

**BESTIMMUNG VON LINEAREN ALKYL BENZOL-  
SULFONATEN (LAS) IN KLÄRSCHLAMM MIT DER  
HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE  
(HPLC) MIT UV-DETEKTION**



**Bestimmung von linearen  
Alkylbenzolsulfonaten (LAS) in  
Klärschlamm mit der  
Hochleistungsflüssigchromatographie  
(HPLC) mit UV–Detektion**

**Peter SEIF**

**Peter REISINGER**

**UBA–BE–039**

Wien, Juli 1995

Bundesministerium für Umwelt



Autoren:

Peter Seif

Peter Reisinger

**Impressum:**

Medieninhaber und Herausgeber: Umweltbundesamt, 1090 Wien, Spittelauer Lände 5

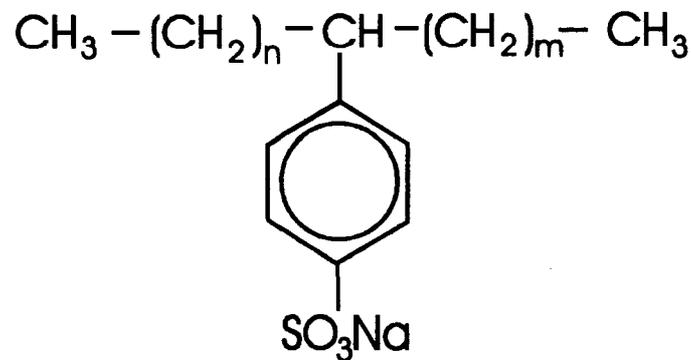
© Umweltbundesamt, Wien, Juli 1995

Alle Rechte vorbehalten  
ISBN 3-85457-259-x

## Einleitung

Die linearen Alkylbenzolsulfonate (LAS) sind - nach Seife - die wichtigsten Tenside mit einem Marktanteil von ca. 30 %; weltweit werden jährlich etwa 1.5 Millionen Tonnen dieser anionischen Tenside produziert [S. Scharf et al.: LAS in der Umwelt. Umweltbundesamt, Report UBA-95-105, Wien, 1995].

Abbildung 1 : Lineare Alkylbenzolsulfonate (LAS)



$$n + m = 7 \text{ bis } 10$$

In den Kläranlagen werden sie fast vollständig aus dem Wasser eliminiert. Mit Gehalten von ca. 15 mg - 16 g/kg stellen sie im Klärschlamm die wichtigste organische Schadstoffgruppe dar [U. Drescher-Kaden, M. Matthies und R. Brüggemann: Organische Schadstoffe in Klärschlämmen. GWF Wasser Abwasser 130(1989) Nr.12, 613-620].

Im Rahmen der Umweltkontrolle ist daher die Erfassung dieser Tensidgruppe im Klärschlamm von sehr großer Bedeutung.

Im Umweltbundesamt wurde deshalb eine Analysenmethode zur Bestimmung dieser waschaktiven Substanzen in Klärschlamm entwickelt. Dabei werden die LAS mit Hilfe einer Soxhletextraktion aus dem Klärschlamm angereichert und der gewonnene Extrakt über eine Festphase vorgereinigt. Die Trennung und Bestimmung erfolgt mit der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit UV-Detektion bei 225 nm.

## Arbeitsvorschrift

Die beiden Methoden UBA31303-01 und UBA31303-02 unterscheiden sich nur im Bereich der HPLC-Analytik, wo zwei verschiedene HPLC-Systeme (HPLC A und HPLC B) verwendet werden.



