

DISSERTATION

Analyse fettchemischer Produkte mittels
comprehensiver zweidimensionaler
Flüssigchromatographie gekoppelt mit der
Massenspektrometrie (LCxLC-MS)

vom Fachbereich C (Mathematik und Naturwissenschaften)

der Bergischen Universität Wuppertal

genehmigte Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde

- Doktor der Naturwissenschaften -

(Dr. rer. nat.)



vorgelegt von

Victoria Elsner (M.Sc.)

aus Düsseldorf

Wuppertal, September 2013

Diese Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20140113-115443-6

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn:nbn:de:hbz:468-20140113-115443-6>]

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum
von November 2010 bis August 2013
im Arbeitskreis Analytische Chemie
der Bergischen Universität Wuppertal
unter der Leitung von
HERRN PROF. DR. OLIVER J. SCHMITZ.

Die in dieser Arbeit beschriebene Forschung
wurde finanziert von der
BASF Personal Care and Nutrition GmbH
und der
Dr. Jost Henkel Stiftung.

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig im Arbeitskreis der Analytischen Chemie unter der Leitung von HERRN PROF. DR. OLIVER J. SCHMITZ durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Wuppertal, 13.09.2013

(Victoria Elsner)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt HERRN PROF. DR. OLIVER J. SCHMITZ für die sehr freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe der Analytischen Chemie, für die interessante Aufgabenstellung dieser Arbeit sowie für die fachliche Betreuung.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei HERRN PROF. DR. HANS-WILLI KLING für die gute Zusammenarbeit, die rege Diskussionsbereitschaft und die Übernahme des Korreferates.

Bei HERRN DR. DAVID MELCHIOR, FRAU DR. MICHAELA WIRTZ und HERRN DR. VOLKER WULF von der BASF Personal Care and Nutrition GmbH bedanke ich mich für die interessanten Diskussionen und Ratschläge sowie für die Koordination des gesamten Projektes.

Ein großer Dank gilt auch der Dr. Jost Henkel Stiftung, die mich als Stipendiatin aufgenommen hat und deren finanzielle Unterstützung mir die Promotion ermöglicht hat.

Bei HERRN DR. ALBIN MAISCH möchte ich mich für die zur Verfügung gestellten RP-Trennsäulen bedanken.

Ich bedanke mich außerdem bei Agilent Technologies für die Möglichkeit einen Forschungsaufenthalt am Standort in Waldbronn durchzuführen. Hier möchte ich mich insbesondere bei dem gesamten Team der Marketing-Abteilung für die freundliche Aufnahme sowie für die fachliche Betreuung bedanken.

Bei HERRN DR. ROMAN DÜCK möchte ich mich für die Einweisung in die verwendeten Geräte sowie für die Einarbeitung in die zweidimensionale Flüssigchromatographie bedanken.

Ebenso danke ich HERRN DR. WALTER TURNER für seine Hilfe und seine geduldigen Korrekturen des Englischen bei sämtlichen Veröffentlichungen.

Außerdem bedanke ich mich herzlich bei INA EBERSBACH, ALEXANDRA VON TROTHA und EDUARD DEIBEL für die außerordentlich angenehme und humorvolle Arbeitsatmosphäre im Büro sowie ebenfalls bei alle Mitgliedern der Arbeitsgruppen Analytische Chemie und Management chemischer Prozesse in der Industrie, die mir stets hilfsbereit und freundlich entgegen traten und mir fortwährend mit interessanten Gesprächen zur Seite standen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund LUKAS HYZAK für das kritische Korrekturlesen dieser Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft sowohl auf fachlicher als auch auf persönlicher Ebene und seine Unterstützung jeglicher Art.

Schlussendlich danke ich meinen Eltern und meiner Familie, die mich während meines gesamten Studiums unterstützt haben, mir fortwährend mit Rat und Zuspruch zur Seite standen und deren Unterstützung mir von unschätzbarem Wert ist.

Abstract

Fatty alcohol derivatives are used as surfactants and applied in commercial formulations like laundry detergents, cleaning agents or cosmetic products as complex mixtures. Different classes of surfactants are combined in formulations to improve the properties of the product such as cleaning capacity or foam formation. Furthermore, the individual surfactant classes already consist of a complex mixture of homologues because of the raw materials used and the production process. Due to the complexity of this kind of samples, an analytical method is necessary which can detect all individual substances as well as qualify and quantify them.

In this work, it has been shown that complex mixtures consisting of anionic, nonionic and amphoteric surfactants can be separated with HILIC by substance class. Furthermore, a separation by EO homologues was achieved for the ethoxylated substances while a separation by alkyl chain length distribution was only obtained for the betaines. In addition, the application of a reversed phase material showed a very good separation by alkyl chain length distribution whereas the substance classes could not be separated from each other. The use of different organic mobile phases can also lead to a separation by EO homologues, if needed. But exemplified by a special phase material for the analysis of surfactants, it was shown that the one-dimensional separation by substance class, alkyl chain length distribution and EO homologues of a complex surfactant mixture leads to coelutions and a very complicated data evaluation.

Since the one-dimensional separation did not lead to the desired result, comprehensive two-dimensional liquid chromatography (LCxLC) was implemented. Firstly, the Neue test was carried out for a closer characterization of the reversed phase materials used. While the separation in the first dimension was performed by polar interactions of a HILIC phase, a C₈ diol phase showed the highest orthogonality when used as second dimension. With this column combination, a separation by substance class and EO homologues was achieved in the first dimension, while the

separation in the second dimension led to a further separation by alkyl chain length distribution. Finally, the developed method allowed the separation of about 110 individual substances.

The LCxLC method was successfully applied to the analysis of several real samples from the home care sector. Furthermore, analyses for the determination of the reproducibility of peak area and retention time showed that the reproducibility of the retention time in the first dimension is dependent on the retention time. Apart from a small sector in the chromatogram where broad signals were obtained, the reproducibility of the retention time in the first dimension resulted in values below 10%. The retention time in the second dimension showed a very good reproducibility with a relative standard deviation below 7% for all substances. Concerning the reproducibility of the peak area, a relative standard deviation below 7% was achieved for fatty alcohol ethoxylates (FAEO), fatty alcohol ether sulfates (FAES) and betaines. For the fatty alcohol sulfates (FAS) and alkyl polyglucoside (AG), higher values were achieved, which is due to an insufficient and non-reproducible ionisation. Regarding the betaines and fatty alcohol ethoxylates, it was shown that a quantification of the surfactants in complex mixtures is possible with an external calibration or the standard addition method.

Abkürzungsverzeichnis

2D-LC	Zweidimensionale Flüssigchromatographie
A	Peakfläche
ACN	Acetonitril
AG	Alkylpolyglucosid
APCI	Chemische Ionisation unter Atmosphärendruck
APLI	Laserionisation unter Atmosphärendruck
APPI	Photoionisation unter Atmosphärendruck
Bed.	Bedingung
CAP	Critical point of adsorption
CRM	Charged-Residue-Modell
dp-Grad	Oligomerisierungsgrad
EIC	Extrahiertes Ionenchromatogramm
ELSD	Evaporative light-scattering detector
EO-Grad	Ethoxylierungsgrad
ESI	Elektrospray-Ionisation
FAEO	Fettalkoholethoxylat
FAES	Fettalkoholethersulfat
FAS	Fettalkoholsulfat
GC	Gaschromatographie
GFC	Gelfiltrationschromatographie
GPC	Gelpermeationschromatographie
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie
HPLC	High-performance liquid chromatography
IEM	Ion-Evaporation-Modell
IPA	Isopropanol
LAC	Liquid adsorption chromatography
LAEC	Liquid adsorption exclusion chromatography
LC	Liquid chromatography
LCCC	Liquid chromatography at critical conditions

LC-LC	Heart-cutting zweidimensionale Flüssigchromatographie
LCxLC	Comprehensive zweidimensionale Flüssigchromatographie
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungsverhältnis
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NP	Normalphase
NPC	Normalphasenchromatographie
PEG	Polyethylenglycol
R	Rest
RI	Brechungsindex
RP	Umkehrphase
RPC	Umkehrphasenchromatographie
RSD	Relative Standardabweichung
SEC	Größenausschlusschromatographie
TOF	Time-of-flight
t_R	Retentionszeit

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
2	Theoretische Grundlagen.....	2
2.1	Definition und Klassifizierung der Tenside	2
2.2	Rohstoffe, Produktion, Einsatzgebiete	3
2.3	Die Chemie der Tenside	6
2.3.1	Anionische Tenside.....	6
2.3.2	Nichtionische Tenside	9
2.3.3	Kationische Tenside	11
2.3.4	Amphotere Tenside	11
2.4	Die Analytik von Tensiden	12
2.4.1	Die chromatographische Trennung.....	12
2.4.2	Die unspezifische Detektion.....	15
2.4.3	Die massenspektrometrische Detektion	16
2.5	Chromatographische Trennmechanismen	21
2.5.1	Adsorptions- und Umkehrphasenchromatographie	21
2.5.2	Hydrophile Interaktionschromatographie	23
2.5.3	Größenausschlusschromatographie	25
2.5.4	Weitere Trennmechanismen zur Analytik von Polymeren	26
2.6	Comprehensive zweidimensionale Flüssigchromatographie	29
3	Aufgabenstellung und Zielsetzung.....	36
4	Ergebnisse und Diskussion.....	37
4.1	Allgemeines Messprinzip	37
4.2	Eindimensionale Analyse verschiedener Tensidklassen.....	38

4.2.1	Trennung mittels HILIC.....	38
4.2.1.1	Allgemeiner Versuchsaufbau.....	38
4.2.1.2	Anionische Tenside.....	39
4.2.1.3	Nichtionische Tenside	43
4.2.1.4	Amphotere Tenside	46
4.2.1.5	Standardgemisch der Tenside.....	47
4.2.2	Trennung mittels Umkehrphasenchromatographie	49
4.2.2.1	Allgemeiner Versuchsaufbau.....	49
4.2.2.2	ReproSil-Pur® C ₁₈ AQ	50
4.2.2.3	Reprospher 100 C ₈ -Aqua.....	53
4.2.2.4	Weitere Phasen	58
4.3	Klassifizierung von Phasenmaterialien nach NEUE	60
4.4	Massenspektrometrische Detektion	67
4.4.1	Ionisation mittels APCI.....	67
4.4.2	Ionisation mittels ESI.....	70
4.5	Comprehensive zweidimensionale LC von Tensidgemischen	73
4.5.1	Separate Optimierung der beiden Trenndimensionen.....	73
4.5.2	Comprehensive zweidimensionale Trennung.....	74
4.5.3	Optimierung in der LCxLC	76
4.5.4	Kompatibilität der Methode mit anderen Systemen	79
4.6	Comprehensive zweidimensionale LC von Home Care Produkten	86
4.7	Präzision von Retentionszeit und Peakfläche in der LCxLC.....	90
5	Ausblick.....	103
6	Zusammenfassung.....	104

7	Experimenteller Teil.....	107
7.1	Chemikalien.....	107
7.1.1	Tenside.....	107
7.1.2	Weitere Chemikalien.....	111
7.2	Geräte und Software.....	111
7.3	Trennsäulen.....	113
7.4	Gradienten.....	114
7.5	Parameter für Neue-Test.....	120
7.6	Parameter für Fließinjektion.....	121
8	Anhang.....	122
8.1	Weitere Chromatogramme, Abbildungen und Tabellen.....	122
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	138
8.3	Tabellenverzeichnis.....	143
8.4	Literatur.....	147

1 Einführung

Natürliche Fette und Öle liefern die Rohstoffe für die fettchemische Industrie. Neben den Fettsäuren zählen Glycerin, Fettsäuremethylester, Fettalkohole und Fettamine zu den Ausgangssubstanzen, welche durch chemische Reaktionen zu Tensiden umgesetzt werden.

Tenside mit verschiedenen Eigenschaften und unterschiedlichen Strukturen finden in der Industrie vielseitige Einsatzmöglichkeiten. Zum einen dienen sie als Derivate mit waschaktiven Eigenschaften zum Waschen und Reinigen, zum anderen werden Tenside auch bei der Herstellung von Nahrungsmitteln, kosmetischen Produkten, Textilien, Lacken und Farben eingesetzt. Im Allgemeinen kann in kommerziell erhältlichen Reinigungsmitteln eine Vielzahl von Tensiden mit unterschiedlicher Struktur wiedergefunden werden. [1]

Da ein modernes Vollwaschmittel heutzutage beispielsweise bis zu 35 Komponenten enthält, ist zur Sicherstellung festgelegter Qualitätsanforderungen eine einfache und verlässliche Analysenmethode zur Qualifizierung und Quantifizierung aller Tenside in den Endprodukten notwendig. Daher wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl neuer Methoden und Kopplungstechniken zur Tensidanalytik entwickelt [2-4]. Dennoch gestaltet sich die Analyse komplexer Gemische als problematisch. In der Industrie erfolgt die qualitative Analyse komplexer Proben oft mit einem vorgeschalteten, mehrstufigen Trennungsgang. Anschließend werden die einzelnen Komponenten zum Teil nasschemisch oder durch spektroskopische sowie chromatographische Analysen nachgewiesen [2, 5]. Infolge des mehrstufigen Arbeitsprozesses ist dieses Verfahren zeitaufwendig, kostenintensiv und stark fehlerbehaftet. Aufgrund der unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der Tenside ist es bisher nicht gelungen, alle Substanzen durch nur eine chromatographische Trennung zu identifizieren und zu quantifizieren.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Definition und Klassifizierung der Tenside

1960 wurde der Begriff Tensid, welcher sich von dem lateinischen Wort tensio, die Spannung, ableitet, von GÖTTE [6] eingeführt. Er beschreibt alle Substanzen, welche sich an Grenzflächen anreichern und die Grenzflächenspannung herabsetzen. Der Grund für diese Eigenschaft liegt im allgemeinen chemischen Aufbau der Tenside: Das Tensidmolekül besteht aus einem lipophilen und einem hydrophilen Teil. An Grenzflächen wässriger Lösungen wenden die Moleküle den hydrophilen Teil dem Wasser zu und den lipophilen Teil dem Wasser ab, sodass Schichten orientierter Moleküle entstehen. Im Inneren wässriger Lösungen lagern sich die Tensidmoleküle beispielsweise zu kugelartigen Aggregaten, den Mizellen, zusammen, indem die hydrophilen Molekülteile nach außen und die lipophilen Teile nach innen ragen [1, 5-11]. Abbildung 1 zeigt die Ausrichtung von Tensidmolekülen an Wasseroberflächen sowie die Zusammenlagerung in Wasser als Mizelle.

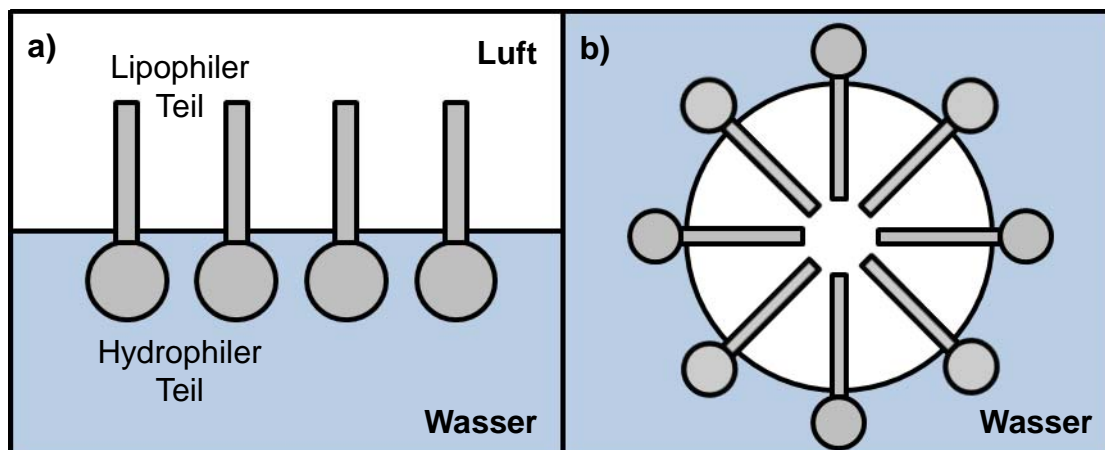


Abbildung 1: Tenside an Wasseroberflächen a) und Tensidmoleküle in Wasser als Mizelle b) nach [6]

Die hydrophile Kopfgruppe des Moleküls kann sowohl einen ionischen als auch einen nichtionischen Charakter besitzen. So lassen sich die Tenside in folgende Untergruppen einteilen [2, 3, 9, 10]:

- Anionische Tenside
- Nichtionische Tenside
- Kationische Tenside
- Amphotere Tenside

Anionische Tenside sind negativ geladen und tragen meist Sulfat, Sulfonat oder auch Carboxylat als funktionelle Gruppe, während die positiv geladenen kationischen Tenside fast ausschließlich quartäre Ammoniumverbindungen darstellen. Bei nichtionischen Tensiden trägt die hydrophile Gruppe keine Ladung. Als funktionelle Gruppen werden hier meist Polyethergruppen oder auch Glucoside eingesetzt. Amphotere Tenside, welche auch häufig als zwitterionische Tenside bezeichnet werden, besitzen sowohl einen anionischen als auch einen kationischen Molekülteil, welcher je nach pH-Bereich die Gesamtladung des Moleküls bestimmt. [1, 5]

2.2 Rohstoffe, Produktion, Einsatzgebiete

Für die Herstellung von Tensiden kommen viele unterschiedliche Rohstoffe in Frage, welche im Endprodukt den lipophilen Charakter bestimmen. Die Auswahl geeigneter Rohstoffe wird einerseits von ökologischen Standpunkten, aber auch von Kostenaspekten bestimmt. Tenside lassen sich zum einen basierend auf der Oleochemie aus nachwachsenden Rohstoffen herstellen oder aber auch basierend auf der Petrochemie aus Erdöl oder Kohle [5]. Tenside, welche auf Basis der Oleochemie hergestellt werden, weisen hauptsächlich eine geradzahlige Anzahl an Kohlenstoffatomen in der *n*-Alkylkette im lipophilen Molekülteil auf, während Produkte auf Basis von Rohöl auch eine ungeradzahlige Anzahl an Kohlenstoffatomen in der Alkylkette, welche ebenfalls in verzweigter Form vorliegen kann, enthalten.

Die Oleochemie beschäftigt sich mit der Chemie natürlicher Fette und Öle, welche sowohl pflanzlichen als auch tierischen Ursprungs sein können. Dabei ist der

Rohstoffkreislauf über Produktion und Zersetzung nahezu geschlossen, was ein nachhaltiges Wirtschaften ermöglicht und zur Schonung endlicher fossiler Ressourcen beiträgt (Abbildung 2).

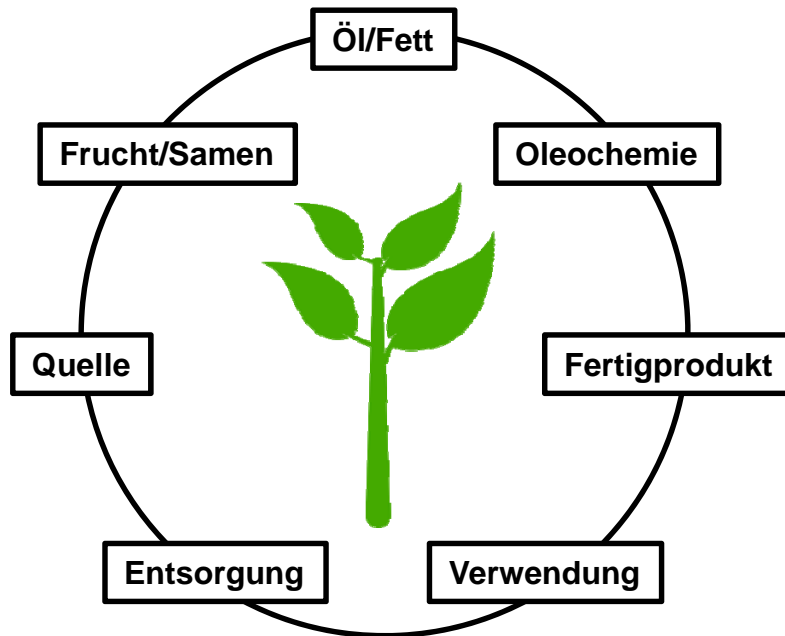


Abbildung 2: Rohstoffkreislauf in der Oleochemie nach [12]

Die CO₂-Bilanz für nachwachsende Rohstoffe ist nahezu ausgeglichen. Das CO₂, welches bei der Nutzung und der Entsorgung frei wird, wurde zuvor während des Wachstumsprozesses der Pflanze z.B. in Form von Fettsäuren gebunden [13].

Aus pflanzlichen und tierischen Fetten und Ölen werden die Rohstoffe für die Oleochemie und damit auch für die Herstellung von Tensiden gewonnen [14]. 90% der technisch relevanten Tenside werden lediglich anhand von sechs Bausteinen hergestellt. Neben den Fettsäuren zählen dazu außerdem die Fettsäuremethylester, Fettalkohole, Fettalkoholpolyglycoether, Glycerin sowie Alkylaromaten [1, 12].

In der fettchemischen Industrie werden Fettsäuren beispielsweise aus Kokosöl oder auch aus Palmkernöl gewonnen, indem die Öle unter Druck mit Wasserstoff behandelt oder mit Lauge verseift werden und so Glycerin abgespalten wird. Durch Umesterung der Fettsäure werden Fettsäuremethylester gewonnen, welche wiederum zu Fettalkoholen hydriert werden können [14]. Fettalkoholethoxylate

können erhalten werden, indem Fettalkohole mit Ethylenoxid oder Propylenoxid umgesetzt werden [1, 2, 5]. Durch weitere Derivatisierungen der o.g. sechs Grundbausteine können anschließend die entsprechenden anionischen, kationischen, nichtionischen sowie amphoteren Tenside hergestellt werden.

Laut einer Marktstudie von SRI Consulting aus dem Jahr 2010 [15] lag der Verbrauch an Tensiden im Jahr 2009 bei mehr als 10 Mio. Tonnen mit einem Wert von mehr als 23 Mrd. US-Dollar. Laut dieser Studie wächst der Markt jährlich um 1,4% bezüglich des Volumens und um 7,6% bezüglich des Wertes. Tabelle 1 zeigt den globalen Tensidverbrauch aufgeteilt in die wichtigsten Regionen der Welt.

Tabelle 1: Tensidverbrauch im Jahr 2009 [15]

	Volumen (Tausend Tonnen)	Wert (Mio. US-Dollar)
Nordamerika (USA/Kanada)	2.944	8.154
Südamerika (inkl. Mexiko)	972	1.918
Europa	3.729	6.910
Mittlerer Osten	427	772
Afrika	350	715
Japan	668	2.156
China	1.852	3.216
Insgesamt	10.941	23.840

Die am häufigsten eingesetzten Substanzklassen stellen die nichtionischen (etwa 46%) und die anionischen (etwa 37%) Tenside dar, gefolgt von den kationischen (12%) und den amphoteren (5%) Tensiden. Das Haupteinsatzgebiet liegt im Bereich der Wasch- und Reinigungsmittel. Neben industriellen Anwendungen (38%) werden Tenside vor allem in Reinigern (44%), Körperpflegeprodukten (14%) oder Weichspülern (4%) eingesetzt. [15]

Die o.g. Studie hat gezeigt, dass sich die Trends der Tensidindustrie in den nächsten Jahren hinsichtlich milderer, sicherer und natürlicher Tenside mit hoher Qualität

verändern werden. Der Marktanteil von Alkylbenzolsulfonaten und Alkylphenoethoxylaten wird voraussichtlich kleiner werden, dagegen wird der Marktanteil an effektiveren Tensiden, wie den Methylestersulfonaten, steigen. Generell wird sich der Rohstoffverbrauch von petrochemischen Produkten weg und zu oleochemischen Produkten hin orientieren. [15]

2.3 Die Chemie der Tenside

2.3.1 Anionische Tenside

Die anionischen Tenside stellen die klassischen Reiniger dar, da sie an Schmutzpartikel binden, durch ihre negative Ladung aber von Oberflächen abgestoßen werden. Diese stellen auch mit die größte und wichtigste Gruppe der weltweit hergestellten Tenside dar [5, 10, 15]. Dazu zählen die Fettalkoholcarboxylate, die Fettalkoholsulfate und -ethersulfate sowie die Fettalkoholsulfonate (Abbildung 3).

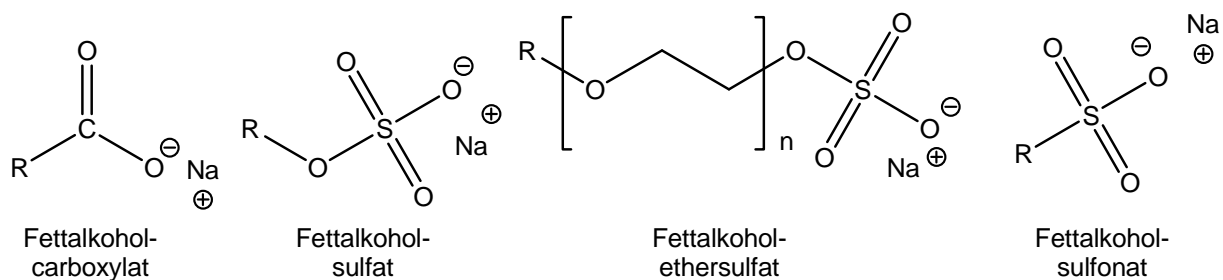


Abbildung 3: Anionische Tenside

Die ältesten in der Geschichte verbreiteten Tenside sind die Fettalkoholcarboxylate, die klassischen Seifen. Hergestellt werden Seifen durch das sogenannte Seifensieden, indem natürliche Fette und Öle mit Natron- oder Kalilauge, früher auch mit Pottasche oder Soda, unter Bildung von Glycerin und den entsprechenden Salzen der Fettsäure verseift werden (Abbildung 4). Als Rohstoffe dienen meist Talgfett, Kokosfett oder Palmkernfett [5, 12].

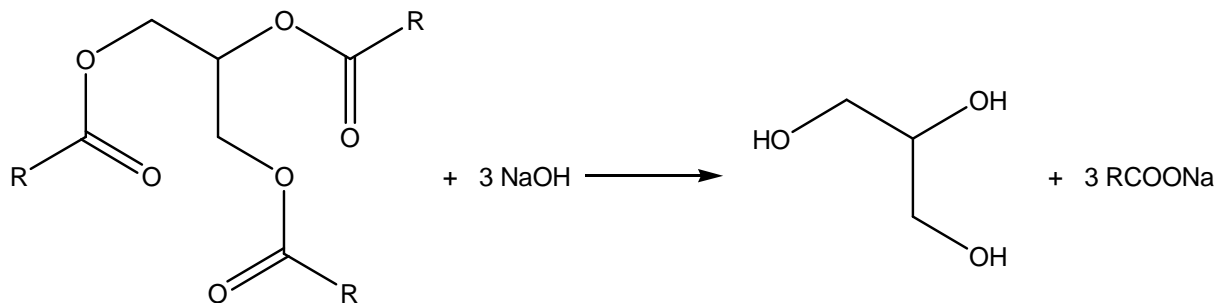


Abbildung 4: Prinzip der Verseifung mit Natronlauge

Der in Abbildung 4 dargestellte Rest R steht für die Alkylkette der Fettsäure, die je nach verwendetem Rohstoff 8 bis 22 Kohlenstoffatome tragen kann. Tabelle 2 zeigt, in welchen Anteilen die verschiedenen Fettsäuren in den am häufigsten verwendeten oleochemischen Rohstoffen enthalten sind.

Tabelle 2: Zusammensetzung von Fettsäuren (%) aus natürlichen Fetten und Ölen [5]

Säure	Kohlenstoffatome Doppelbindung	Kokos	Palm- kern	Oliven	Palm	Talg	Raps
Capryl-	8:0	8	4	-	-	-	-
Caprin-	10:0	7	5	-	-	-	-
Laurin-	12:0	48	50	-	-	-	-
Myristin-	14:0	17	15	-	2	3	-
Palmitin-	16:0	9	7	14	42	25	3
Stearin-	18:0	2	2	3	5	20	2
Öl-	18:1	7	15	68	41	44	32
Linol-	18:2	1	1	13	10	4	19
Linolen-	18:3	-	-	-	-	-	1
Eruca-	22:1	-	-	-	-	-	24

Fettalkoholsulfate, im Folgenden mit FAS abgekürzt, werden durch Sulfatierung von Fettalkoholen hergestellt. Dabei wird der Alkohol zunächst mit einem Schwefeltrioxid/Luft-Gemisch oder mit Chlorsulfonsäure verestert und anschließend mit Natronlauge neutralisiert (Abbildung 5) [1, 5, 16].

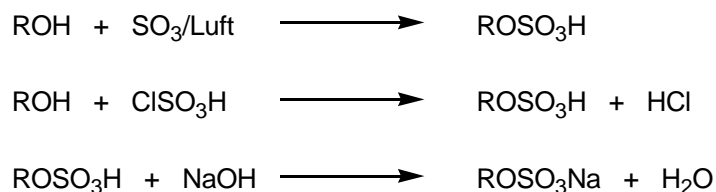


Abbildung 5: Herstellung von FAS

Bereits in den dreißiger Jahren wurden FAS als erste synthetisch hergestellte Tenside in Feinwaschmitteln (FEWA) eingesetzt. Sie besitzen ein gutes Waschvermögen und gute ökologische Eigenschaften. FAS mit kürzeren Alkylketten ($\text{C}_{12}/\text{C}_{14}$) werden aufgrund ihrer guten Wasserlöslichkeit und ihres starken Schaumverhaltens bevorzugt in flüssigen Wasch- und Reinigungsmitteln, Feinwaschmitteln sowie Körperpflegeprodukten eingesetzt, während FAS mit längeren Alkylketten vor allem in pulverförmigen Waschmitteln eingesetzt werden [16-18].

Fettalkoholethersulfate, im Folgenden mit FAES abgekürzt, stellen eine schnell wachsende Substanzklasse innerhalb der anionischen Tenside dar [19]. Hergestellt werden diese analog zu den FAS, allerdings werden hier anstatt der Fettalkohole Fettalkoholethoxylate als Edukte verwendet, welche zuvor durch Ethoxylierung des Fettalkohols mit Ethylenoxid oder Propylenoxid hergestellt werden [16, 20, 21].

FAES besitzen eine gute Schaumbildung und sind biologisch leicht abbaubar. Sie weisen eine erhöhte Löslichkeit sowie eine höhere Toleranz gegenüber Härtebildnern im Vergleich zu den FAS auf [10, 22]. Daher werden sie vor allem in Kosmetikprodukten wie Shampoos oder Schaumbädern, aber auch in Haushaltsreinigern eingesetzt [20-24].

Bei der Gruppe der Sulfonate kann zusätzlich in α -Olefinsulfonate, Alkylbenzolsulfonate und sekundäre Alkansulfonate unterschieden werden, wobei die sekundären Alkansulfonate hier die interessantesten Eigenschaften als Tensid aufweisen. Sie besitzen ein hohes Netzvermögen sowie ein sehr gutes Schaumvermögen und eine gute Wasserlöslichkeit [25]. Hergestellt werden sie aus

n-Paraffin mit Schwefeldioxid und Sauerstoff in Gegenwart von UV-Strahlen [25, 26]. Das Haupteinsatzgebiet liegt bei Haar- und Körperreinigungsmitteln [25].

2.3.2 Nichtionische Tenside

Nichtionische Tenside werden meist auf Basis von Fettalkoholen aufgebaut, jedoch können auch Alkylphenole oder Carbonsäuren als Edukte dienen [27]. Die wichtigsten Vertreter aus dieser Tensidklasse stellen die Fettalkoholethoxylate, im Folgenden mit FAEO abgekürzt, oder Fettalkoholpropoxylate dar, aber auch Alkylpolyglucoside, im Folgenden mit AG abgekürzt, werden vermehrt als nichtionische Tenside eingesetzt (Abbildung 6).

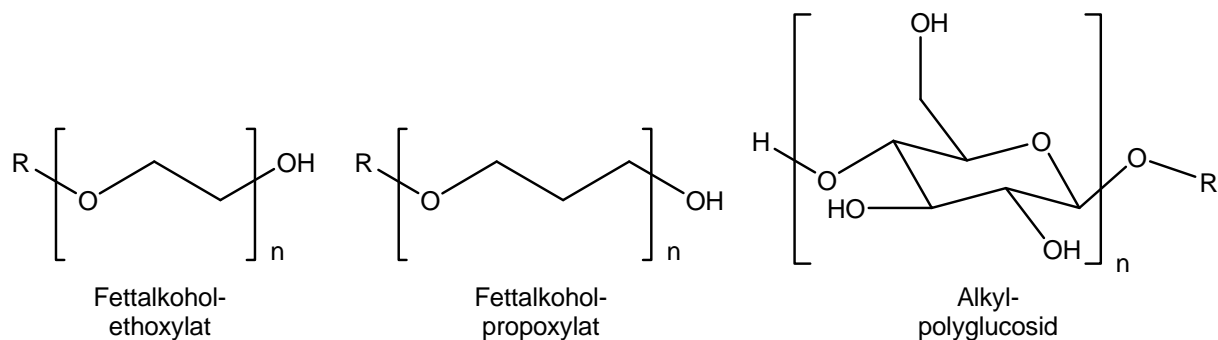


Abbildung 6: Nichtionische Tenside

Fettalkoholethoxylate können sowohl durch säure- als auch durch basenkatalysierte Umsetzung von Fettalkoholen mit Ethylenoxid hergestellt werden [28, 29] (Abbildung 7). Es handelt sich um eine Einstufenreaktion, welche in der Bildung von Homologen resultiert, also einer Variation der Ethylenoxideinheit, welche in Abbildung 6 durch das *n* im Index dargestellt ist und im Folgenden als EO-Grad bezeichnet wird.

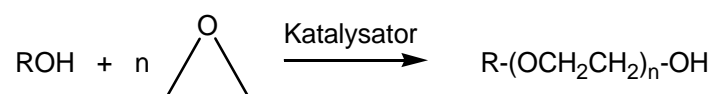


Abbildung 7: Herstellung von FAEO

Die Homologenverteilung der FAEO ist stark von den Reaktionsbedingungen und von der Art des Katalysators abhängig. Die Verwendung basischer Katalysatoren resultiert in einer breiten Verteilung hinsichtlich des EO-Grades, während die Verwendung saurer Katalysatoren zu einer sehr engen Homologenverteilung führt [29, 30]. Die Homologenverteilung bestimmt maßgeblich die Eigenschaften des Produktes. So kann eine enge Verteilung zu einer besseren Benetzung von Oberflächen, einem größeren Schaumvolumen oder einer verbesserten Emulsionsbildung führen [31-33].

Alkylpolyglucoside bestehen allein aus nativen Bausteinen, sodass diese als besonders ökologische Tenside gelten [34]. Hergestellt werden AG aus Stärke, Glucose oder Glucosesirup und Fettalkoholen über eine Direktsynthese oder eine Umacetalisierung über einen Zweistufenprozess. Bei der Direktsynthese wird der Fettalkohol mit Glucose unter Säurekatalyse ohne Lösungsmittel zur Reaktion gebracht, während bei dem Zweistufenprozess zunächst Glucose mit Butanol zu dem Butylglucosid umgesetzt wird, welches die benötigte Mischbarkeit mit dem Fettalkohol besitzt, um mit diesem die Umacetalisierung zum langkettigen Alkylglucosid einzugehen (Abbildung 8). [16, 34-39]

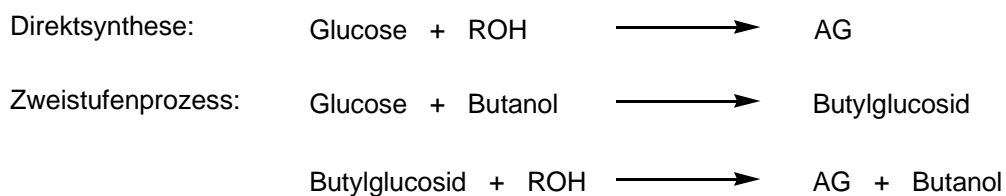


Abbildung 8: Herstellung von AG

Als hydrophilen Rest weisen AG bedingt durch den Herstellungsprozess eine oder mehrere Glucoseeinheiten auf. Diese Verteilung wird als Oligomerisierungsgrad (dp-Grad) bezeichnet [35]. Aufgrund der guten dermatologischen Eigenschaften werden AG vor allem in Körperpflegeprodukten in Kombination mit anionischen Tensiden eingesetzt [16, 39-42].

Nichtionische Tenside sind im Vergleich zu anionischen Tensiden biologisch besser abbaubar und weisen eine geringere Toxizität auf [43, 44]. Eingesetzt werden diese in kosmetische Produkten, Waschmitteln und technischen Emulgatoren [5].

2.3.3 Kationische Tenside

Die wichtigsten Vertreter der kationischen Tenside sind quartäre Ammoniumverbindungen. Hergestellt werden diese aus Fettsäuren oder Fettalkoholen, die zunächst zu sekundären Aminen umgesetzt werden. Durch Reaktion z.B. mit Methylchlorid entstehen anschließend die quartären Verbindungen [45-47].

Kationische Tenside haben weichmachende und antistatische Eigenschaften, sodass diese in Weichspülern oder Haarspülungen ihren Einsatz finden. Des Weiteren wirken kationische Tenside korrosionsschützend, weshalb sie auch als Hilfsstoffe bei der Metallreinigung verwendet werden [45-50]. Einige kationische Tenside weisen außerdem eine biozide Wirkung auf und können daher als Desinfektionsmittel eingesetzt werden.

2.3.4 Amphotere Tenside

Amphotere Tenside tragen sowohl eine kationische als auch eine anionische Gruppe innerhalb des Moleküls und weisen je nach pH-Wert kationische oder anionische Eigenschaften auf. Die kationische Funktion ist eine sekundäre, tertiäre oder quartäre Aminogruppe, während die anionische Funktion meist eine Carboxyl-, Sulfat- oder Sulfonatgruppe darstellt [51-54] (Abbildung 9).

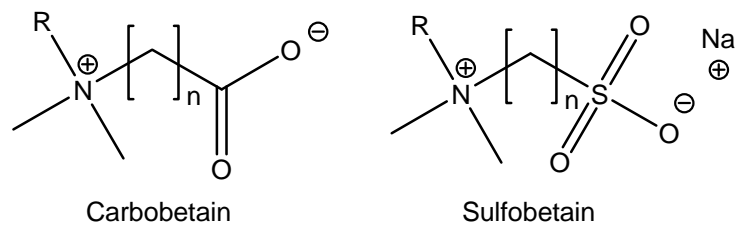


Abbildung 9: Amphotere Tenside

Zur Herstellung werden Alkylamine verwendet, welche durch Kondensation mit halogenierten Carbonsäuren zu den Carbobetainen umgesetzt werden.

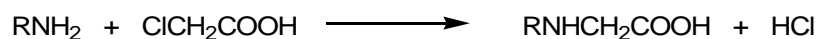


Abbildung 10: Herstellung eines Carbobetains

Die Verbindung weist ein acids Proton an der Carboxy-Funktion sowie ein freies Elektronenpaar am Stickstoff auf, sodass in wässrigen Lösungen am isoelektrischen Punkt um den pH-Wert 4 die zwitterionische Form vorliegt [5].

Carbobetaine weisen eine sehr gute Hautverträglichkeit auf und werden daher insbesondere in Shampoos und Schaumbädern eingesetzt. Sie zeichnen sich durch eine sehr gute Kompatibilität mit anderen Tensiden aus, sodass amphotere Tenside häufig als Cotenside verwendet werden, um die Vorteile von unterschiedlichen Tensidklassen zu kombinieren [10, 24, 55].

2.4 Die Analytik von Tensiden

2.4.1 Die chromatographische Trennung

Aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Tensidklassen mit komplexen Molekülstrukturen sowie unterschiedlichen Eigenschaften und der ständigen Weiterentwicklung im Bereich neuartiger, effizienterer Substanzen gibt es im Bereich der Tensidanalytik eine breite Auswahl an analytischen Methoden zum qualitativen und quantitativen Nachweis.

Einige Techniken, wie die Infrarot- sowie die Kernresonanzspektroskopie (NMR), führen bei einem geringen Substanzbedarf und ohne chromatographische Trennung zu einem schnellen Analysenergebnis. So kann mit Hilfe des ^1H - bzw. des ^{13}C -NMR-Spektrums eine Identifizierung bezüglich des CH-Skeletts erfolgen, allerdings ist eine Identifizierung der polaren Gruppe nur selten exakt möglich [56-58]. Liegt die Probe als komplexes Gemisch in eventuell unbekannter Matrix vor, so stoßen diese Techniken allerdings schnell an ihre Grenzen. Eine nasschemische oder chromatographische Trennung ist daher in der Regel obligatorisch.

Neben der Dünnschichtchromatographie [32, 59-63], welche einen geringen instrumentellen Aufwand zum Vorteil hat, zählen vor allem flüssig- und gaschromatographische Trenntechniken zur Methode der Wahl.

Die Gaschromatographie (GC) ist eine analytische Plattform, mit welcher Tenside mit hoher Auflösung und hoher Trenneffizienz sowohl nach Alkylhomologen als auch nach EO-Grad getrennt werden können, allerdings ist eine Derivatisierung aufgrund des hohen Siedepunktes immer notwendig, was die Methode zeitaufwendig und kostenintensiv macht [43, 64-71].

Die Flüssigchromatographie (HPLC – High-performance liquid chromatography) ist derzeit die am häufigsten verwendete instrumentelle Technik zur Trennung und Analyse von Tensiden und Tensidgemischen, da im Gegensatz zur Gaschromatographie auch nichtflüchtige Analyten sowohl mit niedrigem als auch mit hohem Molekulargewicht ohne Derivatisierung analysiert werden können [71]. Tenside können ohne großen Aufwand getrennt und bezüglich ihrer Zusammensetzung charakterisiert werden, wobei ebenfalls das Quantifizieren einzelner Tenside in komplexen Gemischen möglich ist [72].

MISZKIEWICZ und SZYMANOWSKI, VOGT und HEINIG, MARCOMINI und ZANETTE sowie MORELLI und SZAJER haben in ihren Review-Artikeln die Methoden zur Tensidanalytik kritisch zusammengefasst [3, 4, 43, 73, 74]. Sie haben gezeigt, dass die

HPLC unter Verwendung von Phasenmaterialien sowohl aus der Umkehrphasen- (RP) als auch aus der Normalphasenchromatographie (NP) in der Regel die Methode der Wahl darstellt. Während die Verwendung von RP-Materialien durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der stationären Phase zu einer Trennung der einzelnen Alkylkettenhomologen führt, kann unter Verwendung von NP-Materialien eine sehr gute Trennung der EO- [75-77] oder auch der Glucose-Einheiten [38, 40] erzielt werden.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Trennung der EO-Einheiten in der RP-Chromatographie durch Modifikation der mobilen Phase oder durch Verwendung polar modifizierter stationärer Phasen zusätzlich möglich ist [75, 78-82]. KIBBEY et al. haben gezeigt, dass unter Verwendung von Normalphasen, welche allerdings mit typischen RP-Gradienten betrieben werden, nichtionische FAEO hinsichtlich der EO-Homologen getrennt werden [79]. Die Trennung wird vorrangig aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen der EO-Gruppen mit protonierten Silanolgruppen hervorgerufen. Weiterhin haben LIU und POHL ein Phasenmaterial vorgestellt, mit welchem eine Trennung sowohl nach Alkylkettenlänge als auch nach EO-Verteilung möglich ist [78]. VANHOENACKER und SANDRA haben gezeigt, dass eine Trennung von nichtionischen Tensiden nach EO-Homologen mit klassischen RP-Materialien unter Variation der Temperatur möglich ist [82]. Weiterhin führte der Einsatz eines Phasenmaterials, welches aus porösem, graphitischen Kohlenstoff besteht, und einer mobilen Phase aus Wasser, Acetonitril, Isopropanol und Dichlormethan zu einer Separation der EO-Einheiten [82]. Dass bei der Analyse von Tensidgemischen eine Trennung nach Alkylhomologen und Anzahl der EO-Einheiten zu einem sehr komplexen Chromatogramm führt, liegt hier sicherlich auf der Hand. Aus diesem Grund ist es nötig, die Chromatographie mit einem Detektor zu koppeln, welcher eine qualitative sowie quantitative Bestimmung ermöglicht.

2.4.2 Die unspezifische Detektion

Im Allgemeinen stellt die UV-Absorption die präferierte Detektionsmethode bei der Kopplung mit der HPLC dar. Da nichtaromatische Tenside allerdings keine oder nur sehr schwache Chromophore besitzen, ist der UV-Detektor nur bei derivatisierten Proben geeignet.

Alternativ können Leitfähigkeits- oder Brechungsindexdetektoren (RI-Detektor) verwendet werden. Im Falle des Leitfähigkeitsdetektors können allerdings lediglich ionische Tenside erfasst werden, da nichtionische Tenside keine Leitfähigkeit hervorrufen. Der universelle RI-Detektor ist leicht in der Handhabung und unselektiv, solange sich der Brechungsindex der Substanz von dem der mobilen Phase unterscheidet. Allerdings ändert sich bei einer Gradientenelution der Brechungsindex der mobilen Phase kontinuierlich, sodass dieser Detektor lediglich für isokratische Trennungen verwendet werden kann [83]. Des Weiteren ist der RI-Detektor für die meisten Fragestellungen nicht empfindlich genug. [84, 85]

Zur Detektion von Tensiden ist der universelle Verdampfungslichtstreuendetektor (ELSD – Evaporative light-scattering detector) besonders gut geeignet. Der ELSD ist kompatibel mit Gradientenelutionen und ist deutlich empfindlicher als der RI-Detektor. Er eignet sich für die Analytik aller Substanzen, die einen niedrigen Dampfdruck besitzen und oberhalb der Siedetemperatur des Eluenten Kristalle ausbilden. Der ELSD lässt sich mit allen gängigen HPLC-Methoden koppeln, gilt als unselektiv und, im Vergleich zu Massenspektrometern, kostengünstig in der Anschaffung. Aus diesem Grund ist der Verdampfungslichtstreuendetektor sowohl im Bereich der Routineanalytik als auch zur Methodenentwicklung oft der Detektor der Wahl. [44, 72, 79, 84-88]

Das Prinzip des ELSD beruht auf der Streuung von Licht an Partikeln. Das Eluat wird nach der chromatographischen Trennung im Nebulizer mit Hilfe eines Stickstoffstroms zu einem Aerosol versprüht, welches dann durch ein beheiztes

Driftrohr geleitet wird, in der das Lösungsmittel verdampft. Der feste Rückstand der Analyten kann nun detektiert werden, indem die Intensität des an den Partikeln gestreuten Lichtes gemessen wird [89, 90]. Die Lichtstreuung ist lediglich von der Partikelgröße und -anzahl abhängig [84, 91]. Der Aufbau eines ELSD ist in Abbildung 11 schematisch dargestellt.

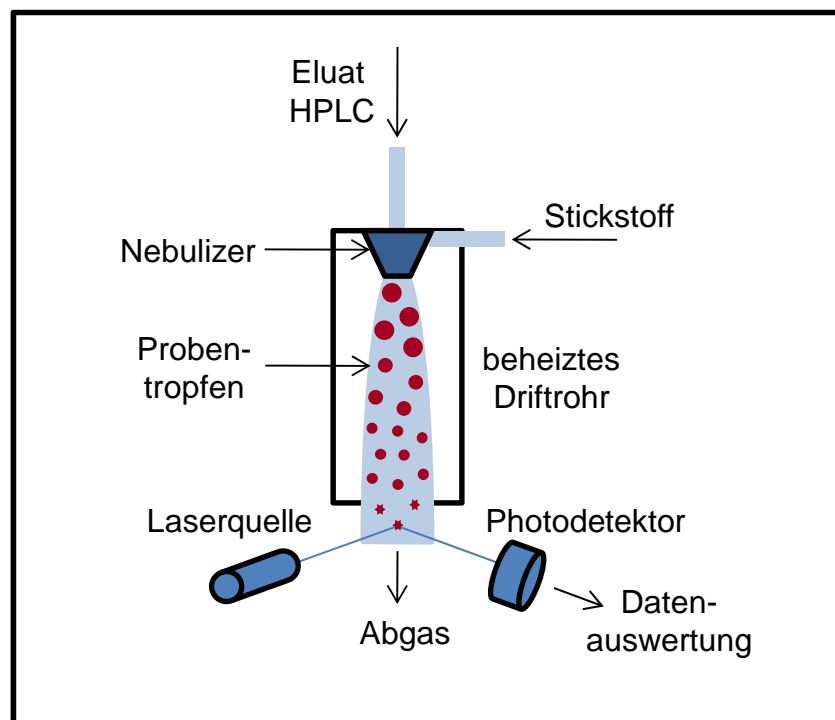


Abbildung 11: Aufbau eines ELSD nach [84]

2.4.3 Die massenspektrometrische Detektion

Die Massenspektrometrie (MS) stellt eine hoch sensitive und selektive Technik dar, mit der Analyten sowohl über eine Fließinjektion als auch über eine Kopplung mit der HPLC analysiert werden können. Das Massenspektrometer kann sowohl zur Identifizierung als auch zur Quantifizierung genutzt werden.

Die Massenspektrometrie beruht auf den Überlegungen von THOMSON aus dem Jahr 1897, nach denen Elektronen im Vakuum durch elektrische Felder gelenkt werden [92]. Das Grundprinzip besteht darin, Ionen aus sowohl organischen als auch

anorganischen Substanzen zu bilden, diese nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) zu trennen und anschließend das spezifische m/z -Verhältnis zu detektieren. Die Ionisierung der Analyten kann thermisch, durch ein elektrisches Feld oder durch Wechselwirkung mit Elektronen, Ionen oder Photonen erfolgen. Die Trennung der Ionen kann über elektrische oder magnetische Felder, aber auch feldfrei aufgrund ihrer kinetischen Energie geschehen. [93] Der allgemeine Aufbau eines Massenspektrometers wird in Abbildung 12 dargestellt.

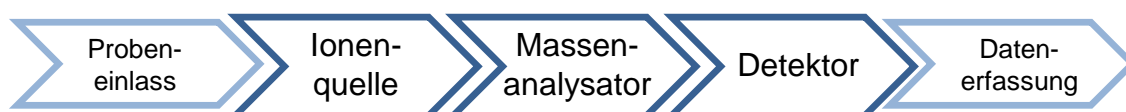


Abbildung 12: Allgemeiner Aufbau eines Massenspektrometers

Wird die Flüssigchromatographie mit der Massenspektrometrie gekoppelt (LC-MS) werden als Ionenquelle vor allem die Elektrospray-Ionisation (ESI) [94] und die Ionisation bei Atmosphärendruck, sowohl chemisch (APCI) [95], als auch photonen- (APPI) [96] oder laserinduziert (APLI) [97], verwendet. Diverse Arbeiten haben gezeigt, dass sich für die Tensidanalytik die Elektrospray-Ionisation oder die chemische Ionisation unter Atmosphärendruck besonders gut eignen [19, 74, 89, 98-100].

