

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2019

Bc. Lenka Jarešová

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Analýza aniontových tenzidů na bázi kyseliny glutamové pomocí  
kapalinové chromatografie

Bc. Lenka Jarešová

Diplomová práce

2019

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka Jarešová**  
Osobní číslo: **C17514**  
Studijní program: **N1407 Chemie**  
Studijní obor: **Analytická chemie**  
Název tématu: **Analýza aniontových tenzidů na bázi kyseliny glutamové pomocí kapalinové chromatografie**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. V dostupné vědecké literatuře vyhledejte a rešeršně zpracujte přehled a využití tenzidů a dále práce zabývající se analýzou těchto látek pomocí kapalinové chromatografie. Popište principy kapalinové chromatografie a fázové systémy používané pro analýzu tenzidů.
2. Experimentálně ověřte možnosti analýz aniontových tenzidů na bázi kyseliny glutamové. Připravte deriváty vhodné pro detekci UV spektrometrií. Optimalizujte podmínky analýzy s cílem dosáhnout co nejlepší separace tenzidů.
3. Získaná experimentální data kriticky zhodnoťte a diskutujte.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího práce.**

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Petra Warzechová**

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2019**

Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst.1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 10. 5. 2019

Bc. Lenka Jarešová

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a za čas strávený při konzultacích a vypracovávání této práce. Dále bych chtěla poděkovat konzultantce Ing. Petře Warzechové za rady, podporu a pomoc při měření.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala svému příteli a rodině za podporu po celou dobu mého studia.

## ANOTACE

Předložená diplomová práce se zabývá analýzou aniontových tenzidů na bázi kyseliny glutamové pomocí kapalinové chromatografie. Teoretická část je zaměřena tenzidy z hlediska jejich rozdělení, vlastností a využití. Dále pak práce pojednává o principech kapalinové chromatografie se zaměřením na fázové systémy používané pro analýzu tenzidů. Experimentální část aplikuje teoretické poznatky na analýzu vzorků tenzidů. Je provedena analýza pomocí kapalinové chromatografie s UV a hmotnostní detekcí. V hmotnostních spektrech jsou identifikovány jednotlivé mono- a diestery mastných kyselin obsažených v kokosovém oleji.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Aniontové tenzidy, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

## TITLE

Analysis of anionic surfactants based on glutamic acid by liquid chromatography

## ANNOTATION

This diploma thesis deals with analysis of anionic surfactants based on glutamic acid by liquid chromatography. The theoretical part is focused on surfactants from the point of view of their distribution, properties and use. Furthermore, the thesis deals with the principles of liquid chromatography focused on phase systems used for surfactant analysis. The experimental part applies theoretical knowledge to the analysis of surfactant samples. Liquid chromatographic analysis with UV and mass spectrometric detection is performed. Using mass spectra, mono- and diesters of fatty acids presented in coconut oil were identified.

## KEYWORDS

Anionic surfactants, liquid chromatography, mass spectrometry

# Obsah

Úvod.....	11
1 Teoretická část .....	12
1.1 Význam a rozdělení tenzidů.....	12
1.1.1 Aniontové tenzidy.....	12
1.1.2 Kationtové tenzidy.....	15
1.1.3 Amfoterní tenzidy .....	16
1.1.4 Neiontové tenzidy .....	16
1.2 Charakteristické techniky analýzy .....	16
1.2.1 Principy kapalinové chromatografie.....	16
1.2.2 Způsoby detekce .....	19
1.3 Derivatizace v HPLC .....	23
1.4 Aplikace LC v analýze .....	24
2 Experimentální část.....	30
2.1 Přístrojové vybavení.....	30
2.2 Kolona, gradienty mobilní fáze a podmínky analýzy .....	30
2.3 Použité chemikálie .....	31
2.4 Příprava vzorků .....	31
2.4.1 Příprava <i>p</i> -bromfenacylesteru.....	31
3 Výsledky a diskuse .....	32
3.1 Analýza UV.....	32
3.2 Analýza <i>p</i> -bromfenacylesterů tenzidů.....	33
4 Závěr .....	51
5 Literatura.....	52
6 Přílohy.....	54



## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1	Strukturní vzorec amisoft .....	14
Obrázek 2	Schéma konstrukce HPLC .....	17
Obrázek 3	Schéma spektrofotometrického detektoru .....	21
Obrázek 4	Schéma ionizace elektrosprejem .....	22
Obrázek 5	Schéma chemické ionizace za atmosférického tlaku .....	22
Obrázek 6	Schéma fotoionizace za atmosférického tlaku .....	23
Obrázek 7	Porovnání UV spekter derivátu ECS-22SB s neutralizací NaOH a bez NaOH s p-bromfenacylbromidem .....	32
Obrázek 8	LC/UV záznam derivátu vzorku CS-22 připravovaného při 70 °C po dobu 30 minut s identifikovanými píky .....	34
Obrázek 9	LC/UV záznam derivátu vzorku ET-CS-12 připravovaného při 70 °C po dobu 60 minut s identifikovanými píky .....	34
Obrázek 10	LC/UV záznam derivátu vzorku GCK-12K připravovaného při 70 °C po dobu 90 minut s identifikovanými píky .....	35
Obrázek 11	MS spektrum z LC/MS analýzy tenzidu CS-11, spektrum pro diester kyseliny kaprylové. ....	36
Obrázek 12	MS spektrum z LC/MS analýzy tenzidu CS-11, spektrum pro diester kyseliny kaprové.....	37
Obrázek 13	MS spektrum z LC/MS analýzy tenzidu CS-11, spektrum pro diester kyseliny laurové. ....	37
Obrázek 14	MS spektrum z LC/MS analýzy tenzidu CS-11, spektrum pro diester kyseliny myristové. ....	38
Obrázek 15	MS spektrum z LC/MS analýzy tenzidu CS-11, spektrum pro diester kyseliny palmitové. ....	38
Obrázek 16	MS spektrum z LC/MS analýzy tenzidu GCK-12K, spektrum pro monoester kyseliny kaprové.....	39
Obrázek 17	MS spektrum z LC/MS analýzy tenzidu GCK-12K, spektrum pro monoester kyseliny laurové.....	40
Obrázek 18	MS spektrum z LC/MS analýzy tenzidu GCK-12K, spektrum pro monoester kyseliny myristové.....	40
Obrázek 19	MS spektrum z LC/MS analýzy tenzidu ET-CS-12, spektrum pro monoester kyseliny kaprové.....	41

Obrázek 20 MS spektrum z LC/MS analýzy tenzidu ET-CS-12, spektrum pro monoester kyseliny laurové.....	42
Obrázek 21 MS spektrum z LC/MS analýzy tenzidu ET-CS-12, spektrum pro monoester kyseliny myristové.....	42
Obrázek 22 MS spektrum z LC/MS analýzy tenzidu ET-CS-12, spektrum pro monoester kyseliny palmitové.....	43
Obrázek 23 Graf zastoupení jednotlivých diesterů mastných kyselin v závislosti na podmínkách derivatizace pro vzorek CS-11.....	44
Obrázek 24 Graf zastoupení jednotlivých diesterů mastných kyselin v závislosti na podmínkách derivatizace pro vzorek CS-22.....	44
Obrázek 25 Graf zastoupení jednotlivých diesterů mastných kyselin v závislosti na podmínkách derivatizace pro vzorek CT-12S.....	45
Obrázek 26 Graf zastoupení jednotlivých diesterů mastných kyselin v závislosti na podmínkách derivatizace pro vzorek ECS-22SB.....	46
Obrázek 27 Graf zastoupení jednotlivých diesterů mastných kyselin v závislosti na podmínkách derivatizace pro vzorek ET-CS-12 glutamátová část.....	46
Obrázek 28 Graf zastoupení jednotlivých monoesterů mastných kyselin v závislosti na podmínkách derivatizace pro vzorek ET-CS-12 threoninátová část.....	47
Obrázek 29 Graf zastoupení jednotlivých monoesterů mastných kyselin v závislosti na podmínkách derivatizace pro vzorek GCK-12H.....	48
Obrázek 30 Graf zastoupení jednotlivých diesterů mastných kyselin v závislosti na podmínkách derivatizace pro vzorek GCK-12K.....	49
Obrázek 31 LC/UV záznam derivátu tenzidu CS-11, připravovaného při 70 °C po dobu 30 minut.....	50
Obrázek 32 LC/UV záznam derivátu tenzidu ET-CS-12, připravovaného při 70 °C po dobu 30 minut.....	50
Tabulka 1 Obsah mastných kyselin v kokosovém oleji.....	14
Tabulka 2 Sumární vzorce a vypočtené monoizotopické hmoty derivátů s kyselinou glutamovou.....	36
Tabulka 3 Sumární vzorce a vypočtené monoizotopické hmoty derivátů s glycinem.....	39
Tabulka 4 Sumární vzorce a vypočtené monoizotopické hmoty derivátů s threoninem.....	41

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

A	absorbance
ACN	acetonitril
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
AS	alkoholový sulfonát
AES	alkoholový ethoxysulfát
c	koncentrace absorbující složky
$\epsilon$	molární absorpční koeficient
ELSD	detekce rozptylu světla
ESI	ionizace elektrosprejem
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
l	tloušťka absorbující vrstvy
LAS	lineární alkylbenzensulfonát
LC/FTIR	kapalinová chromatografie s infračervenou spektrometrií s Fourierovou transformací
LC/MS	kapalinová chromatografie s detekcí hmotnostním spektrometrem
LC/UV-VIS	kapalinová chromatografie s UV-VIS detekcí
MALDI	ionizace desorpcí laserem za účasti matrice
NP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s normálními fázemi
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s obrácenými fázemi
SPE	extrakce v pevné fázi

## Úvod

Tenzidy jsou organické povrchově aktivní látky, které jsou schopny se hromadit již v nízkých koncentracích na fázovém rozhraní a tím snižují mezifázovou energii. Stabilizují nebo v případě potřeby ruší disperzní systémy, snižují tření, urychlují technologické procesy a ovlivňují fyzikálně-mechanické vlastnosti látek. Tenzidy usnadňují smáčení povrchu a odstranění nečistot. Nejstarším a nejpoužívanějším aniontovým tenzidem je mýdlo, což je sodná sůl vyšších karboxylových kyselin  $C_{10}$ - $C_{22}$ . Mýdlo je obsaženo v práškových pracích prostředcích, kde působí jako odpěňovač. Hlavními výchozími surovinami pro výrobu syntetických aniontových tenzidů jsou jednosytné alkoholy s delším uhlíkatým řetězcem, mastné kyseliny a nenasycené uhlovodíky  $C_8$  až  $C_{18}$ , dále benzen, naftalen a fenol. Vzhledem k velkému uplatnění aniontových tenzidů je třeba najít vhodné metody pro jejich analýzu.

V diplomové práci byla studována problematika analýzy aniontových tenzidů na bázi kyselin glutamové, threoninu a glycinu a jejich esterů s mastnými kyselinami. Z důvodu obtížné detekce byla zkoumána možnost přípravy *p*-bromfenacylesterů těchto látek a vlivy reakčních podmínek na připravené deriváty.

# 1 Teoretická část

## 1.1 Význam a rozdělení tenzidů

Tenzidy jsou organické látky, které jsou schopny se hromadit již v nízkých koncentracích na fázovém rozhraní a tím snižují mezifázovou energii [1].

Tenzidy jsou povrchově aktivní látky. V důsledku specifických interakcí s molekulami disperzního prostředí výrazně ovlivňují energetické poměry na fázovém rozhraní, což se projevuje především snížením povrchového napětí. Stabilizují nebo v případě potřeby ruší disperzní systémy, snižují tření, urychlují technologické procesy a ovlivňují fyzikálně-mechanické vlastnosti látek [2].

Tenzidy usnadňují smáčení povrchu a odstranění nečistot. Podstatou povrchové aktivity je molekulární struktura tenzidu. Hydrofilní polární skupina je orientována směrem k vodě, druhá nepolární část struktury je směrem k nepolární části smáčeného povrchu [3].

Detergent je směs tenzidů a dalších látek, která má detergenční vlastnosti. Detergence je schopnost převádět nečistoty z pevného povrchu do objemové fáze roztoku [1].

Podle iontového charakteru polární skupiny se dají tenzidy rozdělit na dvě základní skupiny: iontové a neiontové tenzidy. Iontové tenzidy obsahují funkční skupiny, které ve vodném roztoku disociují za vzniku záporně nebo kladně nabitých iontů. Tyto ionty jsou nositeli povrchové aktivity. Iontové tenzidy jsou dále děleny na aniontové, kationtové a amfoterní [2].

### 1.1.1 Aniontové tenzidy

Hlavní funkční skupiny jsou:  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-\text{OSO}_3\text{H}$ ,  $\equiv\text{PO}_4$ . Obchodní druhy tenzidů tohoto typu můžeme podle počtu polárních funkčních skupin a počtu disociovaných skupin rozdělit následovně:

- a) Monofunkční tenzidy
  - Mýdla s  $\text{C}_{12}$  až  $\text{C}_{18}$
  - Sulfáty vyšších mastných alkoholů
  - Alkylarylsulfonany

#### b) Bifunkční tenzidy

- Obsahují dvě polární funkční skupiny, ze kterých mohou být disociovány obě tyto skupiny, nebo pouze jedna z nich; pokud druhá skupina není disociovaná, dochází k ovlivnění polarizace tenzidu

#### c) Polyfunkční tenzidy

- Obsahují více polárních funkčních skupin
- Jedna nebo více těchto skupin je disociovaných a ostatní vytváří polarizované kovalentní vazby

#### d) Oligomerní polyfunkční tenzidy

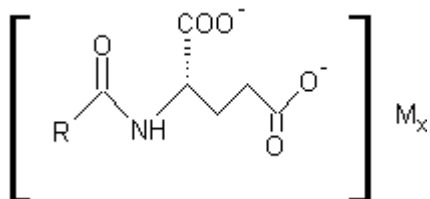
- Mají charakter polyelektrolytů, které obsahují více disociovaných funkčních skupin a polárních neionizovaných skupin
- Polární oblast tenzidu zpravidla vytváří oligomer (nízkomolekulární polypeptid, polysacharid nebo polyfosfát [2]).

Nejrozšířenějším aniontovým tenzidem je dobře biologicky rozložitelný lineární *sek*-alkylbenzensulfonát sodný. Dalšími často používanými tenzidy jsou  $\alpha$ -olefinsulfonáty, které se vyrábí přímou sulfonací  $\alpha$ -olefinů, při které vzniká směs alkensulfonátu a hydroxyalkansulfonátů. Olefinsulfonáty se především používají do kapalných mycích prostředků. Parafinsulfonáty se vyrábí sulfoxidací alkanů frakce C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>. Mají nízkou detergenční účinnost, ale výbornou smáčecí účinnost, a proto jsou používány v kapalných mycích, pracích a smáčecích prostředcích. Nejstarším a nejpoužívanějším aniontovým tenzidem je mýdlo, což je sodná sůl vyšších karboxylových kyselin C<sub>10</sub>-C<sub>22</sub>. Mýdlo je obsaženo v práškových pracích prostředcích, kde působí jako odpěňovač [1].

##### 1.1.1.1. Syntetické aniontové tenzidy

Hlavními výchozími surovinami pro výrobu syntetických aniontových tenzidů jsou jednosytné alkoholy s delším uhlíkatým řetězcem, mastné kyseliny a nenasycené uhlovodíky C<sub>8</sub> až C<sub>18</sub>, dále benzen, naftalen a fenol. Jako činidlo se používá oleum, koncentrovaná kyselina sírová, kyselina chlorsulfonová a oxid sírový. Při sulfatační reakci se sulfatují rychleji hydroxylové skupiny než dvojná vazby uhlovodíků [3].

V diplomové práci se zabývám analýzou tenzidů na bázi kyseliny glutamové s mastnými kyselinami obsaženými v kokosovém oleji, které jsou detailněji popsány v následujících kapitolách. Obsažení jednotlivých mastných kyselin v kokosovém oleji je uvedeno v tabulce 1. Obecná struktura tenzidů na bázi kyseliny glutamové je uvedena na obrázku 1.



$\text{RCO}^-$  : zbytek mastné kyseliny

M : H, Na, K nebo triethylamin

X : 1,2

Obrázek 1 Strukturální vzorec amisoft

Tabulka 1 Obsah mastných kyselin v kokosovém oleji

Obsah mastných kyselin v kokosovém oleji	
Kyselina kaprylová	9 %
Kyselina kaprová	10 %
Kyselina laurová	52 %
Kyselina myristová	19 %
Kyselina palmitová	11 %
Kyselina olejová	8 %
Ostatní	5,3 %

<https://www.superkokos.cz/kokosovy-olej-a-jeho-slozeni> staženo 20.4.2019

#### 1.1.1.2 Amisoft CS-11

Amisoft CS-11 je aniontová povrchově aktivní látka vyrobená z kyseliny glutamové a kokosového oleje. Je k dispozici ve formě prášku. Má vynikající čisticí a pěnivé vlastnosti a současně pomáhá udržovat vlasy a pokožku zvlhčenou. Poskytuje vynikající řešení pro použití v detergentech bez síranů. Vytváří vynikající sametové povrchově aktivní systémy. Je to přírodní složka certifikovaná společností COSMOS [4].

#### 1.1.1.3 Amisoft CS-22

Amisoft CS-22 je aniontová povrchově aktivní látka vyrobená z kyseliny glutamové a mastných kyselin obsažených v kokosovém oleji. Má vynikající čisticí a pěnivé vlastnosti, napomáhá udržovat zvlhčenou pokožku a vlasy. Poskytuje vynikající řešení pro aplikace bez síranů. Je to přírodní složka certifikovaná společností COSMOS [5].

#### 1.1.1.4 Amisoft CT-12S

Amisoft CT-12S je aniontová povrchově aktivní látka vyrobená z kyseliny glutamové a mastných kyselin obsažených v kokosovém oleji. Má vynikající čisticí a pěnivé vlastnosti, pomáhá udržovat zvlhčenou pokožku a vlasy. Poskytuje vynikající řešení pro aplikace bez síranů. Je jemný surfaktant s vynikajícími pěnivými vlastnostmi [6].

#### 1.1.1.5 Amisoft ECS-22SB

Amisoft ECS-22SB je aniontová povrchově aktivní látka vyrobená z kyseliny glutamové a mastných kyselin obsažených v kokosovém oleji. Má vynikající čisticí a pěnové vlastnosti a pomáhá udržovat pokožku a vlasy zvlhčené pomocí aminokyselin, které jsou přítomny v jejím složení. Poskytuje vynikající řešení pro aplikace bez síranů. Je jemný surfaktant s vynikajícími pěnovými vlastnostmi [7].

#### 1.1.1.6 Amilite ET-CS-12

Amilite ET-CS-12 je aniontová povrchově aktivní látka odvozená od kyseliny glutamové, threoninu a obsahuje mastné kyseliny obsažené v kokosovém oleji. Vytváří krémovou pěnu, a to i za přítomnosti olejů a současně pomáhá udržovat zvlhčenou pokožku a vlasy. Poskytuje vynikající řešení pro aplikace bez síranů. Je jemný surfaktant s vynikajícími pěnovými vlastnostmi [8].

#### 1.1.1.7 Amilite GCK-12H

Amilite GCK-12H je aniontová povrchově aktivní látka odvozená od aminokyseliny glycinu. Vytváří krémovou pěnu, a to i za přítomnosti olejů, a současně pomáhá udržovat zvlhčenou pokožku a vlasy. Poskytuje vynikající řešení pro aplikace bez síranů. Je jemný surfaktant s vynikajícími pěnovými vlastnostmi [9].

#### 1.1.1.8 Amilite GCS-12K

Amilite GCS-12K je aniontová povrchově aktivní látka odvozená od glycinu. Vytváří krémovou pěnu, a to i za přítomnosti olejů a současně pomáhá udržovat zvlhčenou pokožku a vlasy. Poskytuje vynikající řešení pro aplikace bez síranů. Je jemný surfaktant s vynikajícími pěnovými vlastnostmi [10].

### 1.1.2 Kationtové tenzidy

Kationtovými tenzidy jsou sloučeniny s jednou nebo více funkčními skupinami. Tyto skupiny ve vodném roztoku disociují za vzniku kladně nabitých organických iontů, které jsou nositelem povrchové aktivity [2]. Kationtové tenzidy se vyrábí v menším rozsahu a mají především dezinfekční a antiseptické účinky. Tyto přípravky nenarušují pokožku a mají zanedbatelnou toxicitu. Uplatňují se jako dezinfekční a koupelové přísady a jako antiseptika. Nejdůležitější kationtové tenzidy jsou organické aminové soli, které se obvykle vyrábí dvoustupňovou reakcí z halogenkarboxylových kyselin nebo jejich esterů a jednosytných alkoholů. Vzniklý halogenester reaguje s terciálním aminem na kvarterní amoniovou sůl esteru vyšší mastné kyseliny [3].



Kationtové tenzidy s avivážními účinky a významným mikrobicidním efektem jsou přítomny v avivážních prostředcích, které zajišťují antistatické úpravy syntetických textilních vláken po každém praní. Jejich biologická rozložitelnost je oproti aniontovým tenzidům horší. Kationtové tenzidy se používají také do přípravků pro vlasovou kosmetiku. Kationtové tenzidy nelze kombinovat v recepturách s aniontovými, neboť se vzájemně srážejí na nerozpustný aglomerát [1].

### 1.1.3 Amfoterní tenzidy

Amfoterní tenzidy jsou sloučeniny s dvěma nebo více zásaditými a kyselými funkčními skupinami, které jsou schopné disociovat ve vodném roztoku a v závislosti na podmínkách prostředí (pH) poskytovat povrchově aktivní látky s aniontovým nebo kationtovým charakterem. [2 Tenzidy]. Amfoterní tenzidy obsahují v nedisociované části molekuly jak kation, tak anion, čímž je dána jejich možnost kombinovat je v recepturách s aniontovými i kationtovými tenzidy [1].

### 1.1.4 Neiontové tenzidy

Neiontové tenzidy jsou sloučeniny, které ve vodném roztoku nedisociují. Rozpustnost ve vodě takových sloučenin umožňuje přítomnost funkčních skupin v molekule, které mají silnou afinitu k vodě. Hlavní typy neiontových tenzidů jsou: alkylpolyglykolethery, alkylarylpolyglykolethery, acylpolyglykolethery, acylované nebo alkylované alkanolaminopolyglykolethery, kopolymery ethylenoxidu s propylenoxidem, estery a ethery polyalkoholů [2]. Při výrobě neiontových tenzidů se používají kondenzační reakce vyšších mastných kyselin s aminoalkoholy, kdy vznikají hydroxyalkylamidy od těchto kyselin [3].

## 1.2 Charakteristické techniky analýzy

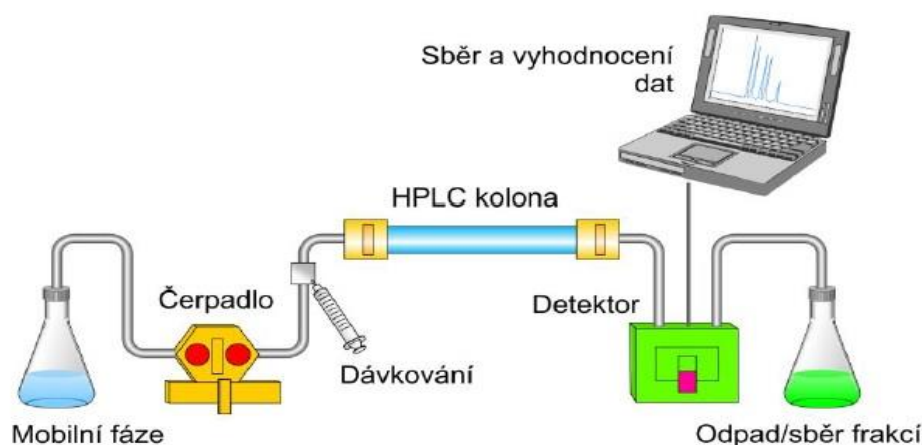
Mezi jednu z nejvýznamnějších technik používaných pro analýzy tenzidů patří kapalinová chromatografie. Podle charakteru tenzidu jsou používány různé fázové systémy a metody detekce.

### 1.2.1 Principy kapalinové chromatografie

Chromatografické metody jsou založeny na rozdílné distribuci dělených látek ve směsi mezi dvě různé nemísitelné fáze: mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou). Stacionární fází je buď tuhá látka, nebo kapalina ukotvena na tuhém nosiči [11].

Kapalinová chromatografie umožňuje dělení organických méně těkavých kapalných i tuhých látek, které jsou rozpustné v běžných organických rozpouštědlech, ve vodě nebo ve zředěných minerálních kyselinách. K dělení látek je možné využít vratné dvoufázové separační mechanismy jako adsorpci, iontovou výměnu, chemisorpci a rozdělování mezi dvěma nemísitelnými kapalinami [12].

Schéma konstrukce typické pro HPLC je uvedeno na obrázku 2.



Obrázek 2 Schéma konstrukce HPLC

[http://www.laboratory-journal.com/sites/git-labor.de/files/images/special/53056402\\_\\_original.jpg](http://www.laboratory-journal.com/sites/git-labor.de/files/images/special/53056402__original.jpg) staženo 14.3.2019

V uzavřeném chromatografickém systému obstarává pohyb eluentu čerpadlo zařazené před kolonou. Čerpadlo musí zajišťovat konstantní průtok mobilní fáze [13].

Gradientová eluce se používá k dělení směsí, jejichž složky se výrazně liší retencí při eluci s konstantním složením mobilní fáze. Princip spočívá v použití mobilních fází, jejichž složení se s časem mění. Toho se docílí mícháním několika složek, většinou dvou až tří, v poměru, který se řídí předem zvoleným časovým programem [14].

Vedle účinných kolon rozhoduje o kvalitě separace především použitý chromatografický systém, tj. kombinace stacionární a mobilní fáze. Podle relativní polaritě stacionární a mobilní fáze se rozlišuje na chromatografii v systémech s normálními fázemi, kde je stacionární fáze polárnější než fáze mobilní a chromatografii v systémech s obrácenými fázemi, kde je mobilní fáze naopak polárnější než fáze stacionární [15].

### 1.2.1.1 Chromatografické systémy s normálními fázemi

U systémů s normálními fázemi (NP-HPLC) jsou pro separaci látek používány polární stacionární fáze a méně polární mobilní fáze. Většinou jde o směsi rozpouštědel s odlišnou polaritou. Retenční mechanismus na normálních fázích je založen na soutěži mezi dělenou látkou a mobilní fází o lokalizovaná adsorpční centra na povrchu stacionární fáze (např. volné hydroxylové skupiny silikagelu). Retence je určena specifickými mezimolekulárními interakcemi látky s povrchem sorbentu a nespecifickými interakcemi látky s mobilní fází. Retence na koloně se zvyšuje s rostoucí polaritou analytu a klesá s rostoucí koncentrací polárního rozpouštědla v mobilní fázi [11].

Nejběžnější stacionární fází pro systém s normálními fázemi je silikagel. Silikagel lze připravit s různě nastavenými fyzikálními vlastnostmi. Pro účely adsorpční kapalinové chromatografie má mít specifický povrch ( $>200 \text{ m}^2/\text{g}$ ), objem pórů ( $> 0,7 \text{ ml/g}$ ) a střední průměr pórů (8-15 nm). S rostoucím objemem pórů klesá specifický povrch adsorbentu a tím i retence separovaných látek. Hydroxylové skupiny na povrchu silikagelu jsou buď izolované nebo jsou sousední skupiny vzájemně vázány vodíkovými vazbami. Na silanolové skupiny se adsorbuje voda rovněž vodíkovou vazbou. Tato adsorbovaná voda lze odstranit zahřátím na  $150 \text{ }^\circ\text{C}$ . Povrch silikagelu je slabě kyselý, takže silněji zadržuje bazické látky, než látky kyselé a neutrální. Silikagel je chemicky stabilní pouze při  $\text{pH} < 8$  [16].

Polaritu látky může ovlivňovat tvorba intramolekulární vodíkové vazby, což se projevuje v selektivě dělení. Objemné funkční skupiny, které stericky stíní polární skupinu v molekule, jsou pak příčinou snížení retence. Selektivita dělení pro sousední homology klesá s rostoucím počtem atomů uhlíku v alifatické řadě [11].

### 1.2.1.2. Chromatografické systémy s obrácenými fázemi (RP-HPLC)

Při chromatografii s obrácenými fázemi (RP-HPLC) je mobilní fáze polární. Obvykle jde o směs vodné složky s polárními organickými rozpouštědly, která jsou mísitelná s vodou (acetonitril, tetrahydrofuran a alkoholy). Stacionární fáze mají nepolární charakter. Často se jedná o dlouhé uhlíkaté řetězce navázané na povrchu nosiče jako je silikagel, hybridní sorbent nebo jiné kovové oxidy. Nejčastěji používanou fází je  $\text{C}_{18}$  [11].

Selektivita nepolárních stacionárních fází k málo polárním organickým látkám je určována výhradně vlastnostmi mobilní fáze. Vzájemné polární interakce mezi molekulami vody jsou tak silné, že k jejich překonání je třeba značné energie, kterou nemohou poskytnout slabé dispersní interakce mezi molekulami vody a molekulami málo polární organické fáze. Proto

jsou tyto látky ve vodě a vodných roztocích málo rozpustné a jsou z mobilní fáze vytěšňovány do fáze stacionární. Separované látky jsou tím více zadržovány na obrácené fázi, čím nižší je jejich polarita [16].

Na reverzních stacionárních fázích se téměř nevyskytují aktivní adsorpční centra schopná polárních interakcí. Povrch stacionární fáze je schopen interagovat pouze slabými disperzními silami. Nеспецифické interakce jsou mnohem slabší než polární interakce mezi polárními molekulami mobilní fáze a analytu. Tyto polární interakce zeslabují nспецифické interakce molekul analytů a stacionární fáze a ulehčují tak přechod molekul analytu do objemu polárního elučního činidla [11].

Roztok acetonitrilu (ACN) ve vodě má vyšší eluční sílu než stejně koncentrovaný roztok methanolu. Při použití roztoků alkoholů ve vodě jako mobilních fází je třeba věnovat pozornost i tomu, že tyto roztoky se vyznačují neideálním chováním [11]. Chromatografie na nepolárních adsorbentech se hodí mnohem lépe k dělení homologických řad než chromatografie na polárních adsorbentech. Většinou poskytují nižší selektivitu pro dělení polohových isomerů [16].

