. reanalyse.

Alle rapporterede fund skal underlægges et plausibilitetstjek af en kemiker, inden de kan anses som valide. Dette er nødvendigt for at skelne mellem reelle forureningssignaler og analytiske artefakter, herunder interferenser og fejl i den automatiske del af databehandlingen. Kemikerens vurdering sker på baggrund af stoffets kemiske egenskaber, kvaliteten af de tilgængelige fragmentdata, kromatografisk signal, med mere. Herved sikres, at kun fagligt forsvarlige resultater rapporteres videre. Plausibilitetstjekket er en integreret del af den samlede kvalitetsprocedure.

Alle kørsler for blindprøver medtages i dataanalysen. For at et fund rapporteres, skal signalet i prøven være minimum fem gange det maximale blindsignal.

Fund afrapporteres med stofnavn, fundet intensitet og identifikationssikkerhed samt eventuelt stoftype eller anden kommentar.

Det er vigtigt, at rapporten indeholder beskrivelse af analysemetode, QC-prøver og kriterier som er anvendt i forbindelse med gennemgangen af data.

Det anbefales, at rapporten suppleres af databilag med følgende oplysninger:

Fundliste suppleret med følgende informationer:

- Prøve ID, matrice og analyseperiode,
- Evt. estimeret/beregnet koncentration af fund f.eks. henhold til qNTA (afsnit 9.1),
- Sikkerhed af identifikation f.eks. i henhold til Schymanski (2014)
- Analysemetode: eksempelvis LC-mode (RP/HILIC), ESI (POS/NEG),
- Oplysninger om forløbet af analysen, eksempelvis retentionstid, m/z, masseafvigelse, addukter, isotopscore, MS/MS-matchscore, area/height, S/N, anvendt intern standard,

Analysedata skal gemmes i henhold til laboratoriets interne procedurer og aftaler med kunden.

I praksis bør følgende data som minimum gemmes for hver analysesekvens og gøres tilgængelig for ordregiver:

- SST-kontrolkort (intensiteter, Δ ppm, FWHM),
- Kontrolprøver, interne standarder, genfinding/afvigelser,
- blank-opsummering (højeste blank pr. stof), eventuelle re-runs og begrundelser herfor.

- Spektralbilag (MS/MS) for rapporterede stoffer, inkl. biblioteks-/in-silico-match og centrale fragmenter.
- Softwareversioner, databehandlingsworkflow, bibliotek/version, screeningsliste, SOP-version, datoer samt unikke RunID'er.
- Oplysninger om eksport til eksterne databaser (f.eks. Danmark Miljøportal)

10.3.1 Rapportering af identifikationssikkerhed

Der er i litteraturen en række forskellige metoder til afrapportering af identifikationssikkerheden af fundne stoffer (Peter et al., 2021; Schymanski et al., 2014; Tisler et al., 2022). Schymanski et al. (2014) beskriver en metode hvor identifikationssikkerheden beskrives i 5 niveauer afhængig af mængden af data som foreligger (TABEL 19). Metoden synes bredt accepteret og ses ofte anvendt på miljøområdet. Ved suspect screening rapporteres der ikke normalt fund under level 3.

TABEL 19. Sikkerhedsniveauer for identifikation af ukendte forbindelser i miljøprøver. Schymanski et al. (2014).

Level 1: Bekræftet struktur	Overensstemmelse med referencestandard og MS/MS-match
Level 2: Sandsynlig struktur	
Level 2a	Overensstemmelse med spektre fra kuraterede biblioteker
Level 2b	Baseret på diagnostiske data (in silico-data)
Level 3: Tentativ kandidat	Flere mulige kandidater baseret på data om molekylmasse og struktur
Level 4: Molekylformel	Molekylformel kendt. Ingen kendskab til molekylstruktur
Level 5: Nøjagtig masse	Kendskab til molekylmasse. Ingen informationer om molekylformel eller struktur

11. Den udviklede metode

Herunder følger en kort gennemgang af den udviklede metode.

11.1 SPE oprensning

Materialer:

SPE: Sep-Pak AC2 Plus Short Cartridge-kolonner, 400 mg, 85 µm (Waters)

Væsker og kemikalier:

5 % myresyre (99,9%) i acetonitril (ACN LC-MS grade),

5 % ammoniakvand (25%) i ACN,

methanol (MeOH 99,95%)

LCMS-grade vand (til konditionering)

Udstyr:

Vakuumanifold

Fremgangsmåde:

1. Der tages en 0,5 liter vand i arbejde til hver oprensning.
2. Prøverne opkoncentreres ved SPE ved hjælp af en vakuumanifold.
3. Kolonnerne bliver monteret i manifoldet således, at de vender omvendt flowretningen.
4. Kolonnerne vaskes sekventielt med
 - i. 4 mL 5 % myresyre i ACN,
 - ii. 4 mL 5 % ammoniakvand i ACN,
 - iii. 4 mL ACN og
 - iv. 4 mL MeOH uden at lade kolonnerne tørre mellem trinnene.
5. Kolonnerne vendes og konditioneres med 10 mL LC-MS-grade vand.
6. Herefter loades prøve/blindprøve (0,5 l).
7. Efter loading bliver kolonnerne tørret under vakuum i 30 minutter.
8. Kolonnerne vendes på ny og elueres sekventielt med
 - i. 4 mL 5 % ammoniak i ACN,
 - ii. 2 mL ACN og
 - iii. 4 mL 5 % myresyre i ACN.
9. Ekstrakterne opsamles i en fraktion.
10. Ekstrakterne blev derefter inddampet til 1 mL under nitrogen og overført til glødede glasvials.
11. Prøverne opbevares herefter på køl (4 °C) natten over eller i fryser ved længere opbevaring indtil analyse.

11.2 Analyse; Dual kromatografisk separation

Kolonner og mobilfaser:

Kolonner og mobilfaser fremgår af TABEL 20.

Der anvendes gradienter som angivet i TABEL 21 for RP og TABEL 22 for HILIC.

Fremgangsmåde:

Prøverne analyseres ved injektion af 2 x 2µL ved henholdsvis RP og HILIC i både POS og NEG ionisering.

TABEL 20. Kolonner og mobilfaser for chromatografiske setup (RP og HILIC).

Metode	Ionisering	Kolonne	Dim. (mm)	Mobilfase A	Mobilfase B
RP	POS	Intensity Solo C18-2	2,1 × 100 × 1,8 µm	H ₂ O:MeOH (99:1) med 5 mM ammonium format og 0,01 % myresyre	MeOH med 5 mM ammonium format og 0,01 % myresyre
RP	NEG	Intensity Solo C18-2	2,1 × 100 × 1,8 µm	H ₂ O:MeOH (99:1) med 5 mM ammonium acetate	MeOH med 5 mM ammonium acetate
HILIC	POS + NEG	ACQUITY Premier BEH Amide	2,1 × 100 × 1,7 µm	H ₂ O:ACN (95:5) med 5 mM ammonium format	ACN:H ₂ O (95:5) med 5 mM ammonium format

TABEL 21. Gradientprogram for RP metoden.

Tid (min)	Flow (mL/min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)
0	0.2	96	4
0.1	0.2	96	4
1	0.2	81.7	18.3
2.5	0.223	50	50
14	0.4	0.1	99.9
16	0.48	0.1	99.9
16.1	0.48	96	4
19	0.48	96	4
19.1	0.2	96	4

TABEL 22. Gradientprogram for HILIC-metoden.

Tid (min)	Flow (mL/min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)
0	0.2	0	100
2	0.2	0	100
18	0.2	45	55
20	0.2	45	55
21	0.2	0	100
25	0.2	0	100

12. Validering

12.1 Omfang og design af valideringen

Generelt indebærer en validering af analytiske metoder at en række centrale performanceparametre bliver fastlagt. Traditionelt udføres validering af miljøanalyser med det formål at sikre præcis og pålidelig kvantificering af kendte målstoffer.

Typiske parametre, der undersøges under en metodevalidering:

1. **Selektivitet / Specificitet:** Metodens evne til at bestemme det ønskede stof uden påvirkning fra andre stoffer i prøven.
2. **Nøjagtighed (Accuracy):** Hvor tæt resultatet ligger på den sande værdi.
3. **Præcision (Precision):** Hvor ensartede resultaterne bliver ved gentagne målinger under samme betingelser (*repeatability*).
4. **Detektionsgrænse (LOD):** Den laveste koncentration, der med rimelig sikkerhed kan påvises.
5. **Kvantificeringsgrænse (LOQ):** Den laveste koncentration, der kan kvantificeres med tilstrækkelig præcision og nøjagtighed.
6. **Linearitet:** Om der er en lineær sammenhæng mellem signal og koncentration i det relevante måleområde.
7. **Robusthed:** Hvor følsom metoden er over for små variationer i forholdene (fx temperatur, pH, laborant).
8. **Recovery / Genfinding:** Hvor stor en andel af stoffet, der kan genfindes i prøven efter prøveforberedelse og analyse.

Den LC-HRMS-metode, som er udviklet i dette projekt, adskiller sig imidlertid fra traditionelle target-analyser. Formålet med denne metode er ikke præcis kvantificering af kendte stoffer, men derimod at fungere som et screeningsværktøj, der muliggør detektion og identifikation af ikke-på-forhånd fastlagte stoffer i drikke- og grundvand. Her er det essentielt at sikre, at metoden er sensitiv nok til at identificere disse ukendte forbindelser på et lavt koncentrationsniveau (typisk omkring 0,01 µg/L til 0,1 µg/L), samt at metodens anvendelsesområde (det kemiske rum) defineres klart.

Da metodens anvendelse adskiller sig fra klassiske target-analyser, kan traditionelle valideringsparametre ikke ukritisk overføres. I stedet lægges vægten i denne validering på en karakterisering af metodens evne til at påvise stoffer med forskellige kemiske egenskaber og en vurdering af robustheden over for variationer i prøvekompositionen og analyttype.

Normalt vil der ved target-metoder blive foretaget en undersøgelse af linearitet for at verificere, at der er en proportional sammenhæng mellem analytsignal og koncentration i det relevante måleområde. Ved HRMS-analyser uden referencestandarder er det imidlertid ikke muligt at kortlægge linearitet, da denne i høj grad afhænger af stoffernes individuelle ioniseringseffektivitet og andre matrixrelaterede forhold. HRMS-metoder som eksempelvis TOF udviser desuden ofte ringere linearitet sammenlignet med klassiske kvantitative teknikker som eksempelvis quadrupol-detektion.

Til valideringen blev der udvalgt i alt 89 relevante stoffer. Formålet var at skabe et valideringssæt, som repræsenterer miljørelevante stoffer med forskellig polaritet, molekylvægt, kemisk struktur og funktionelle grupper for på denne måde at vurdere metodens anvendelighed og dens begrænsninger. Valget af stofferne var baseret på samme tilgang, som blev anvendt for de 38 stoffer, som blev anvendt under metodeudviklingen. I forbindelse med valideringen blev der tilføjet stoffer fra GRUMO/boringskontrol-Top-25- listen og PMT-

stoffer detekteret i Schulz mfl., 2019. Desuden blev ny faglitteratur om screening i grundvand- og drikkevand gennemgået. Der blev således tilføjet stoffer fundet i UBA's PMT-ranking (Peter Arp et al., 2023). Herfra blev især stoffer med priority A tilføjet valideringsstofflisten. Til sidst blev stoffer, som for nylig blev fundet i danske grundvandsprøver (fx INSA-screening (Ida Balsby Jakobsen, 2023)) tilføjet.

De udvalgte stoffer blev analyseret efter den udviklede protokol. Metodens følsomhed og detektionsgrænse blev undersøgt i tre forskellige koncentrationer i hanevand (0,01 µg/L, 0,1 µg/L og 1 µg/L). Alle prøver blev opkoncentreret med den udviklede SPE-metode i triplikater som beskrevet og analyseret med RP og HILIC i positiv og negativ mode.

I forbindelse med forsøgene blev metodens selektivitet / specificitet, nøjagtighed, præcision, detektionsgrænse og genfindning undersøgt. Kvantifikationsgrænse og linearitet er ikke omfattet af valideringen.

12.2 Valideringsresultater

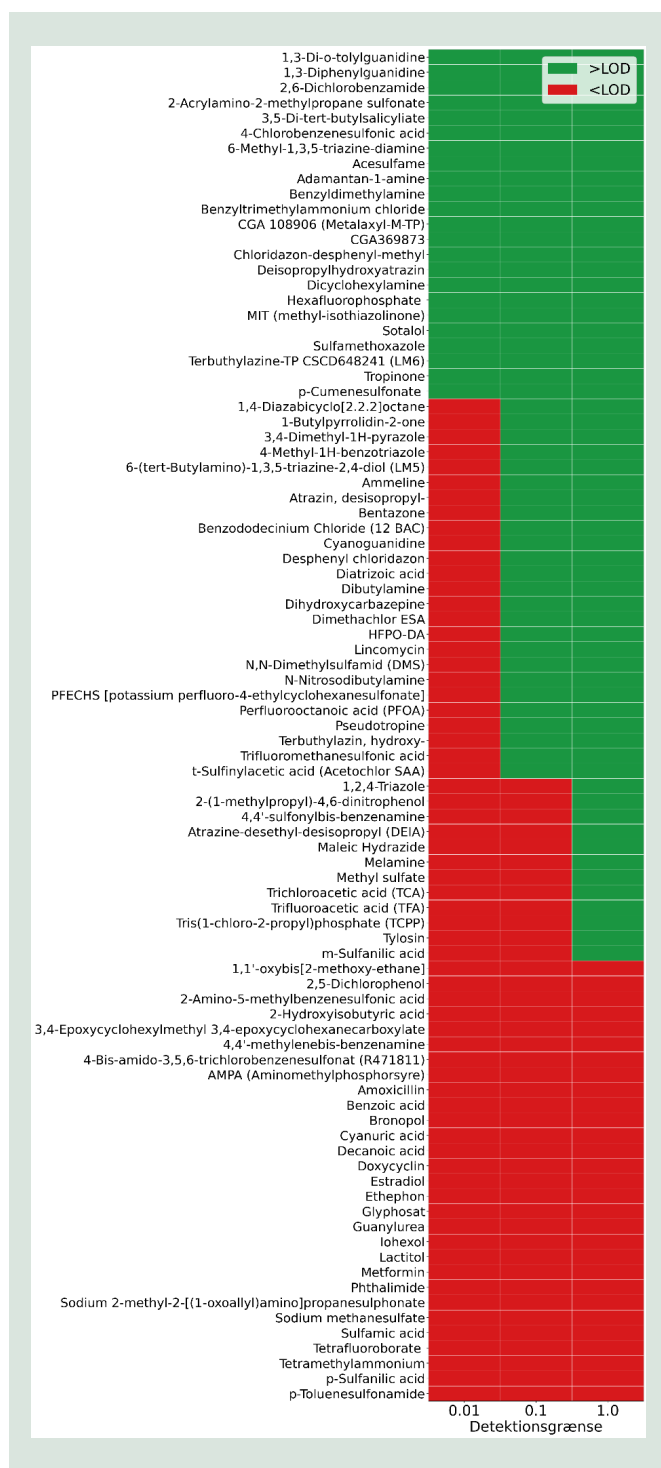
12.2.1 Detektion

TABEL 23 herunder viser, hvor mange af stofferne i valideringsblandingen, som kan identificeres ved analysen i spiket hanevand. I FIGUR 17 fremgår de koncentrationer, ved hvilke de enkelte stoffer er blevet detekteret. Fordelingen af detektioner fordelt på analytiske platforme er angivet i FIGUR 18.

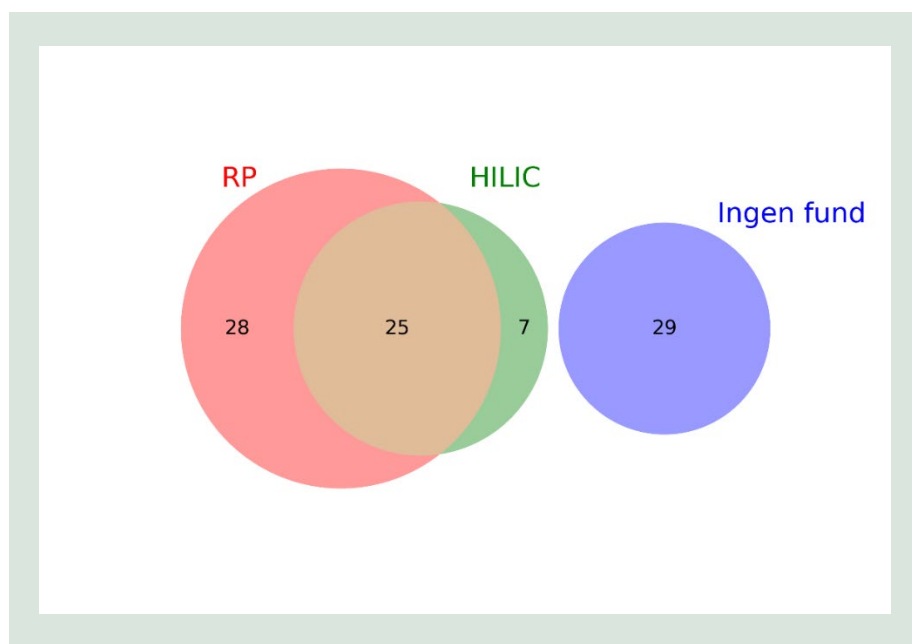
TABEL 23. Detektion af stoffer fra valideringsblandingen.

	Antal	Procent (%)
Komponenter der påvises ved 0,01 µg/L	23/89	26
Komponenter der påvises ved 0,1 µg/L	48/89	54
Komponenter der påvises ved 1 µg/L	60/89	67

En række forbindelser i valideringsblandingen detekteres som det fremgår ikke med metoden. For de fleste skyldes det, at de er meget små og polære, hvilket medfører dårlig retention. Dette gælder bl.a. metformin, guanylurea, tetramethylammonium, 2-hydroxyisobutyric acid og 1,1'-oxybis[2-methoxy-ethane]. Andre stoffer som AMPA, glyphosat og estradiol kræver specifikke eluenter og derivatisering for at kunne fastholdes og ioniseres korrekt. For amoxicillin, bronopol og ethephon er der muligt, at stofferne nedbrydes pga. fysisk/kemiske forhold såsom varme og pH.



FIGUR 17. Fordelingen af påviste stoffer for hhv. reversed-phase og HILIC.