ESI eignet sich hauptsächlich zur Ionisierung von polaren Analyten, während APCI zur Ionisierung von mittelpolaren Analyten geeignet ist [93]. Während des Ionisierungsprozesses kommt es in der Ionenquelle überwiegend zu Protonierungs- bzw. Deprotonierungsreaktionen. Im positiven Modus entstehen vor allem Pseudomolekülonen der Form $[M+H]^+$ und im negativen Modus der Form $[M-H]^-$, allerdings können bei der Ionisierung mit ESI ebenfalls Mehrfachladungen auftreten [101]. Durch Verwendung von Puffersystemen für die chromatographische Trennung findet außerdem eine Adduktbildung mit z.B. Natrium-, Ammonium- oder Acetationen statt [93].

Bei der Ionisierung mittels ESI werden die Analyten, welche in einem Lösungsmittel gelöst vorliegen, als Ionen in die Gasphase überführt [102]. Der Prozess lässt sich grob in drei Schritte unterteilen: die Bildung geladener Tropfen, das Verdampfen des Lösungsmittels und die Bildung gasförmiger Ionen (Abbildung 13) [103]. Das HPLC-Eluat wird durch eine Stahlkapillare, an der eine Spannung von mehreren tausend Volt anliegt, geleitet, wodurch die Moleküle in der Lösung geladen werden. Durch das entstandene Feld wird an der Spitze der Kapillare ein Flüssigkeitskegel, der sogenannte Taylor-Konus, ausgebildet [104-106]. Aufgrund der hohen Ladungsdichte am Taylor-Konus wird die Flüssigkeit zerstäubt, wodurch ein Spray entsteht. Durch die Zugabe von Stickstoff als Nebulizer-Gas wird dieser Prozess unterstützt [107]. Der Verdampfungsprozess des Lösungsmittels verringert das Tropfenvolumen bei konstanter Ladung, sodass sich die Ladungsdichte an der Tropfenoberfläche immer weiter erhöht. Übersteigt die elektrostatische Abstoßung die Oberflächenspannung, so kommt es zur Coulomb-Explosion. Die Tröpfchen zerfallen in immer kleinere Tröpfchen. [93, 103] Der letzte Schritt, die Bildung gasförmiger Ionen, wird derzeit mit zwei Modellen beschrieben. Das Charged-Residue-Modell (CRM) wurde im Jahr 1968 von DOLE et al. postuliert und geht davon aus, dass sich der Prozess der Coulomb-Explosion kontinuierlich wiederholt, bis es am Ende zum vollständigen Verlust aller Lösungsmittelmoleküle kommt und lediglich ein geladenes Analytmolekül vorliegt [102, 108, 109]. Das Ion-Evaporation-Modell (IEM), welches im Jahr 1976 von IRIBARNE und THOMSON postuliert wurde, besagt, dass es kontinuierlich zu einer direkten Ionenverdampfung, also der Bildung desolvatisierter Ionen durch direkte Verdampfung an der Oberfläche der hoch geladenen Tröpfchen, kommt [110, 111].

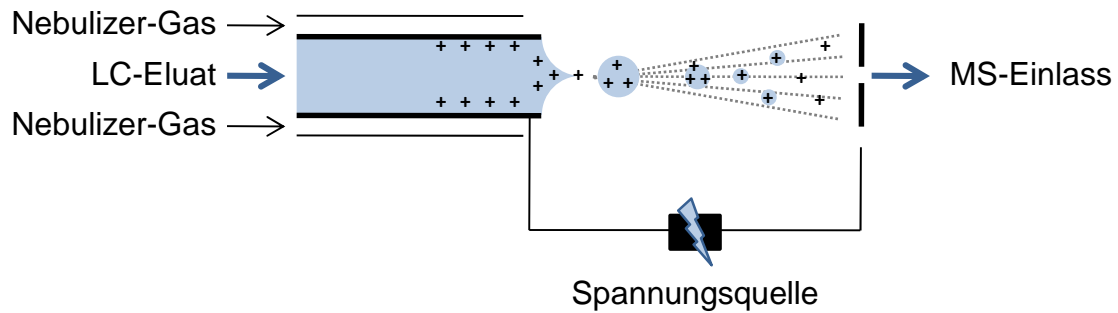


Abbildung 13: ESI-Interface nach [112]

Bei der APCI wird die Probenlösung durch eine geheizte Kapillare geleitet und anschließend durch einen heißen Stickstoffstrom zerstäubt, bevor der Ionisierungsprozess durch eine Entladung an der Corona-Nadel initialisiert wird (Abbildung 14) [95, 113]. Es wird eine komplexe Sequenz von Ionisationsreaktionen in Gang gesetzt, welche mit der Ionisation von N_2 beginnt und schließlich zur Bildung von $[(H_2O)_n+H]^+$ -Cluster-Ionen führt. Aufgrund der geringeren Protonenaffinität des Wassers protonieren die Wasser-Cluster-Ionen schließlich die Analytmoleküle durch eine chemische Ionisation bei Atmosphärendruck. [114, 115]

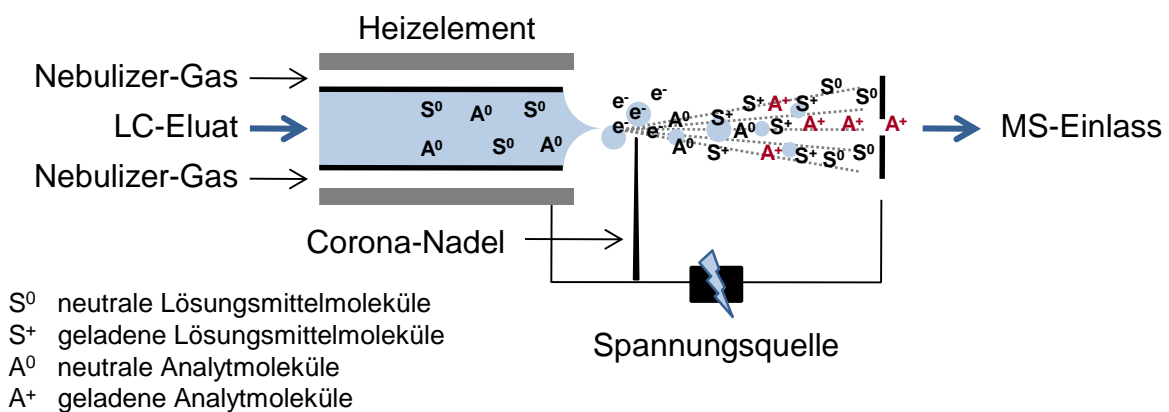


Abbildung 14: APCI-Interface nach [116]

Im Anschluss an die Ionisation in der Ionenquelle werden die Ionen beschleunigt, wodurch sie die gleiche kinetische Energie aufweisen, und durch ein elektrisches Feld in den Massenanalysator gelenkt. Dort findet dann die Trennung nach ihrem m/z -Verhältnis statt [117]. Die Wahl eines geeigneten Massenanalysators ist neben

dem wirtschaftlichen Aspekt abhängig von der gewünschten Auflösung, Scanrate, Nachweisgrenze und Massengenauigkeit sowie dem Massenbereich [118].

Massenanalytoren arbeiten entweder kontinuierlich oder gepulst. Zu den kontinuierlichen Massenanalytoren gehören z.B. Quadrupol-Massenfilter oder magnetische Sektorfelder. Zu den gepulsten Analytoren gehören u. a. orthogonale Flugzeit-Massenspektrometer (TOF – time-of-flight) und Ionenfallen [118].

Das TOF-Massenspektrometer trennt die Ionen aufgrund der massenabhängigen Flugzeit, die sie benötigen, um ein Flugrohr zu passieren. Die Ionen werden durch kurzzeitige Hochspannungspulse als Ionenpakete gebündelt und in die feldfreie Flugstrecke gelenkt. Der Hochspannungspuls gibt dabei den Startpunkt der Zeitmessung bis zum Detektor an [119, 120]. Schwere Ionen bewegen sich langsamer durch das Flugrohr als leichtere und werden somit später detektiert. Allerdings ist es möglich, dass Ionen mit demselben Masse-zu-Ladungsverhältnis dennoch leicht unterschiedliche Geschwindigkeiten aufweisen, da diese unterschiedliche kinetische Energien besitzen, was eine geringere Auflösung zur Folge hat [102]. Durch Verwendung eines Reflektors können Ionen gleicher Masse wieder fokussiert und zusätzlich die Flugstrecke verlängert werden [121-123]. Durch Kombination mit einem Quadrupol-Massenfilter ist es möglich, nur einen bestimmten Massenbereich ins Flugrohr zu leiten. Dies ermöglicht eine höhere Datenaufnahmerate. Ist außerdem noch eine Kollisionszelle vorhanden, können zusätzlich MS/MS-Experimente durchgeführt werden [124]. Der Aufbau solch eines Massenspektrometers ist in Abbildung 15 dargestellt.

TOF-Massenspektrometer weisen hohe Ionentransmissionen, resultierend in einer guten Sensitivität, und zusätzlich sehr hohe Scanraten auf [122]. Der detektierbare Massenbereich kann bei bis zu 500 kDa liegen, was allerdings mit einer schlechteren Massenauflösung bei zunehmender Molekülmasse einhergeht [84].

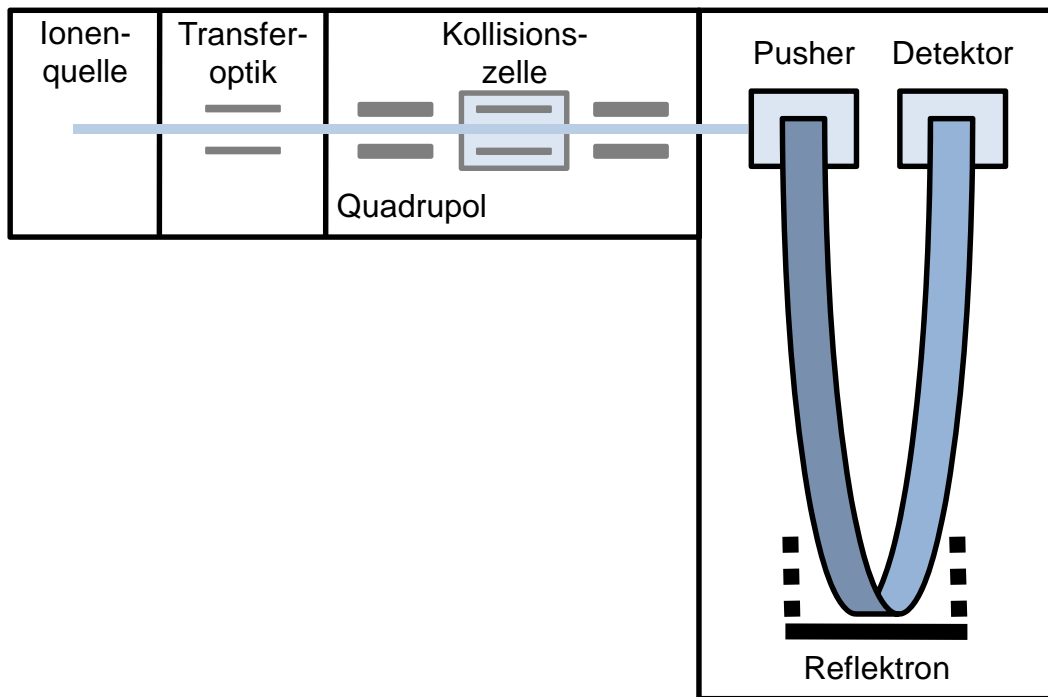


Abbildung 15: Aufbau eines QTOF-Massenspektrometers nach [119]

2.5 Chromatographische Trennmechanismen

2.5.1 Adsorptions- und Umkehrphasenchromatographie

Die ersten Arbeiten zur Adsorptionschromatographie wurden 1906 durch TSWETT durchgeführt. Dabei wurde unter anderem Chlorophyll durch Adsorption an Inulin getrennt [125, 126]. Da dies die Anfänge der Flüssigchromatographie waren, wurden chromatographische Systeme, in denen die stationäre Phase polarer ist als der Eluent, später als Normalphasen-Flüssigchromatographie (NP-LC) bezeichnet [127].

In der NP-LC werden vor allem Silicagel oder Aluminiumoxid als stationäre Phase eingesetzt [128]. Als mobile Phase dienen wasserfreie, unpolare und lipophile Eluenten wie Hexan oder Heptan, welche häufig mit Alkoholen als Zusatz kombiniert werden [129]. Der Trennmechanismus basiert nach dem Snyder-Soczewinski-Model auf der konkurrierenden Adsorption von Analyt und Lösungsmittel um aktive Stellen auf der Oberfläche der stationären Phase. Die

Adsorption kann demnach über Wasserstoffbrückenbindungen, Dipol-Dipol- oder π - π -Wechselwirkungen erfolgen [130]. Die Retention wird durch steigende Polarität der stationären Phase oder durch sinkende Polarität des Lösungsmittels erhöht. Des Weiteren steigt die Retention mit der Polarität der Analyten [130].

Die NP-LC eignet sich zur Trennung nichtionischer Substanzen, während allerdings polare und hydrophile Substanzen häufig durch die schlechte Löslichkeit in der verwendeten mobilen Phase nicht analysierbar sind [131]. Nachteilig sind die langen Äquilibrierungszeiten der Säule bei Gradientenelution, häufig auftretende Tailing-Effekte sowie die Tatsache, dass in der Regel wasserfrei gearbeitet werden muss [129, 132].

Eine Alternative zur NP-LC stellt die Umkehrphasen-Flüssigchromatographie (RP-LC) dar. Hier ist die mobile Phase polarer als die stationäre Phase [127]. Die stationären Phasen basieren meist auf Silicagel, welches durch Octadecylreste modifiziert wurde. Es sind aber auch kürzere Alkylketten, wie z.B. Octylreste, oder auch Cyclohexyl- oder Phenylgruppen in Gebrauch. Generell gilt jedoch, je länger die Alkylkette, desto stärker ist die Retention lipophiler Analyten [128]. Die Modifikation des Silicagels mit Alkylresten verläuft aufgrund von sterischen Hinderungen allerdings nicht quantitativ. Die verbleibenden freien Silanolgruppen lassen sich daher in einem weiteren Schritt mit kurzkettigen Silanen, meist Trimethylchlorsilan, umsetzen, wodurch die Polarität der stationären Phase weiter reduziert wird. Diese Modifikation wird auch als Endcapping bezeichnet. Als mobile Phase werden häufig Gemische aus Wasser oder Pufferlösungen mit organischen Lösungsmitteln, welche mit Wasser mischbar sind, verwendet. Dabei steigt die Elutionskraft mit abnehmender Polarität [130].

Der Trennmechanismus in der RP-LC ist sehr komplex. Die Retention kann durch Adsorption, also durch hydrophobe Wechselwirkungen mit den Alkylketten der stationären Phase, durch sterische Hinderung oder durch polare sowie ionische Wechselwirkungen mit der stationären Phase verursacht werden [133]. Des Weiteren

kommt es zusätzlich zu Wechselwirkungen mit der mobilen Phase, sodass der Mechanismus als Kombination aus Adsorption und Verteilung verstanden werden kann [84].

Die RP-LC zeichnet sich durch eine hohe Reproduzierbarkeit und eine hohe Robustheit aus, allerdings ist ihr größter Nachteil, dass polare und hydrophile Substanzen gar nicht oder nicht ausreichend retardiert werden [131].

2.5.2 Hydrophile Interaktionschromatographie

Zur Trennung polarer und hydrophiler Substanzen ist die Hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC) besonders gut geeignet [134]. Die Idee dieses Trennmechanismus ist nicht neu, der Name wurde allerdings erst 1990 von ALPERT etabliert [135].

Die HILIC stellt eine Variante der NP-LC dar, bei der ebenfalls polare stationäre Phasen eingesetzt werden. Als mobile Phasen werden jedoch bevorzugt wässrige Puffersysteme mit einem hohem Anteil an Acetonitril (ACN) oder Methanol (MeOH) verwendet, wodurch eine gute Löslichkeit für polare Analyten gewährleistet wird [136].

Bei der HILIC nimmt die Retention mit der Polarität der Analyten zu und mit der Polarität der mobilen Phase ab, was einen orthogonalen Trennmechanismus gegenüber der RP-LC darstellt [137, 138]. Unter HILIC-Bedingungen steigt die Elutionskraft mit der Polarität des Lösungsmittels nach folgender Reihenfolge an: Aceton > ACN > Isopropanol > Ethanol > MeOH > Wasser [139, 140].

Der Trennmechanismus in der HILIC basiert hauptsächlich auf dem Prinzip der Verteilung des Analyten zwischen der mobilen Phase und einer wässrigen Grenzschicht auf der Oberfläche der hydrophilen stationären Phase. Die stark hydrophile stationäre Phase adsorbiert bzw. immobilisiert temporär das Wasser aus

der mobilen Phase und bildet so eine sehr polare Oberfläche aus [141, 142]. Polarere Analyten weisen nun stärkere Wechselwirkungen mit dieser wasserreichen Grenzschicht auf als weniger polare Verbindungen [143]. Der Verteilungsmechanismus ist allerdings nicht allein für die Retention verantwortlich. Des Weiteren kommt es bei der HILIC ebenfalls zu ionischen Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen [140, 144, 145].

HILIC kann sowohl auf silica- als auch auf polymerbasierten stationären Phasen betrieben werden. Neben reinem Silicagel werden vor allem Cyano-, Diol-, Amino- oder Amid-Phasen verwendet [146]. Neutrale Phasen weisen im Vergleich zu geladenen Phasen keine ionischen Wechselwirkungen, eine geringere Selektivität und eine geringere Wasserbindungskapazität auf. Bei geladenen Phasen tragen elektrostatische Wechselwirkungen zusätzlich zur Retention bei [132]. Zusätzlich kommen auch zwitterionische Phasen, die sowohl kationische als auch anionische funktionelle Gruppen tragen, zum Einsatz. Diese Phasen sind zwar nach außen hin ungeladen, weisen aber eine hochpolare Oberfläche auf.

Bei zwitterionischen Phasen handelt es sich meist um Sulfoalkylbetaine, welche eine stark acide Sulfonsäuregruppe sowie eine stark basische quartäre Ammoniumgruppe aufweisen. Da die gegensätzlich geladenen funktionellen Gruppen in einem Verhältnis von 1:1 vorliegen, resultiert daraus eine Gesamtladung von Null, welche nur geringfügig durch Veränderung des pH-Wertes beeinflusst wird [146]. Zwitterionische Phasen weisen im Vergleich zu anderen HILIC-Phasen durch ihre schwach ionischen und elektrostatischen Wechselwirkungen eine hohe Selektivität auf und finden daher auch eine breite Anwendung [129, 147, 148].

Die wichtigsten Anwendungsgebiete für die HILIC stellen vor allem die Analytik von Kohlenhydraten, polaren Peptiden sowie Oligosacchariden dar, aber auch im Bereich der Analytik von Pestiziden oder Pharmazeutika findet diese ihren Einsatz [149-152]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass speziell modifizierte

HILIC-Phasen nichtionische ethoxylierte Tenside nach ihrer Alkylkettenlänge sowie nach ihrer EO-Anzahl trennen können [153, 154].

Wird die HILIC mit der Massenspektrometrie gekoppelt, so führt der hohe Anteil an ACN zu einer niedrigeren Oberflächenspannung der mobilen Phase, was die Spray-Bildung im ESI-Prozess begünstigt und so, zusammen mit einer besseren Verdampfbarkeit des Eluates, zu einer höheren Empfindlichkeit im Vergleich zur RP-LC führt [132, 155].

2.5.3 Größenausschlusschromatographie

In der Größenausschlusschromatographie (SEC) werden die Analyten nicht aufgrund von Wechselwirkungen mit der stationären oder mobilen Phase, sondern lediglich aufgrund ihrer Molekülgröße getrennt.

Bei der stationären Phase handelt es sich um ein poröses Gel, welches lediglich die Anforderung hat, keine Wechselwirkungen mit den Analyten einzugehen. Substanzen, deren Molekülgröße zu groß für das Eindringen in die Poren der stationären Phase ist, eluieren mit demjenigen Lösungsmittelvolumen, welches dem Volumen zwischen den Gelpartikeln entspricht (V_i). Die letzte Substanz eluiert mit dem Volumen (V_0), welches sich aus dem Außenvolumen (V_i) und dem Innenvolumen der Poren (V_p) zusammensetzt [156]. Dieses Elutionsvolumen entspricht der Totzeit in der RP-LC, sodass in der SEC alle eluierenden Substanzen einen negativen Retentionsfaktor aufweisen [157, 158]. Je kleiner also ein Molekül ist, desto länger hält es sich in den Poren auf und desto größer ist die Retention.

Um einem Elutionsvolumen eine bestimmte Molekülgröße zuzuordnen zu können, müssen die Säulen in der SEC zuvor immer mit Substanzen mit bekannter Molekülgröße kalibriert werden [159]. Die SEC wird in der Regel isokratisch betrieben. Bei der mobilen Phase handelt es sich meist um reine Lösungsmittel, die

lediglich eine gute Löslichkeit des Analyten aufweisen müssen [157]. Unter Verwendung einer wässrigen mobilen Phase wird diese Trennmethode als Gelfiltrationschromatographie (GFC) bezeichnet, während bei der Verwendung von organischen Lösungsmitteln als mobile Phase von Gelpermeationschromatographie (GPC) die Rede ist [128].

Die SEC wird häufig verwendet, um Aussagen zur Molekulargrößenverteilung von Polymeren zu treffen [160]. Im Allgemeinen ist die Auflösung in der SEC zur Trennung von Homologen nicht ausreichend, werden jedoch geeignete Gele, die z.B. durch homogen-vernetzende Polymerisation hergestellt werden, verwendet, sind sogar Trennungen von Oligomeren oder, im Fall von Tensiden, einzelnen Ethoxylaten möglich [156, 161].

2.5.4 Weitere Trennmechanismen zur Analytik von Polymeren

Bei Polymeren handelt es sich meist um sehr komplexe Proben, welche bedingt durch den Herstellungsprozess mindestens eine Verteilung aufweisen. Bei Diblock-Copolymeren des Typs A_n-B_m liegen sogar zwei voneinander unabhängige Verteilungen vor [162, 163]. Ethoxylierte Tenside können ebenfalls als Diblock-Copolymere des Typs A_n-B_m beschrieben werden. Dabei stellt A die Alkylkettenverteilung und B den Grad der Ethoxylierung dar [164, 165].

Da die Trennung solcher Copolymere sehr komplex sein kann, haben sich weitere Trennmechanismen etabliert, die verschiedene Trennprinzipien kombinieren. Die Adsorptionschromatographie (LAC) basiert auf Wechselwirkungen des Analyten mit der stationären Phase und kann im NP- und im RP-Modus betrieben werden. Wie bereits in Abschnitt 2.4.1 am Beispiel der Tensidanalytik erläutert, trennt die NP-LAC hauptsächlich nach der Anzahl polarer Gruppen, z.B. nach EO-Homologen, und die RP-LAC insbesondere nach der Anzahl unpolarer Gruppen, z.B. nach dem Alkylrest. In beiden Fällen wird die Retention aber ebenfalls durch weitere Wechselwirkungen

der funktionellen Gruppen beeinflusst, sodass es häufig zu Überlappungen der Signale kommt. [154]

Zur Trennung von Polymeren mit mehr als einer Verteilung hat sich die Flüssigchromatographie unter kritischen Bedingungen (LCCC) etabliert [166]. Diese ermöglicht das Trennen komplex aufgebauter Polymere nach nur einer Funktionalität [167]. Bei der Flüssigchromatographie von Polymeren ist der Verteilungskoeffizient K abhängig von der Änderung der freien Energie G einer Polymerkette, wenn diese von dem Außenvolumen V_i in das Porenvolumen V_p diffundiert°[166].

$$-R \cdot T \cdot \ln(K) = \Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$$

mit: ΔG , ΔH und ΔS = Änderung der freien Energie, Enthalpie und Entropie

K = Verteilungskoeffizient

R = Allgemeine Gaskonstante

T = Absolute Temperatur

In der SEC ist die Änderung der Entropie (ΔS) die treibende Kraft, während die Retention in der LAC von den enthalpischen Wechselwirkungen (ΔH) der Homologen mit der stationären Phase bestimmt wird. Unter den Bedingungen von LCCC eluiert nun eine Polymerkette ohne Wechselwirkungen einzugehen mit dem Volumen V_0 , sodass $K = 1$ und $\Delta G = 0$ ist und sich damit die Beiträge der Entropie und Enthalpie gegenseitig kompensieren [166]:

$$\Delta H = T \cdot \Delta S$$

Dies gilt jedoch nur für eine bestimmte Zusammensetzung der mobilen Phase sowie eine konkrete Temperatur [168, 169]. Bei diesem sogenannten kritischen Punkt der Adsorption (CAP), welcher für jeden Analyten experimentell bestimmt werden muss, zeigt für ein Polymer des Typs A_n - B_m eine der beiden Polymerketten keinerlei Retentionsverhalten, sodass alle Kettenlängen des einen Stranges unabhängig von der molaren Masse zur gleichen Zeit eluieren (Abbildung 16) [164, 170-174].

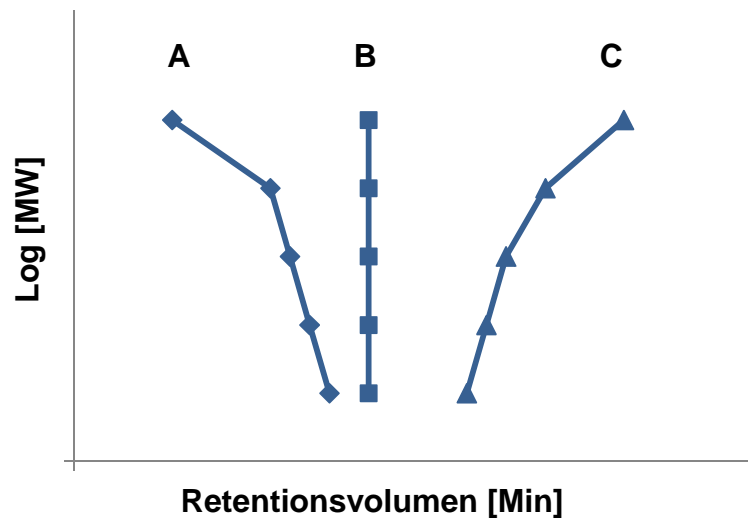


Abbildung 16: Beispiel einer Kalibrierfunktion für ein Polymer mit der SEC (A), der LCCC (B) und der LAC (C) nach [167]

Die Trennung von Diblock-Copolymeren am CAP mit einem adsorbierenden Block A resultiert in sehr schmalen Signalen für den Block B [154, 175]. So zeigten RAPPEL et al. beispielsweise die Trennung eines Fettalkoholpolyglycolesters unter kritischen Bedingungen mit 92% Aceton und 8% Wasser als mobile Phase [164]. Unter den verwendeten Bedingungen eulieren die Polyglycolester alle in einem schmalen Peak. Weiterhin haben FALKENHAGEN et al. FAEO unter kritischen Bedingungen mit 78,5% Methanol und 21,5% Wasser als mobile Phase analysiert und so eine Trennung von sechs Alkylhomologen nach Alkylkettenlänge mit sehr schmalen Peaks erhalten, während eine Zusammensetzung der mobilen Phase von 88% Methanol und 12% Wasser zu deutlich breiteren Signalen geführt hat [170].

Zur Trennung von Diblock-Copolymeren wurde ein weiterer Trennmechanismus von TRATHNIGG und GORBUNOV eingeführt [157]. Am Beispiel von FAEO beschrieben sie die Ausschluss-Adsorptionschromatographie (LEAC). In einer isokratischen RP-Trennung werden demnach FAEO mit einer bestimmten Alkylkettenlänge nach der Anzahl der EO-Einheiten aufgrund von zwei kombinierten Mechanismen getrennt. Es kommt zum einen zu Wechselwirkungen der FAEO mit der stationären Phase, aber es findet ebenfalls ein Größenausschluss in den Poren statt [176]. Dieser

Mechanismus erklärt erfolgreich das RP-Retentionsverhalten, nachdem FAEO mit höherem EO-Grad zuerst eluieren [177]. Nach diesem Modell führt die Wechselwirkung mit der stationären Phase zum positiven Retentionsfaktor, während der Größenausschlussmechanismus die umgekehrte Elutionsreihenfolge der EO-Einheiten bewirkt [178, 179]. So zeigten auch CHO et al. am Beispiel einer Trennung von FAEO, dass unter RP-Bedingungen mit 70% Acetonitril und 30% Wasser als mobile Phase die Trennung nach Alkylkettenlänge aufgrund abnehmender Polarität erfolgt, also längere Alkylketten stärker retardiert werden, während die Retention für die EO-Homologen mit steigender Anzahl abnimmt [180].

2.6 Comprehensive zweidimensionale Flüssigchromatographie

Zur umfassenden Analyse aller Inhaltstoffe einer hochkomplexen Probe ist eine Analytik mit hoher chromatographischer Auflösung nötig. Allerdings stoßen die eindimensionalen Trenntechniken hier oft an ihre Grenzen. Erfolgsversprechend ist der Einsatz multidimensionaler Trenntechniken, bei denen die einzelnen Dimensionen auf unterschiedlichen Trennmechanismen basieren. Multidimensionale Trenntechniken zeichnen sich vor allem durch ihre enorm hohe Auflösung im Vergleich zu eindimensionalen Methoden aus [181-183].

Da die Flüssigchromatographie, wie in Abschnitt 2.5 beschrieben, eine große Auswahl an Trennmechanismen bietet, kann die zweidimensionale Flüssigchromatographie (2D-LC), die im Jahr 1978 von ERNI und FREI zum ersten Mal beschrieben wurde [184], theoretisch in vielen Kombinationen betrieben werden [185]. Schwierigkeiten kann es dabei allerdings bei der Mischbarkeit der mobilen Phasen oder der Kompatibilität von mobiler Phase in erster und stationärer Phase in zweiter Dimension geben [183, 186].

Die 2D-LC kann entweder offline oder online betrieben werden. Bei der Offline-Methode wird das Eluat aus der ersten Dimension in Fraktionen geteilt und diese

zunächst gesammelt. Anschließend werden die Fraktionen nacheinander auf einer Säule mit einem weiteren Phasenmaterial chromatographisch getrennt. Die Online-Methode ist weniger zeitaufwändig, allerdings ist ein komplexeres Analysensystem mit speziellem Interface notwendig. Bei der Online-Variante kann zusätzlich zwischen dem heart-cutting-Verfahren (LC-LC) (Abbildung 17) und der comprehensiven zweidimensionalen Flüssigchromatographie (LCxLC) unterschieden werden [187]. Das erste Verfahren ermöglicht die Injektion einer bestimmten Anzahl an Fraktionen von der ersten Dimension auf die Zweite, während bei der comprehensiven Technik in sehr kurzen Intervallen nach und nach das gesamte Eluat auf die zweite Dimension übertragen wird. [188-190]

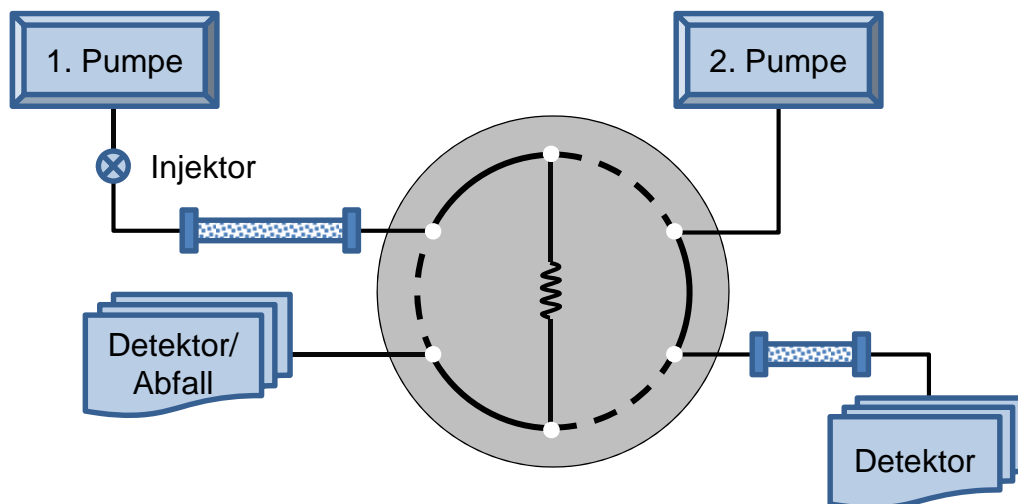


Abbildung 17: 2D-LC mit der heart-cutting Technik (LC-LC) nach [187]

Bei einer comprehensiven zweidimensionalen Trennung werden die Substanzen zunächst auf einer Trennsäule getrennt. Das Eluat dieser ersten Dimension wird dann über ein Mehrwegeventil mit zwei Sammelschleifen in Aliquots geteilt, welche anschließend auf eine zweite Trennsäule gegeben werden [191]. Während in der einen Schleife das Eluat der ersten Dimension gesammelt wird, wird der Inhalt der zweiten Sammelschleife auf die zweite Dimension gegeben und getrennt (Abbildung 18) [188].

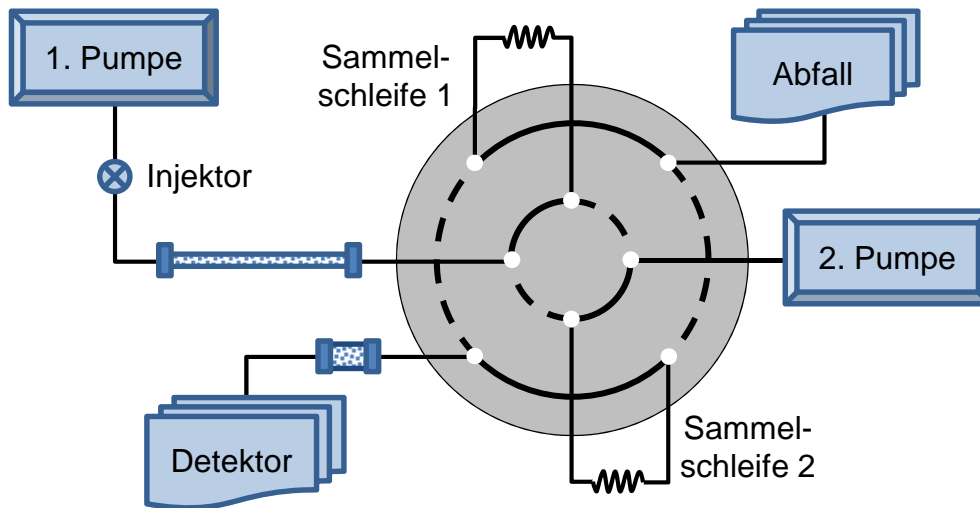


Abbildung 18: Comprehensive 2D-LC (LCxLC) nach [192]

Als Interface können je nach Fragestellung viele unterschiedliche Mehrwegeventile eingesetzt werden. Für das heart-cutting-Verfahren wird in der Regel ein Sechswegventil eingesetzt, wie es auch in Abbildung 17 dargestellt ist. Um bei der comprehensiven zweidimensionalen Technik die erste Dimension mit der zweiten zu verbinden, kommen hauptsächlich Acht- oder Zehnwegventile zum Einsatz. Es können entweder zwei Sammelschleifen eingesetzt werden, in denen die Fraktionen für die Dauer einer Modulation gesammelt werden oder aber zwei Säulen, auf denen alternierend die Trennungen der zweiten Dimension durchgeführt werden. [187, 193] VAN DER HORST und SCHOENMAKERS haben gezeigt, dass es je nach Sammelschleifen-volumen bei Verwendung eines Achtwegventils zu unregelmäßigen Peakformen in der 2D-Darstellung kommt, da die beiden Sammelschleifen nicht in gleicher Richtung geleert werden [194]. Dies kann durch den Einsatz eines Zehnwegventils verhindert werden, wo der Fluss bei beiden Sammelschleifen in gleicher Richtung verläuft. [187]

In den Arbeiten von ERNI und FREI wurden erstmals zwei unterschiedliche Phasenmaterialien online über ein Achtwegventil gekoppelt. Es wurde ein komplexes Pflanzenextrakt mit einer SEC-Phase in der ersten und einem RP-Material in der zweiten Dimension mit einer gesamten Analysenzeit von 10 Stunden getrennt. Das Eluat aus der ersten Dimension wurde in sieben Fraktionen geteilt und

nacheinander auf die zweite Dimension injiziert, sodass hier von einer comprehensiven zweidimensionalen Trennung gesprochen werden kann. [184] Da das Eluat lediglich in sieben Fraktionen geteilt wurde und somit jeweils ein Volumen von etwa 1,5 mL auf die zweite Dimension injiziert wurde, resultierte diese Trennung jedoch nicht in einer maximalen Auflösung. BUSHEY und JORGENSON haben im Jahr 1990 die Idee von ERNI und FREI aufgegriffen und hinsichtlich einer höheren Sammelfrequenz sowie eines geringeren Sammelvolumens optimiert. So wurden Proteine in der ersten Dimension mittels Kationen-Austauschchromatographie und in der zweiten Dimension mittels SEC mit sehr großer chromatographischer Auflösung getrennt [195]. Aufgrund der hohen Sammelfrequenz mit 6-Minuten-Intervallen wurde die erreichte Auflösung in der ersten Dimension nicht beeinträchtigt und durch die Trennung in der zweiten Dimension zusätzlich enorm erhöht.

Bei der LCxLC muss gewährleistet sein, dass zwei Substanzen, die in der ersten Dimension getrennt wurden, auch in der zweiten Dimension getrennt bleiben [196]. Daher verläuft die Trennung in der ersten Dimension üblicherweise sehr langsam, um jeden eluierenden Peak in möglichst viele Fraktionen (mindestens 3-4) teilen zu können und gleichzeitig das Sammelvolumen möglichst klein zu halten [197]. Deshalb ist eine schnelle Modulation, also ein schnelles Schalten des Mehrwegeventils, nötig. Kurze Modulationszeiten bedürfen allerdings sehr schneller Trennungen in der zweiten Dimension, da die Analysenzeit maximal der Dauer einer Modulation entsprechen darf, um eine Vermischung zweier Fraktionen in der zweiten Dimension zu verhindern. [198, 199]. Das Sammelvolumen, welches in die zweite Dimension injiziert wird, sollte außerdem möglichst gering sein, da aufgrund der notwendigen kleinen Säulenvolumina in der zweiten Dimension große Injektionsvolumina die Trennung verschlechtern können.

In der LCxLC werden lediglich die einzelnen Chromatogramme der zweiten Dimension vom Detektor erfasst. Da die Datenauswertung dadurch sehr komplex

wird, ist eine Software zur visuellen Darstellung der Ergebnisse notwendig. Häufig werden die Daten als 2D-Plot oder Konturplot dargestellt, bei denen die Retentionszeiten der ersten und zweiten Dimension auf die x- bzw. y-Achse übertragen werden (Abbildung 19). Die Farbe, bzw. die Farbintensität, der einzelnen Spots gibt Auskunft über die Signalintensität. [186]

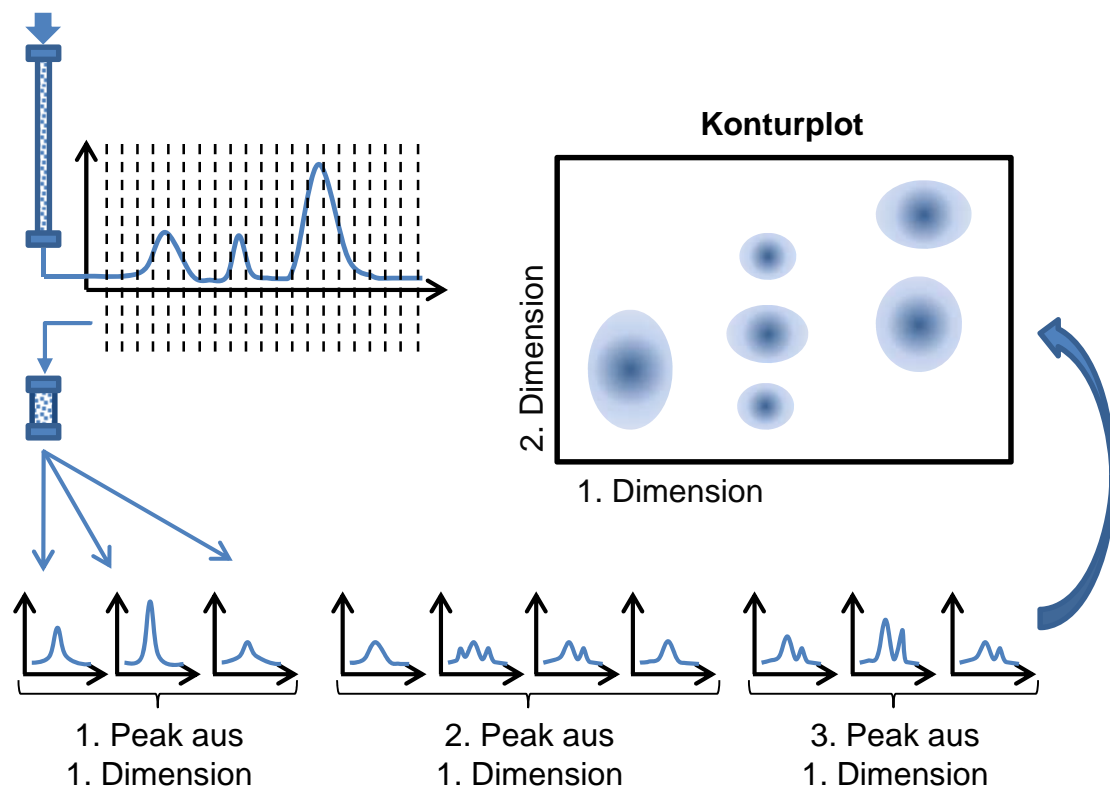


Abbildung 19: Darstellung der Einzelchromatogramme einer LCxLC-Messung als Konturplot nach [192]

Der Vorteil der LCxLC liegt darin, dass sich die Trennkapazitäten der einzelnen Dimensionen multiplizieren, was zu einer sehr hohen Peakkapazität führt und komplexe Proben mit einer hohen chromatographischen Auflösung getrennt werden können [200]. Die besten Ergebnisse können dabei erzielt werden, wenn orthogonale Systeme verwendet werden, also wenn die Trennung in der ersten und zweiten Dimension auf unterschiedlichen Trennmechanismen basiert [201, 202]. Eine Kombination aus Umkehrphasen mit HILIC oder SEC wäre dafür gut geeignet und würde zusätzlich auch nicht zu Problemen bezüglich der Mischbarkeit der mobilen Phasen führen [203, 204].

Wird die LCxLC mit der Massenspektrometrie gekoppelt, muss berücksichtigt werden, dass nicht alle Eluenten MS-kompatibel sind. So ist die Ionenaustauschchromatographie, bei der hohe Konzentrationen an Phosphat- oder Borat-Puffern verwendet werden, nicht als zweite Dimension geeignet. Des Weiteren ist bei der Kopplung mit der MS zu beachten, dass die Flussrate für ESI-Quellen maximal einige hundert Mikroliter pro Minute betragen sollte, um ein stabiles Spray zu generieren. Wenn nicht mit Kapillarsäulen gearbeitet wird, liegen die Flussraten der zweiten Dimension meist bei einigen Millilitern pro Minute, um eine schnelle Trennung zu realisieren, weshalb ein Flusssplitting notwendig wird [205]. Für die LCxLC-MS ist außerdem ein Massenspektrometer mit hoher Datenaufnahmerate notwendig, da die Peakbreiten nur einigen Sekunden betragen und idealerweise jedoch etwa 6 – 10 Datenpunkte pro Peak gesammelt werden sollten [205]. Ein TOF-Massenspektrometer, welches bereits in Abschnitt 2.4.3 beschrieben wurde, wäre hier besonders gut geeignet.

Die LCxLC wurde in den letzten Jahren für eine Reihe von Fragestellungen, wie der Trennung von Polymeren [194, 206, 207], der Proteom-Analytik [208] oder der Analyse von Pflanzeninhaltsstoffen [183, 200, 204, 209], eingesetzt. Dennoch gibt es nur wenige Veröffentlichungen zur quantitativen LCxLC, da die Auswertung entweder sehr zeitaufwendig ist oder aber eine Software verlangt, mit der sowohl eine Identifizierung als auch eine Bestimmung der Peakvolumina möglich ist [209, 210]. Hingegen werden bei einer manuellen Auswertung alle Signale, welche zu einer Substanz gehören, aber zuvor in Fraktionen geteilt wurden, integriert und summiert, um die gesamte Peakfläche zu bestimmen. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass es aufgrund der starken Verdünnung der Probe bei der Trennung in der zweiten Dimension sowie aufgrund eines eventuellen Flusssplittings vor der massenspektrometrischen Detektion zu einer geringeren Sensitivität im Vergleich zur eindimensionalen Trennung kommt [186].

In einigen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass sich die LCxLC ebenfalls zur Trennung von Tensiden eignet. So wurde von TRATHNIGG und ABRAR gezeigt, dass FAEO unter Verwendung der LAC in Kombination mit der LCCC, der LEAC oder HILIC nach ihrer Alkylkettenlänge und/oder ihrem EO-Grad sowie Nebenkomponten, wie Polyethylenglycol, getrennt werden können [211, 212]. In weiteren Arbeiten wurde die NP-LC mit der RP-LC zur Trennung von FAEO gekoppelt, was zu einer sehr guten Trennung nach der Alkylkettenlänge in der einen und nach dem EO-Grad in der anderen Dimension geführt hat [213, 214]. HAEFLIGER beschreibt eine Methode, bei der die heart-cutting-Technik mit einer Diol-Phase in der ersten und zwei parallel geschalteten RP-Säulen in der zweiten Dimension verwendet wird, um anionische, kationische, nichtionische und amphotere Tenside zu trennen [197]. In der ersten Dimension erfuhren die kationischen und die amphoteren Tenside keine Retention, während die nichtionischen Tenside vor den anionischen Tensiden eluierten. Bei den anionischen Tensiden konnten hier zusätzlich Sulfate von Sulfonaten getrennt werden. Für die zweite Dimension wurde eine C₄- sowie eine C₂-Phase parallel verwendet, um zusätzlich nach Alkylkettenlänge und Ethoxylierungsgrad zu trennen. Allerdings wurden lediglich vier Fraktionen gesammelt, welche die einzelnen Substanzklassen enthielten. Die Fraktionen wurden anschließend in der zweiten Dimension getrennt, was allerdings mit Coelutionen und sehr breiten Signalen einher ging.

3 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, eine Analysenmethode zu entwickeln, mit welcher Tenside in komplexen Gemischen und realen Proben identifiziert und charakterisiert werden können. Für die Identifizierung spielt zum einen die Substanzklassen eine wichtige Rolle, aber auch Informationen über die Verteilung der Alkylkettenlängen sowie der EO-Homologen sind von großer Bedeutung. Während die Verteilung der Alkylkettenlängen einen Hinweis auf die Herkunft der verwendeten Rohstoffe gibt, können aus der Verteilung der EO-Homologen Informationen über den industriellen Ethoxylierungsprozess gewonnen werden.

Zunächst sollen konventionelle Trenntechniken wie die hydrophile Interaktionschromatographie und die Umkehrphasenchromatographie verwendet und hinsichtlich ihrer Grenzen für die gegebene Fragestellung untersucht werden. Weiterhin soll die comprehensive zweidimensionale Flüssigchromatographie implementiert werden, da diese Methode aufgrund der hohen chromatographischen Auflösung vielversprechend für das vorliegende Trennproblem erscheint.

Als Ziel soll eine Analysenmethode entwickelt werden, mit welcher Tenside in nur einem Schritt nach Substanzklasse, Alkylkettenlängenverteilung sowie nach EO-Homologen getrennt und anschließend eindeutig mit einer geeigneten Detektionsmethode identifiziert werden können. Die Methode soll hinsichtlich der Analysenzeit sowie der Trennleistung zu einem optimalen Ergebnis führen. Des Weiteren wäre es wünschenswert, wenn diese Methode ebenfalls zur Quantifizierung einzelner Tenside in komplexen Gemischen geeignet wäre.

Abschließend soll die Leistungsfähigkeit der Methode durch die Analyse von realen Proben belegt werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Allgemeines Messprinzip

Die Trennung von Tensiden mittels Flüssigchromatographie ist von vielen Faktoren abhängig. Zum einen spielen die chemischen Eigenschaften des Tensids, wie die Substanzklasse, die Ladung der Kopfgruppe, die Verteilung der Alkylkettenlänge und gegebenenfalls der Ethoxylierungsgrad, eine wichtige Rolle. Andererseits ist die Güte der Trennung auch von einer Vielzahl chromatographischer Parameter, wie dem Phasenmaterial, dem Eluenten, dem Trennmechanismus oder dem pH-Wert, abhängig.

Es wurden unterschiedliche, kommerziell erhältliche HILIC- und RP-Materialien eingesetzt und die Trennung hinsichtlich der zuvor erwähnten chromatographischen Parameter optimiert. Anschließend wurde die Tenside unter Berücksichtigung der zuvor optimierten Trennungen mit der comprehensive zweidimensionale Flüssigchromatographie analysiert.

Zur Analyse wurden zunächst technische Standards einzelner Tenside aus der Gruppe der nichtionischen, anionischen sowie amphoteren Tenside, welche von der BASF Personal Care and Nutrition GmbH zur Verfügung gestellt wurden, eingesetzt. Daran anschließend wurden Gemische dieser Standards analysiert, um dann final die optimierte Methode zur Untersuchung von Realproben anzuwenden.

Zur Detektion wurde für die eindimensionalen Analysen aufgrund der einfachen Handhabung in der Regel ein ELSD verwendet. Außerdem wurde die Detektion mittels Massenspektrometrie sowohl für die Ionisationsmodi APCI-positiv und APCI-negativ als auch für ESI-positiv und ESI-negativ optimiert und für die zweidimensionalen Analysen eingesetzt.

4.2 Eindimensionale Analyse verschiedener Tensidklassen

4.2.1 Trennung mittels HILIC

4.2.1.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

Während die Verteilung der Alkylkettenlänge bei Fettalkoholderivaten meist mit Hilfe der RP-LC bestimmt wird, wird die EO- oder auch die Glucosid-Verteilung in der Regel mit der NP-LC ermittelt. In dieser Arbeit soll nun gezeigt werden, wie Tenside im HILIC-Modus retardiert werden.

Als HILIC-Phasenmaterial wurde für die Analysen eine ZIC[®]-HILIC (SeQuant[®], Deutschland), 250 mm x 4,6 mm, 5 µm, 200 Å, verwendet. Die ZIC[®]-HILIC stellt eine auf Kieselgel basierende Sulfoalkylbetain-Phase dar, welche im verwendeten pH-Bereich permanent zwitterionisch geladen ist. Als mobile Phase diente in der Regel Acetonitril und ein Ammoniumacetat-Puffer. Eine detaillierte Beschreibung der Methode ist in Tabelle 22 in Abschnitt 7.4 und Angaben zu Geräteparametern in Abschnitt 7.2 zu finden.

Zunächst wurde die Trennung aller Substanzen (Tabelle 15, Abschnitt 7.1) mit einem Standardgradienten für HILIC-Trennungen durchgeführt (Tabelle 3). Zur Optimierung der Trennung wurde anschließend die Zusammensetzung der mobilen Phase, die Pufferkonzentration sowie der pH-Wert variiert.