UBA31303-01  
UBA31303-02

**Bestimmung von linearen Alkylbenzolsulfonaten (LAS) in Klärschlamm mit der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit UV-Detektion**

### 1) Warn- und Sicherheitshinweise

**Acetonitril ist leichtentzündlich (R11) und giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut (R23/24/25).**

**Methanol ist leichtentzündlich (R11) und giftig beim Einatmen und Verschlucken (R23/25).**

**Dodecylbenzolsulfonsäure ist gesundheitsschädlich beim Verschlucken (R22) und reizt die Augen und die Haut (R36/38).**

**Formaldehyd ist giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut (R23/24/25) und verursacht Ätzungen (R34). Irreversibler Schaden (R40) und Sensibilisierung durch Hautkontakt (R43) ist möglich.**

**Kaliumhydroxid verursacht schwere Verätzungen (R35).**

**Natriumperchlorat ist gesundheitsschädlich beim Verschlucken (R22). Es besteht Explosionsgefahr bei Mischung mit brennbaren Stoffen (R9).**

**Salzsäure reizt die Augen und die Haut (R36/38).**

## 2) Zweck und Anwendungsbereich

Mit dieser Methode können LAS in lyophilisierten Klärschlammproben in Konzentrationen von 400 - 8000 mg/kg Trockensubstanz (TS) bestimmt werden.

## 3) Referenzen

L. Comellas, J.L. Portillo, M.T. Vaquero: Development of an analytical procedure to study linear alkylbenzenesulphonate (LAS) degradation in sewage sludge-amended soils.

Journal of Chromatography A, 657 (1993) 25-31.

## 4) Grundzüge des Verfahrens

- Soxhletextraktion der LAS mit alkalischem Methanol
- Entfernen des Extraktionsmittels
- Aufnahme des Trockenrückstandes in Wasser/Methanol und Ansäuern mit Salzsäure auf pH = 1
- Extraktion der LAS an einer C18-Festphase
- Elution mit Methanol
- Bestimmung mit der Hochleistungschromatographie (HPLC) mit UV-Detektion

## 5) Reagenzien und Materialien

Acetonitril, gradient grade (z.B. Merck 30)

Methanol, gradient grade (z.B. Merck 6007)

Dodecylbenzolsulfonsäure Natriumsalz 80-85 % (Fluka 44200)

Formaldehydlösung mind. 37 %, p.A. (z.B. Merck 4003)

Kaliumhydroxid Plätzchen, p.A. (z.B. Merck 5033)

Natriumperchlorat-Monohydrat  $\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , p.A. (z.B. Merck 6564)

Salzsäure 25% , p.A. (z.B. Merck 316)

Reinstwasser (z.B. hergestellt mit Milli-Q-Plus)

Extraktionshülsen 22 x 80 mm (z.B. Schleicher & Schuell 350 211)

Festphasenextraktionssäule Isolut C 18 (EC), 1g (IST 221-0100-C)

HPLC - Vorsäule: LiChrospher 100 RP-18, 5  $\mu\text{m}$ , 4 mm x 4 mm ID (Merck 50957)

HPLC - Trennsäule: LiChrospher 100 RP-18, 5  $\mu\text{m}$ , 125 mm x 4 mm ID (Merck 50943)

## 6) Geräte

Reinstwasseraufbereitungssystem Milli-Q-plus (Millipore)

Soxhlet-Extraktionsapparatur (30 ml)

Rotationsverdampfer Rotavapor (Büchi)

Festphasenextraktionssystem Baker-Spe 21

HPLC-System (Waters):

HPLC A (UBA31303-01):

- 1 Pumpe 510
- 1 Pumpe 590
- Autosampler WISP 712
- Photodiodearray-Detektor 990
- System Interface Module
- Gerätesteuer- und Auswertesoftware Millennium 2010

HPLC B (UBA31303-02):

- Delta Prep 4000
- Autosampler WISP 717
- UV-Detektor 486
- System Controller 4000
- Gerätesteuer- und Auswertesoftware Maxima 825

## **7) Durchführung**

### **7.1) Probenvorbereitung**

#### **7.1.1) Soxhletextraktion**

250 mg der lyophilisierten Klärschlammprobe werden in eine Extraktionshülse (22 x 80 mm) gegeben und im Soxhletextraktor (30 ml) mit 120 ml 0.5 M Kaliumhydroxid in Methanol 4 Stunden extrahiert.