Ve srovnání s nerozvětvenými nasycenými látkami působí snížení retence přítomnost násobné vazby a rozvětvené uhlovodíkové řetězce v molekule separované látky. Tento vliv na retenci je možno přikládat působením disperzních sil mezi nepolárními stacionárními fázemi a separovanými látkami. U některých funkčních skupin bylo pozorováno snížení i zvýšení retence separovaných látek v závislosti na počtu těchto skupin a jejich poloze v molekule. Při přítomnosti více polárních skupin v molekule, a pokud je uhlovodíková část malá nebo jsou-li přítomny ionizované funkční skupiny, může převažovat afinita těchto látek k vodě jako mobilní fázi a tyto látky se eluují s mrtvým objemem kolony nebo dokonce ještě dříve [16].

### 1.2.2 Způsoby detekce

Pro detekci analyzovaných látek se využívá jejich specifických nebo obecných vlastností, jimiž se tyto látky liší od mobilní fáze. Podle toho se rozlišují selektivní a univerzální detektory [12].

Detektory v HPLC systému jsou umístěny za kolonou a zaznamenávají rozdíl v signálu mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující analyt. Detektory se dělí na hmotnostní a koncentrační. Hmotnostní detektory reagují na změnu hmotnostního toku složky v eluentu. Koncentrační detektory reagují na změnu hmotnostní koncentrace složky eluentu nezávisle na rychlosti přívodu do detektoru. Dále se detektory dělí na nedestruktivní

a destruktivní. V nedestruktivních detektorech nedochází k chemické přeměně detekované složky, zatímco v destruktivních detektorech se detekovaná složka chemicky mění [11].

#### 1.2.2.1. UV-VIS detektory

Mezi nejpoužívanější detektory pro kapalinovou chromatografii patří detektory, které pracují v rozmezí vlnových délek odpovídající ultrafialové a viditelné oblasti [15].

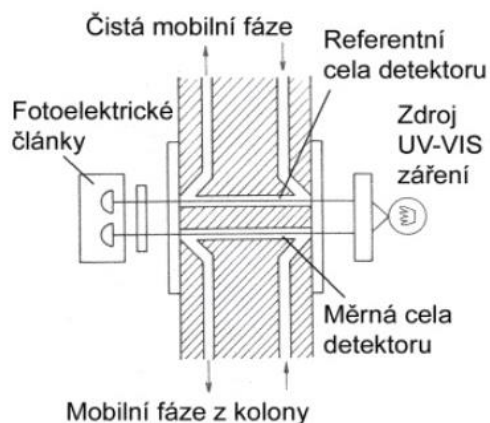
Přímé spojení LC/UV-VIS poskytuje ze všech kombinací (LC/MS, LC/NMR, LC/FTIR) sice nejméně informací o struktuře dělených látek, avšak je nejcitlivější a setkává se s nejmenšími technickými problémy [14].

Citlivost detektoru UV je velká a záleží na molárním absorpčním koeficientu analyzované složky a na celém objemu cely detektoru. Spektrofotometrický detektor, který pracuje v UV oblasti, je selektivní a vhodný i pro gradientovou eluci, neboť je mnoho rozpouštědel, jejichž kombinací lze gradient uskutečnit [12].

Eluát protéká měrnou celou, která pro analytické účely má mít malý objem a velkou optickou délku (obrázek 3). Tyto cely mají objem 5 až 10  $\mu\text{l}$  a optickou délkou 10 mm. Levnější přístroje mají jako zdroj UV záření nízkotlakou rtuťovou lampu a pracují jen při jedné vlnové délce 254 nm. Nejnovější přístroje jsou vybaveny deuteriovou výbojkou, mřížkovým monochromátorem a fotoelektrickým násobičem [13].

Kvantitativní vyhodnocení je založeno na Lambert-Beerově zákoně (rovnice (1)), který vyjadřuje vzájemný vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy ( $l$ ), koncentrací absorbující složky ( $c$ ) a vlastní velikostí absorpce vyjádřenou jako absorbancí ( $A$ ). Molární absorpční koeficient ( $\varepsilon$ ) je charakteristický pro každou látku.

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (1) [11]$$



Obrázek 3 Schéma spektrofotometrického detektoru

Přednášky ze separačních metod analytických doc. Ing. Petr Česla, Ph.D..

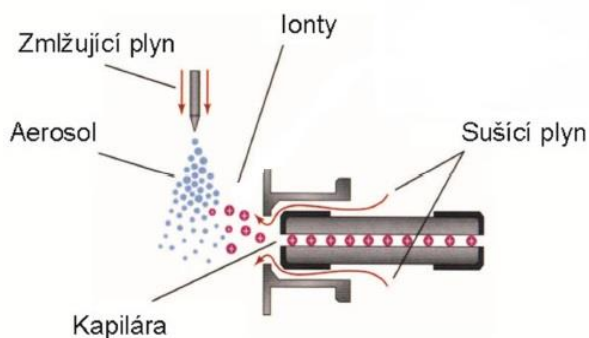
#### 1.2.2.2. Hmotnostně spektrometrická detekce

Výhody hmotnostního spektrometru oproti ostatním detektorům používaným v kapalinové chromatografii jsou dány jak jeho citlivostí, selektivitou, tak univerzálností [15].

Hmotnostní spektrometry (MS) jako detektory v HPLC jsou specifické a kromě údajů z chromatografu poskytují spektrální údaje o identitě látky. Proces identifikace či kvantifikace látek hmotnostním spektrometrem se odehrává ve třech krocích. Nejdříve dochází k ionizaci vzorku, kdy jsou neutrální molekuly v iontovém zdroji převedeny na ionty. Poté následuje rozdělení iontů podle poměru  $m/z$  (hmotnost/náboj) a jejich urychlení v analyzátoru a nakonec detekce a zesílení signálu v detektoru [11]. Částice stejných efektivních hmotností vychází z magnetického pole jako svazky zaostřené na stejné místo detektoru. Intenzita signálu je úměrná počtu částic. Vyhodnocovací software registruje jednotlivé signály v závislosti na hodnotách  $m/z$  a vznikne tzv. hmotností spektrum. Obsahuje-li molekulový ion přebytek vnitřní energie získané z ionizačního zdroje, rozpadne se za vzniku iontového fragmentu a elektroneutrální částice. Pravděpodobnost rozpadu molekulového iontu roste s jeho hmotností, násobné vazby naopak zvyšují jeho stabilitu [12].

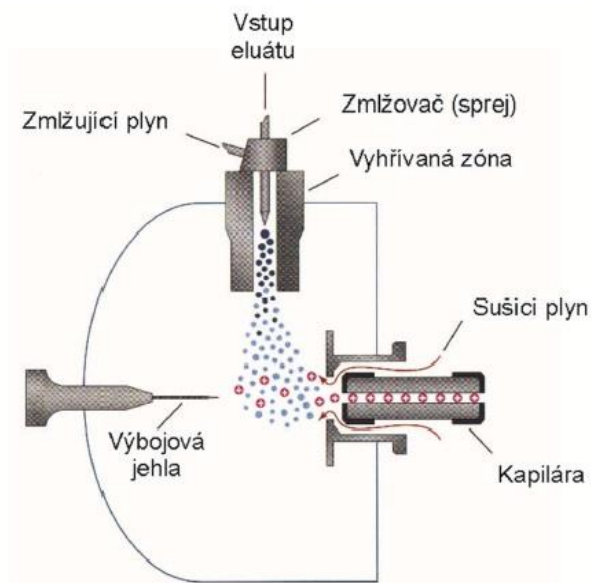
Pro ionizaci analytů existuje široké spektrum ionizačních technik, žádná z nich není zcela univerzální. Volba ionizační techniky je ovlivněna tepelnou stabilitou, molekulovou hmotností, těkavostí a polaritou látky. Nejpoužívanější ionizační techniky pro spojení s HPLC jsou techniky ionizace za atmosférického tlaku, jako ionizace elektrosprejem (ESI; obrázek 4), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI; obrázek 5) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI; obrázek 6). V off-line spojení se používá ionizace desorpcí laserem za účasti matrice (MALDI). Tyto techniky patří mezi tzv. měkké ionizační techniky,

což znamená, že při ionizaci vznikají primárně protonované molekuly  $[M + H]^+$  (pro záznam kladných iontů) nebo deprotonované molekuly  $[M - H]^-$  (pro záznam záporných iontů) a nedochází tak k rozsáhlé fragmentaci jako u tvrdých ionizačních technik [11].



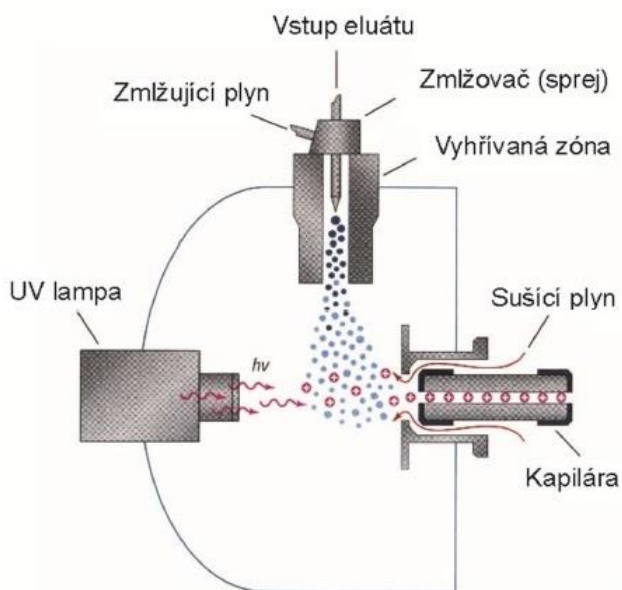
Obrázek 4 Schéma ionizace elektrosprejem

Přednášky z molekulové spektrometrie prof. Ing. Michal Holčápek, Ph.D.



Obrázek 5 Schéma chemické ionizace za atmosférického tlaku

Přednášky z molekulové spektrometrie prof. Ing. Michal Holčápek, Ph.D.



Obrázek 6 Schéma fotoionizace za atmosférického tlaku

Přednášky z molekulové spektrometrie prof. Ing. Michal Holčapek, Ph.D.

### 1.3 Derivatizace v HPLC

Derivatizační přístupy lze rozdělit podle místa, kde probíhá derivatizační reakce:

1. Předkolonová derivatizace (*off-line derivatization*) – chemická reakce probíhá před kolonou
2. Postkolonová derivatizace (*on-line derivatization*) – chemická reakce probíhá za kolonou
3. Derivatizace na koloně (*on-column derivatization*) – chemická reakce probíhá přímo na koloně

Uvedené postupy derivatizace mají vliv na eluční charakteristiky separovaných látek jako je účinnost separace, selektivita a doba analýzy. Požadavky na vznikající deriváty jsou odlišné. Obecně je derivatizace v separačních metodách používána za účelem umožnění a zvýšení citlivosti detekce, umožnění separace, zvýšení rozlišení a zamezení nežádoucí sorpce látek na koloně [11].

Z derivatizačních reakcí vhodných k přípravě derivátů pro kapalinovou chromatografii se využívají především ty, které vedou k tvorbě derivátů s vysokou citlivostí detekce. V podstatě jde o deriváty vykazující silnou fluorescenci nebo absorpci v ultrafialové a viditelné oblasti spektra nebo o deriváty obsahující značné elementy umožňující radiometrickou detekci [14].



## 1.4 Aplikace LC v analýze

Lineární alkybenzensulfonát (LAS) je nejběžnější syntetická aniontová povrchově aktivní látka používaná v domácích a průmyslových detergentech. Villar a kol. ji stanovovali v kalech z čistíren odpadních vod pomocí mikrovlnné extrakce a HPLC-FL. Byla použita mobilní fáze obsahující acetonitril a vodu s gradientovou elucí. Výsledná doba analýzy trvala 7 min. Mezní hodnota pro LAS v kalu po aplikaci do půdy je 2600 mg/kg. Metoda nevyžadovala kroky čištění nebo zakoncentrování a nevyžadují žádné speciální vybavení. Metoda poskytuje dobrý výkon, pokud jde o přesnost, linearitu, LOD a LOQ a výtěžky [17].

Pro analýzu čtyř (aniontových, amfoterních, neiontových a kationtových) tříd povrchově aktivních látek v šamponech a vlasových kondicionérech Hyun a kol. použil HPLC-RP s detekcí rozptylu světla (ELSD) bez předchozího zakoncentrování. Mobilní fáze byla směs acetonitrilu a kyseliny trifluoroctové (TFA) obsahující vodu a tetrahydrofuran (THF). Průtok byl po celou dobu 0,8 ml/min. Počáteční mobilní fáze byla směs 5 % ACN – 5 % TF – 90 % vody (0,5 % TFA) ponechána po dobu 5 min. Obsah ACN a TF byl lineárně zvýšen z 5 na 70 % ACN a z 5 na 30 % TF po dobu 40 min při 30°C. Tuto metodu lze použít ke stanovení koncentrací povrchově aktivních látek v komerčních produktech. Nicméně přesná kvantitativní analýza nebyla možná kvůli nedostatku standardů. Distribuce homologů mezi standardem a surovinami v komerčních produktech nejsou stejné, ale podobné, proto byly standartní materiály studovaných surových látek odebírány z komerčních produktů podle informací o jejich složení [18].

Pro identifikaci a kvantifikaci homologů alkoholových sulfátů (AS) a ethoxysulfátů (AES) alkoholu ve vzorcích z mořských a říčních sedimentů Fernández-Ramos a kol. vyvinuli novou metodu. Metoda zahrnuje extrakci 5 g suchého vzorku methanolem s použitím extrakce kapalinou za zvýšeného tlaku (PLE) a kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Jako vnitřní standard byla použita sodná sůl kyseliny 2-oktylbenzensulfonové. Pro separaci byla použita kolona Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub>. Mobilní fáze byla směs roztoku triethylaminu a kyseliny octové (50 mM) ve vodě (rozpouštědlo A) a roztok acetonitril:voda (80:20 obj. %) (rozpouštědlo B). Pro separaci homologů byl použit následující gradient: 0 až 30 min, 50-100 % B; zpět na 50 % B za 5,0 min, aby se obnovily podmínky. Průtok byl 0,5 ml/min a teplota kolony byla udržována na 30°C. Pro ethoxyestery AES byly podmínky gradientu následující: 0 až 15 min, 30-100 % B; zpět na 30 % B za 5 min. Průtok byl 0,5 ml/min a teplota kolony 30°C. Pro MS/MS detekci byla použita

ionizace elektrosprejem (ESI) v režimu negativních iontů. Nejvyšší koncentrace AS a AES byly zjištěny ve vzorcích říčních sedimentů. Také byly pozorovány rozdíly mezi chováním sloučenin s krátkým řetězcem (C12) a sloučenin s dlouhým řetězcem (C14-C18) [19].

Jandera a kol. zkoumali retenční chování sulfátových oligoethylenglykol-nonylfenyletherových aniontových povrchově aktivních látek v systému s normálními fázemi s nitrilovými a aminovými stacionárními fázemi a s mobilní fází obsahující tetraalkylamoniové přísady. Za použití gradientové eluce bylo možné oddělit sulfátové oligomery a jejich mateřské nesulfátové analogy v jednom systému. Aby bylo možné oddělit jednotlivé sulfátové oligomery, bylo nutné snížit jejich retenci použitím mobilních fází obsahujících iontovou přísadu. Zjistili, že kationtové tetraalkylamoniové soli jako je CTAB (cetyltrimethylamonim bromid) a TBAB (tetrabutylamonim bromid) jsou pro tento účel vhodné, protože mají dobrou rozpustnost v nevodném prostředí [20].

Aparicio a kol. vyvinuli multidisciplinární metodu pro stanovení znečišťujících látek v listnaté a kořenové zelenině. Metoda byla aplikována na listovou zeleninu (hlávkový salát a špenát) a kořenovou zeleninu (mrkev, tuřín, brambory). Mezi vybrané sloučeniny patřilo šest perfluoralkylových sloučenin (perfluorkarboxylové kyseliny a kyseliny perfluoroktansulfonové), tři neiontové povrchově aktivní látky (nonylfenol a nonyfenolethoxyláty), osm aniontových povrchově aktivních látek (alkylsulfáty a lineární alkylbenzensulfonáty), čtyři konzervační látky (parabeny), biocidy (triclosan a triklokarban), změkčovadla (bisfenol A a di-4,2-ethylhexylftalát), benzofenony a hormony. Metoda je založena na extrakci pomocí ultrazvuku, čištění při extrakci na pevné fázi (SPE) a analýze pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotností spektrometrií s trojitým kvadrupólem a ionizací elektrosprejem (ESI). Separace byla provedena na koloně HALO C18 při 25 °C pomocí 10 mM vodného roztoku octanu amonného a metanolu při průtoku 0,6 ml/min. Eluce byla prováděna s gradientem s lineárním zvýšením obsahu metanolu z 23 % na 70 % za 14 min, pak na 80 % v 19 min a na 100 % v průběhu 3 min [21].

Piere a kol. studovali a porovnávali protokol pro kvantitativní a kvalitativní analýzu kationtových povrchově aktivních látek na bázi argininu pomocí HPLC a CE. Povrchově aktivní homology byly analyzovány jako dihydrochloridové soli: arginin, decylamid arginin, dodecylamid, arginin tetradecylamid a arginin hexadecylamid. Separace byla prováděna na koloně LiChrocart 250x4 mm, Lichrospher 100 CN za laboratorní teploty a průtoku 1 ml/min. Kvalitativní i kvantitativní analýza řady argininových alkyl amid dihydrochloridů homologů

(C10-C16) byla úspěšně dosažena pomocí HPLC a CE. Použití organických modifikátorů je nezbytné pro dosažení rozlišení mezi homology kationtových povrchově aktivních látek s dlouhým řetězcem [22].

Gomez a kol. použili pro stanovení 16 neiontových a aniontových povrchově aktivních látek ve vzorcích vody SPE v kombinaci s kapalinovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem. Vliv suprese iontů byl studován ve vodních matricích z čistíren odpadních vod, úpraven pitné vody a zařízení na odsolení mořské vody. LC separace byla provedena na koloně C18 s reverzní fází při teplotě 35 °C a průtoku mobilní fáze 1 ml/min. ESI rozhraní bylo použito se dvěma ionizačními režimy: pozitivní ionizací (PI) a negativní ionizací (NI). Pro PI byla použita mobilní fáze: voda (A) a methanol (B). výchozí podmínky gradientu byly 60 % methanol (B), lineárně zvýšeno na 100 % za 20 min. V NI režimu byla použita následující mobilní fáze: voda obsahující 5 mM triethylaminu (A) a methanolu (B). Eluční gradient byl zahájen 40 % methanolem (B) a byl zvýšen na 100 % za 7 min a dále udržován za těchto podmínek 10 min. Vyvinutá metoda je citlivá, jednoduchá a vykazuje dobrý lineární rozsah a má detekční limity nižší než 50 ng/L pro většinu testovaných sloučenin [23].

Jandera a Prokeš zkoumali retenční chování nesulfatovaných a sulfatovaných oligoethylenglykol-nonylfenyl etherů a aniontových povrchově aktivních látek v LC systémech s normální fází s chemicky vázanou aminovou stacionární fází v organických mobilních fázích obsahující vodu a cetyltrimethylamonium bromid (CTAB). V tomto systému bylo možno oddělit nižší sulfatované a nesulfatované oligomery v jednom cyklu za 10-15 minut za izokratických podmínek [24].

Park a Rhee použili LC/ELSD pro současnou a rychlou analýzu různých aniontových a neiontových povrchově aktivních látek. Osm povrchově aktivních látek (APG, LAE7, CDE, NPE7, LAE9-cap, SLS, AOS, AOT) bylo odděleno během 30 minut v jednom cyklu LC na silikagelové koloně s vázaným C18 s gradientem methanolu a vody s použitím ELSD detekce. Gradient začínal na 70 % methanolu a 30 % vody při průtoku 0,8 ml/min po dobu 6 min, obsah methanolu vzrostl lineárně ze 70 na 100 % po dobu dalších 14 minut, přičemž tento stav byl udržován po dobu 4 minut a poté byl průtok zvýšen na 2 ml/min. Tato metoda má však určitá omezení. Například chromatogramy LAS a lauryethoxylenovaného síranu sodného (SLES) byly příliš široké na to, aby byly kvalitativně analyzovány do konce.

Na druhé straně nebylo možno oddělit homology povrchově aktivních látek, jako je NPE7, LAE7 a LAE9-cap [25].

Lara-Martín a kol. vyvinuli novou metodu pro současné stanovení nejpoužívanějších aniontových povrchově aktivních látek: lineární alkybenzensulfonáty (LAS), alkylethoxysulfonáty (AES) a alkylsulfáty (AS) ve vodách a sedimentárních vzorcích. Předkoncentrace a čištění se provádí pomocí SPE. Identifikace a kvantifikace cílových sloučenin se provádí pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem vybaveným elektrosprejem (ESI) v negativním iontovém režimu. Separace byla provedena za použití analytické kolony C18 s reverzní fází. Byla použita následující mobilní fáze: acetonitril:voda 80:20 (A) a voda s 5 mM triethylaminem (B). Gradient začal s 47 % A a byl lineárně zvýšen na 100 % A během 40 minut a udržován isokraticky po dobu 10 min. Rychlost průtoku byla 0,15 ml/min [26].

Benetio-Cambra a kol. popsali způsob separace, charakterizace a stanovení ethoxylátů mastných alkoholů (FAE) a alkylether sulfátů (AES) ve vzorcích průmyslových a environmentálních. Oddělení dvou tříd povrchově aktivních činidel bylo dosaženo v médiu 50:50 metanol:voda zadržením AES na silném aniontovém výměníku (SAX) zatímco většina FAE byla eluována. Po promytí SAX byly zbytkové hydrofobní FAE eluovány zvýšením methanolu na 80 %. Nakonec byly AES eluovány za použití 80:20 a 95:5 methanolu. Methanol a voda byly odstraněny z frakcí FAE a AES a zbytky byly rozpuštěny v 1,4-dioxanu. V tomto médiu byla provedena esterifikace FAE a transesterifikace AES cyklickým anhydridem. K derivatizaci povrchově aktivních látek v průmyslových vodách a extraktech z moří byly použity anhydridy kyseliny ftalové a difenové, přičemž separace derivatizovaných derivátů byla dosažena gradientovou elucí na koloně C8 s acetonitrilem a vodou v přítomnosti 0,1% kyseliny octové [27].

Seguar a kol. popsali způsob stanovení povrchově aktivních látek, včetně ethoxylátů mastných alkoholů (FAE), alkylethersulfonátů (AES) a lineárních alkybenzensulfonátů (LAS). Vzorky byly zředěny 50% methanolem při pH 4 před extrakcí na pevné fázi na slabém iontoměnič/anexu (WAX). Třídy surfaktantů AES a LAS byly zachovány, zatímco neiontové složky včetně většiny FAE oligomerů byly eluovány. Po promytí WAX patrony pro odstranění kationtů byly zbývající hydrofobní FAE oligomery eluovány za použití horkého 80% methanolu při pH 4. Tyto eluáty byly spojeny za vzniku neiontové frakce. Poté byly AES a LAS eluovány za použití 80% methanolu s 3 M NH<sub>3</sub> následovaným 95% methanolem

s 0,75 M NH<sub>3</sub>. Dva eluáty získané v zásaditém médiu se spojily, aby se vytvořila aniontová frakce. Rozpouštědla se odpaří, zbytky se rozpustí v 1,4-dioxamu a provede se esterifikace alkoholů a transesterifikace AES anhydridem kyseliny ftalové. Separace derivatizovaných oligomerů byla dosažena gradientovou elucí na koloně C8 s mobilní fází acetonitril:voda s přítomností 0,1% kyseliny octové a 0,1 M NaClO<sub>4</sub>. Metoda byla aplikována na prací a průmyslové čisticí prostředky, šampony a sprchové gely [28].

Guo a kol. vyhodnotili potencionální využití vícevrstevných uhlíkových nanotrubeček (MWCNTs) jako adsorbentu pro extrakci na pevné fázi (SPE) pro předkoncentraci lineárních alkylbenzensulfonátů (LAS) za použití ionpárové-SPE s tetrabutylamoniumhydroxidem (TBAH). Homology LAS přítomné ve vodném vzorku vytvořily iontový pár s TBAH a roztok byl veden přes MWCNT. Analyty zadržené v patroně byly eluovány methanolem a koncentrovaný methanolvý extrakt byl analyzován pomocí HPLC-UV [29].

Wangkarn a kol vyvinuli novou metodu pro separaci a stanovení lineárních alkylbenzensulfonátů C10-C13 (LAS). Pro HPLC-UV separaci LAS v různých vzorcích byla použita kolona Zorbax Eclipse XDB C8. Jako mobilní fáze byla použita směs metanolu a vody v poměru 80:20 (obj./obj.) obsahující 1,5 mM octan amonný. Pro potvrzení sloučenin LAS ve vzorcích vody byla použita hmotnostní spektrometrie s negativní ionizací elektrosprejem [30].

Escrig-Doménech a kol. vyvinuli metodu pro současné stanovení nejpoužívanějších skupin povrchově aktivních látek lineárních alkylbenzensulfonátů (LAS), alkylethersulfonátů (AES), ethoxylátů mastných alkoholů (FAE) a oleinů (mýdla, soli mastných kyselin) v čisticích prostředcích. Běžné kolony C8, pentafluorfenylu a bifenyly s reverzní fází nebyly schopny oddělit aniontové třídy LAS a AES; nicméně protože jediný LAS absorbuje v UV, tyto dvě třídy byly nezávisle kvantifikovány použitím kolony C8 a sériově zapojeného UV a ELSD detektoru. Nejlepšího kompromisu pro vyřešení separace čtyř tříd povrchově aktivních látek a oligomerů ve třídách bylo dosaženo pomocí kolony C8 a gradientu ACN:voda. Pro zvýšení retence aniontových povrchově aktivních látek byl použit octan amonný jako činidlo pro párování iontů kompatibilní s ELSD detekcí. Také pro posun pík oleinů vzhledem k oligomerům FAE byla použita kyselina octová. V optimalizovaném způsobu byla poskytnuta modulace mobilní fáze s použitím octanu amonného během eluce LAS a AES a kyseliny octové po eluci LAS a AES. Kvantifikace překrývajících se tříd LAS a AES byla dosažena použitím UV detektoru. Pro separaci byla použita kolona C8. Rychlost průtoku byla

1 ml/min a UV detekce byla nastavena na  $225 \pm 10$  nm za použití  $360 \pm 60$  nm jako reference. Separace byla provedena při  $15^\circ\text{C}$  s použitím gradientu ACN:voda, dosaženého smícháním čtyř roztoků v párech (A-B a C-D) následujícím způsobem. Roztok A obsahoval 10 mM  $\text{NH}_4\text{AcO}$  ve vodě a roztok B byl 90:10 ACN-voda ve směsi obsahující 10 mM  $\text{NH}_4\text{AcO}$ . Roztok C byl 17,5 mM (0,1%) vodný roztok  $\text{HAcO}$ , zatímco D také obsahoval 17,5 mM (0,1%)  $\text{HAcO}$ , ale ve směsi 90:10 ACN-voda. Eluce gradientu byla zahájena smícháním A a B. Pro optimalizovaný postup bylo procento B lineárně zvýšeno v 50 na 65 % za 12 minut. Po 12 minutách byly roztoky A a B nahrazeny roztoky C a D, ale při nahrazení roztoků bylo udržováno 65 % D. Pak byl obsah D zvýšen ze 65 na 100 % po dalších 28 minut. Celkový čas gradientu byl 40 minut [31].

Lara-Martín a kol. také vyvinuli metodiku schopnou souběžné analýzy hlavních povrchově aktivních látek: lineárních alkybenzensulfonátů (LAS), alkylethoxysulfonátů (AES), alkylsulfátů (AS), nonylfenolpolyethoxylátů (NPEOs) a alkoholových polyethoxylátů (AEO) – a jejich karboxylových metabolitů: sulfofenylkarboxylové kyseliny (SPC) a alkylfenoethoxykarboxyláty (APEC) ve vzorcích životního prostředí. Extrakce se provádí extrakcí na pevné fázi (SPE) a tlakovou extrakcí (PLE) z vody a sedimentu. Identifikace a kvantifikace cílových sloučenin byla provedena pomocí systému kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) s elektrosprejovou ionizací. Chromatografická separace byla provedena za použití kolony C18. Jako mobilní fáze byla směs metanolu (A) a voda s 5 mM kyselinou octovou a 5 mM ethylaminem (B). Eluční gradient pro první minutu byl 0 % A a byl lineárně zvýšen na 70 % A v průběhu 15 minut, pak lineárně vzrostl na 100 % A během dalších 15 minut. Rychlost průtoku byla 0,15 ml/min [32].

Pro stanovení 16 povrchově aktivních látek v odpadních vodách, suspendovaných pevných látkách a biologických kalech Bergé a kol. vyvinuli jednoduchou, rychlou, efektivní a multireziduální metodu založenou na extrakci na pevné fázi s využitím syntetických matic. Separace byla provedena pomocí kapalinového chromatografu s tandemovou hmotnostní spektrometrií LC-MS/MS s ionizací elektrosprejem. Jako mobilní fáze byl použit 0,1 M octan amonný v Milli-Q vodě (A) Milli-Q voda (B) a acetonitril (C). Počáteční podmínky gradientu byly po 1 min: 65 % Milli-Q vody (B) a 30 % ACN (C) a byl zahájen eluční gradient a ACN lineárně vzrostl na 85 % za 7 min a udržován po dobu 12 minut [33].

## 2 Experimentální část

### 2.1 Přístrojové vybavení

K vlastní analýze byly použity tyto přístroje:

- Dvoupaprskový spektrální fotometr UV-2600 Shimadzu (Kyoto, Japonsko)
- Modulární kapalinový chromatograf Shimadzu XR (Kyoto, Japonsko) sestávající z dvou vysokotlakých čerpadel LC-20ADXR, autosampleru SIL-20A HT, UV detektoru SPD-20A a termostatu kolon LCO102 (ECOM Praha), spojený s hmotnostním spektrometrem QTRAP4500 (AB Sciex, Framingham, MA, USA).