Tabelle 3: Standardgradient für HILIC-Trennungen

Zeit [min]	ACN [%]	NH ₄ OAc [%]
0	95	5
10	95	5
30	70	30
35	70	30
50	95	5
70	95	5

4.2.1.2 Anionische Tenside

Fettalkoholsulfate (FAS) und Fettalkoholethoxylate (FAES) zählen zu der Klasse der anionischen Tenside. Sie weisen eine Alkylkettenverteilung, eine Sulfat-Funktion als anionische Kopfgruppe sowie im Falle der FAES zusätzlich eine Verteilung des EO-Grades auf.

Zur Analyse der Fettalkoholsulfate wurde zunächst ein C_{12,14}-FAS verwendet. Abbildung 20 zeigt, dass beide FAS unter Verwendung des Standardgradienten für HILIC-Trennungen bereits nach etwa 5 Minuten eluieren und somit keine Trennung hinsichtlich der Alkylkettenlänge erzielt wird.

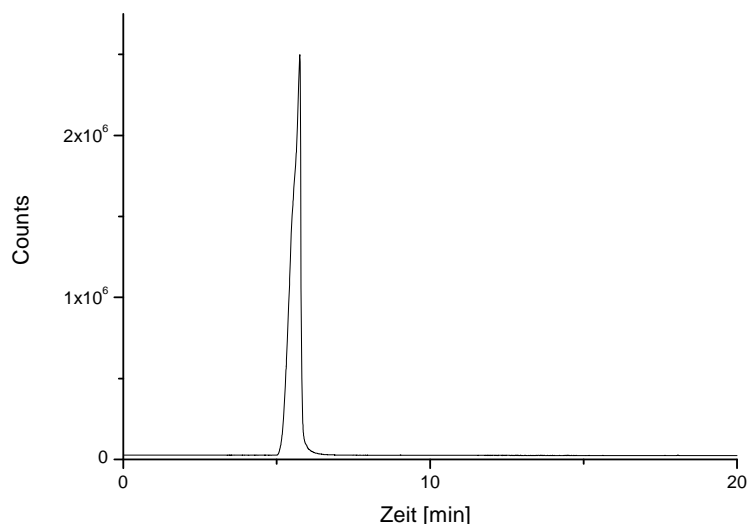


Abbildung 20: Analyse von C_{12,14}-FAS unter Verwendung des Standardgradienten für HILIC-Trennungen, Detektor: ELSD

Im HILIC-Modus nimmt die Retention mit steigender Polarität der Analyten zu. Da das Signal auf der linken Seite eine Schulter aufweist, wird zwar angenommen, dass das C₁₂-FAS eine leicht höhere Retention aufweist, als das C₁₄-FAS, allerdings konnte auch nach einer Analysenoptimierung unter isokratischen Bedingungen mit unterschiedlichen Zusammensetzungen der mobilen Phase keine Trennung erzielt werden.

Daraufhin wurde außerdem ein Natriumoctylsulfat analysiert, um das Verhalten der FAS hinsichtlich der Anzahl der Kohlenstoffatome zu untersuchen. Die Trennung unter isokratischen Bedingungen mit 90% ACN und 10% NH_4OAc -Puffer als mobile Phase zeigte, dass eine Trennung des $\text{C}_{12,14}$ - und des C_8 -FAS erzielt werden konnte (Abbildung 21).

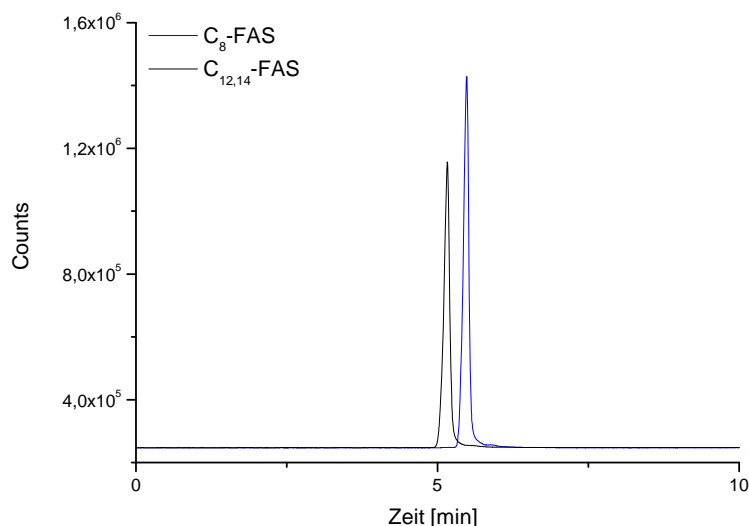


Abbildung 21: FAS mit C_8 , C_{12} und C_{14} als Alkylkettenlänge; isokratisch 90% ACN : 10% NH_4OAc , Detektor: ELSD

Aus Abbildung 21 wird ersichtlich, dass das Natriumoctylsulfat erst nach dem $\text{C}_{12,14}$ -FAS eluiert. Je kürzer die Alkylkette ist, desto größer ist somit die Retention. Da die Polarität mit abnehmender Alkylkettenlänge zunimmt, kann die Aussage aus Abschnitt 2.5.2, dass im HILIC-Modus die Retention mit der Polarität des Analyten zunimmt, auch für die Substanzklasse der anionischen Tenside bestätigt werden.

Zur Untersuchung des Retentionsverhaltens der FAES wurde ein $\text{C}_{12,14}\text{EO}_{12}$ -FAES, also ein FAES mit C_{12} sowie C_{14} als Alkylkettenlänge und einem mittleren Ethoxylierungsgrad von 12, eingesetzt und zunächst mittels Gradientenelution analysiert. Abbildung 22 zeigt, dass eine Trennung der FAES nach den einzelnen EO-Einheiten erzielt werden konnte.

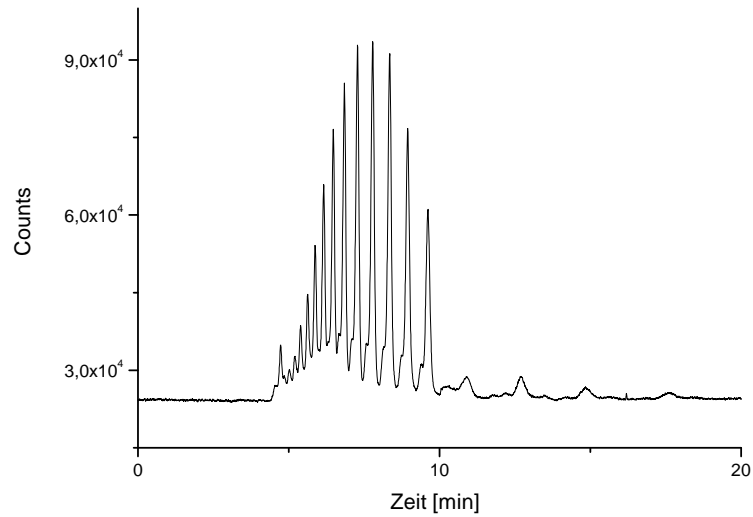


Abbildung 22: Analyse von $C_{12,14}EO_{12}$ -FAES unter Verwendung des Standardgradienten für HILIC-Trennungen, Detektor: ELSD

Des Weiteren wurde das Retentionsverhalten von FAES mit unterschiedlichem mittleren EO-Grad unter isokratischen Bedingungen verglichen (Abbildung 23 a-d).

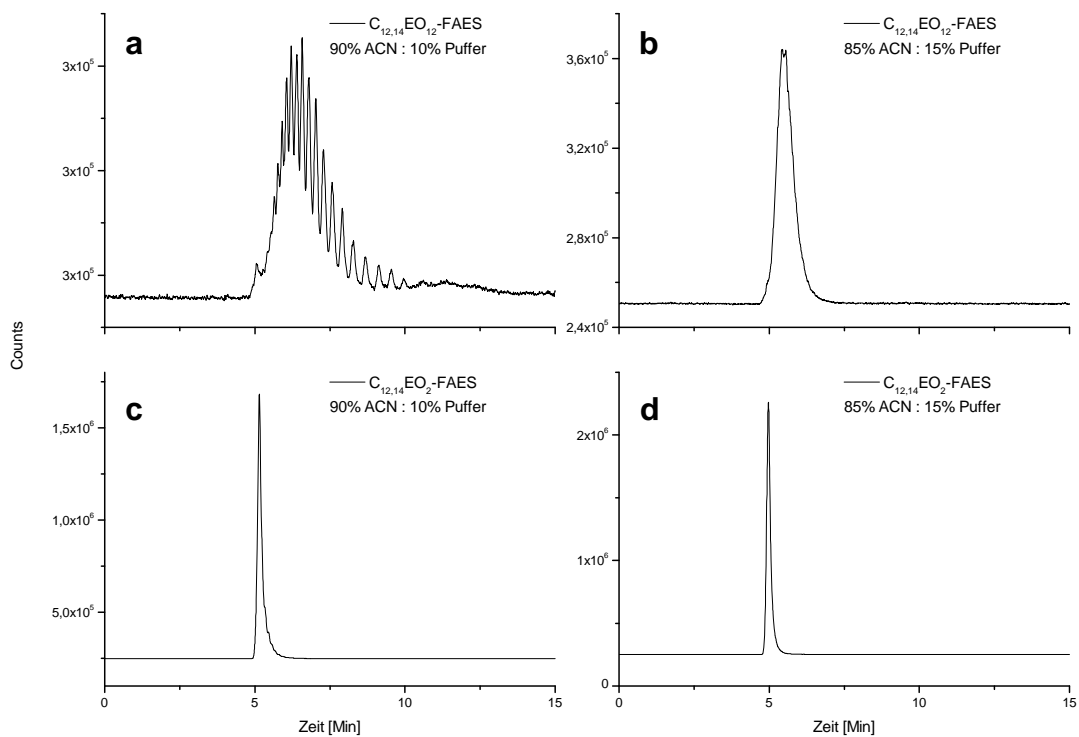


Abbildung 23: Analyse von FAES mit unterschiedlichem EO-Grad unter isokratischen Bedingungen, Detektor: ELSD

Während bei einer Zusammensetzung von 90% ACN und 10% NH₄OAc-Puffer eine sehr gute Trennung der EO-Einheiten für das C_{12,14}EO₁₂-FAES realisiert werden kann (Abbildung 23 a), zeigt das C_{12,14}EO₂-FAES keine Trennung (Abbildung 23 c). Bei einer Zusammensetzung von 85% ACN und 15% NH₄OAc-Puffer, also bei Erhöhung der Elutionskraft, erfolgt auch keine Trennung nach EO-Einheiten für das C_{12,14}EO₁₂-FAES mehr und die Tenside eluieren lediglich in einem Peak (Abbildung 23 b und d). Abbildung 23 zeigt ebenfalls, dass FAES mit mittlerem EO-Grad von 12, also der höheren Polarität, eine stärkere Retention aufweisen.

Bei Betrachtung der Retentionszeiten wird deutlich, dass FAS und FAES mit niedrigem EO-Grad coeluieren. Wie von GRUMBACH aufgezeigt wurde [139], kann der pH-Wert der mobilen Phasen einen zusätzlichen Einfluss auf die Retention und die Selektivität bei HILIC-Trennungen haben. Aus diesem Grund wurde versucht, die Trennung durch Variation des pH-Wertes der mobilen Phase zu optimieren. Der pH-Wert des NH₄OAc-Puffers wurde von pH 5,3 auf pH 4,3 und pH 3,8 abgesenkt und die Analysen mit einer Zusammensetzung der mobilen Phase von 90% ACN und 10% NH₄OAc-Puffer verglichen. Es zeigt sich zwar eine leichte Auftrennung der FAS von den FAES bei niedrigerem pH-Wert, allerdings wird keine Basislinientrennung erreicht (Abbildung 24).

FAS und FAES wiesen bei den vorangegangenen Analysen lediglich eine geringe Retention auf, weshalb, basierend auf den Arbeiten von GRUMBACH, eine weitere Modifikation der mobilen Phase vorgenommen wurde. Ein Teil des Wassers in der mobilen Phase wurde durch Isopropanol (IPA), ein Lösungsmittel mit geringerer Polarität, ersetzt, um die Retention der Analyten zu erhöhen [139]. Abbildung 60 in Abschnitt 8.1 belegt zwar eine erhöhte Retentionszeit und es konnte ebenfalls eine Antrennung nach Alkylkette für FAS sowie nach EO-Grad für FAES realisiert werden, allerdings wurde das Trennproblem durch diese Modifizierung dennoch nicht hinreichend gelöst.

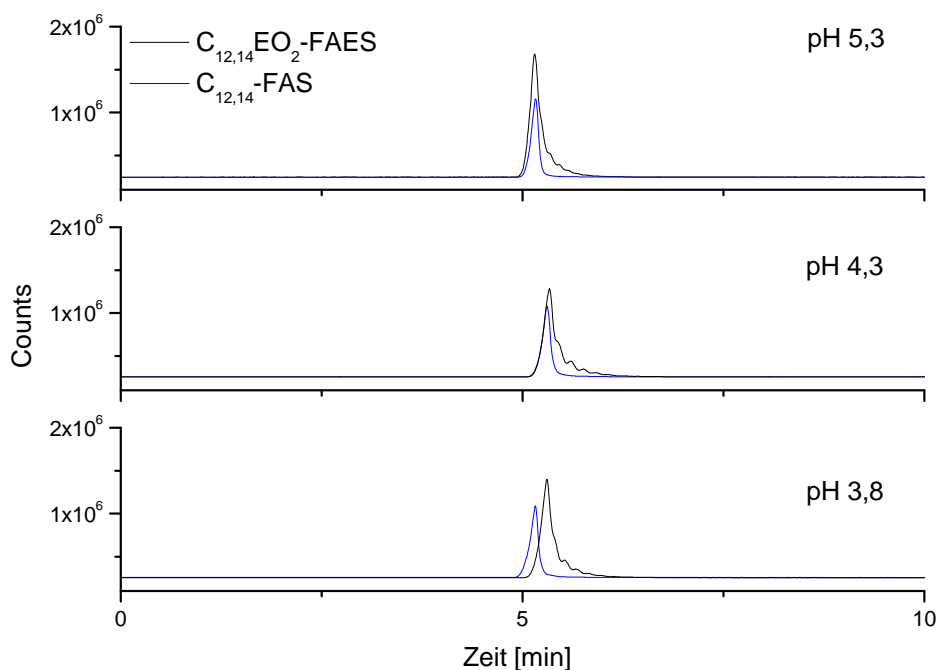


Abbildung 24: Variation des pH-Wertes bei 90% ACN und 10% NH_4OAc

Da die Variation des pH-Wertes, des Puffer-Salzes sowie des organischen Lösungsmittels zu keiner deutlichen Verbesserung der Trennung von FAS und FAES geführt hat, wurde auf diese Optimierungsschritte bei der Analyse der nichtionischen und amphoteren Tenside verzichtet.

4.2.1.3 Nichtionische Tenside

Aus der Gruppe der nichtionischen Tenside sollte die Trennung für Fettalkoholethoxylate (FAEO) sowie Alkylpolyglucoside (AG) optimiert werden. Beide Substanzklassen weisen eine Homologenverteilung der Alkylketten auf. FAEO enthalten zusätzlich eine Verteilung bezüglich des EO-Grades, während AG zusätzlich eine Verteilung des dp-Grades (Anzahl der Glucoseeinheiten) enthalten. Die polare Kopfgruppe ist nicht geladen und stellt im Falle der FAEO eine OH-Funktionalität dar. Alkylpolyglucoside weisen als polare Kopfgruppe ein Kohlenhydratgrundgerüst auf.

Zur Analyse der Fettalkoholethoxylylate wurde ein $C_{12-18}EO_7$ -FAEO, also ein FAEO mit einer Alkylkettenlänge von C_{12} , C_{14} , C_{16} sowie C_{18} und einem mittleren EO-Grad von 7, verwendet. Abbildung 25 zeigt, dass unter Einsatz des HILIC-Standardgradienten (Tabelle 3) eine Trennung nach EO-Grad erfolgt. Während die niederen Ethoxylylate coeluiieren, ist mit steigender Anzahl der EO-Einheiten eine deutliche Trennung der Homologen zu erkennen. Ohne massenspektrometrische Detektion kann allerdings nicht zweifelsfrei bewiesen werden, dass lediglich eine Auftrennung nach EO-Grad erfolgt. Es könnte theoretisch auch eine Auftrennung nach Alkylkettenlänge stattfinden. Eine Aufspaltung nach EO-Homologen steht jedoch im Einklang mit Analyseergebnissen von LIU und POHL, die ebenfalls FAEO im HILIC-Modus nach EO-Grad getrennt haben [153].

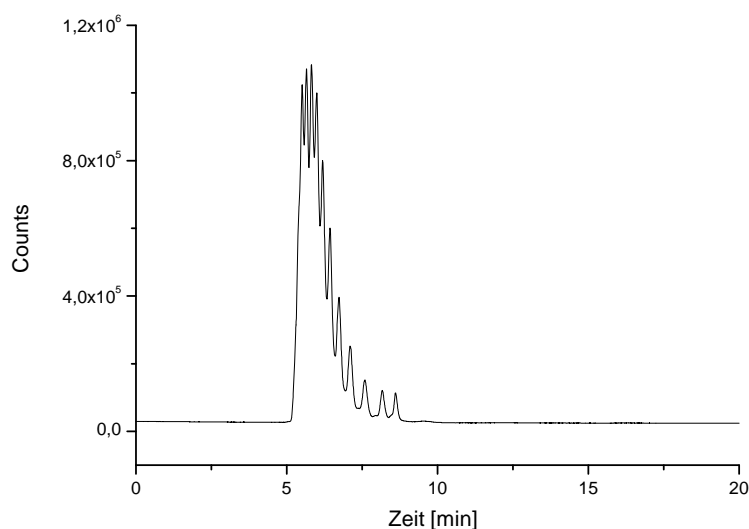


Abbildung 25: Analyse von $C_{12-18}EO_7$ -FAEO unter Verwendung des Standardgradienten für HILIC-Trennungen, Detektor: ELSD

Ferner haben Vorarbeiten zu dieser Arbeit von LAUN [215] gezeigt, dass die Analyse von $C_{12,14}EO_3$ -FAEO unter isokratischen Bedingungen mit 90% ACN und 10% NH_4OAc auf einer ZIC[®]-HILIC zu einer Trennung der einzelnen EO-Einheiten führt, während bei einer Zusammensetzung von 55% ACN und 45% NH_4OAc alle Homologen in einem Peak eluieren. Wasser gilt im HILIC-Modus als der stärkste Eluent. Wie bereits bei der Trennung der FAES gezeigt wurde, führt eine Erhöhung

des wässrigen Anteils in der mobilen Phase zu einer Verringerung der Retention und damit zur Aufhebung der Trennung der Homologen.

In den Arbeiten von LAUN wurde die HILIC-Trennung von $C_{12,14}EO_3$ -FAEO massenspektrometrisch mittels ESI-TOF-MS im positiven Ionisationsmodus untersucht. Eine Analyse der extrahierten Massenspuren hat die Annahme, dass eine Trennung nach den EO-Einheiten erfolgt und ein Oligomer mit höherem EO-Grad eine stärkere Retention erfährt, bestätigt. Die Analyse zweier FAEO-Standards mit gleichem EO-Grad, $C_{12}EO_4$ sowie $C_{16}EO_4$, unter isokratischen Bedingungen zeigte zudem, dass keine Trennung aufgrund der Alkylkettenlänge stattfindet, die Retention also lediglich durch die polaren EO-Gruppen beeinflusst wird. [215]

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Trennung von Fettalkoholethoxylaten im HILIC-Modus der Trennung mit Normalphasen ähnelt. FAEO werden nach ihren EO-Einheiten getrennt. Eine Trennung nach der Alkylkettenlänge findet nicht statt.

Weiterhin wurde in den Arbeiten von LAUN das Retentionsverhalten von Alkylpolyglucosiden auf einer HILIC-Phase untersucht. Unter isokratischen Bedingungen konnte bei einer Zusammensetzung von 70% ACN und 30% NH_4OAc durch massenspektrometrische Detektion mittels ESI-TOF-MS im positiven Ionisationsmodus eine Trennung der einzelnen Glucose-Einheiten nachgewiesen werden, wobei die Retention mit steigender Glucose-Anzahl zunimmt. Durch die Analyse zweier Maltoside, die sich lediglich in ihrer Alkylkettenlänge unterscheiden, wurde auch die Auftrennung aufgrund des Alkylrestes aufgezeigt. [215]

In der vorliegenden Arbeit wurde ein $C_{12,14}$ -AG mit einem mittleren Oligomerisierungsgrad von 1,4 – 1,5 verwendet, um das Retentionsverhalten der Alkylpolyglucoside nochmals zu beschreiben. Die Trennung dieser AG unter Verwendung des Standardgradienten für HILIC-Trennungen (Tabelle 3), welche in Abbildung 26 dargestellt ist, hat gezeigt, dass eine Auftrennung aufgrund der Alkylkettenlänge erreicht werden kann. Eine Trennung der Glucose-Einheiten

konnte jedoch nicht beobachtet werden, was vermutlich mit der geringen Empfindlichkeit des Lichtstreuendetektors zusammenhängt.

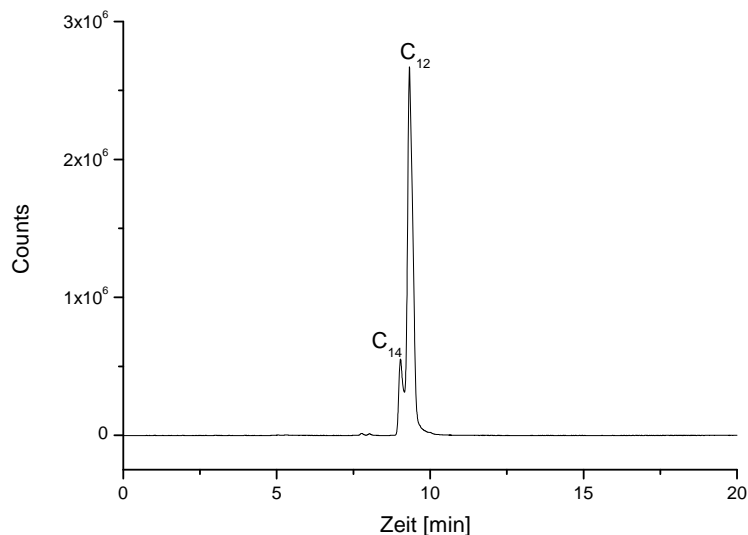


Abbildung 26: Analyse von C_{12,14}-AG unter Verwendung des Standardgradienten für HILIC-Trennungen, Detektor: ELSD

4.2.1.4 Amphotere Tenside

Aus der Gruppe der amphoteren Tenside wurde Cocoamidopropyl-Betain mit einer geradzahligen Alkylkettenlängenverteilung von 8 – 18 Kohlenstoffatomen ausgewählt. Die Trennung dieser Betaine unter Verwendung des Standardgradienten für HILIC-Trennungen (Tabelle 3) ist in Abbildung 27 dargestellt. Aufgrund der sehr polaren Kopfgruppe, die zum einen eine Amid-Funktionalität trägt, des Weiteren allerdings noch ein quartäres Amin sowie eine Carboxyl-Gruppe beinhaltet, weisen die Betaine im Vergleich zu den anderen Tensiden mit einer Retentionszeit von etwa 30 Minuten das stärkste Retentionsverhalten auf. Mit dem gewählten Gradienten können die Betaine aufgrund ihrer Alkylkettenlängen getrennt werden. Auch hier gilt wieder, je kürzer die Alkylkette ist, desto höher ist die Polarität des Moleküls und desto größer ist auch die Retention.

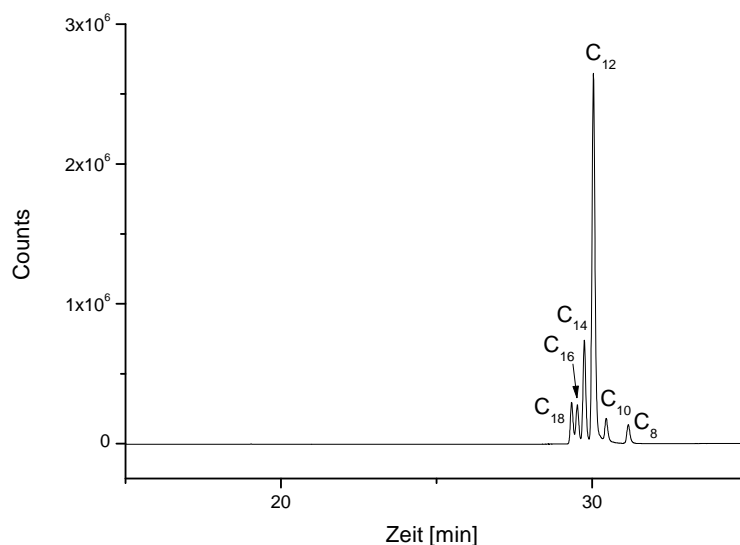


Abbildung 27: Analyse von C₈₋₁₈-Betains unter Verwendung des Standardgradienten für HILIC-Trennungen, Detektor: ELSD

Von LAUN wurde bereits gezeigt, dass sich die Ergebnisse der HILIC-Trennung des Cocoamidopropyl-Betains mit ionenchromatographischen Analysen decken [215]. Aufgrund der hohen Übereinstimmung des Peakprofils kann so eine Signalzuordnung bei der Analyse mit HILIC-ELSD getroffen werden. Mit einer vergleichbaren Auflösung führte die optimierte Trennung des Cocoamidopropyl-Betains mittels HILIC unter isokratischen Bedingungen mit 80% ACN und 20% NH₄OAc-Puffer zu einer fünffach kürzeren Analysenzeit im Vergleich zur Ionenchromatographie [215].

4.2.1.5 Standardgemisch der Tenside

Die optimierten Trennungen der einzelnen technischen Tensidstandards haben gezeigt, dass für nahezu jede Substanzklasse chromatographische Bedingungen gefunden werden konnten, die zu einer hinreichenden Trennung von mindestens einer Homologenverteilung geführt haben. FAES und FAEO konnten aufgrund ihres EO-Grades getrennt werden, während bei den AG und den Betainen eine Trennung der Alkylkettenlängenverteilung erzielt wurde.

In den meisten Realproben werden allerdings unterschiedliche Tensidklassen kombiniert, um die gewünschten Eigenschaften des Produktes zu verbessern. Daher ist es notwendig, eine analytische Plattform zu entwickeln, die auch Gemische von verschiedenen Tensidklassen hinreichend trennt, um anschließend qualitative oder quantitative Aussagen über die Inhaltsstoffe treffen zu können. Zur Methodenentwicklung wurden aus diesem Grund zwei Standardgemische hergestellt, welche jeweils FAS, FAES, FAEO, AG und Betaine in unterschiedlichen Konzentrationen enthalten. Die ausgewählten Substanzen sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Details zur Probenvorbereitung sind in Abschnitt 7.1.1 zu finden.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Standardgemische der Tenside

Substanz- klasse	Anzahl C-Atome Alkylrest*	Polymerisations- grad	Anteil in Gemisch 1	Anteil in Gemisch 2
FAS	12-14	-	20%	14,3%
FAES	12-14	12	20%	14,3%
FAEO	12-18	7	20%	42,8%
AG	12-14	1,4 – 1,5	20%	14,3%
Betain	8-18	-	20%	14,3%

*geradzahlige Alkylkettenlängenverteilung

Das hergestellte Standardgemisch 1 wurde mit dem in Tabelle 3 beschriebenen HILIC-Standardgradienten getrennt. Abbildung 28 zeigt das Ergebnis dieser Trennung. Es wird deutlich, dass die FAS zuerst eluieren und dass keine Trennung hinsichtlich der Alkylkettenlängenverteilung stattfindet. FAEO und FAES können zwar aufgrund ihres EO-Grades getrennt werden, allerdings coeluieren diese beiden Substanzklassen. Während bei den AG lediglich eine Antrennung der C₁₂- und der C₁₄-Alkylkette erreicht werden kann, werden alle sechs Betaine aufgrund ihrer unterschiedlichen Alkylkettenlänge getrennt.

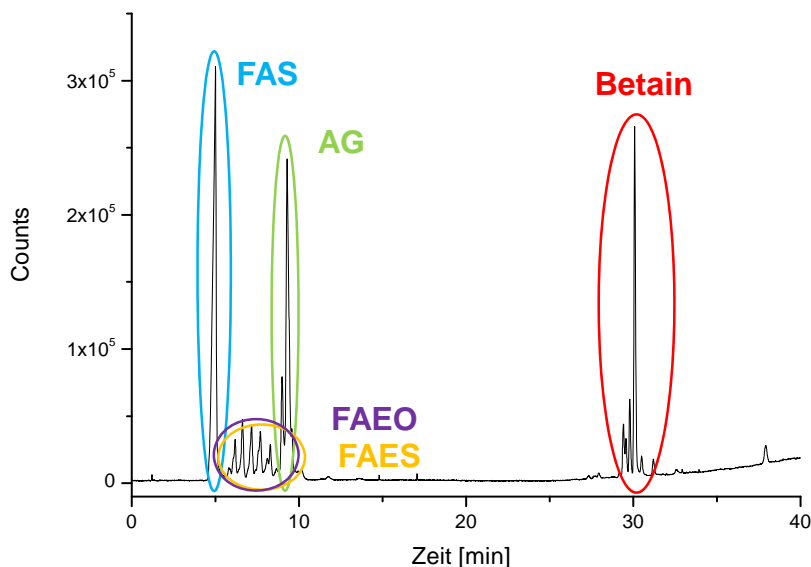


Abbildung 28: Trennung des Standardgemisches 1 unter Verwendung des HILIC-Standardgradienten, Detektor: ELSD

In Arbeiten von LAUN wurde bei der Analyse von Realproben deutlich, dass durchaus FAEO und FAES in einem Produkt kombiniert werden [215], sodass die hier entwickelte Methode nicht ausreicht, um qualitative Aussagen zu den Inhaltsstoffen von Realproben zu treffen. Zudem ist eine Aussage über die Verteilung der Alkylkettenlängen oft wünschenswert, da dadurch Aussagen über die Art und die Herkunft der verwendeten Rohstoffe möglich sind.

4.2.2 Trennung mittels Umkehrphasenchromatographie

4.2.2.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

Da die Trennung mittels HILIC nicht zum gewünschten Erfolg geführt hat, wurden zusätzlich diverse RP-Materialien ausgewählt (Tabelle 5), um das Retentionsverhalten der Tenside auf verschiedenen modifizierten Umkehrphasen zu vergleichen. Bis auf die Acclaim® Surfactant-Phase lagen alle Phasen in der gleichen Dimension vor, um optimale Vergleichsvoraussetzungen zu schaffen.

Tabelle 5: Verwendete Umkehrphasen

Phase	Dimension
ReproSil-Pur® C ₁₈ AQ	250 mm x 4,6 mm, 5 µm
Reprospher 100 C ₈ -Aqua	250 mm x 4,6 mm, 5 µm
Fluofix® N	250 mm x 4,6 mm, 5 µm
Fluofix® E	250 mm x 4,6 mm, 5 µm
ReproSil-Fluosil® NE	250 mm x 4,6 mm, 5 µm
Acclaim® Surfactant	150 mm x 4,6 mm, 5 µm

Es wurden jeweils die einzelnen technischen Standards der ausgewählten Tenside sowie deren Gemisch unter Verwendung eines Standardgradienten für RP-Trennungen, welcher in Tabelle 6 dargestellt ist, analysiert (für Details s. Tabelle 23, Abschnitt 7.4).

Tabelle 6: Standardgradient für RP-Trennungen

Zeit [min]	ACN [%]	NH ₄ OAc [%]
0	5	95
5	5	95
35	95	5
55	95	5
60	5	95
80	5	95

Für die RP-LC-Trennungen wurde die gleiche Zusammensetzung der Tenside (Gemisch 1) ausgewählt, welche bereits für die Methodenentwicklung mittels HILIC verwendet wurde (Tabelle 4).

4.2.2.2 ReproSil-Pur® C₁₈ AQ

Bei der Phase ReproSil-Pur® C₁₈ AQ handelt es sich um ein klassisches RP-Material mit einer C₁₈-Funktionalität und einem Endcapping. Die Trennung der ausgewählten

Tenside unter Verwendung des Standardgradienten für RP-Trennungen mit dieser Phase ergab, dass alle Substanzen aufgrund ihrer Alkylkettenverteilung getrennt werden konnten (Abbildung 29). Dabei weisen die Analyten mit längerer Alkylkette, also mit geringerer Polarität, eine höhere Retention auf.

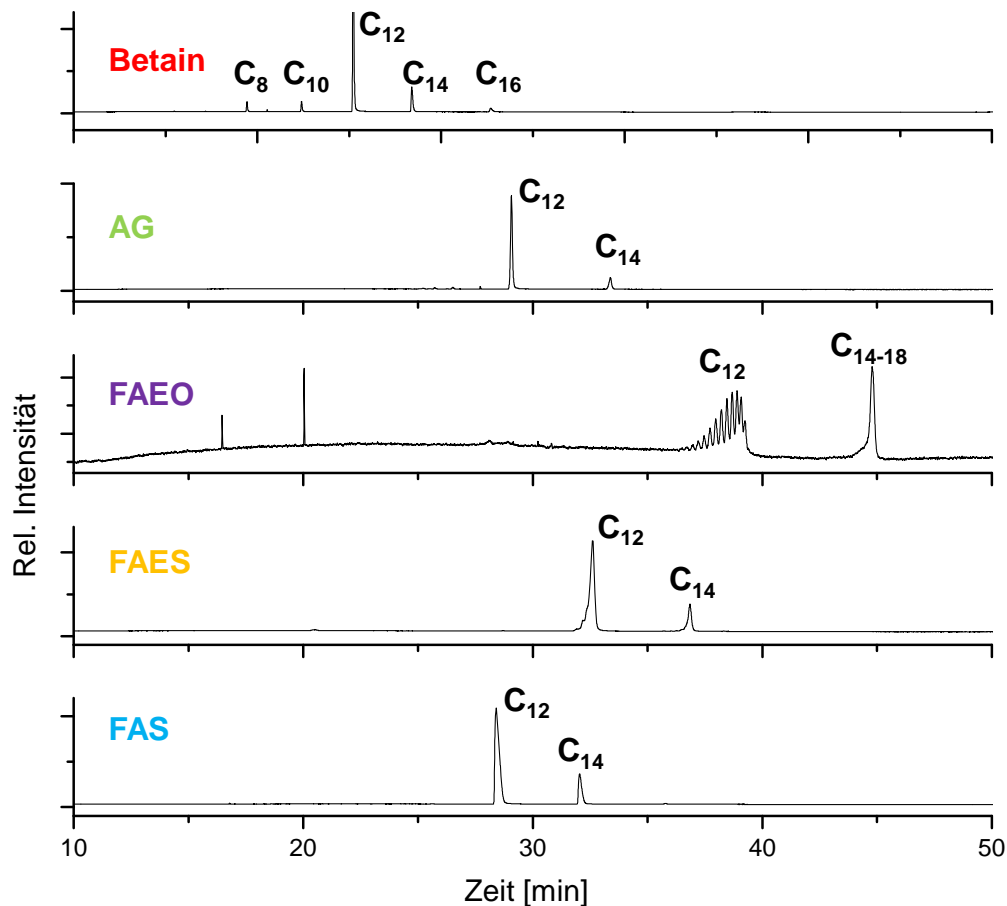


Abbildung 29: Analyse von FAS, FAES, FAEO, AG und Betainen unter Verwendung des Standardgradienten für RP-Trennungen; Phasenmaterial: ReproSil-Pur® C₁₈ AQ, Detektor: ELSD

Die polaren Betaine weisen im Vergleich zu den weniger polaren Substanzen die geringste Retention auf. Die FAEO mit der Alkylkettenlänge von C₁₂ konnten unter den verwendeten Bedingungen zusätzlich aufgrund ihrer EO-Verteilung getrennt werden. Massenspektrometrische Untersuchungen haben gezeigt, dass die einzelnen Oligomere aufgrund ihrer molaren Masse, ähnlich wie in der SEC, getrennt werden. Oligomere mit einem höheren EO-Grad eluieren somit früher. Andererseits folgt die

Trennung der Alkylketten dem in Abschnitt 2.5.4 beschriebenen LAC-Mechanismus, der hauptsächlich von adsorptiven Wechselwirkungen bestimmt wird. Dies führt zu der Annahme, dass unter den verwendeten Bedingungen eine LEAC, also die Kombination von LAC und SEC, definiert durch TRATHNIGG und GORBUNOV [157], beobachtet wird. Für die C₁₄₋₁₈-FAEO wird keine Trennung erreicht, da die Analyten eine Retentionszeit von 45 Minuten aufweisen und hier die Gradientenelution bereits ihr Maximum erreicht hat, sodass die Substanzen mit maximaler Elutionskraft von der Säule gespült werden.

Die Analyse des Standardgemisches 1 unter gleichen Bedingungen hat gezeigt, dass die einzelnen Substanzen aufgrund ihrer Alkylkettenlänge getrennt werden können. Die unterschiedlichen polaren Kopfgruppen der Analyten wirken sich jedoch kaum auf das Retentionsverhalten aus, weshalb die einzelnen Substanzklassen oftmals coeluieren und eine Zuordnung ohne massenspektrometrische Detektion nahezu unmöglich ist (Abbildung 30).

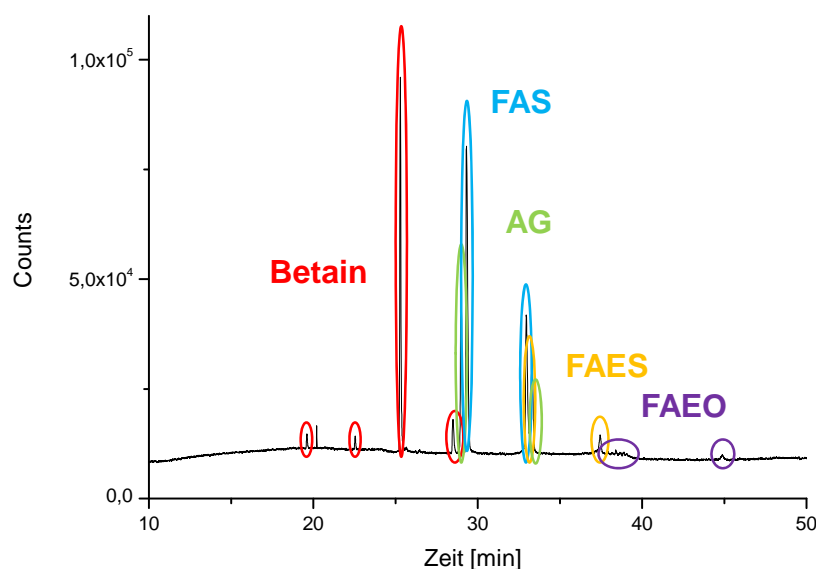


Abbildung 30: Trennung des Standardgemisches 1 unter Verwendung des Standardgradienten für RP-Trennungen; Phasenmaterial: ReproSil-Pur® C₁₈ AQ, Detektor: ELSD

4.2.2.3 Reprospher 100 C₈-Aqua

Bei der Reprospher 100 C₈-Aqua handelt es sich um eine C₈-Diol-Mischphase, also ein Phasenmaterial mit eingebetteten polaren Gruppen und einem zusätzlichen Endcapping. Abbildung 31 zeigt die Trennung der fünf ausgewählten Tensidklassen unter Verwendung des Standardgradienten für RP-Trennungen.

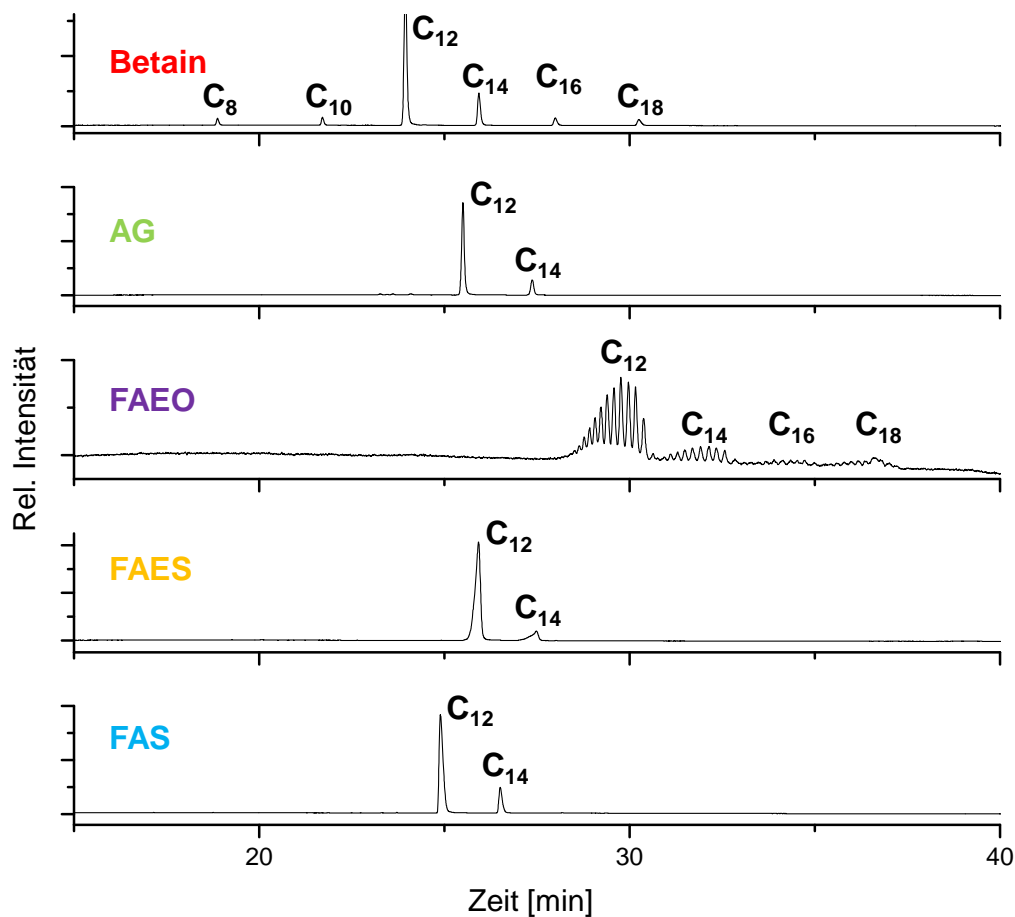


Abbildung 31: Analyse von FAS, FAES, FAEO, AG und Betainen unter Verwendung des Standardgradienten für RP-Trennungen; Phasenmaterial: Reprospher 100 C₈-Aqua, Detektor: ELSD

Es wird deutlich, dass alle Substanzen sehr gut aufgrund ihrer Alkylkettenverteilung getrennt werden. Bei den FAEO werden alle vier Alkylkettenhomologen zusätzlich aufgrund der vorliegenden EO-Verteilung getrennt. Und auch für die FAES werden breitere Peaks als für die anderen Substanzklassen erhalten. Unter den verwendeten

Bedingungen trägt vermutlich die Ethoxylatverteilung zur Verbreiterung der Peaks bei. Aufgrund der Trennung nach Molekülgröße bei den einzelnen Oligomeren der FAEO wie in der SEC und einer Trennung nach LAC für die Alkylketten wird auch hier ein LEAC-Mechanismus [157] angenommen.

Aufgrund der Aufspaltung der einzelnen EO-Einheiten zeigen die Signale der FAEO einen geringeren Response im Vergleich zu den anderen Substanzen. Um alle fünf Tensidklassen in einem Gemisch hinreichend gut detektieren zu können, wurde das Standardgemisch 2 mit einer gegenüber den anderen Tensidklassen dreifach höheren Konzentration an FAEO hergestellt (Tabelle 4). Die Trennung dieses Standardgemisches 2 ist in Abbildung 32 dargestellt. Der Vergleich mit der Trennung an einer ReproSil-Pur® C₁₈ AQ-Phase (Abbildung 30) zeigt, dass bei der Reprospher 100 C₈-Aqua eine ähnlich gute Trennung der Alkylkettenhomologen erhalten wird, jedoch deutlich weniger Coelutionen der einzelnen Substanzklassen untereinander auftreten.

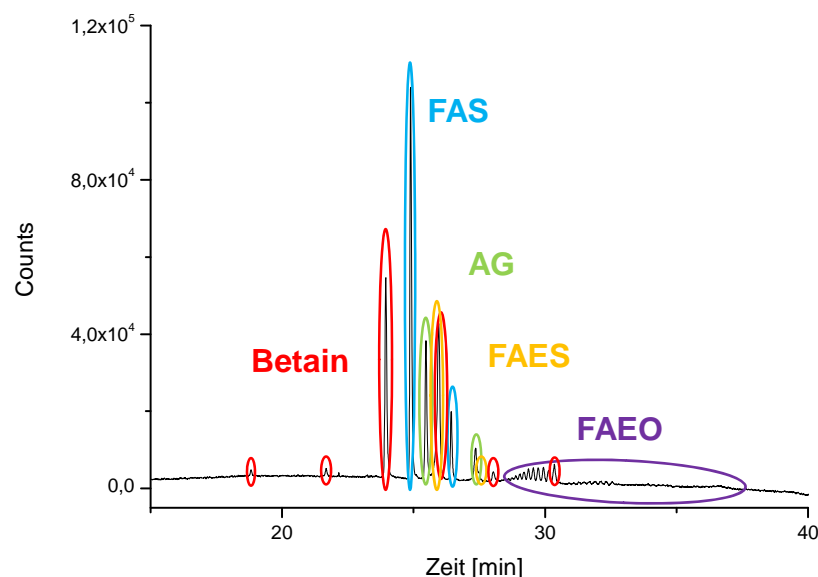


Abbildung 32: Trennung des Standardgemisches 2 unter Verwendung des Standardgradienten für RP-Trennungen; Phasenmaterial: Reprospher 100 C₈-Aqua, Detektor: ELSD

Die breite Separation der einzelnen FAEO-Oligomere führt zu einer Coelution mit dem C₁₈-Betain, zum anderen sind die Signale so gering, dass diese teilweise vom Rauschen überlagert werden. In Anlehnung an die Arbeiten von MALIK et al. wurde daher versucht, die Zusammensetzung des Eluenten so zu optimieren, dass die FAEO lediglich nach einer Homologenverteilung, nämlich nach der Alkylkettenlänge, getrennt werden und so eine LCCC vorliegt [171]. Dadurch soll die Coelution mit dem C₁₈-Betain unterbunden sowie eine empfindlichere Detektion für die FAEO aufgrund des Zusammenführens aller EO-Homologen einer Alkylkettenlänge zu einem Signal erzielt werden. Dazu wurde das Acetonitril in der mobilen Phase zum einen durch ein Gemisch aus 50% ACN und 50% IPA und zum anderen durch Methanol ersetzt. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde der Standardgradient für RP-Trennungen zur Analyse verwendet.

Abbildung 33 zeigt, dass durch Verwendung von Methanol anstelle von Acetonitril die Trennleistung deutlich herab gesetzt wird und die FAEO lediglich aufgrund ihrer Alkylkettenverteilung und nicht mehr nach EO-Homologen getrennt werden. Es wird angenommen, dass dies durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Methanol und den Ethoxylatgruppen hervorgerufen wird und so aufgrund der Abschirmung durch die Methylgruppen des Methanols keine Wechselwirkung mehr zwischen den Ethoxylatgruppen und den polaren Gruppen der stationären Phase stattfindet. Die strukturellen Unterschiede zwischen Acetonitril und Methanol verhindern bei Acetonitril die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit den Ethoxylatgruppen, sodass diese mit den polaren Gruppen der stationären Phase wechselwirken können. Diese Annahme wird außerdem durch Ausführungen von MISZKIEWICZ und SZYMANOWSKI [43] und KIBBEY et al. [79] gestützt. So fassten MISZKIEWICZ und SZYMANOWSKI in einem Review-Artikel zusammen, dass unter Verwendung von RP-Systemen und Methanol als organische mobile Phase keinerlei Wechselwirkungen von EO-Homologen mit der stationären Phase beobachtet werden. Darüber hinaus haben KIBBEY et al.

dargelegt, dass es unter Verwendung von Acetonitril als organische mobile Phase zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den EO-Gruppen und den protonierten Silanolgruppen auf der Silicaoberfläche kommt, was eine Trennung nach EO-Homologen ermöglicht. Außerdem wird ersichtlich, dass die Retention unter Verwendung von Methanol als organische mobile Phase aufgrund des geringeren Polaritätsindex [216] für MeOH (5,1) im Vergleich zu ACN (5,8) zunimmt. Dies kann mit der schwächeren Elutionskraft von Methanol im Vergleich zu Acetonitril begründet werden.

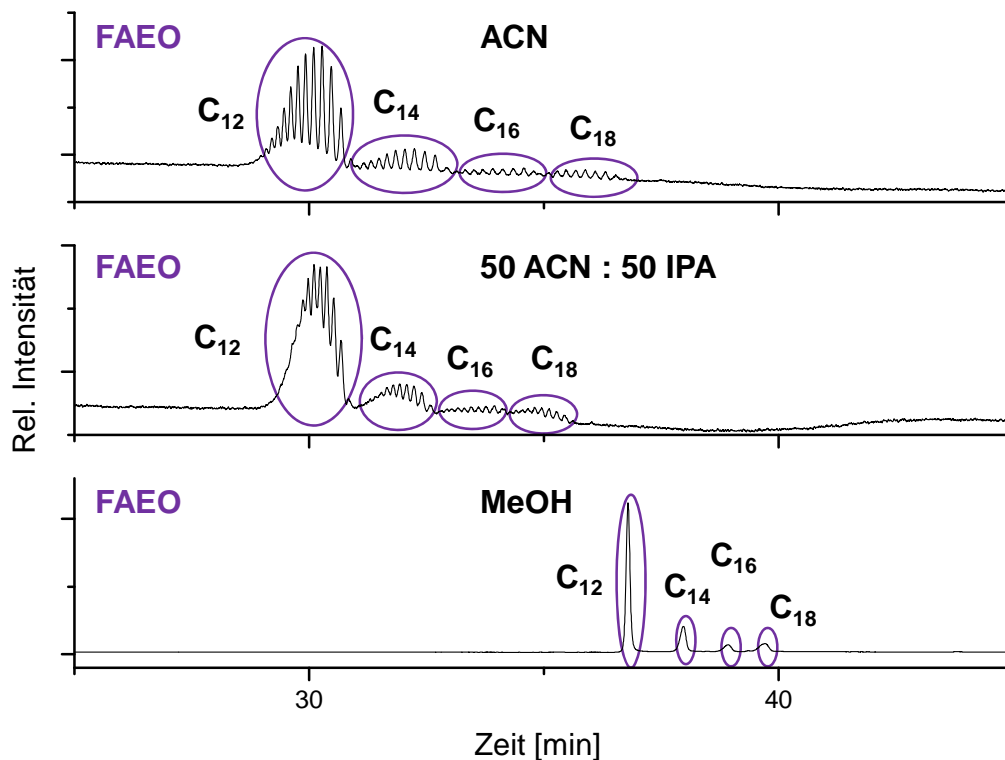


Abbildung 33: Trennung von C₁₂₋₁₈-FAEO unter Verwendung des Standardgradienten für RP-Trennungen; Variation des organischen Anteils in der mobilen Phase (ACN, 50% ACN : 50% IPA, MeOH), Detektor: ELSD

Die Verwendung von 50% ACN und 50% IPA statt ACN führte zwar ebenfalls zu einer geringeren Trennleistung für die Ethoxylate, allerdings konnte das Ergebnis nicht signifikant verbessert werden.