Das Lösemittel wird am Rotavapor (Temperatur: 40 °C) entfernt und der Trockenrückstand in 30 ml Wasser/Methanol (70/30 V/V) aufgenommen. Der pH-Wert wird mit 25 %iger Salzsäure auf pH = 1 eingestellt. Anschließend wird die Probe ca. 1 min. im Ultraschallbad behandelt, um das Kaliumchlorid in Lösung zu bringen (= Soxhletextrakt).

#### **7.1.2) Festphasenextraktion**

##### **7.1.2.1) Vorbehandlung der C18 - Festphasenextraktionssäule**

Die C18-Säule wird mit 3 ml Methanol und mit 2 ml 0.1 N Salzsäure gereinigt und aktiviert.

##### **7.1.2.2) Extraktion**

Der Soxhletextrakt wird über die C18-Säule gesaugt (Fluß: ca. 4 ml/min.). Die Säule wird mit 2 ml 0.1 N Salzsäure nachgewaschen.

### 7.1.2.3) Elution und Aufnahme in Methanol

Die LAS werden mit 9 ml (3 x 3 ml) Methanol in einen 10 ml Meßkolben eluiert. Dann wird mit Methanol auf 10 ml aufgefüllt (= Probenextrakt).

### 7.2) Analyse

Die Analyse kann auf 2 verschiedenen HPLC-Linien (HPLC A oder HPLC B) durchgeführt werden. Wenn nötig wird der Probenextrakt mit Methanol in geeigneter Weise verdünnt.

HPLC A / UBA31303-01 :

Vorsäule: LiChrospher 100 RP-18, 5 µm, 4 mm x 4 mm ID (Merck 50957)

Trennsäule: LiChrospher 100 RP-18, 5 µm, 125 mm x 4 mm ID (Merck 50943)

Gradientenelution: Linearer Gradient

Zeit (min.)	Acetonitril	0.1 M NaClO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O in Acetonitril/Wasser (25/75 V/V)
0.0	15	85
1.0	15	85
20.0	40	60
22.0	40	60
25.0	70	30
35.0	70	30
45.0	15	85

Flußrate: 1 ml/min.

Injektionsvolumen: 50 µl Probenextrakt

Detektion: UV bei 225 nm

HPLC B / UBA31303-02:

Vorsäule: LiChrospher 100 RP-18, 5 µm, 4 mm x 4 mm ID (Merck 50957)

Trennsäule: LiChrospher 100 RP-18, 5 µm, 125 mm x 4 mm ID (Merck 50943)

Gradientenelution: Linearer Gradient

Zeit (min.)	Acetonitril	0.1 M NaClO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O in Acetonitril/Wasser (25/75 V/V)
0.0	15	85
1.0	15	85
19.0	40	60
21.0	40	60
30.0	70	30
34.0	70	30
40.0	15	85
50.0	15	85

Flußrate: 1 ml/min.  
Injektionsvolumen: 50 µl Probenextrakt  
Detektion: UV bei 225 nm

### **7.3) Kalibrierung**

Die Kalibrierung erfolgt mit externen Standards auf der Gerätesoftware. Als Referenzsubstanz wird Natriumdodecylbenzolsulfonat verwendet, eine Mischung von LAS-Homologen. Für die Kalibrierung wird die Gesamtfläche dieser Homologen herangezogen. Die Ergebnisse werden mit dem Faktor des Probenvorbereitungsschrittes (x 40) sowie mit der mittleren Wiederfindungsrate korrigiert.