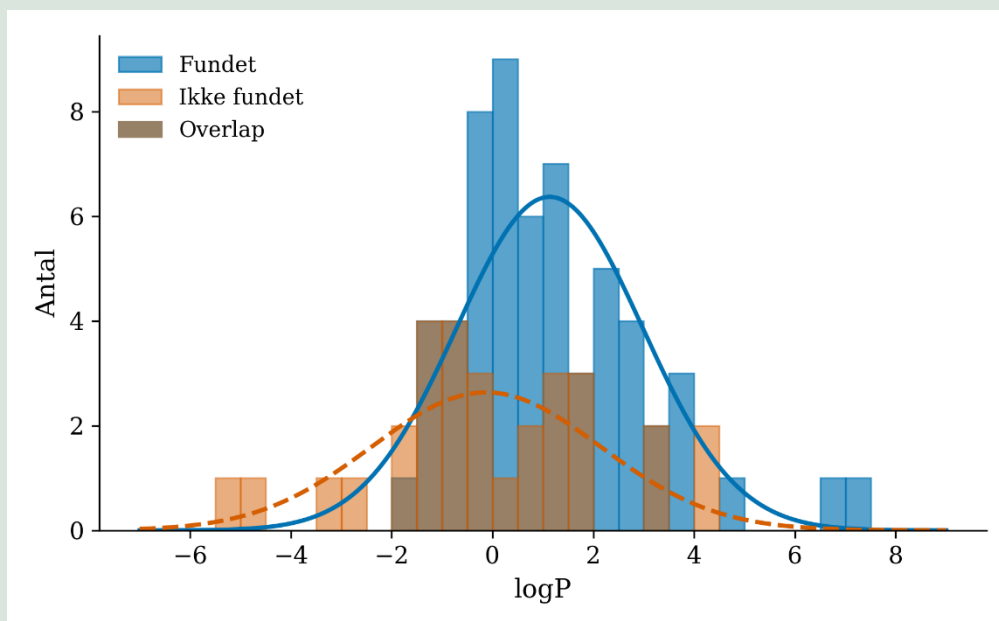


FIGUR 18. Fordelingen af fund på tværs af metoderne (1 µg/L, RP og HILIC).

12.2.2 Effekt af polaritet

Fordelingen af påviste/ikke-påviste stoffer som funktion af stoffernes polaritet er vist i FIGUR 17. Påviste forbindelser spænder fra LogP $-1,8$ til $7,4$ (median $0,8$; 25.-75.-percentil $-0,2$ til $2,25$), hvilket viser en klar overvægt af let til moderat hydrofobe stoffer. 71 % har LogP ≥ 0 , og 57 % ligger i intervallet $0-3$. En mindre, men vigtig andel er mere udtalt hydrofobe: ca. 9 % ligger i logP $3-4$, og 5 % ligger > 4 (op til $7,4$), hvilket indikerer potentiale for sorption til partikler/organisk materiale og retention i matrices. Som det ses, påvises også en del polære stoffer ved metoden (LogP < 0 : 29 %).

Til sammenligning er de ikke-detekterede stoffer generelt mere polære (median $-0,4$; 25.-75.-percentil $-1,28$ til $1,25$). Denne forskydning mod lavere LogP understøtter, at sandsynligheden for detektion stiger fra negative mod moderat positive LogP-værdier. Enkelte meget hydrofobe stoffer (højt LogP) fremstår som undtagelse fra reglen om, at denne type stoffer påvises med metoden. Samlet peger LogP-mønstret altså på, at metoden er egnet for forbindelser i området let-moderat hydrofobe (LogP $\sim 0-3$) mens både meget polære stoffer (LogP < 0) og stærkt hydrofobe stoffer (LogP > 4) påvises mindre effektivt. Overordnet set er fordelingen også påvirket af valget af teststoffer.



FIGUR 19. Fundne (blå) og ikke fundet stoffer (rød) inkluderet i valideringen. Til hvert af datasættene er der fittet en gaussisk funktion. For at kunne visualisere overlappene korrekt, de tilfælde hvor der er både "Fundet" og "Ikke fundet" tilfælde, har disse fået farven brun.

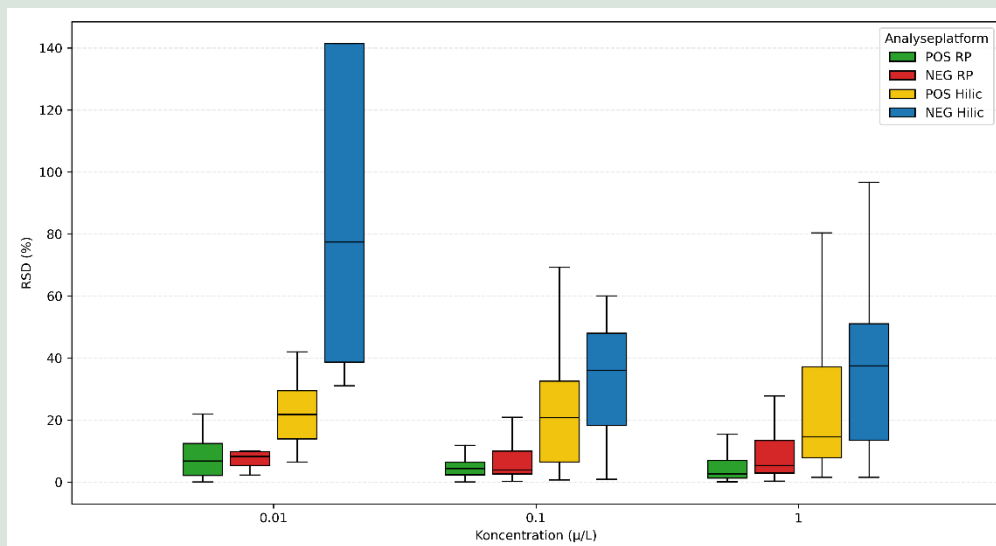
12.2.3 Teknisk variation

Den tekniske variation repræsenterer den instrumentelle usikkerhed ved analysen. Denne variation kvantificeres ved hjælp af den relative standardafvigelse (RSD), som giver et mål for analysens præcision og reproducerbarhed.

Ved analyse på ppb-niveau ($\mu\text{g/L}$) tilstræbes en RSD under 10 %, hvilket indikerer god reproducerbarhed. En RSD under 20 % anses generelt for acceptabel, mens værdier over 20 % kan indikere problemer med metodens stabilitet.

For at vurdere den tekniske variation er hver prøve injiceret tre gange. Herefter er RSD beregnet, og variationen er vist i FIGUR 20. Bedst repeterbarhed er fundet for RP POS: medianer 6,76 % (0,01 $\mu\text{g/L}$), 4,32 % (0,1 $\mu\text{g/L}$) og 2,62 % (1 $\mu\text{g/L}$). Hvilket tydeligt vidner om en metode der giver meget reproducerbare resultater. Omvendt viser HILIC markant større variationer, med medianer over 15 % for begge ioniseringer og alle koncentrationsniveauer. Det er tidligere beskrevet, at signalintensiteten falder igennem sekvensen for HILIC, hvilket kan tyde på, at metoden kan have udfordringer ved længere sekvenser. Dette er samme effekt som observeres her.

Det er indtrykket fra metodeudviklingen, at analysesystemet generelt belastes mere ved høje koncentrationer af ACN sammenlignet med MeOH og det kan derfor også være en årsag til den observerede variation. Der er behov for yderligere arbejde for at gøre HILIC platformen mere robust.



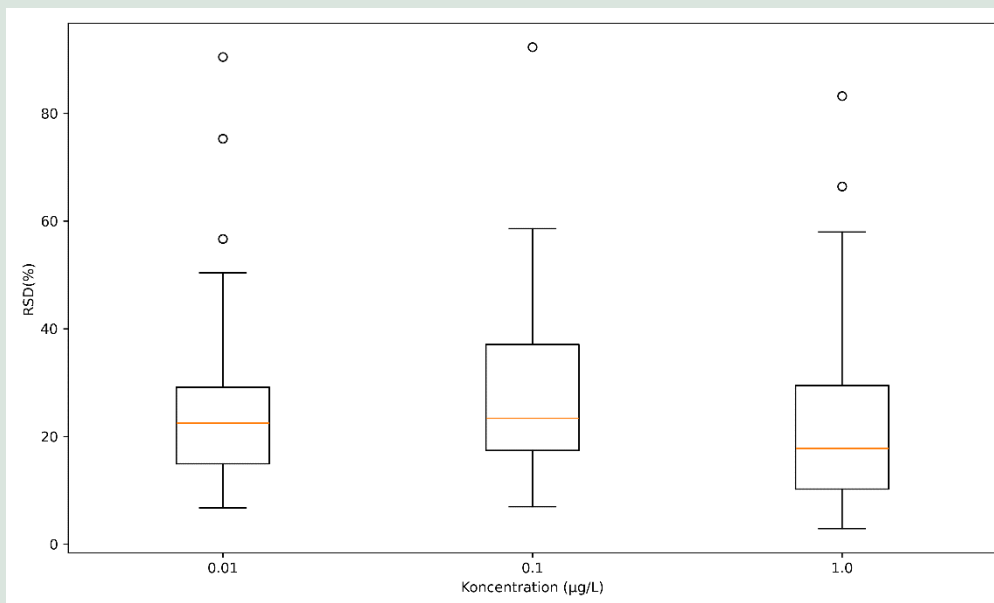
FIGUR 20. Boxplot for den tekniske variation for analyseplatformene for de tre forskellige koncentrationsniveauer [0,01 ; 0,1 ; 1] µg/l.

12.3 Reperterbarhed af prøveforberedelse

For at vurdere repeterbarheden af SPE-prøveforberedelsen blev der udarbejdet tre uafhængige replikater (prøve A, B og C) fra den samme vandprøve i koncentrationerne 0,01 µg/L, 0,1 µg/L og 1 µg/L. Disse blev analyseret på samme dag for at bestemme variationen under identiske betingelser. For at mindske betydningen af den tekniske variation, blev der valgt den analytiske platform med den laveste RSD for det enkelte stof til undersøgelse af variationen mellem prøveforberedelsen.

12.3.1 Resultater prøveforberedelse

RSD(%) viser en samlet median på 21 % (Q1/Q3: 14,0/34,2), med en svag tendens til bedre repeterbarhed ved højeste koncentration (FIGUR 21). Q1 (første kvartil) er 25-percentilen: 25 % af observationerne ligger under Q1. Q3 (tredje kvartil) er 75-percentilen: 75 % af observationerne ligger under Q3 (eller 25 % over Q3). Ved 0,01 µg/L ligger medianen på 22,45 % (Q1/Q3: 14,90/29,12), hvilket indikerer moderat variation men en relativt kompakt fordeling. Ved 0,1 µg/L er medianen 23,35 % (Q1/Q3: 17,39/37,03), altså lidt højere medianværdi og bredere spredning. Ved 1,0 µg/L falder medianen til 17,77 % (Q1/Q3: 10,21/29,45), og øvre kvartil er lavere end ved 0,1 µg/L, hvilket peger på færre høje RSD-værdier. Overordnet tyder tallene på, at repeterbarheden er bedst ved 1,0 µg/L, hvilket var forventeligt. Resultaterne er dog ikke signifikant forskellige mellem niveauerne. Overordnet leverer metoden en fin repeterbarhed med en samlet median på 21% RSD.



FIGUR 21. Boxplot for repeterbarheden af prøveforberedelsen for de tre forskellige koncentrationsniveauer [0,01 ; 0,1 ; 1] µg/l.

12.4 Interlaboratorie sammenligning

12.4.1 Harmonisering og standardisering

Et kerneprincip i kommercielle og akkrediterede analyser er, at analysens resultat er uafhængigt af laboratorium. For non-target- og suspect-screening af miljøprøver findes der imidlertid ingen danske standarder eller nationale retningslinjer, hvilket vanskeliggør sammenlignelighed på tværs af analytiske platforme, databehandlingssoftware og databehandlingsstrategier. Gentagne sammenligninger, hvor identiske miljøprøver analyseres ved non-target-screening i forskellige laboratorier, har tydeliggjort behovet for harmonisering af både prøveforberedelse, instrumentparametre, identifikationskriterier og rapporteringspraksis.

Internationalt er der de senere år publiceret retningslinjer, som kan fungere som fagligt udgangspunkt for en dansk standardisering, herunder tyske anbefalinger koordineret via Water Chemistry-miljøet (fx Jewell m.fl., 2021), Hollandske retningslinjer (Schulz m.fl., 2019; NTA 8033:2021 NL) samt NORMAN-netværkets guideline for suspect- og non-target-screening (Hollender m.fl., 2023). Disse tiltag peger samlet på, at kommercielle HRMS-analyser kan harmoniseres.

Baseret på dette blev den udviklede metode evalueret i et lille interlaboratoriestudie med henblik på at vurdere robusthed af den udviklede metode, hvis den overføres mellem laboratorier, hvilket er et første skridt mod harmonisering i en dansk kontekst.

12.4.2 Deltagere

Tre laboratorier deltog i sammenligningen: Analytisk Kemi Gruppen ved Københavns Universitet, GEUS og Eurofins Miljø A/S (laboratorierne er i det følgende blevet anonymiseret). Prøveforberedelse, instrumentel analyse og databehandling blev udført i de respektive laboratorier efter de udviklede metoder. Alle anvendte LC-HRMS-platforme og ens LC-

kolonner, men der forekom variationer i apparatkonfigurationer og kørselsmetoder (TABEL 24, herunder).

TABEL 24. Oversigt over anvendt apparatur mm.

Parameter	LAB1	LAB2	LAB3
HPLC-producent	Thermo	Elute OLE (Bruker)	Elute-HT (Bruker)
MS-detektor	Orbitrap (Thermo)	timsTOF Pro, (Bruker)	Impact 2 (Bruker)
Dataopsamling	DDA	DDA	DIA
Ion-kilde	ESI	VIP-HESI	VIP-HESI
Dataanalyse	MSDial	MetaboScape (og TASQ)	TASQ

12.4.3 Set-up

Hvert laboratorium modtog to hanevandsprøver (spikede), en matrixblank (ikke-spiket hanevand) samt beholdere til fremstilling af en laboratorieblind (LC-MS-grade vand). De to spikede prøver bestod af:

- en "kendt" blanding med oplyst indhold og
- en "ukendt" blanding, hvor laboratorierne samtidig fik en kort screeningsliste bestående af de faktiske stoffer i prøven suppleret med ekstra forbindelser ("negativer") til vurdering af specificitet i databehandlingen.

Prøverne blev forberedt af Eurofins og distribueret i ens volumen (500 mL) til hvert laboratorium i mærkede flasker. Spiking blev udført ved tilsætning af enten et kendt- eller ukendtmix (400 µL) til udmålte mængder hanevand i 2 L redcap-flasker. Efter grundig homogenisering blev prøverne fordelt i mindre flasker. Den kendte prøve havde en koncentrationsrange på 0,01–1 µg/L, mens den ukendte prøve havde koncentrationer på 0,02–0,5 µg/L (TABEL 25). Prøverne blev spiket til forskellige koncentrationer for at vurdere metodens egnethed ved varierende niveauer. Spiking af "ukendt prøve" blev hos Eurofins udført af personale, der ikke var direkte involverede i PESTICID-projektet. Analyser og databehandling blev således gennemført af personale, som ikke kendte sammensætningen af den ukendte prøve.

Alle prøver blev lavet i duplikat og mærket med laboratorie-ID samt en ekstra prøve til eventuelle gentagelser. Derudover blev der udarbejdet kontrolopløsninger i form af et standardmix til kvalitetssikring samt et mix af interne standarder (IS-mix), som blev sendt med til brug i analyserne.

Prøveforberedelse blev udført af hvert laboratorie efter fremsendt SOP (Bilag 1 og 2), og alle prøver blev kørt i duplikat. Analysen omfattede både RP-LC og HILIC i positiv og negativ ESI for at dække et bredt polaritetsspektrum. Databehandlingen fulgte laboratoriets egne workflows (MS-software), men med den fælles screeningsliste som indgangspunkt (Bilag 5).

Stofferne, der indgik i screeningslisten, blev udvalgt ud fra en række praktiske og metodiske hensyn. For det første skulle de være kendt for at kunne detekteres med den anvendte metode, så vi sikrede, at analysen ville være relevant og operationel. Derudover blev der lagt vægt på, at stoffernes molekylære egenskaber fordelte sig bredt i forhold til både molekylmasse (MF) og logP, for at dække et repræsentativt kemisk rum.

Resultaterne blev rapporteret i den fremsendte rapportskabelon og returneret til Eurofins til samlet vurdering. Dette set-up muliggør objektiv sammenligning af detektionshyppighed og identifikationssikkerhed samt analyse af, hvilke parameterforskelle der faktisk påvirker fundene.

TABEL 25. Stoffer og koncentrationen i spikede prøver.

Analyt	Kendt mix (µg/L)	Ukendt mix (µg/L)
1,3-Diphenylguanidine	-	0,05
2-(1-methylpropyl)-4,6-dinitrophenol	0,02	-
4,4'-sulfonylbis-benzenamine (peak 1)	0,02	-
4-Bis-amido-3,5,6-trichlorobenzenesulfonat (R471811)	0,05	-
4-Chlorobenzenesulfonic acid	0,05	-
Adamantan-1-amine	0,05	-
Atrazine-desisopropyl	0,1	0,05
CGA 108906 (Metalaxyl-M-TP)	-	0,5
CGA369873	-	0,1
Desphenyl chloridazon	-	0,1
Diatrizoic acid (Na ⁺)	-	0,05
Deisopropylhydroxyatrazin	0,05	0,05
Lincomycin	0,1	-
p-cumenesulfonate	0,1	0,02
Pentadecafluorooctanoic acid (PFOA)	-	0,02
p-Sulfanilic acid	0,01	0,1
Sotalol	-	0,05
Sulfamethoxazole	1	-
Terbutylazine-TP MT23 (LM5)	-	0,02
Tri-(2-chloroisopropyl) phosphate (TCPP)	0,01	-

12.4.4 Resultater

12.4.4.1 Den kendte prøve

Den kendte prøve indeholdt 12 komponenter. Lab 1 og 2 detekterede hver 10 ud af de 12 stoffer, mens Lab 3 detekterede 9 (TABEL 27 og TABEL 26). Tabellerne viser hvilke enkeltstoffer de enkelte laboratorier påviste i prøverne (TABEL 30) og samlet (TABEL 29).

TABEL 26. Fund i kendt og ukendt prøve for de tre laboratorier. Et X betyder et fund for det gældende laboratorie. Den grønne markering illustrerer hvilke stoffer der var tilsat mixet. Diatrizoic acid er udeladt af sammenligningen grundet fejl ved produktionen af interlab-prøverne.

ID	Kendt Prøve			Ukendt prøve		
	LAB1	LAB2	LAB3	LAB1	LAB2	LAB3
1,3-Diphenylguanidine				X	X	X
2-(1-methylpropyl)-4,6-dinitrophenol	X	X	X			

ID	Kendt Prøve			Ukendt prøve		
	LAB1	LAB2	LAB3	LAB1	LAB2	LAB3
4,4'-sulfonylbis-benzenamine (peak 1)	X	X	X			
4-Bis-amido-3,5,6-trichlorobenzenesulfonat (R471811)	X	X				
4-Chlorobenzenesulfonic acid	X	X	X			
Adamantan-1-amine	X	X	X			
Atrazine-desisopropyl	X	X	X	X	X	X
CGA 108906 (Metalaxyl-M-TP)				X	X	X
CGA369873				X	X	X
Deisopropylhydroxyatrazin	X	X	X	X	X	X
Desphenyl chloridazon				X	X	X
Lincomycin	X	X	X			
p-Cumenesulfonate		X	X			
Pentadecafluorooctanoic acid (PFOA)				X	X	X
p-Sulfanilic acid	X			X		
Sotalol				X	X	X
Sulfamethoxazole	X	X	X			
Terbutylazine-TP MT23 (LM5)					X	X
Tri-(2-chloroisopropyl) phosphate (TCPP)						

TABEL 27. Fund i prøverne mellem de forskellige laboratorier, den kendte prøve indeholdte 11 stoffer og den ukendte prøve indeholdt 11 stoffer.

