

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

**Analýza neiontových tenzidů na bázi
oxyethylenovaných acylglycerolů pomocí
kapalinové chromatografie**

Bc. Matouš Humplík

Diplomová práce

2020

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF ANALYTICAL CHEMISTRY

**Analysis of nonionic surfactants based on
oxyethylenated acylglycerols using liquid
chromatography**

Bc. Matouš Humplík

Thesis

2020

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Matouš Humplík**
Osobní číslo: **C18552**
Studijní program: **N1407 Chemie**
Studijní obor: **Analytická chemie**
Téma práce: **Analýza neiontových tenzidů na bázi oxyethylenovaných acylglycerolů pomocí kapalinové chromatografie**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. V dostupné vědecké literatuře vyhledejte a rešeršně zpracujte přehled tenzidů a dále práce zabývající se analýzou neiontových tenzidů pomocí kapalinové chromatografie. Popište principy kapalinové chromatografie a fázové systémy používané pro analýzu tenzidů.
2. Proměřte retenční charakteristiky oxyethylenovaných acylglycerolů s různým stupněm oxyethylenace. Optimalizujte podmínky analýzy tenzidů s cílem dosáhnout co nejlepší separace oligomerů/homologů. Porovnejte separace s využitím různých typů detekce.
3. Získaná experimentální data kriticky zhodnoťte a diskutujte.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené 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 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2020

Prohlašuji:

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

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30. 6. 2020

Bc. Matouš Humplík

Poděkování

Zde bych rád poděkoval především mému vedoucímu diplomové práce, doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D. a konzultantce Ing. Petře Warzechové za odborné vedení, cenné rady, praktické připomínky, trpělivost a ochotu při konzultacích. V neposlední řadě patří poděkování také celé mé rodině za trpělivost a podporu během celého studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá analýzou neiontových tenzidů na bázi oxyethylenovaných acylglycerolů pomocí kapalinové chromatografie v systému s obrácenými fázemi a chromatografií hydrofilních interakcí. K tomu bylo využito třech typů detekce: refraktometrická, rozptylová a hmotnostní spektrometrie. Na základě hmotnostních spekter byly určeny série iontů, podle kterých se vzorky dále charakterizovaly.

KLÍČOVÁ SLOVA

neiontové tenzidy, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, chromatografie hydrofilních interakcí

ANNOTATION

The thesis is devoted to the analysis of nonionic surfactants based on oxyethylenated acylglycerols using liquid chromatography in a reversed phase system and chromatography of hydrophilic interactions. Three types of detection were used: refractometric, evaporative light scattering and mass spectrometry. A series of ions were determined based on the mass spectra, according to which the samples were further characterized.

KEYWORDS

non-ionic surfactants, liquid chromatography, mass spectrometry, hydrophilic interaction chromatography

OBSAH

ÚVOD	11
1 TEORETICKÁ ČÁST	12
1.1 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE	12
1.1.1 Instrumentace	12
1.1.1.1 Mobilní fáze	13
1.1.1.2 Čerpadla mobilní fáze	13
1.1.1.3 Dávkovací ventil	14
1.1.1.4 Kolony pro HPLC	15
1.1.1.5 Detektory	16
1.1.2 Systémy HPLC	20
1.1.2.1 Systém s normálními fázemi – NP-LC	21
1.1.2.2 Systém s obrácenými fázemi – RP-LC	21
1.1.2.3 Systém hydrofilních interakcí – HILIC	21
1.2 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	23
1.2.1 Hmotnostní analyzátory	24
1.2.2 Hmotnostní detektory	25
1.2.3 Ionizace	26
1.3 TENZIDY	28
1.3.1 Iontové tenzidy	29
1.3.1.1 Aniontové tenzidy	29
1.3.1.2 Kationtové tenzidy	29
1.3.2 Neiontové tenzidy	30
1.4 Analýza neiontových tenzidů pomocí HPLC	31
1.5 Neiontové tenzidy LEVENOL [®]	32
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
2.1 Chemikálie	34

2.2	Přístrojové vybavení.....	34
2.3	Příprava vzorků	35
2.4	Pracovní postup pro HPLC a HPLC/MS	35
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	37
3.1	Separace pomocí kapalinové chromatografie	39
3.1.1	Separace v systému s obrácenými fázemi	39
3.1.2	Separace v HILIC systému	46
3.1.3	Komplexní charakterizace tenzidů Levenol®.....	52
4	ZÁVĚR	56
5	LITERATURA.....	57
6	PŘÍLOHY	70

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN	Acetonitril
CI	Chemická ionizace
EI	Elektronová ionizace
EO	Oxyethylenovaná jednotka
ESI	Elektrosprejová ionizace
GC/MS	Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem
HILIC	Chromatografie hydrofilních interakcí
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC/MS	Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem
MALDI	Ionizace vzorku laserem za přítomnosti matrice
MeOH	Methanol
MF	Mobilní fáze
MS	Hmotnostní spektrometrie
NP-LC	Chromatografie s normálními fázemi
RP-LC	Chromatografie s obrácenými fázemi
SF	Stacionární fáze
THF	Tetrahydrofuran
UV	Ultrafialové záření
VIS	Viditelné záření

ÚVOD

S rozvojem společnosti a celkovou spotřebou surovin a zdrojů stoupá samozřejmě i spotřeba povrchově aktivních látek, které však představují určitý problém kvůli jejich toxicitě a biodegradabilitě především u běžných povrchově aktivních látek. Dříve hojně používané aniontové tenzidy dnes nahrazují tenzidy neiontové, které jsou díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem využívány především jako detergenty, ale mají uplatnění i ve výrobních technologiích. Novým směrem je tak výroba neiontových tenzidů z přírodních, netoxických a dobře rozložitelných surovin. V případě této diplomové práce se jedná o neiontové tenzidy vycházející z kokosového oleje a glycerolu, který vzniká jako odpad při zpracování přírodních tuků a olejů.