- Arbeitsbereich: 400 - 8000 mg/kg Trockensubstanz (TS)
- Kalibrierpunkte: 5
- Bezugsfunktion: linear
- Meßwert: Peakfläche

#### **7.3.1) Herstellen der Stammlösung**

1 g Natriumdodecylbenzolsulfonat wird eingewogen, 1 ml Formaldehydlösung dazugegeben und mit Reinstwasser auf 100 ml aufgefüllt.  
Diese Stammlösung enthält 10 g LAS / l Reinstwasser

#### **7.3.2) Herstellung der Kalibrierlösungen**

In je einem 100 ml Meßkolben werden je 100 µl, 500 µl, 1 ml, 1.5 ml und 2 ml der Stammlösung mit Methanol auf 100 ml verdünnt.  
Diese Kalibrierlösungen enthalten 10 mg, 50 mg, 100 mg, 150 mg und 200 mg LAS / l Methanol.  
Bei der vorliegenden Probenvorbereitung entsprechen sie 400 mg, 2000 mg, 4000 mg, 6000 mg und 8000 mg LAS / Klärschlamm TS.

#### **7.3.3) Bestimmung der mittleren Wiederfindungsrate**

Für die Ermittlung der Wiederfindungsraten werden 250 mg Klärschlamm mit LAS dotiert. Es werden je 1 Zumischprobe mit einer LAS-Konzentration von 2 g/kg TS, 5 g/kg TS, 7.5 g/kg TS und 10 g/kg/TS sowie je 4 Zumischproben mit einer LAS-Konzentration von 20 g/kg TS, 30 g/kg TS und 40 g/kg TS nach der Arbeitsvorschrift analysiert und der Gehalt an LAS bestimmt. Die Blindwerte werden abgezogen.

Die mittlere Wiederfindungsrate (MWFR) wird aus den Wiederfindungsraten der 16 Zumischungen bestimmt (siehe Tabelle 1).

*Tabelle 1 : Mittlere Wiederfindungsrate von LAS*

	MWFR	(+/- s)
LAS	90.7	(5.0)
MWFR = mittlere Wiederfindungsrate aus 16 Meßwerten in % +/- s = Standardabweichung in %		

## 8) Qualitätssichernde Maßnahmen

### 8.1) Grundkalibrierung

#### 8.1.1) Methode UBA31303-01 (HPLC A)

Die Grundkalibrierung wird erstellt, indem jede der Kalibrierlösungen mit einer LAS-Konzentration von 10 mg/l, 20 mg/l, 50 mg/l, 75 mg/l, 100 mg/l, 125 mg/l, 150 mg/l, 175 mg/l und 200 mg/l mit der HPLC 6x analysiert wird (bei der vorliegenden Probenvorbereitung entsprechen sie 400 mg, 800 mg, 2000 mg, 3000 mg, 4000 mg, 5000 mg, 6000 mg, 7000 mg und 8000 mg/kg Klärschlamm TS). Die dabei erhaltenen Peakflächen werden mit den dazugehörigen Konzentrationen zur Ermittlung der Verfahrenskennndaten in die Qualitätssicherungssoftware ValiData eingegeben (siehe Tabelle 2).

#### 8.1.2) Methode UBA31303-02 (HPLC B)

Die Grundkalibrierung wird erstellt, indem jede der Kalibrierlösungen mit einer LAS-Konzentration von 10 mg/l, 20 mg/l, 50 mg/l, 75 mg/l, 100 mg/l, 125 mg/l, 150 mg/l, 175 mg/l und 200 mg/l mit der HPLC 4x analysiert wird (bei der vorliegenden Probenvorbereitung entsprechen sie 400 mg, 800 mg, 2000 mg, 3000 mg, 4000 mg, 5000 mg, 6000 mg, 7000 mg und 8000 mg/kg Klärschlamm TS). Die dabei erhaltenen Peakflächen werden mit den dazugehörigen Konzentrationen zur Ermittlung der Verfahrenskennndaten in die Qualitätssicherungssoftware ValiData eingegeben (siehe Tabelle 3).