	Kendt prøve			Ukendt prøve		
	Lab1	Lab2	Lab3	Lab1	Lab2	Lab3
Antal Fund	10	10	9	9	9	9

Ingen af laboratorierne detekterede tri-(2-chloroisopropyl) phosphate (TCPP). Dette er forventeligt, da stoffet blev testet ved meget lav koncentration (0,01 µg/L). Under metodevalideringen hos Eurofins kunne TCPP kun detekteres i den højeste testede koncentration (1 µg/L). En af udfordringerne ved TCPP er et forholdsvis højt baggrunds niveau, der gør det svært at adskille indhold i prøver fra blindniveauet.

p-Sulfanilic acid blev kun detekteret af Lab1. Dette stemmer overens med valideringsresultaterne, hvor stoffet generelt var svært at detektere, og kun ved høje koncentrationer. Det indikerer desuden, at der kan være instrumentelle forskelle, der påvirker følsomheden. Lab1 var dog i stand til at detektere p-sulfanilic acid i både den ukendte og den kendte prøve.

Lab3 detekterede ikke 4-bis-amido-3,5,6-trichlorobenzenesulfonat (R471811). Stoffet er kendt for at være ustabil og blev i valideringen påvist ved brug af HILIC-metoden, som tidligere beskrevet var forskellig i performance mellem laboratorier. Dermed kan den manglende detektion meget vel skyldes instrumentelle forskelle.

12.4.4.2 Den ukendt prøve

Den ukendte prøve var spiket med 11 stoffer. Laboratorierne fik tilsendt en screeningsliste med 29 mulige stoffer (Bilag 8.2). Alle tre laboratorier detekterede 9 ud af de 11 spikede stoffer (81%).

Ingen laboratorier detekterede p-Cumenesulfonat i den ukendte prøve, selvom stoffet blev fundet af to laboratorier i den kendte. I den ukendte prøve var stoffet dog tilsat i en fem gange lavere koncentration, hvilket kan forklare det manglende fund, idet niveauet formentlig har ligget under detektionsgrænsen for metoden. Dette kan også forklare, at det ene laboratorium ikke påviste den i den kendte prøve, da den har ligget omkring detektionsgrænsen og derfor været følsom overfor forskelle i følsomheder mellem instrumenter.

Terbutylazine-TP MT23 (LM5) blev detekteret af LAB2 og LAB3, men ikke af LAB1. Det er her ikke muligt at pege på en direkte årsag. For p-Sulfanilic gjaldt det samme som for den kendte prøve.

Ingen af de deltagende laboratorier har rapporteret falsk positive resultater.

Schulz W. et al (17) gennemførte en tilsvarende interlaboratorie sammenligning. I sammenligningen deltog 12 laboratorier med TOF-instrumenter. Ét laboratorium påviste 22 af 24 (92%) tilsatte stoffer (bekræftede fund), mens to laboratorier ikke påviste nogen af de tilsatte stoffer med sikkerhed. De øvrige laboratorier fordelte sig mellem 12% og 71% med majoriteten fra 40-60%. Den udviklede metode i dette projekt synes således at give sammenlignelige resultater med størstedelen af laboratorierne i den noget større undersøgelse publiceret af Schultz et al. I parentes bemærket dokumenterer resultaterne fra Schultz et al. også behovet for en standardiseret kvalitetssikret metode for dette område.

Miljøstyrelsen udgav i 2021 rapporten HITLIST2 (Frøkjær & Hansen, 2021). Rapporten sammenligner performance ved brug af en række forskellige kromatografiske platforme i samspil med HRMS-detektion (LC-HRMS, GC-HRMS og AES-HRMS). Til prøvepræparation/opkoncentrering blev anvendt fastfaseekstraktion (SPE) over to forskellige SPE adsorbenter. Genfinding blev vurderet på baggrund af en blanding af 967 potentielt forekommende stoffer i drikkevand/grundvand (0,1 µg/L). Undersøgelsen viste en genfinding på 51% ved brug af væskechromatografi (LC-HRMS) som kromatografisk analytisk princip samt 54% hvis LC-HRMS blev kombineret med ionkromatografi (AES-HRMS) og op til 70% hvis alle tre kromatografiske platforme blev taget i brug. Til sammenligning genfinder den i dette projekt udviklede metode 54% på samme koncentrationsniveau.

12.4.4.3 Opsummering af interlaboratoriestudie

Det gennemførte interlaboratoriestudie viser, at den udviklede prøveforberedelses- og analysemetode giver sammenlignelige resultater mellem de deltagende tre laboratorier. I den kendte prøve fandt laboratorierne 8–9 af 11 tilsatte stoffer, og i den ukendte prøve fandt alle 8 af 11.

Afvigelserne kan forklares ved lave koncentrationer tæt på detektionsgrænser (fx TCPP og p-cumenesulfonat), stofs specifik ustabilitet (R471811) samt instrumentelle forskelle, der påvirker følsomhed (fx p-sulfanilsyre). For de instrumentelle forskelle er der tale om forskelle, der kan være svære at gøre noget ved. Det viser dog behovet for at nye metoder testes på det samme datasæt for at evaluere deres performance i forhold til hinanden, også uafhængigt af forskellige instrumenter.

Datamaterialet er begrænset både hvad angår antallet af deltagende laboratorier, antallet af prøver og antallet af stoffer som indgår i studiet og det skal naturligvis tages med i betragtning i forbindelse med evalueringen, men der er ikke fundet noget i den gennemførte interlaboratoriesammenligning, som peger på at den udviklede metode ikke lader sig overføre til andre laboratorier.

Resultaterne understøtter behovet for en yderligere standardisering af instrumentparametre, identifikationskriterier og rapportering for at sikre fuld sammenlignelighed på tværs af analytiske platforme og databehandlingsmetoder.

12.5 Sammenfatning

Valideringen, som blev gennemført på et sæt af 89 stoffer som er relevante i miljøsammenhæng. I hanevand påvistes 26 % af 89 stoffer ved 0,01 µg/L, 54 % ved 0,1 µg/L og 67 % ved 1 µg/L; manglende fund skyldtes især meget små/polære eller ustabile forbindelser samt behov for særlige betingelser (fx AMPA/glyphosat/estradiol).

Metoden er mest effektiv for let-moderat hydrofobe stoffer (LogP ca. 0–3), mens både meget polære (LogP < 0) og stærkt hydrofobe (LogP > 4) stoffer påvises sjældnere. Den tekniske præcision er god for RP POS (median RSD ~2,6–6,8 %), men HILIC viser større variation og behov for yderligere robusthed. Prøveforberedelsen (SPE) er synes repeterbar (samlet median RSD 21 %, svagt bedre ved 1 µg/L).

Sammenlignet med andre undersøgelser synes den i denne undersøgelse udviklede metode baseret på dual væsekromatografi med HRMS detektion (RP-HRMS og HILIC HRMS) at give sammenlignelige genfindingsresultater, når der sammenlignes med andre undersøgelser. Det skal dog bemærkes, at sammenligning mellem undersøgelser kan være forbundet med usikkerhed, fordi der ikke er anvendt samme mix af stoffer i undersøgelserne.

For at afprøve metoden på reelle prøver er der i samarbejde med HOFOR, Vand Center Syd og Aarhus Vand udtaget tre prøver i dobbeltbestemmelse samt en blindprøve. Prøverne indgår ikke i denne rapport, men vil blive behandlet med den validerede metode, og resultaterne vil blive rapporteret til de respektive forsyningsselskaber.

13. Suspect-screeningsliste

Mens almindelige target-analyser er målrettet enkelte udvalgte stoffer, så bygger HRMS-analyser på generering af meget store dataset, som efterfølgende skal gennemgå databehandling mhp identifikation af tilstedeværende stoffer. Her er der forskellige indgangsvinkler.

En fuldstændig non-target-screening er både meget tidskrævende og meget bekostelig. Det er derfor som regel et godt alternativ at opstille en liste over stoffer, som vides at kunne være til stede i den pågældende prøvetype og at målrette analysen mod de stoffer, og som den enkelte metode kan detektere. Disse suspect screeninglister kan være meget omfattende og indeholde 1000-vis af stoffer. Brug af suspect screening muliggør således screening for et meget stort antal stoffer, som med en vis sandsynlighed kan optræde i den aktuelle prøvetype for væsentligt lavere omkostninger end en fuld non-target analyse af samme prøve.

For flere detaljer omkring databehandling henvises til rapporten "Non-target screening som værktøj til risikoanalyse af grundvandstrusler" (Bollmann et al., 2024).

Udarbejdelsen af en effektiv suspect-screeningsliste kan være afgørende for at få succes med brede LC-HRMS-screeninger og er ikke uden udfordringer. Opstilling af en plausibel liste kræver en detaljeret viden om lokale forureningskilder, viden om anvendelsen af kemikalier i oplandet og viden om transportveje og nedbrydningsmønstre i miljøet samt viden om hvilke stoffer metoden kan påvise.

Når man sammensætter listen, er det vigtigt at være opmærksom på følgende:

1. Listen skal være tilpasset den specifikke problemstilling. Den skal indeholde så mange som mulige relevante stoffer (f.eks. pesticider i landbrugsområder eller migrationsstoffer i vandbanen), men samtidig være specifik nok til, at der ikke opnås en lang række falsk-positive hits. Derfor er det vigtigt at inddrage så meget viden om den specifikke problemstilling, som muligt. En kombination af historisk viden om forureninger i området og aktuelle anvendelsesmønstre er vigtig i den forbindelse.
2. Listen bør prioritere stoffer baseret på deres potentielle risici (toksicitet, persistens, bioakkumulering).
3. Listen skal også omfatte potentielle transformationsprodukter. Mange miljøfremmede stoffer nedbrydes i miljøet til andre forbindelser, såkaldte transformationsprodukter, som kan være lige så eller endda mere skadelige end moderstoffet. Det er derfor vigtigt at medtage relevante og forventede nedbrydningsprodukter på listen.
4. Viden om hvilke stoffer den anvendte metode kan påvise ("det kemiske rum")

Ved at tage højde for disse faktorer kan man skabe en dynamisk og målrettet suspect screeningsliste, der markant forøger chancen for at identificere relevante miljøfremmede stoffer. Samtidig reducerer det tidsforbruget til databehandling og er dermed med til at holde omkostningerne til analysen nede.

I forbindelse med projektet blev der udarbejdet en liste over 283 plausibelt forekommende organiske miljøfremmede stoffer i grundvand og drikkevand. Listen er baseret på indmeldinger fra projektpartnere og dækker over miljøfremmede stoffer fra en række kilder såsom pesticider/biocider, plastadditiver, tilsætningsstoffer til byggematerialer, rengøringsmidler mm. Listen indeholder foruden kemiske navne og CAS-numre også molmasser, SMILES, InChIs og PubChemIDs.

Listen er et eksempel på en suspect-liste. Metoden er derfor ikke testet overfor standarder af de 283 stoffer. Det er ikke muligt at afgrænse det kemiske rum af en metode med 100% sikkerhed. Hvorvidt de enkelte stoffer lader sig påvise ved en HRMS-analyse afhænger af mange faktorer herunder koncentrationer, forekomst af andre stoffer, det valgte analyseprincip etc. Der er således ikke garanti for, at den i dette projekt udviklede metode vil kunne påvise alle 283 stoffer på listen.

Listen, som er vedlagt denne rapport i excel-format, er ikke fyldestgørende for alle stoffer, der kan forventes i grundvand og drikkevand i Danmark. Listen fungerer som et eksempel på en liste, som kan udvides og tilpasses af myndigheder, vandforsyninger og laboratorier og kan løbende udvides efter behov. En liste af denne type er et dynamisk dokument og skal tilpasses det enkelte formål.

Der bliver arbejdet videre med listen i AQUAPLEXUS projektet.

14. Konklusion og perspektivering

14.1 Konklusion

Projektet PESTICID udspringer af de seneste år afsløringer af en stigende trussel fra fund af miljøfremmede stoffer i grundvandsboringer og drikkevand. Disse fund skaber bekymring blandt forbrugerne og udfordrer forsyningsselskabernes ambition om at levere rent drikkevand uden uønskede stoffer. Klassiske target-analyser, som normalt anvendes i forbindelse med analyser af grund- og drikkevand, giver ikke det samme overblik over indhold af miljøfremmede stoffer i en prøve. Omvendt giver de nye NTS metoder ikke altid en garanti for, at de stoffer, der findes ved analysen, virkelig er i prøven (falske positive) og heller ikke en særligt præcis koncentrationsbestemmelse. Den største og mest anvendelige viden i miljøovervågningen fås derfor ved en kombineret anvendelse af target- og NTS-analyser.

Projektet PESTICID har udviklet en metode til prøveforberedelse og analyse af et såkaldt kemisk fingeraftryk (NTS) af grund- og drikkevand baseret på LC-HRMS. Formålet har været at udvikle en bred, robust og kommercielt tilgængelig screeningsmetode, der kan danne grundlag for at detektere både kendte og uventede forbindelser og samtidig muliggøre efterfølgende retrospektive analyser.

Den udviklede metode kombinerer opkoncentrering ved fastfaseekstraktion med en dual kromatografisk opsætning.

På prøveforberedelsesiden blev flere fastfasematerialer til SPE testet. Kulbaserede sorbenter viste sig at give den bredeste dækning. På baggrund af en række kriterier blev "Sep-Pak AC2" valgt. Eluering viste sig mest effektiv ved sekventiel basisk og sur eluering i acetonitril kombineret med kontrolleret inddampning. Vakuuminddampning (VEC) blev afprøvet som alternativ metode til SPE, men SPE gav flere sikre fund ved lave niveauer.

En systematisk screening for kolonner med 38 repræsentative stoffer førte til en dual opsætning med C18 Reversed Phase (RP) for bred robust dækning og BEH-Amide hydrophilic interaction kromatografi (HILIC) for små og polære forbindelser. For HILIC blev pH, buffer og injektionssolvens optimeret. Prøveforberedelse- og analysedelen af metoden er beskrevet i to separate SOP'er (se bilag 1 og 2).

Validering på et testsæt af 89 miljørelevante stoffer viste, at den samlende metode (prøveforberedelse med SPE og LC-HRMS analyse) påviser 26% af stofferne på et koncentrationniveau på 0,01 µg/L, 54% af stofferne på et koncentrationniveau på 0,1 µg/L og 67% ved et koncentrationniveau på 1 µg/L. Til sammenligning kan nævnes, at kvalitetskravet for pesticider i drikkevand er 0,1 µg/l. Det er primært små, meget polære forbindelser, som er udfordrende for metoden.

Sammenlignet med andre undersøgelser synes den udviklede metode – med forbehold for de anvendte testmix – at påvise samme andel af forekommende relevante mikroforureninger (teststoffer).

Et af formålene med dette projekt har været at udvikle en metode, som ville være realistisk at implementere på det kommercielle miljømarked i Danmark ud fra et økonomisk perspektiv.

Sammenlignet med metoden publiceret i HITLIST2 rapporten (Hansen et al., 2021) har den udviklede metode en række fordele i et kommercielt set-up. For det første er den udviklede metode baseret på ét kromatografisk princip (LC) modsat HITLIST2-metoden, som opererer med flere principper, hvis samme genfindingsprocent sættes som mål. Investering i og drift af to platforme som f.eks. LC-HRMS og AES-HRMS vil være væsentligt dyrere sammenlignet med én platform.

For det andet anvendes den nye metode én SPE ekstraktion modsat HITLIST-metodens to SPE kolonner og tager mindre prøvemængde i arbejde. Begge dele vil være tidsbesparende på et kommercielt laboratorium.

Projektet har udviklet en samlet QA/QC-pakke med SST-kontroller, isotopmærkede interne standarder, triplikatanalyser, blindprøver og forslag til rapportering af identifikationssikkerhed.

For første gang i Danmark er der lavet et interlaboratorie sammenligningsstudie indenfor HRMS-screeninger. Sammenligningen viste, at metoden giver betydelig træfsikkerhed på tværs af tre laboratorier med 9–10 af 11 tilsatte stoffer genfundet i både kendt og blindt sæt.

Projektet har beskrevet rammerne for datalagring af HRMS-rådata og introduceret en kvantitativ non-target analyse (qNTA)-tilgang, der kan estimere koncentrationer uden referencestandarder.

HILIC-metoden viste sig at kunne udvide det kemiske rum, som metoden dækker, mod stoffer med høj polaritet. Gennem projektet og under valideringen var det imidlertid også tydeligt, at HILIC-metoden ikke på nuværende tidspunkt er så robust som den del af metoden, som er baseret på Reversed-Phase C18 kromatografi. Overførsel af HILIC-delen mellem laboratorier viste sig også at kræve en tidskrævende laboratoriespecifik optimering.

Der er således udviklet og beskrevet en metode, som muliggør påvisning af ukendte miljøfremmede stoffer i grundvands- og drikkevandsprøver. Det er vigtigt at understrege, at metoder af denne type ikke med sikkerhed påviser alle tilstedeværende stoffer og projektet har da også vist, at specielt mindre og polære molekyler fortsat udgør en udfordring. Hvis der ønskes detektion af en større andel af miljøfremmede stoffer, vil det kræve yderligere optimering af HILIC-metoden og muligvis introduktion af supplerende analytiske platforme. Det vil dog som anført i rapporten også fordyre analyserne betydeligt i et kommercielt marked.

Metoden er tilgængelig på minimum ét kommercielt laboratorium i Danmark. På baggrund af metodebeskrivelserne i projektet er udrulning til andre laboratorier mulig.

14.2 Perspektivering og næste skridt

Som nævnt er metoden kommercielt tilgængelig på nuværende tidspunkt. Det er dog vigtigt at være opmærksom på, og som det også er dokumenteret, at metoden ikke sikrer, at alle miljøfremmede stoffer i en prøve påvises. I parentes bemærket vil det formentlig aldrig blive muligt for noget laboratorium at gøre dette.

Der er en række muligheder for at forbedre metodens performance og dens dækningsområde:

- Forbedring af HILIC-metodens performance (mindre variation, større robusthed i forbindelse med overførsel mellem laboratorier etc.)
- Undersøgelse af muligheder for prøveforberedelsesmetode som kan reducere risikoen for nedbrydning af indholdsstoffer efter prøveudtagning

- Udvikling af performancekriterier for analyse og databehandling, inklusiv brug af SST-kontrol på tværs af danske laboratorier. Kan med fordel suppleres med interlaboratoriestudier.
- Forbedring af identifikationssikkerheden via enighed om at anvende en eller flere bredt anerkendte kuraterede databaser og biblioteker som f.eks. MassBank.
- Implementering af kvalitetssikrede kvantificeringsmodeller på laboratorierne (f.eks. qNTA)

Metodens dækningsområde ("Det kemiske rum") kan også udvides ved at inddrage andre analytiske platforme, som f.eks. ionkromatografi (IC-HRMS), gaskromatografi (GC-HRMS) eller superkritiske væskrokromatografi (SFC-HRMS). Hvorvidt økonomien ved en sådan udvidelse står mål med udbyttet, vil altid afhænge af formålet med den enkelte undersøgelse.