### 2.2 Kolona, gradienty mobilní fáze a podmínky analýzy

Při analýze připravených derivátů tenzidů kapalinovou chromatografií byla použita kolona Luna Omega C18 délky 100 mm, vnitřního průměru 2,1 mm, plněná plně porézními částicemi o velikosti 1,6  $\mu\text{m}$ . Teplota kolony byla v průběhu analýzy udržována na 30 °C. Na kolonu byl dávkován vzorek o objemu 1  $\mu\text{l}$ .

Jako mobilní fáze byl použit acetonitril ve směsi s deionizovanou vodou. Průtok mobilní fáze činil 0,1 ml/min a pro gradientovou eluci byl použit následující program: 0 min – 70 % (v/v) acetonitrilu ve vodě, 15 min – 100 % (v/v) acetonitrilu ve vodě, 28 min – 100 % (v/v) acetonitrilu ve vodě, 28,1 min – 70 % (v/v) acetonitrilu ve vodě. Analýza byla zastavena ve 30. min. Před každou analýzou byla kolona promyta mobilní fází s počátečním složením po dobu 10 min.

Analýzy byly zaznamenávány jednak pomocí UV detekce při vlnové délce 254 nm a dále byla měřena hmotnostní spektra s ionizací elektrosprejem, přístroj pracoval v režimu lineární iontové pasti s dynamickým plněním (Enhanced MS) a byly zaznamenávány kladné ionty. Spektra byla zaznamenávána v rozsahu m/z 50-1000 se skenovací rychlostí 10 000 Da/s. Další nastavení hmotnostního spektrometru byla následující: průtok plynů CUR (Curtain gas) 25 psi (172 kPa), zmlžující plyn GS1 40 psi (276 kPa), sušící plyn GS2 50 psi (345 kPa); napětí na zdroji 4500 V, teplota sušícího plynu 200 °C, deklasterační potenciál 60 V, vstupní potenciál 10 V a kolizní energie 10 V. Napětí na detektoru bylo nastaveno na 2700 V.

## 2.3 Použité chemikálie

- Amisoft CS-11            *Na N-cocoyl-L-glutamate*
- Amisoft CS-22            *Na N-cocoyl-L-glutamate*
- Amisoft CT-12S         *Na Triethanolamine N-cocoyl-L-glutamate*
- Amisoft ECS-22SB       *Na N-cocoyl-L-glutamate*
- Amilate ET-CS-12       *Na N-cocoyl-L-glutamate resp. Na N-cocoyl-L-Threonine*
- Amilate GCK-12H       *K N-cocoyl-glycinate + K Cocoate*
- Amilate GCK-12K       *Na N-cocoyl-glycinate*

Vzorky tenzidů byly poskytnuty firmou Ajinomoto (Tokio, Japonsko).

- Acetonitril, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Deionizovaná voda připravená pomocí zařízení Milli-Q Reference System (Molsheim, Francie)
- Ethanol, denaturovaný, ze zásob na Katedře analytické chemie
- Fenolftalein, ze zásob na Katedře analytické chemie
- Hydroxid sodný, LachNer (Neratovice, ČR)
- *p*-bromfenacylbromid, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

## 2.4 Příprava vzorků

### 2.4.1 Příprava *p*-bromfenacylesteru

K derivatizaci bylo do vialek odpipetováno 0,5 ml kapalných vzorků a naváženo 125 mg pevného vzorku. Pevný vzorek byl rozpuštěn ve 2 ml destilované vody. Ke každému vzorku bylo přidáno 0,5 ml ethanolu. Dále byla provedena neutralizace tak, že ke vzorkům byla přidána kapka fenolftaleinu a po kapkách byl přidáván hydroxid draselný do prvního růžového zbarvení. Poté byl přidán po kapkách čistý vzorek do odbarvení fenolftaleinu. Vzorek Amisoft ECS-22SB měl fialové zbarvení hned po přidání fenolftaleinu. Dále bylo ke vzorku přidáno 125 mg *p*-bromfenacylbromidu. Vialky byly uzavřeny a vloženy do vodní lázně, kde byly zahřívány. Po ochlazení se vyloučil krystalický derivát, který byl přefiltrován a promyt destilovanou vodou.

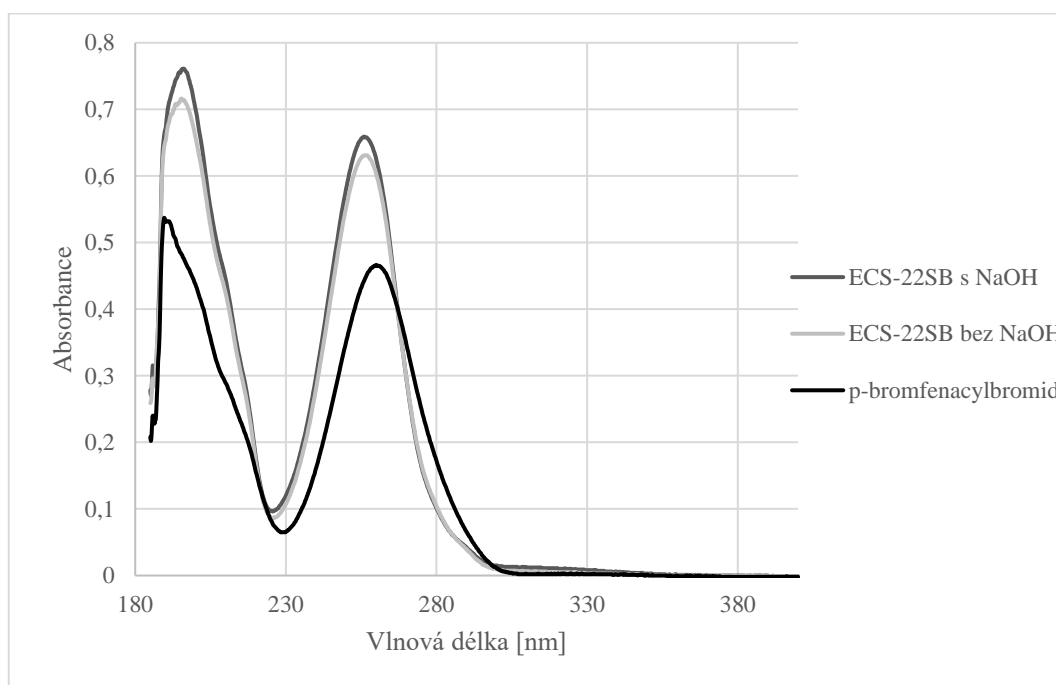


## 3 Výsledky a diskuse

### 3.1 Analýza UV

Vzorky tenzidů byly nejprve proměřeny na UV spektrometru. Naměřená spektra vzorků tenzidů jsou uvedena v příloze 1 (obrázky P1-1 až P1-7). Ze spekter bylo zjištěno, že samotné vzorky tenzidů absorbují záření při vlnové délce menší než 200 nm, která však není příliš vhodná jako detekční vlnová délka pro chromatografickou analýzu z důvodu značné nespecifické absorpce mnoha látek, včetně používaných rozpouštědel. Z toho důvodu byly připraveny *p*-bromfenacylestery, aby byla možná UV detekce těchto látek.

Deriváty tenzidů byly připravovány postupem dle Jurečka [34]. Před samotnou reakcí s *p*-bromfenacylbromidem je vzorek derivatizované karboxylové kyseliny nejprve neutralizován na fenolftalein. Vzorek tenzidu ECS-22SB měl fialové zbarvení ihned po přidání fenolftaleinu, proto byl připraven derivát jak s neutralizací NaOH, tak bez ní. Oba deriváty byly proměřeny na UV spektrometru a záznamy byly porovnány se spektrem *p*-bromfenacylbromidu. Porovnání záznamu je uvedeno na obrázku 7. Ze záznamu je vidět, že derivát připravovaný s NaOH i bez NaOH mají stejné UV spektrum. Proto byly další deriváty od tohoto vzorku připravovány bez neutralizace NaOH.



Obrázek 7 Porovnání UV spekter derivátu ECS-22SB s neutralizací NaOH a bez NaOH s *p*-bromfenacylbromidem

### 3.2 Analýza *p*-bromfenacylesterů tenzidů

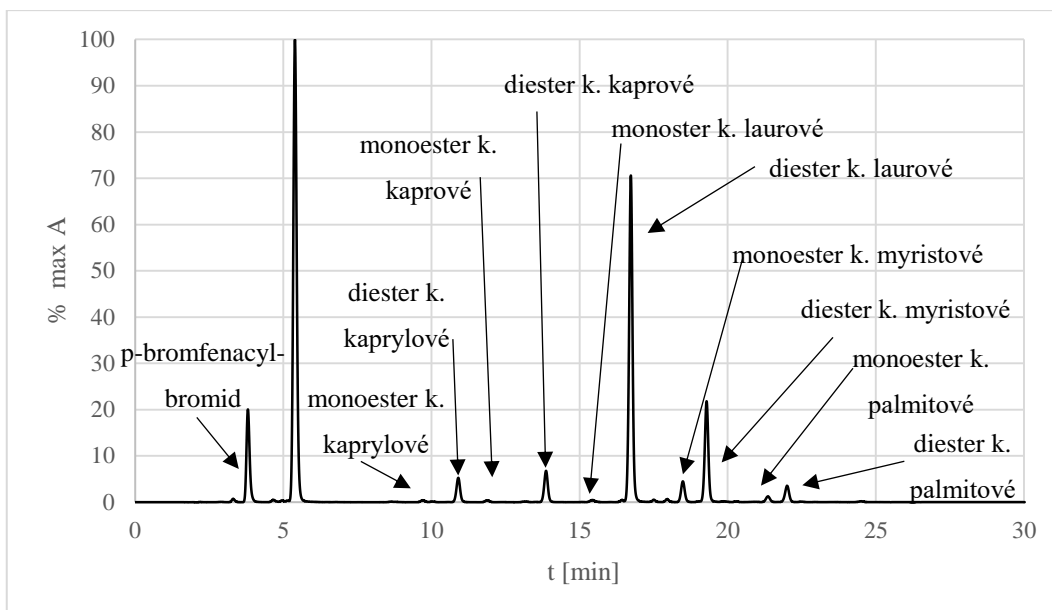
Vzorek k analýze byl připraven následujícím způsobem. Ke krystalu derivátu ve vialce byl přidán 1 ml acetonitrilu a rozpuštěn v ultrazvuku. Takto připravený vzorek byl následně analyzován pomocí kapalinové chromatografie v systému s obrácenými fázemi s gradientovou elucí a byl zaznamenán signál absorbance při 254 nm, tak i hmotnostní spektra pro potvrzení identity připravených derivátů.

Dále jsme se v experimentální části snažili ověřit vliv podmínek přípravy derivátů na výtěžek derivatizace, a proto byly deriváty připravovány při čtyřech různých podmínkách.

1. Při 70°C po dobu 30 minut.
2. Při 70°C po dobu 60 minut
3. Při 70°C po dobu 90 minut
4. Při 80°C po dobu 60 minut

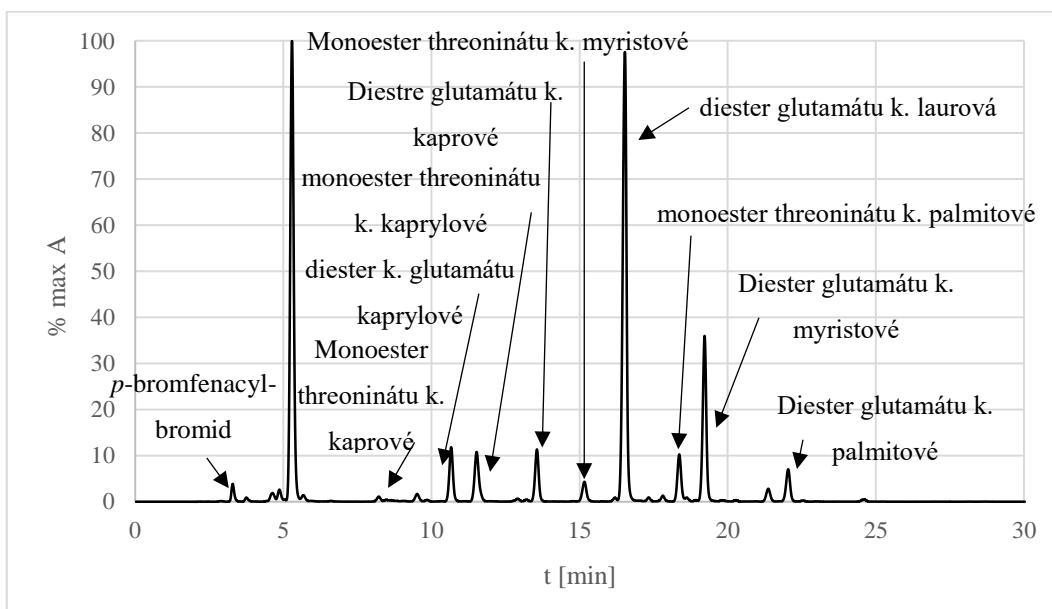
LC/UV záznamy analýz jednotlivých derivátů od každého vzorku jsou uvedeny v příloze 2.

V LC/UV záznamu derivátů tenzidů na bázi kokosového oleje s kyselinou glutamovou byly identifikovány píky náležící mono- a di-*p*-bromfenacylesterům tenzidu obsahující kyselinu kaprylovou, kaprovou, laurovou, myristovou, palmitovou a dále pík *p*-bromfenafylbromidu jako nezreagovaného derivatizačního činidla. Příklad záznamu s identifikovanými píky je uveden na obrázku 8. Separace jsou vyneseny jako závislost % absorbance z nejvyšší hodnoty absorbance v daném záznamu na čase.



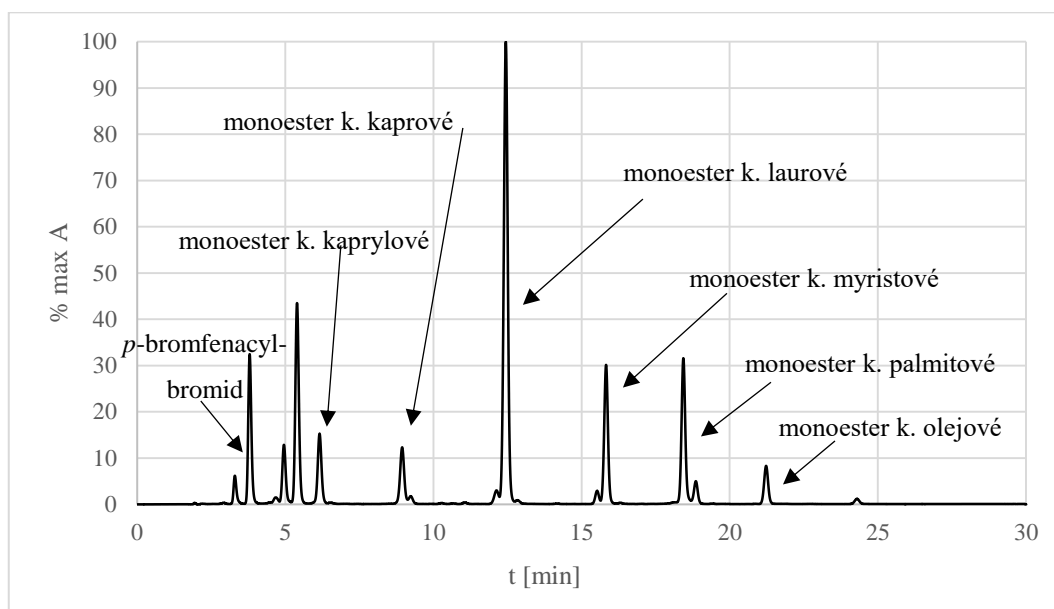
Obrázek 8 LC/UV záznam derivátu vzorku CS-22 připravovaného při 70 °C po dobu 30 minut s identifikovanými píky

V LC/UV záznamu derivátu tenzidu na bázi kokosového oleje s threoninem byly identifikovány píky náležící monoesterům od threoninu a di-*p*-bromfenacylesterům od kyseliny glutamové s kyselinou kaprylovou, kaprovou, laurovou, myristovou, palmitovou a pík činidla *p*-bromfenacylbromidu. Záznam s identifikovanými píky je uveden na obrázku 9.



Obrázek 9 LC/UV záznam derivátu vzorku ET-CS-12 připravovaného při 70 °C po dobu 60 minut s identifikovanými píky

V LC/UV záznamu derivátů tenzidů na bázi kokosového oleje s glycinem byly identifikovány píky náležící mono-*p*-bromfenacylesterům tenzidu s kyselinou kaprylovou, kaprovou, laurovou, myristovou, palmitovou, olejovou a pík *p*-bromfenafylbromidu. Záznam s identifikovanými píky je uveden na obrázku 10.



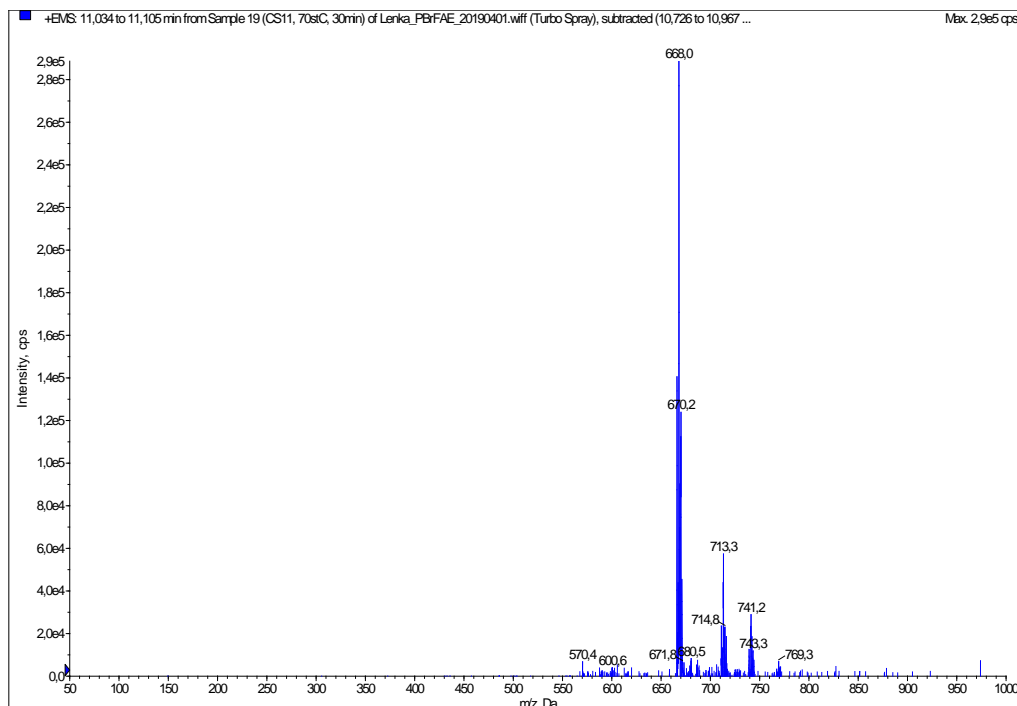
Obrázek 10 LC/UV záznam derivátu vzorku GCK-12K připravovaného při 70 °C po dobu 90 minut s identifikovanými píky

Z porovnání všech záznamů separace připravených derivátů *p*-bromfenacylesterů aniontových tenzidů (obr. 8-10) vyplývá, že největší obsah ve vzorcích mají deriváty kyseliny laurové, následované ostatními mastnými kyselinami s nižším (kaprylová, kaprová) a vyšším počtem uhlíků v alkyly (myristová, palmitová, olejová kyselina). Toto složení odpovídá typickému zastoupení mastných kyselin v kokosovém oleji, které je uváděno v literatuře (tabulka 1). Dále pořadí eluce látek v gradientu odpovídá typickému retenčnímu chování v systému s obrácenými fázemi, kdy delší alkylový řetězec poskytuje vyšší retenční charakteristiky a zbývající část struktury přispívá k retenci menším dílem. Di-*p*-bromfenacyl estery mají vyšší retenční časy v porovnání s mono-*p*-bromfenacylestery stejného tenzidu a délce řetězce mastné kyseliny, pravděpodobně díky příspěvku benzenového jádra k retenci.

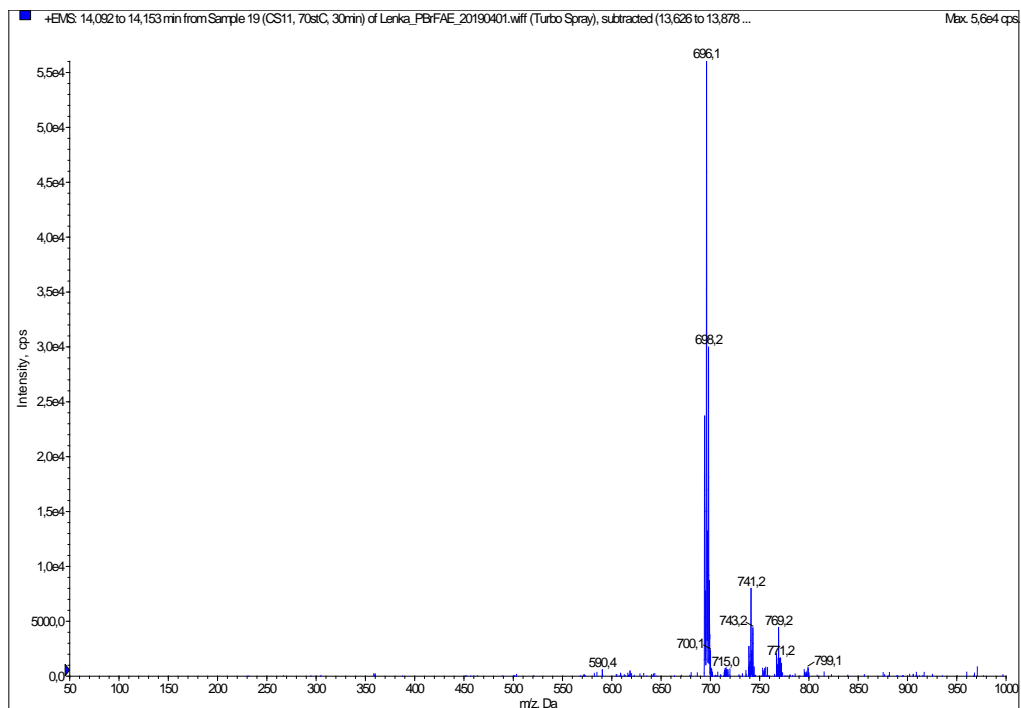
Tabulka 2 Sumární vzorce a vypočtené monoizotopické hmoty derivátů s kyselinou glutamovou

	glutamát			monoester		diester	
	vzorec	vzorec	Mr	vzorec	Mr	vzorec	Mr
k. glutamová	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> N		147,05				
<i>p</i> -bromfenacyl-bromid	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> OBr <sub>2</sub>		277,89				
k. kaprylová	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> O <sub>5</sub> N	273,16	C <sub>21</sub> H <sub>29</sub> O <sub>6</sub> NBr	470,12	C <sub>29</sub> H <sub>35</sub> O <sub>7</sub> NBr <sub>2</sub>	667,08
k. kaprová	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>27</sub> O <sub>5</sub> N	301,19	C <sub>23</sub> H <sub>33</sub> O <sub>6</sub> NBr	498,15	C <sub>31</sub> H <sub>39</sub> O <sub>7</sub> NBr <sub>2</sub>	695,11
k. laurová	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>31</sub> O <sub>5</sub> N	329,22	C <sub>25</sub> H <sub>37</sub> O <sub>6</sub> NBr	526,18	C <sub>33</sub> H <sub>43</sub> O <sub>7</sub> NBr <sub>2</sub>	723,14
k. myristová	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>35</sub> O <sub>5</sub> N	357,25	C <sub>27</sub> H <sub>41</sub> O <sub>6</sub> NBr	554,21	C <sub>35</sub> H <sub>47</sub> O <sub>7</sub> NBr <sub>2</sub>	751,17
k. palmitová	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>39</sub> O <sub>5</sub> N	385,28	C <sub>29</sub> H <sub>45</sub> O <sub>6</sub> NBr	582,24	C <sub>37</sub> H <sub>51</sub> O <sub>7</sub> NBr <sub>2</sub>	779,20
k. olejová	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>23</sub> H <sub>43</sub> O <sub>5</sub> N	413,31	C <sub>31</sub> H <sub>49</sub> O <sub>6</sub> NBr	610,27	C <sub>39</sub> H <sub>55</sub> O <sub>7</sub> NBr <sub>2</sub>	807,23

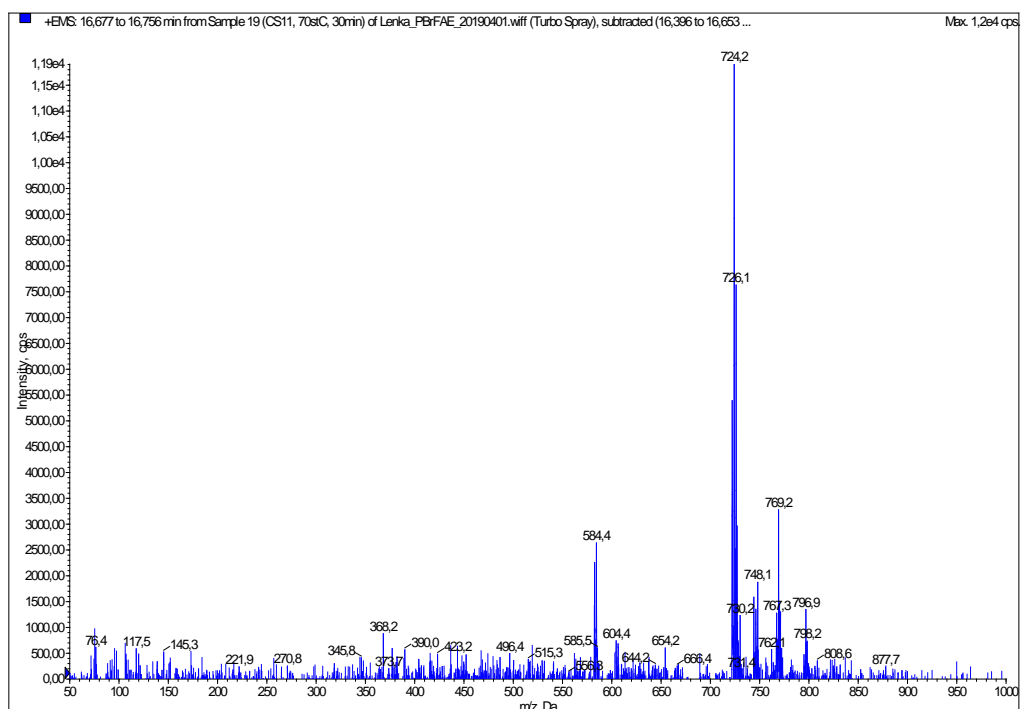
Pomocí vypočtených monoizotopických hmot derivátů uvedených v tabulce 2 byly v hmotnostním spektru tenzidu Amisoft CS-11 na bázi kyseliny glutamové identifikovány diestery mastných kyselin a to kaprylové, kaprové, laurové, myristové a palmitové. Jednotlivá hmotnostní spektra těchto kyselin jsou uvedena na obrázku 11-15. V hmotnostních spektrech se jako nejintenzivnější ion projevila protonovaná molekula  $[M+H]^+$ , následovaná aduktem s kyselinou mravenčí  $[M+HCOOH+H]^+$ . Jednotlivé deriváty byly identifikovány na základě shody hodnoty  $m/z$  protonovaných molekul s vypočtenou hodnotou v tabulce 2. Obdobným způsobem byla provedena identifikace také u vzorků obsahujících tenzidy s threoninem a glycinem.



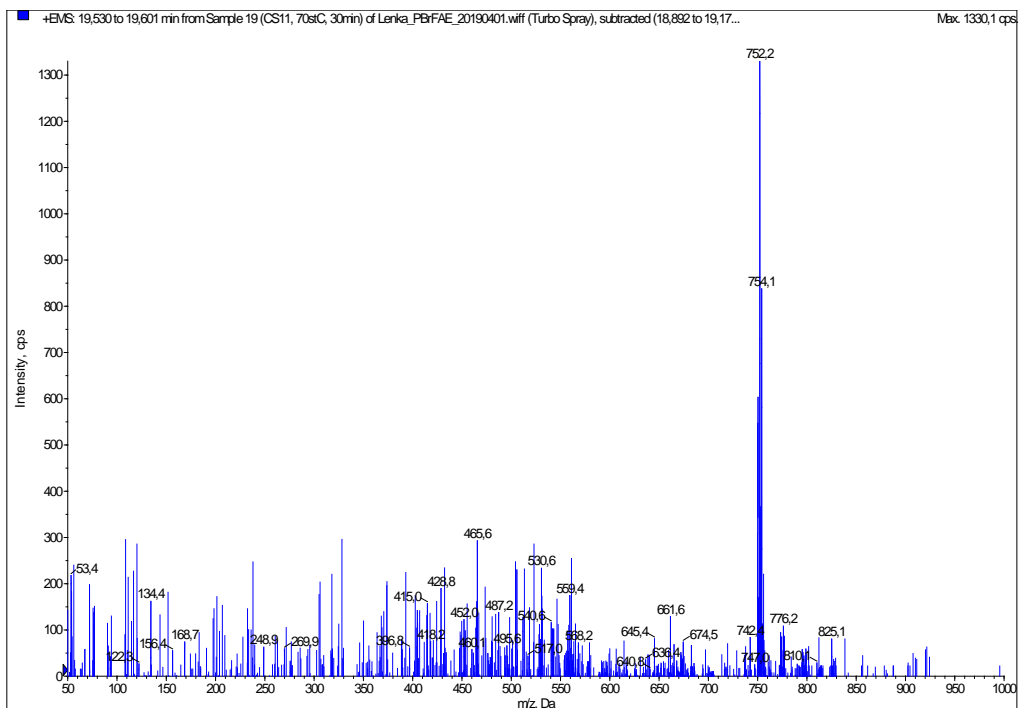
Obrázek 11 MS spektrum z LC/MS analýzy tenzidu CS-11, spektrum pro diester kyseliny kaprylové.