Jelikož se jedná o produkt založený na přírodní bázi je zde problém s jeho stanovením. Složení výchozích surovin není nikdy úplně stejné a následné analýze nepomáhá ani absence chromoforu pro snadnější a rychlejší UV/VIS detekci.

Tato diplomová práce se zabývá nalezením podmínek pro charakterizaci neiontových tenzidů na bázi oxyethylenovaných acylglycerolů obchodní značky Levenol®. Měření probíhalo pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie v systému s obrácenými fázemi a v systému hydrofilních interakcí. K detekci byl používán refraktometrický a rozptylový detektor. Následně bylo využito hmotnostní spektrometrie pro určení a identifikaci vzorků.

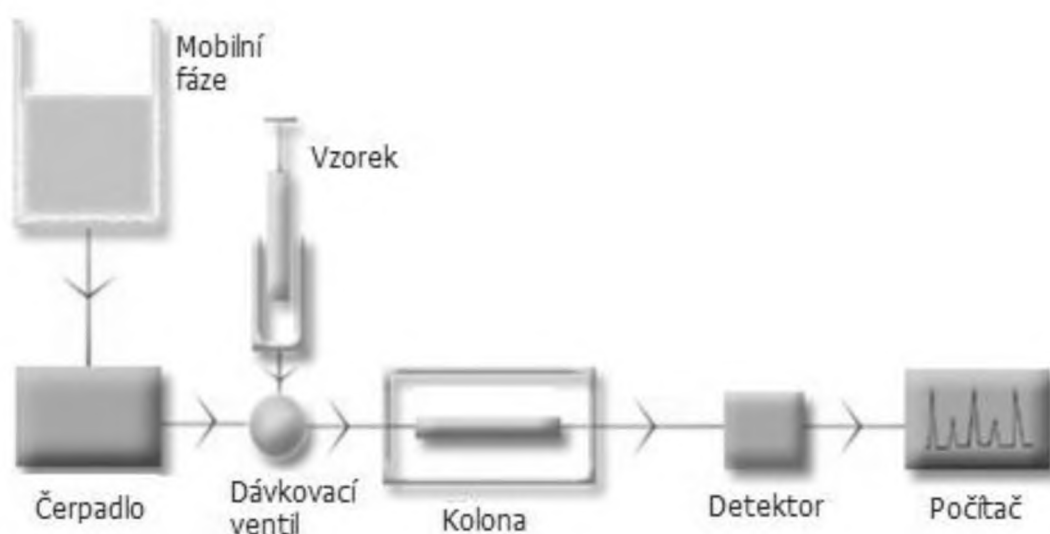
1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je separační chromatografická technika založená na principu rozdílné distribuce látek mezi dvěma nemísitelnými fázemi, a to mezi fází mobilní (MF) a fází stacionární (SF), která je zakotvena na koloně. Čas, který analyt stráví v jedné nebo druhé fázi závisí na afinitě analytu ke každé fázi zvlášť.

Rozdíl oproti klasické kapalinové chromatografii je především v přítomnosti vysokotlakého čerpadla, které umožňuje průtok MF kolonou, kde má zakotvená SF rozměry částic o velikosti (pouze) několik mikrometrů. Díky tomu dosahuje HPLC vyšší účinnosti za kratší čas. Dle typu mobilní a stacionární fáze dělíme HPLC na režimy s normálními fázemi (NP), obrácenými fázemi (RP) a chromatografii hydrofilních interakcí (HILIC). HPLC je především využívána pro stanovení polárních, termicky nestabilních, netěkavých nebo málo těkavých látek, případně směsí látek. Nachází využití v mnoha oborech, jako je např. analýza léčiv, životního prostředí, potravin, nebo stanovení meziproduktů a produktů v chemickém průmyslu [1 – 10].

1.1.1 Instrumentace



Obrázek 1: Schéma kapalinového chromatografu [11]

HPLC se skládá z vysokotlakého čerpadla (operující v tlacích běžně okolo 30 – 50 MPa, speciální až do 130 MPa), dávkovacího ventilu (převážně šesticečný ventil, který může být použit samostatně, nebo je součástí autosampleru), chromatografické kolony, detektoru (nebo více detektorů) a následného zpracování dat v příslušném softwaru, jako je znázorněno na obrázku 1 [1, 2, 3, 10, 12].

1.1.1.1 Mobilní fáze

Složení mobilní fáze je důležité hlavně z hlediska elučních charakteristik (retenční poměr, účinnost, rozlišení, citlivost, doba analýzy). Vhodná mobilní fáze je vybrána při optimalizaci metody nejčastěji tak, aby docházelo k co nejúčinnější separaci, ale zároveň nedocházelo k rozmývání píků.

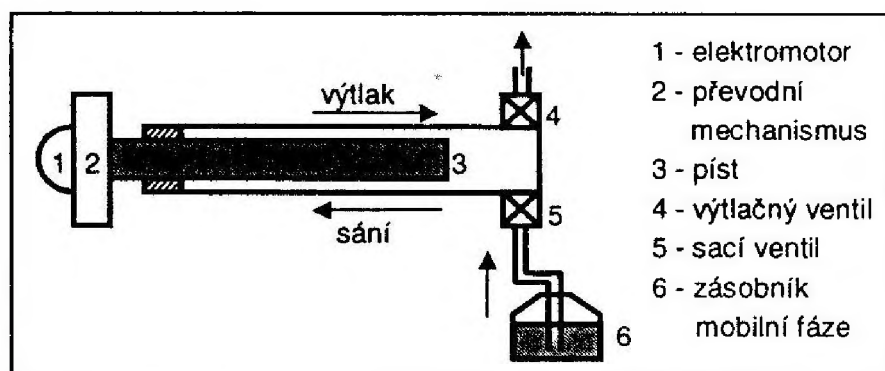
MF je přiváděna do vysokotlakého čerpadla přes degasser (odplyňovač) ze zásobních láhví. Při zapojení směšovače je možnost v průběhu analýzy měnit složení (zastoupení) rozpouštědel, a tím docílit tzv. gradientové eluce. Ta výrazně zkrátí čas analýzy při zachování optimálních podmínek separace pro danou směs látek. Při zachování stálého poměru rozpouštědel se jedná o izokratickou eluci [1, 8, 12, 13, 14].