15. Referencer

- Angeles, L. F., Singh, R. R., Vikesland, P. J., & Aga, D. S. (2021). Increased coverage and high confidence in suspect screening of emerging contaminants in global environmental samples. *Journal of Hazardous Materials*, 414, 125369. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125369>
- Bollmann, U. E., & Badawi, N. (2020). A fast and simple SPE-LC-MS/MS procedure for extraction and quantitative analysis of 1,2,4-triazole, N,N-dimethylsulfamide, and other small polar organic compounds in groundwater. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(23), 5683–5693. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02788-1>
- Bollmann, U. E., Kjølner, C., Badawi, N., Vidkjaer, N. H., & Thorling, L. (2024). *Non-target screening som værktøj til risikoanalyser af grundvandstrusler? DE NATIONALE GEOLOGISKE UNDERSØGELSER FOR DANMARK OG GRØNLAND KLIMA-, ENERGI-OG FORSYNINGSMINISTERIET.*
- Broadhurst, D., Goodacre, R., Reinke, S. N., Kuligowski, J., Wilson, I. D., Lewis, M. R., & Dunn, W. B. (2018). Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies. *Metabolomics*, 14(6), 72. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1367-3>
- Creusot, N., Casado-Martinez, C., Chiaia-Hernandez, A., Kiefer, K., Ferrari, B. J. D., Fu, Q., Munz, N., Stamm, C., Tlili, A., & Hollender, J. (2020). Retrospective screening of high-resolution mass spectrometry archived digital samples can improve environmental risk assessment of emerging contaminants: A case study on antifungal azoles. *Environment International*, 139, 105708. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105708>
- Diera, T., Thomsen, A. H., Tisler, S., Karlby, L. T., Christensen, P., Rosshaug, P. S., Albrechtsen, H.-J., & Christensen, J. H. (2023). A non-target screening study of high-density polyethylene pipes revealed rubber compounds as main contaminant in a drinking water distribution system. *Water Research*, 229, 119480. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.119480>
- Dürig, W., Lindblad, S., Golovko, O., Gkotsis, G., Aalizadeh, R., Nika, M.-C., Thomaidis, N., Alygizakis, N. A., Plassmann, M., Haglund, P., Fu, Q., Hollender, J., Chaker, J., David, A., Kunkel, U., Macherius, A., Belova, L., Poma, G., Preud'Homme, H., ... Ahrens, L. (2023). What is in the fish? Collaborative trial in suspect and non-target screening of organic micropollutants using LC- and GC-HRMS. *Environment International*, 181, 108288. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.108288>
- Frøkjær, E. E., & Hansen, M. (2021). *HITLIST2: Validation of a Non-Targeted Screening methodology for use in monitoring of xenobiotics in the aquatic environment.*
- GEUS. (2026, February 6). *Forekomst af pesticidstoffer i de almene vandværkers boringskontrol for perioden 1/10-2024 til 30/9-2025*. <https://www.geus.dk/Media/638953394794331522/Forekomst%20af%20pesticidstoffer%20i%20de%20almene%20vandv%C3%A6rkers%20boringskontrol%20i%20perioden%201.10.2024-30.9.2025.pdf>
- Hansen, M., Frøkjær, E., Aggerbeck, M. R., Gravert, T. K. O., Young, J. D. M. R. B., Vorkamp, K., & Bossi, R. (2021). *HITLIST : holistic non-targeted approach to determine pesticide and biocide residues in the aquatic environment.* Environmental Protection Agency.
- Höcker, O., Flottmann, D., Schmidt, T. C., & Neusüß, C. (2021). Non-targeted LC-MS and CE-MS for biomarker discovery in bioreactors: Influence of separation, mass spectrometry and data processing tools. *Science of The Total Environment*, 798, 149012. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149012>
- Hollender, J., Schymanski, E. L., Ahrens, L., Alygizakis, N., Béen, F., Bijlsma, L., Brunner, A. M., Celma, A., Fildier, A., Fu, Q., Gago-Ferrero, P., Gil-Solsona, R., Haglund, P., Hansen, M., Kaserzon, S., Kruve, A., Lamoree, M., Margoum, C., Meijer, J., ... Krauss, M. (2023). NORMAN guidance on suspect and non-target screening in environmental monitoring. *Environmental Sciences Europe*, 35(1), 75. <https://doi.org/10.1186/s12302-023-00779-4>

- Hollender, J., Schymanski, E. L., Singer, H. P., & Ferguson, P. L. (2017). Nontarget Screening with High Resolution Mass Spectrometry in the Environment: Ready to Go? *Environmental Science & Technology*, 51(20), 11505–11512. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02184>
- Huynh, N., Caupos, E., Soares Peirera, C., Le Roux, J., Bressy, A., & Moilleron, R. (2021). Evaluation of Sample Preparation Methods for Non-Target Screening of Organic Micropollutants in Urban Waters Using High-Resolution Mass Spectrometry. *Molecules*, 26(23), 7064. <https://doi.org/10.3390/molecules26237064>
- Ida Balsby Jakobsen. (2023, November 23). *Non-target screening af drikkevandet fra 17 vandværker*. Dansk Vandkonference 2023. <https://insa-drikkevand.dk/files/media/document/3%20Non-target%20screening%20af%20drikkevandet%20fra%2017%20vandv%C3%A6rker%20-%20Ida%20B.%20Jakobsen%20%2528INSA%20drikkevand%2529.pdf>
- ISO/CASCO. (2017). *ISO/IEC 17025:2017: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories* (3rd ed.). ISO.
- Joerss, H., Menger, F., Tang, J., Ebinghaus, R., & Ahrens, L. (2022). Beyond the Tip of the Iceberg: Suspect Screening Reveals Point Source-Specific Patterns of Emerging and Novel Per- and Polyfluoroalkyl Substances in German and Chinese Rivers. *Environmental Science & Technology*, 56(9), 5456–5465. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c07987>
- Kiefer, K., Müller, A., Singer, H., & Hollender, J. (2019). New relevant pesticide transformation products in groundwater detected using target and suspect screening for agricultural and urban micropollutants with LC-HRMS. *Water Research*, 165. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.114972>
- Malm, L., Liigand, J., Aalizadeh, R., Alygizakis, N., Ng, K., Frøkjær, E. E., Nanusha, M. Y., Hansen, M., Plassmann, M., Bieber, S., Letzel, T., Balest, L., Abis, P. P., Mazzetti, M., Kasprzyk-Hordern, B., Ceolotto, N., Kumari, S., Hann, S., Kochmann, S., ... Krue, A. (2024). Quantification Approaches in Non-Target LC/ESI/HRMS Analysis: An Interlaboratory Comparison. *Analytical Chemistry*, 96(41), 16215–16226. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.4c02902>
- Meichelke, J., Longrée, P., Singer, H., & Hollender, J. (2019). Vacuum-assisted evaporative concentration combined with LC-HRMS/MS for ultra-trace-level screening of organic micropollutants in environmental water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(12), 2555–2567. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01696-3>
- Montes, R., Rodil, R., Cela, R., & Quintana, J. B. (2019). Determination of Persistent and Mobile Organic Contaminants (PMOCs) in Water by Mixed-Mode Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 91(8), 5176–5183. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05792>
- Nanusha, M. Y., Frøkjær, E. E., Vernon, A. N., Jakobsen, I. B., Tüchsen, P. L., Olesen, I. H., Clausen, L., Trettenes, U. B., Jensen, J., Sanderson, H., Lindhardt, B., Albrechtsen, H.-J., & Hansen, M. (2025). Nontarget Analysis of Drinking Water from Danish Waterworks: Profiling of Organic Micropollutants and Health Risk Screening. *ACS ES&T Water*, 5(7), 4054–4066. <https://doi.org/10.1021/acsestwater.5c00280>
- Neuwald, I., Muschket, M., Zahn, D., Berger, U., Seiwert, B., Meier, T., Kuckelkorn, J., Strobel, C., Knepper, T. P., & Reemtsma, T. (2021). Filling the knowledge gap: A suspect screening study for 1310 potentially persistent and mobile chemicals with SFC- and HILIC-HRMS in two German river systems. *Water Research*, 204, 117645. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117645>
- Peter Arp, H. H., Hale NGI, S. E., Ulrich Borchers, O., Valkov, V., Wiegand IWW, L., an der Ruhr Daniel Zahn, M., Neuwald HSF, I., Karsten Nödler, I., Scheurer TZW-DVGW, M., & publisher, K. (2023). *UBA TEXTE 22/2023 A prioritization framework for PMT/vPvM Substances under REACH for registrants, regulators, researchers and the water sector*.
- Peter, K. T., Phillips, A. L., Knolhoff, A. M., Gardinali, P. R., Manzano, C. A., Miller, K. E., Pristner, M., Sabourin, L., Sumarah, M. W., Warth, B., & Sibus, J. R. (2021). Nontargeted Analysis Study Reporting Tool: A Framework to Improve Research Transparency and Reproducibility. *Analytical Chemistry*, 93(41), 13870–13879. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c02621>
- Reemtsma, T., Berger, U., Arp, H. P. H., Gallard, H., Knepper, T. P., Neumann, M., Quintana, J. B., & Voogt, P. de. (2016). Mind the Gap: Persistent and Mobile Organic Compounds—Water

- Contaminants That Slip Through. *Environmental Science & Technology*, 50(19), 10308–10315. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03338>
- Schulz, W., Lucke, T., Oberleitner, D., & Balsaa, P. (2019). *Use of non-target screening by means of LC-ESI-HRMS in water analysis (Guideline-edition 1.0 2019)*. <http://www.wasserchemische-gesellschaft.de>
- Schulze, B., Bader, T., Seitz, W., & Winzenbacher, R. (2020). Column bleed in the analysis of highly polar substances: an overlooked aspect in HRMS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(20), 4837–4847. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02387-0>
- Schulze, B., Heffernan, A. L., Samanipour, S., Gomez Ramos, M. J., Veal, C., Thomas, K. V., & Kaserzon, S. L. (2023). Is Nontarget Analysis Ready for Regulatory Application? Influence of Peak-Picking Algorithms on Data Analysis. *Analytical Chemistry*, 95(50), 18361–18369. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c03003>
- Schulze, B., van Herwerden, D., Allan, I., Bijlsma, L., Etxebarria, N., Hansen, M., Merel, S., Vrana, B., Aalizadeh, R., Bajema, B., Dubocq, F., Coppola, G., Fildier, A., Fialová, P., Frøkjær, E., Grabic, R., Gago-Ferrero, P., Gravert, T., Hollender, J., ... Samanipour, S. (2021). Inter-laboratory mass spectrometry dataset based on passive sampling of drinking water for non-target analysis. *Scientific Data*, 8(1), 223. <https://doi.org/10.1038/s41597-021-01002-w>
- Schulze, S., Zahn, D., Montes, R., Rodil, R., Quintana, J. B., Knepper, T. P., Reemtsma, T., & Berger, U. (2019). Occurrence of emerging persistent and mobile organic contaminants in European water samples. *Water Research*, 153, 80–90. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.01.008>
- Schymanski, E. L., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ruff, M., Singer, H. P., & Hollender, J. (2014). Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environmental Science & Technology*, 48(4), 2097–2098. <https://doi.org/10.1021/es5002105>
- Schymanski, E. L., Singer, H. P., Slobodnik, J., Ipolyi, I. M., Oswald, P., Krauss, M., Schulze, T., Haglund, P., Letzel, T., Grosse, S., Thomaidis, N. S., Bletsou, A., Zwiener, C., Ibáñez, M., Portolés, T., de Boer, R., Reid, M. J., Onghena, M., Kunkel, U., ... Hollender, J. (2015). Non-target screening with high-resolution mass spectrometry: critical review using a collaborative trial on water analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(21), 6237–6255. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8681-7>
- Seitz, W., Schulz, W., & Winzenbacher, R. (2018). Advantage of liquid chromatography with high-resolution mass spectrometry for the detection of the small and polar molecules trifluoroacetic acid and sulfamic acid. *Journal of Separation Science*, 41(24), 4437–4448. <https://doi.org/10.1002/jssc.201800723>
- Thorling Christian Nyrop Albers Birgitte Hansen Anders Johnsen Jolanta Kazmierczak Mette Hilleke Mortensen Ingelise Møller Lars Trolborg, L. R. (2023). *Grundvandsovervågning Status og udvikling 1989-2021 GEUS 2023*. www.geus.dk
- Tisler, S., & Christensen, J. H. (2022). Non-target screening for the identification of migrating compounds from reusable plastic bottles into drinking water. *Journal of Hazardous Materials*, 429, 128331. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128331>
- Tisler, S., Engler, N., Jørgensen, M. B., Kilpinen, K., Tomasi, G., & Christensen, J. H. (2022). From data to reliable conclusions: Identification and comparison of persistent micropollutants and transformation products in 37 wastewater samples by non-target screening prioritization. *Water Research*, 219, 118599. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118599>
- Tisler, S., Kilpinen, K., Pattison, D. I., Tomasi, G., & Christensen, J. H. (2023). Quantitative Nontarget Analysis of CECs in Environmental Samples Can Be Improved by Considering All Mass Adducts. *Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c03791>
- Tisler, S., Mrkajic, N. S., Reinhardt, L. M., Jensen, C. M., Clausen, L., Thomsen, A. H., Albrechtsen, H.-J., & Christensen, J. H. (2025). A non-target evaluation of drinking water contaminants in pilot scale activated carbon and anion exchange resin treatments. *Water Research*, 271, 122871. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.122871>

- Tisler, S., Pattison, D., & Christensen, J. (2021). Correction of Matrix Effects for Reliable Non-target Screening LC-ESI-MS Analysis of Wastewater. *Analytical Chemistry*, 93(24), 8432–8441.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00357>
- Wang, X.-C., Ma, X.-L., Liu, J.-N., Zhang, Y., Zhang, J.-N., Ma, M.-H., Ma, F.-L., Yu, Y.-J., & She, Y. (2023). A comparison of feature extraction capabilities of advanced UHPLC-HRMS data analysis tools in plant metabolomics. *Analytica Chimica Acta*, 1254, 341127.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.341127>

Bilag 1. SOP for Prøveforberedelse

SOP for Prøveforberedelse

1. Anvendelsesområde

Metoden anvendes til LC-HRMS-analyse af vand bestående af rene matricer så som grundvand og drikkevand.

2. Måleområde

Metoden forudsætter, at stoffer kan ioniseres ved en elektrospray ioniseringskilde (ESI). Metoden er kun egnet til organiske forbindelser, og vil ofte kræve, at den eftersøgte analyt indeholder minimum et oxygen, nitrogen eller svovlatom.

3. Princip

Prøven tilsættes intern standard og opkoncentreres ved fastfaseekstraktion, elueres og inddampes til 1 mL.- Herefter analyseres ved LC-HRMS med Reversed Phase (RP) og Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) kolonner i positiv og negativ ionisering.

4. Prøvetagning

Da prøverne skal anvendes til LC-HRMS-analyse, er det vigtigt at være meget opmærksom på enhver risiko for kontaminering, da dette kan give anledning til falsk positive resultater. Det betyder f.eks., at al emballage skal opbevares tillukket med tætsluttende låg både før og efter prøvetagning, og at prøvetagning og transport sker med mindst mulig risiko for påvirkning af prøverne.

Vær opmærksom på om der er forhold i omgivelserne under prøvetagningen, som kan have indflydelse på prøverne f.eks. afvigende lugt, sprøjtning af marker, nedslag af røg fra skorstene etc. Hvis det er tilfældet, noteres det. Der må ikke anvendes håndsprit, sæber, parfumer og cremer i forbindelse med prøver udtaget til HRMS-analyse. Ligeledes må der ikke ryges i forbindelse med prøvetagningen eller i bilen under transporten.

4.1 Emballage

Prøverne udtages i glødede 1L-glasflasker og opbevares under transporten ved 2-8 °C.

4.2 Udtagning af prøverne

Prøverne udtages som stikprøver. Der udtages 3 x 1L for hver prøve

- Låget skrues af flasken, og flasken fyldes med ca. 100 mL prøveemne
- Låget skrues på og flasken omrystes kort
- Låget skrues af, hvorefter vandet hældes ud.
- Flasken fyldes helt op med prøven, så der ikke er luft over væsken og låget sættes på med det samme.

4.3 Feltblind

I forbindelse med prøvetagningen laves en feltblind/emballageblind ved at bruge det medsendte HPLC-vand.

Der anvendes 2 x 1L.

- Låget skrues af flasken, og flasken fyldes med lidt HPLC-vand – ca. 100 mL
- Låget skrues på og flasken omrystes kort
- Låget skrues af, hvorefter vandet hældes ud
- Flasken fyldes med vand og låget sættes på

- Gentag for begge flasker
- Blindprøverne opbevares og transporteres sammen med prøverne

Hvis der anvendes pumpe eller slanger i forbindelse med prøvetagning, skal risiko for afsmitning evalueres og der skal evt. udtages feltblindprøver, som indbefatter det anvendte prøvetagningsudstyr.

5. Transport og opbevaring

Prøverne transporteres nedkølet til laboratoriet og opbevares herefter på køl (<4°C) indtil analyse. Prøverne skal tages i arbejde hurtigst muligt, og senest 7 dage efter modtagelse på laboratoriet.

6. Databehandling og afrapportering

Prøverne analyseres og data behandles som beskrevet i SOP for analyse og databehandling. Der udarbejdes en rapport for resultater på baggrund af kundens ønsker og behov og laboratoriets forskrifter for rapportering.

7. Apparatur

- Apparatur til SPE-oprensning (f.eks. vakuummanifold)
- SPE-kolonner: Sep-Pak AC2 Plus Short Cartridge, 400 mg Sorbent per Cartridge, 85 µm
- Reservoir (tom SPE-cartridge). F.eks. TELOS Kolonne, 70ml, Varenr. KIS 8500000027T
- Female Luer Coupler for DNPH tubes, Sigma Aldrich 21015, Supelco eller tilsvarende
- Male Luer Coupler for polypropylene, Sigma Aldrich 25064-U, Supelco eller tilsvarende
- Udstyr til nitrogeninddampning.
- Glas til opsamling af eluent.
- Vials med låg
- Pipetter
- Handsker

8. Kemikalier

- HPLC-vand. LiChrosolv 4L, 1.15333.4000 Merck eller tilsvarende.
- 25% ammoniakvand Supelco, partnummer 1.05432.2500 eller tilsvarende.
- Acetonitril HPLC-grade. Sigma Aldrich 34851-2,5L > 99,9% eller tilsvarende
- Methanol, Sigma Aldrich partnummer 34860-2,5L-R eller tilsvarende.
- Myresyre
- Interne standarder

9. Intern standard

Der fremstilles en blanding af isotopmærkede interne standarder (IS-mix), som tilsættes prøverne inden SPE. Blandingen skal indeholde stoffer som dækker metodens anvendelsesområde i forhold til retentionstider i HILIC og RP, ionisering og masse/ladning. Se "*Næste generation fingeraftryksmetode til måling af miljøfremmede stoffer i drikkevand*, TABEL 16".