Das Standardgemisch 1 wurde erneut über die Reprospher 100 C₈-Aqua getrennt, allerdings wurde das organische Lösungsmittel in der mobilen Phase durch MeOH ersetzt. Aus Abbildung 32 wird deutlich, dass die erste Substanz erst bei etwa 18 Minuten eluiert. Daher wurde zusätzlich eine Optimierung des Gradienten vorgenommen, indem als Startbedingungen 50% MeOH und 50% NH₄OAc gewählt wurden (für Details s. Tabelle 24, Abschnitt 7.4). In Abbildung 34 ist das Ergebnis der Trennung dargestellt. Da nun alle Substanzen lediglich nach der Alkylkettenlänge und nicht mehr nach der EO-Verteilung getrennt werden, liegt bei der FAEO-Trennung höchstwahrscheinlich ein LCCC-Mechanismus vor.

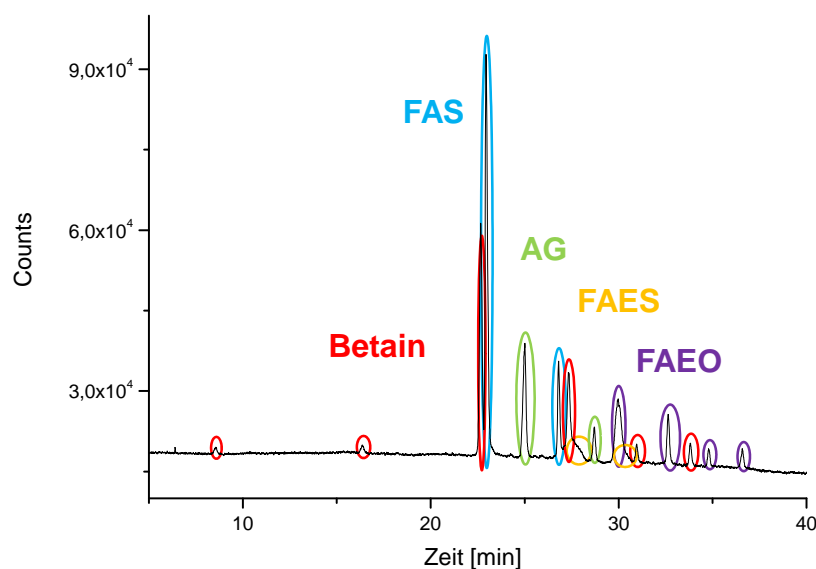


Abbildung 34: Trennung des Standardgemisches 1; Gradient aus MeOH/NH₄OAc von 50% nach 95% MeOH in 30 Minuten (Details s. 7.4.3); Phasenmaterial: Reprospher 100 C₈-Aqua, Detektor: ELSD

Durch den optimierten Gradienten und das Verwenden von Methanol statt Acetonitril konnten alle Substanzklassen hinreichend getrennt werden. Lediglich die FAES coeluierten mit anderen Signalen. Eine Zuordnung der Signale bei Realproben ist leicht durch einen Vergleich der Retentionszeiten möglich. Je nach Komplexität der Probe wäre es allerdings dennoch sinnvoll, ein Massenspektrometer anstatt des Lichtstredetektors zur Detektion zu verwenden.

4.2.2.4 Weitere Phasen

Es wurden drei unterschiedliche fluorierte Phasen verwendet, um das Retentionsverhalten der ausgewählten Tenside zu untersuchen. Es kam eine Fluofix® N ohne Endcapping, eine Fluofix® E mit Endcapping sowie eine ReproSil-Fluosil® NE ohne Endcapping zum Einsatz.

Wie aus Abbildung 35 ersichtlich wird, zeigt vor allem die Trennung unter Verwendung der ReproSil-Fluosil® NE unsymmetrische Peakformen und daraus resultierend einen geringen Response. Auch bei den anderen fluorierten Phasen ist die Peakform im Vergleich zur Trennung mit der Reprospher 100 C₈-Aqua breiter. Insbesondere kommt es bei den drei Trennungen zur Coelution der Substanzklassen, sodass eine Zuordnung kaum möglich ist.

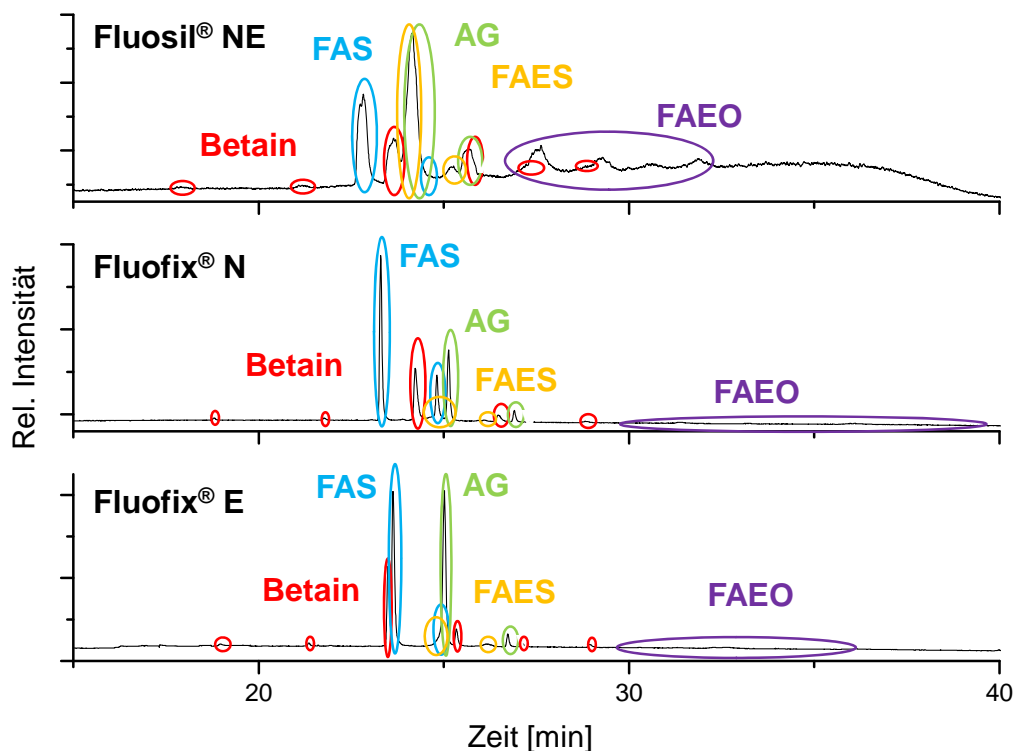


Abbildung 35: Trennung des Standardgemisches 1 unter Verwendung des RP-Standardgradienten; Phasenmaterialien: ReproSil-Fluosil® NE, Fluofix® N und Fluofix® E, Detektor: ELSD

Ein Vergleich der Trennungen mit der Fluofix® N und der Fluofix® E zeigt, dass sich das Endcapping des Phasenmaterials kaum auf das Retentionsverhalten der Tenside auswirkt. Dies mag daran liegen, dass die Tensidmoleküle aufgrund ihrer Größe gar nicht erst zu den polaren Silanolgruppen am Kern des Phasenmaterials gelangen und so auch keine polaren Wechselwirkungen stattfinden.

Des Weiteren kam ein Phasenmaterial zum Einsatz, welches speziell für die Trennung von Tensiden entwickelt wurde. Abbildung 36 zeigt die Trennung der einzelnen Tenside unter Verwendung des Standardgradienten für RP-Trennungen mit der Acclaim® Surfactant.

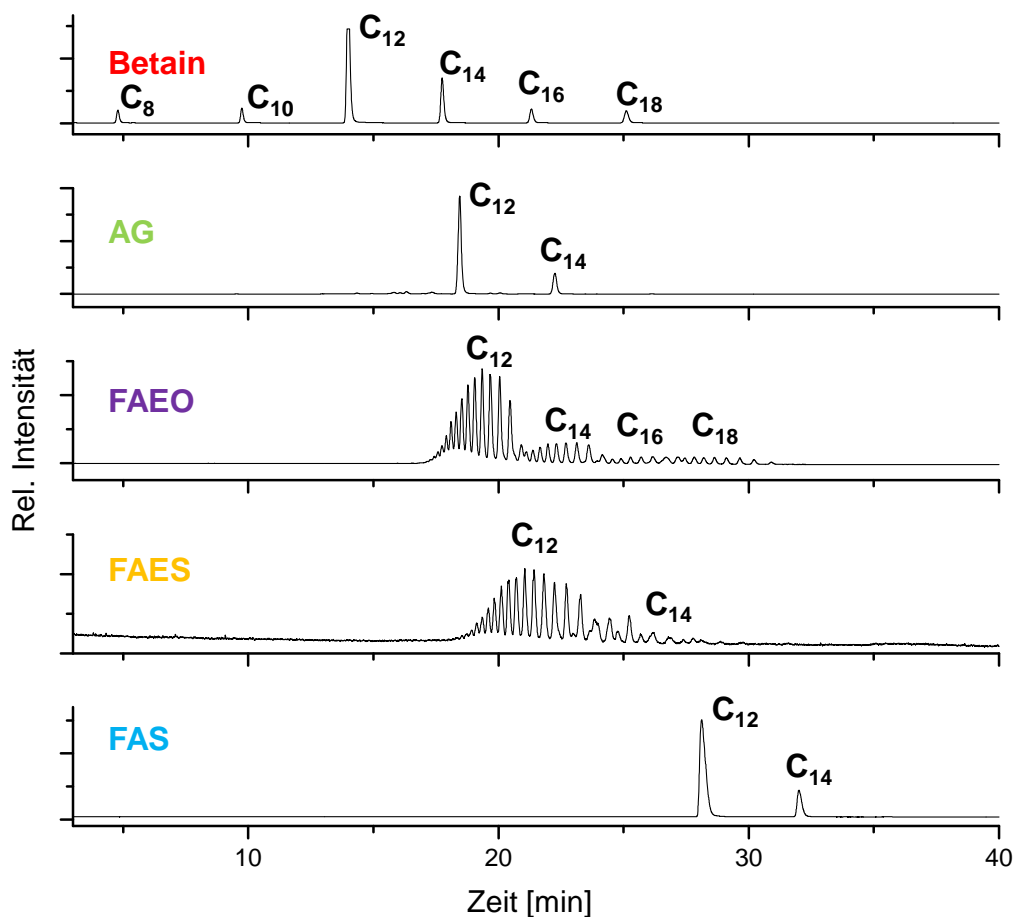


Abbildung 36: Analyse von FAS, FAES, FAEO, AG und Betainen unter Verwendung des Standardgradienten für RP-Trennungen; Phasenmaterial: Acclaim® Surfactant, Detektor: ELSD

Die Acclaim® Surfactant-Phase soll sowohl anionische als auch kationische, nichtionische und amphotere Tenside zum einen nach der Alkylkettenlänge und zum anderen nach der EO-Verteilung trennen können [78, 85, 217]. Hierbei handelt es sich um eine nicht näher spezifizierte mixed-mode Phase. Es wird deutlich, dass alle Substanzklassen mit diesem Phasenmaterial sowohl nach ihrer Alkylkettenlänge als auch nach den EO-Homologen getrennt werden. Die anionischen FAS weisen bei diesem Phasenmaterial die stärkste Retention auf, was darauf schließen lässt, dass das Phasenmaterial kationisch modifiziert ist.

Bei der Betrachtung von Abbildung 36 wird allerdings deutlich, dass es aufgrund der zusätzlichen breiten Aufspaltung nach EO-Grad zu einer Coelution von fast allen Substanzklasse kommt. Daher ist die Phase lediglich geeignet, um einzelne Tenside zu trennen. Eine Trennung von Tensidgemischen führt bei der Auswertung in der Regel zu Problemen.

4.3 Klassifizierung von Phasenmaterialien nach NEUE

Da die eindimensionale Trennung des Tensidgemisches mit keinem Phasenmaterial zum gewünschten Erfolg, nämlich zur Trennung nach Alkylkettenlänge und EO-Grad ohne Coelution der einzelnen Tensidklassen, geführt hat, wurde nun versucht, eine comprehensive zweidimensionale Trennung auf dieses Problem anzuwenden. Bei einer comprehensiven zweidimensionalen Trennung werden unterschiedliche Trennmechanismen in der ersten und zweiten Dimension verwendet, um eine maximale Auflösung zu erreichen [201, 202]. In Abschnitt 4.1 konnte bereits gezeigt werden, dass die verwendeten Tenside mit einem HILIC-Phasenmaterial zum einen nach Substanzklasse und zum anderen, wenn vorhanden, nach ihrem Oligomerisierungsgrad getrennt werden können, während die Ergebnisse aus Abschnitt 4.2 gezeigt haben, dass die Substanzen mit den klassischen Umkehrphasen sehr gut nach ihrer Alkylkettenlängenverteilung separiert werden

können. Auch JANDERA zeigte bereits, dass Trennungen mit HILIC und RP-Materialien auf unterschiedlichen Mechanismen basieren und sich daher für die zweidimensionale LC eignen [203]. Die Untersuchungen in Abschnitt 4.2 belegen allerdings ebenfalls, dass viele verschieden modifizierte Umkehrphasen auf dem Markt vertreten sind und diese Phasen auch zu unterschiedlichen Selektivitäten führen. Aus diesem Grund wurde für alle verwendeten Umkehrphasen der Neutest zur Klassifizierung von Säulenmaterialien durchgeführt [218].

WILSON et al. haben bereits in ihren Arbeiten versucht, die fundamentalen Eigenschaften von Phasenmaterialien zu beschreiben. Dazu wurde zunächst die Retention einer großen Anzahl an Verbindungen mit einigen wenigen Phasenmaterialien untersucht. Aus dem beobachteten Retentionsverhalten der Substanzen wurde dann eine kleinere Anzahl an Analyten ausgewählt, um die spezifischen Beiträge zur Retention zu bewerten. Die betrachteten Beiträge waren die hydrophoben Eigenschaften, ein Parameter, der das Eindringen des Analyten in die stationäre Phase beschreibt, die Wasserstoffbrücken-Donor-Eigenschaften der stationären Phase sowie Parameter, welche die ionische Abstoßung oder den Ionenaustausch beschreiben. [133, 219, 220]

Eine Vielzahl von Arbeiten hat sich bereits mit der Charakterisierung von Phasenmaterialien beschäftigt und es hat sich gezeigt, dass mindestens drei Parameter nötig sind, um Phasen ausreichend zu klassifizieren. Die hydrophoben Eigenschaften, wie sie bereits von WILSON et al. beschrieben wurden, stellen einen dieser Parameter dar. Eine weitere Eigenschaft ist die molekulare Formerkennung, also die Eigenschaft der stationären Phase, zwischen planaren und nicht-planaren Molekülen zu unterscheiden. Des Weiteren stellt die Silanol-Aktivität einen wichtigen Parameter dar, der allerdings zum einen abhängig vom pH-Wert der mobilen Phase ist und zum anderen auch mit untergeordneten Eigenschaften, wie der Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen oder ionischen Wechselwirkungen, beschrieben werden kann. [218]

Mit dem Neue-Test ist es nun möglich, unter Verwendung von nur einer mobilen Phase und diversen Test-Substanzen, Schlüsseigenschaften von RP-Materialien zu ermitteln. Als mobile Phase wird ein $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer mit einem pH-Wert von 7 und Methanol in einem Mischungsverhältnis von 35% zu 65% verwendet (für Details s. Tabelle 31, Abschnitt 7.5). Uracil dient als Totzeit-Marker, Naphthalin und Acenaphthen sind die rein hydrophoben Substanzen, Propranolol und Amitriptylin stellen basische Verbindungen dar und Butylparaben und Dipropylphthalat dienen als Marker für die polare Selektivität des Phasenmaterials. [218] Die Strukturformeln der verwendeten Substanzen sind in Abbildung 62 in Abschnitt 8.1 dargestellt. Mit Hilfe des Neue-Tests wurden nun alle in Tabelle 5 zusammengestellten RP-Materialien charakterisiert.

Zunächst werden die hydrophoben Eigenschaften beschrieben, die ebenfalls als Methylengruppen-Selektivität bezeichnet werden können, nach der die Retention linear mit der Anzahl der Methylengruppen der Alkylkette zunimmt. Dazu werden die Analyten Naphthalin und Acenaphthen herangezogen und deren Retentionsfaktor in die Gleichung der linearen Solvatisierungsenergie eingesetzt, um den hydrophoben Parameter v zu bestimmen. Der natürliche Logarithmus des Retentionsfaktors einer hydrophoben Substanz ist somit linear abhängig von dem hydrophoben Parameter v .

$$\ln(k) = v \cdot V - 3,068$$

mit: k = Retentionsfaktor

V = Molvolumen von Naphthalin bzw. Acenaphthen

v = hydrophober Parameter

Zur Auswertung wurden die hydrophoben Parameter für Naphthalin und Acenaphthen gemittelt und in Abhängigkeit des Phasenmaterials aufgetragen. Abbildung 37 zeigt, dass die klassische C_{18} -Phase, die ReproSil-Pur® C_{18} AQ, den größten Wert für den hydrophoben Parameter aufweist, der hydrophobe Parameter für die Reprospher C_8 -Aqua deutlich kleiner ausfällt und für die drei fluorierten

Phasen die kleinsten Werte ermittelt werden. Ebenfalls wird deutlich, dass die Fluofix® E einen höheren Wert aufweist als die Fluofix® N, was nochmals verdeutlicht, dass das Endcapping die hydrophoben Eigenschaften verstärkt, auch wenn das mit den Tensiden als Analyten nicht festgestellt werden konnte.

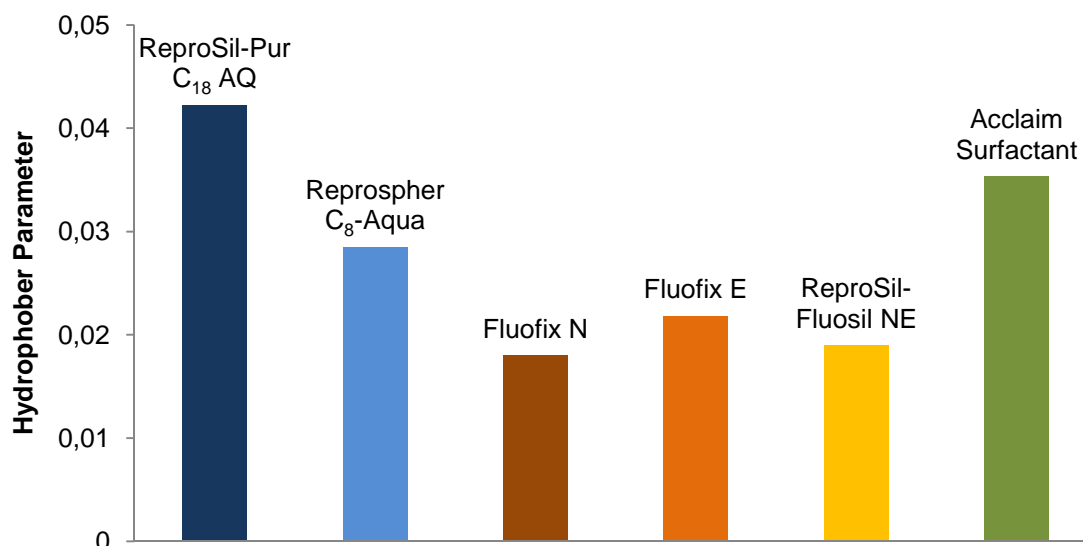


Abbildung 37: Hydrophobe Eigenschaften von sechs RP-Materialien mit dem Neue-Test bestimmt

Ein Faktor, der in der RP-LC ebenfalls von großer Bedeutung ist, ist die nicht-hydrophobe Wechselwirkung, also Wechselwirkungen der Silanolgruppen mit den Analyten, vorrangig mit Aminen. Um diesen Faktor zu bestimmen, wurde die relative Retention zwischen Amitriptylin, ein basischer sowie hydrophober Analyt, und dem neutralen Analyten Acenaphthen berechnet. Durch Subtraktion des Anteils der hydrophoben Wechselwirkung kann so die Silanol-Aktivität bei einem pH-Wert von 7 ermittelt werden.

$$S = \ln(k_{\text{Amitriptyline}}) - 0,7124 \cdot \ln(k_{\text{Acenaphthen}}) + 1,9748$$

mit: k = Retentionsfaktor

S = Silanol-Aktivität

Abbildung 38 zeigt, dass sich die Werte für die Silanol-Aktivität für alle sechs Phasen kaum unterscheiden. Auch hier kann nochmals bei Betrachtung der Fluofix®-Phasen beobachtet werden, dass ein Endcapping polare Wechselwirkungen unterdrückt. Die

Acclaim® Surfactant zeigt im Vergleich den niedrigsten Wert. NEUE et al. konnten belegen, dass Phasen mit eingebetteten polaren Gruppen in den Alkyl-Liganden eine deutlich reduzierte Silanol-Aktivität aufweisen [218], sodass auf eine eingebettete polare Gruppe geschlossen werden kann. Dies würde die erhaltene Information, dass es sich um eine mixed-mode Phase handelt, bestätigen.

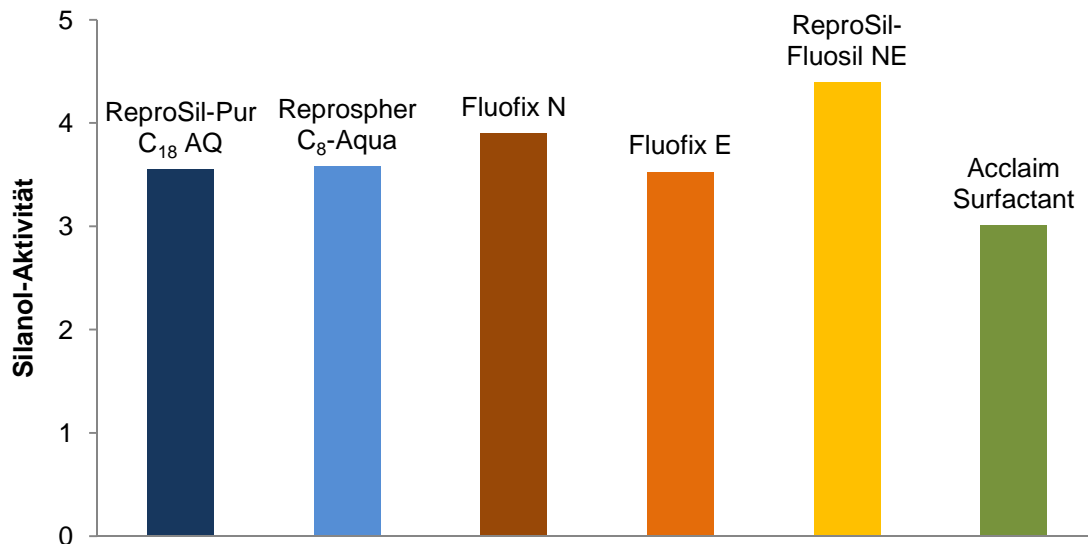


Abbildung 38: Silanol-Aktivität bei pH 7 von sechs RP-Materialien mit dem Neue-Test bestimmt

Durch Betrachtung des Retentionsfaktors des sekundären Amins Propranolol und des Retentionsfaktors des hydrophoben tertiären Amins Amitriptylin wird die Wechselwirkung einer positiv geladenen Aminogruppe mit elektronenreichen Gruppen des Phasenmaterials beschrieben. Durch Subtraktion der hydrophoben und silanolischen Wechselwirkungen kann so die erweiterte polare Selektivität ermittelt werden.

$$E = \ln(k_{\text{Propranolol}}) - 0,6815 \cdot \ln(k_{\text{Amitriptylin}})$$

mit: k = Retentionsfaktor

E = Erweiterte polare Selektivität

Die in Abbildung 39 dargestellten Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen von NEUE et al. [218]. Während für klassische C₁₈-Phasen die größten negativen Werte

ermittelt werden, weisen fluorierte Phasen, ebenso wie Cyano-Phasen, aufgrund ihrer elektronenreichen Struktur die stärkste erweiterte polare Selektivität auf.

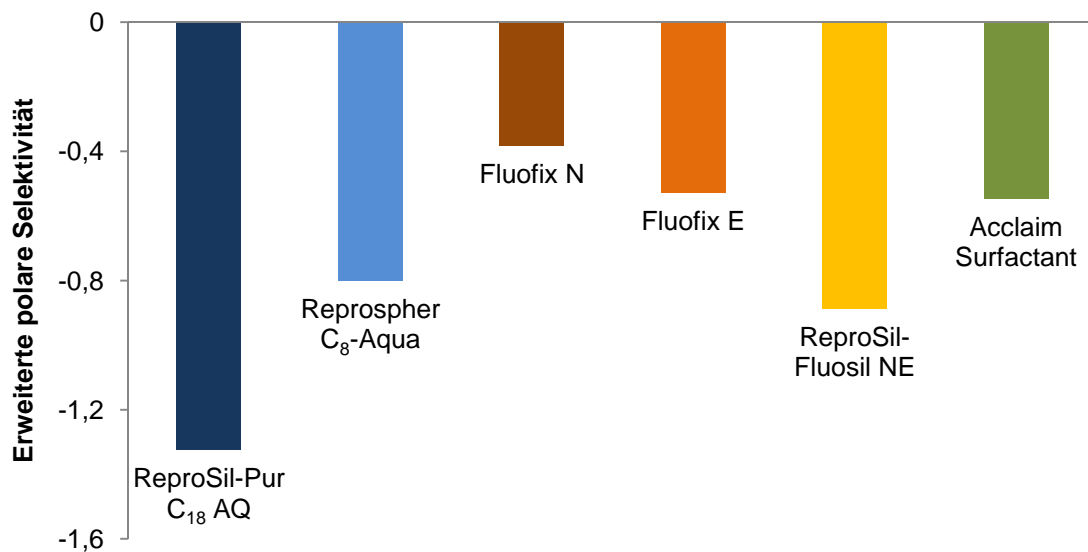


Abbildung 39: Erweiterte polare Selektivität bei pH 7 von sechs RP-Materialien mit dem Neue-Test bestimmt

Mit Butylparaben und Dipropylphthalat lassen sich schließlich Phasenmaterialien mit eingebetteten polaren Gruppen oder einem selten eingesetzten Endcapping, wie einer Aminofunktionalität, charakterisieren. Dadurch kann der hydrophile Beitrag zur polaren Selektivität, der spezifisch für Analyten mit phenolischen funktionellen Gruppen ist, definiert werden. Diese phenolische Selektivität lässt sich folgendermaßen beschreiben:

$$P = \ln(k_{\text{Butylparaben}}) - 0,8962 \cdot \ln(k_{\text{Dipropylphthalat}})$$

mit: k = Retentionsfaktor

P = Phenolische Selektivität

Abbildung 40 zeigt die ermittelten phenolischen Selektivitäten für die sechs verwendeten RP-Materialien. Es wird dabei deutlich, dass lediglich die Acclaim® Surfactant einen positiven Wert aufweist, während für alle weiteren Phasenmaterialien negative Werte ermittelt wurden. Auch NEUE et al. haben gezeigt, dass Phasenmaterialien mit eingebetteten polaren Gruppen meist zu positiven Werten für

die phenolische Selektivität führen, während für die klassischen C₈- bzw. C₁₈-Phasen negative Werte ermittelt werden [218].

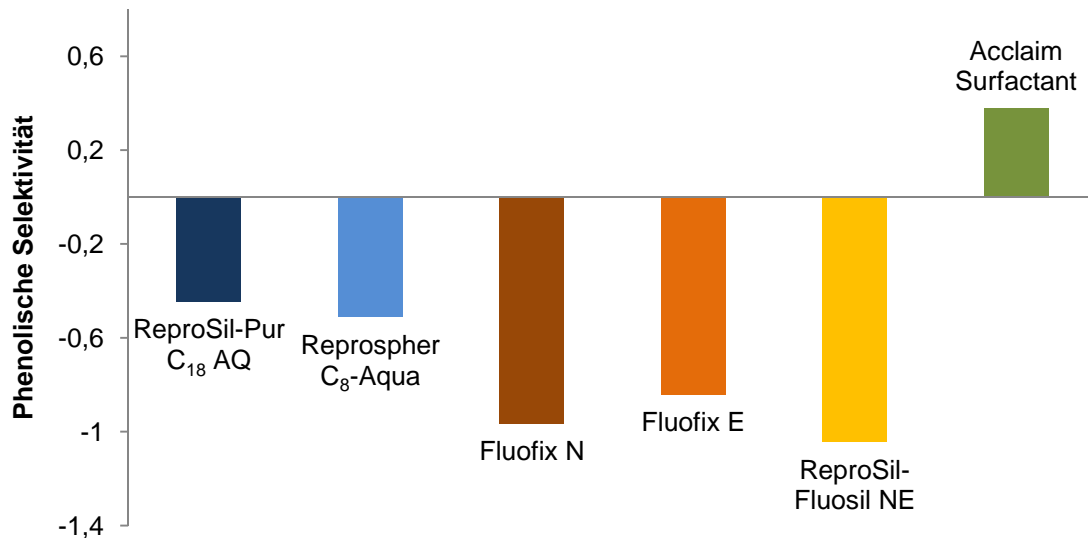


Abbildung 40: Phenolische Selektivität von sechs RP-Materialien mit dem Neue-Test bestimmt

Es lässt sich zusammenfassen, dass sich die getesteten Phasen nicht signifikant bezüglich der silanolischen Wechselwirkung unterscheiden und eine phenolische Selektivität für die gegebene Fragestellung nicht notwendig ist.

In dem zweidimensionalen chromatographischen Trennsystem soll in einer Dimension eine HILIC-Phase eingesetzt werden, um eine Trennung aufgrund polarer Wechselwirkungen zu erreichen, weshalb für die andere Dimension ein Phasenmaterial bevorzugt wird, welches einen geringen Wert für die erweiterte Polarität sowie einen hohen Wert für den hydrophoben Parameter aufweist. Hier stechen vor allem die beiden klassischen Umkehrphasen, die ReproSil-Pur® C₁₈ AQ und die Reprospher 100 C₈-Aqua, hervor. Da das zuvor durchgeführte Screening der Phasenmaterialien hinsichtlich des Retentionsverhaltens der ausgewählten Tenside allerdings für die Reprospher 100 C₈-Aqua zu einer optimalen Trennung der Alkylhomologen geführt hat, wurde diese Phase für den zweidimensionalen Versuchsaufbau ausgewählt.

4.4 Massenspektrometrische Detektion

4.4.1 Ionisation mittels APCI

Für die bisher durchgeführten Trennungen wurde zur Detektion ein Lichtstredetektor verwendet. Da eine Zuordnung der Signale allerdings nur über einen Vergleich der Retentionszeiten mit Standardsubstanzen möglich ist, stößt dieser Detektor bei hochkomplexen Proben schnell an seine Grenzen. Daher wurde versucht, ein Massenspektrometer zur Detektion zu implementieren. Um die Analyten der massenspektrometrischen Detektion zugänglich zu machen, müssen diese allerdings zunächst ionisiert werden.

In Abschnitt 2.4.3 wurde bereits erläutert, dass sich die ESI und die APCI besonders zur Ionisation von polaren bzw. mittelpolaren Substanzen eignen [93]. Daher soll die Eignung der beiden Ionisationsarten sowohl im positiven als auch im negativen Ionisationsmodus für die Detektion von Tensiden untersucht werden. Für dieses Screening wurden die einzelnen Analyten, welche in einer Konzentration von 1 µg/mL vorlagen, über eine Fließinjektion ins Massenspektrometer geleitet und die erhaltenen Signale qualitativ bewertet (für Details s. Abschnitt 7.6). Dazu wurde ein QTOF Ultima™ API von Micromass in einem Massenbereich von 100 – 1000 m/z verwendet.

Die FAS und die FAES tragen aufgrund der Sulfat-Funktionalität bereits eine negative Ladung, während die FAEO und die AG nicht geladen sind. So müssen also zur Ionisation der FAS und der FAES im positiven Modus zwei Ladungen an das Molekül angebracht werden, während bei den FAEO oder den AG ein Ladungsträger genügt.

Zunächst wurde die Ionisation mittels APCI-positiv durchgeführt und die Ionisationsausbeuten für FAS, FAES, FAEO, AG und die Betaine gegenübergestellt. Wie aus Abbildung 41 hervorgeht, konnten lediglich für die FAEO und die Betaine auswertbare Signale erhalten werden. FAS, FAES und AG liefern keine Signale, die

Ergebnisse und Diskussion

den Analyten zugeordnet werden können. Im Falle der FAES ist zwar eine EO-Verteilung zu erkennen, jedoch handelt es sich hier vermutlich um ein Fragment, welches jedoch nicht zugeordnet werden kann. Außerdem werden lediglich Signale mit einer sehr geringen Intensität erhalten. Die Signale mit m/z 113, 127, 283 und 392 stammen aus dem Lösungsmittel.

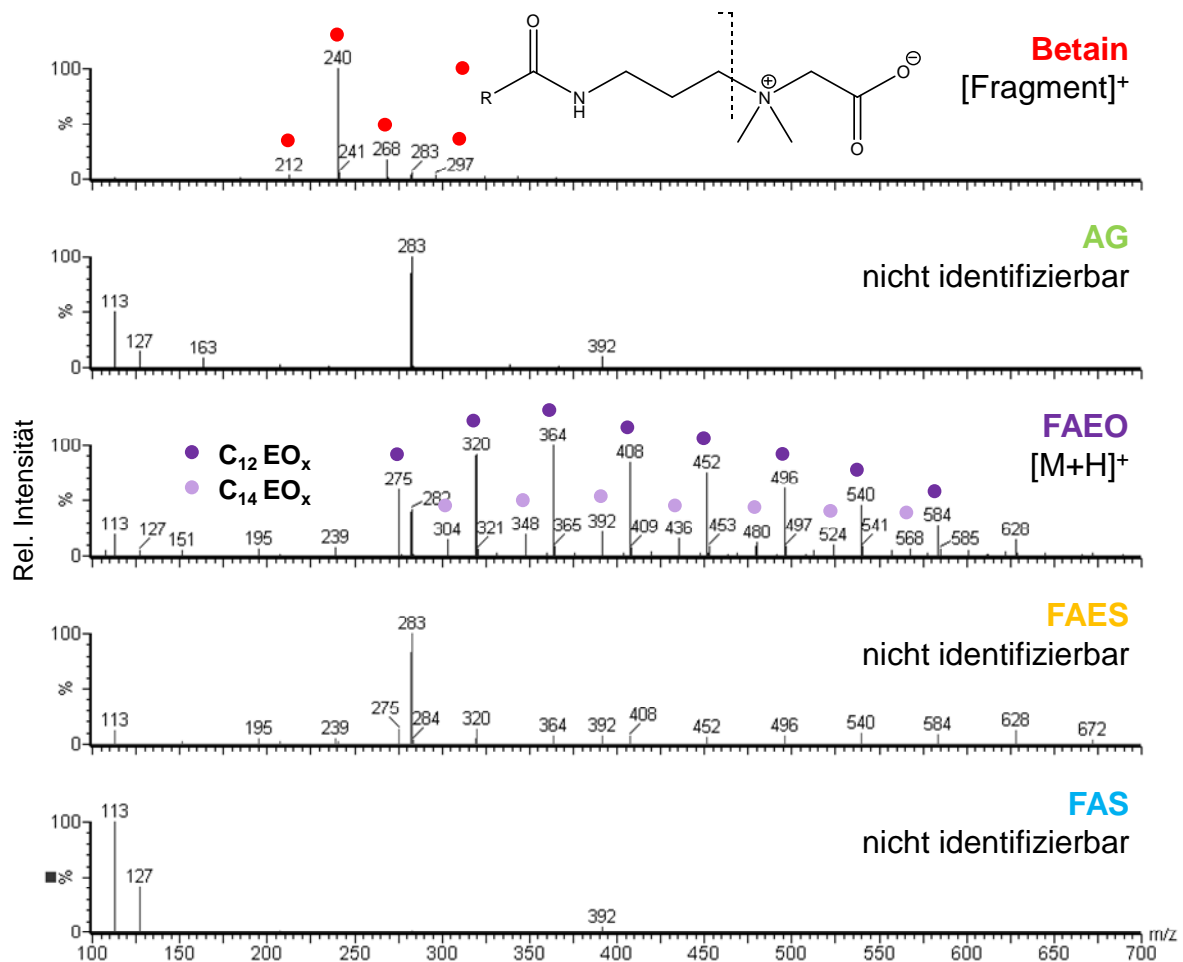


Abbildung 41: Massenspektren der fünf Tenside; Ionisation mittels APCI-positiv

Für die FAEO wird bei der Ionisation mittels APCI-positiv das [M+H]⁺-Quasimolekülion erhalten. In Abbildung 41 lassen sich eindeutig die beiden Verteilungen der EO-Homologen mit einer Alkylkettenlänge von 12 bzw. 14 Kohlenstoffatomen zuordnen. Im Falle der Betaine wird ein Fragment detektiert, welches durch Bindungsbruch an dem quartären Amin entstanden ist. Es können alle Alkylkettenhomologen eindeutig zugeordnet werden.

Für die Alkylkettenverteilung werden im Massenspektrum Signale erwartet, bei welchen sich das m/z -Verhältnis um 28 unterscheidet, während für die EO-Homologen ein Abstand von 44 m/z erwartet wird. Da in den in diesem Abschnitt gezeigten Abbildungen lediglich Nominalmassen dargestellt sind, ist bei einigen Signalen eine Abweichung von 1 m/z zu beobachten.

Unter Verwendung von APCI im negativen Ionisationsmodus konnte gezeigt werden, dass Signale für FAS, FAES, FAEO sowie AG erhalten werden (Abbildung 42). Für die Betaine konnten keine Signale zugeordnet werden. Die Signale mit m/z 283, 312, 316 und 369 stammen aus dem Lösungsmittel.

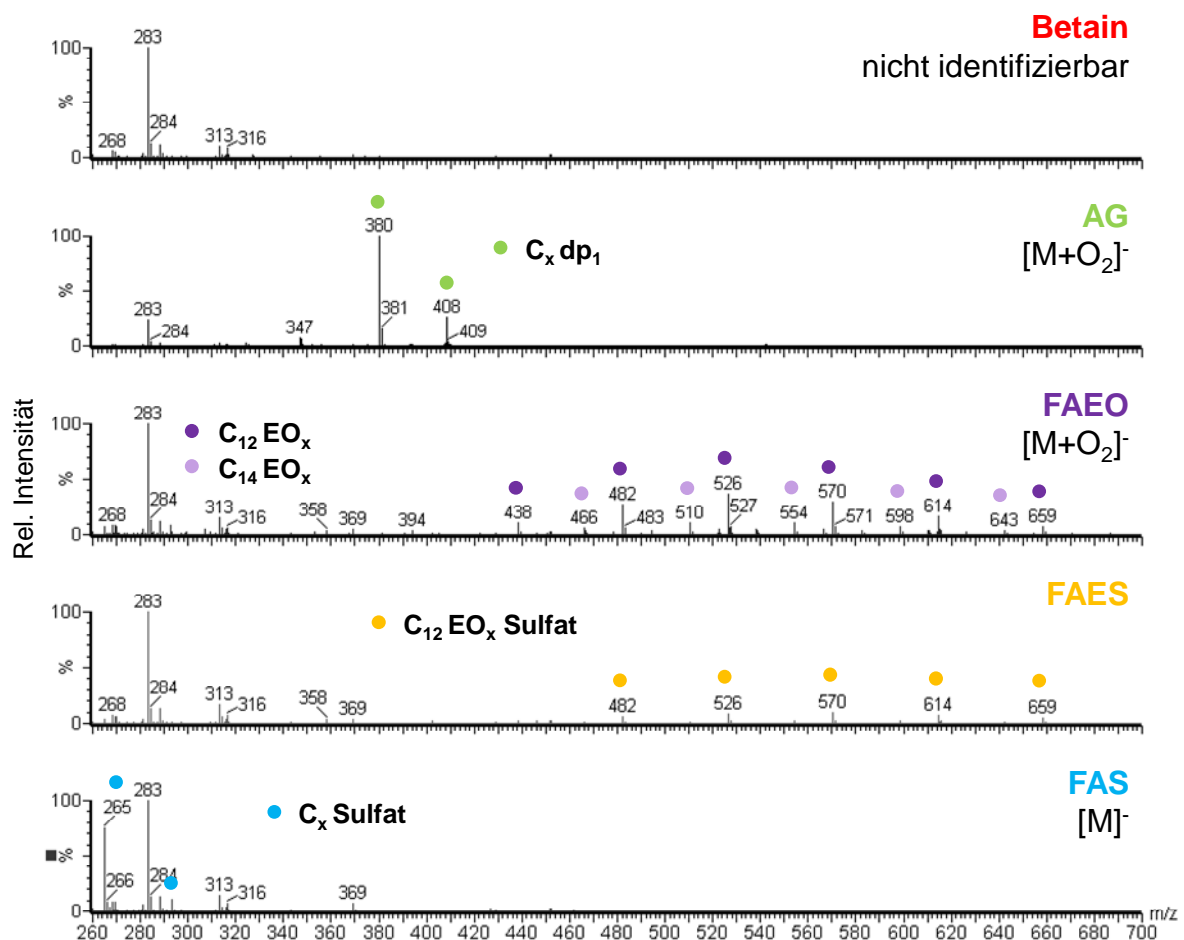


Abbildung 42: Massenspektren der fünf Tenside; Ionisation mittels APCI-negativ

Die FAS konnte hier als $[M]^-$ -Spezies detektiert werden, während für die FAEO und die AG Signale erhalten werden, die nicht den Molekülonen entsprechen. Es kommt

zu einer Zunahme des m/z -Verhältnisses von 32, was einer Anlagerung von O_2^- entspricht und für den negativen Ionisationsmodus bei der APCI literaturbekannt ist [221]. Für die FAES wurden Signale mit dem gleichen m/z wie für die FAEO erhalten. Dies spricht für eine Abspaltung der Sulfonatgruppe der FAES während des Ionisationsprozesses, wodurch die Moleküle ein Äquivalent zu den entsprechenden FAEO darstellen.

Es lässt sich zusammenfassen, dass weder APCI-positiv noch APCI-negativ als Ionisationsmethode zu zufriedenstellenden Ergebnissen geführt hat. Bei beiden Methoden gab es Substanzen, die sich gar nicht ionisieren und folglich detektieren ließen, was somit eine simultane Bestimmung der fünf Tensidklassen ausschließt.

4.4.2 Ionisation mittels ESI

Es wurde nun die Ionisation der fünf Tensidklassen mittels Elektrospray im positiven sowie im negativen Ionisationsmodus untersucht.

Abbildung 43 zeigt die Massenspektren der fünf Tenside, welche bei einer Ionisation mit ESI-positiv erhalten wurden. Daraus wird ersichtlich, dass alle Substanzklassen mit dieser Methode massenspektrometrisch detektiert und eindeutig zugeordnet werden können. Die Tenside werden allerdings als unterschiedliche Addukte detektiert. Im Falle der anionischen FAS werden jeweils ein Proton und ein Ammoniumion angelagert, während bei den ebenfalls anionisch geladenen FAES ein Proton und zwei Ammoniumionen angelagert werden, sodass das Molekülion zweifach geladen ist. Die nichtionischen FAEO und AG bilden $[M+NH_4]^+$ -Addukte aus, während die Betaine aufgrund ihrer basischen Gruppe protoniert werden.

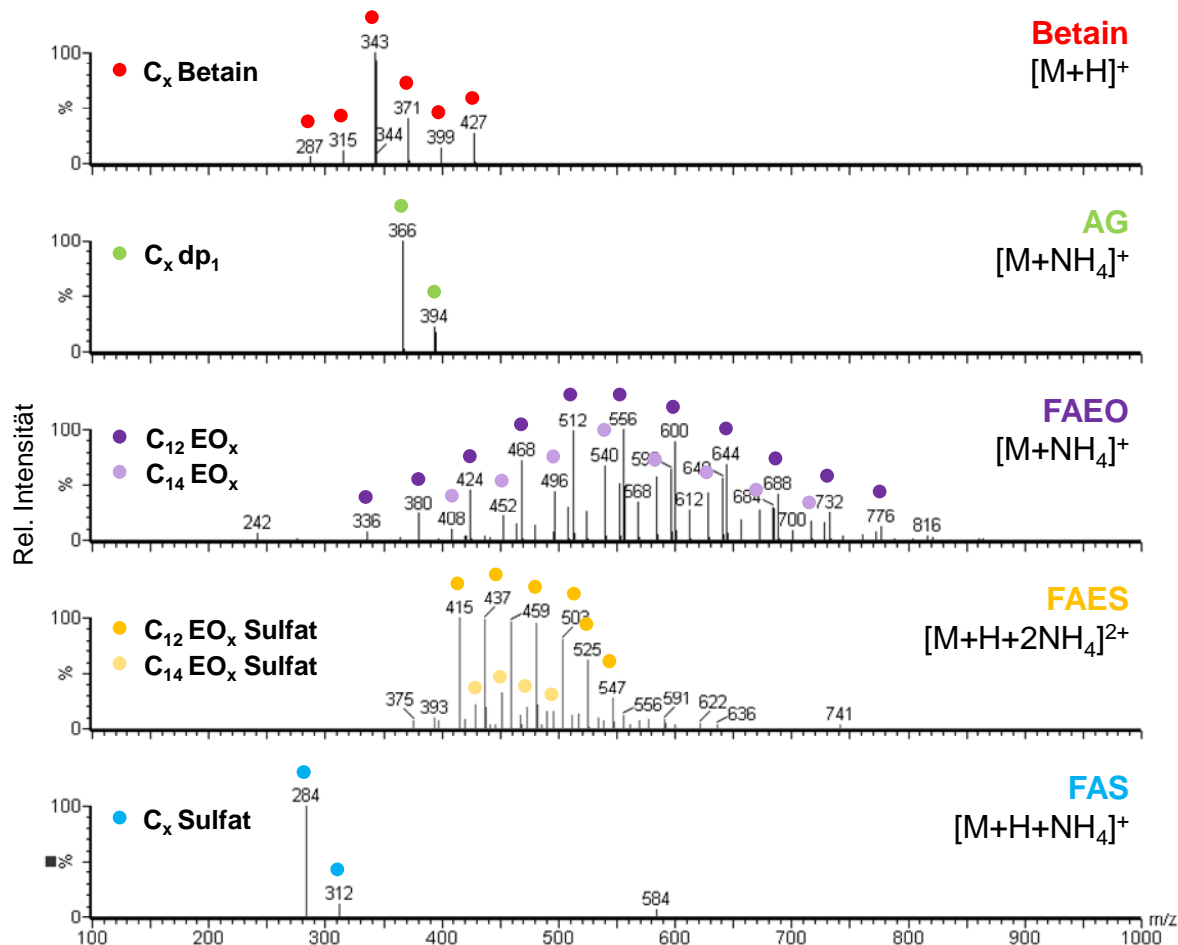


Abbildung 43: Massenspektren der fünf Tenside; Ionisation mittels ESI-positiv

Die Ionisation mit ESI-negativ zeigt hingegen, dass nicht alle Tenside ausreichend ionisiert werden können (Abbildung 44). Für die AG und die FAEO werden keine ausgeprägten Signale erhalten, die den Analyten eindeutig zugeordnet werden können. Während die FAS und FAES jeweils als Molekülonen detektiert werden können, findet bei den Betainen eine Adduktbildung mit Chloridionen statt. Dies kann sowohl durch das ermittelte m/z -Verhältnis als auch durch das charakteristische Isotopenverhältnis des Chlors bestätigt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Ionisation mit ESI-negativ nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen bezüglich einer simultanen Detektion der fünf Tensidklassen führt. Allerdings konnten unter Verwendung von ESI-positiv alle Substanzklassen ionisiert und damit detektiert werden, sodass sich diese Methode eignet, um die ausgewählten Tenside simultan zu identifizieren.

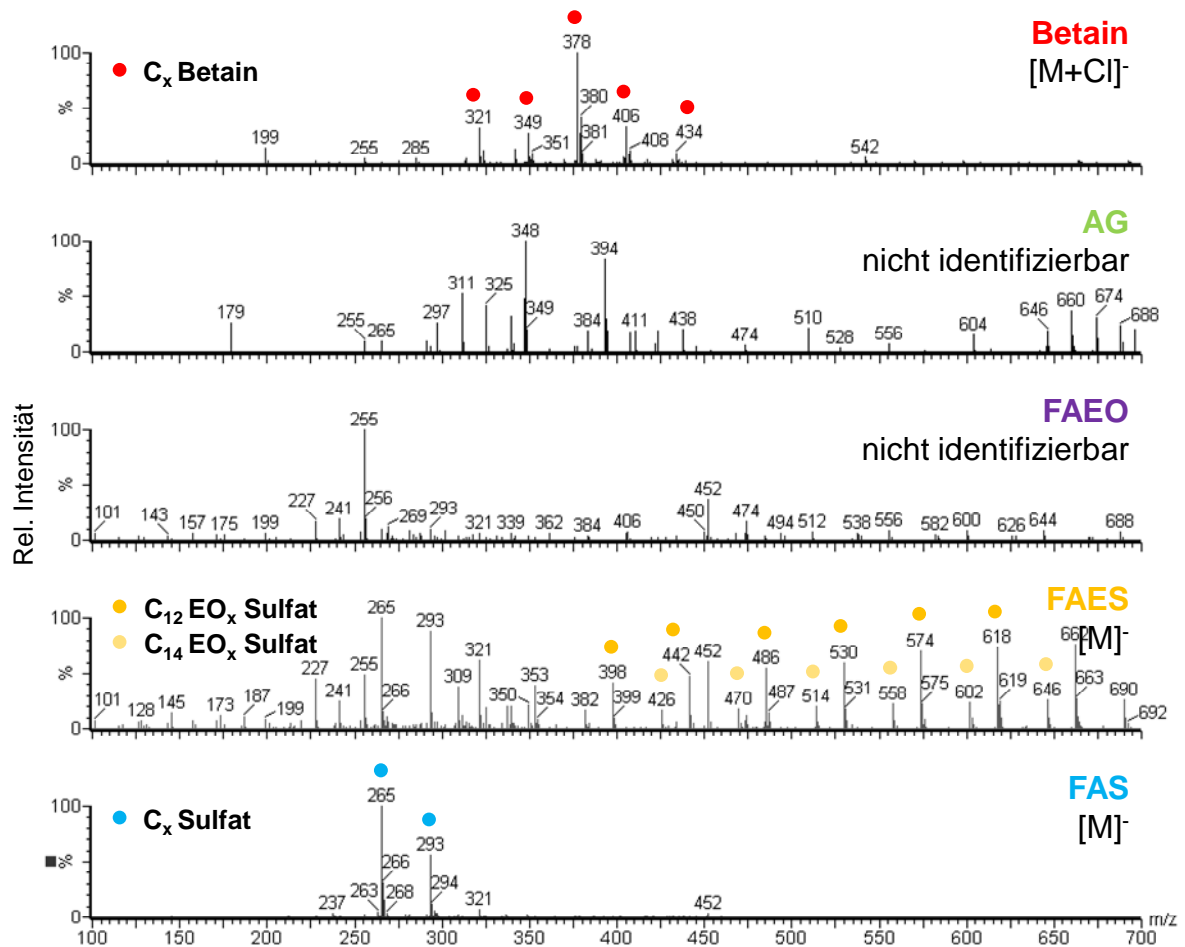


Abbildung 44: Massenspektren der fünf Tenside; Ionisation mittels ESI-negativ

Während der Analysen wurde deutlich, dass sich die Ionisationsausbeuten für die Substanzen zum Teil stark unterscheiden. So lieferte bei gleichen Konzentrationen die FAS die geringste Ionisationsausbeute, während die Signale der Betaine und der FAEO am stärksten ausfielen. Daher wurde für die weiteren Untersuchungen eine Mischung hergestellt, in der die Tensidklassen in unterschiedlichen Konzentrationen vorlagen, um so für alle Substanzen vergleichbare Signalintensitäten zu erhalten. Die einzelnen Konzentrationen liegen in einem Bereich zwischen 0,04 und 0,4 mg/mL und können Tabelle 16 in Abschnitt 7.1.1 entnommen werden.