1.1.1.2 Čerpadla mobilní fáze

Čerpadlo (pístové nebo membránové) je jednou z nejdůležitějších částí systému a slouží k dosažení stabilního průtoku mobilní fáze (0,1 – 10 ml/min pro analytické účely), který je nutný ke kvantifikaci a reprodukovatelnosti analýzy. Jeho funkcí je poskytovat přesný, správný, reprodukovatelný, konstantní a bezpulzový tok mobilní fáze do kolony. Pracuje za velmi vysokých tlaků v nejčastějším rozmezí 30 – 50 MPa při použití běžných kolon (je možnost použít i speciální čerpadla na mnohem vyšší tlaky).

V současné době se používají především vysokotlaká pístová čerpadla. Schéma a princip pístového čerpadla je znázorněn na obrázku 2. Tato čerpadla mají objemy pístů v rozmezí od 10 do 100 μ l. Jeden pár ventilů se stará o směr toku skrz čerpací hlavu. Takto konstruované jednočinné čerpadlo by způsobovalo rušivé tlakové rázy, a proměnlivý tok mobilní fáze. V důsledku toho jsou spíše používána dvojčinná čerpadla, čerpadla využívající více pístů nebo sériově řízená čerpadla. K vyhlazení pulzů se používá mikroprocesoru.

Membránové čerpadlo má na rozdíl od pístového čerpadla prostor s pístem naplněnou hydraulickou kapalinou (olejem), který je oddělen od pracovního prostoru membránou [1, 2, 3, 12, 14, 15].

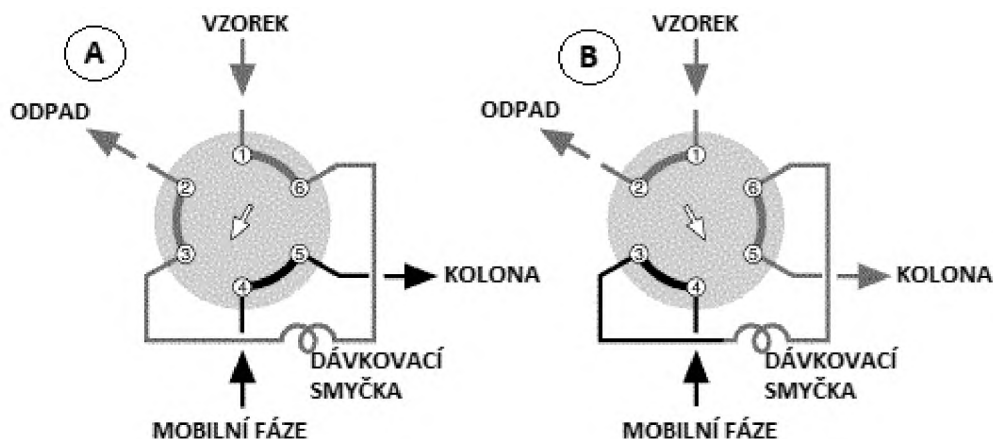


Obrázek 2: Princip pístového čerpadla [1]

1.1.1.3 Dávkovací ventil

Jako dávkovací ventily se nejčastěji používají šesticestné ventily (schéma je znázorněno na obrázku 3.), které slouží k zavedení přesně daného dávkovaného objemu do chromatografu. Dávkování probíhá pomocí stříkačky naplněním smyčky o přesně daném objemu (běžně dostupné jsou objemy smyček od 0,2 μl , pro mikrokolony, až po 5 ml nebo i více). Přepnutím ventilu dochází k okamžitému unášení vzorku mobilní fází na kolonu bez ztráty tlaku. Smyčka může být jak vnější, tak vnitřní a může mít různé objemy.

Kvůli minimalizování chyb operátora a zrychlení produktivity jsou v současnosti hojně používány autosamplery (automatické dávkovače). Používají se převážně pro rutinní analýzy. Moderní autosamplery zvládají analyzovat okolo 100 vzorků, dávkovat široké rozpětí objemu vzorku, vzorek zahřát nebo ochladit a případně provést jeho ředění, či derivatizaci [2, 3, 12, 14, 15].



Obrázek 3: Schéma šesticestného ventilu [16]

A – pozice plnění smyčky (Load), B – pozice dávkování (Inject)

1.1.1.4 Kolony pro HPLC

Kolony pro analytickou HPLC jsou nejčastěji vyráběny z nerezové oceli a standardní kolony mívají vnitřní průměr 4,6 mm, délku zpravidla 10 – 25 cm a rozměr vnitřních částic 3 – 5 μm . V případě mikrokolon se používají menší vnitřní průměry (1 nebo 2 mm). Díky těmto mikrokolonám se dá snížit objem eluentu, ale nezmění se selektivita separace a mrtvé objemy začnou mít větší význam se snižujícím se průměrem kolony. Jsou tak preferovány pouze tehdy, pokud je k dispozici velmi omezené množství vzorku.

Kolony pro HPLC kolony dosahují účinnosti od 40 000 do 60 000 teoretických pater na metr. Dnešním trendem je používání vysokoúčinných, vysokorychlostních kolon, které mají menší rozměry než výše popsané. Tyto kolony dosahují efektivity okolo 100 000 teoretických pater na metr. Jejich další výhodou je rychlost analýzy a nízká spotřeba rozpouštědel pro přípravu mobilní fáze.

Pro ochranu hlavní kolony se hojně používají předkolony, které jsou umístěny mezi čerpadlem a dávkovacím zařízením, nebo mezi dávkovacím zařízením a analytickou kolonou. Způsobují sice malé rozšíření píků, ale chrání kolonu před nerozpustnými materiály a nečistotami [1, 3, 9, 12, 14, 15].