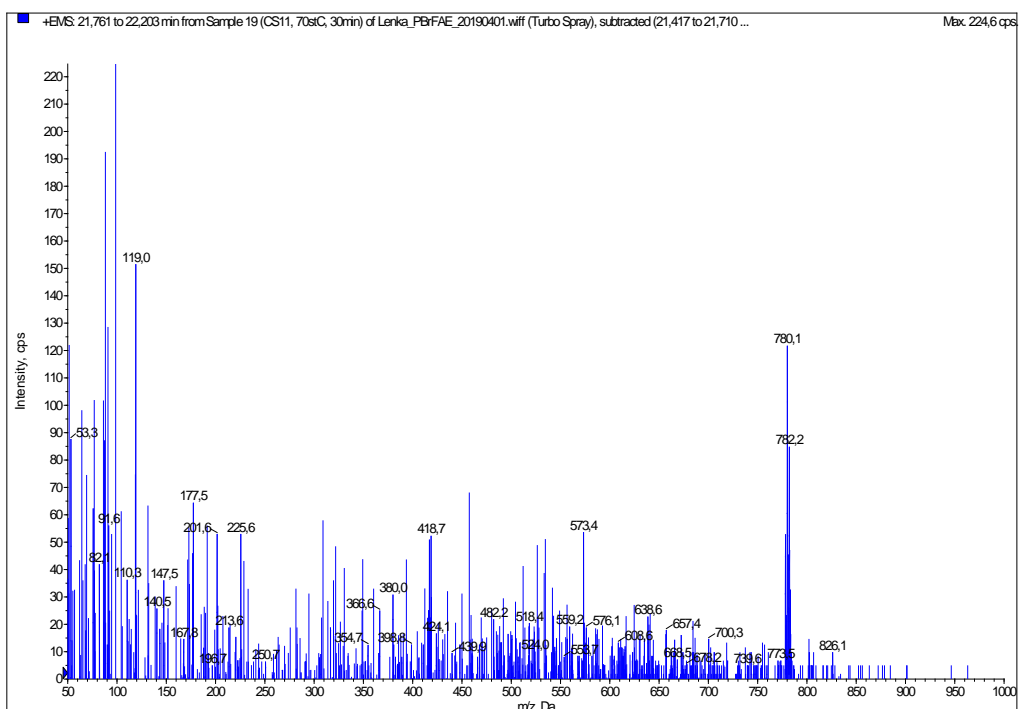
Obrázek 12 MS spektrum z LC/MS analýzy tenzidu CS-11, spektrum pro diester kyseliny kaprové.



Obrázek 13 MS spektrum z LC/MS analýzy tenzidu CS-11, spektrum pro diester kyseliny laurové.



Obrázek 14 MS spektrum z LC/MS analýzy tenzidu CS-11, spektrum pro diester kyseliny myristové.



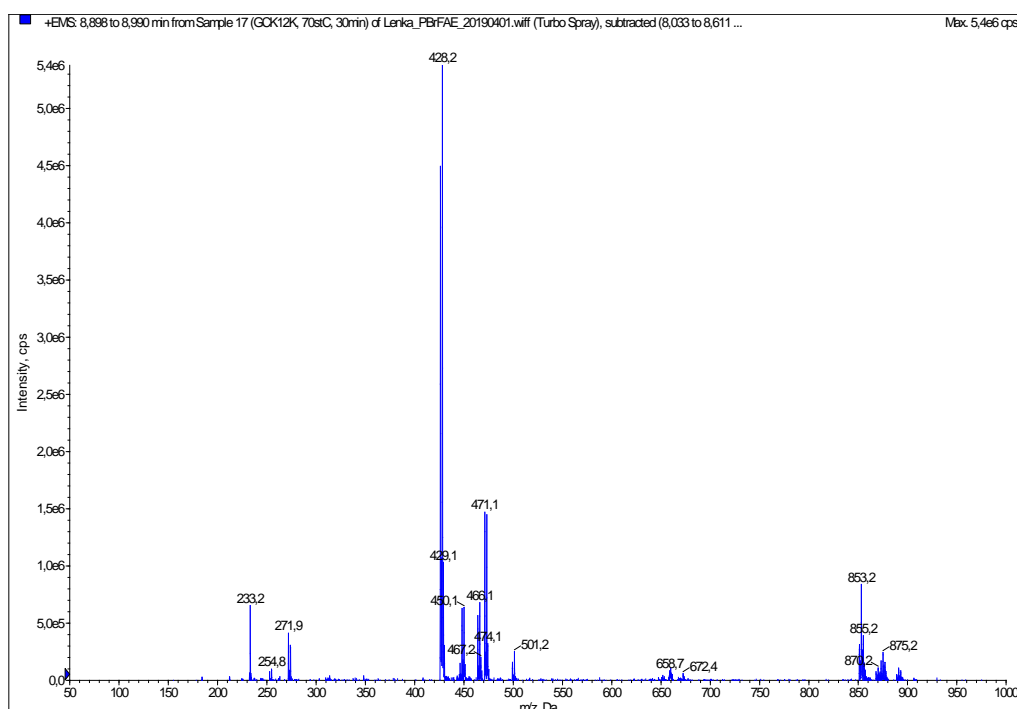
Obrázek 15 MS spektrum z LC/MS analýzy tenzidu CS-11, spektrum pro diester kyseliny palmitové.

Pomocí monoizotopických hmot vypočtených v tabulkách 2 až 4 byly identifikovány mono- a di-*p*-bromfenacylestery tenzidů s různými mastnými kyselinami. Jejich retenční časy spolu s plochou píků z UV záznamu jsou uvedeny v příloze v tabulkách P3-1 až P3-8.

Tabulka 3 Sumární vzorce a vypočtené monoizotopické hmoty derivátů s glycinem

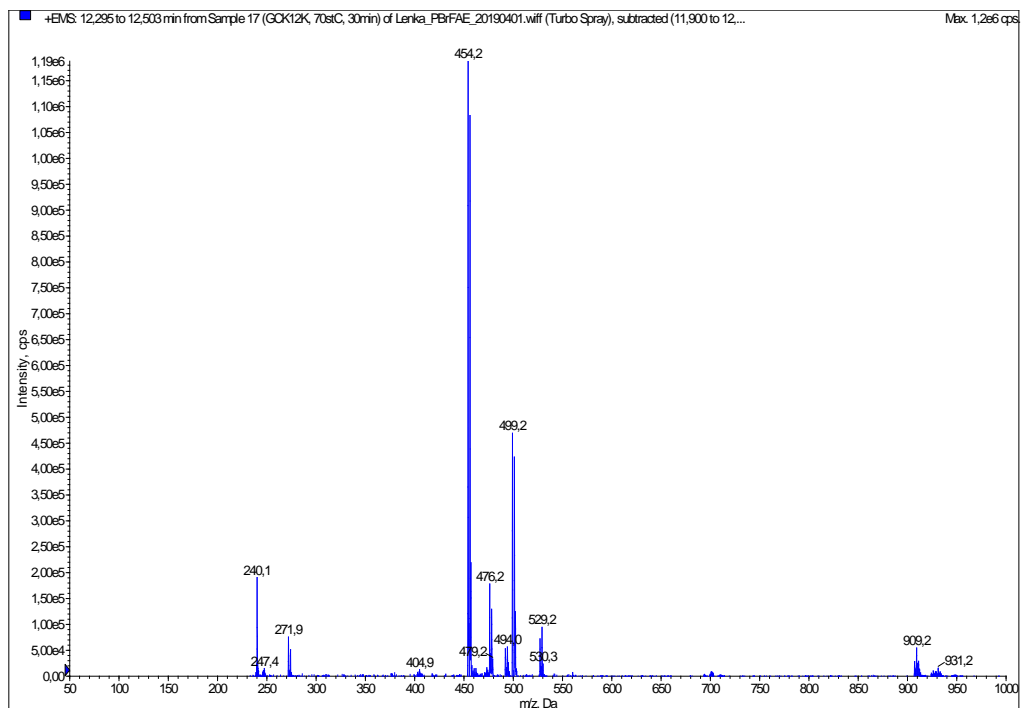
	glycinát			monoester	
	vzorec	vzorec	Mr	vzorec	Mr
glycin	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> N		75,03		
<i>p</i> -bromfenacyl-bromid	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> OBr <sub>2</sub>		277,89		
k. kaprylová	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sub>3</sub> N	201,13	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub> NBr	397,09
k. kaprová	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>23</sub> O <sub>3</sub> N	229,17	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub> NBr	425,12
k. laurová	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>27</sub> O <sub>3</sub> N	257,19	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub> NBr	453,15
k. myristová	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> O <sub>3</sub> N	285,23	C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub> NBr	481,18
k. palmitová	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> O <sub>3</sub> N	313,26	C <sub>26</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub> NBr	509,21
k. olejová	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>37</sub> O <sub>3</sub> N	339,28	C <sub>28</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub> NBr	535,23

Pomocí vypočtených monoizotopických hmot derivátů uvedených v tabulce 3 byly v hmotnostním spektru tenzidu Amilite GCK-12K na bázi glycinu identifikovány monoestery mastných kyselin a to kaprové, laurové, myristové. Jednotlivá hmotnostní spektra těchto kyselin jsou uvedena na obrázku 16-18.

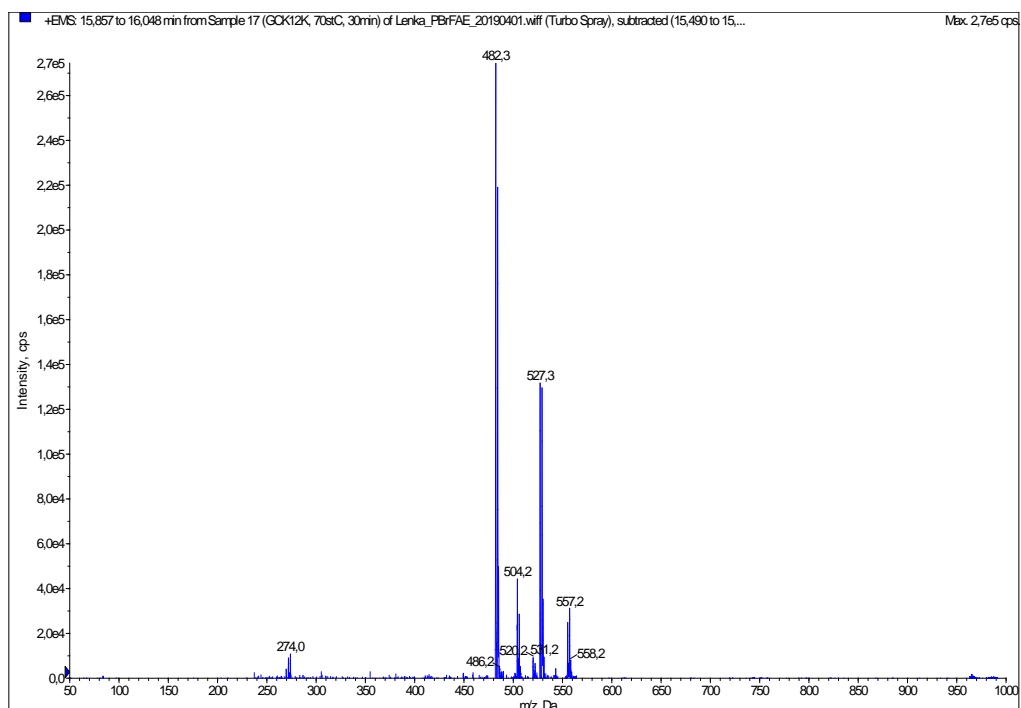


Obrázek 16 MS spektrum z LC/MS analýzy tenzidu GCK-12K, spektrum pro monoester kyseliny kaprové.





Obrázek 17 MS spektrum z LC/MS analýzy tenzidu GCK-12K, spektrum pro monoester kyseliny laurové.

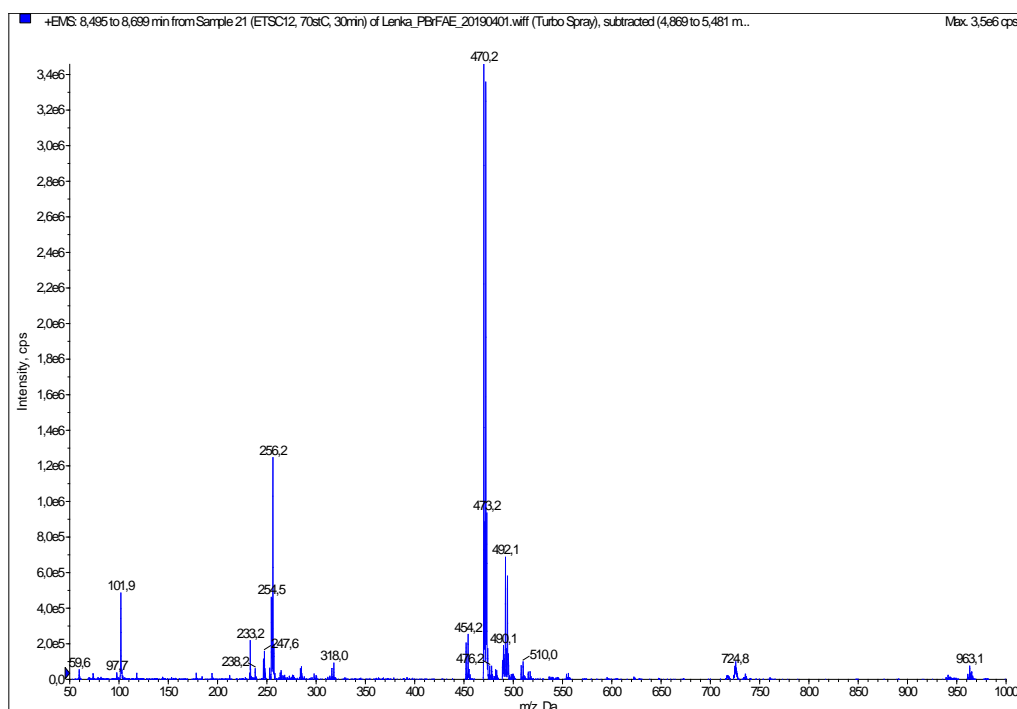


Obrázek 18 MS spektrum z LC/MS analýzy tenzidu GCK-12K, spektrum pro monoester kyseliny myristové.

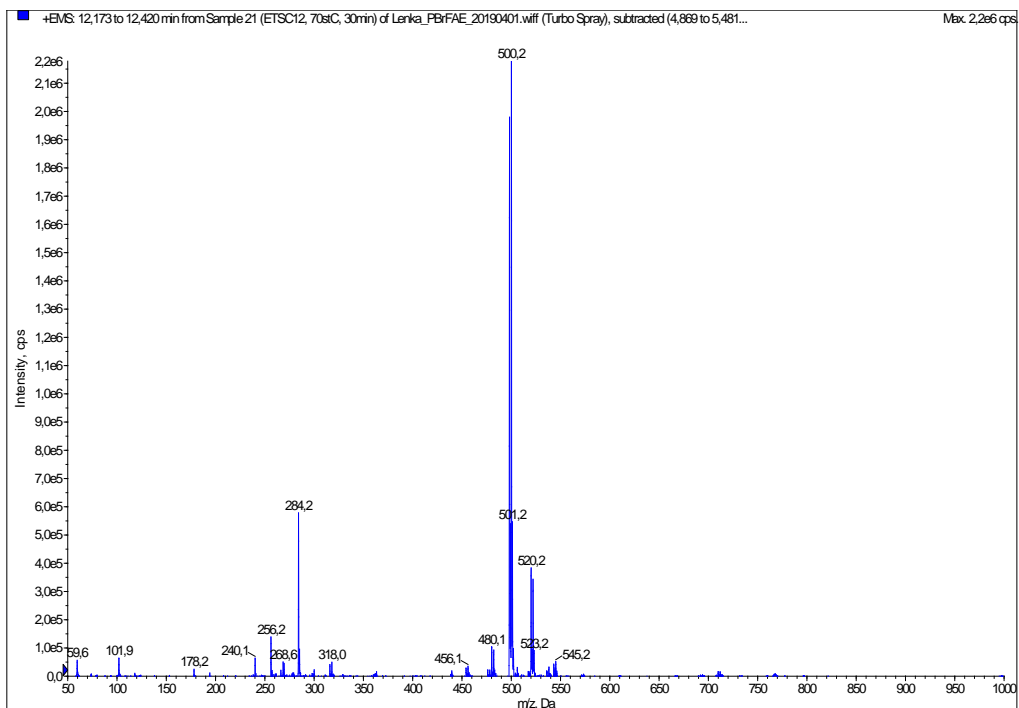
Tabulka 4 Sumární vzorce a vypočtené monoizotopické hmoty derivátů s threoninem

	threoninát		monoester		
	vzorec	Mr	vzorec	Mr	
threonin	$C_4H_9O_3N$	119,06			
<i>p</i> -bromfenacyl-bromid	$C_8H_6OBr_2$	277,89			
k. kaprylová	$C_8H_{16}O_2$	$C_{12}H_{22}O_4N$	244,15	$C_{20}H_{28}O_5NBr$	441,12
k. kaprová	$C_{10}H_{20}O_2$	$C_{14}H_{26}O_4N$	272,19	$C_{22}H_{32}O_5NBr$	469,15
k. laurová	$C_{12}H_{24}O_2$	$C_{16}H_{30}O_4N$	300,22	$C_{24}H_{36}O_5NBr$	497,18
k. myristová	$C_{14}H_{28}O_2$	$C_{18}H_{34}O_4N$	328,25	$C_{26}H_{40}O_5NBr$	525,21
k. palmitová	$C_{16}H_{32}O_2$	$C_{20}H_{38}O_4N$	356,28	$C_{28}H_{44}O_5NBr$	553,24
k. olejová	$C_{18}H_{34}O_2$	$C_{22}H_{40}O_4N$	382,30	$C_{30}H_{46}O_5NBr$	579,26

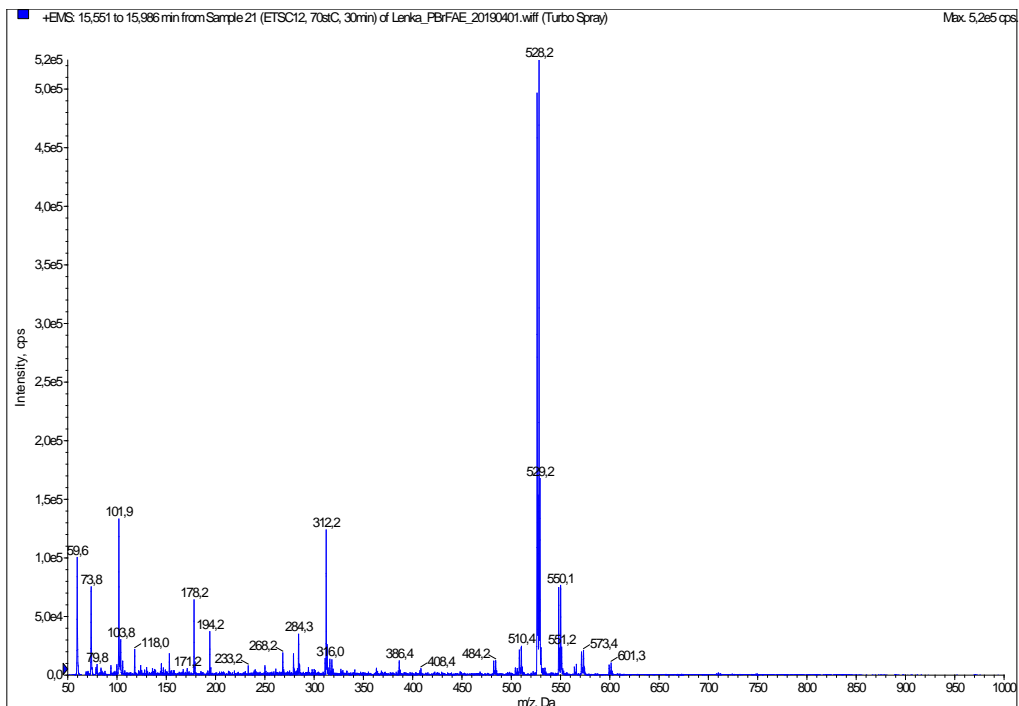
Pomocí vypočtených monoizotopických hmot derivátů uvedených v tabulce 4 byly v hmotnostním spektru tenzidu Amilite ET-CS-12 na bázi threoninu identifikovány diestery mastných kyselin a to kaprové, laurové, myristové a palmitové. Jednotlivá hmotnostní spektra těchto kyselin jsou uvedena na obrázku 19-22.



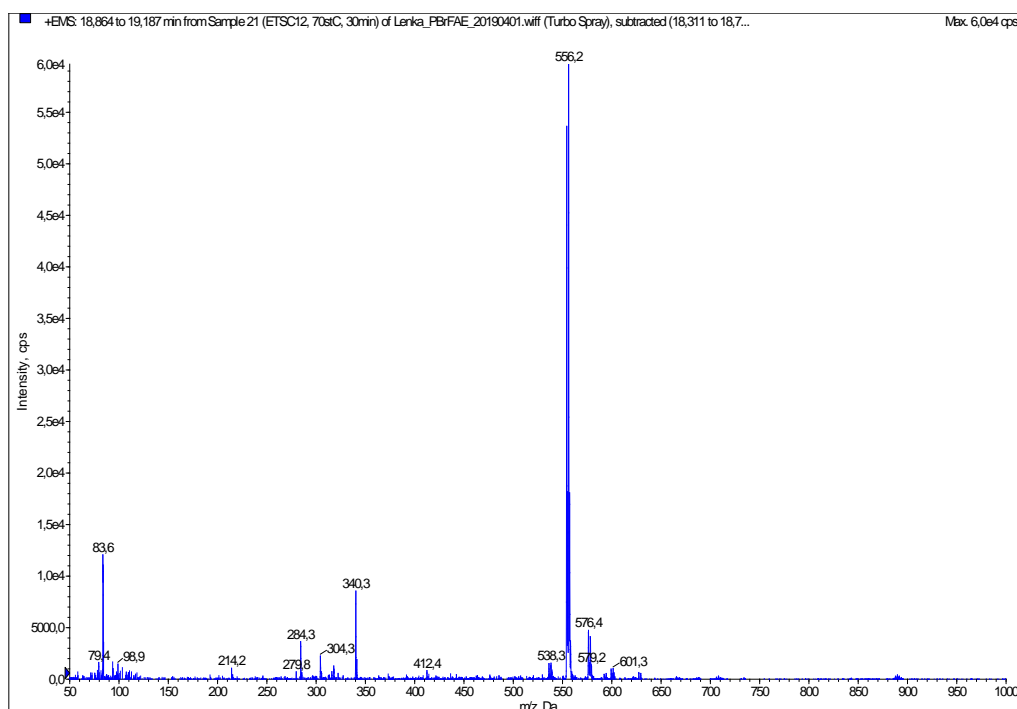
Obrázek 19 MS spektrum z LC/MS analýzy tenzidu ET-CS-12, spektrum pro monoester kyseliny kaprové.



Obrázek 20 MS spektrum z LC/MS analýzy tenzidu ET-CS-12, spektrum pro monoester kyseliny laurové.

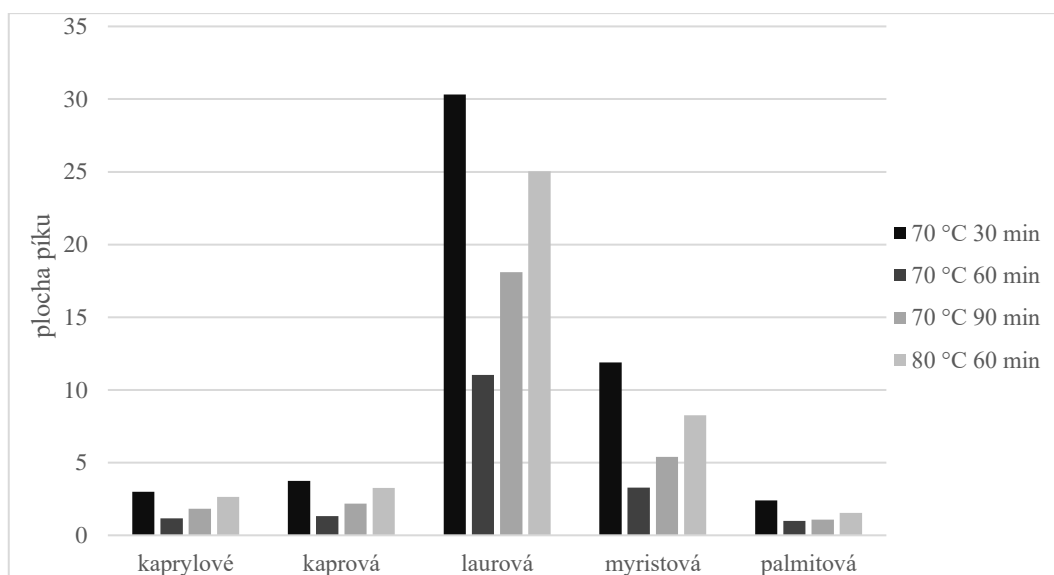


Obrázek 21 MS spektrum z LC/MS analýzy tenzidu ET-CS-12, spektrum pro monoester kyseliny myristové.



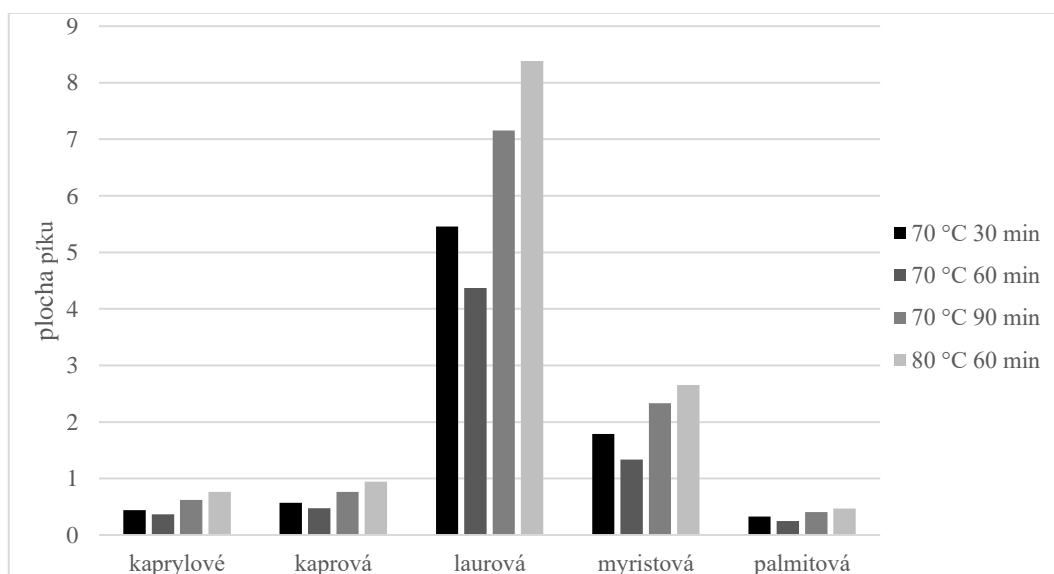
Obrázek 22 MS spektrum z LC/MS analýzy tenzidu ET-CS-12, spektrum pro monoester kyseliny palmitové.

Z naměřených ploch píků pro vzorek CS-11 vypsanych v tabulce v příloze P3-1 byl sestrojen graf zastoupení jednotlivých di-*p*-bromfenacylesterů tenzidů s různými mastnými kyselinami v závislosti na podmínkách přípravy derivátů. Tento graf je uveden na obrázku 23. Z grafu je zřejmé, že nejvyšší výtěžek diesterů mastných kyselin poskytl derivát připravovaný při 70 °C po dobu 30 minut, zatímco nejnižší výtěžnost poskytl derivát připravovaný při 70 °C po dobu 60 minut. Zvýšením doby zahřívání sice výtěžnost vzrostla, ale pořád se nevyrovná výtěžnosti při nejkratší době. Zvýšení výtěžnosti je možno dosáhnout zvýšením teploty na 80 °C po dobu 60 minut. Zvýšená teplota však přináší prakticky stejný benefit jako kratší doba reakce při nižší reakční teplotě.



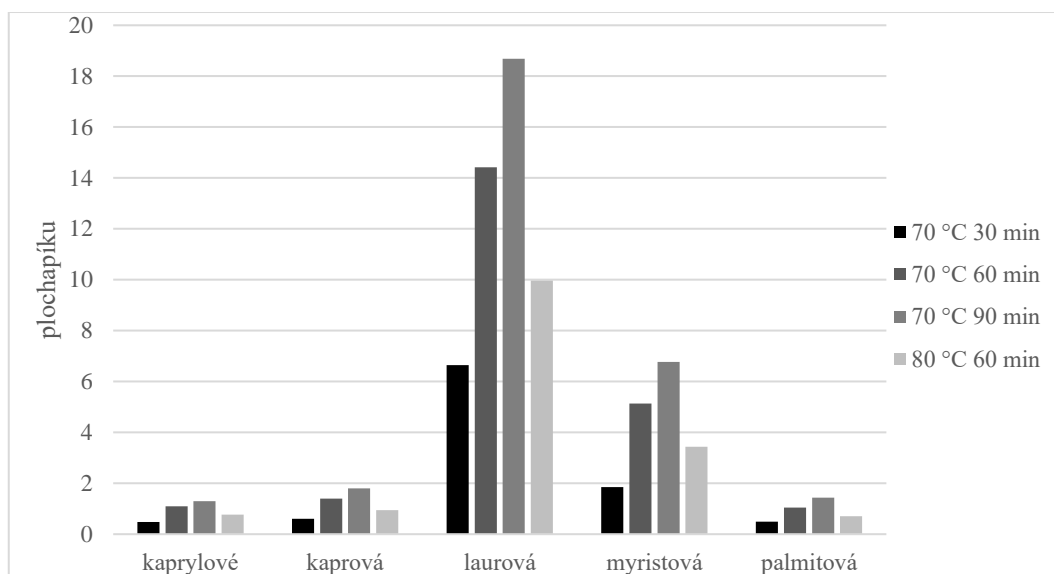
Obrázek 23 Graf zastoupení jednotlivých diesterů mastných kyselin v závislosti na podmínkách derivatizace pro vzorek CS-11

Dále z naměřených ploch píků pro vzorek CS-22 vypsanych v tabulce v příloze P3-2 byl sestrojen graf zastoupení jednotlivých diesterů mastných kyselin v závislosti na podmínkách přípravy derivátů. Tento graf je uveden na obrázku 24. Z grafu je zřejmé, že nejvyšší výtěžek diesterů mastných kyselin poskytl derivát připravovaný při 80 °C po dobu 60 minut. Avšak derivát připravovaný při 70 °C po dobu 30 minut, který u předchozího vzorku měl nejvyšší výtěžnost u tohoto vzorku byl až třetí. Nejnížší výtěžnost měl opět derivát připravovaný při 70 °C po dobu 60 minut.