10. Kontrolprøve

Der fremstilles en kontrolprøve ud fra en stamopløsning af stoffer som dækker metodens kemiske rum. Disse stoffer skal være i lav koncentration i prøven (0,01 µM og 0,01 µM). Denne prøve anvendes til at sikre, at analysen lever op til metodens minimumskrav. Se "*Næste generation fingeraftryksmetode til måling af miljøfremmede stoffer i drikkevand*, bilag 5".

11. Klargøring af prøver til direkte injektion

Dette gøres umiddelbart inden opkoncentrering.

Flaskerne omrystes - hvis der er bundfald dekanteres prøven. Herefter udtages 1 mL prøve, som hældes over i en glødet glasvial og tilsættes intern standard.

12. Opkoncentrering

12.1 Klargøring af prøverne

Prøver og feltblind

Flaskerne omrystes og 3 x 500 mL prøve hældes over i glødede glasflasker, tilsættes IS-mix og omrystes. Hvis der er bundfald, dekanteres prøven.

PESTICID Knt.

3 x 500 mL HPLC-vand hældes over i glødede glasflasker, tilsættes Knt-mix og IS-mix.

Prøverne omrystes.

12.2 Klargøring af SPE kolonner og loading af prøven

Kolonnerne monteres på manifolden, som vist på FIGUR 1.



FIGUR 1. Montering af SPE-kolonne på manifold i forbindelse med vask af kolonnen samt eluering.

Kolonnerne vaskes sekventielt med følgende solventer. Kolonnerne køres ikke tørre mellem solventerne.

- 1) 4 mL 5% myresyre i ACN
- 2) 4 mL 5% ammoniakvand (25%) i ACN
- 3) 4 mL ACN
- 4) 4 mL MeOH

Herefter vendes kolonnerne (FIGUR 2) og konditioneres i samme retning, som der loades.

- 5) 10 mL HPLC-vand



FIGUR 2. Montering af SPE-kolonner på manifold i forbindelse medkonditionering og loading.

Nu loades prøver og blindprøver på kolonnerne. Når hele prøvevolumenet er loadet, suges kolonnerne tørre i ca. 30 min.

12.3 Eluering og inddampning

Kolonnerne vendes, så de er monteret på manifolden med fittings, som vist på FIGUR 1. Der elueres sekventielt med følgende eluenter.

- 1) 4 mL 5% Ammoniakvand (25%) i ACN
- 2) 2 mL ACN,
- 3) 4 mL 5% myresyre i ACN

Eluenterne samles i samme glødede reagensglas. Kolonnerne køres ikke tør imellem eluenterne.

Ekstrakterne inddampes til 1 mL, og prøve deles i to med 500 µl i hver vial (der anvendes glødede glasvials). Prøverne er nu klar til analyse.

13. Opbevaring af prøver efter opkoncentrering

Hvis ikke prøverne kommer på apparatet umiddelbart efter inddampning, sættes de på køl (4 °C) natten over eller placeres i fryser, hvis de skal opbevares i længere tid.

14. Kvalitetskontrol

I forbindelse med analysen af prøverne medtages en funktionskontrol (SST) bestående af stoffer med kendte koncentrationer. Kontrolprøven sammensættes så fysisk-kemiske egenskaber, retentionstider etc. er repræsentative for den aktuelle anvendelse. Der føres kontrolkort over intensiteten for analysen af disse stoffer for at monitorere sensitiviteten af apparatet. Der medtages også en kontrol (PESTICID Knt.), som fungerer som et minimumskrav for metoden. Der føres kontrolkort for intensiteterne i denne prøve. Derudover plottes massenøjagtigheden for de interne standarder i prøver og blindprøver for at vurdere, om der er udfordringer med enkelte prøver eller kørsler.

15. Sikkerhed

Afvejning af standarder skal foregå under anvendelse af lokalsug. Arbejde med organiske opløsningsmidler skal foregå i stinkskab og der skal anvendes egnede beskyttelseshandsker samt kittel og briller under arbejdet.

16. Affaldskoder

Glas med små rester af metanol/ammoniakvand stilles til afdampning i stinkskab natten over.

Bilag 2. SOP for Analyse og databehandling

SOP for Analyse og databehandling (suspect screening)

1 Det analytiske set-up

1.1 Princip

Analysen udføres ved hjælp af væskekromatografi koblet til højopløselig massespektrometri (HRMS). Der anvendes to kromatografiske teknikker hhv. Reverse Phase (RP) og Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC), med både positiv og negativ ionisering. Der anvendes to koloner med tilhørende mobilfaser som vist i TABEL 1, idet prøverne analyseres i både positiv og negativ ionisering. Mobilfaser fremstilles med LC-MS-grade eller tilsvarende renhed.

1.2 Kemikalier:

- vand (H₂O),
- methanol (MeOH),
- acetonitril (ACN),
- ammoniumacetat,
- ammoniumformat
- myresyre.

1.3 Kromatografisk set-up

TABEL 1. Kolonner og mobilfaser.

Metode	Ionisering	Kolonne	Dim. (mm)	Mobilfase A	Mobilfase B
Reverse phase	POS	Intensity Solo C18-2	2,1 × 100 × 1,8 µm	H ₂ O:MeOH (99:1) med 5 mM ammonium format og 0,01 % myresyre	MeOH med 5 mM ammonium format og 0,01 % myresyre
Reverse phase	NEG	Intensity Solo C18-2	2,1 × 100 × 1,8 µm	H ₂ O:MeOH (99:1) med 5 mM ammonium acetate	MeOH med 5 mM ammonium acetate
HILIC	POS + NEG	ACQUITY Premier BEH Amide	2,1 × 100 × 1,7 µm	H ₂ O:ACN (95:5) med 5 mM ammonium format	ACN:H ₂ O (95:5) med 5 mM ammonium format

1.4 Prøveforberedelse og injektion

Prøver opkoncentreres iht. SOP for prøveforberedelse.

Intern standard tilsættes før opkoncentrering.

Hver prøve behandles i triplikat.

Én injektion pr. koncentrat køres for hver kombination af kolonne og ionisering.

1.5 Blindprøver og kontroller

Blindprøver og kontroller analyseres som angivet i TABEL 2.

TABEL 2. Blindprøver og kontroller.

Type	Fremstilling	Formål
Instrumentblind	LC-MS-grade vand	
Felt/emballageblind	1000 mL LC-MS-grade vand behandles som prøverne (opkoncentreres)	Sikre at fund ikke skyldes emballage eller prøveforberedelse
Funktionskontrol (SST)	Mix af kendte stoffer (f.eks. Agilent pesticidmix, 2,5 µg/L MeOH)	Kontrol af apparatets performance
PESTICID-kontrol (Knt.)	Lav koncentration af udvalgte stoffer dækkende metodens kemiske rum	Sikre metodens minimumskrav til detektionsevne

1.6 Sekvensopsætning

Sekvensopsætning kan variere afhængig af opgaven og det enkelte laboratorium. Følgende opsætning er fundet anvendelig:

1. Indkøring
2. SST
3. Instrument-/feltblind
4. PESTICID-kontrol
5. Prøver (op til 8 injektioner)
6. Instrumentblind
7. PESTICID-kontrol
8. SST

Ved mere end 8 prøver gentages trin 5–7. Sekvenser gentages derefter for triplikater, men prøverne injiceres i ny rækkefølge for at identificere evt. carry-over. Prøver med forventet højt indhold placeres sidst.

Indkøring: Indkøringsprøver bør være prøver der er sammenlignelige med de prøver der skal analyseres i sekvensen. Disse skal køres til der opnås stabile målinger. Det nøjagtige antal er instrumentafhængigt, men der bør som minimum altid køres tre.

SST: Kendt mix til bestemmelse af instrumentets performance. For at sikre der ikke er behov for rens af instrument eller lignende. Se f.eks. "*Næste generation fingeraftryksmetode til måling af miljøfremmede stoffer i drikkevand*"

PESTICID-kontrol: Mere specifikt mix i forhold til metoden til kontrol af metoden kan klare f.eks. krav til detektionsgrænser. Se f.eks. "*Næste generation fingeraftryksmetode til måling af miljøfremmede stoffer i drikkevand*"

2 Re-analyser

Prøver re-analyseres ved:

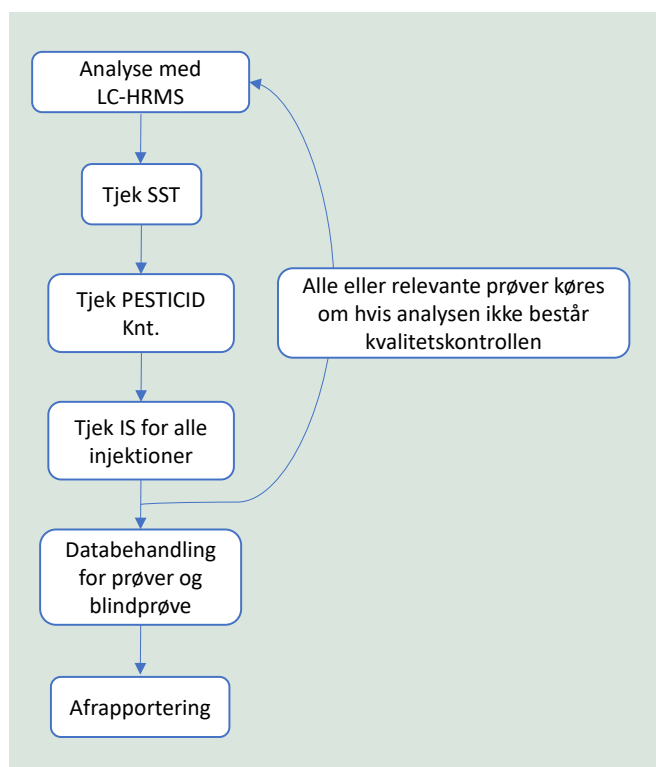
- Afvigelse i SST (intensitet, massenøjagtighed, FWHM)
- Store variationer i signal eller massenøjagtighed for interne standarder
- Mistanke om apparat- eller prøveforberedelsesfejl
- Fejl i intern kalibrering

Da databehandlingen er omfangsrig, kan det ved mistanke om en dårlig kørsel stort set altid betale sig at foretage re-analyser, så der ikke databehandles på en dårlig kørt sekvens.

3 Databehandling

En skematisk illustration af workflow for databehandling er vist i FIGUR 3.

Alle trin udføres for hver kørsel (RP pos og neg, samt HILIC pos og neg). Resultaterne afrapporteres i en samlet rapport.



FIGUR 3. Illustration af workflow for databehandling.

Trin 1: Tjek SST (kan gøres mens sekvensen analyseres)

Hent alle funktionskontroller ind i en sekvens i databehandlingsprogram (instrumentspecifikt) og processer med SST-metode:

1. Undersøg om det er skred i retentionstid
2. Tjek at intensiteten ikke falder under minimumskravet (overfør til kontrolkort).
3. Tjek at massenøjagtigheden er acceptabel ($\Delta m/z$ må maksimalt afvige med ± 5 ppm for TOF)
4. Tjek FWHM. Er peak-bredde acceptabel?

Hvis SST ikke opfylder minimumskravene, køres sekvensen om. Minimumskrav: Intensitets RSD <20%, ΔRT : max 0,5 min, og FWHM <0,3 min (kun for RP setup).

Trin 2: Tjek PESTICID Knt.

Hent alle Knt. prøver ind i databehandlingsprogram og processér med Knt. Metode:

1. Kontroller at alle komponenter detekteres i alle prøver.
2. Intensiteten af første og sidste Knt. overføres til kontrolkort.

Hvis alle stoffer ikke detekteres i Knt. kørt før og efter prøverne, skal prøverne køres om. Det samme gælder, hvis intensiteter ikke opfylder opstillede krav.

Trin 3: Tjek intern standard for alle injektioner

Hent alle kørsler ind i en sekvens i databehandlingsprogram og processer med intern standard metode:

1. Tjek massenøjagtigheden for alle injektioner.
2. Sammenlign intensiteten af IS for triplikater af samme prøve. Hvis der er store afvigelser, skal der tages stilling til, om dette kan skyldes fejl i apparatkørsel, prøveforberedelse eller lignende. Hvis to ud af tre prøver har acceptabelt og sammenligneligt signal anvendes en af disse i den videre analyse. Hvis der er store afvigelser mellem alle tre prøver, skal prøverne køres om eller der skal laves en fuld re-analyse.
3. Hvis triplikaterne er ens mht. intensitet og massenøjagtighed medtages en enkelt prøve i den videre analyse.

Trin 4: Databehandling for prøverne

Hent kørsel for alle prøver samt alle kørsler af blindprøven ind i databehandlingsprogram og processer med relevante screeningslister.

1. For hver prøve gennemgås fund identificeret i databehandlingsprogrammet. Der er kun fund, hvis det findes i alle tre triplikater.
2. Blindprøverne tjekkes for alle fund identificeret i prøverne.
3. Ved prøver med højt indhold er der risiko for carry-over-effekter. Dette vurderes ved evaluering af output fra de tre samhørende injektioner/triplikater.
4. Tjek at signalet er minimum 3x det maximale blindsignal. Kun signaler over denne grænse rapporteres.
5. Såfremt der skal beregnes en koncentration, korrigeres signalet for intern standard, og koncentrationen estimeres via: (i) responsnormalisering, (ii) applicering af QSPR-modellen for ioniseringseffektivitet, og (iii) skaleret til koncentration via known-response konvertering i henhold til bilag X (qNTA-protokol). Se bilag 3.

4 Usikkerhed

Identifikationssikkerhed rapporteres vha. Schymanski et al. (2014).

TABEL 3. Schymanski et al. (2014) identifikationsniveauer, som anvendes ved vurdering af stofidentifikation i non-target screening baseret på massespektrometri. Niveau 1 repræsenterer den højeste sikkerhed (bekræftet med standard), mens niveau 5 blot angiver en eksakt masse uden strukturel information.

Niveau	Beskrivelse
1	Bekræftet identifikation med referencestandard
2	Sandsynlig struktur (2a: Biblioteksmatch 2b: Diagnostisk evidens)
3	Tentativ kandidat
4	Entydig molekyleformel (ingen struktur)
5	Eksakt masse af interesse

5 Afrapportering

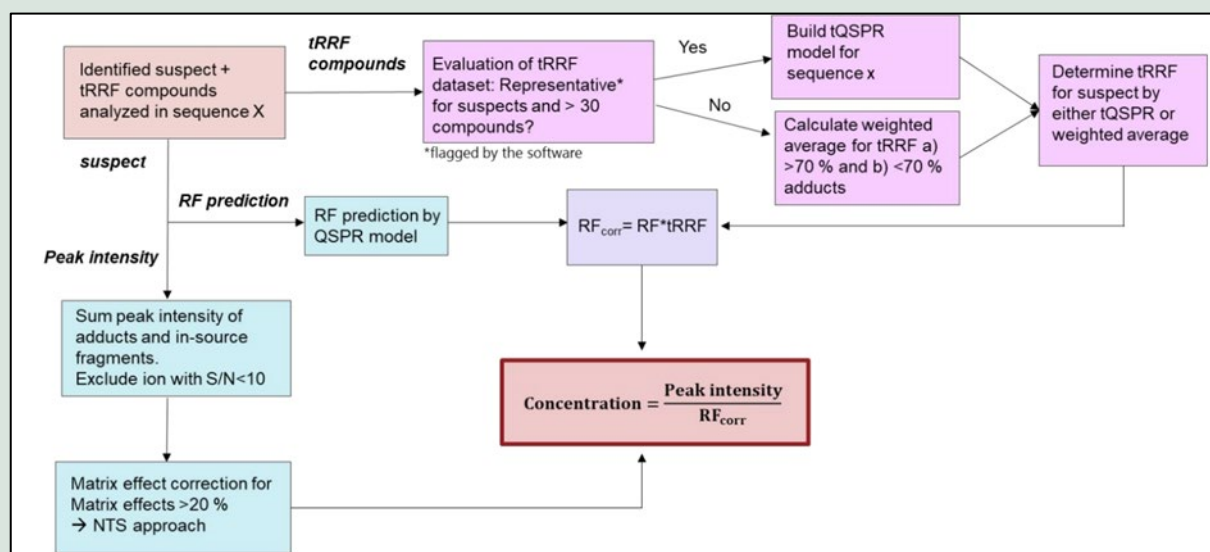
Afrapportering af data skal som minimum indeholde følgende punkter:

- Identifikation af kunde og evt. projekt ID.

- Information om prøver. Herunder prøvenummer, matrice, dato for prøvetagning samt eventuelle bemærkninger, hvis f.eks. emballage eller prøvetagning afviger fra standardmetoden.
- Beskrivelse af metodens kemiske rum.
- Analysemetode:
 - Kort beskrivelse af prøveforberedelsen
 - Beskrivelse af anvendt apparat, ionkilde, kolonnetype, ioniseringsmode, opsamlingsmode (DDA eller DIA) og injektionsvoluminer.
 - Beskrivelse af kvalitetskontrolprøver herunder blindprøver og kontroller, samt hvordan disse er anvendt i databehandlingen
- Databehandling:
 - Anvendt software
 - Beskrivelse af database anvendt som grundlag for Suspect Screening
 - Beskrivelse af om intensiteter er korrigeret for IS.
 - Kriterier anvendt i forbindelse med dataanalyse.
- Resultater af analysen:
 - Navn og evt. supplerende ID (CAS-nr./InChI-key etc.) for identificeret stof, påvist intensitet, ID score (Schymanski) samt stofgruppe hvis muligt. Eventuelle kommentarer og forbehold for det anførte resultat skal tydeligt fremgå

Bilag 3. Kvantificering med QSPR-modellering

This method predicts the response factor (RF) for each compound based on molecular descriptors, which are values representing structural and physicochemical properties. The response factor is defined as the peak intensity divided by the compound's concentration. The workflow is described in the scientific paper by Tisler et al. (2024). A schematic illustration of the workflow (from the paper) is shown in FIGURE 4 and briefly presented in the following.



FIGUR 4. Workflow for concentration prediction of suspect compounds (from Tisler et al., 2024). QSPR model building is based on model compounds and used for RF prediction. To assess transferability between multiple time points and/or instruments, the transferability relative response factor (tRRF) of selected model compounds is determined and used to correct the predicted RF.

To estimate the concentration of a compound:

The total peak intensity is divided by the predicted response. The total peak intensity implies isotopes, adducts, and known in-source fragments, ensuring accurate quantification.

The quantitative structure-property relationship (QSPR) model has been specifically developed for electrospray ionization in positive mode: The average prediction error during validation was 1.8 (i.e., the predicted response factor differed from the observed response factor by a factor of 1.8). 27 out of 28 test compounds were predicted within a factor of three, confirming the model's reliability.