4.5 Comprehensive zweidimensionale LC von Tensidgemischen

4.5.1 Separate Optimierung der beiden Trenndimensionen

Es wurde bereits erläutert, dass in der comprehensiven zweidimensionalen Flüssigchromatographie (LCxLC) für eine Trennung mit maximaler Auflösung zwei orthogonale Systeme benötigt werden, also die Trennungen in erster und zweiter Dimension auf unterschiedlichen Mechanismen basieren sollten. In Abschnitt 4.3 wurde gezeigt, dass die Reprospher 100 C₈-Aqua ein zur ZIC[®]-HILIC weitestgehend orthogonales Phasenmaterial darstellt. Somit wurden diese beiden Phasen für alle zweidimensionalen Trennungen verwendet.

Bei der LCxLC wird in der ersten Dimension eine sehr langsame Trennung mit geringer Flussrate durchgeführt, um einerseits die Sammelvolumina möglichst klein zu halten und andererseits jedes Signal in möglichst viele Fraktionen zu unterteilen. In der zweiten Dimension wiederum muss die Trennung in sehr kurzer Zeit erfolgen, da die gesammelten Fraktionen im Abstand der Modulationszeit, welche meist im Bereich von ein bis zwei Minuten liegt, auf die zweite Dimension injiziert werden. Um diese schnelle Trennung zu gewährleisten, werden schnelle Gradienten mit einer hohen Flussrate verwendet. Da die HILIC-Phase im Anschluss an jede Trennung eine gewisse Zeit zur Equilibrierung des Materials benötigt und die Umkehrphase eine deutlich robustere Phase darstellt, die mit hohen Flussraten betrieben werden kann und großen Druckunterschieden stand hält, wurde die ZIC[®]-HILIC als erste und die Reprospher C₈-Aqua als zweite Dimension verwendet.

In der ersten Dimension wurde die ZIC[®]-HILIC mit einer Dimension von 250 x 2,1 mm und einem durchschnittlichen Partikeldurchmesser von 5 µm eingesetzt. Der zuvor für das Tensidgemisch verwendete Gradient wurde nochmals hinsichtlich der Steigung optimiert, um mit einer Flussrate von 0,025 mL/min praktikable Analysenzeiten zu generieren. Der optimierte Gradient wurde nun von 97% ACN auf 50% ACN mit einer Gesamtanalysenzeit von 140 Minuten betrieben.

Details zu den verwendeten Bedingungen sind in Tabelle 25 in Abschnitt 7.4 zusammengefasst.

Für die zweite Dimension wurde die Reprospher C₈-Aqua mit einer Dimension von 50 x 4,6 mm und einem durchschnittlichen Partikeldurchmesser von 5 µm verwendet. Aufgrund dessen, dass die Modulationszeit zunächst 2 Minuten betrug, wurde der zuvor optimierte Gradient für RP-Trennungen auf eine Gesamtdauer von 2 Minuten inklusive Rückequilibrierung angepasst und mit 3 mL/min betrieben.

4.5.2 Comprehensive zweidimensionale Trennung

In beiden Dimensionen sollte die mobile Phase im Gradientenmodus gefördert werden, weshalb ein HPLC-System bestehend aus vier Pumpen, oder zwei binären Pumpen, benötigt wurde. Für die Trennung in der ersten Dimension wurde eine Waters 2690 Alliance eingesetzt und über eine etwa 1,5 m lange PEEK-Kapillare mit der Injektor-Einheit einer Shimadzu Prominence LC-20AD XR HPLC-Anlage und einem Rheodyne 10-Wege-Ventil als Interface verbunden. Als Detektor wurde das MicroMass QTOF Ultima™ API, betrieben im ESI-positiv-Modus, eingesetzt. An das 10-Wege-Ventil waren zwei Sammelschleifen mit je einem Volumen von 50 µL gekoppelt. Die Modulationszeit betrug zunächst 2 Minuten, was bei einer Flussrate von 0,025 mL/min in der ersten Dimension einem Sammelvolumen von 50 µL entspricht.

Abbildung 45 zeigt die zweidimensionale Spot-Darstellung des Chromatogramms der LCxLC-Analyse des Standardgemisches der Tenside (Tabelle 16) unter Verwendung der zuvor beschriebenen Phasen und optimierten Parameter. Die Zeit der x-Achse stellt dabei die Retentionszeit in der ersten Dimension in Minuten dar, während die Zeit auf der y-Achse die Retentionszeit in der zweiten Dimension in Sekunden beschreibt. Die Peakintensitäten werden über die Farbintensitäten der Spots veranschaulicht.

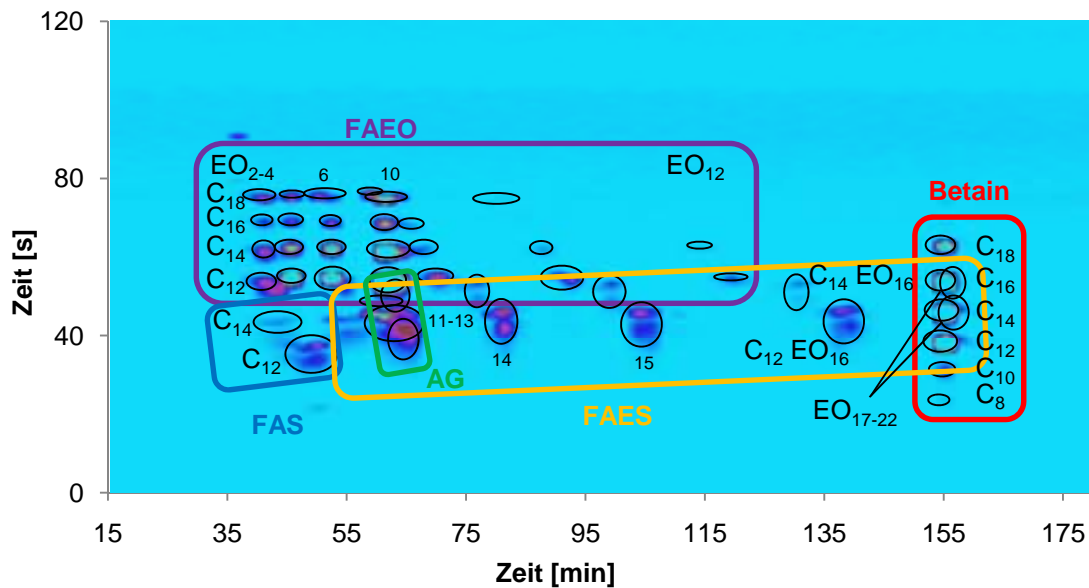


Abbildung 45: LCxLC-Analyse des Tensidgemisches; 1. Dim.: ZIC[®]-HILIC, 250 x 2,1 mm, 2. Dim.: Reprospher C₈-Aqua, 50 x 4,6 mm; Modulation: 2 min; System: Waters/Shimadzu

Es wird deutlich, dass alle Substanzen sowohl aufgrund ihrer Alkylkettenlänge als auch nach EO-Homologen getrennt werden können. Allerdings ist die Trennung nach Substanzklassen an einigen Stellen nicht optimal. So konnten beispielsweise die Fettalkoholethoxylate, welche durch die violette Box veranschaulicht werden, in der ersten Dimension nach EO-Einheiten und in der zweiten Dimension zusätzlich nach Alkylkettenlänge getrennt werden. Die Alkylketten sind dabei alle basisliniengetreunt, während einige EO-Homologen, vor allem im Bereich von 7 bis 10 EO-Einheiten, coeluieren. Auch für die Betaine, welche in der roten Box dargestellt sind, konnte eine Basislinientrennung hinsichtlich der Alkylkettenlänge erreicht werden. Allerdings wird ebenfalls deutlich, dass im Bereich zwischen 50 und 60 Minuten sowie zwischen 130 und 145 Minuten in der ersten Dimension die Substanzen nicht ausreichend getrennt werden konnten, was mit einem nicht optimal eingestellten Gradienten begründet werden kann.

Des Weiteren weisen die anionischen Tenside keine runden Spots auf, sondern treten eher als nicht gaußförmige Signale in der zweiten Dimension in Erscheinung. Aufgrund der erschwerten Ionisation der anionischen Tenside mit ESI-positiv liegen

die FAS und die FAES in deutlich höheren Konzentration im Vergleich zu den anderen Tensidklassen vor. Bereits die eindimensionale Analyse mit der hier gewählten Konzentration hat ungleichmäßige Signale gezeigt, was eine Überladung der Säule oder eine zu hohe Konzentration für einen stabilen Ionisationsprozess vermuten lässt, sodass eine Optimierung der einzelnen Konzentrationen in der Mischung vorgenommen werden sollte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die verwendete Säulenkombination ein orthogonales System darstellt, mit welchem die Tenside sowohl nach der Alkylkettenlängen- als auch nach der EO-Verteilung getrennt werden können. Ebenfalls konnte zum Teil eine Trennung nach Substanzklasse erreicht werden, allerdings soll diesbezüglich nochmals eine Optimierung des Gradienten in der ersten Dimension vorgenommen werden. Da außerdem nicht alle EO-Homologen basisliniengetrennt sind, kann auch an dieser Stelle noch eine Optimierung erfolgen. Möglicherweise sind zwar alle Substanzen in der ersten Dimension getrennt worden, werden allerdings aufgrund der Modulationszeit von 2 Minuten innerhalb der Sammelschleife wieder vermischt. Das Verkürzen der Modulationszeit und somit das Sammeln eines geringeren Volumens sollte dieses Problem lösen.

4.5.3 Optimierung in der LCxLC

In der LCxLC kann an vielen Stellen eine Optimierung der Trennung vorgenommen werden. So lassen sich zunächst unterschiedliche Phasenmaterialien in der ersten und zweiten Dimension kombinieren. Auch die gewählte Säulendimension sowie der Partikeldurchmesser beeinflussen die Güte der Trennung. COHEN und SCHURE haben typische Parameter im Bezug auf die Trennsäulen und Beispiele für eine mögliche Methodenentwicklung zusammengestellt [187]. Während bei einer langen Säule zwar die Trennstufenzahl erhöht und somit die Trennung verbessert wird, geht dies allerdings auch mit einer längeren Analysenzeit einher, sodass vor allem in

der zweiten Dimension ein Mittelmaß zwischen der Güte der Auflösung und der Dauer der Trennung gefunden werden muss.

Des Weiteren können die mobile Phase, der verwendete Gradient sowie die Flussrate in der ersten und auch in der zweiten Dimension variiert werden. So wird in der zweiten Dimension eine sehr schnelle Trennung benötigt, was durch kurze Säulen, steile Gradienten und eine hohe Flussrate erhalten werden kann. Gleichzeitig kommt es dabei allerdings zu enormen Druckschwankungen von teilweise über 100 Bar innerhalb einer Modulation, wodurch die Lebensdauer der Säulen in der zweiten Dimension beeinflusst wird.

Ein weiterer Parameter zur Optimierung der Trennung stellt die Dauer einer Modulation dar. Das Verkürzen der Modulationszeit führt zu geringeren Sammelvolumina und so vermutlich zu einer verbesserten Trennung aufgrund des geringeren Injektionsvolumens in der zweiten Dimension. Außerdem kann eine Vermischung innerhalb der Sammelschleifen von Substanzen, die in der ersten Dimension möglicherweise getrennt wurden, durch kurze Modulationszeiten verhindert werden.

Da die verwendeten Phasen bereits ein orthogonales System darstellen, wurden diese nicht variiert. Auch die Dimension der HILIC-Phase wurde konstant gehalten. Stattdessen wurde zunächst die Modulationszeit von zwei Minuten auf eine Minute verringert. Dies führt bei einer konstanten Flussrate in der ersten Dimension zu einem Sammelvolumen von 25 μL . Aufgrund der kürzeren Modulationszeit musste der Gradient und die Säulenlänge in der zweiten Dimension angepasst werden, da die Analysenzeit dort nun lediglich eine Minute betragen durfte. So wurde die Säulenlänge von zuvor 50 mm auf nun 30 mm verringert und der optimierte Gradient von 50% MeOH auf 95% und zurück auf 50% innerhalb von 60 Sekunden betrieben. Details sind in Tabelle 26 in Abschnitt 7.4 zusammengestellt.

Aus Abbildung 45 wird deutlich, dass die Trennung in der ersten Dimension an einigen Stellen nicht optimal verlief, weshalb ein flacherer Gradient von 97% ACN auf nun lediglich 70% ACN mit einem Plateau bei 85% ACN in insgesamt 180 Minuten inklusive Rückequilibrierung in der ersten Dimension verwendet wurde. Diese Änderung führt zwar zu einer Verlängerung der Analysenzeit, sollte allerdings in einer höheren Trennleistung resultieren.

Schließlich wurden die Konzentrationen der einzelnen Tenside im Gemisch verringert, um zum einen die Ionensuppression zu reduzieren und zum anderen eine verbesserte Peakform zu gewährleisten. Die einzelnen Tensidklassen lagen nun in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,01 und 0,2 mg/mL in der Lösung des Tensidgemisches vor (Tabelle 17, Abschnitt 7.1.1).

Abbildung 46 zeigt, dass der gewählte Gradient in der ersten Dimension nun zu einer Trennung nach Substanzklasse für nahezu alle in der Mischung enthaltenen Tenside führt. Lediglich die Alkylpolyglucoside eluieren zeitgleich mit den Fettalkoholethersulfaten. Durch eine massenspektrometrische Detektion lassen sich die Signale allerdings leicht zuordnen. Es wird deutlich, dass die Fettalkoholethersulfate mit einer Alkylkettenlänge von 12 Kohlenstoffatomen bis zu einem EO-Grad von 23 getrennt werden können. Dies wird zum einen durch den optimierten Gradienten in der ersten Dimension, aber auch durch die verkürzte Modulationszeit von nun einer Minute erreicht. Aus Abbildung 46 wird allerdings ebenfalls ersichtlich, dass für die Fettalkoholethoxylate deutlich weniger Signale erhalten werden, als es bei der Analyse aus Abbildung 45 der Fall war. Die Konzentration der FAEO betrug hier mit 0,01 mg/mL lediglich 25% der zuvor gewählten Konzentration und war zu gering, um alle Alkyl- und EO-Homologen zu detektieren.

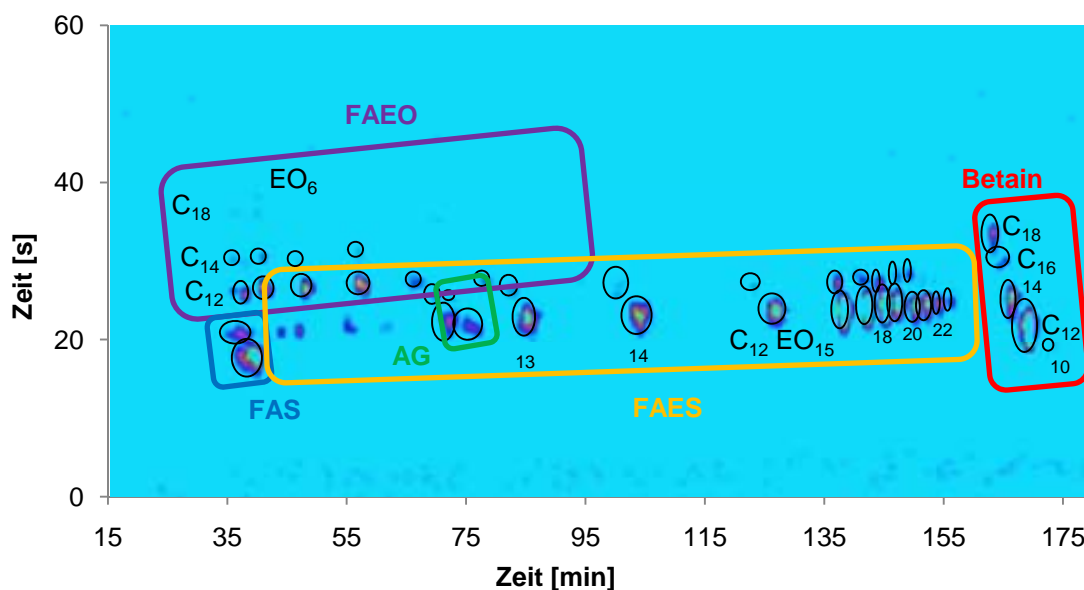


Abbildung 46: LCxLC-Analyse des Tensidgemisches; 1. Dim.: ZIC®-HILIC, 250 x 2,1 mm, 2. Dim.: Reprospher C₈-Aqua, 30 x 4,6 mm; Modulation: 1 min; System: Waters/Shimadzu

Eine Optimierung hinsichtlich der Modulationszeit sowie des Gradienten in der ersten Dimension führte zu einer verbesserten Trennung nach Tensidklasse und nach EO-Homologen. Die kürzere Säule und der schnellere Gradient in der zweiten Dimension haben die Trennung nach der Alkylkettenlänge nicht negativ beeinflusst.

4.5.4 Kompatibilität der Methode mit anderen Systemen

Im Folgenden wurde versucht, die entwickelte Methode auf ein anderes System zu übertragen, um so die Reproduzierbarkeit der Analysen zu bestätigen. Dazu wurde eine Agilent 1290 Infinity UHPLC-Anlage mit zwei binären Pumpen sowie ein Agilent 6538 Ultra High Definition Accurate-Mass QTOF verwendet (Agilent-System 1). Die zuvor optimierten Parameter wurden konstant gehalten, lediglich die Konzentration der FAEO wurde auf 0,06 mg/mL erhöht (Tabelle 18, Abschnitt 7.1.1 und Tabelle 27, Abschnitt 7.4).

Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 47 ist die Analyse, welche mit dem Agilent-System 1 durchgeführt wurde, dargestellt. Es wird zunächst deutlich, dass sich trotz unveränderter Parameter die Analysenzeit von 170 Minuten auf 120 Minuten verkürzt. Dies kann mit einer geringfügig unterschiedlichen Pumpleistung, einer unterschiedlich effektiven Eluentenvermischung, einem kleineren Totvolumen und deutlich kürzeren Kapillaren begründet werden. Aufgrund der sehr langen Analysenzeit von über zwei Stunden können bereits kleine Unterschiede zu einer deutlich unterschiedlichen Retentionszeit führen. Während sich die Fettalkoholsulfate, welche die geringste Retention erfahren, lediglich um 5 Minuten in der Retentionszeit unterscheiden, eluiert das C₁₀-Betain, welches eine hohe Retentionszeit aufweist, unter Verwendung des Agilent-Systems etwa 60 Minuten früher. Dies zeigt, dass die geringfügigen Unterschiede vor allem bei einer hohen Retentionszeit stark ins Gewicht fallen.

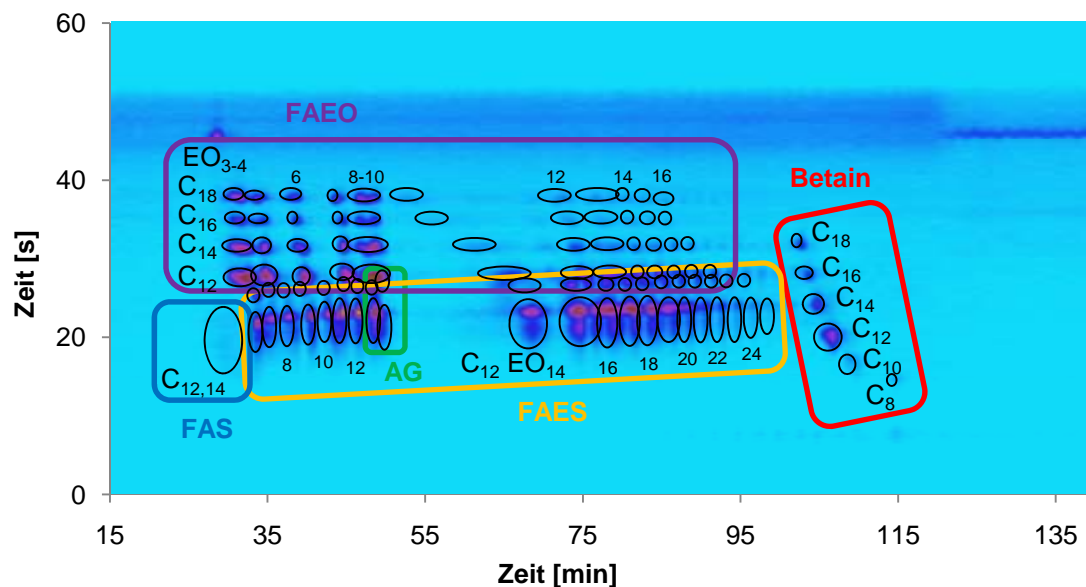


Abbildung 47: LCxLC-Analyse des Tensidgemisches; 1. Dim.: ZIC[®]-HILIC, 250 x 2,1 mm, 2. Dim.: Reprospher C₈-Aqua, 30 x 4,6 mm; Modulation: 1 min; System: Agilent 1

Die entwickelte Methode ist hinsichtlich der Trennleistung auf andere Systeme übertragbar, allerdings kann unter Verwendung des Agilent-Systems zusätzlich noch eine Steigerung der Empfindlichkeit beobachtet werden. Während das Signal des C₈-Betains bei der optimierten Analyse mit dem Waters/Shimadzu-System kaum

detektiert werden konnte, kann es mit dem moderneren und deutlich empfindlicheren QTOF des Herstellers Agilent Technologies als Spot in der zweidimensionalen Darstellung detektiert werden. Des Weiteren wird ersichtlich, dass die Peakform verbessert wurde. Dies lässt sich zum einen wiederum mit geringeren Totvolumina begründen, resultiert aber außerdem daraus, dass die Datenaufnahmerate hier bei 5 Hz lag, während das MicroMass QTOF Ultima™ API maximal mit einer Rate von 2 Hz Daten aufzeichnen kann. Da die Signale in der zweiten Dimension teilweise Peakbreiten von etwa ein bis zwei Sekunden aufweisen, ist es enorm wichtig, eine hohe Aufnahmerate zu verwenden, um genügend Datenpunkte zu erhalten. Eine Datenaufnahmerate von mehr als 5 Hz resultierte aufgrund der Hochauflösung allerdings in enorm großen Datensätzen, welche schnell an die Grenzen der Speicherkapazität der Recheneinheit stießen, sodass diese im Folgenden nicht weiter erhöht wurde.

Die entwickelte Methode wurde außerdem auf ein weiteres Agilent-System übertragen. Hier diente ein Agilent Infinity 1290 LC/MS System mit einer zusätzlichen Infinity 1260 Binary Pump für den Gradienten der ersten Dimension als HPLC-Anlage und ein Agilent 6530 Accurate-Mass QTOF als Detektor (Agilent-System 2). Alle zuvor beschriebenen Parameter wurden zunächst konstant gehalten (Tabelle 19, Abschnitt 7.1.1 und Tabelle 27, Abschnitt 7.4). Ein Vergleich von Abbildung 48 mit Abbildung 47 zeigt auch hier, dass die Retentionszeiten in der ersten Dimension von System zu System nicht reproduzierbar sind. Zwar werden hier HPLC-Systeme vom gleichen Hersteller verwendet, dennoch ist die Leistung der einzelnen Geräte geringfügig unterschiedlich, was vor allem bei langen Analysendauern mit geringen Flussraten ins Gewicht fällt. Während die FAS mit beiden Systemen eine Retentionszeit von etwa 28 Minuten aufweisen, eluiert das C₈-Betain mit dem Agilent-System 2 etwa 30 Minuten später als mit dem Agilent-System 1. An dieser Stelle muss außerdem berücksichtigt werden, dass Agilent-HPLC-Pumpen zwar mit Flussraten von 25 µL/min betrieben werden können, vom

Ergebnisse und Diskussion

Hersteller allerdings erst ab 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ reproduzierbare Flussraten garantiert werden.

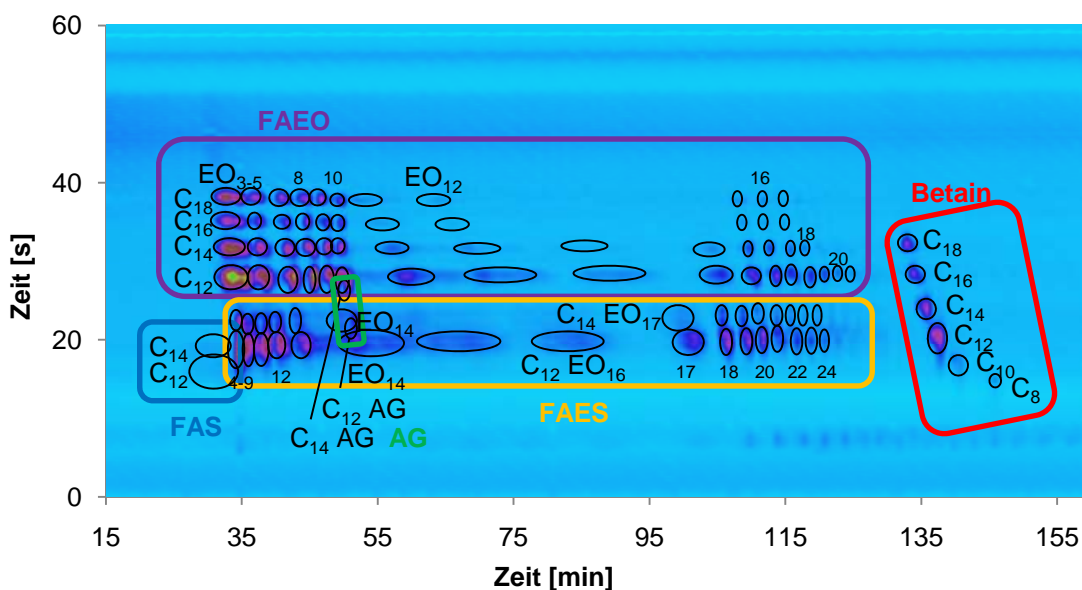


Abbildung 48: LCxLC-Analyse des Tensidgemisches; 1. Dim.: ZIC®-HILIC, 250 x 2,1 mm, 2. Dim.: Reprospher C₈-Aqua, 30 x 4,6 mm; Modulation: 1 min; System: Agilent 2

Alle weiteren Optimierungsschritte sowie die Analyse von Realproben sowohl für Home Care als auch für Personal Care Produkte wurden unter Verwendung des Agilent-Systems 2 durchgeführt. Lediglich die Analysen zur Präzision von Retentionszeit und Peakvolumen, welche in Abschnitt 4.7 näher beschrieben werden, wurden unter Verwendung des Agilent-Systems 1 durchgeführt.

Um vor allem die einzelnen EO-Homologen als scharfe Signale und definierte Spots basisliniengetreunt darzustellen, wurde versucht, die Modulationszeit bei gleichen Säulendimensionen nochmals von 60 Sekunden auf 30 Sekunden zu verringern. Dadurch halbiert sich auch das Sammelvolumen auf 12,5 μL . Um diesen Parameter zu variieren, muss gleichzeitig auch der Gradient in der zweiten Dimension angepasst werden. Daher wurde der Gradient auf eine Analysendauer von 30 Sekunden inklusive Rückequilibrieren optimiert und mit einer Flussrate von 4 mL/min betrieben. Details zu den weiteren Parametern sind in Tabelle 28 in Abschnitt 7.4 angegeben.

Abbildung 49 zeigt die Analyse unter optimierten Bedingungen mit einer Modulationszeit von 30 Sekunden. Es wird deutlich, dass die Peakbreite in der ersten Dimension nochmals verringert wurde und so die Trennung der einzelnen EO-Einheiten bei den FAEO und den FAES nochmals verbessert werden konnte.

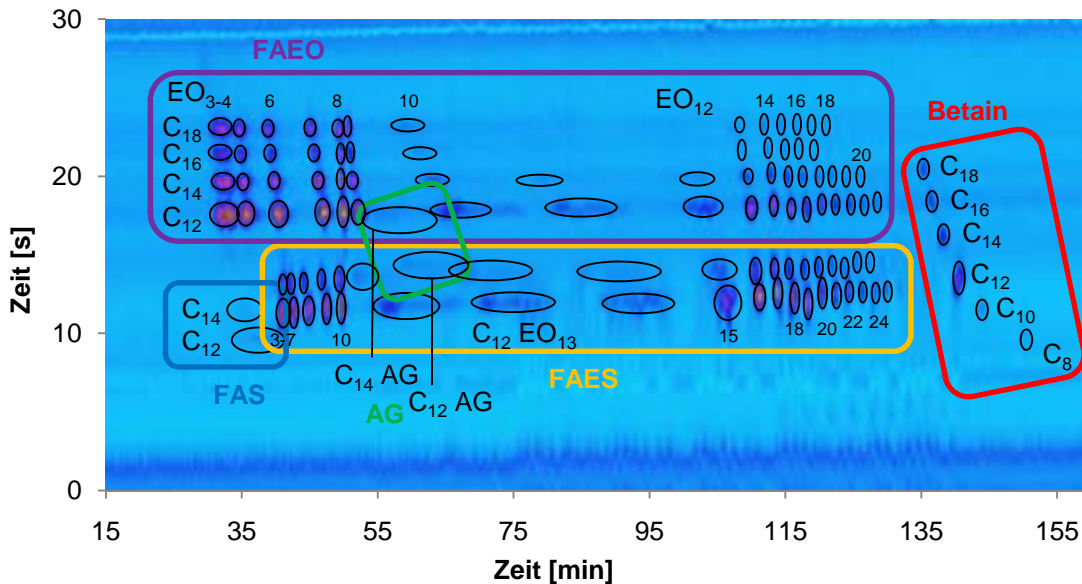


Abbildung 49: LCxLC-Analyse des Tensidgemisches; 1. Dim.: ZIC®-HILIC, 250 x 2,1 mm, 2. Dim.: Reprospher C₈-Aqua, 30 x 4,6 mm; Modulation: 30 s; System: Agilent 2

In den gezeigten LCxLC-Chromatogrammen wird deutlich, dass in der ersten Dimension sehr breite Signale im Bereich zwischen 50 und 70 Minuten für das Agilent-System 1 und im Bereich zwischen 50 und 110 Minuten für das Agilent-System 2 erhalten werden. Dies stellt in etwa den Bereich dar, bei dem der Gradient von einem langsamen Herabsetzen der ACN-Konzentration in ein Plateau bei 85% ACN übergeht (Abbildung 63 in Abschnitt 8.1). Zum einen könnte die isokratische Elution innerhalb des Plateaus die Ursache für die langsame Elution der Substanzen an dieser Stelle sein. Allerdings hat eine Optimierung des Gradienten ohne Verwendung eines Plateaus nicht zur Lösung des Problems geführt. Andererseits ist es möglich, dass es bei der sehr geringen Flussrate von 0,025 mL/min, welche zudem außerhalb der Spezifikation der Pumpe (min. 0,05 mL/min) liegt, zu einer unregelmäßigen Förderung der einzelnen Kanäle kommt. Des Weiteren kann eine inhomogene Durchmischung der mobilen Phase in

der Mischungskammer, welche mit einem Volumen von 35 μL recht groß im Hinblick auf die geringe Flussrate ist, die Ursache für die breiten Signale sein.

Eine weitere Theorie besteht darin, dass es in dem zuvor beschriebenen Bereich zu einem Wechsel im Retentionsmechanismus bei der HILIC-Trennung kommt. Zwar basiert der Trennmechanismus in der HILIC hauptsächlich auf der Verteilung des Analyten zwischen mobiler Phase und wässriger Grenzschicht auf der Oberfläche der stationären Phase, jedoch kommen außerdem ionische Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen zum Tragen. So könnte es also sein, dass mit der Zunahme des Wassers in der mobilen Phase im Verlauf des Gradienten der Verteilungsmechanismus eine immer kleinere Rolle spielt und stattdessen Wechselwirkungen mit der stationären Phase die Retention bestimmen.

Da das Massenspektrometer einen kostenintensiven Detektor darstellt und die Methode auch in Laboratorien für Auftragsanalytik implementiert werden soll, wurde zusätzlich ein Lichtstredetektor zur Detektion eingesetzt. Dazu wurde zunächst nochmals das Tensidgemisch mit den zuvor verwendeten Konzentrationen (Tabelle 19, Abschnitt 7.1.1) verwendet. Allerdings konnten hier keine Signale im Chromatogramm detektiert werden. Erst nachdem die FAEO in einer Konzentration von 3 mg/mL sowie die zuvor gewählten Bedingungen mit einer Modulationszeit von 60 Sekunden und einer Flussrate von 3 mL/min in der zweiten Dimension (für Details s. Tabelle 27, Abschnitt 7.4) verwendet wurden, konnten mit dem Lichtstredetektor Signale detektiert werden (Abbildung 50). In Realproben werden allerdings Konzentrationen in der Größenordnung von 1 mg/mL erwartet, sodass die Sensitivität des ELSD nicht ausreicht, um Tenside in diesem Konzentrationsbereich mit der hier beschriebenen Methode zu detektieren. Somit kann auf ein Massenspektrometer als Detektor nicht verzichtet werden.

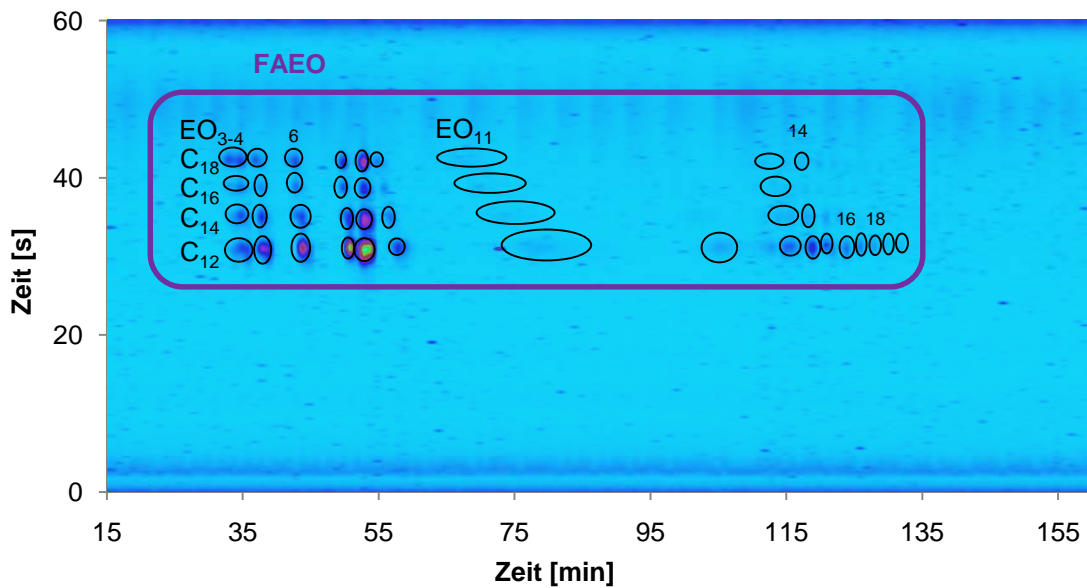


Abbildung 50: LCxLC-Analyse des FAEO; 1. Dim.: ZIC®-HILIC, 250 x 2,1 mm, 2. Dim.: Reprospher C₈-Aqua, 30 x 4,6 mm; Modulation: 1 min; System: Agilent 2; Detektor: ELSD

Mit der vorgestellten Methode können Tenside nach Substanzklasse und zusätzlich basisliniengetreunt nach der Alkylkettenlängen- sowie nach der EO-Verteilung getrennt werden. Eine geringere Modulationszeit in der LCxLC führt zu einer verbesserten Trennung in der ersten Dimension, da aufgrund der geringeren Sammelvolumina einer Vermischung in der Sammelschleife von bereits getrennten Substanzen vorgebeugt wird sowie zu einer Verbesserung der Trennung in der zweiten Dimension aufgrund des geringeren Probenvolumens und der Reduzierung an Analyten. Über eine hochauflösende massenspektrometrische Detektion können die Signale aufgrund des m/z -Verhältnisses eindeutig identifiziert werden. Des Weiteren stellt das Massenspektrometer einen empfindlichen Detektor dar, der Tenside in einem Konzentrationsbereich von 0,01 – 0,4 mg/mL detektieren kann. Lediglich für die Fettalkoholsulfate werden nur sehr schwache Signale aufgrund einer unzureichenden Ionisation im positiven Ionisationsmodus erhalten. Im Gegensatz dazu ist ein Lichtstreuendetektor an dieser Stelle nicht geeignet, da die Sensitivität dieses Detektors nicht ausreichend ist, um Realproben zu detektieren.

4.6 Comprehensive zweidimensionale LC von Home Care Produkten

Im Folgenden soll nun gezeigt werden, ob die entwickelte Methode geeignet ist, um Realproben zu analysieren. Dazu wurden handelsübliche Reiniger und Waschmittel käuflich erworben und diese nach Verdünnung in 80% ACN und 20% Wasser ohne weitere Probenvorbereitung mit der optimierten LCxLC-Methode analysiert (Tabelle 28, Abschnitt 7.4). Die Ergebnisse werden exemplarisch anhand der Analyse eines Handgeschirrspülmittels und eines Reisewaschmittels diskutiert. Tabelle 7 zeigt die Konzentration der Proben und die vom Hersteller angegebenen Inhaltsstoffe.

Tabelle 7: Realproben zur Analyse mittels LCxLC

Probe	Art der Probe	Konzentration der Realprobe [mg/mL]	Inhaltsstoffe laut Hersteller
P 1	Handgeschirrspülmittel	2,07	C _{12,14} EO ₂ -FAES C ₈₋₁₈ -Betain
P 2	Reisewaschmittel	2,37	C ₁₀₋₁₆ -FAS C ₁₂₋₁₅ -FAEO

Abbildung 51 zeigt das Chromatogramm der Analyse von Realprobe P 1 unter Verwendung der zuvor optimierten LCxLC-Methode mit massenspektrometrischer Detektion und ESI-positiv als Ionisationsmethode. Laut Herstellerangaben enthält die Probe ein C_{12,14}EO₂-FAES sowie ein C₈₋₁₈-Betain, welche auch detektiert werden konnten. Für die FAES konnten beide Kettenlängen bis zu einer EO-Einheit von 12 zugeordnet werden. Die Betaine weisen ebenfalls die sechs zu erwartenden Signale auf.

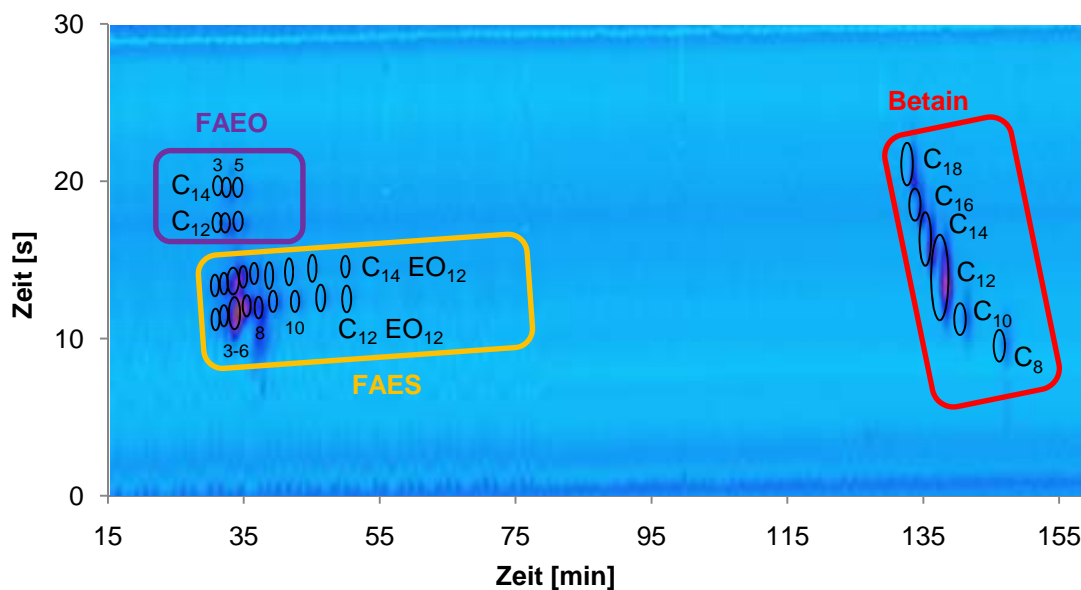


Abbildung 51: LCxLC-Analyse von P 1; 1. Dim.: ZIC®-HILIC, 250 x 2,1 mm, 2. Dim.: Reprospher C₈-Aqua, 30 x 4,6 mm; Modulation: 30 s; System: Agilent 2

In Abbildung 51 sind zusätzlich Signale für Fettalkoholethoxylylate detektiert worden, welche jedoch nicht unter den Inhaltsstoffen der Probe genannt werden. Bei diesen FAEO handelt es sich um nicht umgesetzte Fettalkoholethoxylylate aus dem Herstellungsprozess der Fettalkoholethersulfate. Diese Annahme kann durch die eindimensionale Analyse reiner Fettalkoholethersulfate bestätigt werden (für Details s. Tabelle 30, Abschnitt 7.4). Dazu wurde eine Amino-Phase verwendet, mit welcher im HILIC-Modus anionische Analyten stärker retardiert werden als nichtionische und kationische Analyten und die Trennungen mittels ELSD, ESI-positiv-MS und ESI-negativ-MS detektiert (Abbildung 52).

Aus Abbildung 52 wird deutlich, dass bei Detektion mit dem Lichtstreuendetektor sowie mit ESI-negativ-MS lediglich ein Signal für die zu erwartenden FAES zu beobachten ist. Bei der Ionisation im positiven Modus der ESI-Quelle wird allerdings ein weiteres Signal bei einer Retentionszeit von etwa 3 Minuten detektiert. Aufgrund des Trennmechanismus, bei welchem nichtionische Substanzen eine deutlich geringere Retention erfahren als anionische, und über die massenspektrometrische Detektion, bei welcher die m/z -Verhältnisse eindeutig zugeordnet werden können (Abbildung 53), lässt sich das Signal den Fettalkoholethoxylylaten zuordnen.

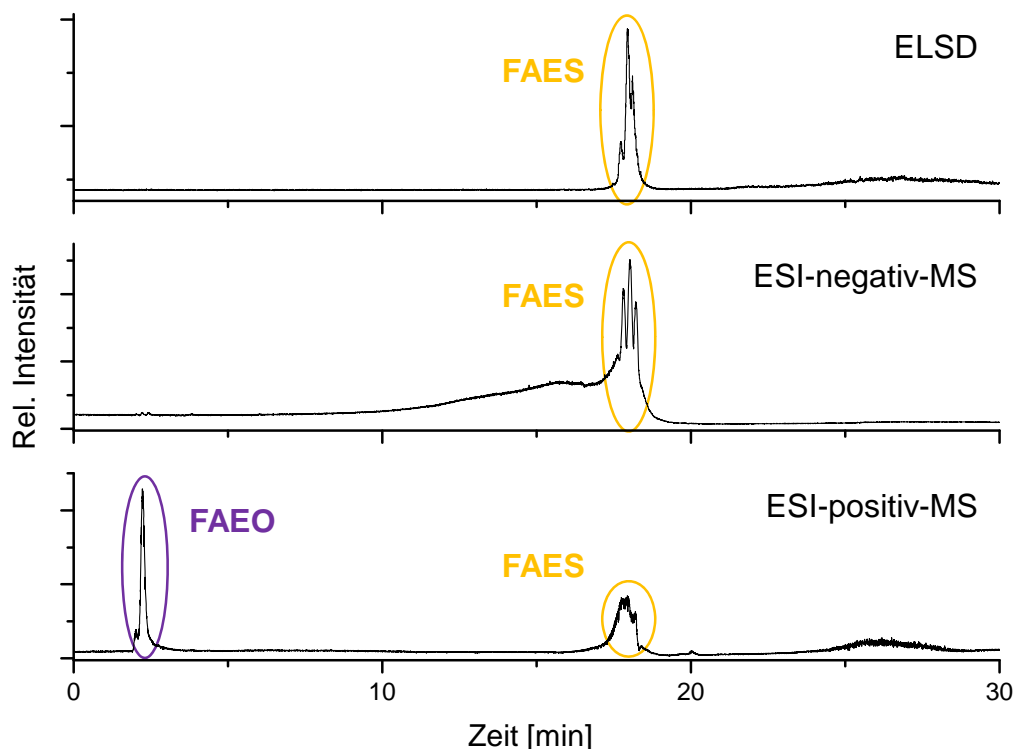


Abbildung 52: Trennung eines FAES im HILIC-Modus; Phasenmaterial: Luna NH₂, Detektion: ELSD, ESI-negativ-MS, ESI-positiv-MS

Die Konzentration an nichtumgesetzten FAEO in den FAES liegt im Bereich von lediglich 1%, sodass diese mit dem Lichtstreuendetektor und ESI-negativ-MS nicht detektiert werden können. Da Fettalkoholethoxylyate mit ESI-positiv-MS jedoch deutlich höhere Ionisationsausbeuten liefern als die Fettalkoholethersulfate, wird hier ein sehr stark ausgeprägtes Signal erhalten.

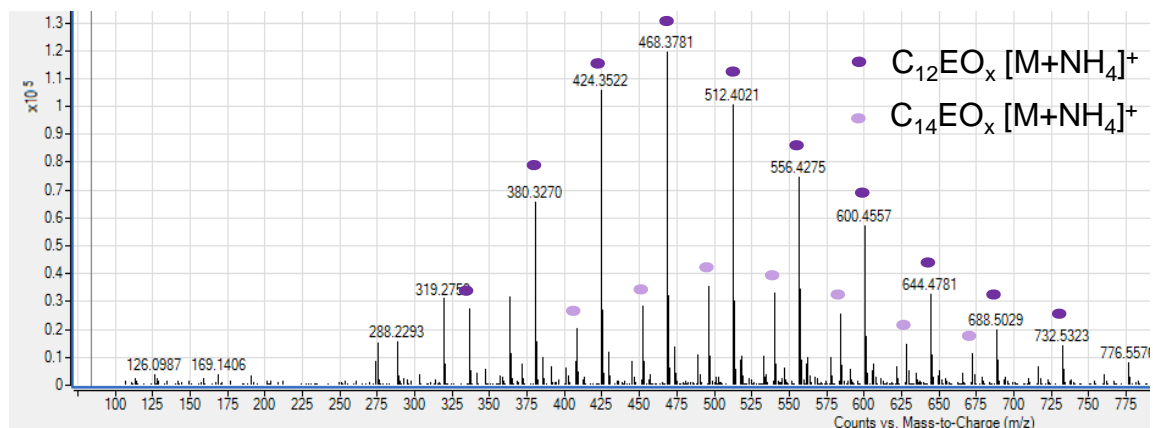


Abbildung 53: Massenspektrum (ESI-positiv) der FAEO

Realprobe P 2 enthält laut Herstellerangaben ein C₁₀₋₁₆-FAS sowie ein C₁₂₋₁₅-FAEO. Wie aus Abbildung 64 in Abschnitt 8.1 ersichtlich wird, können die FAEO zwar detektiert werden, jedoch werden keine Signale für die FAS erhalten. Eine Wiederholung der Analyse unter Verwendung von ESI-negativ als Ionisationsmethode zeigte hingegen lediglich die Signale der FAS und nicht die der FAEO (Abbildung 65, Abschnitt 8.1). In Abbildung 54 wird jeweils ein Ausschnitt aus den Chromatogrammen mit ESI-positiv- und ESI-negativ-MS gezeigt, woraus resultiert, dass alle enthaltenen Substanzen mit der entwickelten Methode analysiert und detektiert werden können.

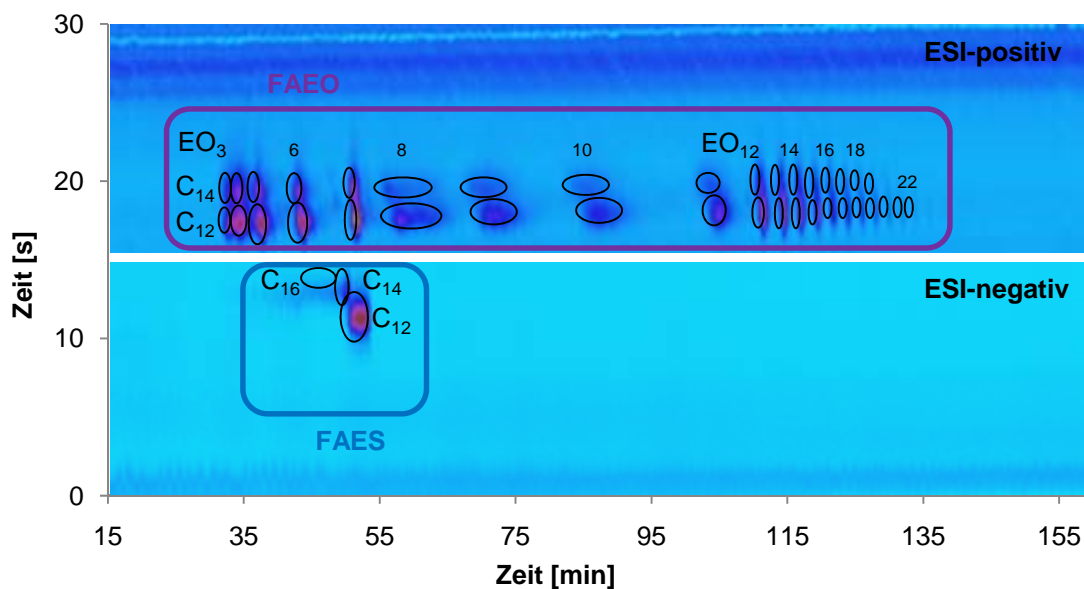


Abbildung 54: LCxLC-Analyse von P 2; 1. Dim.: ZIC[®]-HILIC, 250 x 2,1 mm, 2. Dim.: Reprospher C₈-Aqua, 30 x 4,6 mm; Modulation: 30 s; System: Agilent 2, ESI-positiv und ESI-negativ

In Realprobe P 2 sind Fettalkoholethoxylate enthalten, welches nicht auf oleochemischen, sondern auf petrochemischen Rohstoffen basieren. Dies wird daran deutlich, dass auch Fettalkoholethoxylate mit ungeradzahigen Alkylketten enthalten sind. Allerdings ist die Konzentration der C₁₃- und der C₁₅-FAEO deutlich geringer als die der C₁₂- und der C₁₄-FAEO, sodass zwar die entsprechenden *m/z*-Verhältnisse im Massenspektrum zugeordnet werden können, dagegen keine ausgeprägten Spots im Konturplot erhalten werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Tenside in Realproben mittels comprehensiver zweidimensionaler Flüssigchromatographie unter Verwendung der zuvor optimierten Methode analysiert und mittels massenspektrometrischer Detektion mit ESI-positiv und ESI-negativ als Ionisationsmethode ausreichend sensitiv detektiert werden können. Die massenspektrometrische Bestimmung der m/z -Verhältnisse kann dabei als dritte Dimension angesehen werden, mit welcher eine eindeutige Zuordnung der Signale möglich ist.