1.1.1.5 Detektory

Detektor je zařízení monitorující veškeré změny složení mobilní fáze pomocí měření chemických nebo fyzikálních veličin. Detektory se dělí podle několika hledisek na:

- Selektivní detektor – reaguje pouze na určitou skupinu látek
- Specifický detektor – reaguje pouze na jeden analyt, případně na velmi malou, podobnou skupinu látek
- Univerzální detektor – reaguje na všechny analyty
- Koncentrační detektor – reaguje na změnu koncentrace složky v eluentu – odezva koncentračního detektoru závisí na průtoku mobilní fáze detektorem
- Hmotnostní detektor – reaguje na změnu hmotnostního toku v eluentu, s rychlostí odezva je nezávislá na průtoku mobilní fáze.
- Destruktivní detektor – analyt se nevratně mění
- Nedestruktivní detektor – v analytu nedochází k chemické změně

Detekce v HPLC má několik základních pojmů, které definují jednotlivý detektor:

- Šum – náhodné fluktuace signálu, které jsou vyjádřeny v jednotkách intenzity signálu
- Drift – postupná změna intenzity signálu v čase
- Mez detekce (LOD) – koncentrace, kdy je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu (dle uzance se vyhodnocuje jako trojnásobek hodnoty šumu základní linie)
- Mez stanovitelnosti – koncentrace, která dovoluje kvantitativní vyhodnocení (desetinásobek šumu základní linie)
- Citlivost detektoru – směrnice kalibrační přímky, velikost signálu vztažená na koncentraci, tzn. citlivost je hodnota výšky píku v závislosti na koncentraci analytu

Nejběžněji používané detektory v HPLC jsou spektrofotometrický (UV/VIS), fluorescenční, refraktometrický, elektrochemický, vodivostní, infračervené detektory a hmotnostně-spektrometrický. Jejich stručný souhrn je uveden v tabulce 1 [1, 2, 12, 14, 15].

RI – refraktometrický detektor
 UV-VIS – spektrofotometrický detektor
 IR – infračervený detektor
 FLD – Fluorescenční detektor

ECD – elektrochemický detektor
 CONDUCT – vodivostní detektor
 ELSD – rozptylový detektor
 MS – hmotnostní spektrometr

Tabulka 1: Typy detektorů [17]

	RI	UV-VIS	IR	FLD	ECD	CONDUCT	ELSD	MS
typ detektoru	nedestruktivní	nedestruktivní	nedestruktivní	nedestruktivní	destruktivní	nedestruktivní	destruktivní	destruktivní
odezva	univerzální	selektivní	selektivní	selektivní	selektivní	selektivní	univerzální	selektivní
měřená veličina	index lomu	absorbance	absorbance	intenzita fluorescence	elektrický proud	vodivost	rozptyl světla	m/z
typická citlivost (hmotnost/ml)	µg	ng	µg	pg	pg	ng	µg	pg
lineární rozsah	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ⁶	10 ⁶	10 ²	10 ⁵
závislost odezvy na průtoku	ano	ne	ne	ne	ano	ano	ano	ano
teplotní závislost	vysoká (10 ⁻⁴ jed. lomu)	nízká	nízká	nízká	vysoká (1,5%)	vysoká (2,0%)	vysoká	nízká
gradientová eluce	ne	ano	ne	ano	ne	ano	ano	ano

Spektrofotometrický (UV/VIS) detektor

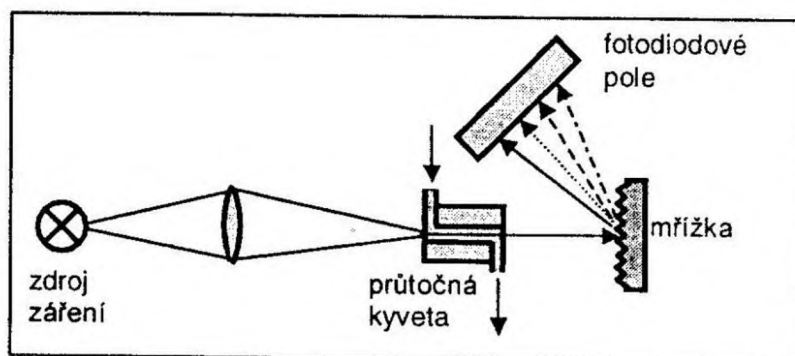
Spektrofotometrické detektory jsou nejběžnější v HPLC, měří absorbanci eluátu vycházejícího z kolony při vlnových délkách od 190nm do 800nm. Kvantitativní vyhodnocení je dáno Lambert-Beerovým zákonem. Ten vyjadřuje závislost absorbance – A , na délce kyvety – l (cm), koncentraci absorbující složky – c (mol·cm⁻¹) a molárním absorpčním koeficientu – ϵ (l · mol⁻¹ · cm⁻¹), viz. rovnice 1.

Rovnice 1: Lambert-Beerův zákon [1 - upraveno]

$$A = l \cdot c \cdot \epsilon$$

Jednoduché přístroje dovolují měření při jedné vlnové délce, dražší a složitější přístroje dovolují nastavení různých vlnových délek pomocí monochromátoru, jak je znázorněno na obrázku 4. Nejdokonalejší přístroje dokáží pomocí diodového pole (DA) proměřit celé dané absorpční spektrum v jednom okamžiku. Citlivost je různá

pro každou látku v závislosti na vlnové délce a molárním absorpčním koeficientu látky [1, 2, 3, 12].