*Tabelle 2 : Verfahrenskenndaten der Methode UBA31303-01 (HPLC A)*

Arbeitsbereich: 10 mg/l bis 200 mg/l		
Kalibrierfunktion 1.Grades (y=a+bx)		
Steigung		19271 Fl. / (mg/l)
VB (Steigung)	18944	19598 Fl. / (mg/l)
Achsenabschnitt		- 3093 Fl.
VB (Achsenabschnitt)	- 42013	35826 Fl.
Reststandardabweichung		76162 Fl.
Verfahrensstandardabweichung		3.95 mg/l
rel. Verfahrensstandardabweichung		3.93 %
Nachweisgrenze (nach DIN32645 Vorentwurf Dezember 1991)		
Nachweisgrenze		3.18 mg/l
VB Nachweisgrenze	2.67	3.94 mg/l
Bestimmungsgrenze		11.2 mg/l
VB Bestimmungsgrenze	9.43	13.9 mg/l

*Tabelle 3 : Verfahrenskenndaten der Methode UBA31303-02 (HPLC B)*

Arbeitsbereich: 10 mg/l bis 200 mg/l		
Kalibrierfunktion 1.Grades (y=a+bx)		
Steigung		16562 Fl. / (mg/l)
VB (Steigung)	16352	16771 Fl. / (mg/l)
Achsenabschnitt		21779 Fl.
VB (Achsenabschnitt)	- 3151	46708 Fl.
Reststandardabweichung		39330 Fl.
Verfahrensstandardabweichung		2.37 mg/l
rel. Verfahrensstandardabweichung		2.36 %
Nachweisgrenze (nach DIN32645 Vorentwurf Dezember 1991)		
Nachweisgrenze		2.37 mg/l
VB Nachweisgrenze	1.91	3.10 mg/l
Bestimmungsgrenze		8.42 mg/l
VB Bestimmungsgrenze	6.81	11.0 mg/l

## **8.2) Kontrollmessungen**

### **8.2.1) Kalibrierung**

Die aktuelle Kalibrationskurve, die bei jeder HPLC-Analysenserie auf der Gerätesoftware erstellt wird, wird mit der Kalibrierfunktion der Grundkalibrierung verglichen. Für die LAS-Konzentrationen von 10 mg/l und 100 mg/l werden Regelkarten erstellt, indem mit den Flächen der Grundkalibrierung die Standardabweichung  $s$  errechnet wird. Als obere und untere Regelgrenzen wird die dreifache Standardabweichung ( $+3 s$  und  $-3 s$ ) festgesetzt.

Es wird überprüft, ob die Flächen der LAS-Kalibrierlösungen der aktuellen Kalibrationskurven innerhalb dieser Regelgrenzen liegen.

Ist dies nicht der Fall, werden neue LAS-Kalibrierlösungen hergestellt. Liegen deren Flächen wieder außerhalb der Regelgrenzen, wird der Analysenleiter informiert.

### **8.2.2) Wiederfindungsproben**

Während einer Meßserie nach jeweils 10 Proben sowie beim Einsatz einer neuen Charge von Festphasenextraktionssäulen wird die Wiederfindungsrate durch Analyse von zwei Zumischproben kontrolliert.

Liegen die Wiederfindungsraten dieser Kontrollproben nicht innerhalb der Wiederfindungsgrenzen ( $= \text{MWFR} \pm 3 s$ ), werden weitere zwei Zumischproben (eventuell mit einer neuen Charge von Festphasenextraktionssäulen) analysiert. Liegen diese wieder außerhalb der Wiederfindungsgrenzen, wird eine neue mittlere Wiederfindungsrate aus 12 Zumischungen bestimmt und daraus neue Wiederfindungsgrenzen errechnet.

### **8.2.3) Doppelbestimmungen**

Die Proben werden 2x aufgearbeitet und analysiert (Doppelbestimmung) und aus den Gehalten der Mittelwert gebildet. Weichen die Konzentrationen der Einzelbestimmungen um mehr als 15 % vom Mittelwert ab, wird eine dritte Bestimmung durchgeführt und aus den beiden zusammenpassenden Gehalten der Mittelwert gebildet.