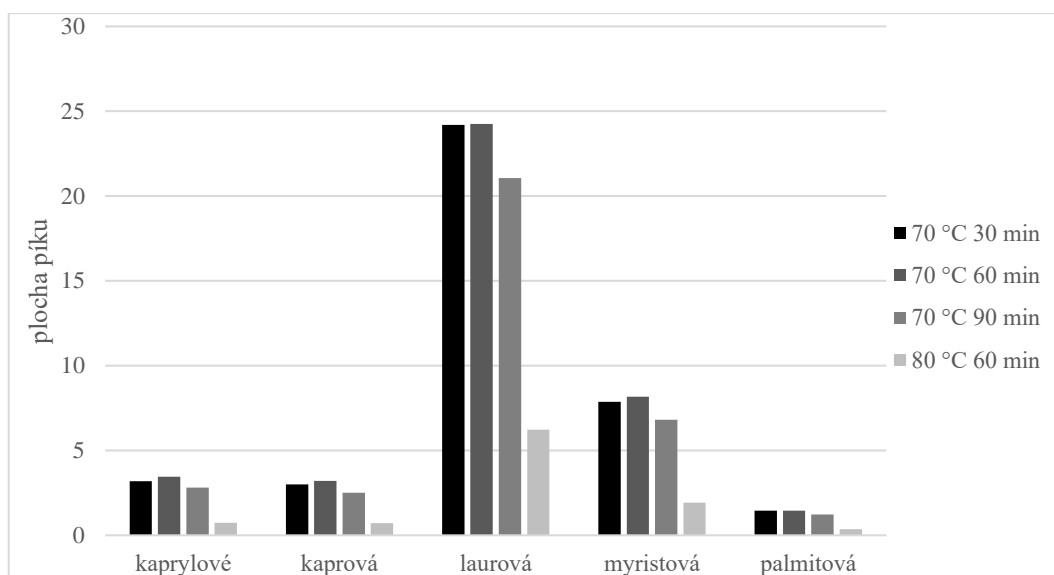
Obrázek 24 Graf zastoupení jednotlivých diesterů mastných kyselin v závislosti na podmínkách derivatizace pro vzorek CS-22

Z naměřených ploch píků pro vzorek CT-12S vypsanych v tabulce v příloze P3-3 byl také sestrojen graf zastoupení jednotlivých diesterů mastných kyselin v závislosti na podmínkách přípravy derivátů. Tento graf je uveden na obrázku 25. Z grafu je zřejmé, že jako u jediného vzorku tenzidu poskytl nejvyšší výtěžek diesterů mastných kyselin derivát připravovaný při 70 °C po dobu 90 minut. Jako druhý nejvyšší výtěžek poskytl derivát připravovaný při 70 °C po dobu 60 min. Nejnižší výtěžek však poskytl derivát připravovaný při 70 °C po dobu 30 min, který však u jiných derivátů poskytl nejvyšší výtěžky.



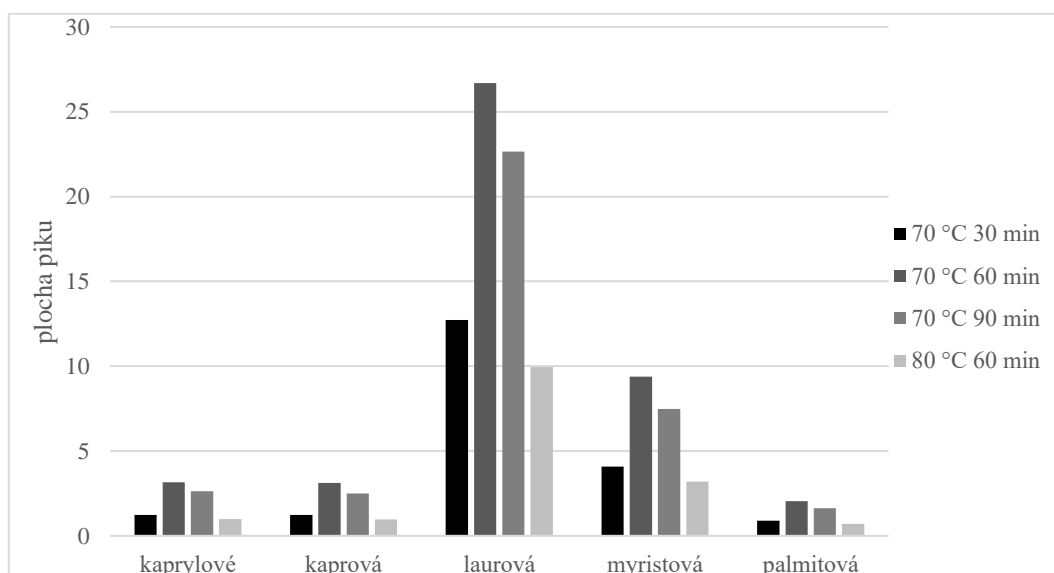
Obrázek 25 Graf zastoupení jednotlivých diesterů mastných kyselin v závislosti na podmínkách derivatizace pro vzorek CT-12S

Z naměřených ploch píků pro tenzid ECS-22SB vypsanych v tabulce v příloze P3-4 byl sestrojen graf zastoupení diesterů mastných kyselin v závislosti na podmínkách přípravy derivátů. Tento graf je uveden na obrázku 26. Deriváty připravované při 70 °C po dobu 30 a 60 minut mají shodné výtěžky.



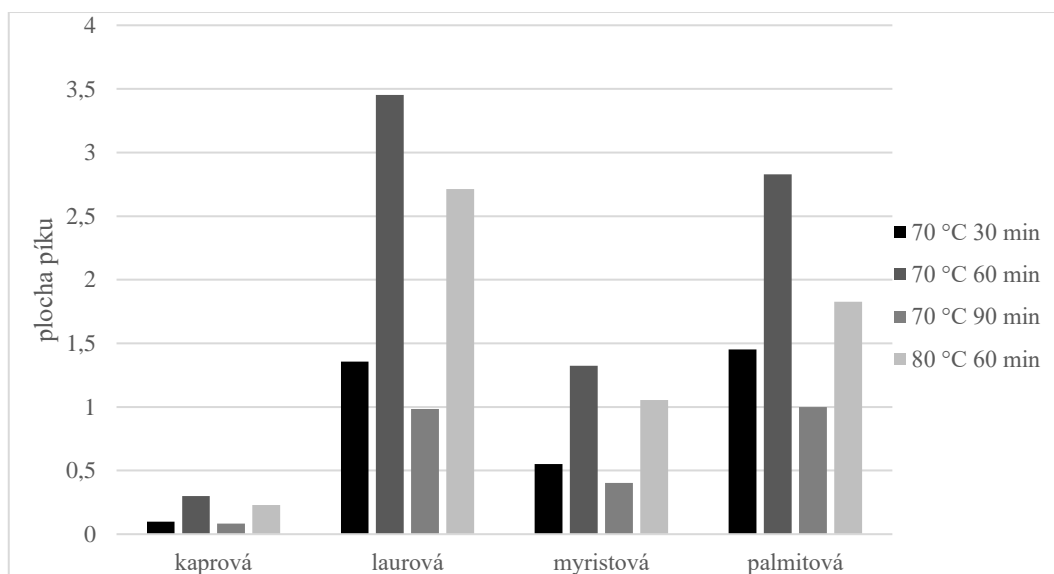
Obrázek 26 Graf zastoupení jednotlivých diesterů mastných kyselin v závislosti na podmínkách derivatizace pro vzorek ECS-22SB

Z naměřených ploch píků pro glutamátovou část vzorku ET-CS-12 vypsanych v tabulce v příloze P3-5 byl také sestrojen graf zastoupení jednotlivých diesterů mastných kyselin v závislosti na podmínkách přípravy derivátů. Tento graf je uveden na obrázku 27. Z grafu je zřejmé, že nejvyšší výtěžek diesterů mastných kyselin poskytl derivát připravovaný při 70 °C po dobu 60 minut. Jako druhý nejvyšší výtěžek poskytl derivát připravovaný při 70 °C po dobu 90 min. Nejnižší výtěžek však poskytl derivát připravovaný při 80 °C po dobu 60 min.



Obrázek 27 Graf zastoupení jednotlivých diesterů mastných kyselin v závislosti na podmínkách derivatizace pro vzorek ET-CS-12 glutamátová část

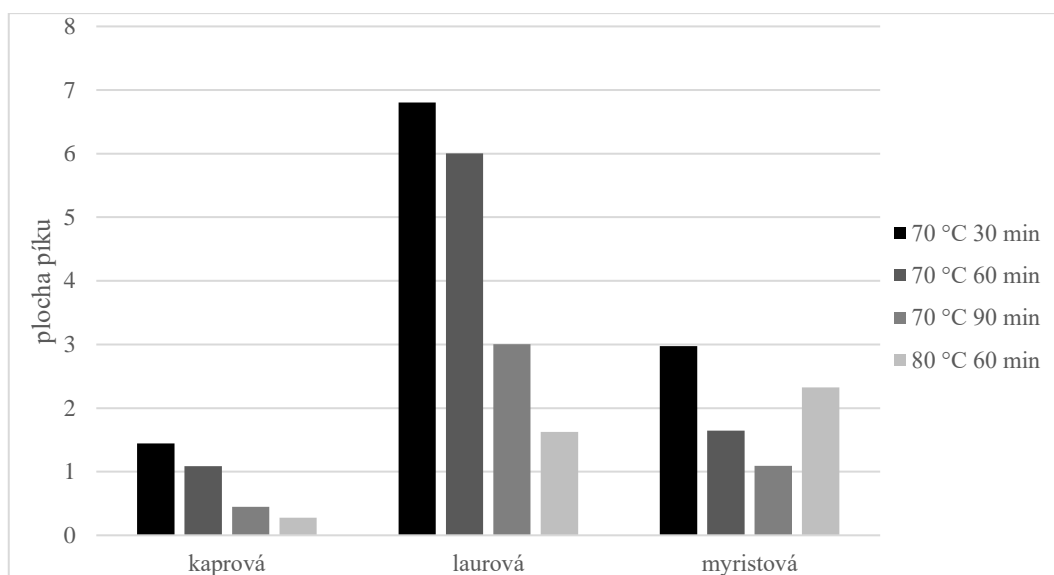
Z naměřených ploch píků pro threoninátovou část vzorku ET-CS-12 vypsanych v tabulce v příloze P3-6 byl také sestrojen graf zastoupení jednotlivých monoesterů mastných kyselin v závislosti na podmínkách přípravy derivátů. Tento graf je uveden na obrázku 28. Z grafu je zřejmé, že nejvyšší výtěžek monoesterů mastných kyselin poskytl derivát připravovaný při 70 °C po dobu 60 minut, stejně jako u glutamátové části tohoto vzorku. Jako druhý nejvyšší výtěžek poskytl derivát připravovaný při 80 °C po dobu 60 min. Nejnižší výtěžek však poskytl derivát připravovaný při 70 °C po dobu 90 min.



Obrázek 28 Graf zastoupení jednotlivých monoesterů mastných kyselin v závislosti na podmínkách derivatizace pro vzorek ET-CS-12 threoninátová část

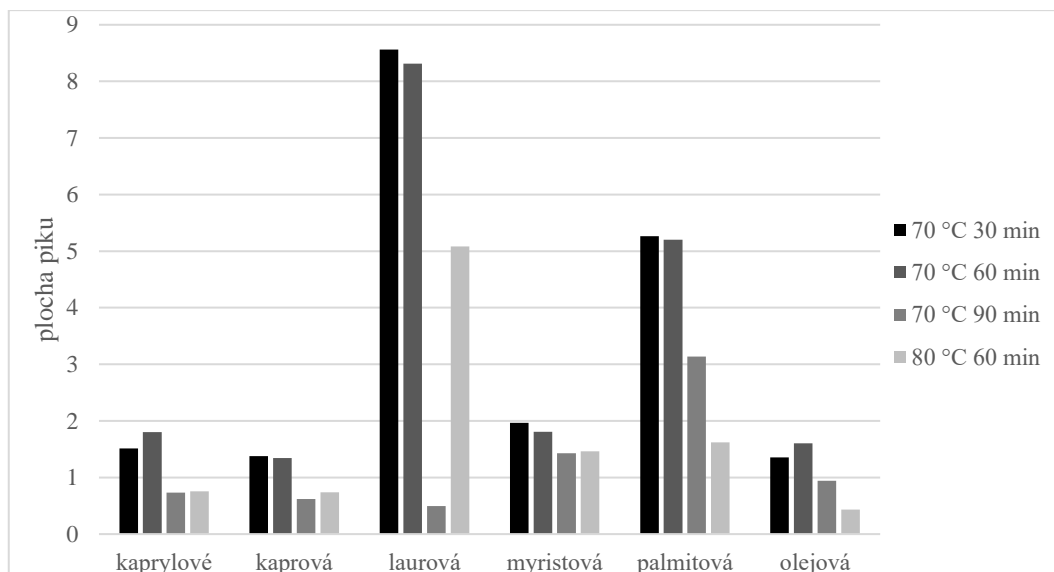
U vzorku GCK-12H byly v hmotnostním spektru identifikovány pouze tři mastné kyseliny a to kaprylová, laurová a myristová. Z naměřených ploch píků vypsanych v tabulce v příloze P3-7 byl sestrojen graf zastoupení jednotlivých monoesterů mastných kyselin v závislosti na podmínkách přípravy derivátů. Tento graf je uveden na obrázku 29. Z grafu je zřejmé, že nejvyšší výtěžek monoesterů mastných kyselin poskytl derivát připravovaný při 70 °C po dobu 30 minut. Jako druhý nejvyšší výtěžek poskytl derivát připravovaný při 70 °C po dobu 60 minut. Nejnižší výtěžek poskytl derivát připravovaný při 80 °C po dobu 60 minut.





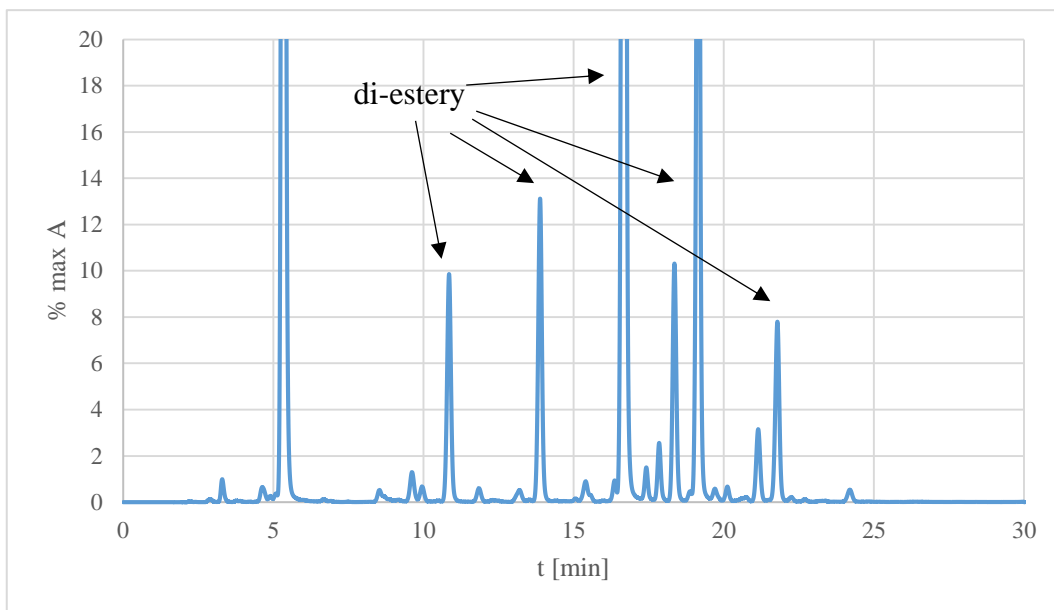
Obrázek 29 Graf zastoupení jednotlivých monoesterů mastných kyselin v závislosti na podmínkách derivatizace pro vzorek GCK-12H

Pro vzorek GCK-12K bylo v hmotnostním spektru identifikováno šest mastných kyselin a to kaprová, kaprylová, laurová, myristová, palmitová a olejová. Z naměřených ploch píků vypsanych v tabulce v příloze P3-8 byl sestrojen graf zastoupení jednotlivých monoesterů mastných kyselin v závislosti na podmínkách přípravy derivátů. Tento graf je uveden na obrázku 30. Z grafu je zřejmé, že nejvyšší výtěžek monoesterů mastných kyselin poskytl opět derivát připravovaný při 70 °C po dobu 30 minut. Jako druhý nejvyšší výtěžek poskytl derivát připravovaný při 70 °C po dobu 60 min stejně jako u vzorku GCK-12H, který je také na bázi glycinu a kokosového oleje. Nejnižší výtěžek poskytl derivát připravovaný při 70 °C po dobu 90 minut stejně jako u threoninátové části tenzidu ET-CS-12.

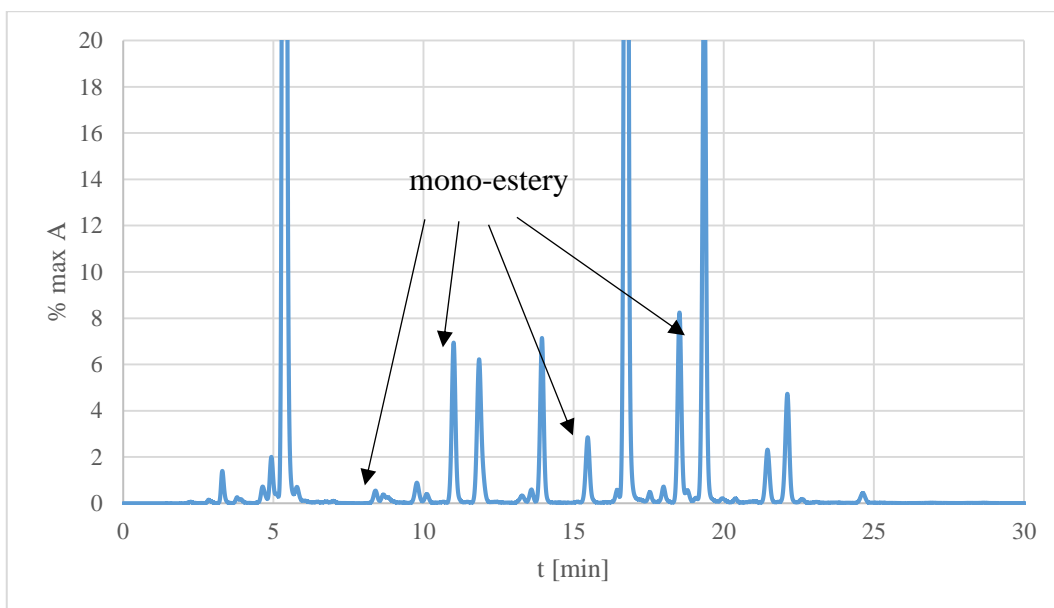


Obrázek 30 Graf zastoupení jednotlivých diesterů mastných kyselin v závislosti na podmínkách derivatizace pro vzorek GCK-12K

Vzorek tenzidu ET-CS-12 obsahuje jak kyselinu glutamovou tak threonin. Na obrázku 31 a 32 jsou pro porovnání uvedeny LC/UV záznamy derivátu tenzidu CS-11 připravovaného při 70 °C po dobu 30 minut a tenzidu ET-CS-12 také připravovaného při 70 °C po dobu 30 minut. Z porovnání záznamů je zřejmé, že v LC/UV záznamu derivátu tenzidu ET-CS-12 jsou přítomny mono-*p*-bromfenacylestery od threoninu a také di-*p*-bromfenacylestery od kyseliny glutamové.



Obrázek 31 LC/UV záznam derivátu tenzidu CS-11, připravovaného při 70 °C po dobu 30 minut.



Obrázek 32 LC/UV záznam derivátu tenzidu ET-CS-12, připravovaného při 70 °C po dobu 30 minut.

## 4 Závěr

Teoretická část diplomové práce byla zpracována formou rešerše. Vzorky aniontových tenzidů byly podrobeny derivatizaci. Derivatizace byla provedena *p*-bromfenacylbromidem. Pro zjištění vlivu podmínek přípravy derivátů na výtěžek derivatizace byla derivatizace provedena při čtyřech různých podmínkách. Při teplotě 70 °C po dobu 30 minut, při teplotě 70 °C po dobu 60 minut, při teplotě 70 °C po dobu 90 minut a při teplotě 80 °C po dobu 60 minut. Připravené deriváty byly upraveny pro LC/UV a LC/MS analýzu. Analýzy s UV detekcí byly provedeny při 254 nm za použití gradientové eluce. Na základě vypočtených předpokládaných monoizotopických hmot jednotlivých *p*-bromfenacylestřů tenzidů byla provedena identifikace látek ve vzorku, kde v souladu s deklarací výrobce byly identifikovány *p*-bromfenacylestery tenzidů v rozsahu kyselin od kyseliny kaprylové po kyselinu olejovou.

Z hlediska reakčních podmínek byla pro některé tenzidy lepší kratší doba reakce a nižší teplota. Pro jiné potom byla výhodnější delší doba reakce nebo zvýšení teploty.

Zatímco pro derivát threoninátu a glycinátu byly v MS spektrech pozorovány pouze mono-*p*-bromfenacylestery tak u derivátu glutamátu byly identifikovány jak mono-*p*-bromfenacylestery tak i di-*p*-bromfenacylestery a to díky dvěma funkčním skupinám přítomným v molekule kyseliny glutamové. Di-*p*-bromfenacylestery měly mnohem vyšší zastoupení než mono-*p*-bromfenacylestery.

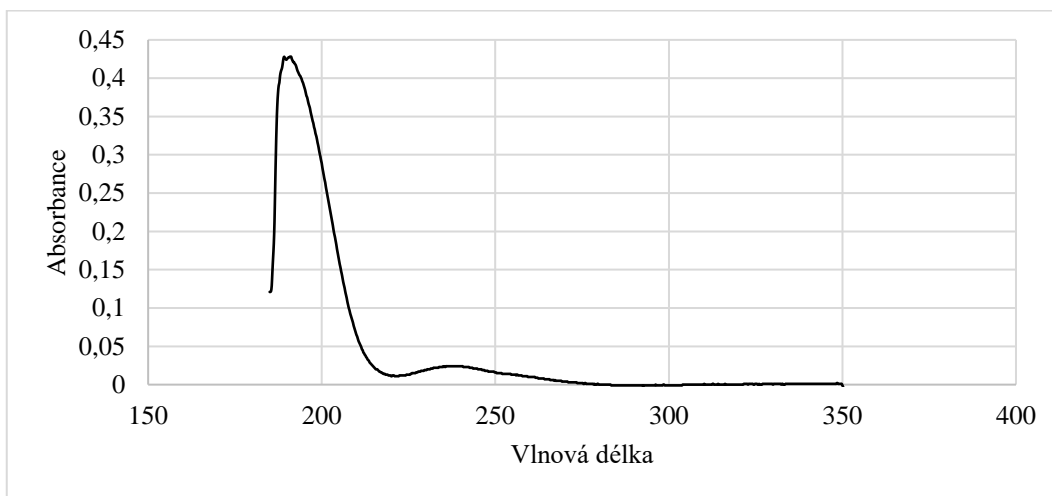
## 5 Literatura

- [1] J. Šmidrkal, *Tenzidy a detergenty dnes*, Chemické listy 93, st. 421-427 1999 (dostupné z: [http://www.w.chemicke-listy.cz/docs/full/1999\\_07\\_421-427.pdf](http://www.w.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_07_421-427.pdf) 15.2.2019)
- [2] A. Blažej a kol., *Tenzidy*, ALFA Bratislava 1977
- [3] J. Kizlink, *Technologie chemických látek II.*, Vysoké učení technické v Brně, 2001
- [4] Aminobeauty. Home. Aminobeauty [online]. Dostupné z: <http://www.ajiaminobeauty.com/products/amisoft-cs-11> 28.11.2018
- [5] Aminobeauty. Home. Aminobeauty [online]. Dostupné z: <http://www.ajiaminobeauty.com/products/amisoft-cs-22> 28.11.2018
- [6] Aminobeauty. Home. Aminobeauty [online]. Dostupné z: <http://www.ajiaminobeauty.com/products/amisoft-ct-12s> 28.11.2018
- [7] Aminobeauty. Home. Aminobeauty [online]. Dostupné z: <http://www.ajiaminobeauty.com/products/amisoft-ecs-22sb> 28.11.2018
- [8] Aminobeauty. Home. Aminobeauty [online]. Dostupné z: <http://www.ajiaminobeauty.com/products/amilite-et-cs-12> 28.11.2018
- [9] Aminobeauty. Home. Aminobeauty [online]. Dostupné z: <http://www.ajiaminobeauty.com/products/amilite-gck-12h> 28.11.2018
- [10] Aminobeauty. Home. Aminobeauty [online]. Dostupné z: <http://www.ajiaminobeauty.com/products/amilite-gck-12k> 28.11.2018
- [11] L. Nováková, M. Douša, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*, Europrint a.s. Praha 2013
- [12] Z. Holzbecher, J. Churáček, *Analytická chemie*, SNTL Praha 1987
- [13] F. Čůta, M. Popl a kol., *Instrumentální analýza*, SNTL Praha 1986
- [14] J. Churáček a kol., *Analytická separace látek*, SNTL Praha 1990
- [15] J. Churáček a kol., *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*, Academia Praha 1993

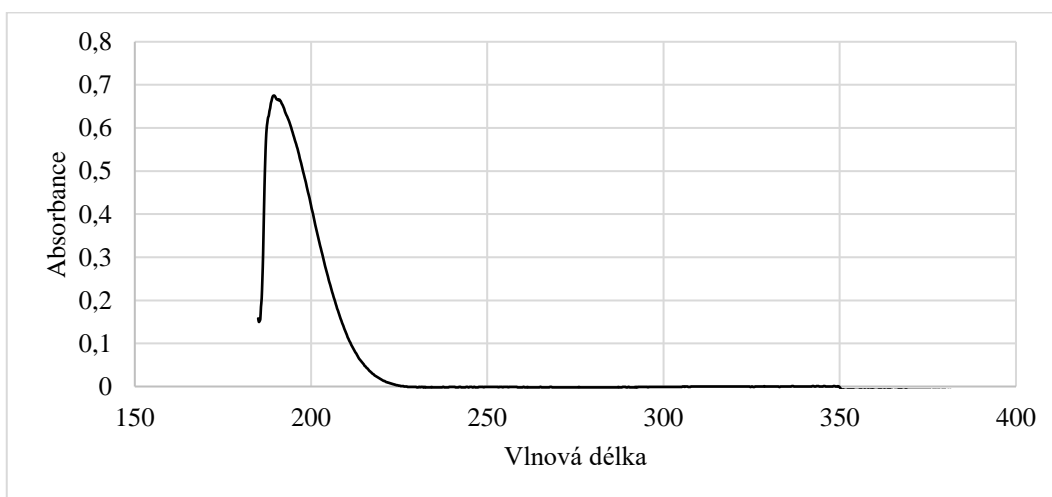
- [16] J. Churáček, P. Jandera, *Separace látek – kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie*, SNTL 1986
- [17] M. Villar a kol., *Analytica Chimica Acta*, 634 (2009) 267-271
- [18] Sung Hyun Im a kol., *Analytica Chimica Acta*, 619 (2008) 129-136
- [19] C. Fernández-Ramos a kol. *Talanta* 115 (2013) 606-615
- [20] P. Jandera a kol., *Journal of Chromatography A*, 736 (1996) 131-140
- [21] I. Aparicio a kol., *Journal of Chromatography A*, 1533 (2018) 49-56
- [22] E. Piera a kol., *Journal of Chromatography A*, 852 (1999) 499-506
- [23] V. Gomez a kol., *Talanta* 84 (2011) 859-866
- [24] P. Jandera, B. Prokeš, *Chromatographia* Vol. 42, No. 9/10, 1996
- [25] H.S. Park, Ch. K. Rhee, *Journal of Chromatography A*, 1046 (2004) 289-291
- [26] P. A. Lara-Martín a kol. *Journal of Chromatography A*, 1114 (2006) 205-210
- [27] M. Benetio-Cambra a kol. *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 8511-8518
- [28] L. Ripoll-Seguer a kol., *Journal of Chromatography A* 1320 (2013) 66-71
- [29] P. Guo a kol., *Talanta* 84 (2011) 587-592
- [30] S. Wangkarn a kol. *Talanta* 67 (2005) 686-695
- [31] A. Escrig-Doménech a kol., *Analytica Chimica Acta* 932 (2016) 106-113
- [32] P. A. Lara-Martín a kol., *Journal of Chromatography A* 1137 (2006) 188-197
- [33] A. Bergé a kol. *Journal of Chromatography A* 1450 (2016) 64-75
- [34] M. Jureček, *Organická analýza*, Přírodovědecké nakladatelství, Praha 1950

## 6 Přílohy

### Příloha 1 UV spektra jednotlivých tenzidů



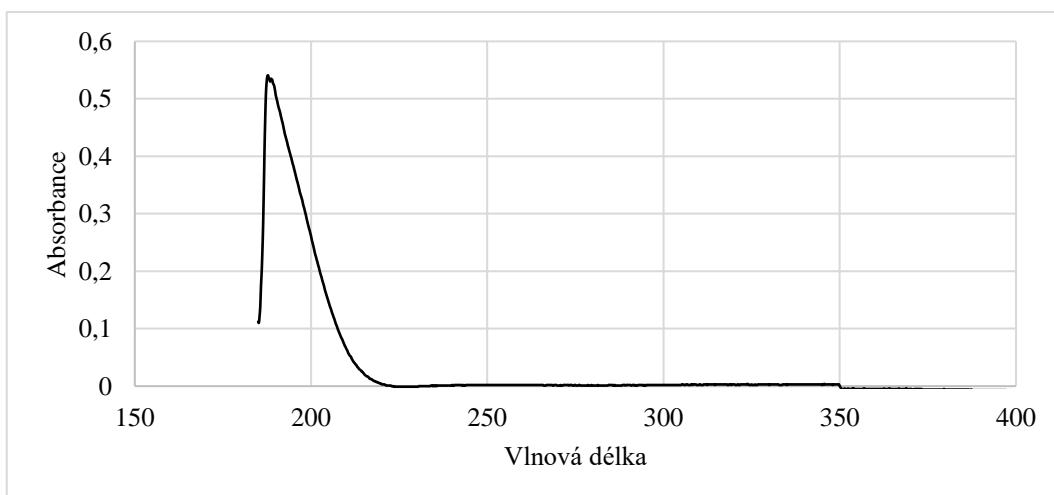
Obrázek P1-1 UV spektrum vzorku tenzidu CS-11, rozpuštěného ve vodě.