The initial model was trained using water-relevant compounds, ensuring that it covers the expected chemical space of the study presented. The software Maestro 13.2 (Schrödinger) was used for QSPR modelling. If a compound falls outside the trained chemical space, the software flags it, indicating higher uncertainty in the prediction. In such cases, the predicted concentration cannot be considered reliable.

Correction of matrix effects is done based on total ion chromatogram (TIC) using an approach previously developed at UCPH (Tisler et al., 2021). To scale the matrix effects, internal standards spiked into every sample are used to determine the amount of signal suppression or enhancement.

To maintain accuracy over time, a drift correction must be applied. Instrument performance can change due to variations in detector sensitivity, ionization efficiency, or other factors. To correct for this, the response factors of five to ten reference compounds should be compared between the current analysis and the original model development phase (the list of reference compounds is provided in scientific paper in Annex 6.3). Analytical standards for the reference compounds must be available. The response factors of these compounds in the new analysis are compared to their response factors from the model's development phase. The mean response difference is calculated and applied as a correction factor for peak intensity of the newly identified compounds to align new response factor predictions with current instrument conditions.

Applying and Validating the QSPR Model

The peak intensity obtained from the drift correction, in addition to the molecular structure of the identified compounds (imported as .mol or .sdf files) are fed into the model. The model will calculate logarithmic response factors which can be back-calculated into concentrations.

To validate the model's performance for a given analysis, it is recommended to use at least five additional compounds with known concentrations and analytical standards, i.e. targeted analytes which can be quantified with external calibration. By comparing the predicted concentrations to actual measured concentrations, the accuracy of the model at the time of analysis can be assessed. This approach ensures that response factor predictions remain reliable, even as instrument conditions change over time.

Bilag 4. Suspect screenings liste

Se vedhæftede Excel fil af samme navn.

Bilag 5. Den kromatografiske metode

Bilag 5.1 Referencestoffer anvendt til metodeudvikling.

TABEL 4. Referencestoffer anvendt til metodeudvikling.

Stof	CAS-nr. og PubChem ID	Kemisk formel og SMILES-notation	Molvægt og logD [#]	Ref
Repræsentanter for pesticider/biocider				
Desethyl-desisopropyl- atrazin (DEIA)	Cas: 3397-62-4 PubChem: 18831	Formula: C3H4ClN5 SMILES: n(c(nc(n1)Cl)N)c1N	M: 145.55 logD: 0.46	1
2,6-Dichlorbenzamid	Cas: 2008-58-4 PubChem: 16183	Formula: C7H5Cl2NO SMILES: C1=CC(=C(C(=C1)Cl)C(=O)N)Cl	M: 190.02 logD: 2.03	1
Atrazin, desisopropyl-	Cas: 1007-28-9 PubChem: 13878	Formula: C5H8ClN5 SMILES: Clc1nc(N)nc(NCC)n1	M: 173.6 logD: 1.12	1
1,2,4-Triazol	Cas: 288-88-0 PubChem: 9257	Formula: C2H3N3 SMILES: n1ncnc1	M: 69.07 logD: -0.75	1
2,5-Dichlorphenol	Cas: 583-78-8 PubChem: 66	Formula: C6H4Cl2O SMILES: C1=CC(=C(C(=C1)O)Cl	M: 163 logD: 2.71	1
Terbuthylazin, hydroxy-	Cas: 66753-07-9 PubChem: 135495928	Formula: C9H17N5O SMILES: CCNC1=NC(=O)NC(=N1)NC(C)(C)C	M: 211.26 logD: -0.6	1
Bentazon	Cas: 25057-89-0 PubChem: 2328	Formula: C10H12N2O3S SMILES: CC(C)N1C(=O)C2=CC=CC=C2NS1(=O)=O	M: 240.28 logD: -0.19	1
Desphenyl chloridazon	Cas: 6339-19-1 PubChem: 95827	Formula: C4H4ClN3O SMILES: NC1=C(Cl)C(=O)NN=C1	M: 145.55 logD: -1.32	1
Methyl-desphenyl-chloridazon	Cas: 17254-80-7 PubChem: 594330	Formula: C5H6ClN3O SMILES: CN1C(=O)C(=C(C(=N1)N)Cl	M: 159.57 logD: -1.1	1
N,N-Dimethylsulfamid (DMS)	Cas: 3984-14-3 PubChem: 134472	Formula: C2H8N2O2S SMILES: CN(C)S(=O)(=O)N	M: 124.17 logD: -1.54	1
Dimethachlor ESA	Cas: PubChem: 86290104	Formula: C13H19NO5S SMILES: CC1=C(C(=CC=C1)C)N(CCOC)C(=O)CS(=O)(=O)O	M: 301.36 logD: -1.12	1
(2,6-dimethyl-phenylcarbamoyl)-methansulfonsyre (CGA369873)	Cas: 1418095-08-5 PubChem: 139292176	Formula: C10H13NO4S SMILES: CC1=C(C(=CC=C1)C)NC(=O)CS(=O)(=O)O	M: 243.28 logD: -0.94	1
4-Bis-amido-3,5,6-trichlorobenzenesulfonat (R471811)	Cas: PubChem: 138402810	Formula: C8H5Cl3N2O5S SMILES: C1(=C(C(=C(C(=C1Cl)C(=O)N)Cl)Cl)S(=O)(=O)O)C(=O)N	M: 347.6 logD: -1.71	1
4-(tert-Buthylamino)-6-hydroxy-1-methyl-1,3,5-triazin-2(1H)-one (LM6)	Cas: 2206682-85-9 PubChem: 139597106	Formula: C8H14N4O2 SMILES: CC(C)(C)NC1=NC(=O)N(C(=O)N1)C	M: 198.22 logD: -0.02	1
6-(tert-Butylamino)-1,3,5-triazine-2,4-diol (LM5)	Cas: 309923-18-0 PubChem: 582098	Formula: C7H12N4O2 SMILES: CC(C)(C)NC1=NC(=O)NC(=O)N1	M: 184.2 logD: -1.7	1
Methyl-isothiazolinone (MIT)	Cas: 2682-20-4 PubChem: 39800	Formula: C4H5NOS SMILES: S1N(C)C(=O)C=C1	M: 115.16 logD: 0.09	2
Benzyl-dimethyldodecyl-ammonium chloride (12 BAC)	Cas: 139-07-1 PubChem: 8753	Formula: C21H38ClN SMILES: c(ccc1CN(Cl)(C)(C)CCCCCCCCCCC)cc1	M: 340 logD: 2.47	2
Repræsentanter for PMT-labeled REACH-stoffer				
Sodium methanesulfonate	Cas: 2386-57-4 PubChem: 638112	Formula: CH3NaO3S SMILES: CS(=O)(=O)[O-].[Na+]	M: 118.09 logD: -3.34	

Stof	CAS-nr. og PubChem ID	Kemisk formel og SMILES-notation	Molvægt og logD [#]	Ref
Repræsentanter for pesticider/biocider				
2-Acrylamino-2-methylpropane sulfonate	Cas: 5165-97-9 PubChem: 23665719	Formula: C7H12NNaO4S SMILES: S(=O)(=O)(O(Na))CC(C)(C)NC(=O)C=C	M: 229.23 logD: -2.65	3
Cyanuric acid (1,3,5-Triazine-2,4,6-triol)	Cas: 108-80-5 PubChem: 7956	Formula: C3H3N3O3 SMILES: N1C(=O)NC(=O)NC1=O	M: 129.07 logD: -1.06	3
Benzyltrimethylammonium	Cas: 56-93-9 PubChem: 5963	Formula: C10H16ClN SMILES: c1(CN(CI)(C)(C)C)cccc1	M: 185.69 logD: -2.25	3
p-Sulfanilic acid	Cas: 121-57-3 PubChem: 8479	Formula: C6H7NO3S SMILES: C1=CC(=CC=C1N)S(=O)(=O)O	M: 173.19 logD: -2.05	3
Melamine	Cas: 108-78-1 PubChem: 7955	Formula: C3H6N6 SMILES: n(c(nc(n1)N)N)c1N	M: 126.12 logD: -2.34	3
Trifluoromethanesulfonic acid	Cas: 1493-13-6 PubChem: 62406	Formula: CHF3O3S SMILES: O=S(=O)(O)C(F)(F)F	M: 150.08 logD: -1.23	3
6-Methyl-1,3,5-triazine-diamine	Cas: 542-02-9 PubChem: 10949	Formula: C4H7N5 SMILES: n(c(nc(n1)C)N)c1N	M: 125.13 logD: -0.2	3
Benzyltrimethylamine	Cas: 103-83-3 PubChem: 7681	Formula: C9H13N SMILES: N(Cc(cccc1)c1)(C)C	M: 135.21 logD: 0.4	3
1,3-Di-o-tolylguanidine	Cas: 97-39-2 PubChem: 7333	Formula: C15H17N3 SMILES: N=C(Nc(C(ccc1)C)c1)Nc(C(ccc2)C)c2	M: 239.32 logD: -2.71	3
Tri-(2-chloroisopropyl) phosphate	Cas: 13674-84-5 PubChem: 26176	Formula: C9H18Cl3O4P SMILES: O=P(OC(CCI)C)OC(CCI)C	M: 327.6 logD: 3.36	3
Repræsentanter for PFAS				
Perfluorooctanoic acid (PFOA)	Cas: 335-67-1 PubChem: 9554	Formula: C8HF15O2 SMILES: O=C(O)C(F)(F)C(F)(F)C(F)(F)C(F)(F)C(F)(F)C(F)(F)C(F)(F)F	M: 414.07 logD: 1.58	2
Perfluoro-4-ethylcyclohexanesulfonic acid (PFECyS)	Cas: 646-83-3 PubChem: 101650	Formula: C8HF15O3S SMILES: C1(C(C(C(C1(F)F)(F)F)S(=O)(=O)O)(F)F)(F)F)(C(C(F)(F)F)(F)F)	M: 462.13 logD: 2.53	2;4
2,3,3,3-tetrafluoro-2-(1,1,2,2,3,3,3-heptafluoropropoxy) propanoic acid (HFPO-DA, GenX)	Cas: 13252-13-6 PubChem: 114481	Formula: C6HF11O3 SMILES: FC(F)(F)C(F)(C(=O)O)OC(F)(F)C(F)(F)C(F)(F)F	M: 330.05 logD: 3.16	2;4
Trifluoroacetic acid (TFA)	Cas: 76-05-1 PubChem: 6422	Formula: C2HF3O2 SMILES: O=C(O)C(F)(F)F	M: 114.02 logD: -2.62	
Repræsentanter for PMT-labeled plaststoffer				
2-(1-methylpropyl)-4,6-dinitrophenol	Cas: 88-85-7 PubChem: 6950	Formula: C10H12N2O5 SMILES: CCC(C)c1cc(N(=O)=O)cc(N(=O)=O)c1O	M: 240.21 logD: 1.4	5
1,1'-oxybis[2-methoxy-ethane]	Cas: 111-96-6 PubChem: 8150	Formula: C6H14O3 SMILES: COCCOCCOC	M: 134.17 logD: 0.03	5
1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane	Cas: 280-57-9 PubChem: 9237	Formula: C6H12N2 SMILES: C1CCCCCCC1N1CCCCNCC1	M: 112.17 logD: 1.01	5
4,4'-methylenbis-benzenamine	Cas: 101-77-9 PubChem: 7577	Formula: C13H14N2 SMILES: Nc1ccc(Cc2ccc(N)cc2)cc1	M: 198.26 logD: 2.4	5
2-amino-5-methyl-benzenesulfonic acid	Cas: 88-44-8 PubChem: 6934	Formula: C7H9NO3S SMILES: Cc1ccc(N)c(S(=O)(=O)O)c1	M: 187.22 logD: -1.54	5
4,4'-sulfonylbis-benzenamine	Cas: 80-08-0 PubChem: 2955	Formula: C12H12N2O2S SMILES: c1cc(ccc1N)S(=O)(=O)c1ccc(cc1)N	M: 248.3 logD: 1.27	5

Predicted with Chemicalize ved pH 7.4.

(1) Top10 2022 GRUMO og/eller boringskontrollen (Thorling m.fl., 2023); (2) HOFORS "ønske-liste"; (3) Schulze m.fl., 2019: High frequency of detection in German surface and/or groundwater; (4) Joerss m.fl., 2022: New PFAS replacement compounds with highest detections in marine waters (Baltic & North Sea); (5) Fries m.fl., 2022: PMT-plast stoffer Canada: 10 highest estimated emissions via WWTP-effluent, highest Groundwater PMOC-scorej

Bilag 5.2 Sammenligning af kolonner

Kolonne		HSS-T3 100% H2O	Hypercarb 100% H2O	Kinetex-F5 100% H2O	Primesep100 100% H2O	Int. Solo 100% H2O	Int. Solo 20% ACN	HSSc18 20% ACN	TrinityP1 100% H2O	Venusil 100% ACN	BEH-NH2 100% ACN
STD											
(2,6-dimethyl-phenylcarbamoyl)-methansulfonsyre (CGA369873)	NEG	8.9			6.0	4.7	4.4	4.0	20.2	4.5	4.4
2,5-Dichlorophenol	NEG	15.6			12.1	10.6	10.4	7.4	15.7	1.9	1.9
2-(1-methylpropyl)-4,6-dinitrophenol	NEG	14.8	21.3	14.4	14.4	9.9	9.8	6.6	21.6	1.3	1.3
2-Acrylamino-2-methylpropane sulfonate	NEG	6.0				3.5			15.8		
2-amino-5-methyl-benzenesulfonic acid	NEG	6.7				4.0	3.7	3.4	21.8	5.9	5.8
PfECBS [potassium perfluoro-4-ethylcyclohexanesulfonate]	NEG	17.1	21.4		12.1	12.4	12.3	8.3	22.0		
Perfluorooctanoic acid (PFOA)	NEG	16.3			14.3	12.5	12.4	8.5	22.5	2.3	2.3
Trifluoromethanesulfonic acid	NEG	2.4	22.7		6.9	2.6	2.8	2.5	19.8	1.2	1.2
p-Sulfamic acid	NEG	1.3			1.5	1.7	1.5	1.2	16.9	8.6	8.8
Methyl Sulfonate	NEG	1.3	5.0		1.2	16.6	16.7	1.2	13.0		
HPPO-DA [2,3,3,3-tetrafluoro-2-(1,1,2,2,3,3,3-heptafluoropropoxy)propanoic acid]	NEG	14.8				9.8	9.6	6.8	17.6		
Dimethachlor ESA	NEG	11.8			6.6	6.1	5.8	4.7	20.4	7.4	7.8
Cyanuric acid (1,3,5-Triazine-2,4,6-triol)	NEG	2.0	7.7		1.4	1.9	1.6	1.5	2.4	3.8	3.8
Bentazon	NEG	9.7	17.8		11.3	5.0	4.8	4.2	21.5	1.5	1.5
6-(tert-Butylamino)-1,3,5-triazine-2,4-diol (LM5)	NEG	9.6	9.9		7.4	4.8	4.4	4.1	5.6	4.0	4.0
4-Bis-amido-3,5,6-trichlorobenzene-sulfonat (R471811)	NEG	2.3			1.0	2.3	1.7	1.6	17.4		
4-(tert-Butylamino)-6-hydroxy-1-methyl-1,3,5-triazin-2(1H)-one (LM6)	NEG									2.7	2.7
TFA	NEG										
(2,6-dimethyl-phenylcarbamoyl)-methansulfonsyre (CGA369873)	POS	9.1				4.4	4.3	4.1	20.2	4.9	5.1
1,1'-oxybis[2-methoxy-ethane]	POS	13.0	6.4	6.2	6.6	5.8			2.0	1.7	1.7
1,2,4-Triazol	POS				6.3					2.7	2.7
1,3-Di-o-tolylguanidine	POS	12.0	10.6	8.4	1.4	5.1	4.9	4.6	13.6	6.4	6.3
1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane	POS	1.7	21.5	1.2		1.6	1.4	1.4	12.8	18.2	17.8
13 BAC (Benzyltrimethylammonium chloride)	POS	18.0	19.4	13.7		10.6	10.5	10.1	14.2	4.7	4.5
4,4'-methylenbis-benzenamine	POS	11.5		3.8		5.2	4.8	4.5	13.5	1.9	2.0
4,4'-sulfonylbis-benzenamine	POS	9.6		8.6		4.4	4.2	3.9	8.6	2.1	2.1
6-(tert-Butylamino)-1,3,5-triazine-2,4-diol (LM5)	POS	9.6	9.6	6.3	6.9	4.5	4.2		5.6	4.1	4.1
6-Methyl-1,3,5-triazine-diamine	POS	3.2	8.4		6.9	2.6	1.8		6.1	3.8	3.8
DEIA	POS	5.9	14.6	3.7	5.6	3.6		4.4	2.1	2.4	2.4
Atrazin, desisopropyl-	POS	10.5	22.1	7.1	8.8	4.9	4.7	4.4	4.2	2.3	2.3
Benzyltrimethylammonium	POS	7.2	8.4	5.4	21.2	3.6	3.5	3.3	13.5	4.5	4.2
Methyl-desphenyl-chloridazon	POS	7.5	14.3	5.6	5.9	4.0	3.8	3.5	2.3	2.3	2.3
Desphenyl chloridazon	POS	4.9	11.6	2.7	1.4	3.2	1.8	1.6	2.0	2.9	2.9
2,6-Dichlorbenzamid	POS	9.9	12.8	7.2	7.4	4.7	4.5	4.2	4.6	1.9	
Dimethachlor ESA	POS	12.0		8.1		5.2	5.0	4.7	20.4	7.5	7.6
Melamine	POS	2.0		1.3		1.9	1.7	1.5	8.6	5.6	5.6
MIT (methyl-Isotiazolinone)	POS	5.8	7.4	3.4	5.6	3.5	1.8	1.6	1.9	2.4	2.4
N,N-Dimethylsulfamid (DMS)	POS	3.5	1.5	2.4	2.1	2.9	1.8	1.6	1.9		

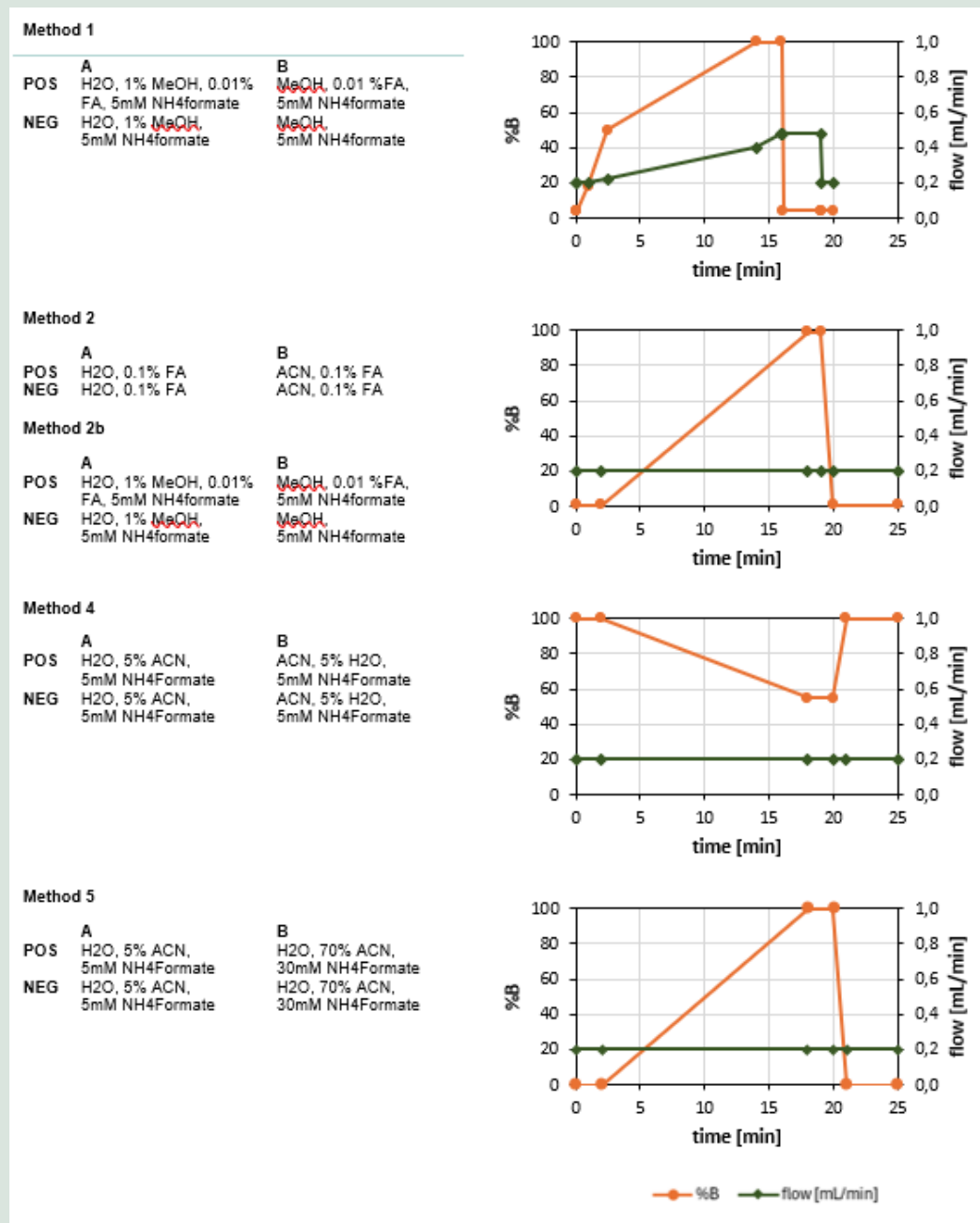
FIGUR 5. Sammenligning af kolonner.