4.7 Präzision von Retentionszeit und Peakfläche in der LCxLC

Obwohl die Verwendung der comprehensiven zweidimensionalen LC als leistungsstarke Trenntechnik immer mehr zunimmt, ist der Einsatz für quantitative Experimente bisher nicht weit verbreitet. Für quantitative Anwendungen ist einerseits eine Software notwendig, welche die Peaks sehr präzise identifizieren und integrieren kann [210]. Alternativ können die Signale aus den eindimensionalen Chromatogrammen zunächst den einzelnen Substanzen zugeordnet und anschließend alle einer Substanz zugehörigen, aufgrund der Modulation geteilten Signale, addiert werden, was jedoch sehr zeitintensiv ist. Ein weiteres Problem, welches eine Quantifizierung beeinträchtigt, ist die nicht zufriedenstellende Sensitivität aufgrund des Analysenaufbaus. Werden die Analyten, welche in der mobilen Phase der ersten Dimension gelöst sind, auf die zweite Dimension übertragen, kommt es aufgrund der hohen Flussrate zu einer starken Verdünnung. Außerdem können gängige ESI-Ionenquellen lediglich Flussraten im Bereich von einigen 100 μL versprühen, weshalb das Eluat aus der zweiten Dimension vor Eintritt in die Ionenquelle des Massenspektrometers in einem Verhältnis von etwa 1 zu 10 gesplittet wird. Aufgrund der starken Verdünnung sowie der Teilung der Flussrate, nimmt die Sensitivität ab, wodurch wiederum die Güte der Quantifizierung beeinflusst wird. Des Weiteren wurde in den vorangegangenen Analysen

beobachtet, dass die Retentionszeit in der ersten Dimension vor allem von Gerät zu Gerät nicht reproduzierbar ist, was die Identifizierung der Signale erschwert.

Um die Tauglichkeit der Methode im Hinblick auf quantitative Analysen zu bewerten, wurden im Folgenden Analysen zur Reproduzierbarkeit der Retentionszeit und der Peakfläche von Analyse zu Analyse unter Verwendung eines Gerätes (Agilent-System 1) durchgeführt. Dazu wurde für das zuvor verwendete Tensidgemisch eine Auswertung hinsichtlich aller Einzelsubstanzen vorgenommen. Aus dem extrahierten Ionenchromatogramm (EIC) des entsprechenden Molekülpeaks wurde zur Bestimmung der Retentionszeit in der ersten Dimension im eindimensionalen Chromatogramm jeweils das höchste Signal der einzelnen Modulationen verwendet, während zur Bestimmung der Retentionszeit in der zweiten Dimension lediglich die Zeit zwischen den Modulationen, also zwischen 0,0 und 0,5 Minuten herangezogen wurden. Zur Bestimmung der Peakfläche wurden alle zu einer Substanz gehörenden Signale, welche aufgrund der Modulation geschnitten wurden, im eindimensionalen Chromatogramm integriert und addiert.

Abbildung 55 zeigt die Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der ersten Dimension der Betaine für die einzelnen Alkylhomologen mit zugehöriger Standardabweichung bei fünf Wiederholmessungen. Es wird deutlich, dass die Standardabweichung mit zunehmender Retention ansteigt, jedoch die maximale relative Standardabweichung bei 1,3% liegt.

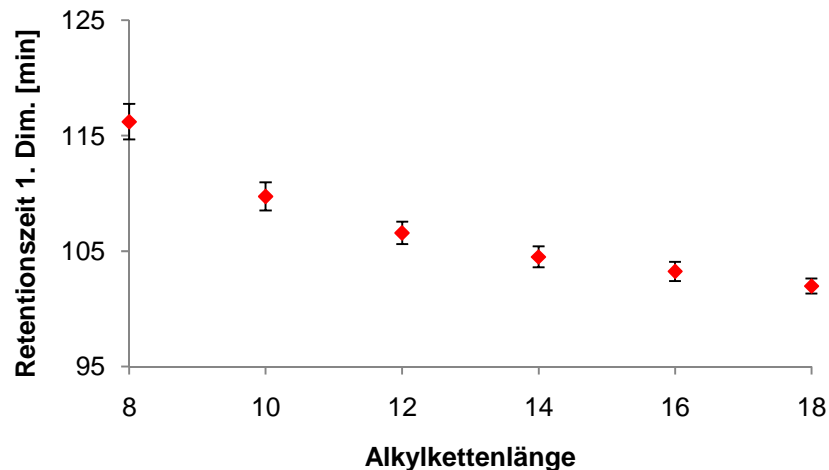


Abbildung 55: Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der 1. Dim. für die Betaine mit $n = 5$

In Abbildung 56 ist die Reproduzierbarkeit der Peakflächen beispielhaft für die Betaine dargestellt. Da die relative Standardabweichung bei maximal 5,4% liegt, wird deutlich, dass die Methode ebenfalls reproduzierbare Ergebnisse von Analyse zu Analyse im Hinblick auf die Peakflächen liefert.

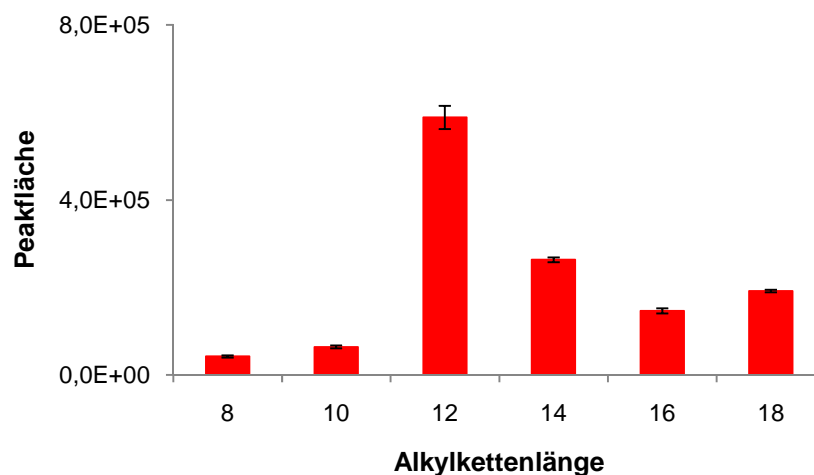


Abbildung 56: Reproduzierbarkeit der Peakflächen für die Betaine mit $n = 5$

Tabelle 8 stellt die ermittelten Ergebnisse für die Präzision der Retentionszeit in erster und zweiter Dimension sowie der Peakfläche mit zugehöriger relativer Standardabweichung nochmals zusammengefasst dar. Es wird deutlich, dass die relative Standardabweichung im Mittel unter 4% liegt. Während die relative Standardabweichung der Retentionszeit in der ersten Dimension im Mittel unter 1% liegt, beträgt sie in der zweiten Dimension 3%.

Tabelle 8: Mittelwerte (MW) (n = 5) der Retentionszeiten (t_R) in der 1. und 2. Dim. sowie der Peakflächen (A) mit zugehöriger relativer Standardabweichung (RSD) für die Betaine

Substanz	MW t_R 1. Dim. [min]	RSD [%]	MW t_R 2. Dim. [min]	RSD [%]	MW A	RSD [%]
C₈-Betain	116,2	1,3	0,195	3,7	42126	5,4
C₁₀-Betain	109,7	1,1	0,222	2,4	63976	4,7
C₁₂-Betain	106,6	0,9	0,256	1,8	588520	4,5
C₁₄-Betain	104,5	0,9	0,293	1,5	263260	2,0
C₁₆-Betain	103,2	0,8	0,343	6,4	146254	4,1
C₁₈-Betain	102,0	0,6	0,365	2,1	191564	1,5
MW RSD		0,9		3,0		3,7

Während die qualitative Auswertung der Betaine reproduzierbare Ergebnisse lieferte, wurden für die Alkylpolyglucoside vor allem hohe Werte für die relative Standardabweichung der Retentionszeit in der ersten Dimension sowie der Peakfläche erhalten (Tabelle 9). Dies kann damit begründet werden, dass die AG mit einer Retentionszeit von etwa 55 Minuten genau dann eluieren, wenn, wie zuvor beschrieben, aufgrund des Gradienten in der ersten Dimension sehr breite Signale erhalten werden. Es wurde beobachtet, dass die Retention vor allem im Bereich von 50 – 70 Minuten für das Agilent-System 1 und im Bereich von 50 – 110 Minuten für das Agilent-System 2 nicht reproduzierbar ist. Zudem ist aufgrund der breiten Signale und der daraus resultierenden hohen Anzahl an zu addierenden Peakflächen die Peakintegration stark fehlerbehaftet und führt zu hohen Werten für die Standardabweichung.

Außerdem kann aus Tabelle 9 entnommen werden, dass für die Fettalkoholsulfate zwar im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der ersten Dimension relative Standardabweichungen von kleiner 4% erreicht werden, die RSD-Werte der Peakflächen allerdings deutlich höher als die der Betaine sind. Trotz hoher Konzentrationen liefern die FAS im Vergleich zu den anderen Substanzen bedingt

durch die unzureichende Ionisierbarkeit nur schwache Signale, welche erst im EIC vom Rauschen unterschieden werden können. So ist aufgrund des geringen Responses die Integration und Flächenaddition fehlerbehaftet, was in hohen RSD-Werten resultiert.

Tabelle 9: Mittelwerte (MW) (n = 5) der Retentionszeiten (t_R) in der 1. und 2. Dim. sowie der Peakflächen (A) mit zugehöriger relativer Standardabweichung (RSD) für die FAS und AG

Substanz	MW t_R 1. Dim. [min]	RSD [%]	MW t_R 2. Dim. [min]	RSD [%]	MW A	RSD [%]
C ₁₂ -FAS	30,8	2,9	0,212	5,4	61025	13,1
C ₁₄ -FAS	28,5	3,2	0,240	3,8	27873	8,4
C ₁₂ -AG	55,1	15,0	0,264	5,0	18391	20,5
C ₁₄ -AG	55,1	16,9	0,309	3,2	9936	43,9

Für die Substanzklasse der Fettalkoholethoxylate zeigt Abbildung 57 exemplarisch die Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der ersten Dimension am Beispiel der C₁₂-FAEO. Es wird deutlich, dass die relative Standardabweichung stark von der Retentionszeit der Substanz abhängig ist. Vor allem im Bereich von etwa 50 bis 70 Minuten steigt der Wert für die RSD auf nahezu 20% an, während zuvor und danach Werte von maximal 5% erreicht werden. Die Auswertung für die Alkylkettenlängen C₁₄, C₁₆ sowie C₁₈ zeigt vergleichbare Ergebnisse (Abbildung 66 – Abbildung 68 in Abschnitt 8.1). Auch für die Substanzklasse der Fettalkohol-ethersulfate wird dieses Verhalten beobachtet. Abbildung 69 und Abbildung 70 in Abschnitt 8.1 zeigen für die C₁₂- sowie C₁₄-FAES, dass die relative Standardabweichung im Bereich von 50 bis 70 Minuten sogar bei über 20% liegt. Die hohen relativen Standardabweichungen lassen sich auf die Problematik der sehr breiten Signale in dem oben genannten Bereich des Chromatogramms, welche bereits in Abschnitt 4.5.4 diskutiert wurde, zurückführen.

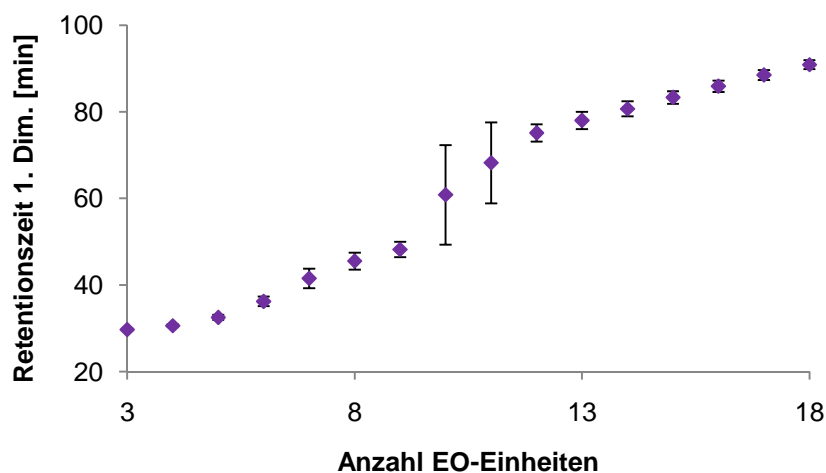


Abbildung 57: Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der 1. Dim. für die C₁₂-FAEO mit n = 5

Aufgrund der Abhängigkeit der relativen Standardabweichung von der Retentionszeit wird das Chromatogramm zur Auswertung der Reproduzierbarkeit für die FAES und FAEO in drei Bereiche geteilt. Da für die FAES und FAEO eine Vielzahl an Einzelsubstanzen vorliegt, wird aus jedem Bereich jeweils ein Vertreter mit einer EO-Einheit für die Alkylkettenlänge mit 12 Kohlenstoffatomen exemplarisch diskutiert. Tabelle 10 zeigt die festgelegten Bereiche sowie die ausgewählten Substanzen, die zur Diskussion herangezogen werden.

Tabelle 10: Verwendete Substanzen zur Auswertung der Reproduzierbarkeit für FAES und FAEO unterteilt in drei Bereiche

Bereich	t _R 1. Dim. [min]	Anzahl EO-Einheiten	
		C ₁₂ -FAES	C ₁₂ -FAEO
1	0 – 50	6	5
2	50 – 70	15	10
3	70 – 120	22	14

Tabelle 11 zeigt nochmals im Detail, dass für das C₁₂EO₆-FAES und das C₁₂EO₂₂-FAES relative Standardabweichungen der Retentionszeiten in der ersten Dimension von 2,4 bzw. 3,2% erzielt werden, während das C₁₂EO₁₅-FAES, welches bei etwa 56 Minuten eluiert, eine relative Standardabweichung von 24,2% aufweist. Auch für das C₁₂EO₅-FAEO und das C₁₂EO₁₄-FAEO werden reproduzierbare Ergebnisse mit

Ergebnisse und Diskussion

relativen Standardabweichungen von 1,8 bzw. 2,2% erzielt, während das C₁₂EO₁₀-FAEO eine RSD von 18,9% aufweist.

Tabelle 11: Mittelwerte (MW) (n = 5) der Retentionszeiten (t_R) in der 1. und 2. Dim. sowie der Peakflächen (A) mit zugehöriger relativer Standardabweichung (RSD) für jeweils drei Vertreter der FAES und FAEO

Substanz	MW t _R 1. Dim. [min]	RSD [%]	MW t _R 2. Dim. [min]	RSD [%]	MW A	RSD [%]
C ₁₂ EO ₆ -FAES	31,5	2,4	0,252	6,9	30182	6,4
C ₁₂ EO ₁₅ -FAES	55,7	24,2	0,254	4,9	245149	4,4
C ₁₂ EO ₂₂ -FAES	87,1	3,2	0,262	3,4	63295	3,1
C ₁₂ EO ₅ -FAEO	32,5	1,8	0,322	3,7	618690	5,6
C ₁₂ EO ₁₀ -FAEO	60,8	18,9	0,325	3,1	645399	6,3
C ₁₂ EO ₁₄ -FAEO	80,7	2,2	0,325	3,3	241089	5,4

Tabelle 11 zeigt ebenfalls, dass die relative Standardabweichung der Retentionszeit in der zweiten Dimension für alle sechs ausgewählten Substanzen in einem vergleichbaren Bereich liegt und maximal 7% beträgt. Auch die Ergebnisse hinsichtlich der Peakflächen zeigen, dass sich die ermittelten Werte für die einzelnen EO-Homologen nicht signifikant unterscheiden. Die relativen Standardabweichungen liegen hier zwischen 3 und 7% und zeigen außerdem keine Abhängigkeit von der Retentionszeit. Trotz großer Peakbreiten und einer schlechten Reproduzierbarkeit hinsichtlich der Retentionszeit in der ersten Dimension im Bereich 2 führt die Addition der einzelnen Peakflächen für die sechs ausgewählten Substanzen zu reproduzierbaren Ergebnissen.

Tabelle 34 und Tabelle 35 in Abschnitt 8.1 zeigen die Zusammenstellung der relativen Standardabweichungen der Peakflächen für alle FAEO- sowie FAES-Homologen.

Bei den vorgestellten Ergebnissen wurden die Analysen mit der zuvor optimierten Methode durchgeführt. Hierzu wurde eine Flussrate von 0,025 mL/min in der ersten

Dimension verwendet. Dieser Wert hat sich als optimal im Hinblick auf eine maximale Auflösung der Trennung in der ersten Dimension herausgestellt und gewährleistet zudem geringe Sammelvolumina, welche auf die zweite Dimension transferiert werden. Wie allerdings bereits in Abschnitt 4.5 diskutiert wurde, liegt dieser Wert außerhalb der Spezifikation der Pumpe. Wird ein Gerät außerhalb seiner vom Hersteller ermittelten Spezifikation betrieben, kann sich dies negativ auf die Reproduzierbarkeit auswirken. Aus diesem Grund wurden die Analysen zur Reproduzierbarkeit von Retentionszeit und Peakfläche für eine Flussrate von 0,05 mL/min in der ersten Dimension wiederholt (für Details s. Tabelle 29, Abschnitt 7.4). Da sich dadurch das Sammelvolumen verdoppelt, wurde eine größere Sammelschleife verwendet, während alle anderen Parameter konstant gehalten wurden.

Tabelle 12 zeigt für die Betaine einen Vergleich der relativen Standardabweichung für die Flussraten von 0,025 mL/min (Bed. 1) und 0,05 mL/min (Bed. 2).

Tabelle 12: Vergleich der Reproduzierbarkeit von Retentionszeit (t_R) und Peakfläche (A) anhand der relativen Standardabweichung bei Variation der Flussrate in der 1. Dim. für die Betaine; 0,025 mL/min mit $n = 5$ (Bed.1) und 0,05 mL/min mit $n = 4$ (Bed. 2)

	RSD t_R 1. Dim. [%]		RSD t_R 2. Dim. [%]		RSD A [%]	
	Bed. 1	Bed. 2	Bed. 1	Bed. 2	Bed. 1	Bed. 2
C₈-Betain	1,3	0,5	3,7	3,0	5,4	4,7
C₁₀-Betain	1,1	0,5	2,4	1,7	4,7	4,2
C₁₂-Betain	0,9	0,6	1,8	6,7	4,5	3,9
C₁₄-Betain	0,9	0,5	1,5	1,4	2,0	4,2
C₁₆-Betain	0,8	0,0	6,4	1,1	4,1	4,2
C₁₈-Betain	0,6	0,0	2,1	0,3	1,5	4,3
MW RSD	0,9	0,4	3,0	2,4	3,7	4,3

Im Hinblick auf die Retentionszeit in erster und zweiter Dimension konnten durch die höhere Flussrate verbesserte Ergebnisse erhalten werden, während die relativen Standardabweichungen für die Peakflächen leicht ansteigen. Allerdings liegen alle ermittelten Werte hier in einem ähnlichen Bereich, sodass der Unterschied nicht signifikant ist.

Für die FAS und die AG zeigt der Vergleich der relativen Standardabweichung bei unterschiedlichen Flussraten, dass die Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in erster und zweiter Dimension bei einer Flussrate von 0,05 mL/min zu niedrigeren Werten führt (Tabelle 13). Es wird somit deutlich, dass eine höhere Flussrate, welche innerhalb der Spezifikation des Gerätes liegt, die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten erhöht. Im Hinblick auf die Peakflächen hat die höhere Flussrate allerdings keine Änderung der Reproduzierbarkeit zur Folge. Die hohen Werte lassen sich somit lediglich mit einer unzureichenden und nicht reproduzierbaren Ionisierbarkeit begründen.

Tabelle 13: Vergleich der Reproduzierbarkeit von Retentionszeit (t_R) und Peakfläche (A) anhand der relativen Standardabweichung bei Variation der Flussrate in der 1. Dim. für die FAS und AG; 0,025 mL/min mit $n = 5$ (Bed. 1) und 0,05 mL/min mit $n = 4$ (Bed. 2)

	RSD t_R 1. Dim. [%]		RSD t_R 2. Dim. [%]		RSD A [%]	
	Bed. 1	Bed. 2	Bed. 1	Bed. 2	Bed. 1	Bed. 2
C₁₂-FAS	2,9	1,9	5,4	0,9	13,1	8,7
C₁₄-FAS	3,2	4,8	3,8	4,4	8,4	11,3
C₁₂-AG	15,0	6,0	5,0	2,1	20,5	15,4
C₁₄-AG	16,9	11,5	3,2	1,2	43,9	55,6

Auch für die FAES und die FAEO konnte bei Betrachtung der zuvor ausgewählten Einzelsubstanzen gezeigt werden, dass eine Steigerung der Reproduzierbarkeit der Retentionszeit erreicht wird, wenn höhere Flussraten verwendet werden (Tabelle 14).

Auch für die Peakflächen wurden hier niedrigere Werte für die relative Standardabweichung ermittelt. Ob die Reduzierung der RSD für die Peakflächen signifikant ist, müsste jedoch durch weitere Analysen untersucht werden.

Tabelle 14: Vergleich der Reproduzierbarkeit von Retentionszeit (t_R) und Peakfläche (A) anhand der relativen Standardabweichung bei Variation der Flussrate in der 1. Dim. für die drei Vertreter der FAES und FAEO; 0,025 mL/min mit n = 5 (Bed. 1) und 0,05 mL/min mit n = 4 (Bed. 2)

	RSD t_R 1. Dim. [%]		RSD t_R 2. Dim. [%]		RSD A [%]	
	Bed. 1	Bed. 2	Bed. 1	Bed. 2	Bed. 1	Bed. 2
C ₁₂ EO ₆ -FAES	2,4	2,5	6,9	1,7	6,4	4,0
C ₁₂ EO ₁₅ -FAES	24,2	16,9	4,9	1,8	4,4	2,6
C ₁₂ EO ₂₂ -FAES	3,2	2,3	3,4	0,9	3,1	3,0
C ₁₂ EO ₅ -FAEO	1,8	1,5	3,7	0,3	5,6	2,6
C ₁₂ EO ₁₀ -FAEO	18,9	3,2	3,1	0,5	6,3	1,0
C ₁₂ EO ₁₄ -FAEO	2,2	1,6	3,3	0,5	5,4	1,4

Abbildung 71 bis Abbildung 76 in Abschnitt 8.1 zeigen die Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der ersten Dimension nochmals ausführlich. In Tabelle 36 bis Tabelle 39 in Abschnitt 8.1 sind die relativen Standardabweichungen für die Retentionszeit in der ersten Dimension und für die Peakflächen der FAEO- sowie der FAES-Homologen bei einer Flussrate von 0,05 mL/min (Bed. 2) vollständig zusammengestellt.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass vor allem die Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der ersten Dimension stark von der Position im Chromatogramm abhängig ist. So konnte ein Bereich im Chromatogramm ermittelt werden (Bereich 2), in welchem aufgrund von Pumpleistung und Effizienz der Durchmischung bei der Gradientenelution oder aufgrund eines Wechsels im Retentionsmechanismus sehr breite Signale erhalten werden. Daher ist in diesem Bereich die Retentionszeit in der

ersten Dimension nicht reproduzierbar. Durch Verwendung höherer Flussraten, welche innerhalb der Spezifikation der HPLC-Pumpe liegen, konnten die Ergebnisse zwar verbessert werden, allerdings wurden dennoch für einige Substanzen relative Standardabweichungen von über 20% ermittelt (Tabelle 39 in Abschnitt 8.1). Außerhalb dieses zuvor genannten Bereichs wurden jedoch deutlich niedrigere Werte für die RSD ermittelt, welche eine gute Reproduzierbarkeit widerspiegeln. Für Bereich 1 und 3 konnten im Mittel relative Standardabweichungen von kleiner 5% im Hinblick auf die Retentionszeit in der ersten Dimension erreicht werden.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Reproduzierbarkeit der Peakflächen nicht von der Retentionszeit abhängig ist. Hier konnten, abgesehen von den Fettalkoholsulfaten und den Alkylpolyglucosiden, relative Standardabweichungen von kleiner 7% ermittelt werden. Die hohen relativen Standardabweichungen bei den FAS und AG werden mit einer unzureichenden und nicht reproduzierbaren Ionisierung begründet, die zu niedrigen Signalen und somit zu einer fehlerbehafteten Peakintegration führt.

Nachdem gezeigt wurde, dass die erhaltenen Peakflächen für alle Bereiche hinreichend reproduzierbar sind, wurde unter Verwendung einer Flussrate von 0,025 mL/min in der ersten Dimension (Bed. 1) eine Kalibriergerade für die Betaine erstellt (Details zu eingesetzten Konzentration s. Tabelle 20, Abschnitt 7.1.1). Dazu wurde die Menge der gesamten Betain-Mischung gegen die Peakfläche des jeweiligen Alkylketten-Homologen aufgetragen. In Abbildung 58 ist die ermittelte Kalibrierfunktion exemplarisch für das C₁₂-Betain dargestellt. Es wird deutlich, dass für den gewählten Konzentrationsbereich mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,984 ein linearer Zusammenhang besteht.

In Tabelle 40 in Abschnitt 8.1 sind die ermittelten Korrelationskoeffizienten der Kalibrierfunktionen für die weiteren Alkylkettenhomologen zusammengefasst. Es werden für alle sechs Alkylkettenlängen Werte größer 0,979 ermittelt. Die Methode ist somit geeignet, um unbekannte Betain-Konzentrationen in dem gewählten

Konzentrationsbereich zwischen 5 und 30 $\mu\text{g/mL}$ in Tensidgemischen, die eine vergleichbare Zusammensetzung, wie die verwendete Mischung, aufweisen, zu bestimmen.

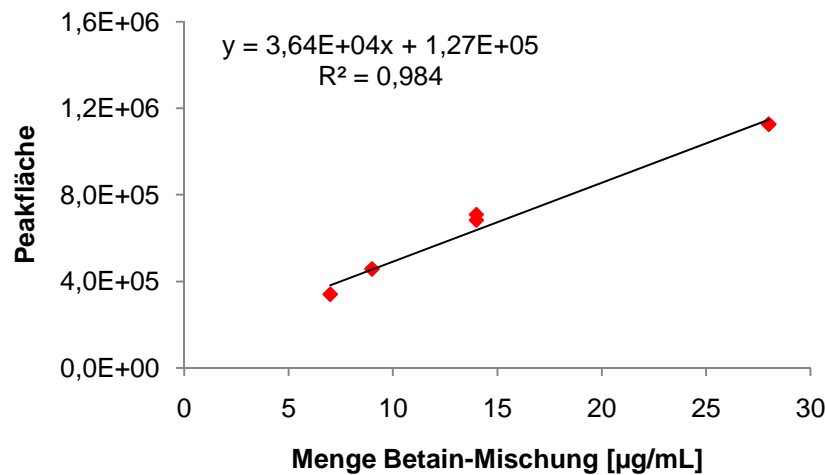


Abbildung 58: Kalibriergerade des C_{12} -Betains

Des Weiteren wurde für ein einzelnes Oligomer der FAEO unter Verwendung einer Flussrate von 0,025 mL/min in der ersten Dimension (Bed. 1) das Standardadditionsverfahren angewendet, um die Konzentration dieser Substanz in der FAEO-Mischung zu ermitteln. Dazu wurde das C_{16}EO_8 -FAEO in unterschiedlicher Konzentration zur Tensidmischung hinzugegeben und anschließend die resultierende Peakfläche ausgewertet (Details zu eingesetzten Konzentration s. Tabelle 20, Abschnitt 7.1.1).

Abbildung 59 zeigt das Standardadditionsverfahren einer Zweifachbestimmung, mit welchem durch Extrapolation der Geraden auf die Abszisse die Ursprungskonzentration des Analyten ermittelt wird. Es ergibt sich daraus eine Konzentration von $0,47 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$ C_{16}EO_8 -FAEO bei einer gesamten FAEO-Konzentration von 60 $\mu\text{g/mL}$. Da die Zusammensetzung der Fettalkoholethoxylate nicht bekannt ist und mit keiner anderen Analysenmethode bestimmt wurde, kann dieses Ergebnis nicht verifiziert werden.

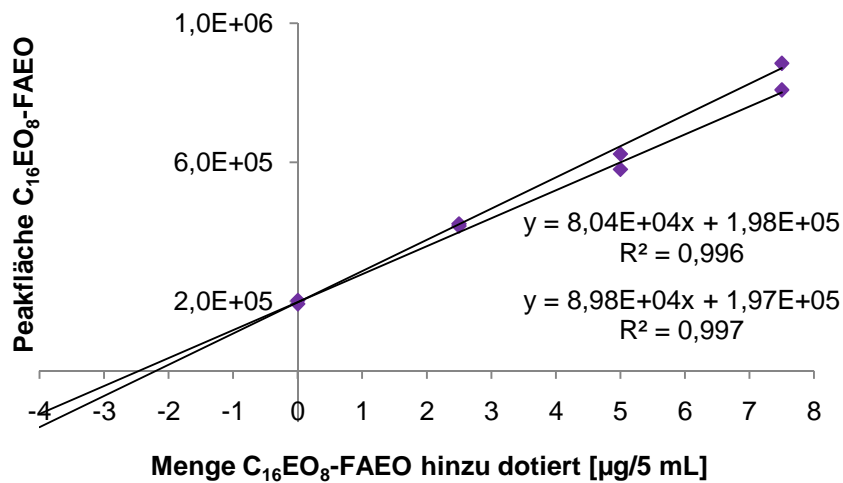


Abbildung 59: Standardadditionsverfahren für das C₁₆EO₈-FAEO

Es konnte gezeigt werden, dass die entwickelte LCxLC-Methode generell geeignet ist, um unbekannte Konzentrationen von Tensiden in komplexen Mischungen, wie sie hier verwendet wurden, sowohl über eine externe Kalibrierung als auch über das Standardadditionsverfahren zu ermitteln.

5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die entwickelte LCxLC-Methode reproduzierbare Ergebnisse hinsichtlich der Retentionszeit und der Peakfläche liefert. Dabei hat eine höhere Flussrate von 0,05 mL/min im Vergleich zu den zuvor verwendeten 0,025 mL/min vor allem die Reproduzierbarkeit im Hinblick auf die Retentionszeit erhöht. Ob diese Verbesserung jedoch signifikant ist, müsste durch weitere Analysen verifiziert werden.

Für die Betaine wurde für einen engen Konzentrationsbereich eine externe Kalibrierung durchgeführt und Korrelationskoeffizienten von größer 0,979 erhalten. An dieser Stelle ist es jedoch notwendig, den Konzentrationsbereich auszuweiten, um Betaine in unterschiedlichen Konzentrationen in Realproben bestimmen zu können.

Des Weiteren wurde mittels Standardadditionsverfahren ein Fettalkoholethoxylat in der gesamten FAEO-Mischung quantifiziert. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, müssen weitere Analysen zur Bestimmung der Konzentration der einzelnen Homologen in der Mischung durchgeführt werden.

Da in der vorliegenden Arbeit allerdings gezeigt wurde, dass die entwickelte LCxLC-Methode weitestgehend reproduzierbare Ergebnisse hinsichtlich Retentionszeit und Peakfläche liefert, könnten Analysen von Realproben zur Bestimmung der Konzentrationen der enthaltenen Tenside mittels externer Kalibrierung oder Standardadditionsverfahren durchgeführt werden.

Mit der vorgestellten LCxLC-Methode ist es gelungen, fünf Tensidklassen nach Substanzklasse, Alkylkettenlänge und Ethoxylierungsgrad zu trennen. An dieser Stelle sollten weitere Tensidklassen eingesetzt werden, um die Tauglichkeit der Methode zu bestätigen und ihre Einsatzmöglichkeit zu erweitern.

6 Zusammenfassung

Fettalkoholderivate werden als Tenside in Formulierungen wie Waschmitteln, Reinigern oder Kosmetikprodukten als komplexe Gemische eingesetzt. Zum einen bestehen die einzelnen Tenside selbst, bedingt durch die verwendeten Rohstoffe oder den Herstellungsprozess, bereits aus einer komplexen Mischung an Homologen. Zum anderen werden jedoch auch Tenside unterschiedlicher Substanzklassen in Realproben kombiniert, um die Eigenschaften des Produktes, wie Reinigungs- oder Schaumbildungsvermögen, zu verbessern. Aufgrund der Komplexität der Proben ist daher eine Analytik notwendig, die alle Einzelsubstanzen erfassen und qualifizieren sowie quantifizieren kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass komplexe Gemische, die anionische, nichtionische und amphotere Tenside enthalten, mittels HILIC nach Substanzklasse getrennt werden können. Des Weiteren wurde mittels HILIC für ethoxylierte Substanzen eine Trennung der EO-Homologen erreicht, während eine Trennung nach Alkylkettenlängen lediglich für Betaine erzielt wurde. Gleichzeitig wurde beobachtet, dass eine Trennung mit Umkehrphasenmaterialien zu einer sehr guten Separation hinsichtlich der Alkylkettenlängenverteilung führt, während eine Trennung nach Substanzklasse jedoch nicht erreicht wird. Der Einsatz unterschiedlicher organischer Lösungsmittel als mobile Phase zeigte, dass eine Trennung nach Ethoxylierungsgrad mit Umkehrphasen bei Bedarf unterdrückt werden kann. Am Beispiel eines speziell zur Tensidanalytik hergestellten und kommerziell erhältlichen Phasenmaterials wurde jedoch deutlich, dass eine eindimensionale Trennung nach Substanzklasse, Alkylkettenlängenverteilung sowie nach EO-Homologen bei komplexen Tensidgemischen zur Coelution vieler Signale führt, was die Auswertung stark erschwert.

Da die eindimensionale Trennung nicht zum gewünschten Ergebnis geführt hat, wurde die comprehensive zweidimensionale Flüssigchromatographie implementiert.

Es wurde zunächst der Neue-Test durchgeführt, um eine nähere Charakterisierung der verwendeten Umkehrphasen zu erhalten. Da die Trennung in der ersten Dimension nach polaren Wechselwirkungen mittels HILIC durchgeführt werden sollte, zeigte eine C₈/Diol-Mischphase, die Reprospher C₈-Aqua, dazu die größte Orthogonalität. Nach einer Optimierung hinsichtlich der Modulationszeit sowie der Säulendimension in der zweiten Dimension konnte unter Verwendung eines HILIC-Phasenmaterials in der ersten Dimension eine Trennung nach Substanzklasse und EO-Homologen erzielt werden, während in der zweiten Dimension eine Umkehrphase für eine zusätzliche Trennung nach Alkylkettenlängenverteilung sorgte. Mit dieser Methode ist es schließlich gelungen, etwa 110 Einzelsubstanzen zu trennen.

Die entwickelte LCxLC-Methode konnte erfolgreich auf die Analyse von mehreren Realproben aus dem Home Care Bereich angewendet werden. Des Weiteren haben Analysen zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit von Retentionszeit und Peakfläche gezeigt, dass die Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der ersten Dimension stark von der Analysenzeit abhängig ist. Bis auf den mittleren Bereich des Chromatogramms wurden jedoch reproduzierbare Ergebnisse mit einer relativen Standardabweichung von kleiner 10% erhalten. Im mittleren Bereich des Chromatogramms werden bedingt durch Pumpleistung und Effizienz der Durchmischung bei der Gradientenelution oder aufgrund eines Wechsels im Retentionsmechanismus sehr breite Signale erhalten, welche zu der schlechten Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten führen. Für die Reproduzierbarkeit der Peakflächen zeigte sich keine Abhängigkeit von der Analysenzeit und die relativen Standardabweichungen lagen hier, abgesehen von den Fettalkoholsulfaten und Alkylpolyglucosiden, im Mittel bei kleiner 7%. Für die Fettalkoholsulfate und Alkylpolyglucoside wurden höhere Werte erhalten, was mit einer unzureichenden und nicht reproduzierbaren Ionisierung begründet werden kann.

Zusammenfassung

Unter Verwendung einer externen Kalibrierung oder des Standardadditionsverfahrens wurde am Beispiel der Betaine sowie eines Fettalkoholethoxylat-Homologen gezeigt, dass bei der comprehensiven zweidimensionalen Flüssigchromatographie außerdem eine Quantifizierung der Tenside in der verwendeten komplexen Mischung möglich ist.

7 Experimenteller Teil

7.1 Chemikalien

7.1.1 Tenside

Bei den analysierten Tensiden handelt es sich um technische Standards, die von der BASF Personal Care and Nutrition GmbH, Düsseldorf, Deutschland, zur Verfügung gestellt wurden.

Für die eindimensionalen Analysen mit der HILIC-Phase wurden von den Tensiden (Tabelle 15) jeweils Lösungen mit einer Konzentration von 1 mg/mL in 80% ACN und 20% Wasser hergestellt. Die Konzentration bezieht sich dabei auf die vom Hersteller angegebene Aktivsubstanz des technischen Standards.

Tabelle 15: Verwendete technische Standards der Tenside

Substanzklasse	Anzahl C-Atome Alkylrest	Polymerisationsgrad	Aktivsubstanz
FAS*	12-14	-	34 – 35%
FAS	8	-	39 – 42%
FAES*	12-14	12	29 – 31%
FAES	12-14	2	68 – 73%
FAEO*	12-18	7	99 – 100%
AG*	12-14	1,4 – 1,5	50 – 53%
Betain*	8-18	-	29 – 32%

* in Standardgemisch enthalten

Zur Herstellung des Standardgemisches, welches fünf Tenside aus unterschiedlichen Tensidklassen ($C_{12,14}$ -FAS, $C_{12,14}EO_{12}$ -FAES, $C_{12-16}EO_7$ -FAEO, $C_{12,14}$ -AG und C_{8-18} -Betain) enthält, wurde jeweils 1 mL der jeweiligen oben genannten Lösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL entnommen und zusammen gegeben, sodass 5 mL

Experimenteller Teil

Standardgemisch vorlagen und jede Substanzklasse mit einer Konzentration von 0,2 mg/mL vertreten war.

Für die RP-Trennungen wurden von den zuvor genannten fünf Tensiden ebenfalls Lösungen mit einer Konzentration von 1 mg/mL hergestellt. Allerdings wurden die Tenside in 20% ACN und 80% Wasser gelöst. Zur Herstellung des Standardgemisches wurde jeweils 1 mL dieser Lösung entnommen und zusammen gegeben, sodass 5 mL Standardgemisch vorlagen und jede Substanzklasse mit einer Konzentration von 0,2 mg/mL vertreten war.

Für die Trennungen, bei denen das QTOF Ultima™ API Massenspektrometer als Detektor mit ESI-positiv als Ionisationsmethode verwendet wurde, wurde eine Tensidmischung mit optimierten Konzentrationen in 80% ACN und 20% Wasser hergestellt. Zur Herstellung der Mischung wurde jeweils 1 mL der entsprechenden Verdünnung entnommen und zusammen gegeben, sodass 5 mL der Mischung vorlagen. Die jeweiligen Konzentrationen sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: Konzentrationen der Tenside in der Mischung bei Verwendung des Ultima™ API Massenspektrometers mit ESI-positiv als Ionisationsmethode

Substanz- klasse	Stammlösung Konzentration [mg/mL]	Verwendete Verdünnung [mg/mL]	Mischung Konzentration [mg/mL]
FAS	1,90	1,90	0,38
FAES	1,60	0,80	0,16
FAEO	3,50	0,18	0,04
AG	2,80	0,28	0,06
Betain	1,50	0,15	0,03

Da sich während der Analysen herausgestellt hat, dass die zuvor verwendete Mischung für einige Tenside eine zu hohe Konzentration aufwies, wurde eine Tensidmischung mit angepassten Konzentrationen hergestellt, welche in Tabelle 17 dargestellt sind.

Tabelle 17: Angepasste Konzentration der Tenside in der Mischung bei Verwendung des Ultima™ API Massenspektrometers mit ESI-positiv als Ionisationsmethode

Substanz- klasse	Stammlösung Konzentration [mg/mL]	Verwendete Verdünnung [mg/mL]	Mischung Konzentration [mg/mL]
FAS	1,80	0,90	0,18
FAES	1,80	0,45	0,09
FAEO	3,00	0,06	0,01
AG	2,80	0,28	0,06
Betain	1,70	0,09	0,02

Bei der Analyse der angepassten Tensidmischung konnten das FAS sowie das FAEO nicht sensitiv genug detektiert werden, sodass erneut eine Mischung mit angepassten Konzentrationen hergestellt wurde, welche für die LCxLC-Analysen mit dem Agilent-System 1 unter Verwendung des Agilent 6538 QTOF als Detektor eingesetzt wurde (Tabelle 18).

Tabelle 18: Angepasste Konzentration der Tenside in der Mischung bei Verwendung des Agilent 6538 Ultra High Definition Accurate-Mass QTOF mit ESI-positiv als Ionisationsmethode

Substanz- klasse	Stammlösung Konzentration [mg/mL]	Verwendete Verdünnung [mg/mL]	Mischung Konzentration [mg/mL]
FAS	1,8	0,90	0,18
FAES	1,8	0,45	0,09
FAEO	3,0	0,30	0,06
AG	2,8	0,28	0,06
Betain	1,7	0,09	0,02

Für die Analysen, welche mit dem Agilent-System 2 unter Verwendung des Agilent 6530 QTOF durchgeführt wurden, wurde eine neue Tensidmischung angesetzt. Die

Experimenteller Teil

Konzentrationen der einzelnen Tenside in der Mischung sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19: Konzentration der Tenside in der Mischung bei Verwendung des Agilent 6530 Ultra High Definition Accurate-Mass QTOF mit ESI-positiv als Ionisationsmethode

Substanz- klasse	Stammlösung Konzentration [mg/mL]	Verwendete Verdünnung [mg/mL]	Mischung Konzentration [mg/mL]
FAS	1,70	1,70	0,34
FAES	1,50	0,38	0,08
FAEO	3,00	0,30	0,06
AG	2,60	0,26	0,05
Betain	1,40	0,07	0,01

Zur Erstellung der Kalibriergeraden für das Betain sowie für das Standardadditionsverfahren, welches zur Bestimmung der C₁₆EO₈-FAEO-Konzentration angewendet wurde, wurden vier Mischungen mit unterschiedlichen Betain- sowie C₁₆EO₈-FAEO-Konzentrationen hergestellt (Tabelle 20).

Tabelle 20: Konzentration der Tenside in Mischung A – D zur Bestimmung der Kalibriergerade für die Betaine und für das Standardadditionsverfahren für C₁₆EO₈-FAEO

	Mischung A	Mischung B	Mischung C	Mischung D
Substanz- klasse	Konzentration [µg/mL]	Konzentration [µg/mL]	Konzentration [µg/mL]	Konzentration [µg/mL]
FAS	340	340	340	340
FAES	76	76	76	76
FAEO	60	60	60	60
C ₁₆ EO ₈ -FAEO	0	2,5	5	7,5
AG	52	52	52	52
Betain	28	14	9	7

7.1.2 Weitere Chemikalien

- Acetonitril für HPLC, LC-MS grade, VWR Prolabo, Radnor, USA
- Methanol für HPLC, LC-MS grade, VWR Prolabo, Radnor, USA
- Isopropanol für HPLC, HPLC grade, Merck KGaA, Darmstadt, D
- Millipore-Wasser (Wasseraufbereitungssystem, GenPure UV-TOC/UF, TKA, Niederelbert, D)
- Ammoniumacetat, LC-MS Ultra, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
- Essigsäure für LC-MS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

7.2 Geräte und Software

HPLC-Anlagen:

- Waters 2690 Alliance, Waters Corporation, Milford, USA
- Merck Hitachi HPLC-Anlage, LaChrom D-7000, L-7100 und L-7200, Merck KGaA, Darmstadt, D
Software: EZChrom Elite
- Shimadzu Prominence LC-20AD XR mit Rheodyne 10-Wege-Ventil, Shimadzu Corporation, Kyoto, J
Software: Shimadzu LC-Solution 1.24
- Agilent Infinity 1290 LC/MS System, Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Software: ChemStation
- Agilent Infinity 1260 Binary Pump, Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Software: ChemStation

Detektoren:

- PL-ELSD, Polymer Laboratories; Santa Clara, USA
Nebulizertemperatur 70 °C
Verdampfungstemperatur 90 °C

Experimenteller Teil

Gasfluss 1,3 L/min

- MicroMass QTOF Ultima™ API, Waters Corporation, Milford, USA

Software: MassLynx

APCI-positiv/negativ Corona: 4,0 μ A

Cone: 40

Quellentemperatur: 150 °C

APCI-Temperatur: 320 °C

ESI-positiv/negativ Kapillarspannung: 2,0/2,5 kV

Cone: 40

Quellentemperatur: 120 °C

Verdampfungstemperatur: 180 °C

Datenaufnahmerate 2 Hz

- Agilent 6530/6538 Ultra High Definition Accurate-Mass QTOF LC/MS System, Agilent Technologies, Santa Clara, USA

Software: Masshunter

Dual ESI-positiv/negativ Gastemperatur: 200 °C

Drying Gas: 8 L/min

Nebulizer: 35 psig

Fragmentor: 175 V

Skimmer: 65 V

Datenaufnahmerate 5 Hz

Weitere Geräte und Software:

- Analysenwaage M2P (2 g/max), Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, D
- Wasseraufbereitungssystem , GenPure UV-TOC/UF, TKA, Niederelbert, D
- Software: GC Image v.2.0, GC-Image, Lincoln, USA

7.3 Trennsäulen

In Tabelle 21 sind alle verwendeten Trennsäulen zusammengestellt.

Tabelle 21: Verwendete Phasenmaterialien

Phase	Dimension	Poren	Hersteller
ZIC®-HILIC	250 mm x 4,6 mm, 5 µm	200 Å	Dichrom GmbH, D
ZIC®-HILIC	250 mm x 2,1 mm, 5 µm	200 Å	Dichrom GmbH, D
ReproSil-Pur® C₁₈ AQ	250 mm x 4,6 mm, 5 µm	120 Å	Dr. Maisch GmbH, D
ReproSpher 100 C₈-Aqua	250 mm x 4,6 mm, 5 µm	100 Å	Dr. Maisch GmbH, D
ReproSpher 100 C₈-Aqua	50 mm x 4,6 mm, 5 µm	100 Å	Dr. Maisch GmbH, D
ReproSpher 100 C₈-Aqua	30 mm x 4,6 mm, 5 µm	100 Å	Dr. Maisch GmbH, D
Fluofix® N	250 mm x 4,6 mm, 5 µm	120 Å	Dr. Maisch GmbH, D
Fluofix® E	250 mm x 4,6 mm, 5 µm	120 Å	Dr. Maisch GmbH, D
ReproSil-Fluosil® NE	250 mm x 4,6 mm, 5 µm	k.a.	Dr. Maisch GmbH, D
Acclaim® Surfactant	150 mm x 4,6 mm, 5 µm	120 Å	Thermo Fisher Scientific Inc.
Luna NH₂	150 mm x 2,0 mm, 3 µm	100 Å	Phenomenex Inc.

7.4 Gradienten

Die HILIC-Trennungen wurden unter Verwendung der folgenden chromatographischen Parameter durchgeführt:

Tabelle 22: Chromatographische Parameter für HILIC-Trennungen

Flussrate	0,5 mL/min	
Pufferkonzentration	100 mM	
pH-Wert des Puffers	5,3	
Injektionsvolumen	10 μ L	
Zeit [min]	ACN [%]	NH₄OAc [%]
0	95	5
10	95	5
30	70	30
35	70	30
50	95	5
70	95	5

Die RP-Trennungen wurden unter Verwendung der folgenden chromatographischen Parameter durchgeführt:

Tabelle 23: Chromatographische Parameter für RP-Trennungen

Flussrate	1 mL/min	
Pufferkonzentration	50 mM	
pH-Wert des Puffers	5,3	
Injektionsvolumen	10 μ L	
Zeit [min]	ACN [%]	NH₄OAc [%]
0	5	95
5	5	95
35	95	5
55	95	5
60	5	95
80	5	95

Tabelle 24 beschreibt den optimierten Gradienten für die RP-Trennungen.

Tabelle 24: Optimierter Gradient für RP-Trennungen

Zeit [min]	MeOH [%]	NH ₄ OAc [%]
0	50	50
5	50	50
35	95	5
55	95	5
60	50	50
80	50	50

Im Folgenden sind die chromatographischen Bedingungen sowie die verwendeten Gradienten für die erste und zweite Dimension der LCxLC-Analyse unter Verwendung des Waters/Shimadzu-Systems zusammengefasst (Tabelle 25).

Tabelle 25: Chromatographische Parameter für die LCxLC-Analysen mit dem Waters/Shimadzu-System

1. Dimension ZIC®-HILIC			2. Dimension Reprospheer C ₈ -Aqua		
Säulen-Dimension	250 x 2,1 mm		Säulen-Dimension	50 x 4,6 mm	
Flussrate	0,025 mL/min		Flussrate	3 mL/min	
Pumpe	Waters		Pumpe	Shimadzu	
Pufferkonzentration	50 mM		Pufferkonzentration	50 mM	
pH-Wert des Puffers	5,3		pH-Wert des Puffers	5,3	
Injektionsvolumen	10 µL		Injektionsvolumen	50 µL	
Modulationszeit	2 Minuten		Detektor	Micromass QTOF	
Zeit [min]	ACN [%]	NH ₄ OAc [%]	Zeit [min]	MeOH [%]	NH ₄ OAc [%]
0	97	3	0	50	50
40	97	3	0,17	50	50
60	50	50	0,33	70	30
85	50	50	1,33	95	5
95	97	3	1,50	95	5
140	97	3	1,75	50	50
			2,00	50	50

Experimenteller Teil

Im Folgenden sind die Bedingungen zusammengefasst, welche für die Analysen mit einer Modulationszeit von 60 Sekunden verwendet wurden (Tabelle 26).

Tabelle 26: Chromatographische Parameter für die LCxLC-Analysen mit dem Waters/Shimadzu-System und optimierter Modulationszeit

1. Dimension ZIC®-HILIC			2. Dimension Reprospher C ₈ -Aqua		
Säulen-Dimension	250 x 2,1 mm		Säulen-Dimension	30 x 4,6 mm	
Flussrate	0,025 mL/min		Flussrate	3 mL/min	
Pumpe	Waters		Pumpe	Shimadzu	
Pufferkonzentration	50 mM		Pufferkonzentration	50 mM	
pH-Wert des Puffers	5,3		pH-Wert des Puffers	5,3	
Injektionsvolumen	5 µL		Injektionsvolumen	25 µL	
Modulationszeit	1 Minute		Detektor	Micromass QTOF	
Zeit [min]	ACN [%]	NH ₄ OAc [%]	Zeit [min]	MeOH [%]	NH ₄ OAc [%]
0	97	3	0	50	50
10	97	3	0,05	50	50
60	85	15	0,10	70	30
100	85	15	0,60	95	5
120	70	30	0,70	95	5
140	70	30	0,80	50	50
160	97	3	1,00	50	50
180	97	3			

Im Folgenden sind die chromatographischen Parameter sowie die verwendeten Gradienten für die erste und zweite Dimension der LCxLC-Analyse unter Verwendung des Agilent-Systems 1 und 2 zusammengefasst (Tabelle 27).