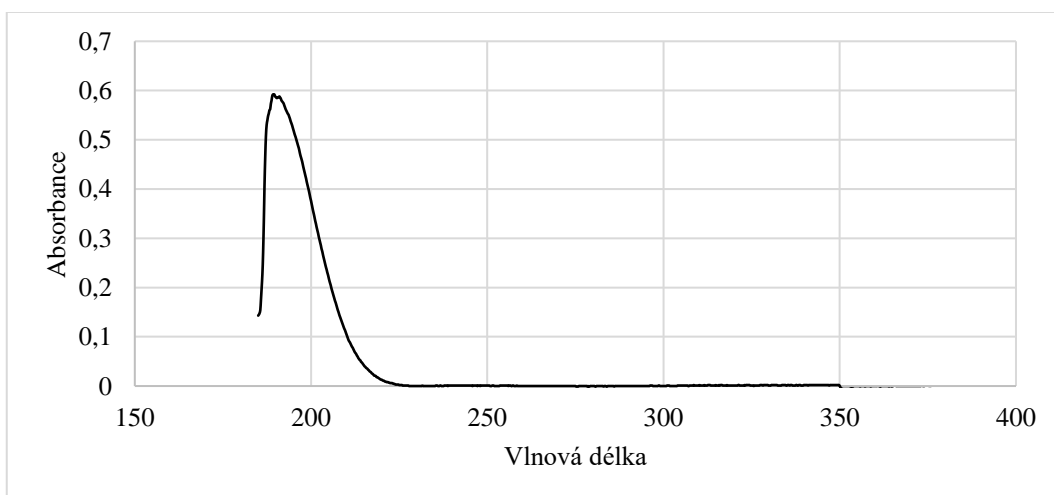
Obrázek P1-2 UV spektrum vzorku tenzidu CS-22, rozpuštěného ve vodě.



Obrázek P1-3 UV spektrum vzorku tenzidu CT-12S, rozpuštěného ve vodě.

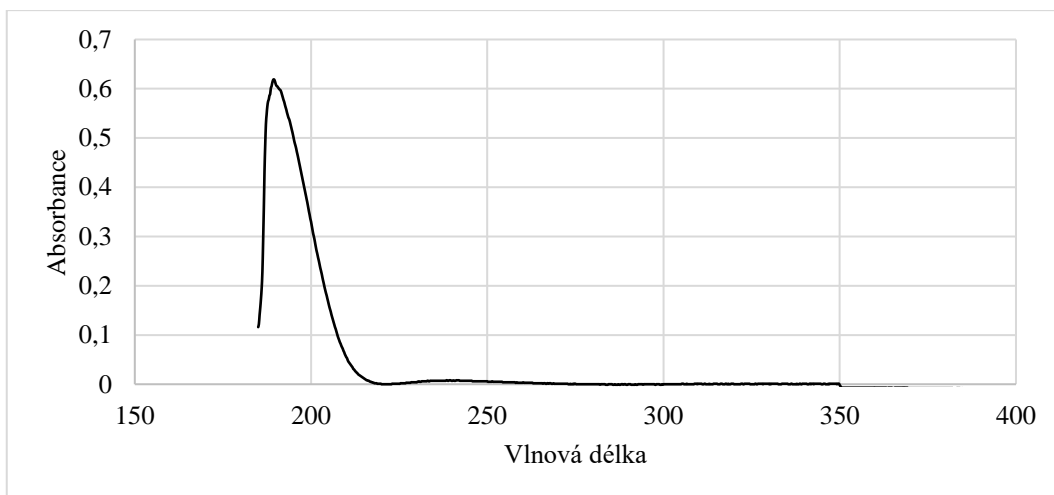


Obrázek P1-4 UV spektrum vzorku tenzidu ECS-22SB, rozpuštěného ve vodě.

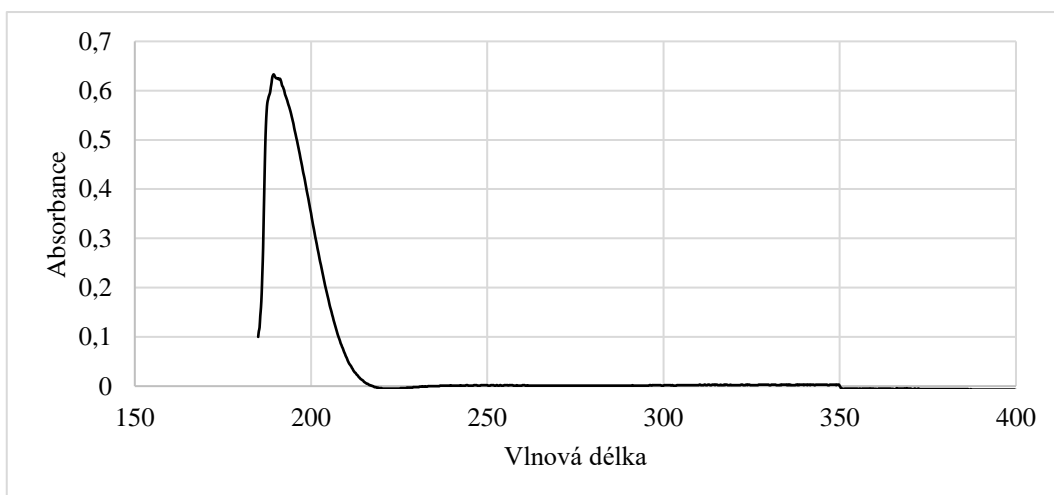


Obrázek P1-5 UV spektrum vzorku tenzidu ET-CS-12, rozpuštěného ve vodě.



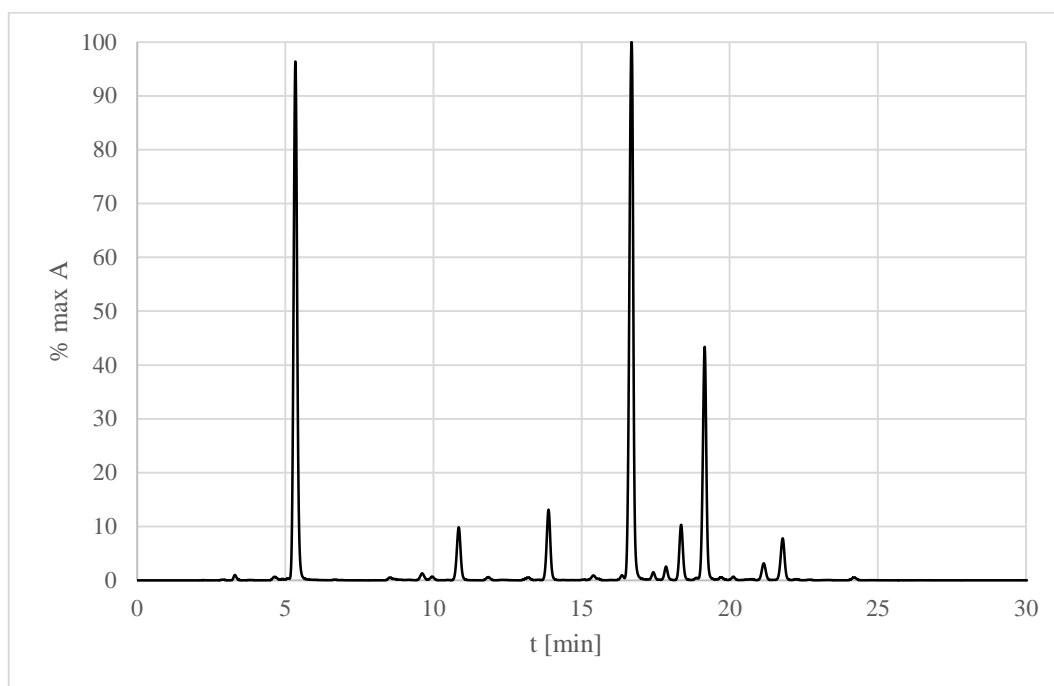


Obrázek P1-6 UV spektrum vzorku tenzidu GCK-12H, rozpuštěného ve vodě.

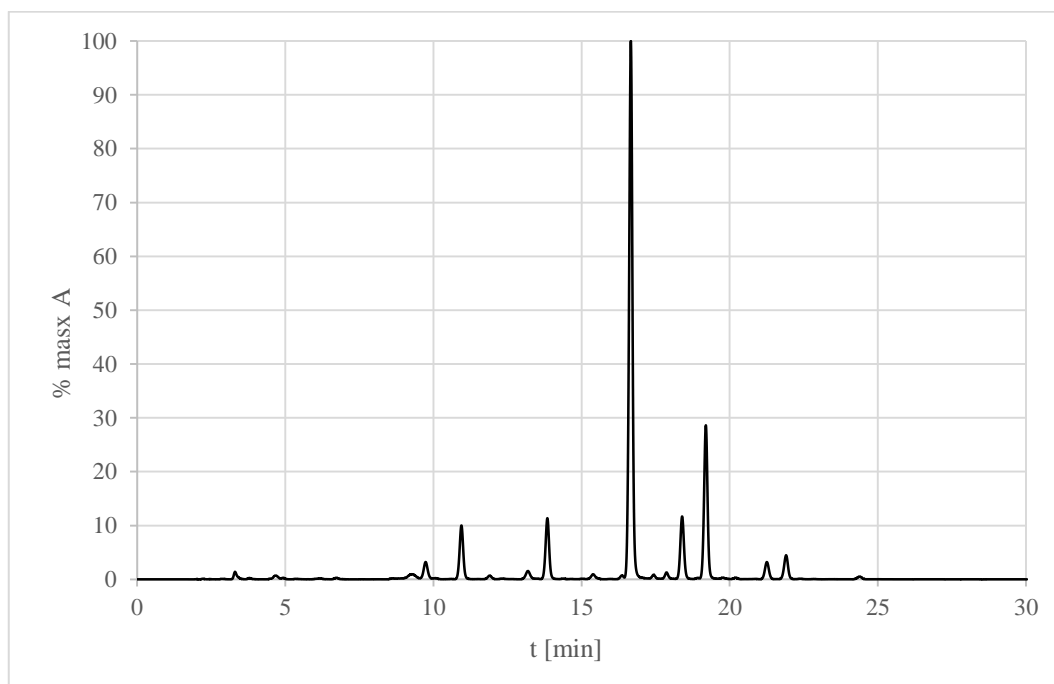


Obrázek P1-7 UV spektrum vzorku tenzidu GCK-12K, rozpuštěného ve vodě.

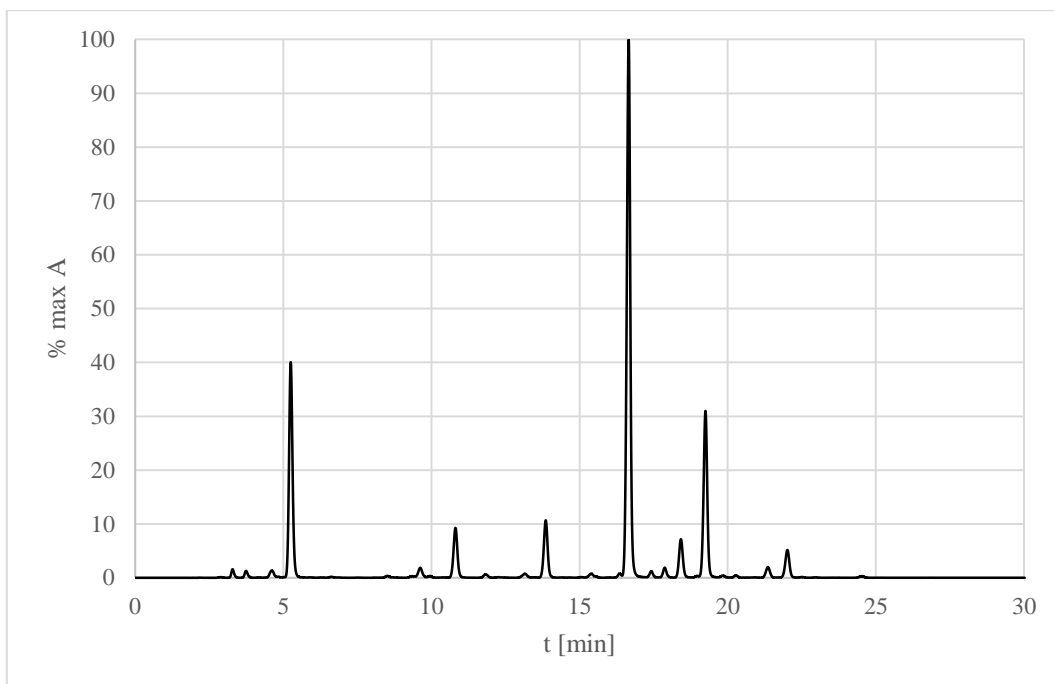
## Příloha 2 LC/UV záznam jednotlivých derivátů



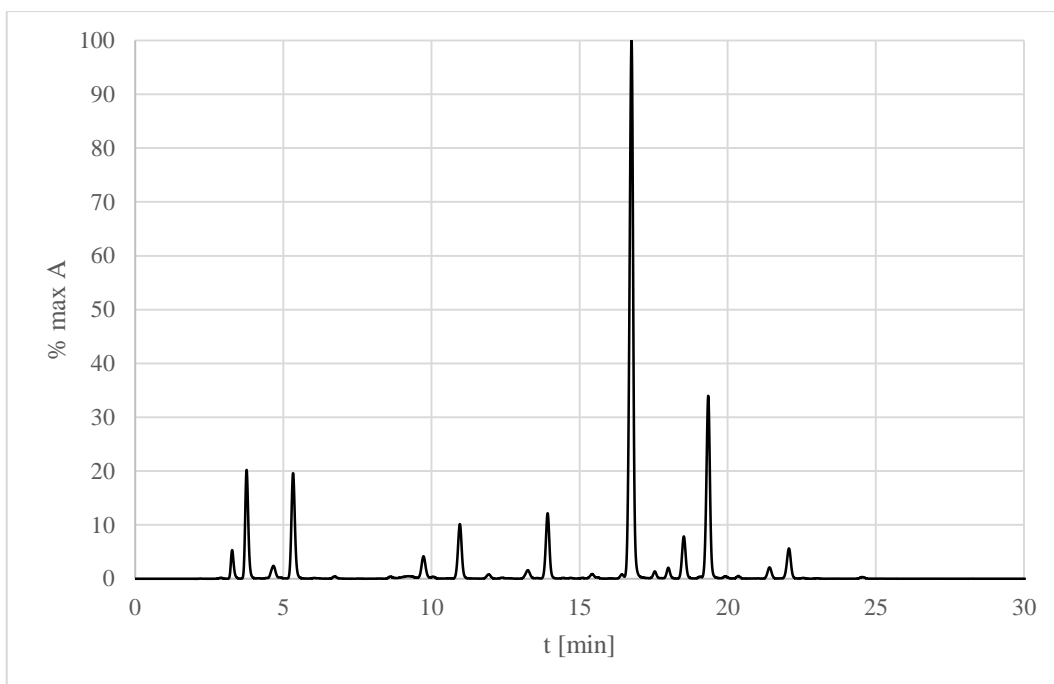
Obrázek P2-1 LC/UV záznam derivátu tenzidu CS-11, připravovaného při 70 °C po dobu 30 min.



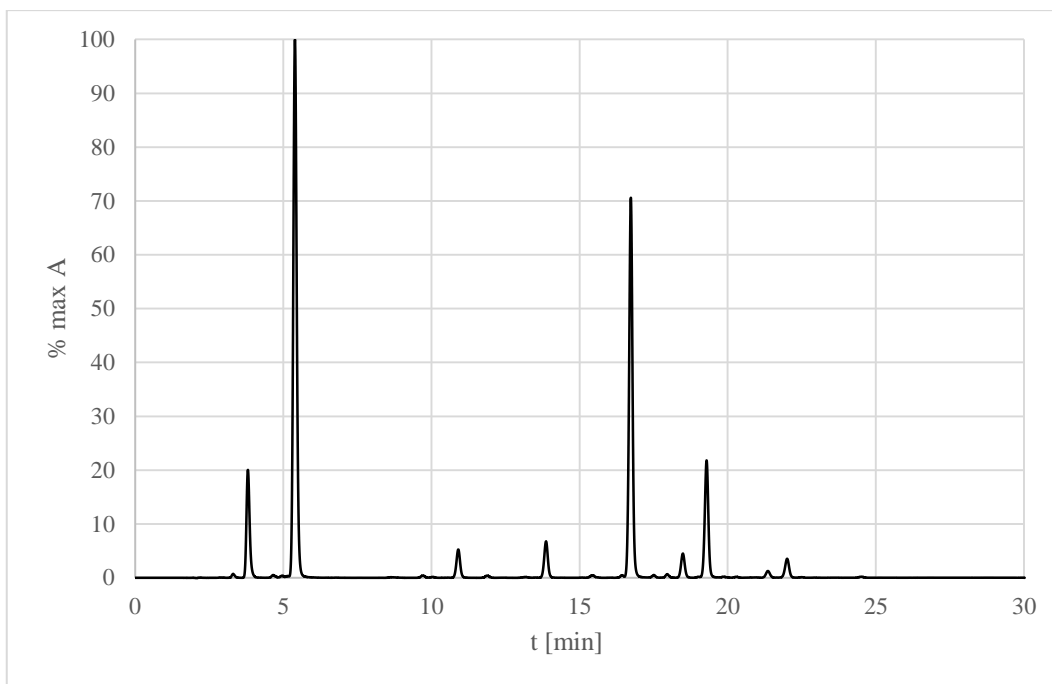
Obrázek P2-2 LC/UV záznam derivátu tenzidu CS-11, připravovaného při 70 °C po dobu 60 min.



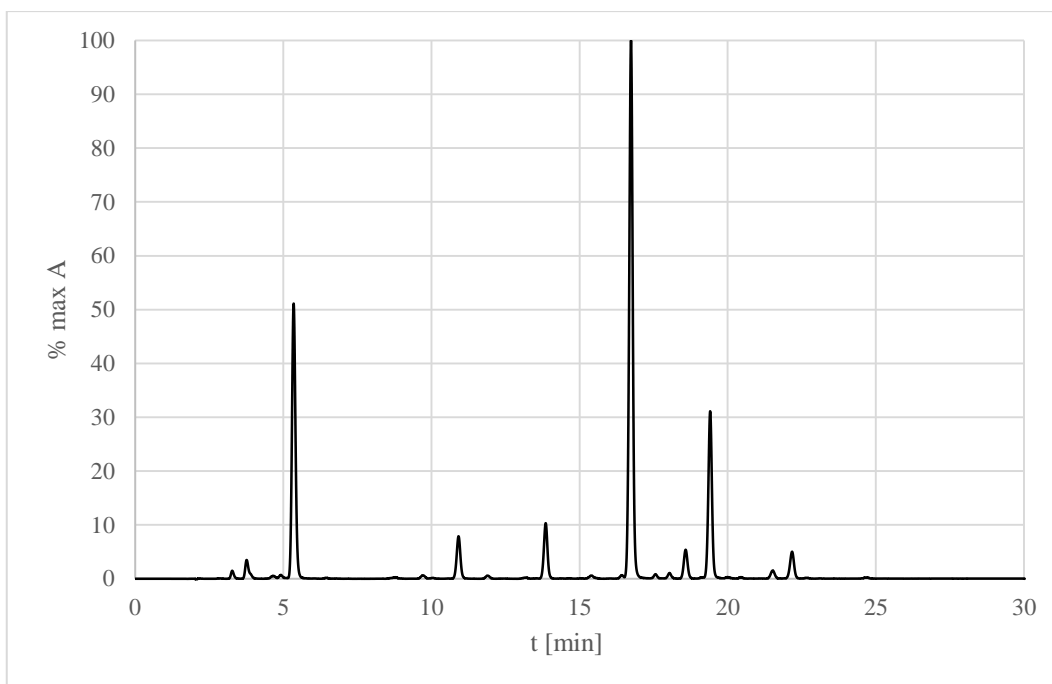
Obrázek P2-3 LC/UV záznam derivátu tenzidu CS-11, připravovaného při 70 °C po dobu 90 min.



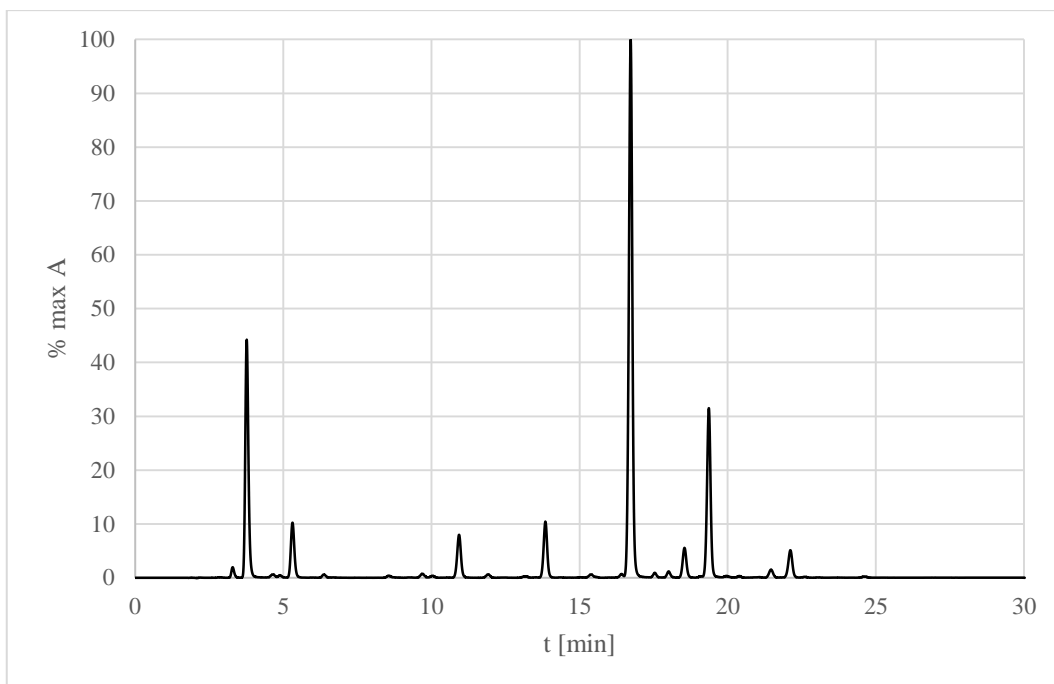
Obrázek P2-4 LC/UV záznam derivátu tenzidu CS-11, připravovaného při 80 °C po dobu 60 min.



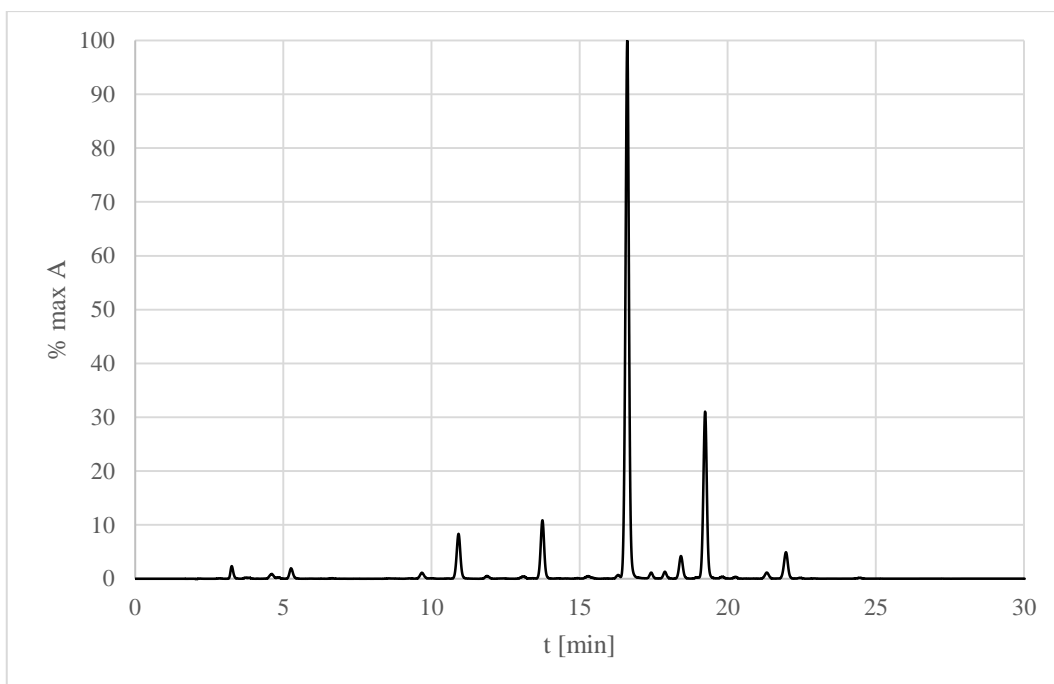
Obrázek P2-5 LC/UV záznam derivátu tenzidu CS-22, připravovaného při 70 °C po dobu 30 min.



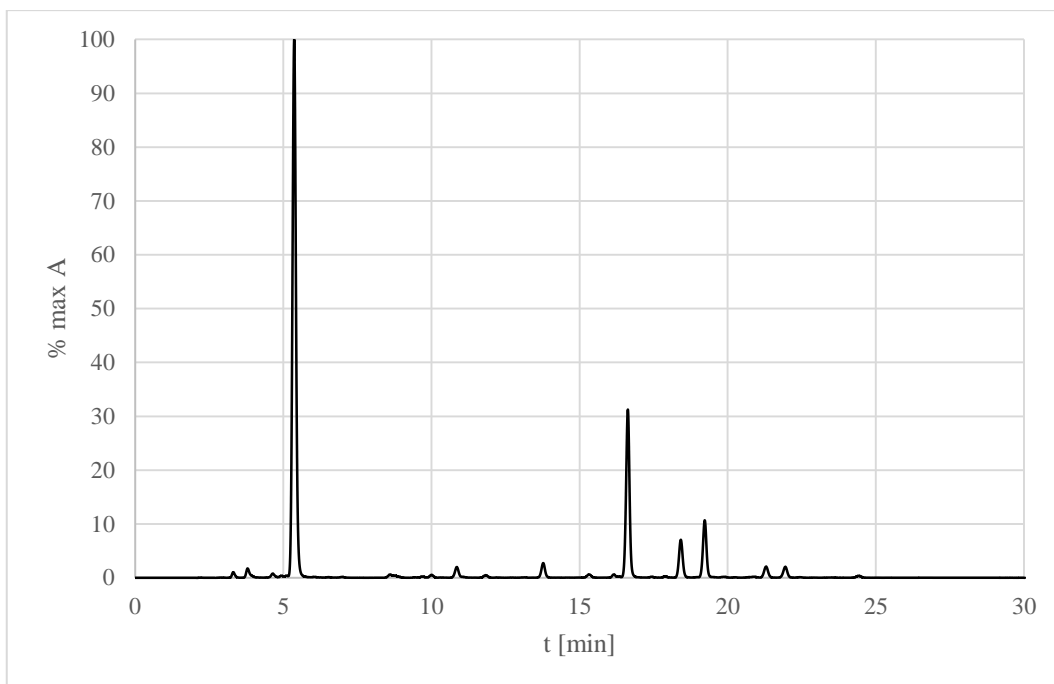
Obrázek P2-6 LC/UV záznam derivátu tenzidu CS-22, připravovaného při 70 °C po dobu 60 min.



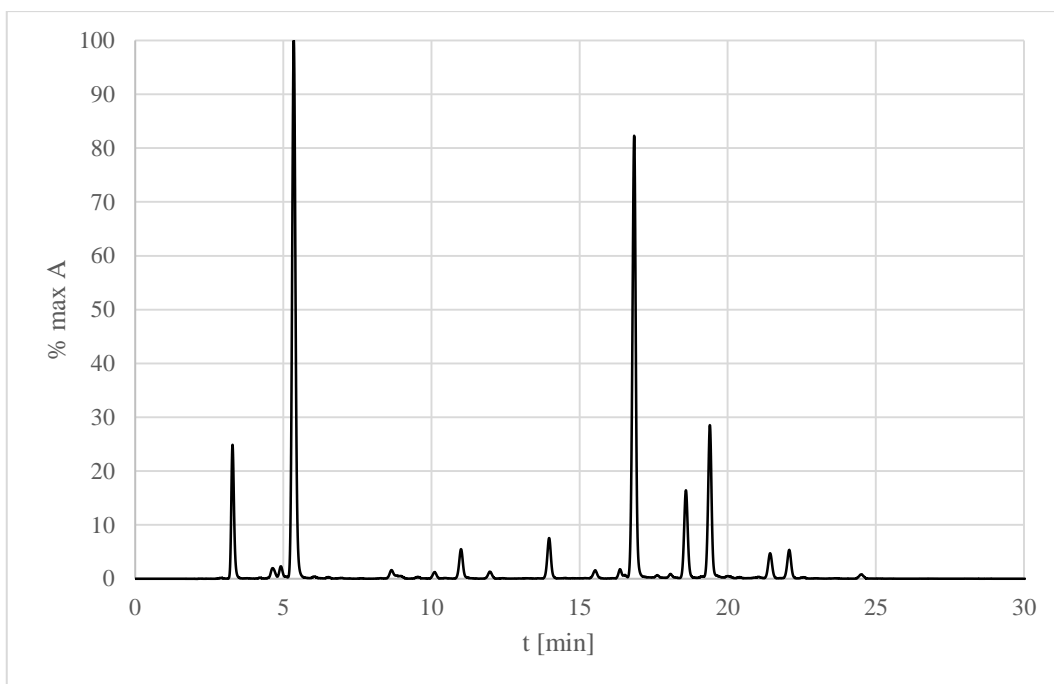
Obrázek P2-7 LC/UV záznam derivátu tenzidu CS-22, připravovaného při 70 °C po dobu 90 min.