Bilag 5.3 Kolonnespecifikationer og henvisning til de anvendte metoder

TABEL 5. Kolonnespecifikationer og henvisning til de anvendte metoder.

Method	Column	Supplier	Dimensions	Part No.
1	Acquity UPLC HSS C18	Waters	1.8 µm, 100 x 2.1 mm	186003533
1	Intensity Solo	Bruker	1.8 µm, 100 x 2.1 mm	1850837
2b	Acquity UPLC HSS T3	Waters	1.8 µm, 100 x 2.1 mm	186003539
2	Kinetex® F5	Phenomenex	1.7µm, 100 x 2.1 mm	00D-4722-AN
2	Primesep 100	SiELC	2.7 µm, 100 x 2.1 mm	100-21.100.0209
2	Hypercarb	Thermofisher	3 µm, 100 x 2.1 mm	35003-102130
4	Venusil	Agela	3 µm, 100 x 2.1 mm	VH931002-0
4	Acquity BEH-NH2	Waters	1.7 µm, 100 x 2.1 mm	186004801
5	Acclaim Trinity P1	Thermofisher	3 µm, 100 x 2.1 mm	071389

Bilag 5.4 Metoder til kolonnetests



FIGUR 6. Metoder til kolonnetests. Injektion: blanding af alle 38 stoffer (10 µg/L) i henholdsvis 100% vand, 20% acetonitril (RP) eller 100% acetonitril (HILIC); injektionsvolumen: 50 µL; dobbeltinjektion.

Bilag 6. Prøveforberedelse

Bilag 6.1 Indledende test af SPE kolonner

For hver SPE blev der lavet to prøver bestående af 500 mL vand (hanevand) spiket med STDmix til en koncentration på 0,4 µg/L. Derudover blev der for hver kolonne lavet en blindprøve bestående af 500 mL hanevand uden STD mix. Kolonnerne blev konditioneret med 4 ml 1% NH₄OH i methanol (for ENV+) eller 1% myresyre i metanol (for WCX), 4 ml acetonitril, 4 ml af MeOH og 4 ml af vand (LCMS grade).

Hvorefter prøverne blev loadet, og elueret sekventielt med 4 ml methanol, 4 ml acetonitril, 4 ml 1% NH₄OH i methanol og 4 ml 1% myresyre i metanol. For vendbare kolonner (Supelclean ENVI-Carb plus) blev kolonnen vendt inden elueringen. Hvert trin i elueringen blev opsamlet og analyseret individuelt. Prøverne er analyseret med targetscreener metoden (reversed phase) i positiv og negativ mode.

Resultaterne for positiv er vist i Bilag 7.2 og 7.3, mens resultaterne for neg mode er samlet i Bilag 7.4

Bilag 6.2 Genfinding (%) for teststoffer ved brug af de forskellige SPE-kolonner

Høj baggrund for BAC 12 gør, at de høje værdier ikke afspejler den reelle genfinding.

TABEL 6. Genfinding (%) for teststoffer ved brug af de forskellige SPE-kolonner. Genfinding for SPE kolonne A-H beregnet ud fra 50 ppb standard i MeOH. Analysen er baseret på reverse phase LC i positiv mode. Genfindingerne er angivet i % og er ikke korrigeret for baggrundsværdier fra instrument og SPE kolonner. Stoffer: 1: 1,2,4-Triazol; 2: BAC 12, resultater er udeladt pga høje blindværdier; 3: Benzyldimethylamine; 4: Chloridazon-desphenyl-methyl; 5: Melamine; 6: Tri-(2-chloroisopropyl) phosphate (TCPP); 7: Benzyltrimethylammonium; 8: 4,4'-sulfonfylbis-benzenamine; 9: 6-Methyl-1,3,5-triazine-diamine; 10: Atrazine-desethyl-desisopropyl; 11: Atrazine-desisopropyl; 12: Desphenyl chloridazon; 13: Dichlorobenzamide; 14: MIT (methyl-isothiazolinone); 15: N,N-Dimethylsulfamide (DMS) ** præcis genfinding er forbundet med usikkerhed pga manglende sensitivitet; 16: Terbutylazine-2-hydroxy.

	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15**	16
A	0		61	13	7	44	101	19	6	12	18	13	16	13	0	70
B	0		42	16	1	65	31	45	1	6	38	0	42	2	0	41
C	0		13	20	7	37	8	22	5	9	21	7	21	10	0	23
D	0		64	5	1	114	3	110	0	0	62	0	44	0	0	101
E	0		72	102	2	146	126	89	93	112	100	41	114	42	0	99
F	0		12	86	2	116	127	12	91	94	88	31	90	11	0	88
G	60		97	82	43	144	158	76	78	92	74	103	109	88	110	88
H	17		117	58	29	136	139	13	50	71	54	72	95	99	103	71

Bilag 6.3 Genfinding targetscreener pos

TABEL 7. Test af nye SPE kolonner RP POS. Genfinding targetscreener pos, korrigeret for blind. 1: 1,2,4-Triazol; 3: Benzyldimethylamine; 4: Chloridazon-desphenyl-methyl; 6: Tri-(2-chloroisopropyl) phosphate (TCPP); 7: Benzyltrimethylammonium; 8: 4,4'-sulfonylbis-benzenamine (peak 1); 9: 6-Methyl-1,3,5-triazine-diamine; 10: Atrazine-desethyl-desisopropyl; 11: Atrazine-desisopropyl; 12: Desphenyl chloridazon; 13: Dichlorobenzamide; 14: MIT (methyl-isothiazolinone); 15: N,N-Dimethylsulfamide (DMS); 16: Terbutylazine-2-hydroxy; 17: 4,4'-methylenebis-benzenamine; 18: Dimethachlor ESA; 19: CGA369873; 20: 1,3-Di-o-tolylguanidine; 21: 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane; 22: 2-Acrylamino-2-methylpropane sulfonate; 23: Terbutylazine-TP CSCD648241 (LM6). Resultaterne er givet som gennemsnit af to replikater. *baseret på én prøve.

	1	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
I	16	92	62	87	13	59	15	26	89	26	92	3	-3	91	17	94	97	71	-1	16	80
J	36	82	36	119	112	45	43	14	41	32	100	87	85	82	1	55	20	97	30	94	88
K	0	31	47	88	110	36	40	20	66	59	65	35	0	93	1	96	41	92	0	99	52
L*	31	83	39	91	94	43	49	42	44	37	82	90	93	65	7	62	36	81	13	102	53
M	0	74	17	102	94	97	3	6	101	2	98	8	0	89	61	118	32	103	0	2	66
N	7	8	85	91	102	8	97	77	88	93	99	9	0	81	0	103	90	26	0	74	66
O	33	86	66	87	96	56	80	67	65	71	95	83	98	68	4	59	55	91	37	111	49

Bilag 6.4 Genfinding beregnet ud fra 50 ppb standard i MeOH

TABEL 8. Venstre: Genfinding beregnet ud fra 50 ppb standard i MeOH. Analysen er baseret på reversed phase LC i negativ mode. Genfindingerne er angivet i % og er ikke korrigeret for baggrundsværdier fra instrument og SPE kolonner.

Højre: Baggrund fra apparat og SPE kolonner angivet i % beregnet ud fra 50 ppb standard i MeOH.

Stoffer: 17: 2-(1-methylpropyl)-4,6-dinitrophenol; 18: Pentadecafluorooctanoic acid (PFOA); 19: Bentazone; 20: Cyanuric acid (1,3,5-Triazine-2,4,6-triol); 21: Trifluoroacetic acid; 22: p-Sulfanilic acid.

SPE kolonner: A: Oasis WCX, 6 cc Vac Cartridge, 150 mg Sorbent per Cartridge, 30 µm; B: Oasis HLB 6 cc Vac Cartridge, 200 mg Sorbent per Cartridge, 30 µm; C: ISOLUTE ENV+ 200 mg/6 mL (Biotage Part No. 915-0020-C; D: Bond Elut PFAS WAX, 150 mg, 6 mL; F: Supelclean™ ENVI-Carb™ SPE Tube, 500 mg/6 mL; G: Supelclean™ ENVI-Carb™ Plus SPE Tube, reversible Tube, bed wt. 400 mg, volume 1 mL (Supelco. Merch).

	17	18	19	20	21	22
F	2	94	17	0	0	0
B	42	0	99	32	0	0
D	67	89	87	0	10	0
C	98	95	89	0	0	28
A	93	101	31	0	0	0
G	8	118	40	16	17	10

Bilag 6.5 Test af nye SPE kolonner RP neg

TABEL 9. Test af nye SPE kolonner RP neg, resultaterne er korrigeret for blind. Resultaterne er givet som gennemsnit af to replikater.

Stof	I	J	K	L
2-(1-methylpropyl)-4,6-dinitrophenol	80	2	-47	-26
PFOA	111	110	68	113
Bentazone	79	24	48	42
2-amino-5-methyl-benzenesulfonic acid	98	22	12	30
2-Acrylamino-2-methylpropane sulfonate	21	106	49	84
CGA369873	118	20	37	33
HFPO-DA	106	102	56	74
LM5	41	87	56	86
TFMS	66	100	1	97

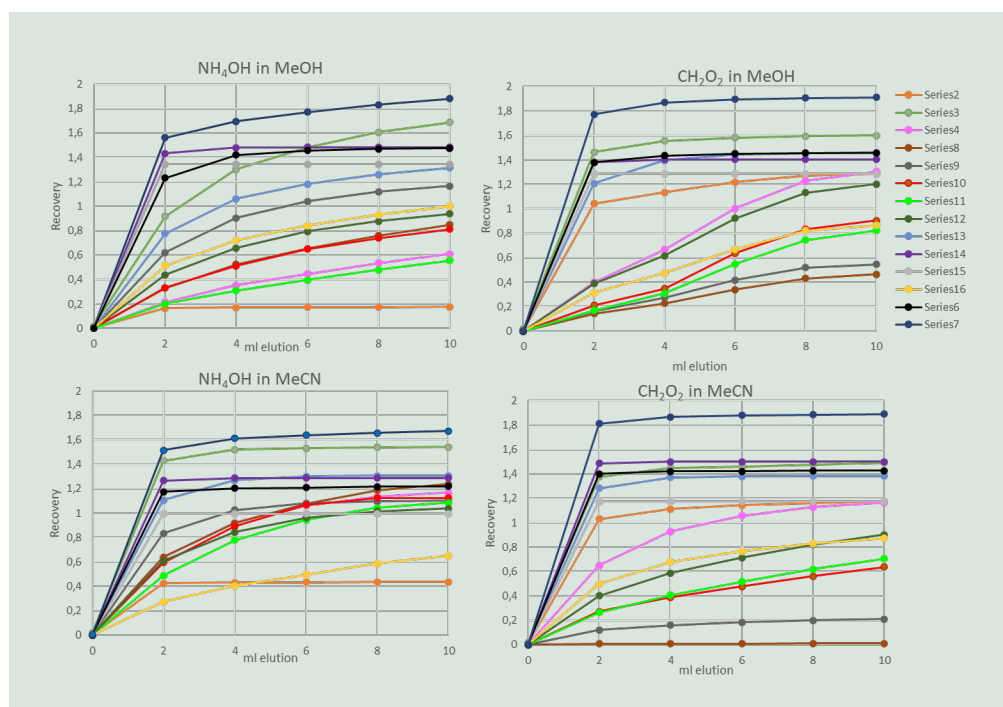
Bilag 6.6 Test af elueringsmetode for Supelclean™ ENVI-Carb™ Plus

4 x 500 mL vand (hanevand) spikes med 40 µL STDmix til en koncentration på 0,4 µg/L. SPE kolonnerne konditioneres med 10 mL metanol og 10 mL vand (LC MS grade). 500 mL spiked prøve blev loadet med et flow på ca. 9 ml/min hvorefter kolonnerne blev suget tørre. Efterfølgende blev der elueret med 10 ml af hhv. 5% ammoniakvand (25%) i MeOH, 5% myresyre i MeOH, 5% ammoniakvand (25%) i MeCN eller 5% myresyre i MeCN. Eluenten blev opsamlet i 2 ml fraktioner. 1 ml af hver fraktion blev udtaget, tilsat intern standard og analyseret ved RP i positiv mode.

TABEL 10. Beregnet genfindning ud fra 50 ppb std i MeOH. Genfindingen er angivet i % og viser den samlede genfindning for alle 5 fraktioner (10 mL) eluent. Genfindingen er ikke korrigeret for blind. Prøverne er analyseret ved reversed phase, positiv mode. Analytter: se Bilag 7.2.

Analyt	1 *	2	3	4	5*	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
NH ₄ OH i MeOH		18	169	61		147	188	85	117	81	56	94	131	148	134	100
NH ₄ OH i MeCN		44	154	117		122	167	124	110	112	109	104	131	129	99	65
CH ₂ O ₂ i MeOH		129	160	130		146	191	46	55	90	82	120	145	140	129	86
CH ₂ O ₂ i MeCN		118	149	116		143	189	1	21	64	71	90	138	150	117	87

Bilag 6.7 Kumulativ genfinding for eluering af Supelclean™ ENVI-Carb™ Plus



FIGUR 7. Kumulativ genfinding for eluering af Supelclean™ ENVI-Carb™ Plus med forskellige eluenter.

Genfindingen er beregnet ud fra 50 ppb std i MeOH. Genfindingen angiver den samlede genfinding for alle 5 fraktioner (10 mL) eluent og er ikke korrigeret for blind. Prøverne er analyseret ved reverse phase, positiv mode. 1: 1,2,4-Triazol*; 2: BAC 12, 3: Benzyltrimethylammonium; 4: Chloridazon-desphenyl-methyl; 5: Melamine*; 6: Tri-(2-chloroisopropyl) phosphate (TCPP); 7: Benzyltrimethylammonium; 8: 4,4'-sulfonylbis-benzenamine (peak 1); 9: 6-Methyl-1,3,5-triazine-diamine; 10: Atrazine-desethyl-desisopropyl; 11: Atrazine-desisopropyl; 12: Desphenyl chloridazon; 13: Dichlorobenzamide; 14: MIT (methyl-isothiazolinone); 15: N,N-Dimethylsulfamide (DMS); 16: Terbutylazine-2-hydroxy. *Stofferne er udeladt da kromatografien ikke tillod relativ kvantificering.

Bilag 6.8 Procedure for vurdering af Supelclean™ ENVI-Carb™ Plus med optimeret eluering

2 x 500 mL hanevand blev spiket med STDmix til en koncentration på 0,4 µg/L. Derudover blev der lavet en blindprøve bestående af 500 mL hanevand uden STD mix. Kolonnerne blev konditioneret med 2 x 4 mL MeOH efterfulgt af 2 x 5 mL vand (LCMS grade). Efter loading af prøverne blev kolonnerne tørret 15 min under sug og elueret med 3 mL 5% ammoniakvand (25%) i ACN og 3 mL 5% myresyre i ACN. Kolonnerne blev vendt inden eluering så der elueres i modsat retning af loading. Eluenten samles i en fraktion, og 1 mL blev udtaget, tilsat intern standard og analyseret.

Bilag 6.9 Forsøg med inddampning

2 x 10 ml af opløsninger af teststoffer i metanol eller acetonitrille (5 µg/L) blev inddampet til tørhed ved 30 °C under nitrogen flow. Prøverne stod ca. 10-15 min under nitrogen flow efter de var tørre. Herefter blev prøverne genopløst 1 i mL vand (LC/MS grade) svarende til en koncentration på 50 ppb ved 100% genfindning. Prøverne blev analyseret ved reversed-phase metoden i positiv mode, og sammenholdt med en kontrol med som ikke er inddampet for at bestemme genfindning. Derudover blev der medtaget prøver med hhv. acetonitril og metanol uden tilsatte stoffer. Intensiteten af toppene er angivet i nedenstående tabel som % af intensiteten fundet i kontrollen og angiver derfor genfindning i %. Der er ikke korrigeret for blindværdier.

TABEL 11. Forsøg med inddampning.

Stof	MeOH (1)	MeOH (2)	MeOH blank	ACN (1)	ACN (2)	ACN blank
1,2,4-Triazol	78	67		54	75	
BAC 12	115	110	11	107	112	12
Benzyltrimethylammonium	59	61		50	55	
Chloridazon-desphenyl-methyl	101	99		98	104	
Melamine	123	119		112	106	15
TCPP	87	84	14	82	92	14
Benzyltrimethylammonium	108	101		96	106	
4,4' sulfonylbis-benzenamine	109	101		91	99	
6-Methyl-1,3,5-triazine-diamine	102	97		97	103	
Atrazine-desethyl-desisopropyl	109	96		102	104	
Atrazine-desisopropyl	94	91		95	100	
Desphenyl chloridazon	108	100		95	101	
Dichlorobenzamide	91	91		90	98	
MIT	59	62		59	70	
DMS	73	62		65	77	
Terbutylazine-2-hydroxy	107	102		96	105	

Herefter blev 3 x 10 ml af opløsninger af teststoffer i metanol (5 µg/L) inddampet til 1 mL (2 prøver) eller næsten tørhed (1 dråbe, 1 prøve) under nitrogen flow ved 30 °C. Ved inddampning til under 1 mL blev prøven fortyndet til 1 mL i vand (LC/MS grade). Prøverne blev analyseret som ovenstående.