Tabelle 27: Chromatographische Parameter für die LCxLC-Analysen mit dem Agilent-System 1 und 2

Agilent-System 1					
1. Dimension ZIC®-HILIC			2. Dimension Reprospher C ₈ -Aqua		
Säulen-Dimension	250 x 2,1 mm		Säulen-Dimension	30 x 4,6 mm	
Flussrate	0,025 mL/min		Flussrate	3 mL/min	
Pumpe	Agilent 1290		Pumpe	Agilent 1290	
Pufferkonzentration	50 mM		Pufferkonzentration	10 mM	
pH-Wert des Puffers	5,3		pH-Wert des Puffers	5,3	
Injektionsvolumen	5 µL		Injektionsvolumen	25 µL	
Modulationszeit	1 Minute		Detektor	Agilent 6538	
Agilent-System 2					
1. Dimension ZIC®-HILIC			2. Dimension Reprospher C ₈ -Aqua		
Säulen-Dimension	250 x 2,1 mm		Säulen-Dimension	30 x 4,6 mm	
Flussrate	0,025 mL/min		Flussrate	3 mL/min	
Pumpe	Agilent 1260		Pumpe	Agilent 1290	
Pufferkonzentration	50 mM		Pufferkonzentration	10 mM	
pH-Wert des Puffers	5,3		pH-Wert des Puffers	5,3	
Injektionsvolumen	5 µL		Injektionsvolumen	25 µL	
Modulationszeit	1 Minute		Detektor	Agilent 6530	
Zeit [min]	ACN [%]	NH ₄ OAc [%]	Zeit [min]	MeOH [%]	NH ₄ OAc [%]
0	97	3	0	50	50
10	97	3	0,05	50	50
60	85	15	0,10	70	30
100	85	15	0,60	95	5
120	70	30	0,70	95	5
140	70	30	0,80	50	50
160	97	3	1,00	50	50
180	97	3			

Experimenteller Teil

Im Folgenden sind die optimierten Parameter zusammengefasst, welche unter Verwendung einer Modulationszeit von 30 Sekunden eingesetzt wurden (Tabelle 28). Diese Parameter wurden sowohl zur Analyse des Standgemisches als auch zur Analyse von Realproben aus dem Home Care Bereich verwendet.

Tabelle 28: Chromatographische Parameter für die LCxLC-Analysen mit dem Agilent-System 2 und optimierter Modulationszeit

1. Dimension ZIC®-HILIC			2. Dimension Reprospher C ₈ -Aqua		
Säulen-Dimension	250 x 2,1 mm		Säulen-Dimension	30 x 4,6 mm	
Flussrate	0,025 mL/min		Flussrate	4 mL/min	
Pumpe	Agilent 1260		Pumpe	Agilent 1290	
Pufferkonzentration	50 mM		Pufferkonzentration	10 mM	
pH-Wert des Puffers	5,3		pH-Wert des Puffers	5,3	
Injektionsvolumen	5 µL		Injektionsvolumen	12,5 µL	
Modulationszeit	30 Sekunden		Detektor	Agilent 6530	
Zeit [min]	ACN [%]	NH ₄ OAc [%]	Zeit [min]	MeOH [%]	NH ₄ OAc [%]
0	97	3	0	50	50
10	97	3	0,05	70	30
60	85	15	0,33	95	5
100	85	15	0,38	95	5
120	70	30	0,4	50	50
140	70	30	0,5	50	50
160	97	3			
180	97	3			

Zur Bestimmung der Präzision von Retentionszeit und Peakfläche wurde in der ersten Dimension die Flussrate auf 0,05 mL/min erhöht. Im Folgenden sind die chromatographischen Bedingungen für diese Analysen unter Verwendung des Agilent-Systems 1 zusammengefasst (Tabelle 29).

Tabelle 29: Chromatographische Parameter für die LCxLC-Analysen mit dem Agilent-System 1 und einer Flussrate von 0,05 mL/min in der ersten Dimension

1. Dimension ZIC®-HILIC			2. Dimension Reprospheer C ₈ -Aqua		
Säulen-Dimension	250 x 2,1 mm		Säulen-Dimension	30 x 4,6 mm	
Flussrate	0,05 mL/min		Flussrate	4 mL/min	
Pumpe	Agilent 1290		Pumpe	Agilent 1290	
Pufferkonzentration	50 mM		Pufferkonzentration	10 mM	
pH-Wert des Puffers	5,3		pH-Wert des Puffers	5,3	
Injektionsvolumen	5 µL		Injektionsvolumen	25 µL	
Modulationszeit	30 Sekunden		Detektor	Agilent 6538	
Zeit [min]	ACN [%]	NH ₄ OAc [%]	Zeit [min]	MeOH [%]	NH ₄ OAc [%]
0	97	3	0	50	50
5	97	3	0,05	70	30
30	85	15	0,33	95	5
50	85	15	0,38	95	5
60	70	30	0,4	50	50
70	70	30	0,5	50	50
75	97	3			
90	97	3			

Experimenteller Teil

Im Folgenden sind die chromatographischen Parameter für die Trennung mit der Luna NH₂ in HILIC-Modus zusammengestellt (Tabelle 30).

Tabelle 30: Chromatographische Parameter für Trennung mit Luna NH₂ im HILIC-Modus

Flussrate	0,2 mL/min	
Pufferkonzentration	50 mM	
pH-Wert des Puffers	5,3	
Injektionsvolumen	2 µL	
Zeit [min]	ACN [%]	NH₄OAc [%]
0	95	5
6,5	95	5
20,0	70	30
23,5	70	30
30,0	95	5
40,0	95	5

7.5 Parameter für Neue-Test

Tabelle 31 fasst die chromatographischen Parameter für den Neue-Test zusammen.

Tabelle 31: Chromatographische Parameter für den Neue-Test

Zusammensetzung mobile Phase	35% Puffer : 65% MeOH
Puffer	K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄
Pufferkonzentration	20 mM
pH-Wert des Puffers	7,0
Injektionsvolumen	10 µL
Flussrate	1,4 mL/min

Im Folgenden sind die Substanzen und die verwendeten Konzentrationen für den Neue-Test zusammengestellt (Tabelle 32). Die Struktur der Substanzen ist außerdem in Abbildung 62 dargestellt.

Tabelle 32: Analyten für den Neue-Test

Substanz	Konzentration [mg/mL]	Eigenschaft
Uracil	16	Totzeitmarker
Naphthalin	60	Hydrophobe Substanz
Acenaphthen	200	Hydrophobe Substanz
Propranolol	400	Basische Substanz
Amitriptylin	100	Basische Substanz
Butylparaben	20	Marker für polare Selektivität
Dipropylphthalat	340	Marker für polare Selektivität

7.6 Parameter für Fließinjektion

Die Analyten, welche in einer Konzentration von 1 µg/mL vorlagen, wurden mit einer Spritzenpumpe über ein T-Stück kontinuierlich zu einem konstanten Fluss einer HPLC-Pumpe gegeben und in die Ionenquelle des Massenspektrometers geleitet.

Tabelle 33: Parameter für Fließinjektion

Konzentration der Analyten	10 µg/mL
Fluss HPLC-Pumpe	0,2 mL/min
Mobile Phase	50% MeOH : 50% NH ₄ OAc
Pufferkonzentration	50 mM
pH-Wert des Puffers	5,3
Fluss Spritzenpumpe	0,02 mL/min

8 Anhang

8.1 Weitere Chromatogramme, Abbildungen und Tabellen

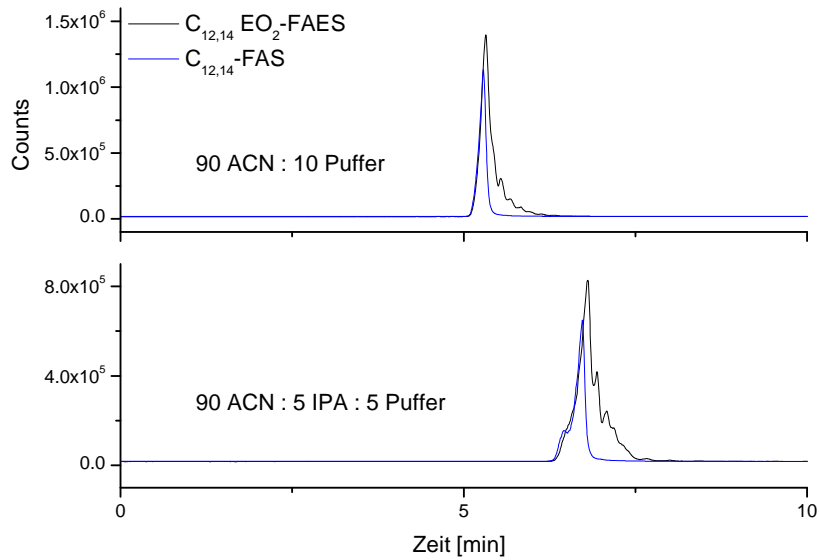


Abbildung 60: Optimierung der Trennung von FAS und FAES - Substitution eines Teils des Wassers durch Isopropanol

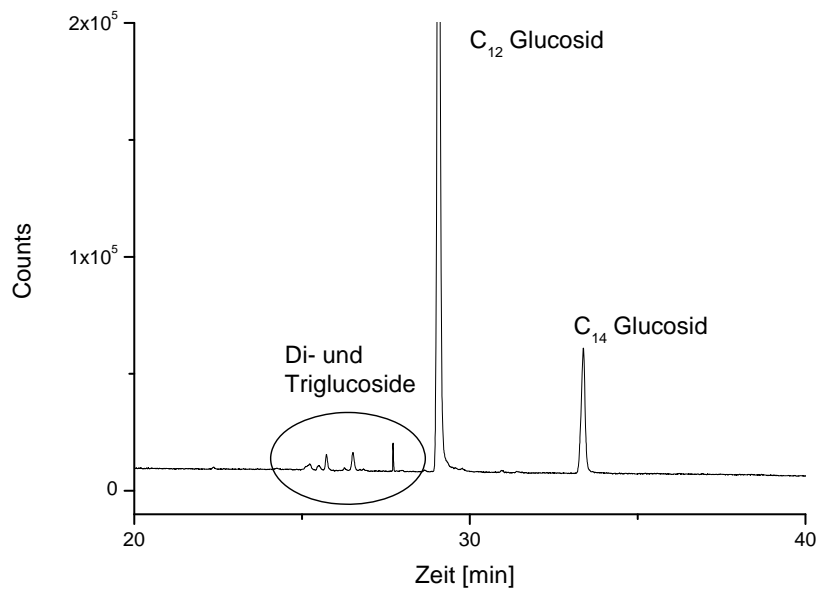
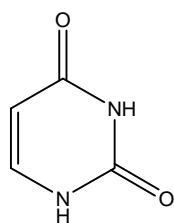
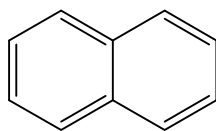


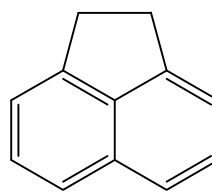
Abbildung 61: Vergrößerter Ausschnitt der Analyse von AG unter Verwendung des Standardgradienten für RP-Trennungen



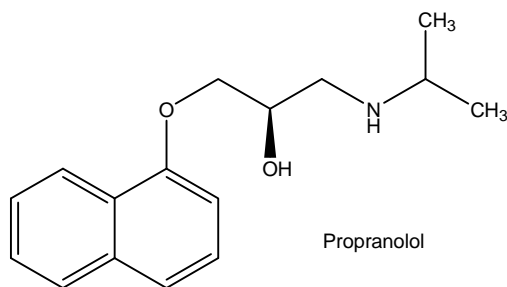
Uracil



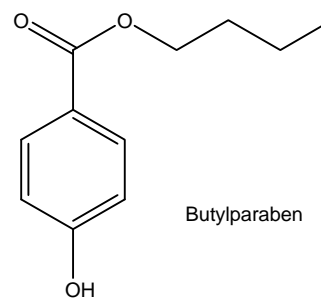
Naphthalin



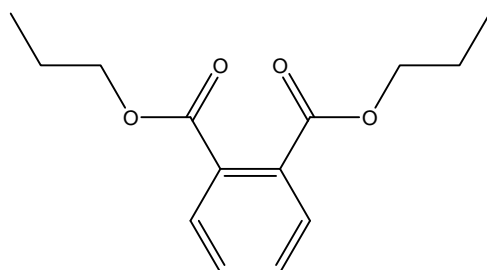
Acenaphthen



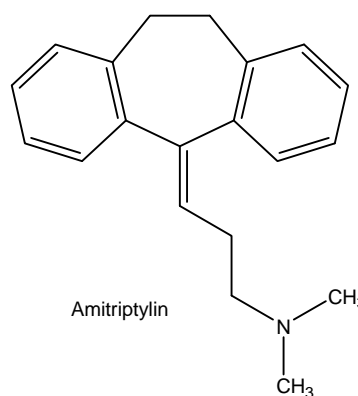
Propranolol



Butylparaben



Dipropylphthalat



Amitriptylin

Abbildung 62: Substanzen für den Neue-Test

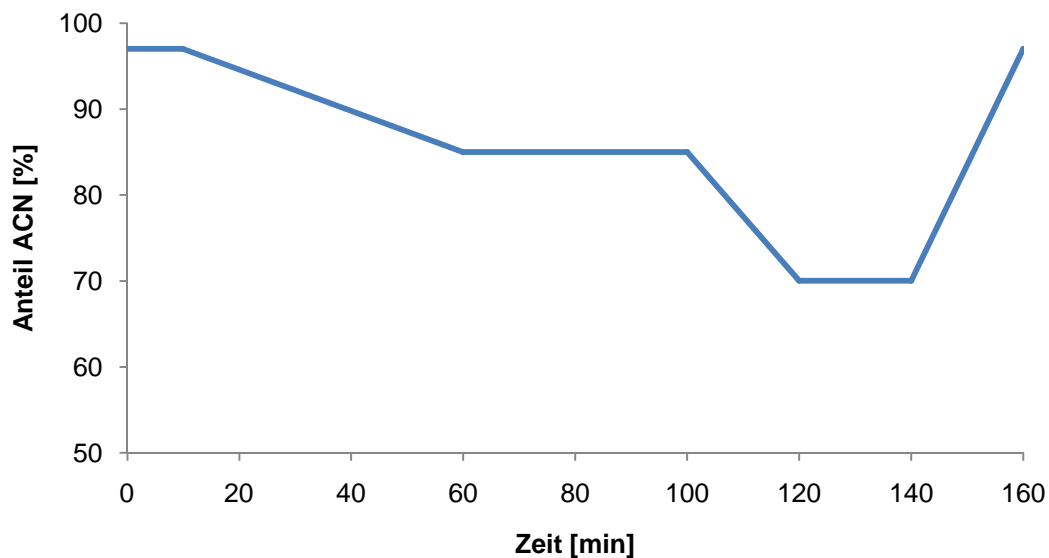


Abbildung 63: Gradientenverlauf der ersten Dimension bei den LCxLC-Analysen

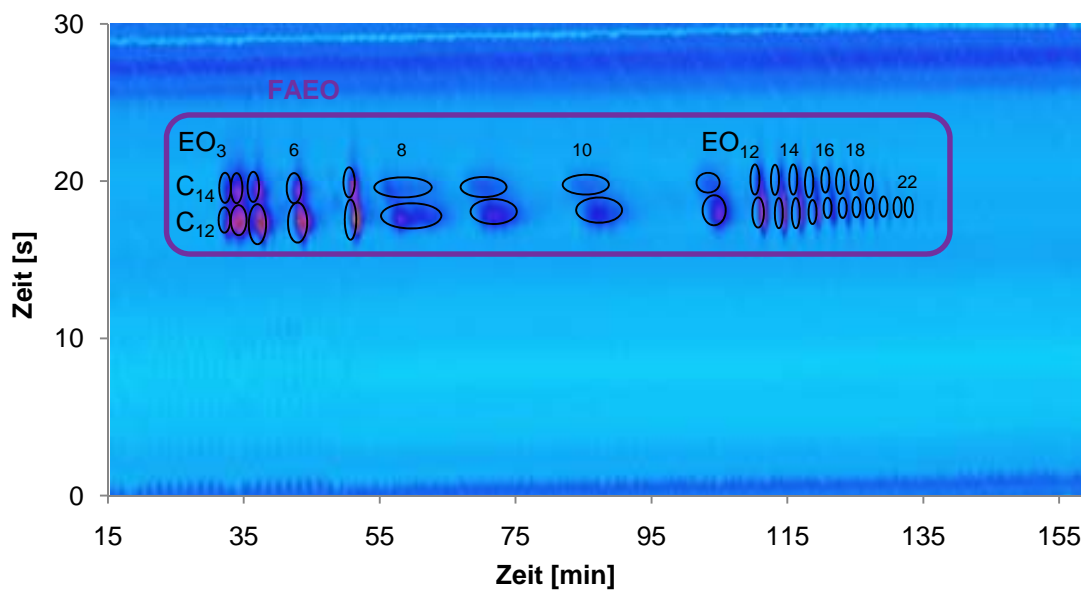


Abbildung 64: LCxLC-Analyse von P 2; 1. Dim.: ZIC®-HILIC, 250 x 2,1 mm, 2. Dim.: Reprospher C₈-Aqua, 30 x 4,6 mm; Modulation: 30 s; System: Agilent 2, ESI-positiv

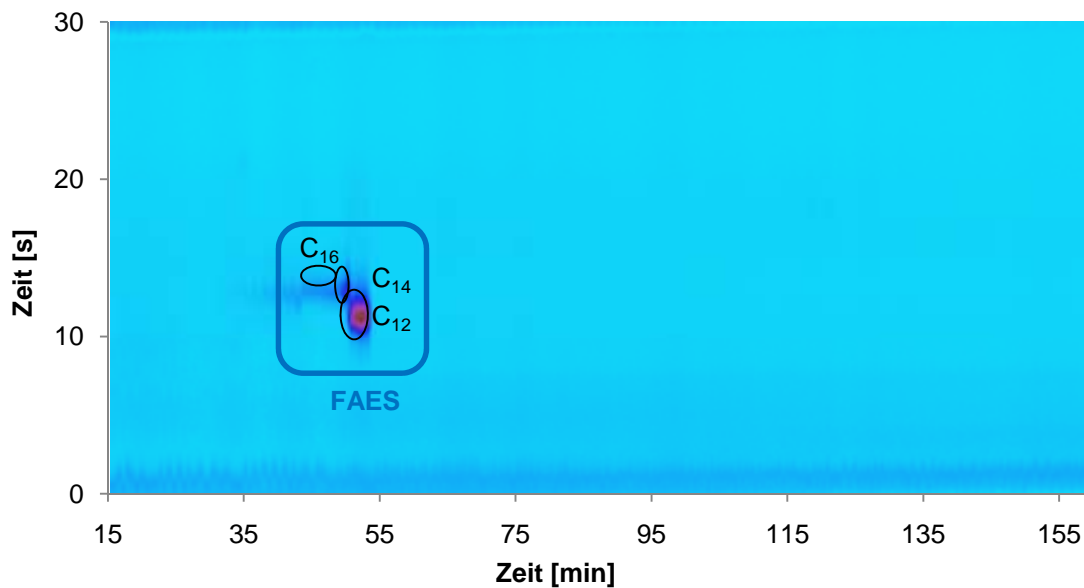


Abbildung 65: LCxLC-Analyse von P 2; 1. Dim.: ZIC[®]-HILIC, 250 x 2,1 mm, 2. Dim.: Reprospher C₈-Aqua, 30 x 4,6 mm; Modulation: 30 s; System: Agilent 2, ESI-negativ

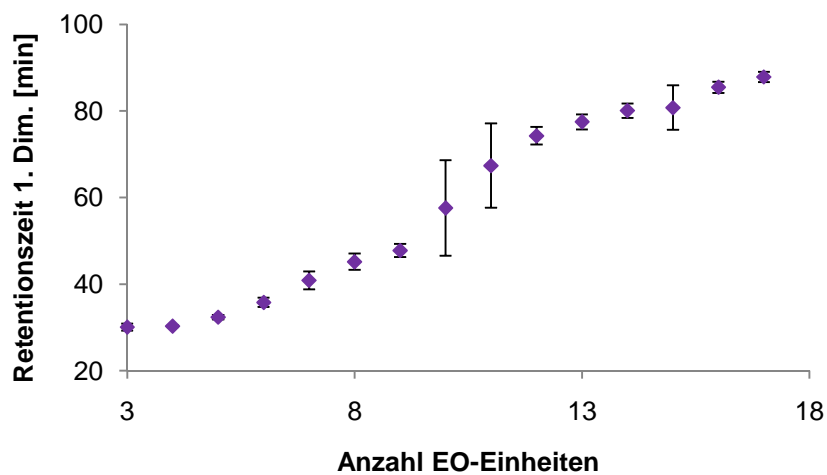


Abbildung 66: Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der 1. Dim. für die C₁₄-FAEO mit n = 5

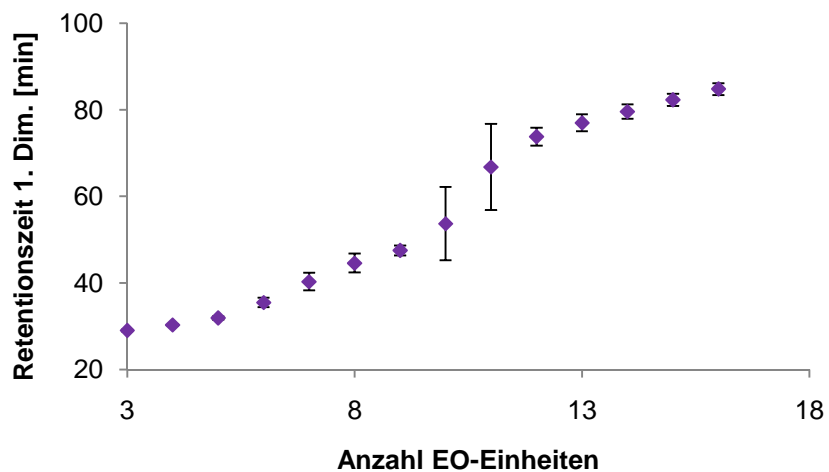


Abbildung 67: Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der 1. Dim. für die C₁₆-FAEO mit n = 5

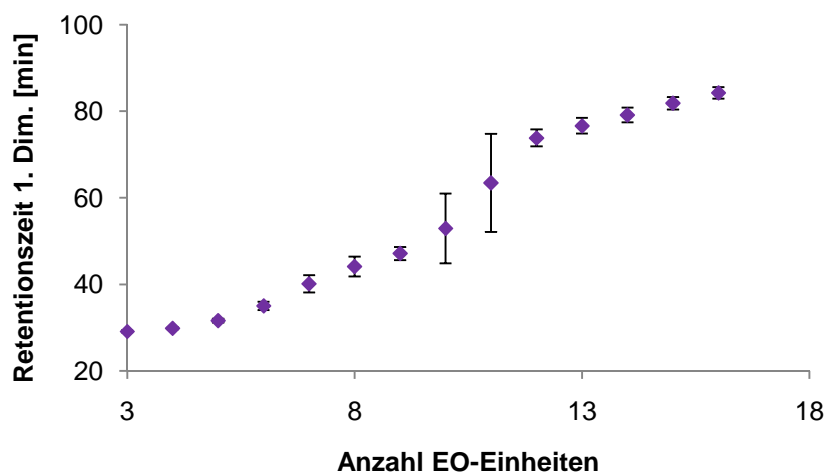


Abbildung 68: Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der 1. Dim. für die C₁₈-FAEO mit n = 5

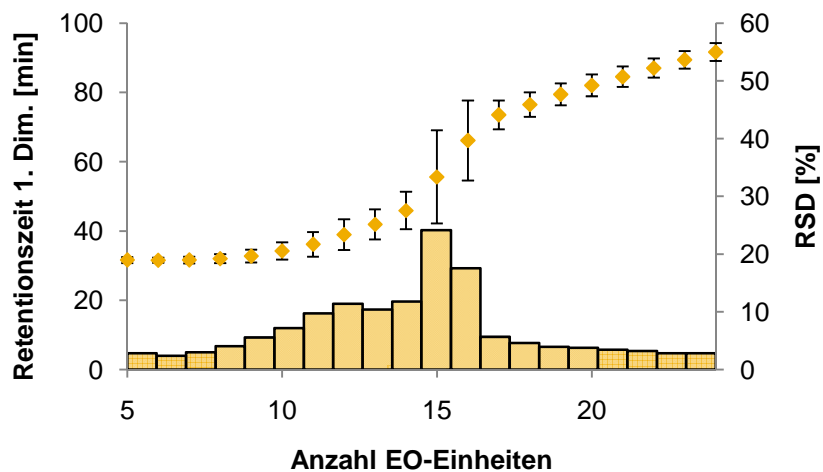


Abbildung 69: Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der 1. Dim. für die C₁₂-FAES mit n = 5 und zugehöriger relativer Standardabweichung (Balkendiagramm)

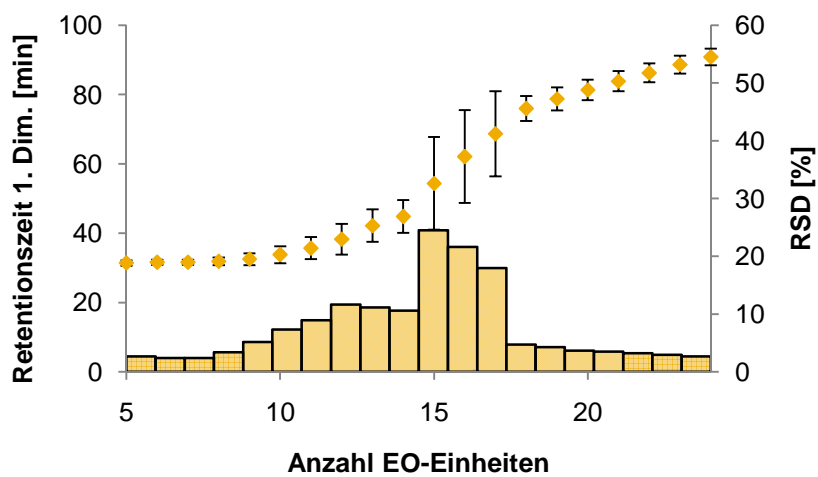


Abbildung 70: Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der 1. Dim. für die C₁₄-FAES mit n = 5 und zugehöriger relativer Standardabweichung (Balkendiagramm)

Anhang

Tabelle 34: Relative Standardabweichung der Peakflächen für die FAEO; 0,025 mL/min mit n = 5 (Bed. 1)

FAEO	Alkylrest C₁₂	Alkylrest C₁₄	Alkylrest C₁₆	Alkylrest C₁₈
EO- Grad	RSD von A [%]	RSD von A [%]	RSD von A [%]	RSD von A [%]
3	22,4	8,2	10,9	11,1
4	12,6	8,2	11,6	9,5
5	5,6	4,6	11,0	10,8
6	5,7	6,6	11,7	16,0
7	4,1	11,3	13,4	10,9
8	5,2	8,8	8,5	9,9
9	6,4	8,2	11,8	16,7
10	6,3	9,7	13,2	10,8
11	4,9	2,5	12,2	12,9
12	3,5	3,3	9,3	8,9
13	3,9	7,4	8,4	8,9
14	5,4	7,2	9,9	10,2
15	3,9	7,5	10,6	11,7
16	5,5	6,6	8,5	9,9
17	6,4	6,5		
18	5,1			

Tabelle 35: Relative Standardabweichung der Peakflächen für die FAES; 0,025 mL/min mit n = 5 (Bed. 1)

FAES	Alkylrest C ₁₂	Alkylrest C ₁₄
EO- Grad	RSD von A [%]	RSD von A [%]
5	9,3	13,0
6	6,4	5,4
7	11,5	5,8
8	10,1	5,2
9	9,0	6,0
10	7,3	8,1
11	7,1	7,1
12	7,3	5,3
13	18,7	7,9
14	6,6	7,8
15	4,4	6,1
16	12,0	8,5
17	6,8	4,5
18	5,3	4,9
19	7,5	6,9
20	3,9	6,4
21	3,6	5,8
22	3,1	3,9
23	6,5	9,3
24	8,9	13,0

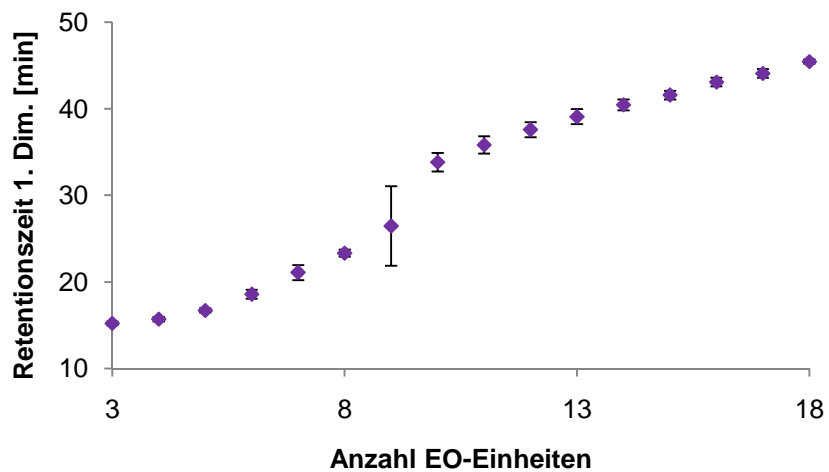


Abbildung 71: Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der 1. Dim. für die C₁₂-FAEO; 0,05 mL/min mit n = 4 (Bed. 2)

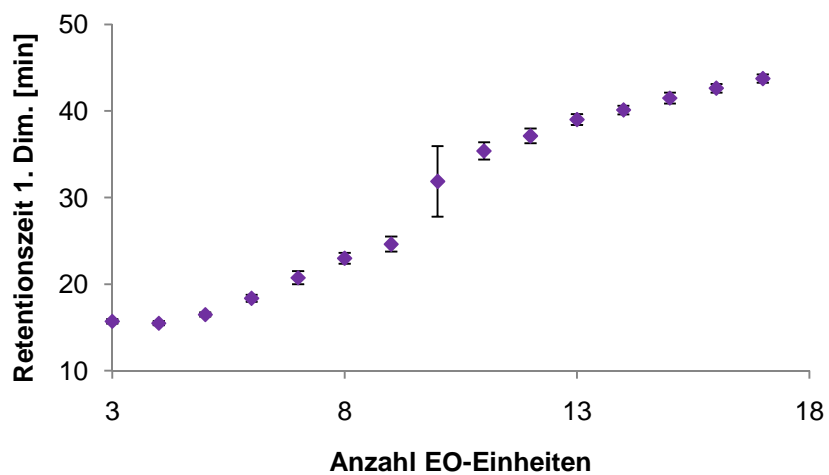


Abbildung 72: Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der 1. Dim. für die C₁₄-FAEO; 0,05 mL/min mit n = 4 (Bed. 2)

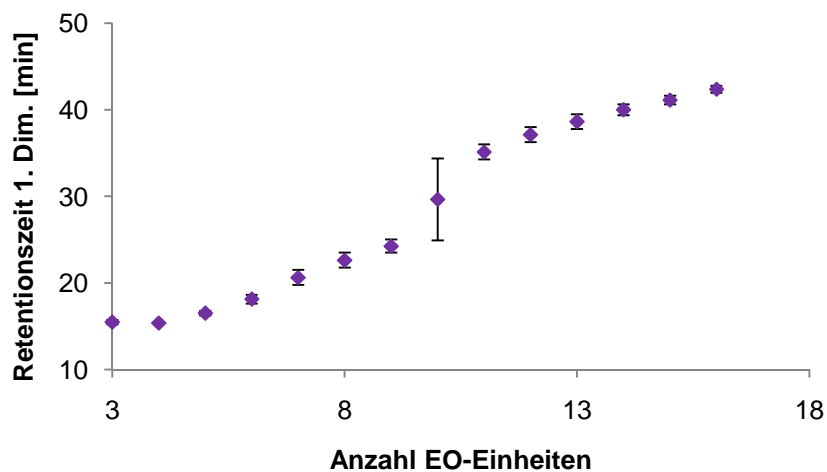


Abbildung 73: Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der 1. Dim. für die C₁₆-FAEO; 0,05 mL/min mit n = 4 (Bed. 2)

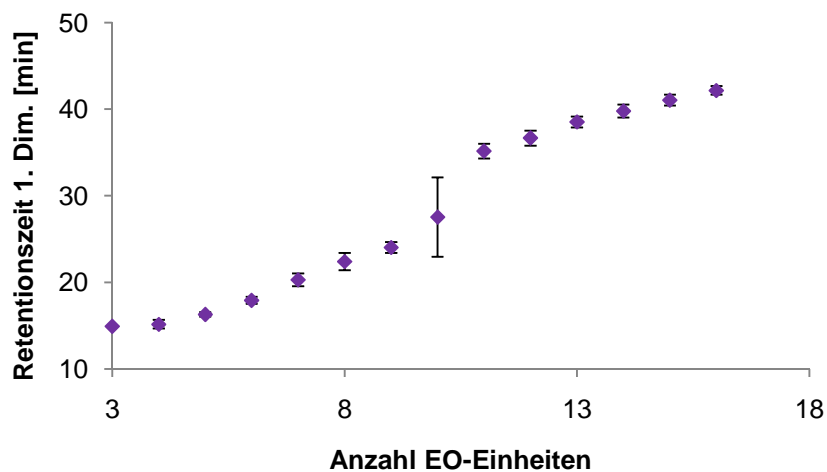


Abbildung 74: Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der 1. Dim. für die C₁₈-FAEO; 0,05 mL/min mit n = 4 (Bed. 2)

Tabelle 36: Relative Standardabweichung der Retentionszeiten in der 1. Dim. für die FAEO;
0,05 mL/min mit n = 4 (Bed. 2)

FAEO	Alkylrest C ₁₂	Alkylrest C ₁₄	Alkylrest C ₁₆	Alkylrest C ₁₈
EO- Grad	RSD von t _R [%]	RSD von t _R [%]	RSD von t _R [%]	RSD von t _R [%]
3	1,5	1,6	1,6	0,0
4	1,6	1,6	0,0	3,3
5	1,5	1,5	1,5	1,5
6	2,7	2,2	2,8	2,3
7	4,1	3,6	4,2	3,7
8	1,7	2,7	3,8	4,5
9	17,4	3,5	3,1	2,6
10	3,2	12,7	16,0	16,7
11	2,8	2,8	2,5	2,5
12	2,3	2,3	2,3	2,4
13	2,2	1,6	2,2	1,6
14	1,6	1,2	1,6	1,9
15	1,2	1,5	1,2	1,5
16	1,2	1,2	1,0	1,2
17	1,1	1,1		
18	0,5			

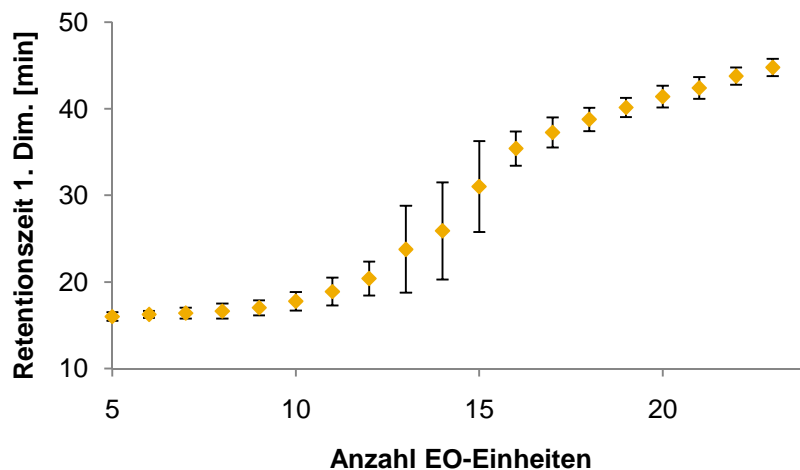


Abbildung 75: Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der 1. Dim. für die C₁₂-FAES; 0,05 mL/min mit n = 4 (Bed. 2)

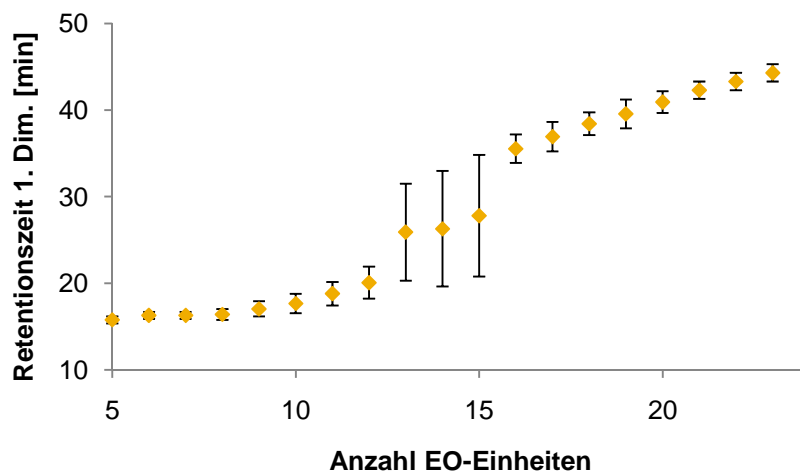


Abbildung 76: Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der 1. Dim. für die C₁₄-FAES; 0,05 mL/min mit n = 4 (Bed. 2)

Tabelle 37: Relative Standardabweichung der Retentionszeiten in der 1. Dim. für die FAES; 0,05 mL/min mit n = 4 (Bed. 2)

FAES	Alkylrest C ₁₂	Alkylrest C ₁₄
EO- Grad	RSD von t _R [%]	RSD von t _R [%]
5	3.2	2.6
6	2.5	2.5
7	3.8	2.5
8	5.1	3.8
9	5.1	5.1
10	6.1	6.3
11	8.5	7.2
12	9.7	9.2
13	21.1	21.7
14	21.7	25.4
15	16.9	25.3
16	5.6	4.7
17	4.7	4.6
18	3.5	3.4
19	2.7	4.2
20	3.0	3.1
21	3.0	2.4
22	2.3	2.3
23	2.2	2.3
24	2.2	2.1

Tabelle 38: Relative Standardabweichung der Peakflächen für die FAEO; 0,05 mL/min mit n = 4 (Bed. 2)

FAEO	Alkylrest C ₁₂	Alkylrest C ₁₄	Alkylrest C ₁₆	Alkylrest C ₁₈
EO- Grad	RSD von A [%]	RSD von A [%]	RSD von A [%]	RSD von A [%]
3	11,8	0,6	3,6	3,3
4	1,1	2,6	1,7	0,6
5	2,6	2,4	0,7	1,0
6	1,3	1,2	1,6	1,6
7	3,4	4,5	1,4	2,5
8	2,2	1,1	1,3	1,6
9	1,4	1,4	1,1	2,0
10	1,0	0,8	1,0	2,1
11	1,7	1,4	1,1	0,9
12	1,2	0,8	0,9	2,4
13	1,3	1,5	1,5	1,6
14	1,4	1,1	1,2	0,8
15	1,5	2,6	2,7	4,7
16	1,1	0,7	1,9	2,5
17	0,5	3,8		
18	2,3			

Anhang

Tabelle 39: Relative Standardabweichung der Peakflächen für die FAES; 0,05 mL/min mit n = 4 (Bed. 2)

FAES	Alkylrest C ₁₂	Alkylrest C ₁₄
EO- Grad	RSD von A [%]	RSD von A [%]
5	5,2	8,0
6	4,0	5,6
7	3,1	3,8
8	3,0	4,7
9	2,6	1,1
10	1,4	1,2
11	2,6	1,5
12	4,3	4,2
13	6,7	5,6
14	4,1	2,5
15	2,6	4,5
16	3,4	1,5
17	6,5	6,5
18	2,7	4,4
19	3,2	3,9
20	2,9	2,5
21	3,6	6,4
22	3,0	1,2
23	2,7	2,1
24	2,2	3,8

Tabelle 40: Ermittelte Korrelationskoeffizienten der Betaine für die einzelnen Alkylketten-Homologen

	RSD von A [%]	Korrelationskoeffizient
C₈-Betain	5,4	0,990
C₁₀-Betain	4,7	0,987
C₁₂-Betain	4,5	0,984
C₁₄-Betain	2,0	0,980
C₁₆-Betain	4,1	0,979
C₁₈-Betain	1,5	0,980

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Tenside an Wasseroberflächen a) und Tensidmoleküle in Wasser als Mizelle b) nach [6].....	2
Abbildung 2:	Rohstoffkreislauf in der Oleochemie nach [12]	4
Abbildung 3:	Anionische Tenside.....	6
Abbildung 4:	Prinzip der Verseifung mit Natronlauge.....	7
Abbildung 5:	Herstellung von FAS	8
Abbildung 6:	Nichtionische Tenside	9
Abbildung 7:	Herstellung von FAEO.....	9
Abbildung 8:	Herstellung von AG.....	10
Abbildung 9:	Amphotere Tenside	12
Abbildung 10:	Herstellung eines Carbobetains	12
Abbildung 11:	Aufbau eines ELSD nach [84].....	16
Abbildung 12:	Allgemeiner Aufbau eines Massenspektrometers	17
Abbildung 13:	ESI-Interface nach [112].....	19
Abbildung 14:	APCI-Interface nach [116].....	19
Abbildung 15:	Aufbau eines QTOF-Massenspektrometers nach [119]	21
Abbildung 16:	Beispiel einer Kalibrierfunktion für ein Polymer mit der SEC (A), der LCCC (B) und der LAC (C) nach [167]	28
Abbildung 17:	2D-LC mit der heart-cutting Technik (LC-LC) nach [188]	30
Abbildung 18:	Comprehensive 2D-LC (LCxLC) nach [193]	31
Abbildung 19:	Darstellung der Einzelchromatogramme einer LCxLC-Messung als Konturplot nach [193].....	33
Abbildung 20:	Analyse von C _{12,14} -FAS unter Verwendung des Standardgradienten für HILIC-Trennungen, Detektor: ELSD	39
Abbildung 21:	FAS mit C ₈ , C ₁₂ und C ₁₄ als Alkylkettenlänge; isokratisch 90% ACN : 10% NH ₄ OAc, Detektor: ELSD.....	40

Abbildung 22: Analyse von C _{12,14} EO ₁₂ -FAES unter Verwendung des Standardgradienten für HILIC-Trennungen, Detektor: ELSD	41
Abbildung 23: Analyse von FAES mit unterschiedlichem EO-Grad unter isokratischen Bedingungen, Detektor: ELSD	41
Abbildung 24: Variation des pH-Wertes bei 90% ACN und 10% NH ₄ OAc	43
Abbildung 25: Analyse von C ₁₂₋₁₈ EO ₇ -FAEO unter Verwendung des Standardgradienten für HILIC-Trennungen, Detektor: ELSD	44
Abbildung 26: Analyse von C _{12,14} -AG unter Verwendung des Standardgradienten für HILIC-Trennungen, Detektor: ELSD	46
Abbildung 27: Analyse von C ₈₋₁₈ -Betains unter Verwendung des Standardgradienten für HILIC-Trennungen, Detektor: ELSD	47
Abbildung 28: Trennung des Standardgemisches 1 unter Verwendung des HILIC-Standardgradienten, Detektor: ELSD	49
Abbildung 29: Analyse von FAS, FAES, FAEO, AG und Betainen unter Verwendung des Standardgradienten für RP-Trennungen; Phasenmaterial: ReproSil-Pur® C ₁₈ AQ, Detektor: ELSD	51
Abbildung 30: Trennung des Standardgemisches 1 unter Verwendung des Standardgradienten für RP-Trennungen; Phasenmaterial: ReproSil-Pur® C ₁₈ AQ, Detektor: ELSD	52
Abbildung 31: Analyse von FAS, FAES, FAEO, AG und Betainen unter Verwendung des Standardgradienten für RP-Trennungen; Phasenmaterial: Reprospher 100 C ₈ -Aqua, Detektor: ELSD	53
Abbildung 32: Trennung des Standardgemisches 2 unter Verwendung des Standardgradienten für RP-Trennungen; Phasenmaterial: Reprospher 100 C ₈ -Aqua, Detektor: ELSD	54
Abbildung 33: Trennung von C ₁₂₋₁₈ -FAEO unter Verwendung des Standardgradienten für RP-Trennungen; Variation des organischen Anteils in der mobilen Phase (ACN, 50% ACN : 50% IPA, MeOH), Detektor: ELSD	56

- Abbildung 34: Trennung des Standardgemisches 1; Gradient aus MeOH/NH₄OAc von 50% nach 95% MeOH in 30 Minuten (Details s. 7.4.3); Phasenmaterial: Reprospher 100 C₈-Aqua, Detektor: ELSD..... 57
- Abbildung 35: Trennung des Standardgemisches 1 unter Verwendung des RP-Standardgradienten; Phasenmaterialen: ReproSil-Fluosil[®] NE, Fluofix[®] N und Fluofix[®] E, Detektor: ELSD..... 58
- Abbildung 36: Analyse von FAS, FAES, FAEO, AG und Betainen unter Verwendung des Standardgradienten für RP-Trennungen; Phasenmaterial: Acclaim[®] Surfactant, Detektor: ELSD 59
- Abbildung 37: Hydrophobe Eigenschaften von sechs RP-Materialien mit dem Neue-Test bestimmt..... 63
- Abbildung 38: Silanol-Aktivität bei pH 7 von sechs RP-Materialien mit dem Neue-Test bestimmt..... 64
- Abbildung 39: Erweiterte polare Selektivität bei pH 7 von sechs RP-Materialien mit dem Neue-Test bestimmt..... 65
- Abbildung 40: Phenolische Selektivität von sechs RP-Materialien mit dem Neue-Test bestimmt..... 66
- Abbildung 41: Massenspektren der 5 Tenside; Ionisation mittels APCI-positiv 68
- Abbildung 42: Massenspektren der 5 Tenside; Ionisation mittels APCI-negativ 69
- Abbildung 43: Massenspektren der 5 Tenside; Ionisation mittels ESI-positiv..... 71
- Abbildung 44: Massenspektren der 5 Tenside; Ionisation mittels ESI-negativ..... 72
- Abbildung 45: LCxLC-Analyse des Tensidgemisches; 1. Dim.: ZIC[®]-HILIC, 250 x 2,1 mm, 2. Dim.: Reprospher C₈-Aqua, 50 x 4,6 mm; Modulation: 2 min; System: Waters/Shimadzu 75
- Abbildung 46: LCxLC-Analyse des Tensidgemisches; 1. Dim.: ZIC[®]-HILIC, 250 x 2,1 mm, 2. Dim.: Reprospher C₈-Aqua, 30 x 4,6 mm; Modulation: 1 min; System: Waters/Shimadzu 79

Abbildung 47:	LCxLC-Analyse des Tensidgemisches; 1. Dim.: ZIC®-HILIC, 250 x 2,1 mm, 2. Dim.: Reprospher C ₈ -Aqua, 30 x 4,6 mm; Modulation: 1 min; System: Agilent 1	80
Abbildung 48:	LCxLC-Analyse des Tensidgemisches; 1. Dim.: ZIC®-HILIC, 250 x 2,1 mm, 2. Dim.: Reprospher C ₈ -Aqua, 30 x 4,6 mm; Modulation: 1 min; System: Agilent 2	82
Abbildung 49:	LCxLC-Analyse des Tensidgemisches; 1. Dim.: ZIC®-HILIC, 250 x 2,1 mm, 2. Dim.: Reprospher C ₈ -Aqua, 30 x 4,6 mm; Modulation: 30 s; System: Agilent 2.....	83
Abbildung 50:	LCxLC-Analyse des FAEO; 1. Dim.: ZIC®-HILIC, 250 x 2,1 mm, 2. Dim.: Reprospher C ₈ -Aqua, 30 x 4,6 mm; Modulation: 1 min; System: Agilent 2; Detektor: ELSD	85
Abbildung 51:	LCxLC-Analyse von P 1; 1. Dim.: ZIC®-HILIC, 250 x 2,1 mm, 2. Dim.: Reprospher C ₈ -Aqua, 30 x 4,6 mm; Modulation: 30 s; System: Agilent 2	87
Abbildung 52:	Trennung eines FAES im HILIC-Modus; Phasenmaterial: Luna NH ₂ , Detektion: ELSD, ESI-negativ-MS, ESI-positiv-MS.....	88
Abbildung 53:	Massenspektrum (ESI-positiv) der FAEO	88
Abbildung 54:	LCxLC-Analyse von P 2; 1. Dim.: ZIC®-HILIC, 250 x 2,1 mm, 2. Dim.: Reprospher C ₈ -Aqua, 30 x 4,6 mm; Modulation: 30 s; System: Agilent 2, ESI-positiv und ESI-negativ	89
Abbildung 55:	Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der 1. Dim. für die Betaine mit n = 5	92
Abbildung 56:	Reproduzierbarkeit der Peakflächen für die Betaine mit n = 5	92
Abbildung 57:	Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der 1. Dim. für die C ₁₂ -FAEO mit n = 5.....	95
Abbildung 58:	Kalibriergerade des C ₁₂ -Betains	101
Abbildung 59:	Standardadditionsverfahren für das C ₁₆ EO ₈ -FAEO.....	102

Abbildung 60:	Optimierung der Trennung von FAS und FAES - Substitution eines Teils des Wassers durch Isopropanol	122
Abbildung 61:	Vergrößerter Ausschnitt der Analyse von AG unter Verwendung des Standardgradienten für RP-Trennungen.....	122
Abbildung 62:	Substanzen für den Neue-Test.....	123
Abbildung 63:	Gradientenverlauf der ersten Dimension bei den LCxLC-Analysen.....	124
Abbildung 64:	LCxLC-Analyse von P 2; 1. Dim.: ZIC®-HILIC, 250 x 2,1 mm, 2. Dim.: Reprospher C ₈ -Aqua, 30 x 4,6 mm; Modulation: 30 s; System: Agilent 2, ESI-positiv	124
Abbildung 65:	LCxLC-Analyse von P 2; 1. Dim.: ZIC®-HILIC, 250 x 2,1 mm, 2. Dim.: Reprospher C ₈ -Aqua, 30 x 4,6 mm; Modulation: 30 s; System: Agilent 2, ESI-negativ	125
Abbildung 66:	Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der 1. Dim. für die C ₁₄ -FAEO mit n = 5.....	125
Abbildung 67:	Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der 1. Dim. für die C ₁₆ -FAEO mit n = 5.....	126
Abbildung 68:	Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der 1. Dim. für die C ₁₈ -FAEO mit n = 5.....	126
Abbildung 69:	Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der 1. Dim. für die C ₁₂ -FAES mit n = 5 und zugehöriger relativer Standardabweichung (Balkendiagramm)	127
Abbildung 70:	Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der 1. Dim. für die C ₁₄ -FAES mit n = 5 und zugehöriger relativer Standardabweichung (Balkendiagramm)	127
Abbildung 71:	Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der 1. Dim. für die C ₁₂ -FAEO; 0,05 mL/min mit n = 4 (Bed. 2)	130
Abbildung 72:	Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der 1. Dim. für die C ₁₄ -FAEO; 0,05 mL/min mit n = 4 (Bed. 2)	130