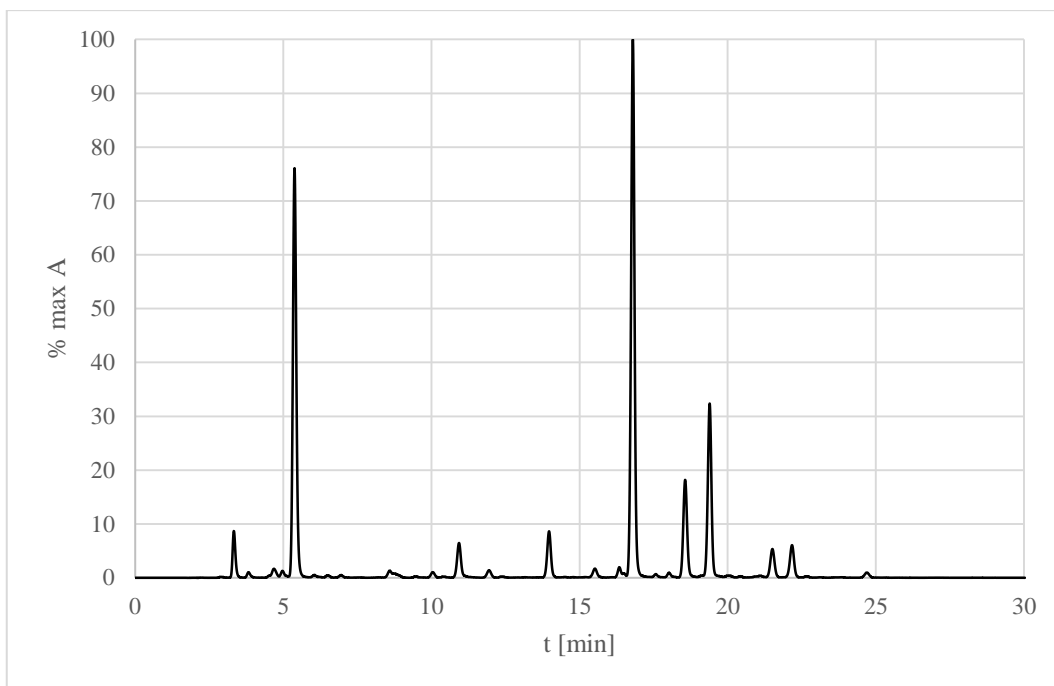
Obrázek P2-8 LC/UV záznam derivátu tenzidu CS-22, připravovaného při 80 °C po dobu 60 min.



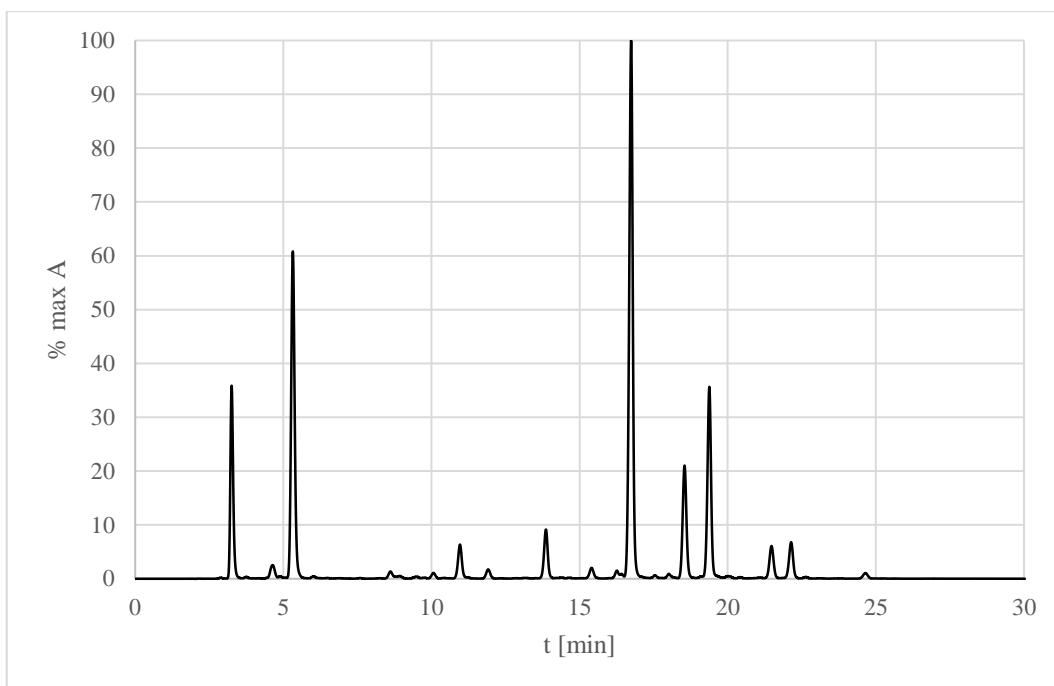
Obrázek P2-9 LC/UV záznam derivátu tenzidu CT-12S, připravovaného při 70°C po dobu 30 min.



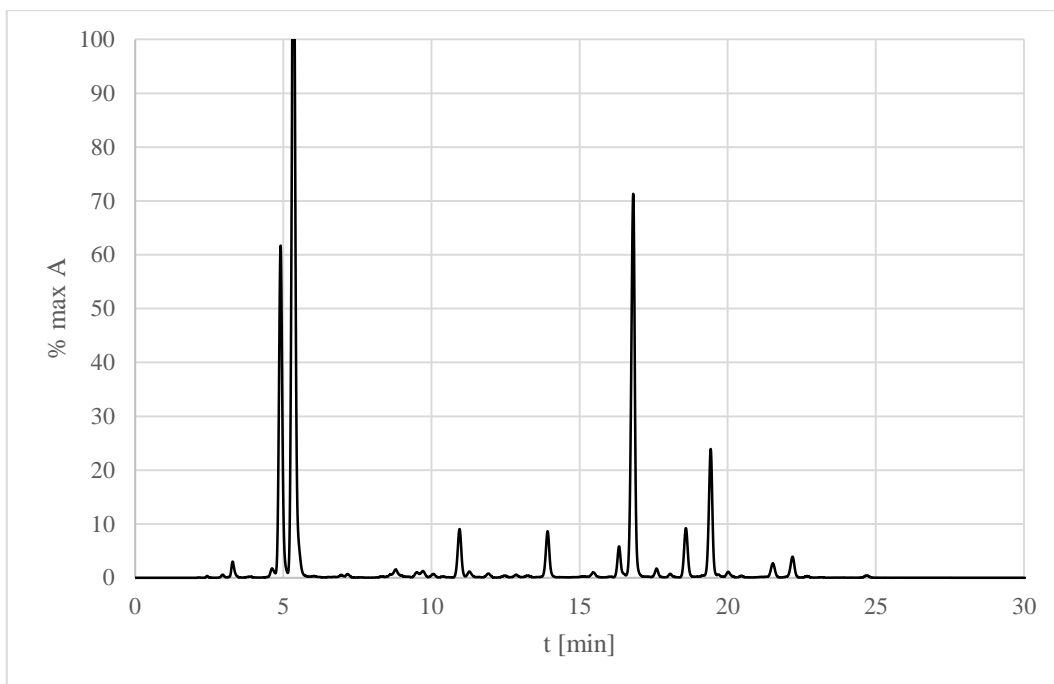
Obrázek P2-10 LC/UV záznam derivátu tenzidu CT-12S, připravovaného při 70°C po dobu 60 min.



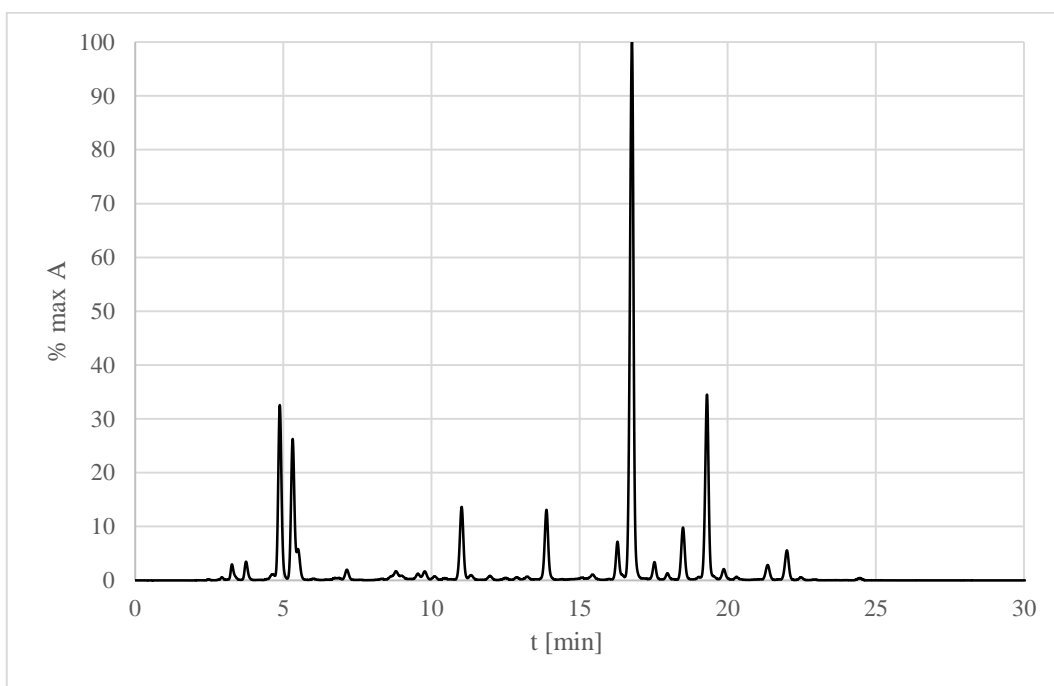
Obrázek P2-11 LC/UV záznam derivátu tenzidu CT-12S, připravovaného při 70 °C po dobu 90 min.



Obrázek P2-12 LC/UV záznam derivátu tenzidu CT-12S, připravovaného při 80 °C po dobu 60 min.

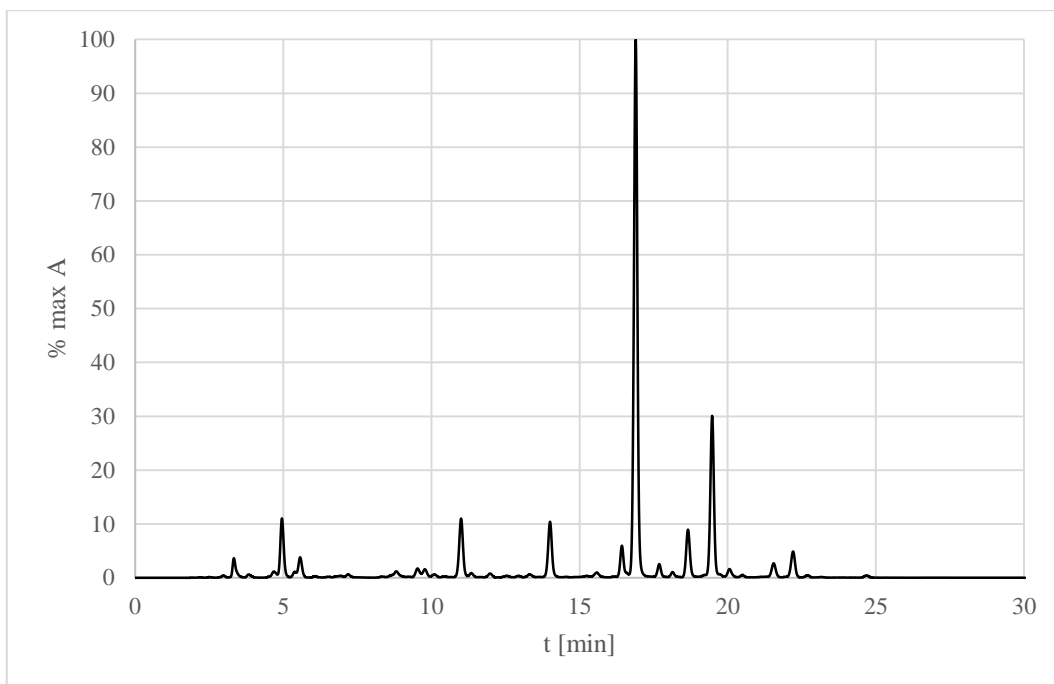


Obrázek P2-13 LC/UV záznam derivátu tenzidu ECS-22SB, připravovaného při 70 °C po dobu 30 min.

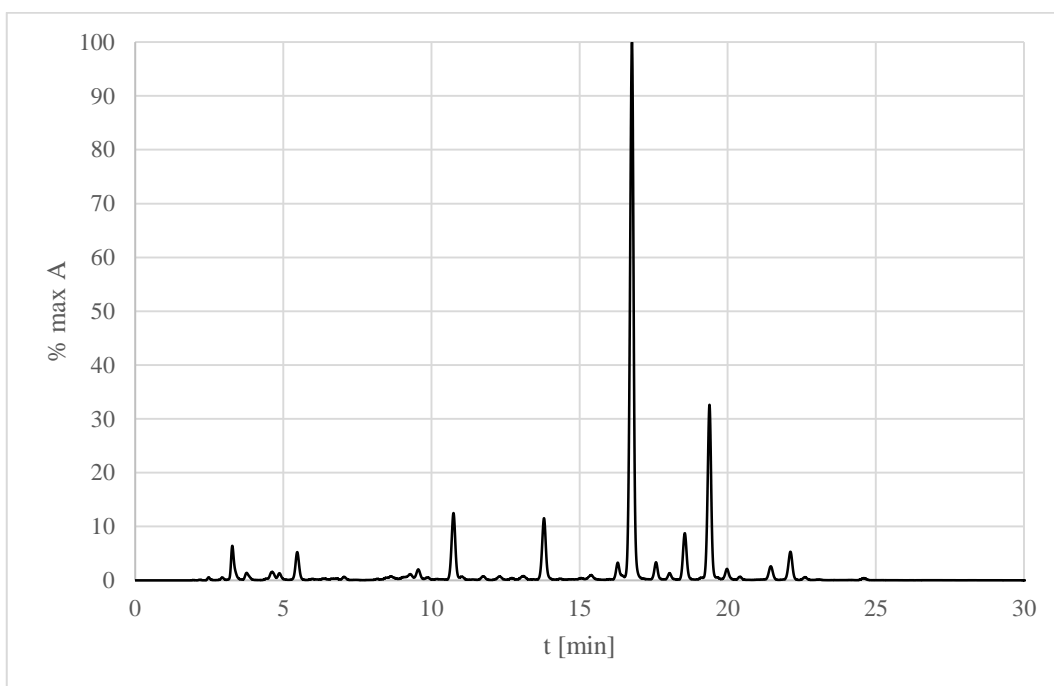


Obrázek P2-14 LC/UV záznam derivátu tenzidu ECS-22SB, připravovaného při 70 °C po dobu 60 min.

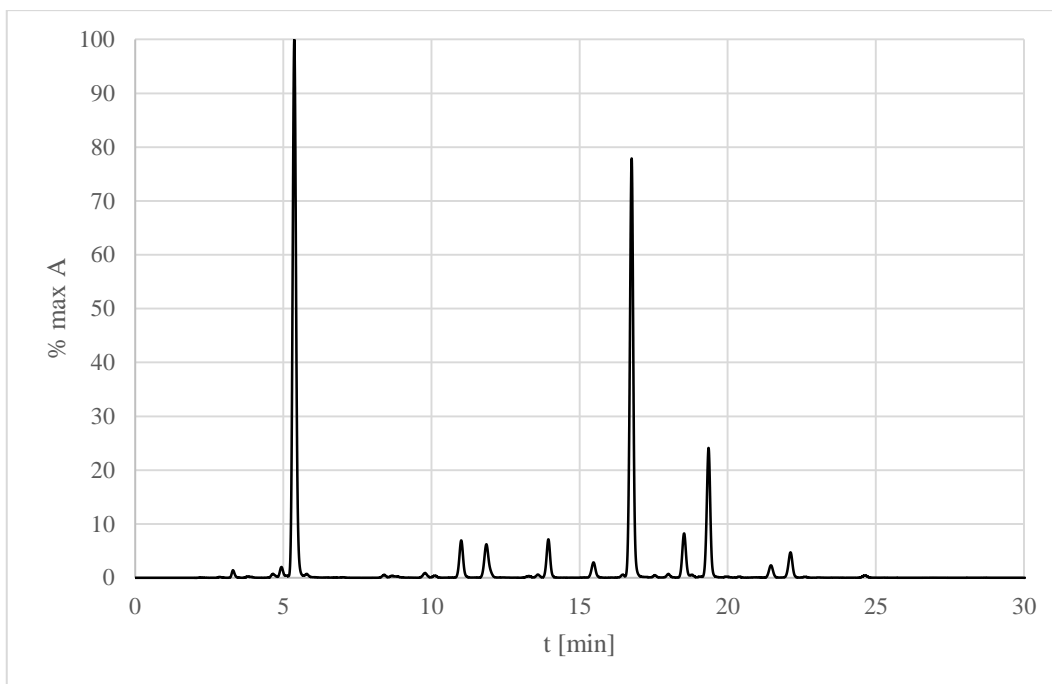




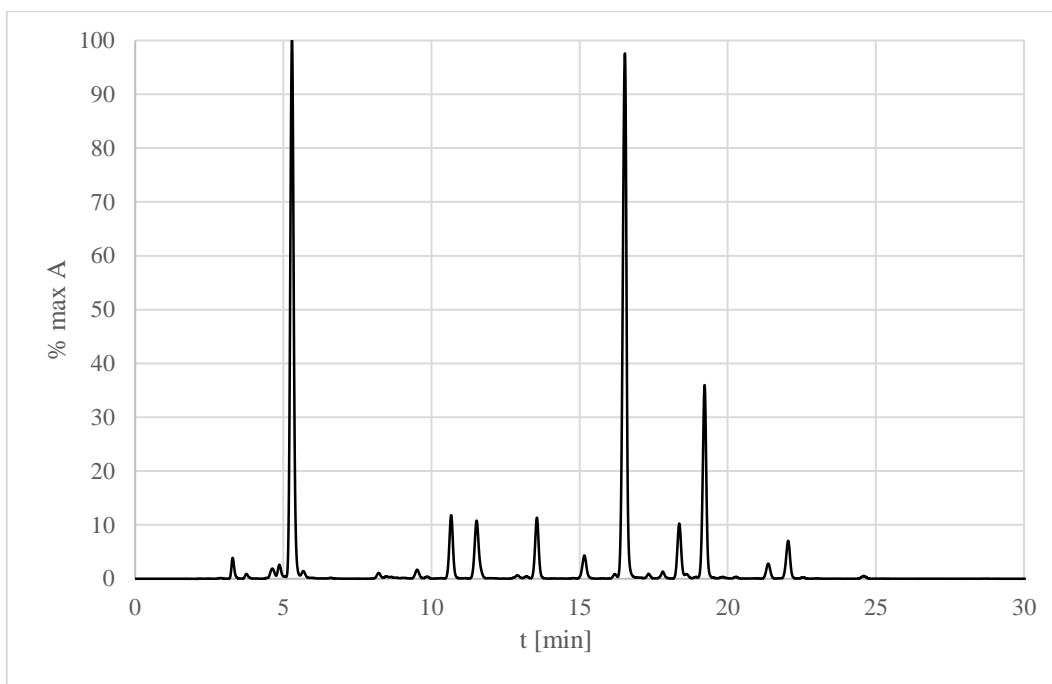
Obrázek P2-15 LC/UV záznam derivátu tenzidu ECS-22SB, připravovaného při 70 °C po dobu 90 min.



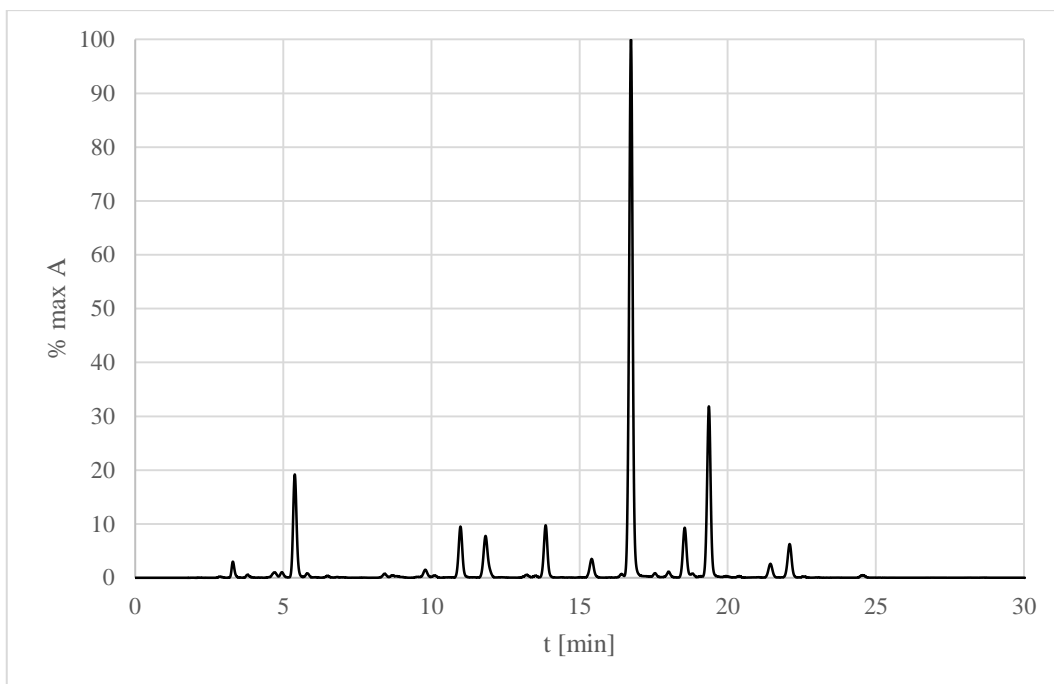
Obrázek P2-16 LC/UV záznam derivátu tenzidu ECS-22SB, připravovaného při 80 °C po dobu 60 min.



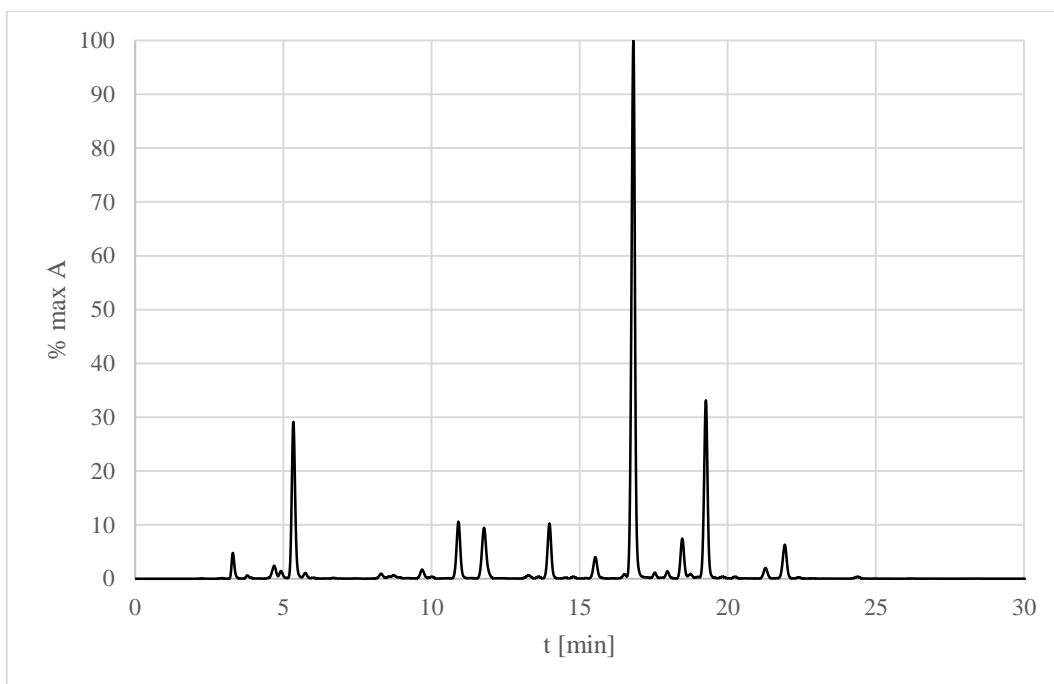
Obrázek P2-17 LC/UV záznam derivátu tenzidu ET-CS-12, připravovaného při 70 °C po dobu 30 min.



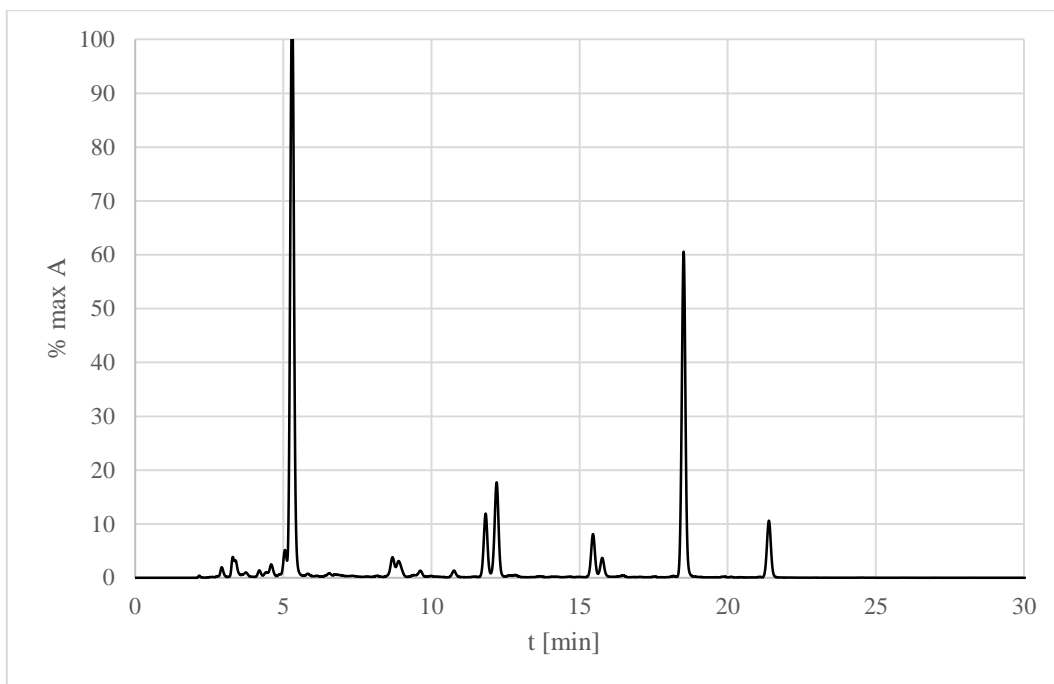
Obrázek P2-18 LC/UV záznam derivátu tenzidu ET-CS-12, připravovaného při 70 °C po dobu 60 min.



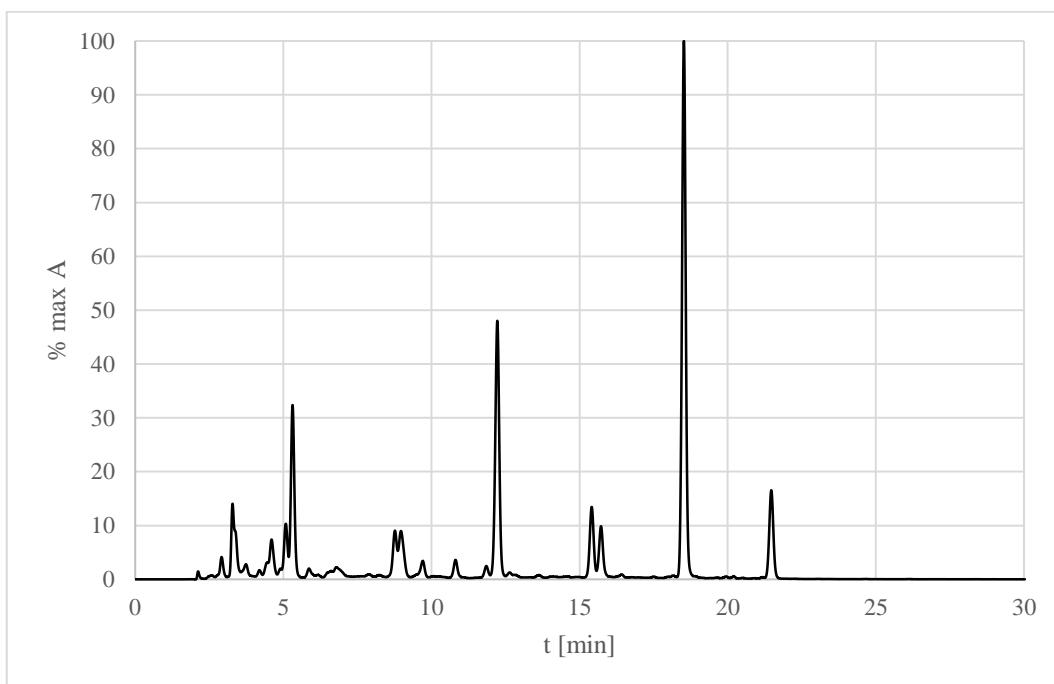
Obrázek P2-19 LC/UV záznam derivátu tenzidu ET-CS-12, připravovaného při 70 °C po dobu 90 min.