Obrázek 4: Schéma fotometrického detektoru DA [1]

Fluorescenční detektor

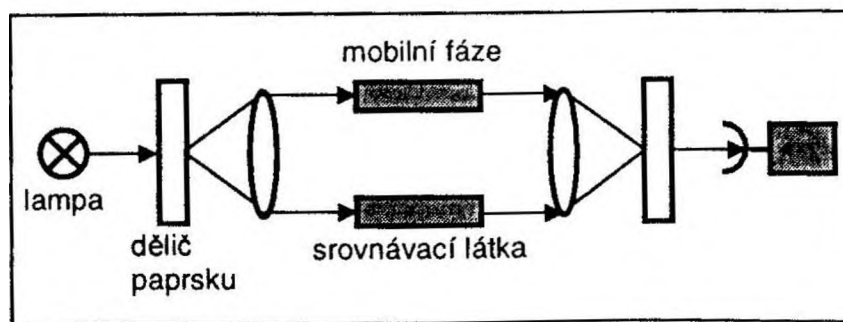
Tento detektor měří emisní (sekundární) záření, které zkoumaná látka vyzáří po absorpci excitačního (primárního) elektromagnetického záření, pomocí fotonásobiče, který měří vyzářené emisní záření kolmo na směr vstupujícího záření. Díky absorpci elektromagnetického záření přechází molekuly ze základního stavu do vyšších vibračních hladin. Absorbovanou energii vyzáří molekula jako fluorescenci, kdy vlnová délka emitovaného záření bývá větší než u excitačního v důsledku vibrační relaxace.

Detektor poskytuje vysokou selektivitu a citlivost, což je důvod, proč je hojně využíván ve stopové analýze. Podmínkou detekce je, aby molekula byla schopna fluorescence. Typicky z analýzy získáme dvě spektra, excitační a emisní spektrum. Obě spektra jsou charakteristická pro danou látku, a tak velmi pomáhají při identifikaci [1, 3, 12, 15].

Refraktometrický detektor

Jde o univerzální a nedestruktivní detektor. Je založen na principu měření rozdílu indexu lomu čisté mobilní fáze a eluátu. Velkou nevýhodou tohoto typu detektoru je,

že jej nelze použít ve spojení s gradientovou elucí a také, že odezva je velice závislá na teplotě a tlaku, a tak je nutné udržovat stále stejné podmínky analýzy. Obecné schéma refraktometrického detektoru je na obrázku 5 [1, 3, 12, 14, 15].



Obrázek 5: Schéma refraktometrického detektoru [1]

Elektrochemický detektor

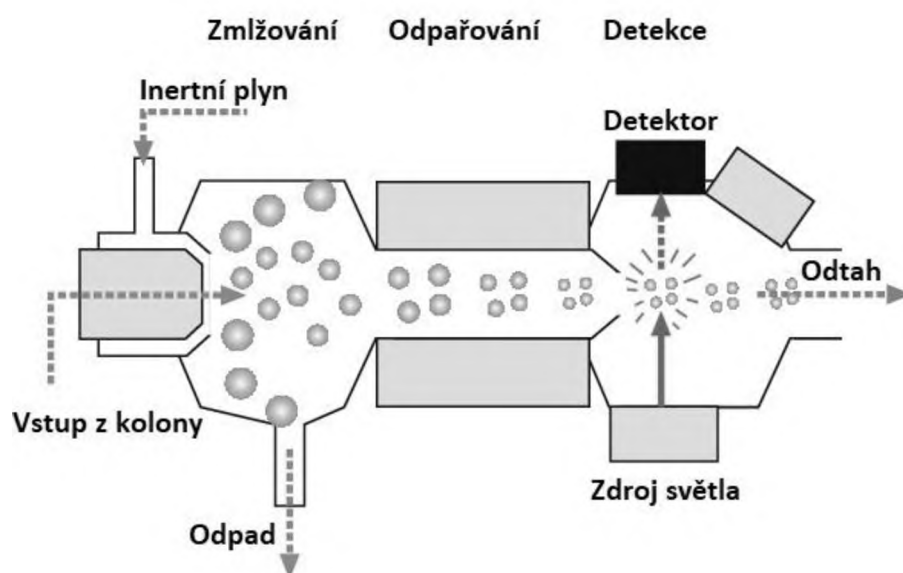
V kapalinové chromatografii je to velice dobrá alternativa k optické detekci, protože pomocí elektrochemického detektoru se dá monitorovat proud, potenciál elektrod nebo elektrická vodivost, která souvisí s redoxními charakteristikami molekul v mobilní fázi. Tyto detektory mají výhody ve vysoké selektivitě, citlivosti a široké lineární rozpětí. Ve všech případech je signál přímo úměrný koncentraci s relativně širokým lineárním rozpětím [1, 3, 12, 14, 15].

Vodivostní detektor

Vodivostní detektor je citlivý na iontové látky v málo vodivých roztocích, jako je např. voda nebo jiné polární rozpouštědlo. Monitoruje schopnost eluátu vést elektrický proud. Odezva je relativně nespecifická kvůli vodivosti všech iontů přítomných v eluátu. Hlavní využití je v iontově-výměnné chromatografii s potlačeným vodivým pozadím pro velmi citlivé stanovení kovů alkalických zemin a aniontů či kationtů anorganických nebo organických alkalických kovů [1, 3, 12, 14, 15].

Rozptylový detektor

Rozptylový detektor, viz schéma na obrázku 6, je univerzální a slouží především k detekci látek neobsahující chromofor nebo fluorofor, a tak nejsou možné detekovat v UV detektoru a pro látky méně těkavé, než je mobilní fáze. Dochází zde k záznamu rozptylu světla na částicích analytu, které vznikly po zmlžení eluentu a následném odpaření rozpouštědla. Jeho výhodou je možnost použití gradientové eluce [18, 19].



Obrázek 6: Schéma rozptylového detektoru [18]

1.1.2 Systémy HPLC

Retenci látek a zejména selektivitu separace v kapalinové chromatografii určuje kombinace použité stacionární a mobilní fáze. Podle relativní polaritě obou fází je možné rozdělit chromatografické systémy na dva základní, historicky starší systém s normálními fázemi a v současné době nejpoužívanější systém s obrácenými fázemi.

1.1.2.1 Systém s normálními fázemi – NP-LC

V chromatografii s normálními fázemi je polárnější stacionární fáze a méně polární fáze mobilní. Typické SF jsou sorbenty připravené např. z Al_2O_3 nebo SiO_2 . Jako MF se primárně používají nepolární organická rozpouštědla jako hexan nebo heptan smíchané s lehce polárními rozpouštědly jako je CCl_4 nebo propan-2-ol. V NP-LC látky interagují s SF adsorpčním mechanismem a nejdříve eluují látky nejméně polární. Retence klesá s množstvím polárního rozpouštědla v MF. Množství nepolární složky v MF musí být alespoň 60 % [8, 9, 10, 12, 20, 21].