Bilag 6.10 Genfindning af teststoffer

Herefter blev 3 x 10 ml af opløsninger af teststoffer i metanol (5 µg/L) inddampet til 1 mL (2 prøver) eller næsten tørhed (1 dråbe, 1 prøve) under nitrogen flow ved 30 °C. Ved inddampning til under 1 mL blev prøven fortyndet til 1 mL i vand (LC/MS grade). Prøverne blev analyseret som ovenstående.

Her blev anvendt gennemsnitlig intensitet for 4 kørsler af samme KNT. ** Resultaterne for melamin er udeladt grundet dårlig kromatografi 1: 1,2,4-Triazol, 2: BAC 12, 3: Benzyltrimethylammonium, 4: Chloridazon-desphenyl-methyl, 5: Melamine, 6: Tri-(2-chloroisopropyl) phosphate (TCPP), 7: Benzyltrimethylammonium, 8: 4,4' sulfonylbis-benzenamine, 9: 6-Methyl-1,3,5-triazine-diamine, 10: Atrazine-desethyl-desisopropyl, 11:

Atrazine-desisopropyl, 12: Desphenyl chloridazon, 13: Dichlorobenzamide, 14: MIT (methylisothiazolinone), 15: N,N-Dimethylsulfamide (DMS), 16: Terbutylazine-2-hydroxy.

TABEL 12. Genfinding af teststoffer.

Stof	1	2	3	4	5**	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Inddampning til 1 ml (1)	11 3	11 4	10 0	10 3		11 0	12 3	10 8	10 8	11 5	10 7	10 6	10 7	10 0	10 3	10 5
Inddampning til 1 ml (2)	75	93	83	86		85	10 1	88	81	78	85	89	84	82	85	87
Inddampning til 1 dråbe	12 9	10 9	61	10 1		10 4	11 5	10 3	11 3	10 4	10 3	10 0	10 4	78	97	98

Bilag 6.11 SPE procedure for evaluering af nye SPE metoder

Prøver: 500 mL hanevand spikes til en konc på 0,4 µg/L

Der laves to prøver og to blindprøve (SPE_blind, hanevand uden STDmix) for hver kolonne.

SPE procedure:

- 1) Konditionering. Alle kolonner konditioneres som følger. De vendbare kolonner konditioneres i modsat retning af loading
 - 4 mL 5% myresyre i MeOH
 - 4 mL 5% ammoniakvand (25%) i MeOH
 - 4 mL ACN
 - 4 mL MeOH

Herefter vendes de vendbase kolonner og vaskes i samme retning som der loades. Alle kolonner vaskes nu med følgende.

 - 2 x 4 mL Sølvvand
- 2) Loading: prøverne loades. Hastigheden bør ikke overskride 5 mL/min.
- 3) Eluering: Der elueres sekventielt med følgende eluenter. Eluenterne samles i hver sit fraktionsglas. De vendbare kolonner elueres i modsat retning af loading. Kolonnerne køres ikke tør imellem eluenterne.
 - 4 mL MeOH
 - 4 mL ACN
 - 4 mL 5% ammoniakvand (25%) i MeOH
 - 4 mL 5% myresyre i MeOH

1 mL af hver fraktion overføres til en glødet glasvial og tilsættes intern standard. Derudover laves en 10, 25 og 50 ppb STD (begge mix i samme STD) i MeOH. 1 mL hældes over i en glødet glasvial, tilsættes IS og er klar til kørsel. Derudover laves en vial med 1 mL hanevand og is (blindhane).

Bilag 7. Validering

Bilag 7.1 Mix brugt til validering

Se Excel fil af samme navn.

Bilag 7.2 Screenings liste til interlab

TABEL 13. Screeningsliste til interlab.

Stoffer	CAS	Mw	MF	InchiKey	SMILES	CID	RT RP pos/neg
1,3-Diphenylguanidine	102-06-7	211,26	C13H13N3	OWRCNXZUPFZXOS-UHFFFAOYSA-N	<chem>C1=CC=C(C=C1)NC(=N)C2=CC=CC=C2N</chem>	7594	4.5
2-(1-methylpropyl)-4,6-dinitrophenol	88-85-7	240,21	C10H12N2O5	OWZPCEFYP5AJFR-UHFFFAOYSA-N	<chem>CCC(C)C1=C(C(=CC(=C1)[N+](=O)[O-])[N+](=O)[O-])O</chem>	6950	7.06
2,6-Dichlorobenzamide	2008-58-4	190,02	C7H5Cl2NO	JHSPCUHPSIUQRB-UHFFFAOYSA-N	<chem>C1=CC(=C(C(=C1)Cl)C(=O)N)Cl</chem>	16183	4.5
3,5-Di-tert-butylsalicylate	19715-19-6	250,33	C15H22O3	ZWQBZEFLFSFEOS-UHFFFAOYSA-N	<chem>CC(C)(C)C1=CC(=C(C(=C1)C(C)(C)O)C(=O)O</chem>	88208	11.2/9.8
4,4'-sulfonylbis-benzenamine (peak 1)	80-08-0	248,3	C12H12N2O2S	MQJKPEGWNLWLTK-UHFFFAOYSA-N	<chem>C1=CC(=CC=C1N)S(=O)(=O)C2=CC=C(C=C2)N</chem>	2955	4.22
4-Bis-amido-3,5,6-trichlorobenzene sulfonat (R471811)		347,6	C8H5Cl3N2O5S	NLCNUAPJCIAONV-UHFFFAOYSA-N	<chem>C1(=C(C(=C(C(=C1Cl)C(=O)N)Cl)Cl)S(=O)(=O)O)C(=O)N</chem>	1,38E+08	2.0
4-Chlorobenzenesulfonic acid	98-66-8	192,62	C6H5ClO3S	RJWBWTWIBUIGANW-UHFFFAOYSA-N	<chem>C1=CC(=CC=C1S(=O)(=O)O)Cl</chem>	7400	4.3
4-Methyl-1H-benzotriazole	29878-31-7	133,15	C7H7N3	CMGDVUCDZOBNDL-UHFFFAOYSA-N	<chem>CC1=CC=CC2=NNN=C12</chem>	122499	5.5/5.4
Adamantan-1-amine	768-94-5	151,25	C10H17N	DKNWSYNQZKUICI-UHFFFAOYSA-N	<chem>C1C2CC3CC1CC(C2)(C3)N</chem>	2130	4.7

Stoffer	CAS	Mw	MF	InchiKey	SMILES	CID	RT RP pos/neg
Atrazine- desisopropyl	1007- 28-9	173,6	C5H8ClN5	IVENSCMCQBJ AKW- UHFFFAOYSA- N	CCNC1=NC(=NC(=N1) N)Cl	13878	4.7
Benzoic acid	532-32- 1	144,1	C7H5O2Na	WXMKNITSTV MEF- UHFFFAOYSA- M	C1=CC=C(C=C1)C(=O)[O-].[Na+]	51705 5	3.4
Benzyltrimethyla mmonium	56-93-9	185,6 9	C10H16ClN	KXHPPCXNWT UNSB- UHFFFAOYSA- M	C[N+](C)(C)CC1=CC=C C=C1.[Cl-]	5963	3.34
CGA 108906 (Metalaxyl-M- TP)	104390- 56-9	295,2 9	C14H17NO 6	WFTHOCCLKY PFJX- UHFFFAOYSA- N	CC1=C(C(=CC=C1)C(= O)O)N(C(C)C(=O)O)C(= O)COC	1,17E +08	5.1/4.0
CGA369873		243,2 8	C10H13NO 4S	ZNKNVJGSYJF DHT- UHFFFAOYSA- N	CC1=C(C(=CC=C1)C)N C(=O)CS(=O)(=O)O	1,39E +08	4.3/4.23
Chloridazon- desphenyl- methyl	17254- 80-7	159,5 7	C5H6ClN3O	XNSGCNYTNL WRKM- UHFFFAOYSA- N	CN1C(=O)C(=C(C=N1) N)Cl	59433 0	3.74
Deisopropylhydr oxyatrazin	7313- 54-4	155,1 6	C5H9N5O	XRVCXZWJNO ORX- UHFFFAOYSA- N	CCNC1=NC(=O)NC(=N 1)N	1,35E +08	2.9/3.3
Desphenyl chloridazon	6339- 19-1	145,5 5	C4H4ClN3O	FEWPCPEGB PTAL- UHFFFAOYSA- N	C1=NNC(=O)C(=C1N)Cl	95827	2.92
Dicyclohexylami ne	101-83- 7	181,3 2	C12H23N	XBPCUCUWBY BCDP- UHFFFAOYSA- N	C1CCC(CC1)NC2CCC CC2	7582	4.9
Lincomycin	154-21- 2	406,5	C18H34N2 O6S	OJMMVQQUTA EWLP- KIDUDLJLSA-N	CCC[C@@H]1C[C@H](N(C1)C)C(=O)N[C@@H]][C@@H]2[C@@H]([C @@H]([C@H]([C@H](O 2)SC)O)O)[C@@H](C)O	30005 40	4.2
Melamine	108-78- 1	126,1 2	C3H6N6	JDSHMPZPIAZ GSV- UHFFFAOYSA- N	C1(=NC(=NC(=N1)N)N) N	7955	1.45
p- Cumenesulfonat e	16066- 35-6	200,2 6	C9H12O3S	CVLHGLWXLD OELD- UHFFFAOYSA- N	CC(C)C1=CC=C(C=C1) S(=O)(=O)O	6640	5.0

Stoffer	CAS	Mw	MF	InchiKey	SMILES	CID	RT RP pos/neg
Pentadecafluoro octanoic acid (PFOA)	335-67- 1	414,0 7	C8HF15O2	SNGREZUHAY WORS- UHFFFAOYSA- N	<chem>C(=O)C(C(C(C(C(C(C(F)(F)F)(F)(F)F)(F)(F)F)F)F)F)O</chem>	9554	8.84
p-Sulfanilic acid	121-57- 3	173,1 9	C6H7NO3S	HVBSAKJJOYL TQU- UHFFFAOYSA- N	<chem>C1=CC(=CC=C1N)S(=O)(=O)O</chem>	8479	1.45
Sotalol	3930- 20-9	272,3 7	C12H20N2 O3S	ZBMZVLHSJCT VON- UHFFFAOYSA- N	<chem>CC(C)NCC(C1=CC=C(C=C1)NS(=O)(=O)C)O</chem>	5253	3.4/3.5
Sulfamethoxazole	723-46- 6	253,2 8	C10H11N3 O3S	JLKIGFTWXXR PMT- UHFFFAOYSA- N	<chem>CC1=CC(=NO1)NS(=O)(=O)C2=CC=C(C=C2)N</chem>	5329	4.5/4.0
Sulfamic acid	5329- 14-6	97,1	H3NO3S	IIACRCGMVDH OTQ- UHFFFAOYSA- N	<chem>NS(=O)(=O)O</chem>	5987	
Terbutylazine- 2-hydroxy	66753- 07-9	211,2 6	C9H17N5O	OYTTCZOJKXCT BHG- UHFFFAOYSA- N	<chem>CCNC1=NC(=O)NC(=N1)NC(C)(C)C</chem>	1,35E +08	5.56
Terbutylazine- TP MT23 (LM5)		184,2 0	C7H12N4O 2	RMGNIWIYFYK TDC- UHFFFAOYSA- N	<chem>CC(C)(C)NC1=NC(=O)NC(=O)N1</chem>	58209 8	4.33
Tri-(2- chloroisopropyl) phosphate (TCPP)	13674- 84-5	327,6	C9H18Cl3O 4P	KVMPUXDNES XNOH- UHFFFAOYSA- N	<chem>CC(CCl)OP(=O)(OC(C)CCl)OC(C)CCl</chem>	26176	8.88
Interne standarder	CAS	Mw	MF	InchiKey	SMILES	CID	RT RP pos/neg
Nicotine-D4	350818- 69-8	166,2 6	C10D4H10 N2	SNICXCGAKAD SCV- MNYIHESISA-N	<chem>[2H]C1=C(C(=C(N=C1[2H]))[2H])C2CCCN2C)[2H]</chem>	45040 014	3,13
CGA 324007-D9	309923- 18-0	193,2 5	C7H3D9N4 O2		<chem>CC(C)(C)NC1=NC(=O)NC(=O)N1</chem>	4,32	3,94
CGA 369873-D9		274,3 1	C10H3D9N NaO4S		<chem>CC1=C(C(=CC=C1)C)NC(=O)CS(=O)(=O)O</chem>	3,9	4,23
Desethyl- atrazine-D6	2733387 -38-5	193,6 7	C6D6H4CIN 5	DFWFIQKMSF GDCQ- WFGJKAKNSA- N	<chem>[2H]C([2H])([2H])C(C([2H])([2H])([2H]))NC1=NC(=NC(=N1)N)Cl</chem>	1,02E +08	5,39
Atrazine D5	163165- 75-1	220,7 1	C8D5H9CIN 5	MXWJVTOORO XGIU- SGEUAGPISA- N	<chem>[2H]C([2H])([2H])C([2H])([2H])NC1=NC(=NC(=N1)Cl)NC(C)C</chem>	12306 645	7,65

Stoffer	CAS	Mw	MF	InchiKey	SMILES	CID	RT RP pos/neg
Diuron-D6	1007536-67-5	239,13	C9D6H4Cl2N2O	XMTQQYYKAHVGBJ-WFGJKAKNSA-N	[2H]C([2H])([2H])N(C(=O)NC1=CC(=C(C=C1)Cl)Cl)C([2H])([2H])[2H]	16212191	7,88/7.54
D3-Propyzamid		259,14	C12D6H15Cl2NO	PHNUZKMIPFFYSO-CRSPMMAGSA-N	[2H]C1=C(C(=C(C(=C1Cl)[2H])Cl)[2H])C(=O)NC(C)(C)C#C	1,29E+08	9,11
Terbutryn-d5	1219804-47-3	246,39	C10D5H14N5S	PHNUZKMIPFFYSO-CRSPMMAGSA-N	[2H]C([2H])([2H])C([2H])([2H])NC1=NC(=NC(=N1)SC)NC(C)(C)C	1,02E+08	9,7
Salicylic acid-d6		144,16	C7D6O3	YGSDEFSMJLZEOE-UDDMDDBKSA-N	[2H]C1=C(C(=C(C(=C1[2H])C(=O)O[2H])O[2H])[2H])[2H]	71309006	3.54
Bentazon-D6	2733969-39-4	246,32	C10D6H6N2O3S	ZOMSMJKLGFBRBS-WFGJKAKNSA-N	[2H]C([2H])([2H])C(C([2H])([2H])[2H])N1C(=O)C2=CC=CC=C2NS1(=O)=O	76974693	3.54
4-Nitrophenol-D4	93951-79-2	143,13	C6D4H1NO3	BTJIUGUIPKRLHP-RHQRLBAQSA-N	[2H]C1=C(C(=C(C(=C1[N+](=O)[O-])[2H])[2H])O)[2H]	15554730	10.21
PFDA-13C9	3830-45-3	545	C*C9F19NaO2		C(=O)(C(C(C(C(C(C(C(C(C(F)F)(F)F)(F)F)(F)F)(F)F)(F)F)(F)F)[O-].[Na+]	10,21	
6PPD-quinone-d5		303,4	C18D5H17N2O2	UBMGKRIXKUIXFQ-UPKDRLQUSAN	[2H]C1=C(C(=C(C(=C1[2H])[2H])NC2=CC(=O)C(=CC2=O)NC(C)CC(C)C)[2H])[2H]	1,62E+08	10,64
Stoffer	CAS	Mw	MF	InchiKey	SMILES	CID	RT RP pos/neg
1,3-Diphenylguanidine	102-06-7	211,26	C13H13N3	OWRCNXZUPFZXOS-UHFFFAOYSA-N	C1=CC=C(C(=C1)NC(=NC2=CC=CC=C2)N	7594	4.5
2-(1-methylpropyl)-4,6-dinitrophenol	88-85-7	240,21	C10H12N2O5	OWZPCEFYPSAJFR-UHFFFAOYSA-N	CCC(C)C1=C(C(=CC(=C1)[N+](=O)[O-])[N+](=O)[O-])O	6950	7.06
2,6-Dichlorobenzamide	2008-58-4	190,02	C7H5Cl2NO	JHSPCUHPSIUQRB-UHFFFAOYSA-N	C1=CC(=C(C(=C1)Cl)C(=O)N)Cl	16183	4.5

Resumé

Projektet PESTICID har udviklet en metode til et såkaldt kemisk fingeraftryk af grund- og drikkevand baseret på LC-HRMS. Formålet har været at etablere en bred, robust og kommercielt anvendelig screeningsmetode, der kan detektere både kendte og uventede forbindelser.

Metoden kombinerer opkoncentrering ved fastfaseekstraktion (SPE) med en dual kromatografisk analyse. Til fastfaseekstraktion blev valgt kulbase-rede sorbenter. Ekstraktion ved sekventiel basisk /sur eluering i acetonitril kombineret med inddampning viste sig mest effektiv.

Til kromatografering blev valgt dual opsætning med Reversed Phase (RP) for bred robust dækning og BEH-Amide hydrophilic interaction kromato-grafi (HILIC) for små og polære forbindelser. Validering overfor en suite af miljørelevante stoffer viste, at den samlede metode påviste 26% af stofferne på et koncentrationsniveau på 0,01 µg/L, 54% af stofferne på et koncentrationsniveau på 0,1 µg/L og 67% ved et koncentrationsniveau på 1 µg/L.

For første gang i Danmark er der udført et interlaboratorie sammenligningsstudie indenfor HRMS-screeninger. Metoden udviste betydelig træfsikkerhed på tværs af tre laboratorier.

Projektet har udviklet en samlet QA/QC-pakke med SST-kontroller, isotopmærkede interne standarder, triplikatanalyser, blankprøver og forslag til rapportering af identifikationssikkerhed. Projektet har samtidig beskrevet rammer for datalagring af HRMS-rådata samt præsenteret en kvantitativ non-target analyse (qNTA)-tilgang til estimering af koncentrationer uden referencestandarder.

Der er således udviklet og beskrevet en Suspect screening metode, som muliggør påvisning af ukendte miljøfremmede stoffer i grundvands- og drikkevandsprøver. Metoder af denne type påviser ikke med sikkerhed alle tilstedeværende stoffer og projektet har da også vist, at specielt mindre og polære molekyler kan udgøre en udfordring.



Miljøstyrelsen
Lerchesgade 35
5000 Odense C

www.mst.dk