Abbildung 2: HPLC-Chromatogramm einer LAS-Kalibrierlösung (175 mg/l) / HPLC A

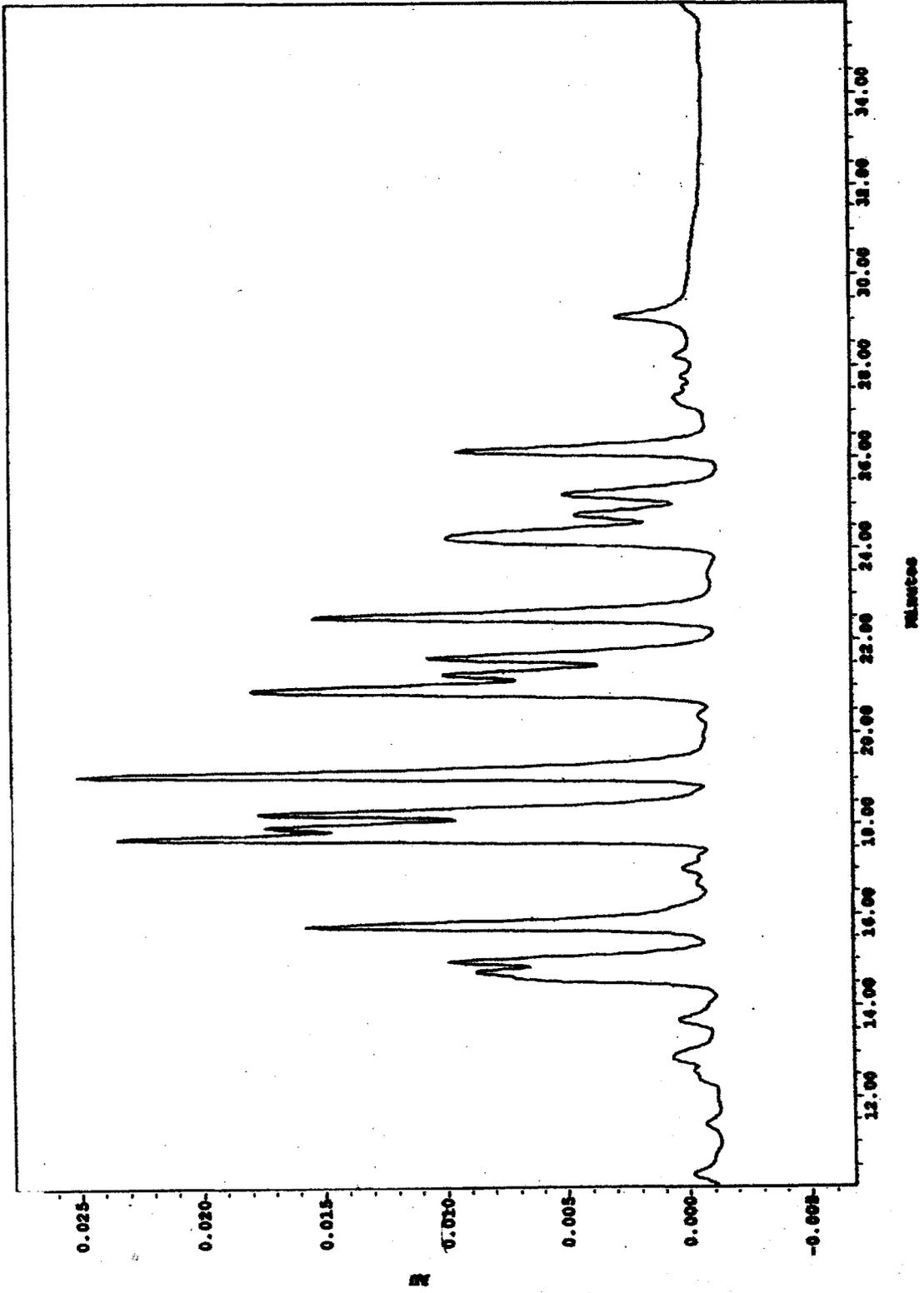


Abbildung 3: HPLC-Chromatogramm einer Klärschlammprobe / HPLC A