1.1.2.2 Systém s obrácenými fázemi – RP-LC

Systém s obrácenými fázemi se používá k separaci polárních látek. Rozdíl u RP-LC oproti NP-LC je v použité fázích. Jako MF se zde používají polární rozpouštědla mísitelná s vodou (ACN, MeOH, THF, aj.). Pro SF, která je zde méně polární než MF, je nejčastější silikagel, na jehož hydroxylové skupiny se váže vhodný ligand (kyanoskupina -CN, oktadecyl uhlíkový řetězec -C18 nebo oktylový uhlíkový řetězec -C8).

Momentálně je to nejpoužívanější systém v HPLC s hlavním využitím při gradientové eluci, při níž se snižuje polarita mobilní fáze k rychlejší eluci nepolárních látek z kolony [6, 7, 8, 9, 12].

1.1.2.3 Systém hydrofilních interakcí – HILIC

Kapalinová chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC) je alternativním systémem HPLC pro separaci polárních sloučenin. Je to systém podobný NP-LC ale se složitějším mechanismem separace. Jako stacionární fáze se zde používají také polární sorbenty jako v NP-LC, ale mobilní fáze jsou podobné MF použitých v RP-LC. Další velkou výhodou HILIC je možnost analyzovat látky s nábojem jako v iontové chromatografii, ale nejsou potřeba drahé reaktanty tvořící iontovou vazbu. HILIC tak řeší mnoho problémů složitých separací, jako jsou organické kyseliny, léčiva [22, 23], uhlovodíky [24, 25] nebo peptidy [26, 27, 28] a jiné. Další využití HILIC je analýza sloučenin v komplexech, které eluují

v RP-LC spolu s mrtvým objemem. Separace v HILIC systému je možné díky vysokému obsahu těkavých rozpouštědel v mobilní fázi velmi dobře propojit s hmotnostní spektrometrií, přesevším v režimu ionizace elektrosprejem (ESI).

Analýza je možná jak v izokratickém režimu s vysokým podílem organického rozpouštědla, tak gradientovém režimu začínajícím vysokým procentem org. rozpouštědla a končící převážným poměrem vodné fáze, jelikož typická MF pro HILIC obsahuje vodou mísitelná polární organická rozpouštědla (jako ACN) s malým množstvím vody. Kvůli udržení pH a iontové síly MF se často přidávají iontová aditiva jako mravenčan nebo octan amonný. Zároveň ale mohou přispívat ke změně ionizace analytu, a tak měnit jeho retenci, proto je nutné u analytů jako jsou například antibiotika upravit pH tak, aby byl analyt pouze v jediné iontové formě. V případě analýzy neiontových sloučenin nejsou pufrů potřeba.

Mobilní fáze tvoří na povrchu fáze stacionární adsorbovanou, částečně imobilizovanou vodní vrstvu, zatímco zbytek MF tvoří převážně organická fáze a vzniká tak extrakční systém kapalina-kapalina a analyt je distribuován mezi těmito dvěma vrstvami [8, 9, 11, 29 – 36].

1.2 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

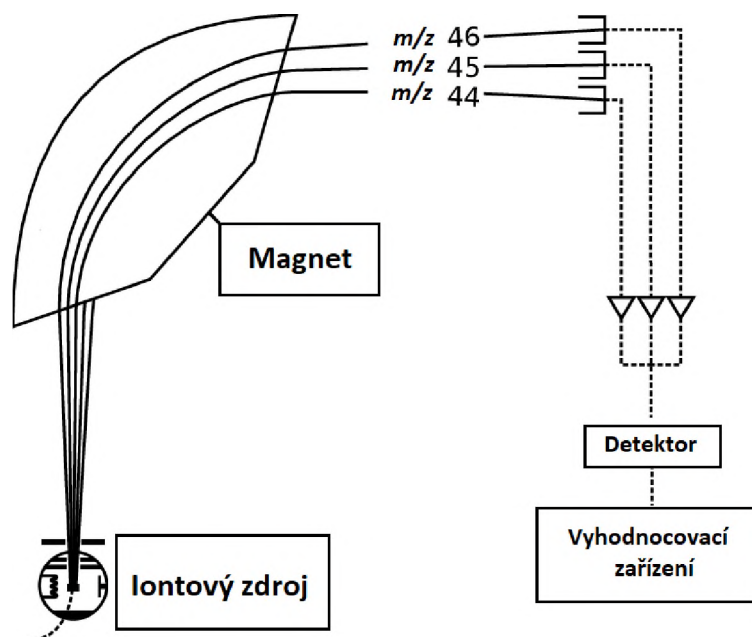
Hmotnostní spektrometrie (MS) je separační technika převádějící vzorek na ionizovanou plynnou fázi. Tyto ionty se poté separují dle jejich podílu hmotnosti a náboje m/z . Poskytuje unikátní možnost určení přítomnosti sloučeniny ve vzorku pomocí hmotnostního spektra, které velice pomáhá v identifikaci. Základní kroky jsou: odpaření vzorku, ionizace, akcelerace iontů do hmotnostního analyzátoru, separace iontů hmotnostním filtrem, detekce iontů. V kombinaci se separačními technikami představuje silnou analytickou metodu. Problém ve spojení s kapalinovou chromatografií (LC-MS) je především v mobilní fázi, kterou je nutné nejdříve zplynit, a vypořádat se tak s velkým objemem vzniklého plynu. Pracovat může jak v normálním režimu, tak i v režimu obrácených fází jak v izokratickém nebo gradientovém modu [1, 14, 15, 37].