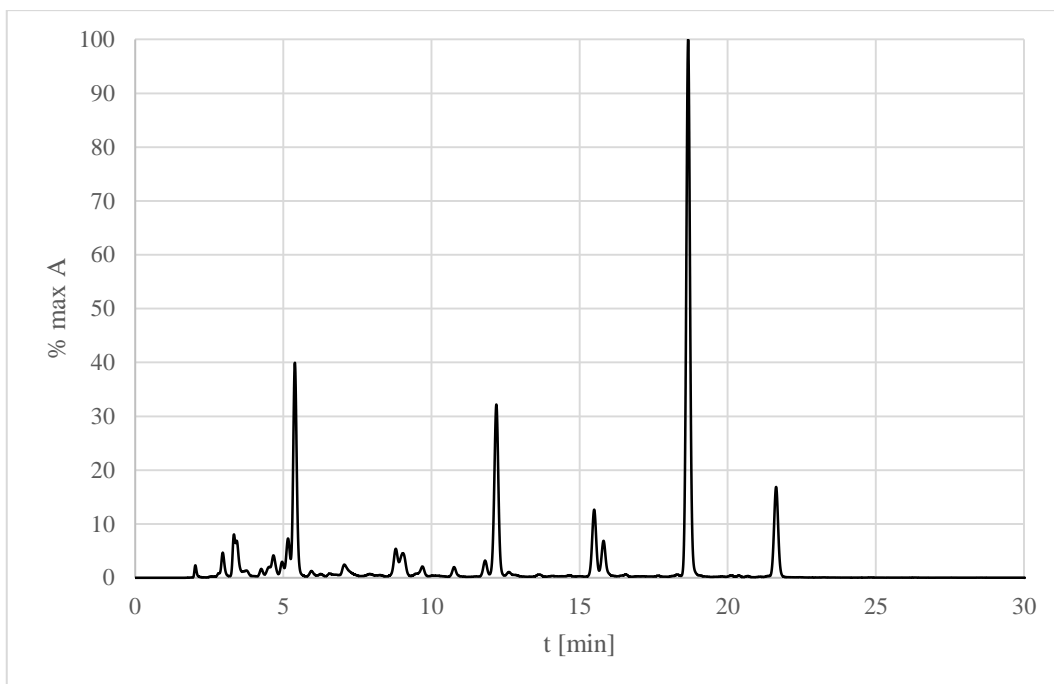
Obrázek P2-20 LC/UV záznam derivátu tenzidu ET-CS-12, připravovaného při 80 °C po dobu 60 min.



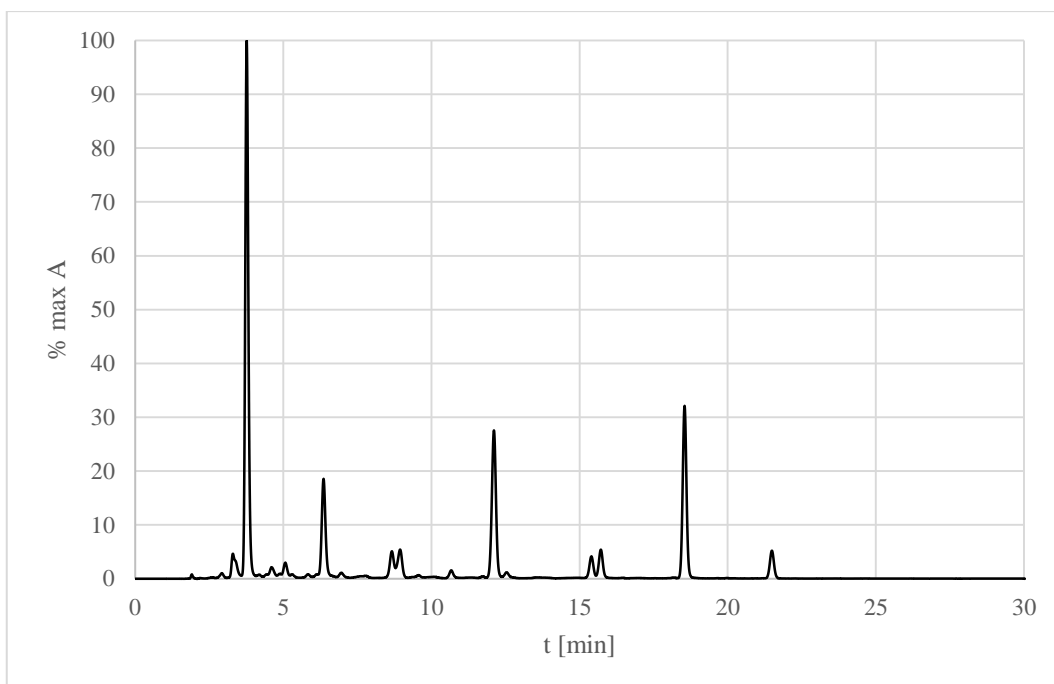
Obrázek P2-21 LC/UV záznam derivátu tenzidu GCK-12H, připravovaného při 70 °C po dobu 30 min.



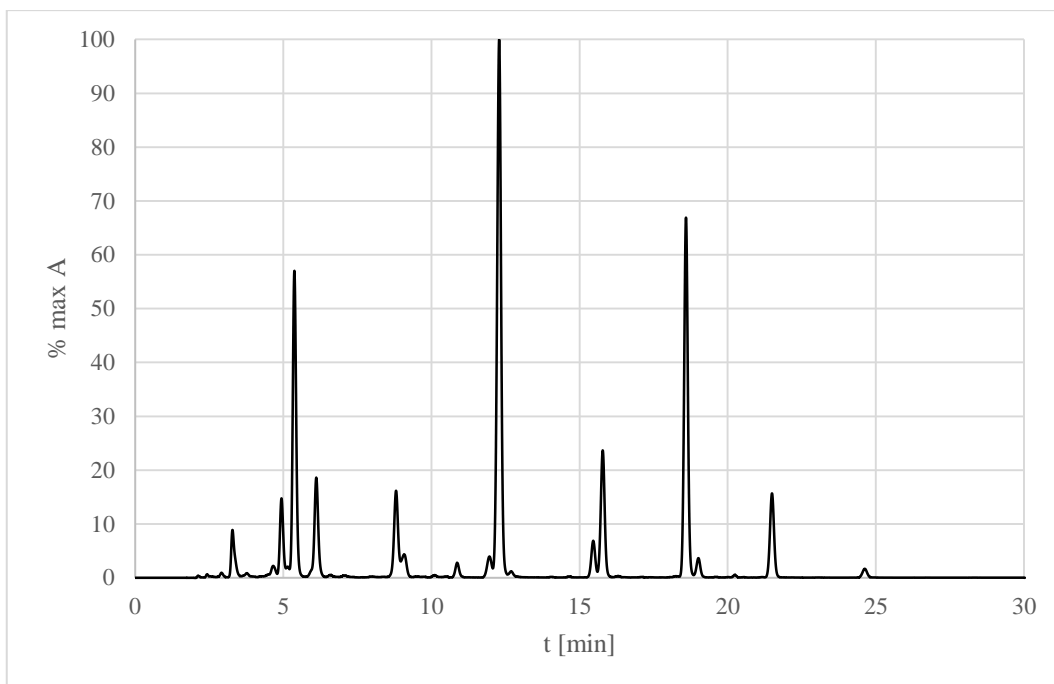
Obrázek P2-22 LC/UV záznam derivátu tenzidu GCK-12H, připravovaného při 70 °C po dobu 60 min.



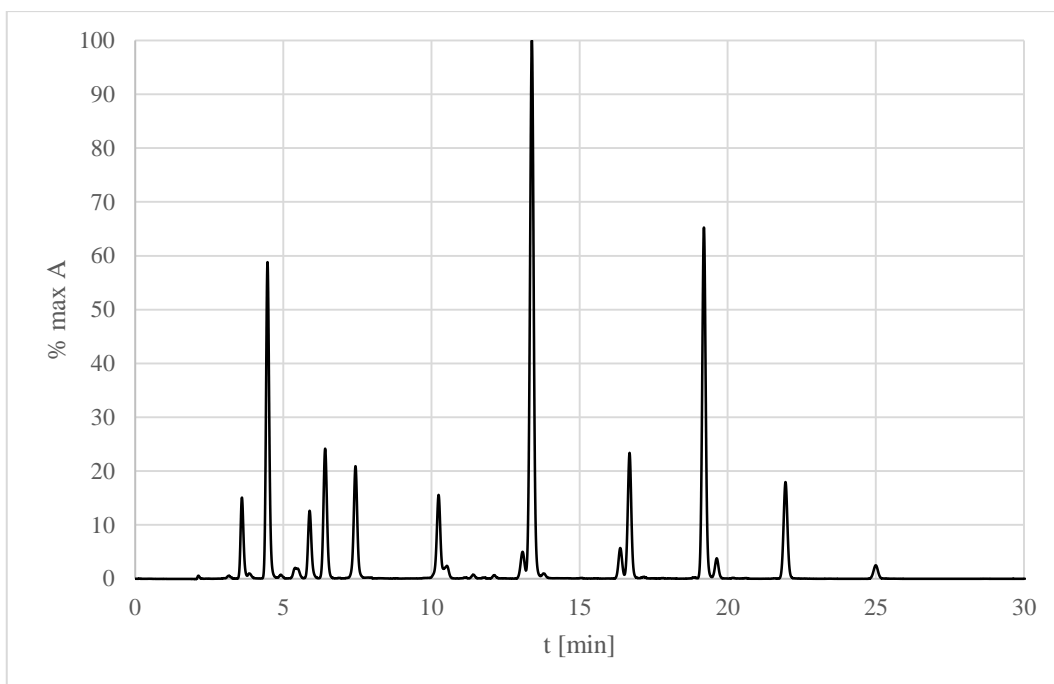
Obrázek P2-23 LC/UV záznam derivátu tenzidu GCK-12H, připravovaného při 70 °C po dobu 90 min.



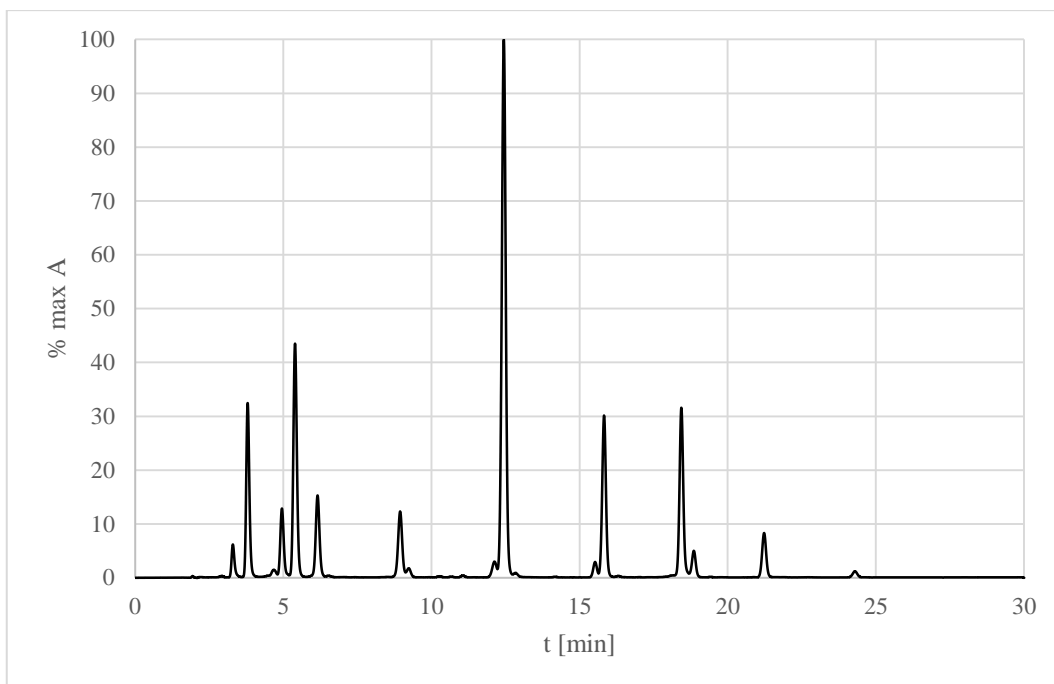
Obrázek P2-24 LC/UV záznam derivátu tenzidu GCK-12H, připravovaného při 80 °C po dobu 60 min.



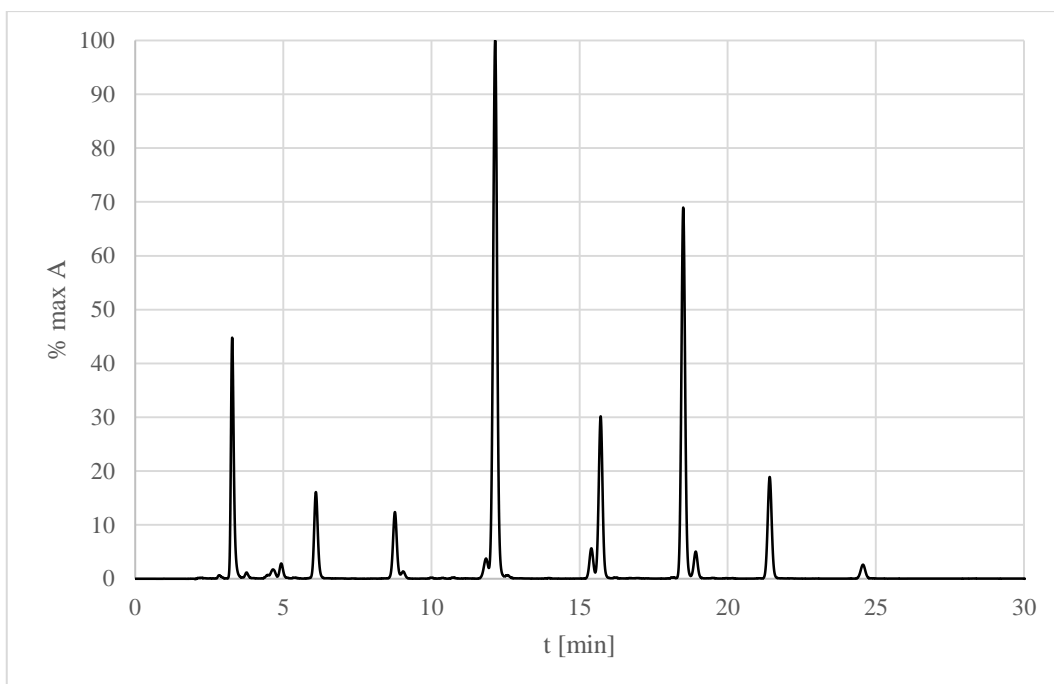
Obrázek P2-25 LC/UV záznam derivátu tenzidu GCK-12K, připravovaného při 70 °C po dobu 30 min.



Obrázek P2-26 LC/UV záznam derivátu tenzidu GCK-12K, připravovaného při 70 °C po dobu 60 min.



Obrázek P2-27 LC/UV záznam derivátu tenzidu GCK-12K, připravovaného při 70 °C po dobu 90 min.



Obrázek P2-28 LC/UV záznam derivátu tenzidu GCK-12K, připravovaného při 80 °C po dobu 60 min.

Příloha 3. Tabulky s elučními daty jednotlivých tenzidů

Tabulka P3-1 Eluční parametry pro jednotlivé deriváty tenzidu Amisoft CS-11

70 °C 30 min						
diester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t <sub>průměr</sub> [min]	plocha <sub>1</sub> [min]	plocha <sub>2</sub> [min]	plocha <sub>průměr</sub> [min]
kaprylové	10,85	11,01	10,93	2,979	2,992	2,986
kaprové	13,88	13,86	13,78	3,792	3,679	3,736
laurové	16,69	16,64	16,67	30,19	30,42	30,31
myristové	19,15	19,22	19,19	11,86	11,91	11,89
palmitové	21,79	21,96	21,88	2,409	2,403	2,406
70 °C 60 min						
diester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t <sub>průměr</sub> [min]	plocha <sub>1</sub> [min]	plocha <sub>2</sub> [min]	plocha <sub>průměr</sub> [min]
kaprylové	10,94	10,81	10,88	1,165	1,180	1,173
kaprové	13,85	13,73	13,79	1,316	1,307	1,312
laurové	16,66	16,67	16,67	10,87	11,17	11,02
myristové	19,19	19,35	19,27	3,224	3,316	3,270
palmitové	21,90	22,13	22,02	0,970	0,994	0,982
70 °C 90 min						
diester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t <sub>průměr</sub> [min]	plocha <sub>1</sub> [min]	plocha <sub>2</sub> [min]	plocha <sub>průměr</sub> [min]
kaprylové	10,81	10,96	10,89	1,851	1,797	1,824
kaprové	13,86	13,94	13,90	2,085	2,277	2,181
laurové	16,66	16,79	16,73	18,10	18,09	18,09
myristové	19,25	19,14	19,19	5,909	4,867	5,388
palmitové	22,01	22,20	22,11	1,091	1,080	1,086
80 °C 60 min						
diester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t <sub>průměr</sub> [min]	plocha <sub>1</sub> [min]	plocha <sub>2</sub> [min]	plocha <sub>průměr</sub> [min]
kaprylové	10,96	10,94	10,95	2,632	2,646	2,639
kaprové	13,92	13,84	13,88	2,986	3,515	3,251
laurové	16,75	16,74	16,75	24,93	25,15	25,04
myristové	19,34	19,37	19,36	8,231	8,301	8,266
palmitové	22,07	22,13	22,10	1,525	1,559	1,542



Tabulka P3-2 Eluční parametry pro jednotlivé deriváty tenzidu Amisoft CS-22

70 °C 30 min						
diester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t průměr [min]	plocha 1 [min]	plocha 2 [min]	plocha průměr [min]
kaprylové	10,91	10,85	10,88	0,441	0,445	0,443
kaprové	13,87	13,75	13,81	0,561	0,584	0,573
laurové	16,73	16,69	16,71	5,431	5,482	5,457
myristové	19,28	19,34	19,31	1,779	1,792	1,786
palmitové	22,01	22,10	22,06	0,327	0,327	0,327
70 °C 60 min						
diester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t průměr [min]	plocha 1 [min]	plocha 2 [min]	plocha průměr [min]
kaprylové	10,91	10,91	10,91	0,367	0,365	0,366
kaprové	13,86	13,80	13,83	0,475	0,475	0,475
laurové	16,74	16,61	16,68	4,371	4,371	4,371
myristové	19,41	19,30	19,36	1,272	1,396	1,334
palmitové	22,17	22,07	22,12	0,249	0,248	0,249
70 °C 90 min						
diester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t průměr [min]	plocha 1 [min]	plocha 2 [min]	plocha průměr [min]
kaprylové	10,93	10,79	10,86	0,618	0,622	0,620
kaprové	13,85	13,79	13,82	0,762	0,759	0,761
laurové	16,72	16,60	16,66	7,158	7,150	7,154
myristové	19,36	19,21	19,29	2,341	2,323	2,332
palmitové	22,12	21,98	22,05	0,396	0,418	0,407
80 °C 60 min						
diester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t průměr [min]	plocha 1 [min]	plocha 2 [min]	plocha průměr [min]
kaprylové	10,91	10,69	10,8	0,758	0,763	0,761
kaprové	13,75	13,68	13,72	0,921	0,968	0,945
laurové	16,61	16,57	16,59	8,399	8,371	8,385
myristové	19,24	19,24	19,24	2,656	2,652	2,654
palmitové	21,97	22,00	21,99	0,468	0,468	0,468

Tabulka P3-3 Eluční parametry pro jednotlivé deriváty tenzidu Amisoft CT-12S

70 °C 30 min						
diester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t průměr [min]	plocha 1 [min]	plocha 2 [min]	plocha průměr [min]
kaprylové	10,86	11,00	10,93	0,499	0,457	0,478
kaprové	13,77	13,96	13,78	0,604	0,595	0,599
laurové	16,63	16,84	16,67	6,651	6,628	6,639
myristové	19,23	19,21	19,19	2,407	1,299	1,853
palmitové	21,94	22,24	21,88	0,497	0,486	0,492
70 °C 60 min						
diester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t průměr [min]	plocha 1 [min]	plocha 2 [min]	plocha průměr [min]
kaprylové	11,00	10,96	10,98	1,083	1,097	1,09
kaprové	13,97	13,84	13,91	1,415	1,374	1,395
laurové	16,84	16,58	16,71	14,39	14,44	14,42
myristové	19,40	19,11	19,26	5,163	5,116	5,140
palmitové	22,08	21,87	21,98	1,043	1,036	1,040
70 °C 90 min						
diester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t průměr [min]	plocha 1 [min]	plocha 2 [min]	plocha průměr [min]
kaprylové	10,96	10,90	10,93	1,311	1,293	1,302
kaprové	13,86	13,90	13,88	1,787	1,806	1,797
laurové	16,74	16,76	16,75	18,76	18,63	18,69
myristové	19,38	19,28	19,33	6,762	6,769	6,766
palmitové	22,14	22,01	22,08	1,418	1,439	1,429
80 °C 60 min						
diester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t průměr [min]	plocha 1 [min]	plocha 2 [min]	plocha průměr [min]
kaprylové	10,93	10,86	10,89	0,762	0,771	0,767
kaprové	13,97	13,84	13,91	0,928	0,964	0,946
laurové	16,79	16,64	16,72	9,98	9,95	9,965
myristové	19,39	19,15	19,27	3,436	3,427	3,432
palmitové	22,18	21,81	21,99	0,709	0,713	0,711

Tabulka P3-4 Eluční parametry pro jednotlivé deriváty tenzidu Amisoft ECS-22SB

70 °C 30 min						
diester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t průměr [min]	plocha 1 [min]	plocha 2 [min]	plocha průměr [min]
kaprylové	10,95	10,91	10,93	3,157	3,207	3,182
kaprové	13,92	13,80	13,78	2,990	3,022	3,006
laurové	16,82	16,62	16,67	24,24	24,16	24,20
myristové	19,43	19,19	19,19	7,645	8,097	7,871
palmitové	22,19	21,92	21,88	1,432	1,487	1,459
70 °C 60 min						
diester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t průměr [min]	plocha 1 [min]	plocha 2 [min]	plocha průměr [min]
kaprylové	11,02	10,86	10,94	3,371	3,548	3,459
kaprové	13,88	13,86	13,87	3,190	3,221	3,206
laurové	16,77	16,73	16,75	24,21	24,30	24,26
myristové	19,30	19,30	19,30	8,201	8,142	8,172
palmitové	22,00	22,00	22,00	1,448	1,472	1,460
70 °C 90 min						
diester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t průměr [min]	plocha 1 [min]	plocha 2 [min]	plocha průměr [min]
kaprylové	10,74	10,92	10,83	2,730	2,880	2,805
kaprové	13,80	13,84	13,82	2,525	2,512	2,519
laurové	16,77	16,68	16,73	21,10	21,04	21,07
myristové	19,38	19,32	19,35	6,790	6,817	6,804
palmitové	22,12	22,10	22,11	1,216	1,230	1,223
80 °C 60 min						
diester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t průměr [min]	plocha 1 [min]	plocha 2 [min]	plocha průměr [min]
kaprylové	11,00	10,98	10,99	0,741	0,745	0,743
kaprové	14,00	13,87	13,94	0,697	0,743	0,720
laurové	16,89	16,79	16,84	6,220	6,235	6,228
myristové	19,48	19,45	19,47	1,922	1,928	1,925
palmitové	22,21	22,21	22,21	0,347	0,351	0,349

Tabulka P3-5 Eluční parametry pro jednotlivé deriváty tenzidu Amilite ET-CS-12 - glutamát

70 °C 30 min						
diester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t průměr [min]	plocha 1 [min]	plocha 2 [min]	plocha průměr [min]
kaprylové	11,01	10,88	10,95	1,246	1,224	1,235
kaprové	13,95	13,87	13,91	1,224	1,224	1,224
laurové	16,76	16,79	16,78	12,71	12,72	12,72
myristové	19,35	19,39	19,37	4,098	4,053	4,076
palmitové	22,12	22,14	22,13	0,870	0,901	0,886
70 °C 60 min						
diester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t průměr [min]	plocha 1 [min]	plocha 2 [min]	plocha průměr [min]
kaprylové	10,67	10,96	10,815	3,163	3,158	3,161
kaprové	13,56	13,96	13,76	3,155	3,095	3,125
laurové	16,53	16,81	16,67	27,19	26,20	26,69
myristové	19,22	19,23	19,23	9,382	9,386	9,384
palmitové	22,04	21,83	21,94	2,059	2,044	2,052
70 °C 90 min						
diester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t průměr [min]	plocha 1 [min]	plocha 2 [min]	plocha průměr [min]
kaprylové	10,91	10,91	10,91	2,629	2,635	2,632
kaprové	13,98	13,85	13,92	2,458	2,524	2,491
laurové	16,82	16,78	16,80	22,49	22,83	22,66
myristové	19,26	19,42	19,34	7,480	7,472	7,476
palmitové	21,93	22,21	22,07	1,632	1,635	1,634
80 °C 60 min						
diester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t průměr [min]	plocha 1 [min]	plocha 2 [min]	plocha průměr [min]
kaprylové	10,98	10,93	10,955	0,995	0,995	0,995
kaprové	13,85	13,83	13,84	0,987	0,965	0,976
laurové	16,73	16,76	16,75	9,978	9,939	9,959
myristové	19,37	19,46	19,42	3,214	3,162	3,188
palmitové	22,09	22,27	22,18	0,699	0,698	0,699

Tabulka P3-6 Eluční parametry pro jednotlivé deriváty tenzidu Amilite ET-CS-12 - threoninát

70 °C 30 min						
monoester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t průměr [min]	plocha 1 [min]	plocha 2 [min]	plocha průměr [min]
kaprové	8,40	8,29	8,345	0,098	0,097	0,098
laurové	11,85	11,73	11,79	1,357	1,355	1,356
myristové	15,47	15,44	15,46	0,552	0,548	0,550
palmitové	18,53	18,56	18,55	1,455	1,446	1,451
70 °C 60 min						
monoester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t průměr [min]	plocha 1 [min]	plocha 2 [min]	plocha průměr [min]
kaprové	8,22	8,35	8,285	0,301	0,297	0,299
laurové	11,53	11,80	11,67	3,468	3,437	3,453
myristové	15,16	15,52	15,34	1,327	1,318	1,323
palmitové	18,36	18,44	18,40	2,833	2,825	2,829
70 °C 90 min						
monoester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t průměr [min]	plocha 1 [min]	plocha 2 [min]	plocha průměr [min]
kaprové	8,42	8,34	8,38	0,081	0,083	0,082
laurové	11,83	11,78	11,81	0,984	0,984	0,984
myristové	15,41	15,41	15,41	0,403	0,402	0,403
palmitové	18,55	18,62	18,59	1,029	0,969	0,999
80 °C 60 min						
monoester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t průměr [min]	plocha 1 [min]	plocha 2 [min]	plocha průměr [min]
kaprové	8,30	8,33	8,315	0,229	0,229	0,229
laurové	11,78	11,76	11,77	2,746	2,678	2,712
myristové	15,53	15,42	15,48	1,069	1,041	1,055
palmitové	18,47	18,58	18,53	1,727	1,924	1,826

Tabulka P3-7 Eluční parametry pro jednotlivé deriváty tenzidu Amilite GCK-12H

70 °C 30 min						
monoester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t průměr [min]	plocha 1 [min]	plocha 2 [min]	plocha průměr [min]
kaprové	8,69	8,81	8,75	1,450	1,439	1,445
laurové	12,20	12,18	12,19	6,780	6,831	6,806
myristové	15,45	15,40	15,43	2,973	2,977	2,975
70 °C 60 min						
monoester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t průměr [min]	plocha 1 [min]	plocha 2 [min]	plocha průměr [min]
kaprové	8,77	8,78	8,775	1,086	1,087	1,087
laurové	12,22	12,25	12,235	6,014	5,991	6,003
myristové	15,41	15,48	15,445	1,637	1,651	1,644
70 °C 90 min						
monoester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t průměr [min]	plocha 1 [min]	plocha 2 [min]	plocha průměr [min]
kaprové	8,80	8,78	8,79	0,451	0,447	0,449
laurové	12,19	12,18	12,185	2,802	3,210	3,006
myristové	15,49	15,44	15,465	1,087	1,093	1,090
80 °C 60 min						
monoester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t průměr [min]	plocha 1 [min]	plocha 2 [min]	plocha průměr [min]
kaprové	8,66	8,78	8,72	0,283	0,271	0,277
laurové	12,11	12,27	12,19	1,598	1,656	1,627
myristové	15,40	15,46	15,43	2,255	2,393	2,324

Tabulka P3-8 Eluční parametry pro jednotlivé deriváty tenzidu Amilite GCK-12K

70 °C 30 min						
monoester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t průměr [min]	plocha 1 [min]	plocha 2 [min]	plocha průměr [min]
kaprylové	6,11	6,10	6,105	1,515	1,510	1,513
kaprové	8,81	8,84	8,825	1,393	1,366	1,379
laurové	12,29	12,25	12,27	8,421	8,701	8,561
myristové	15,78	15,77	15,78	1,981	1,951	1,966
palmitové	18,59	18,35	18,47	5,270	5,258	5,264
olejové	21,50	21,20	21,35	1,358	1,357	1,358
70 °C 60 min						
monoester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t průměr [min]	plocha 1 [min]	plocha 2 [min]	plocha průměr [min]
kaprylové	6,41	6,06	6,235	1,893	1,708	1,801
kaprové	10,24	8,83	9,535	1,344	1,339	1,342
laurové	13,39	12,24	12,82	8,455	8,170	8,313
myristové	16,69	15,79	16,24	1,909	1,700	1,805
palmitové	19,20	18,59	18,89	5,192	5,216	5,204
olejové	21,96	21,55	21,76	1,606	1,606	1,606
70 °C 90 min						
monoester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t průměr [min]	plocha 1 [min]	plocha 2 [min]	plocha průměr [min]
kaprylové	6,10	6,08	6,09	0,731	0,738	0,735
kaprové	8,77	8,79	8,78	0,590	0,647	0,619
laurové	12,15	12,26	12,21	0,493	0,499	0,496
myristové	15,71	15,85	15,78	1,433	1,428	1,431
palmitové	18,50	18,55	18,53	3,140	3,138	3,139
olejové	21,42	21,43	21,43	0,942	0,941	0,942
80 °C 60 min						
monoester kyseliny	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	t průměr [min]	plocha 1 [min]	plocha 2 [min]	plocha průměr [min]
kaprylové	6,16	6,11	6,14	0,752	0,763	0,758
kaprové	8,94	8,90	8,92	0,733	0,745	0,739
laurové	12,42	12,28	12,35	5,133	5,037	5,085
myristové	15,83	15,73	15,78	1,463	1,465	1,464
palmitové	18,44	18,55	18,49	1,800	1,443	1,622
olejové	21,23	21,43	21,33	0,431	0,431	0,431