Abbildung 73: Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der 1. Dim. für die C ₁₆ -FAEO; 0,05 mL/min mit n = 4 (Bed. 2)	131
Abbildung 74: Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der 1. Dim. für die C ₁₈ -FAEO; 0,05 mL/min mit n = 4 (Bed. 2)	131
Abbildung 75: Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der 1. Dim. für die C ₁₂ -FAES; 0,05 mL/min mit n = 4 (Bed. 2)	133
Abbildung 76: Reproduzierbarkeit der Retentionszeit in der 1. Dim. für die C ₁₄ -FAES; 0,05 mL/min mit n = 4 (Bed. 2)	133

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tensidverbrauch im Jahr 2009 [15]	5
Tabelle 2: Zusammensetzung von Fettsäuren (%) aus natürlichen Fetten und Ölen [5]	7
Tabelle 3: Standardgradient für HILIC-Trennungen.....	38
Tabelle 4: Zusammensetzung der Standardgemische der Tenside	48
Tabelle 5: Verwendete Umkehrphasen.....	50
Tabelle 6: Standardgradient für RP-Trennungen.....	50
Tabelle 7: Realproben zur Analyse mittels LCxLC	86
Tabelle 8: Mittelwerte (MW) (n = 5) der Retentionszeiten (t _R) in der 1. und 2. Dim. sowie der Peakflächen (A) mit zugehöriger relativer Standardabweichung (RSD) für die Betaine	93
Tabelle 9: Mittelwerte (MW) (n = 5) der Retentionszeiten (t _R) in der 1. und 2. Dim. sowie der Peakflächen (A) mit zugehöriger relativer Standardabweichung (RSD) für die FAS und AG.....	94
Tabelle 10: Verwendete Substanzen zur Auswertung der Reproduzierbarkeit für FAES und FAEO unterteilt in drei Bereiche.....	95

Tabelle 11: Mittelwerte (MW) (n = 5) der Retentionszeiten (t_R) in der 1. und 2. Dim. sowie der Peakflächen (A) mit zugehöriger relativer Standardabweichung (RSD) für jeweils drei Vertreter der FAES und FAEO.....	96
Tabelle 12: Vergleich der Reproduzierbarkeit von Retentionszeit (t_R) und Peakfläche (A) anhand der relativen Standardabweichung bei Variation der Flussrate in der 1. Dim. für die Betaine; 0,025 mL/min mit n = 5 (Bed.1) und 0,05 mL/min mit n = 4 (Bed. 2)	97
Tabelle 13: Vergleich der Reproduzierbarkeit von Retentionszeit (t_R) und Peakfläche (A) anhand der relativen Standardabweichung bei Variation der Flussrate in der 1. Dim. für die FAS und AG; 0,025 mL/min mit n = 5 (Bed. 1) und 0,05 mL/min mit n = 4 (Bed. 2).....	98
Tabelle 14: Vergleich der Reproduzierbarkeit von Retentionszeit (t_R) und Peakfläche (A) anhand der relativen Standardabweichung bei Variation der Flussrate in der 1. Dim. für die drei Vertreter der FAES und FAEO; 0,025 mL/min mit n = 5 (Bed. 1) und 0,05 mL/min mit n = 4 (Bed. 2)	99
Tabelle 15: Verwendete technische Standards der Tenside.....	107
Tabelle 16: Konzentrationen der Tenside in der Mischung bei Verwendung des Ultima™ API Massenspektrometers mit ESI-positiv als Ionisationsmethode.....	108
Tabelle 17: Angepasste Konzentration der Tenside in der Mischung bei Verwendung des Ultima™ API Massenspektrometers mit ESI-positiv als Ionisationsmethode.....	109
Tabelle 18: Angepasste Konzentration der Tenside in der Mischung bei Verwendung des Agilent 6538 Ultra High Definition Accurate-Mass QTOF mit ESI-positiv als Ionisationsmethode.....	109
Tabelle 19: Konzentration der Tenside in der Mischung bei Verwendung des Agilent 6530 Ultra High Definition Accurate-Mass QTOF mit ESI-positiv als Ionisationsmethode.....	110

Tabelle 20: Konzentration der Tenside in Mischung A – D zur Bestimmung der Kalibriergerade für die Betaine und für das Standardadditionsverfahren für C ₁₆ EO ₈ -FAEO	110
Tabelle 22: Verwendete Phasenmaterialien	113
Tabelle 23: Chromatographische Parameter für HILIC-Trennungen	114
Tabelle 24: Chromatographische Parameter für RP-Trennungen	114
Tabelle 25: Optimierter Gradient für RP-Trennungen	115
Tabelle 26: Chromatographische Parameter für die LCxLC-Analysen mit dem Waters/Shimadzu-System.....	115
Tabelle 27: Chromatographische Parameter für die LCxLC-Analysen mit dem Waters/Shimadzu-System und optimierter Modulationszeit.....	116
Tabelle 28: Chromatographische Parameter für die LCxLC-Analysen mit dem Agilent-System 1 und 2	117
Tabelle 29: Chromatographische Parameter für die LCxLC-Analysen mit dem Agilent-System 2 und optimierter Modulationszeit.....	118
Tabelle 30: Chromatographische Parameter für die LCxLC-Analysen mit dem Agilent-System 1 und einer Flussrate von 0,05 mL/min in der ersten Dimension	119
Tabelle 31: Chromatographische Parameter für Trennung mit Luna NH ₂ im HILIC-Modus	120
Tabelle 32: Chromatographische Parameter für den Neue-Test.....	120
Tabelle 33: Analyten für den Neue-Test.....	120
Tabelle 34: Parameter für Fließinjektion.....	121
Tabelle 35: Relative Standardabweichung der Peakflächen für die FAEO; 0,025 mL/min mit n = 5 (Bed. 1).....	128
Tabelle 36: Relative Standardabweichung der Peakflächen für die FAES; 0,025 mL/min mit n = 5 (Bed. 1).....	129
Tabelle 37: Relative Standardabweichung der Retentionszeiten in der 1. Dim. für die FAEO; 0,05 mL/min mit n = 4 (Bed. 2).....	132

Tabelle 38: Relative Standardabweichung der Retentionszeiten in der 1. Dim. für die FAES; 0,05 mL/min mit n = 4 (Bed. 2).....	134
Tabelle 39: Relative Standardabweichung der Peakflächen für die FAEO; 0,05 mL/min mit n = 4 (Bed. 2).....	135
Tabelle 40: Relative Standardabweichung der Peakflächen für die FAES; 0,05 mL/min mit n = 4 (Bed. 2).....	136
Tabelle 41: Ermittelte Korrelationskoeffizienten der Betaine für die einzelnen Alkylketten-Homologen	137

8.4 Literatur

- [1] B. Fabry, Surfactants - Properties, Raw-Materials, Production, Applications, *Chemie in Unserer Zeit* **1991**, 25, 214 - 222
- [2] H. Stache, Tensid Taschenbuch, **1979**, Carl Hanser Verlag; München, Wien
- [3] J. J. Morelli, G. Szajer, Analysis of surfactants: Part I, *Journal of Surfactants and Detergents* **2000**, 3, 539 - 552
- [4] J. J. Morelli, G. Szajer, Analysis of surfactants: Part II, *Journal of Surfactants and Detergents* **2001**, 4, 75 - 83
- [5] K. Kosswig, H. Stache, Die Tenside, **1993**, Carl Hanser Verlag; München, Wien
- [6] E. Goette, Vorschlaege zur Terminologie der grenzflaechenaktiven amphiphilen Verbindungen, *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **1960**, 62, 789 - 790
- [7] W. Gellendien, Aus der Geschichte der Seife, von ihrem Ursprung bis zum Industrieprodukt, *Fette Seifen Anstrichmittel* **1954**, 56, 170 - 176
- [8] H. Rehage, Biomimetic synthesis of nanomaterials - Self-organization of surfactants, *Chemie in Unserer Zeit* **2005**, 39, 36 - 44
- [9] T. Tadros, Surfactants, **1984**, Academic Press; London
- [10] G. Wagner, Waschmittel - Chemie, Umwelt, Nachhaltigkeit, **2010**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; Weinheim
- [11] K. Holmberg, Surfactants and polymers in aqueous solution, **2003**, John Wiley & Sons; Chichester, West Sussex, England
- [12] Cognis Deutschland GmbH & Co.KG, Handbuch - Cognis Kit für Haushalt & Kosmetik, **2002**
- [13] H. Eierdanz, Persepektiven nachwachsender Rohstoffe in der Chemie, **1996**, VCH Verlagsgesellschaft mbH; Weinheim
- [14] A. Behr, D. W. Agar, J. Jörissou, Einführung in die Technische Chemie, **2010**, Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg
- [15] H. Janshekar, Syed Q.A.Rizvi, Yoshio Inoguchi, Xiaomeng Ma, SCUP report Surfactants, *Specialty Chemicals* **2010**
- [16] H. Baumann, Neuere Entwicklungen auf dem Gebiet fettchemischer Tenside, *Lipid / Fett* **1990**, 92, 49 - 56

- [17] H. Stache, H. Großmann, *Waschmittel*, **1992**, Springer Verlag; Heidelberg, Berlin
- [18] T. J. Proffitt, H. T. Patterson, Oleochemical Surfactants and Lubricants in the Textile-Industry, *Journal of the American Oil Chemists Society* **1988**, *65*, 1682 - 1694
- [19] B. N. Jewett, L. Ramaley, J. C. T. Kwak, Atmospheric pressure ionization mass spectrometry techniques for the analysis of alkyl ethoxysulfate mixtures, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1999**, *10*, 529 - 536
- [20] W. E. Adam, K. Neumann, Alkylethersulfates - Review on Applications, *Fette Seifen Anstrichmittel* **1978**, *80*, 392 - 401
- [21] G. Czichocki, H. Bramer, I. Ohme, Production, Characterization and Analysis of Ether Sulfates, *Zeitschrift fur Chemie* **1980**, *20*, 90 - 94
- [22] E. Goette, Konstitution und Eigenschaften von Tensiden, *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **1969**, *71*, 219 - 223
- [23] M. F. Cox, Effect of Alkyl Carbon Chain-Length and Ethylene-Oxide Content on the Performance of Linear Alcohol Ether Sulfates, *Journal of the American Oil Chemists Society* **1989**, *66*, 1637 - 1646
- [24] Henkel & Cie GmbH, *Waschmittelchemie*, **1976**, Dr. Alfred Hüthig Verlag GmbH; Heidelberg
- [25] J. M. Quack, A. K. Reng, Secondary Alkanesulfonate - Properties and Applications in Cosmetic Preparations, *Fette Seifen Anstrichmittel* **1976**, *78*, 200 - 206
- [26] H. Ramloch, G. Tauber, Modern Methods of Commercial Chemistry - Sulfoxidation, *Chemie in Unserer Zeit* **1979**, *13*, 157 - 162
- [27] F. Asinger, Chemistry and Technology of Manufacture of Nonionic Surfactants, *Fette Seifen Anstrichmittel* **1973**, *75*, 559 - 571
- [28] G. M. Leuteritz, New Process Technology for A Safe and Environmentally Friendly Ethoxylation of Fatty Alcohols, *Fett Wissenschaft Technologie-Fat Science Technology* **1991**, *93*, 383 - 386
- [29] A. Behler, U. Ploog, Fatty Alcohol Ethoxylates with Narrow Range Homolog-Distribution - Development of New Catalysts for Alkoxylation, *Fett Wissenschaft Technologie-Fat Science Technology* **1990**, *92*, 109 - 114

- [30] M. F. Cox, The Effect of Peaking the Ethylene-Oxide Distribution on the Performance of Alcohol Ethoxylates and Ether Sulfates, *Journal of the American Oil Chemists Society* **1990**, *67*, 599 - 604
- [31] E. H. Crook, G. F. Trebbi, D. B. Fordyce, Molecular Weight Distribution of Nonionic Surfactants .3. Foam Wetting Detergency Emulsification + Solubility Properties of Normal Distribution + Homogeneous P,T-Octylphenoxyethoxyethanols, *Journal of the American Oil Chemists Society* **1964**, *41*, 231 - 237
- [32] T. Sato, Y. Saito, I. Anazawa, Polyoxyethylene Oligomer Distribution of Nonionic Surfactants, *Journal of the American Oil Chemists Society* **1988**, *65*, 996 - 999
- [33] Y. Saito, T. Sato, I. Anazawa, Effects of Molecular-Weight Distribution of Nonionic Surfactants on Stability of O/W Emulsions, *Journal of the American Oil Chemists Society* **1990**, *67*, 145 - 148
- [34] S. Matsumura, K. Imai, S. Yoshikawa, K. Kawada, T. Uchibori, Surface-Activities, Biodegradability and Antimicrobial Properties of Normal-Alkyl Glucosides, Mannosides and Galactosides, *Journal of the American Oil Chemists Society* **1990**, *67*, 996 - 1001
- [35] W. von Rybinski, K. Hill, Alkyl polyglycosides - Properties and applications of a new class of surfactants, *Angewandte Chemie-International Edition* **1998**, *37*, 1328 - 1345
- [36] N. Weber, Synthesis and Metabolism of Alkyl Beta-Glycosides, *Fette Seifen Anstrichmittel* **1984**, *86*, 585 - 591
- [37] F. A. Hughes, B. W. Lew, Physical and Functional Properties of Some Higher Alkyl Polyglucosides, *Journal of the American Oil Chemists Society* **1970**, *47*, 162 - 167
- [38] G. Czichocki, H. Fiedler, K. Haage, H. Much, S. Weidner, Characterization of alkyl polyglycosides by both reversed-phase and normal-phase modes of high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* **2002**, *943*, 241 - 250
- [39] M. Biermann, K. Schmid, P. Schulz, Alkylpolyglucosides - Technology and Properties, *Starch-Starke* **1993**, *45*, 281 - 288
- [40] C. Elfakir, M. Lafosse, Porous graphitized carbon and octadecyl-silica columns in the separation of some alkylglycoside detergents, *Journal of Chromatography A* **1997**, *782*, 191 - 198

- [41] C. F. Putnik, N. F. Borys, Alkyl Polyglycosides - New Generation Surfactants from Horizon, *Soap Cosmetics Chemical Specialties* **1986**, 62, 34 - 74
- [42] C. Nieendick, K. H. Schmid, Alkyl Polyglycosides - A New-Generation of Surfactants for the Use in Manual Dishwashing Agents, *Agro Food Industry Hi-Tech* **1995**, 6, 27 - 30
- [43] W. Miszkiewicz, J. Szymanowski, Analysis of nonionic surfactants with polyoxyethylene chains by high-performance liquid chromatography, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **1996**, 25, 203 - 246
- [44] K. Heinig, C. Vogt, G. Werner, Separation of nonionic surfactants by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography, *Analytical Chemistry* **1998**, 70, 1885 - 1892
- [45] R. Puchta, Cationic Surfactants in Laundry Detergents and Laundry After-Treatment Aids, *Journal of the American Oil Chemists Society* **1984**, 61, 367 - 376
- [46] R. Tyagi, V. K. Tyagi, R. K. Khanna, Synthesis, Characterization and Performance of Tallow Fatty Acids and Triethanolamine Based Esterquats, *Journal of Oleo Science* **2006**, 55, 337 - 345
- [47] H. Bueren, H. Großmann, Grenzflächenaktive Substanzen, **1971**, Verlag Chemie; Weinheim
- [48] W. H. Ding, Y. H. Liao, Determination of alkylbenzyltrimethylammonium chlorides in river water and sewage effluent by solid phase extraction and gas chromatography mass spectrometry, *Analytical Chemistry* **2001**, 73, 36 - 40
- [49] P. C. Tsai, W. H. Ding, Determination of alkyltrimethylammonium surfactants in hair conditioners and fabric softeners by gas chromatography-mass spectrometry with electron-impact and chemical ionization, *Journal of Chromatography A* **2004**, 1027, 103 - 108
- [50] A. Shansky, Cationic Salts in Hair Conditioners, *Drug & Cosmetic Industry* **1984**, 134, 42 - 110
- [51] B. R. Bluestein, C. L. Hilton, Amphoteric surfactants, **1982**, M. Dekker; New York
- [52] N. Parris, J. K. Weil, W. M. Linfield, Soap-Based Detergent Formulations .12. Alternate Syntheses of Surface-Active Sulfobetaines, *Journal of the American Oil Chemists Society* **1976**, 53, 60 - 63
- [53] N. Parris, J. K. Weil, W. M. Linfield, Soap-Based Detergent Formulations .18. Effect of Structure Variations on Surface-Active Properties of Sulfur-

- Containing Amphoteric Surfactants, *Journal of the American Oil Chemists Society* **1976**, *53*, 97 - 100
- [54] Alexander.P, Shampoos - Survey of Materials and Formulations, *Manufacturing Chemist and Aerosol News* **1971**, *42*, 27 - 47
- [55] D. L. Andersen, Ampholytic Surface-Active Agents, *Journal of the American Oil Chemists Society* **1957**, *34*, 188 - 191
- [56] G. Carminati, L. Cavalli, F. Buosi, Application of C-13 Nmr to the Identification of Surfactants in Mixture, *Journal of the American Oil Chemists Society* **1988**, *65*, 669 - 677
- [57] D. O. Hummel, Identification and analysis of surface-active agents by infrared and chemical methods, **1962**, Interscience Publishers; New York
- [58] Hans König, Neuere Methoden zur Analyse von Tensiden, **1971**, Springer Verlag; Berlin
- [59] H. Jork, Thin-layer chromatography: reagents and detection methods, **1990**, VCH; Weinheim (Federal Republic of Germany)
- [60] G. A. Cumme, E. Blume, R. Bublitz, H. Hoppe, A. Horn, Composition analysis of detergents of the polyoxyethylene type: comparison of thin-layer chromatography, reversed-phase chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* **1997**, *791*, 245 - 253
- [61] D. Frahne, S. Schmidt, H. G. Kuhn, Micro Separating Procedure for Surface-Active Agents by Combination of Carrier-Electrophoresis and Thin-Layer Chromatography I, *Fette Seifen Anstrichmittel* **1977**, *79*, 32 - 41
- [62] D. Frahne, S. Schmidt, H. G. Kuhn, Development of Microseparation Technique for Surfactants by Combined Carrier Electrophoresis and Thin-Layer Chromatography .2, *Fette Seifen Anstrichmittel* **1977**, *79*, 122 - 130
- [63] M. Kohler, B. Chalupka, A Contribution to the Thin-Layer Chromatography of Anionic Surfactants, *Fette Seifen Anstrichmittel* **1982**, *84*, 208 - 211
- [64] A. H. Silver, H. T. Kalinoski, Comparison of High-Temperature Gas-Chromatography and Co-2 Supercritical Fluid Chromatography for the Analysis of Alcohol Ethoxylates, *Journal of the American Oil Chemists Society* **1992**, *69*, 599 - 608
- [65] H. T. Rasmussen, A. M. Pinto, M. W. Demouth, P. Touretzky, B. P. Mcpherson, High-Temperature Gas-Chromatography of Trimethylsilyl Derivatives of

- Alcohol Ethoxylates and Ethoxysulfates, *Hrc-Journal of High Resolution Chromatography* **1994**, 17, 593 - 596
- [66] C. Asmussen, H. J. Stan, Determination of non-ionic surfactants of the alcohol polyethoxylate type by means of high temperature gas chromatography and atomic emission detection, *Hrc-Journal of High Resolution Chromatography* **1998**, 21, 597 - 604
- [67] J. Hubner, R. Taheri, D. Melchior, H. W. Kling, S. Gab, O. J. Schmitz, Analysis of tensides in complex samples with comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, 388, 1755 - 1762
- [68] V. Wulf, N. Wienand, M. Wirtz, H. W. Kling, S. Gab, O. J. Schmitz, Analysis of special surfactants by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* **2010**, 1217, 749 - 754
- [69] R. Duck, V. Wulf, M. Geissler, H. U. Baier, M. Wirtz, H. W. Kling, S. Gab, O. J. Schmitz, Combination of chemical and electron-impact ionisation with GCxGC-qMS for characterization of fatty alcohol alkoxyate polymers in the low-molecular-weight range up to 700 Da, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, 396, 2273 - 2283
- [70] P. Sandra, F. David, Microcolumn Chromatography for the Analysis of Detergents and Lubricants .1. High-Temperature Capillary Gas-Chromatography (Ht-Cgc) and Capillary Supercritical Fluid Chromatography (Csfc), *Hrc-Journal of High Resolution Chromatography* **1990**, 13, 414 - 417
- [71] J. M. Traverso-Soto, E. González-Mazo, P. Lara-Martín, Analysis of Surfactants in Environmental Samples by Chromatographic Techniques, *Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis*, **2012**, InTech
- [72] H. S. Park, H. R. Ryu, C. K. Rhee, Simultaneous separation of nine surfactants of various types by HPLC with evaporative light scattering detection, *Talanta* **2006**, 70, 481 - 484
- [73] C. Vogt, K. Heinig, Trace analysis of surfactants using chromatographic and electrophoretic techniques, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1999**, 363, 612 - 618
- [74] A. Marcomini, M. Zanette, Chromatographic determination of non-ionic aliphatic surfactants of the alcohol polyethoxylate type in the environment, *Journal of Chromatography A* **1996**, 733, 193 - 206

- [75] K. Rissler, High-performance liquid chromatography and detection of polyethers and their mono(carboxy)alkyl and -arylalkyl substituted derivatives, *Journal of Chromatography A* **1996**, 742, 1 - 54
- [76] L. Nitschke, L. Huber, Analysis of Ethoxylated Alcohol Surfactants in Water by Hplc, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1993**, 345, 585 - 588
- [77] T. M. Schmitt, M. C. Allen, D. K. Brain, K. F. Guin, D. E. Lemmel, Q. W. Osburn, Hplc Determination of Ethoxylated Alcohol Surfactants in Wastewater, *Journal of the American Oil Chemists Society* **1990**, 67, 103 - 109
- [78] X. D. Liu, C. Pohl, A versatile column for surfactant analysis by HPLC, *American Laboratory* **2005**, 37, 27 - 30
- [79] T. C. G. Kibbey, T. P. Yavaraski, K. F. Hayes, High-performance liquid chromatographic analysis of polydisperse ethoxylated non-ionic surfactants in aqueous samples, *Journal of Chromatography A* **1996**, 752, 155 - 165
- [80] T. Okada, Automated Analyses of Nonionic Surfactants in Terms of Hydrophobic and Polyoxyethylated Chain Lengths, *Journal of Chromatography* **1992**, 609, 213 - 218
- [81] C. Sun, M. Baird, H. A. Anderson, D. L. Brydon, Separation and determination of oligomers and homologues of aliphatic alcohol ethoxylates in textile lubricants and lubricant emulsion by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* **1997**, 771, 145 - 154
- [82] G. Vanhoenacker, P. Sandra, High temperature liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectroscopy analysis of octylphenol ethoxylates on different stationary phases, *Journal of Chromatography A* **2005**, 1082, 193 - 202
- [83] B. Zhang, X. Li, B. Yan, Advances in HPLC detection - towards universal detection, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, 390, 299 - 301
- [84] K. Cammann, *Instrumentelle analytische Chemie: Verfahren, Anwendungen und Qualitätssicherung*, **2001**, Spektrum Akademischer Verlag GmbH; Heidelberg, Berlin
- [85] X. D. Liu, C. A. Pohl, J. Weiss, New polar-embedded stationary phase for surfactant analysis, *Journal of Chromatography A* **2006**, 1118, 29 - 34
- [86] P. Chaimbault, S. Cassel, S. Claude, C. Debaig, T. Benvegno, D. Plusquellec, P. Rollin, M. Lafosse, Direct analysis of industrial oligoglycerols by liquid chromatography with evaporative light-scattering detection and mass spectrometry, *Chromatographia* **1999**, 50, 239 - 242

- [87] S. H. Im, Y. H. Jeong, J. J. Ryoo, Simultaneous analysis of anionic, amphoteric, nonionic and cationic surfactant mixtures in shampoo and hair conditioner by RP-HPLC/ELSD and LC/MS, *Analytica Chimica Acta* **2008**, *619*, 129 - 136
- [88] T. Kamiyusuki, T. Monde, K. Omae, K. Morioka, T. Konakahara, Simultaneous separation of nonionic surfactants and polyethylene glycols by reversed phase high performance liquid chromatography, *Chromatographia* **2000**, *51*, 390 - 396
- [89] C. R. Mitchell, Y. Bao, N. J. Benz, S. H. Zhang, Comparison of the sensitivity of evaporative universal detectors and LC/MS in the HILIC and the reversed-phase HPLC modes, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2009**, *877*, 4133 - 4139
- [90] T. H. Mourey, L. E. Oppenheimer, Principles of Operation of An Evaporative Light-Scattering Detector for Liquid-Chromatography, *Analytical Chemistry* **1984**, *56*, 2427 - 2434
- [91] P. VanderMeeren, J. Vanderdeelen, L. Baert, Simulation of the Mass Response of the Evaporative Light-Scattering Detector, *Analytical Chemistry* **1992**, *64*, 1056 - 1062
- [92] J. J. Thomson, Cathode Rays, *Philosophical Magazine Series 5* **1897**, *44*, 293 - 316
- [93] J. H. Gross, Mass spectrometry: A textbook, **2004**, Springer; Berlin
- [94] C. M. Whitehouse, R. N. Dreyer, M. Yamashita, J. B. Fenn, Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers, *Analytical Chemistry* **1985**, *57*, 675 - 679
- [95] D. I. Carroll, I. Dzidic, R. N. Stillwell, K. D. Haegele, E. C. Horning, Atmospheric-Pressure Ionization Mass-Spectrometry - Corona Discharge Ion-Source for Use in Liquid Chromatograph Mass Spectrometer-Computer Analytical System, *Analytical Chemistry* **1975**, *47*, 2369 - 2373
- [96] D. B. Robb, T. R. Covey, A. P. Bruins, Atmospheric pressure photoionisation: An ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry, *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 3653 - 3659
- [97] M. Constapel, M. Schellentrager, O. J. Schmitz, S. Gab, K. J. Brockmann, R. Giese, T. Benter, Atmospheric-pressure laser ionization: a novel ionization method for liquid chromatography/mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19*, 326 - 336
- [98] S. Gonzalez, M. Petrovic, M. Radetic, P. Jovancic, V. Ilic, D. Barcelo, Characterization and quantitative analysis of surfactants in textile wastewater

- by liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2008**, 22, 1445 - 1454
- [99] C. Crescenzi, A. Dicorcia, R. Samperi, A. Marcomini, Determination of Nonionic Polyethoxylate Surfactants in Environmental Waters by Liquid-Chromatography Electrospray Mass-Spectrometry, *Analytical Chemistry* **1995**, 67, 1797 - 1804
- [100] V. Bernabe-Zafon, E. F. Simo-Alfonso, G. Ramis-Ramos, On the determination of underivatized fatty alcohol ethoxylates by electrospray ionisation-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* **2006**, 1118, 188 - 198
- [101] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, Electrospray Ionization for Mass-Spectrometry of Large Biomolecules, *Science* **1989**, 246, 64 - 71
- [102] R. B. Cole, *Electrospray and MALDI mass spectrometry: fundamentals, instrumentation, practicalities, and biological applications*, **2010**, Wiley; Hoboken, N.J
- [103] P. Kebarle, L. Tang, From Ions in Solution to Ions in the Gas-Phase - the Mechanism of Electrospray Mass-Spectrometry, *Analytical Chemistry* **1993**, 65, A972 - A986
- [104] S. J. Gaskell, *Electrospray: Principles and practice*, *Journal of Mass Spectrometry* **1997**, 32, 677 - 688
- [105] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Electrospray Ionization-Principles and Practice*, *Mass Spectrometry Reviews* **1990**, 9, 37 - 70
- [106] P. Kebarle, A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, 35, 804 - 817
- [107] A. P. Bruins, T. R. Covey, J. D. Henion, Ion Spray Interface for Combined Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Ionization Mass-Spectrometry, *Analytical Chemistry* **1987**, 59, 2642 - 2646
- [108] M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, Molecular Beams of Macroions, *Journal of Chemical Physics* **1968**, 49, 2240 - 2249
- [109] G. Schmelzeisenreder, L. Butfering, F. W. Rollgen, Desolvation of Ions and Molecules in Thermospray Mass-Spectrometry, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1989**, 90, 139 - 150

- [110] J. V. Iribarne, B. A. Thomson, Evaporation of Small Ions from Charged Droplets, *Journal of Chemical Physics* **1976**, *64*, 2287 - 2294
- [111] B. A. Thomson, J. V. Iribarne, Field-Induced Ion Evaporation from Liquid Surfaces at Atmospheric-Pressure, *Journal of Chemical Physics* **1979**, *71*, 4451 - 4463
- [112] M. Vogel, U. Karst, Aus der Probe ins Massenspektrometer, *Nachrichten aus der Chemie* **2007**, *55*, 420 - 424
- [113] H. Keski-Hynnä, M. Kurkela, E. Elovaara, L. Antonio, J. Magdalou, L. Luukkanen, J. Taskinen, R. Kostianen, Comparison of electrospray, atmospheric pressure chemical ionization, and atmospheric pressure photoionization in the identification of apomorphine, dobutamine, and entacapone phase II metabolites in biological samples, *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 3449 - 3457
- [114] E. C. Horning, M. G. Horning, D. I. Carroll, I. Dzidic, R. N. Stillwell, New Picogram Detection System Based on A Mass-Spectrometer with An External Ionization Source at Atmospheric-Pressure, *Analytical Chemistry* **1973**, *45*, 936 - 943
- [115] D. I. Carroll, I. Dzidic, R. N. Stillwell, M. G. Horning, E. C. Horning, Subpicogram Detection System for Gas-Phase Analysis Based Upon Atmospheric-Pressure Ionization (Api) Mass-Spectrometry, *Analytical Chemistry* **1974**, *46*, 706 - 710
- [116] S. Krieger, A. von Trotha, K. S. Y. Leung, O. J. Schmitz, Development, optimization, and use of an APCI source with temperature-controlled vaporization of solid and liquid samples, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2013**, *405*, 1373 - 1381
- [117] N. Khatri, A. Gupta, R. Taneja, A. Bilandi, P. Beniwal, A review on mass spectrometry detectors, *International Research Journal of Pharmacy* **2012**, *3*, 33 - 42
- [118] S. E. Van Bramer, An Introduction to Mass Spectrometry, **1998**, Widener University, Department of Chemistry
- [119] M. Guilhaus, V. Mlynski, D. Selby, Perfect timing: Time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1997**, *11*, 951 - 962
- [120] M. Guilhaus, D. Selby, V. Mlynski, Orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews* **2000**, *19*, 65 - 107

- [121] C. Weickhardt, F. Moritz, J. Grotemeyer, Time-of-flight mass spectrometry: State-of-the-art in chemical analysis and molecular science, *Mass Spectrometry Reviews* **1996**, *15*, 139 - 162
- [122] D. Ioanoviciu, Ion-Optical Solutions in Time-Of-Flight Mass-Spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1995**, *9*, 985 - 997
- [123] E. Moskovets, Optimization of the mass reflector parameters for direct ion extraction, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2000**, *14*, 150 - 155
- [124] I. V. Chernushevich, A. V. Loboda, B. A. Thomson, An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry* **2001**, *36*, 849 - 865
- [125] H. H. Strain, J. Sherma, Tswett, M - Adsorption Analysis and Chromatographic Methods - Application to Chemistry of Chlorophylls, *Journal of Chemical Education* **1967**, *44*, 238 - 242
- [126] H. H. Strain, J. Sherma, Tswetts, M Contributions to Sixty Years of Chromatography, *Journal of Chemical Education* **1967**, *44*, 235 - 237
- [127] K. Ballschmiter, M. Wossner, Recent developments in adsorption liquid chromatography (NP-HPLC) - A review, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1998**, *361*, 743 - 755
- [128] V. R. Meyer, Praxis der Hochleistungsflüssigchromatographie, **2004**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; Weinheim
- [129] D. Lambrecht, M. John, HILIC-Chromatographie Effizientere HPLC-Trennung polarer Substanzen, *GIT Labor-Fachzeitschrift* **2009**, *11/2009*, 726 - 728
- [130] E. Katz, Handbook of HPLC, **1998**, M. Dekker; New York
- [131] B. Dejaegher, D. Mangelings, Y. V. Heyden, Method development for HILIC assays, *Journal of Separation Science* **2008**, *31*, 1438 - 1448
- [132] H. Hayen, HILIC - polare Verbindungen, *Nachrichten aus der Chemie* **2010**, *58*, 461 - 464
- [133] N. S. Wilson, M. D. Nelson, J. W. Dolan, L. R. Snyder, R. G. Wolcott, P. W. Carr, Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography I. A general quantitative relationship, *Journal of Chromatography A* **2002**, *961*, 171 - 193
- [134] S. Louw, F. Lynen, M. Hanna-Brown, P. Sandra, High-efficiency hydrophilic interaction chromatography by coupling 25 cm x 4.6 mm ID x 5 μ m silica

- columns and operation at 80 degrees C, *Journal of Chromatography A* **2010**, 1217, 514 - 521
- [135] A. J. Alpert, Hydrophilic-Interaction Chromatography for the Separation of Peptides, Nucleic-Acids and Other Polar Compounds, *Journal of Chromatography* **1990**, 499, 177 - 196
- [136] H. Dibowski, Hydrophile Interaktionschromatographie - HILIC ist nicht gleich HILIC, *GIT Labor-Fachzeitschrift* **2005**, 01/2005, 13 - 15
- [137] U. D. Neue, HPLC columns: theory, technology, and practice, **1997**, Wiley-VCH, Inc.; New York
- [138] H. Lindner, W. Helliger, Hydrophilic interaction Chromatography, in: HPLC of Peptides and Proteins, **2001**, M.-I. Aguilar Humana Press Inc.
- [139] E. S. Grumbach, Comprehensive guide to HILIC, hydrophilic interaction chromatography, **2010**, Waters Corporation; Milford, MA
- [140] Z. G. Hao, B. M. Xiao, N. D. Weng, Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC), *Journal of Separation Science* **2008**, 31, 1449 - 1464
- [141] P. Hemstrom, K. Irgum, Hydrophilic interaction chromatography, *Journal of Separation Science* **2006**, 29, 1784 - 1821
- [142] F. Gritti, A. D. Pereira, P. Sandra, G. Guiochon, Efficiency of the same neat silica column in hydrophilic interaction chromatography and per aqueous liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* **2010**, 1217, 683 - 688
- [143] M. Liu, J. Ostovic, E. X. Chen, N. Cauchon, Hydrophilic interaction liquid chromatography with alcohol as a weak eluent, *Journal of Chromatography A* **2009**, 1216, 2362 - 2370
- [144] W. Y. Jian, R. W. Edom, Y. D. Xu, N. D. Weng, Recent advances in application of hydrophilic interaction chromatography for quantitative bioanalysis, *Journal of Separation Science* **2010**, 33, 681 - 697
- [145] K. J. Fountain, J. Xu, D. M. Diehl, D. Morrison, Influence of stationary phase chemistry and mobile-phase composition on retention, selectivity, and MS response in hydrophilic interaction chromatography, *Journal of Separation Science* **2010**, 33, 740 - 751
- [146] P. Jandera, Stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts, *Journal of Separation Science* **2008**, 31, 1421 - 1437

- [147] T. Ikegami, K. Tomomatsu, H. Takubo, K. Horie, N. Tanaka, Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography, *Journal of Chromatography A* **2008**, 1184, 474 - 503
- [148] P. Appelblad, T. Jonsson, W. Jiang, K. Irgum, Fast hydrophilic interaction liquid chromatographic separations on bonded zwitterionic stationary phase, *Journal of Separation Science* **2008**, 31, 1529 - 1536
- [149] X. Li, J. Xu, Y. Jiang, L. Chen, Y. Xu, C. Pan, Hydrophilic-Interaction Liquid Chromatography (HILIC) with DAD and Mass Spectroscopic Detection for Direct Analysis of Glyphosate and Glufosinate Residues and for Product Quality Control, *Acta Chromatographica* **2009**, 21, 559 - 576
- [150] C. T. Mant, J. R. Litowski, R. S. Hodges, Hydrophilic interaction/cation-exchange chromatography for separation of amphipathic alpha-helical peptides, *Journal of Chromatography A* **1998**, 816, 65 - 78
- [151] G. Karlsson, S. Winge, H. Sandberg, Separation of monosaccharides by hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection, *Journal of Chromatography A* **2005**, 1092, 246 - 249
- [152] B. A. Olsen, Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities, *Journal of Chromatography A* **2001**, 913, 113 - 122
- [153] X. D. Liu, C. Pohl, New hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode stationary phase and its application for analysis of nonionic ethoxylated surfactants, *Journal of Chromatography A* **2008**, 1191, 83 - 89
- [154] S. Abrar, B. Trathnigg, Separation of polysorbates by liquid chromatography on a HILIC column and identification of peaks by MALDI-TOF MS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, 400, 2119 - 2130
- [155] H. P. Nguyen, K. A. Schug, The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications, *Journal of Separation Science* **2008**, 31, 1465 - 1480
- [156] W. Heitz, B. Bomer, H. Ullner, Gelchromatography .7. Resolution in Separation of Oligomers, *Makromolekulare Chemie* **1969**, 121, 102 - 116
- [157] B. Trathnigg, A. Gorbunov, Liquid exclusion-adsorption chromatography: new technique for isocratic separation of nonionic surfactants I. Retention behaviour of fatty alcohol ethoxylates, *Journal of Chromatography A* **2001**, 910, 207 - 216

- [158] B. Trathnigg, O. Jamelnik, Characterization of different reversed phase systems in liquid adsorption chromatography of polymer homologous series, *Journal of Chromatography A* **2007**, 1146, 78 - 84
- [159] M. Kubin, Calibration of Size-Exclusion Chromatography Systems with Polydisperse Standards, *Journal of Liquid Chromatography* **1984**, 7, 41 - 68
- [160] H. G. Elias, *Macromolecules*, **1984**, Plenum Press; New York
- [161] K. Im, H. W. Park, S. Lee, T. Chang, Two-dimensional liquid chromatography analysis of synthetic polymers using fast size exclusion chromatography at high column temperature, *Journal of Chromatography A* **2009**, 1216, 4606 - 4610
- [162] M. D. Lechner, K. Gehrke, E. H. Nordmeier, *Makromolekulare Chemie: Ein Lehrbuch für Chemiker, Physiker, Materialwissenschaftler und Verfahrenstechniker*, **1993**, Birkhäuser Verlag; Berlin
- [163] I. W. Hamley, *Developments in block copolymer science and technology*, **2004**, J. Wiley; Chichester, West Sussex
- [164] C. Rappel, B. Trathnigg, A. Gorbunov, Liquid chromatography of polyethylene glycol mono- and diesters: functional macromolecules or block copolymers?, *Journal of Chromatography A* **2003**, 984, 29 - 43
- [165] B. Trathnigg, D. Thamer, X. Yan, B. Maier, H. R. Holzbauer, H. Much, Characterization of Ethoxylated Fatty Alcohols Using Liquid-Chromatography with Density and Refractive-Index Detection, 2. Quantification in Liquid-Chromatography Under Critical Conditions, *Journal of Chromatography A* **1994**, 665, 47 - 53
- [166] B. Trathnigg, C. Rappel, S. Fraydl, A. Gorbunov, Liquid chromatography of polyoxyethylenes under critical conditions: A thermodynamic study, *Journal of Chromatography A* **2005**, 1085, 253 - 261
- [167] S. V. Olesik, Liquid chromatography at the critical condition, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2004**, 378, 43 - 45
- [168] M. I. Malik, B. Trathnigg, R. Saf, Characterization of ethylene oxide-propylene oxide block copolymers by combination of different chromatographic techniques and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectroscopy, *Journal of Chromatography A* **2009**, 1216, 6627 - 6635
- [169] A. Gorbunov, B. Trathnigg, Theory of liquid chromatography of mono- and difunctional macromolecules - I. Studies in the critical interaction mode, *Journal of Chromatography A* **2002**, 955, 9 - 17

- [170] J. Falkenhagen, J. F. Friedrich, G. Schulz, R. P. Kruger, H. Much, S. Weidner, Liquid adsorption chromatography near critical conditions of adsorption coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *International Journal of Polymer Analysis and Characterization* **2000**, 5, 549 - 562
- [171] M. I. Malik, H. Ahmed, B. Trathnigg, Liquid chromatography under critical conditions: Practical applications in the analysis of amphiphilic polymers, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, 393, 1797 - 1804
- [172] J. Falkenhagen, H. Much, W. Stauf, A. H. E. Muller, Characterization of block copolymers by liquid adsorption chromatography at critical conditions. 1. Diblock copolymers, *Macromolecules* **2000**, 33, 3687 - 3693
- [173] B. Trathnigg, Characterization of amphiphilic polymers: Independent analysis of blocks in poloxamers by liquid chromatography under critical conditions, *Polymer* **2005**, 46, 9211 - 9223
- [174] B. Trathnigg, M. I. Malik, N. Pircher, S. Hayden, Liquid chromatography at critical conditions in ternary mobile phases: Gradient elution along the critical line, *Journal of Separation Science* **2010**, 33, 2052 - 2059
- [175] H. Pasch, C. Brinkmann, H. Much, U. Just, Chromatographic Investigations of Macromolecules in the Critical Range of Liquid-Chromatography, 2. 2-Dimensional Separations of Poly(Ethylene Oxide Block Propylene-Oxide), *Journal of Chromatography* **1992**, 623, 315 - 322
- [176] F. Lacharme, W. Lapeyre, V. Ravaine, Full verification of the liquid exclusion-adsorption chromatography theory using monolithic capillary columns, *Journal of Chromatography A* **2005**, 1074, 89 - 98
- [177] B. Trathnigg, C. Rappel, R. Hodl, S. Fraydl, Molecular characterization of ethoxylates by complementary chromatographic techniques. Evaluation of efficiency and reliability, *Tenside Surfactants Detergents* **2003**, 40, 148 - 154
- [178] B. Trathnigg, M. Kollroser, C. Rappel, Liquid exclusion adsorption chromatography, a new technique for isocratic separation of nonionic surfactants III. Two-dimensional separation of fatty alcohol ethoxylates, *Journal of Chromatography A* **2001**, 922, 193 - 205
- [179] B. Trathnigg, M. I. Malik, N. V. Cuong, A. M. Skvortsov, Monofunctional polymers in liquid adsorption chromatography Determination of the interaction parameter in the range of weak interaction, *Journal of Chromatography A* **2008**, 1207, 122 - 129

- [180] D. Cho, J. Hong, S. Park, T. Chang, Retention mechanism of fatty alcohol ethoxylates in reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* **2003**, *986*, 199 - 206
- [181] P. Dugo, F. Cacciola, T. Kumm, G. Dugo, L. Mondello, Comprehensive multidimensional liquid chromatography: Theory and applications, *Journal of Chromatography A* **2008**, *1184*, 353 - 368
- [182] J. Pol, B. Hohnova, M. Jussila, T. Hyotylainen, Comprehensive two-dimensional liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry in the analysis of acidic compounds in atmospheric aerosols, *Journal of Chromatography A* **2006**, *1130*, 64 - 71
- [183] P. Dugo, O. Favoino, R. Luppino, G. Dugo, L. Mondello, Comprehensive two-dimensional normal-phase (adsorption) - Reversed-phase liquid chromatography, *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 2525 - 2530
- [184] F. Erni, R. W. Frei, 2-Dimensional Column Liquid-Chromatographic Technique for Resolution of Complex-Mixtures, *Journal of Chromatography* **1978**, *149*, 561 - 569
- [185] M. Eggink, W. Romero, R. J. Vreuls, H. Lingeman, W. M. A. Niessen, H. Irth, Development and optimization of a system for comprehensive two-dimensional liquid chromatography with UV and mass spectrometric detection for the separation of complex samples by multi-step gradient elution, *Journal of Chromatography A* **2008**, *1188*, 216 - 226
- [186] I. Francois, K. Sandra, P. Sandra, Comprehensive liquid chromatography: Fundamental aspects and practical considerations-A review, *Analytica Chimica Acta* **2009**, *641*, 14 - 31
- [187] S. A. Cohen, M. R. Schure, Multidimensional liquid chromatography: theory and applications in industrial chemistry and the life sciences, **2008**, Wiley-Interscience; Hoboken, N.J
- [188] P. Jandera, Comprehensive two-dimensional liquid chromatography - practical impacts of theoretical considerations. A review, *Central European Journal of Chemistry* **2012**, *10*, 844 - 875
- [189] A. L. Huidobro, P. Pruijm, P. Schoenmakers, C. Barbas, Ultra rapid liquid chromatography as second dimension in a comprehensive two-dimensional method for the screening of pharmaceutical samples in stability and stress studies, *Journal of Chromatography A* **2008**, *1190*, 182 - 190

- [190] S. P. Dixon, I. D. Pitfield, D. Perrett, Comprehensive multi-dimensional liquid chromatographic separation in biomedical and pharmaceutical analysis: a review, *Biomedical Chromatography* **2006**, *20*, 508 - 529
- [191] J. V. Seeley, Theoretical study of incomplete sampling of the first dimension in comprehensive two-dimensional chromatography, *Journal of Chromatography A* **2002**, *962*, 21 - 27
- [192] M. Frank, Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution: A new flexible and user-friendly 2D-LC solution for the most complex samples, **2012**, Agilent Technologies; Waldbronn, Germany
- [193] L. Mondello, P. Q. Tranchida, V. Stanek, P. Jandera, G. Dugo, P. Dugo, Silver-ion reversed-phase comprehensive two-dimensional liquid chromatography combined with mass spectrometric detection in lipidic food analysis, *Journal of Chromatography A* **2005**, *1086*, 91 - 98
- [194] A. van der Horst, P. J. Schoenmakers, Comprehensive two-dimensional liquid chromatography of polymers, *Journal of Chromatography A* **2003**, *1000*, 693 - 709
- [195] M. M. Bushey, J. W. Jorgenson, Automated Instrumentation for Comprehensive 2-Dimensional High-Performance Liquid-Chromatography of Proteins, *Analytical Chemistry* **1990**, *62*, 161 - 167
- [196] P. Dugo, M. D. Fernandez, A. Cotroneo, G. Dugo, L. Mondello, Optimization of a comprehensive two-dimensional normal-phase and reversed-phase liquid chromatography system, *Journal of Chromatographic Science* **2006**, *44*, 561 - 565
- [197] O. P. Haefliger, Universal two-dimensional HPLC technique for the chemical analysis of complex surfactant mixtures, *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 371 - 378
- [198] D. R. Stoll, J. D. Cohen, P. W. Carr, Fast, comprehensive online two-dimensional high performance liquid chromatography through the use of high temperature ultra-fast gradient elution reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* **2006**, *1122*, 123 - 137
- [199] R. E. Murphy, M. R. Schure, J. P. Foley, Effect of sampling rate on resolution in comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 1585 - 1594
- [200] R. Dück, H. Sonderfeld, O. J. Schmitz, A simple method for the determination of peak distribution in comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* **2012**, *1246*, 69 - 75

- [201] X. P. Li, P. W. Carr, Effects of first dimension eluent composition in two-dimensional liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* **2011**, 1218, 2214 - 2221
- [202] Y. M. Liu, X. Y. Xue, Z. M. Guo, Q. Xu, F. F. Zhang, X. M. Liang, Novel two-dimensional reversed-phase liquid chromatography/hydrophilic interaction chromatography, an excellent orthogonal system for practical analysis, *Journal of Chromatography A* **2008**, 1208, 133 - 140
- [203] P. Jandera, Column selectivity for two-dimensional liquid chromatography, *Journal of Separation Science* **2006**, 29, 1763 - 1783
- [204] Y. L. Wei, T. Lan, T. Tang, L. Y. Zhang, F. Y. Wang, T. Li, Y. P. Du, W. B. Zhang, A comprehensive two-dimensional normal-phase x reversed-phase liquid chromatography based on the modification of mobile phases, *Journal of Chromatography A* **2009**, 1216, 7466 - 7471
- [205] P. Donato, F. Cacciola, P. Q. Tranchida, P. Dugo, L. Mondello, Mass spectrometry detection in comprehensive liquid chromatography: Basic concepts, instrumental aspects, applications and trends, *Mass spectrometry reviews* **2012**, 1 - 37
- [206] K. Im, Y. Kim, T. Chang, K. Lee, N. Choi, Separation of branched polystyrene by comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* **2006**, 1103, 235 - 242
- [207] X. L. Jiang, A. van der Horst, V. Lima, P. J. Schoenmakers, Comprehensive two-dimensional liquid chromatography for the characterization of functional acrylate polymers, *Journal of Chromatography A* **2005**, 1076, 51 - 61
- [208] H. J. Issaq, K. C. Chan, G. M. Janini, T. P. Conrads, T. D. Veenstra, Multidimensional separation of peptides for effective proteomic analysis, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2005**, 817, 35 - 47
- [209] M. Kivilompolo, T. Hyotylainen, Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of Lamiaceae herbs: Characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids, *Journal of Chromatography A* **2007**, 1145, 155 - 164
- [210] L. Mondello, M. Herrero, T. Kumm, P. Dugo, H. Cortes, G. Dugo, Quantification in comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *Analytical Chemistry* **2008**, 80, 5418 - 5424
- [211] S. Abrar, B. Trathnigg, Separation of nonionic surfactants according to functionality by hydrophilic interaction chromatography and comprehensive

- two-dimensional liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* **2010**, 1217, 8222 - 8229
- [212] B. Trathnigg, S. Abrar, Characterization of complex copolymers by two-dimensional Liquid Chromatography, *Procedia Chemistry* **2010**, 2, 130 - 139
- [213] R. E. Murphy, M. R. Schure, J. P. Foley, One- and two dimensional chromatographic analysis of alcohol ethoxylates, *Analytical Chemistry* **1998**, 70, 4353 - 4360
- [214] J. A. Raust, A. Bruell, P. Sinha, W. Hiller, H. Pasch, Two-dimensional chromatography of complex polymers, 8. Separation of fatty alcohol ethoxylates simultaneously by end group and chain length, *Journal of Separation Science* **2010**, 33, 1375 - 1381
- [215] S. Laun, Einsatz einer HILIC-Phase und eines Lichtstreuendetektors zur Analyse fettchemischer Produkte, **2010**, Master-Thesis, Bergische Universität Wuppertal
- [216] L. R. Snyder, Classification of Solvent Properties of Common Liquids, *Journal of Chromatographic Science* **1978**, 16, 223 - 234
- [217] X. D. Liu, A. Heckenberg, C. Pohl, A speciality column for surfactant analysis, *Lc Gc Europe* **2005**, 24 - 24
- [218] U. D. Neue, K. VanTran, P. C. Iraneta, B. A. Alden, Characterization of HPLC packings, *Journal of Separation Science* **2003**, 26, 174 - 186
- [219] N. S. Wilson, M. D. Nelson, J. W. Dolan, L. R. Snyder, P. W. Carr, Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography II. Effect of a change in conditions, *Journal of Chromatography A* **2002**, 961, 195 - 215
- [220] N. S. Wilson, J. W. Dolan, L. R. Snyder, P. W. Carr, L. C. Sander, Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography III. The physico-chemical basis of selectivity, *Journal of Chromatography A* **2002**, 961, 217 - 236
- [221] C. N. Mcewen, B. S. Larsen, Ionization Mechanisms Related to Negative Ion APPI, APCI, and DART, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2009**, 20, 1518 - 1521