Obrázek 7: Obecné schéma hmotnostního spektrometru [1]

Součásti běžného hmotnostního spektrometru jsou znázorněny na obrázku 7. Ionizace probíhá nárazem letících elektronů nebo je použita chemická ionizace. Vzorek je přiveden do iontového zdroje v podobě páry, kde je bombardován elektronovým svazkem. Vzniklé kationty přecházejí do akcelerační komory, kde dochází k urychlení napětím 3 – 10kV. Ionty s hmotností m a nábojem z jsou v poli urychleny a vedeny do magnetického pole, které působí, spolu s odstředivou a dostředivou silou na jejich pohyb po kruhové dráze. Zde podle jednotlivých poměrů hmotnosti a náboje m/z jsou jejich dráhy jinak vychýleny a dopadají na detektor, který je umístěn tak, aby na něj dopadly ionty s určitým poloměrem, jak je znázorněno na obrázku 8.

V moderních a kompaktnějších přístrojích je za iontovým zdrojem jako hmotnostní analyzátozem používán kvadrupól nebo kvadrupólová iontová past [1, 14, 15, 37].



Obrázek 8: Klasická konstrukce hmotnostního spektrometru [38]

1.2.1 Hmotnostní analyzátoary

Kvadrupólový analyzátoar (Q) obsahuje čtyři rovnoběžné tyčové elektrody, na které je přiváděno napětí a složka radiofrekvenčního pole. Tyto hodnoty určují trajektorii drah, po kterých se budou mezi tyčemi pohybovat ionty dle určité hodnoty m/z . V daném nastavení jsou stabilní vždy jen dané hodnoty m/z , ostatní ionty nedojdou až k detektoru. Toto nastavení se mění a detektor tak může zachycovat různé ionty o hodnotách m/z . Umožňuje snadnou automatizaci, je malý, rychlý, relativně levný a nepříliš složitý, ale má menší rozsah měřených hmotností a rozlišení [1, 14, 15, 37].

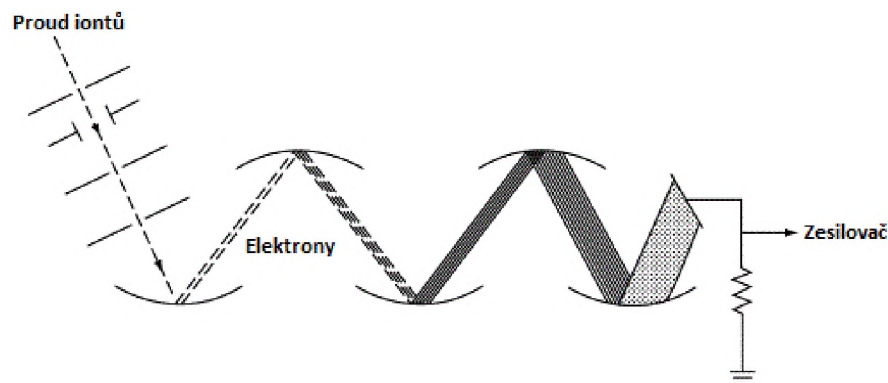
Kvadrupólová iontová past (QIT) funguje podobně jako kvadrupól, ale obsahuje pouze tři elektrody. Dvě vyklenuté a jednu kruhovou. Spolu tak tvoří prostor kruhu, kde se shromažďuje oblak iontů. Ty jsou zde zadrženy na milisekundy nebo i déle. V prostoru pasti se nachází helium o velmi malém tlaku, svým třením brzdí pohyb iontů a pomáhá jim semknout se do oblaku. Změnou nastavení pak dochází k uvolnění do detektoru. Analyzátoar je citlivý, snadno automatizovatelný a citlivý. Má však nižší rozlišení a omezený dynamický rozsah [1, 14, 15, 37].

Hmotnostní analyzátor FT-ICR (Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance) odstraňuje výše uvedené nedostatky. Má navíc magnetický a elektrostatický sektor a nevyužívá základní plyn oproti QIT. Pracuje se za velmi vysokého vakua. Díky své dokonalosti jsou vysoké nároky na prostor, cenu a omezené využití pro špičková pracoviště [1, 14, 15, 37].

Hmotnostní spektrometr TOF-MS (Time of Flight) je nejjednodušší a nejrychlejší hmotnostní spektrometr, kdy je celý vzorek akcelerován najednou. Ionty tak dostanou stejnou energii a vstupují do evakuované 1 – 2 m dlouhé trubice. Na konci trubice je detektor, do kterého dopadají postupně ionty od nejlehčích po nejtěžší. Má velký rozsah měřených hmotností, velkou citlivost, a je rychlý. Má však relativně malé detekční limity a není příliš univerzální. Běžně se používá pro analýzy velkých molekul, jako jsou DNA sekvence nebo proteiny [1, 14, 15, 37].

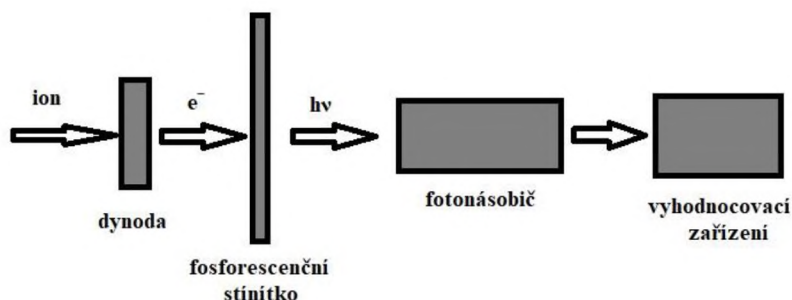
1.2.2 Hmotnostní detektory

Elektronový násobič je detektor obsahující další elektrody, které zesilují elektronový proud 10^4 až 10^8 krát. Konstrukce je zužující se trubice kdy do širší části dopadají ionty. Ion vyrazí elektron, který dopadne na místo s méně negativním potenciálem a vyrazí další elektrony. Signál se tak zvyšuje a takto zesílený proud elektronů je veden do zesilovače a je vyhodnocen. Schéma zesilování signálu je znázorněno na obrázku 9 [1, 14, 15, 37].



Obrázek 9: Elektronový násobič jako detektor [39]

Detektor s konverzní dynodou a fotonásobičem mění v konverzní elektrodě náraz iontu na vyražený elektron, který poté dopadá na fosforescenční stínítko a vyraží tak foton který je pak zachycen fotonásobičem. Obecné schéma je znázorněno na obrázku 10. Detektor je citlivý s vysokou životností [1, 14, 15, 37].



Obrázek 10: Detektor s konverzní dynodou a fotonásobičem [1]

Faradayova miska (Faraday cup) je detektor který tvoří konverzní elektroda miskovitého tvaru (dynoda) s povrchem z GaP nebo BeO. Po dopadu iontu se vyraží elektron z jejího povrchu a dopadá poté na anodu. Takto vzniklý proud je zesílen zesilovačem, jehož šum však omezuje citlivost tohoto detektoru [1, 14, 15, 37].

1.2.3 Ionizace

Ionizace je jedna z nejdůležitějších částí hmotnostního spektrometru a dochází k ní v iontovém zdroji. Vytvoří se zde nabitě částice z neutrálních molekul analytu, které se následně rozpadají (fragmentují). Jelikož do iontového zdroje nevstupuje pouze čistý analyt, ale také jeho matrice, nevznikají tak pouze molekulární ionty (M^- , M^+ , $[M+H]^-$, $[M+H]^+$), ale také ionty aduktové ($[M+HCOO]^-$, $[M+NH_4]^+$, $[M+R]^+$, a jiné). Iontových zdrojů je několik desítek, ale běžné dělení je na ionizace měkké a tvrdé, podle energie potřebné k ionizaci [14, 15, 37, 40].

Elektronová ionizace (EI) je nejstarší a nejtvrdší z ionizačních technik, kdy dochází k fragmentaci molekuly, která získá velmi vysoký přebytek vnitřní energie z elektronu emitovaného ze žhavené katody s urychlujícím potenciálem standardně 70 eV. Jelikož

probíhá ionizace v plynné fázi, je často spojována s plynovou chromatografií (GC/MS) [14, 15, 37, 40].

Chemická ionizace (CI) je první měkkou ionizační technikou, kde vzniklé ionty mají sudý počet elektronů, obvykle vznikají $[M+H]^+$ nebo $[M-H]^-$ ionty. Principem CI je nepřímá ionizace vzorku reakčním plynem (obvykle methan, isobutan nebo amoniak). Vzorek je spolu s přebytkem reakčního plynu dávkován do spektrometru. Vznikající elektrony (stejně jako u EI) ionizují reakční plyn nejdříve na primární a poté na sekundární ionty. Tyto sekundární ionty reagují se vzorkem a protonují ho. Její hlavní využití je v dnešní době hlavně pro GC/MS ke studiu reakcí v plynném stavu [14, 15, 37, 40].

Elektrosprejová ionizace (ESI) je nejměkčí a nejvíce používaná ionizační metoda pro spojení HPLC/MS. Využívá se pro látky středně polární až iontové. Vzorek prochází kovovou kapilárou, na které je vysoké napětí 3-5 kV. Kapičky vzorku, na jejichž povrchu je velké množství nábojů, jsou na ústí kapiláry rozptýlené pomocí zamlžujícího plynu. Z důvodů odpařování rozpouštědla dojde ke zvýšení hustoty povrchového napětí, až dojde ke Coulombické explozi, tj. rozpad na menší kapičky s rozdělenými náboji. Opakováním tohoto procesu dojde k uvolnění iontu [14, 15, 37, 40].

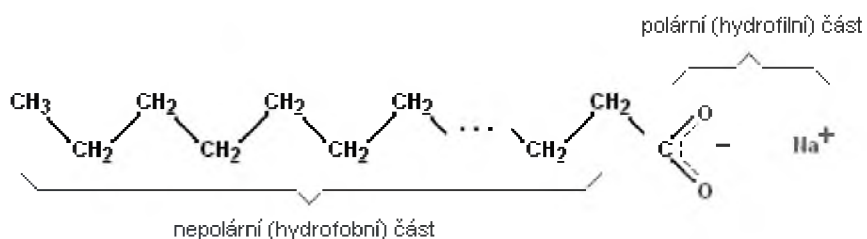
Ionizace vzorku laserem za přítomnosti matrice (MALDI) řadí se mezi měkké techniky se používá především pro biologické vzorky, například pro analýzu proteinů nebo jiných makromolekul, často v offline spojení s HPLC. Vzorek je spolu s matricí nanesen na MALDI terčik, kde je absorbována energie krátkého laserové pulsů a dojde k lokální desorpci analytu i matrice a ionty jsou následně urychleny do hmotnostního analyzátoru [5, 6, 70, 71].

V diplomové práci je řešeno téma optimalizace analytické metody pro analýzu tenzidů pomocí kapalinové chromatografie a následně ve spojení s hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem. Proto se následující kapitola věnuje obecně tenzidům a poté speciálně tenzidům značky Levenol®.

1.3 TENZIDY

Tenzidy jsou skupina organických povrchově aktivních látek, které snižují povrchovou a mezifázovou energii, a tak se samovolně hromadí již v malé koncentraci na fázovém rozhraní. Jejich další vlastností je snížení tření, stabilizace či destabilizace disperzních systémů a ovlivnění fyzikálně-mechanických vlastností jiných látek. Fázové rozhraní jsou plochy, které oddělují dvě fáze soustavy, jako je kapalina-plyn, kapalina-kapalina nebo kapalina-pevná látka.

Jejich schopnost usnadňovat smáčení povrchů a tím odstraňovat nečistoty je dána molekulární strukturou tenzidů tvořenou asymetrickými, dipolárními molekulami s amfifilními vlastnostmi. Lipofilní část je nejčastěji nepolární uhlíkový řetězec C8-C22 orientovaný směrem k nepolární části smáčeného povrchu. Hydrofilní část bývá často iontová, nebo polární skupina orientovaná k vodní fázi. Typickým příkladem je sodné mýdlo, jehož molekula je popsána na obrázku 11.



Obrázek 11: Schéma molekuly sodného mýdla [41]

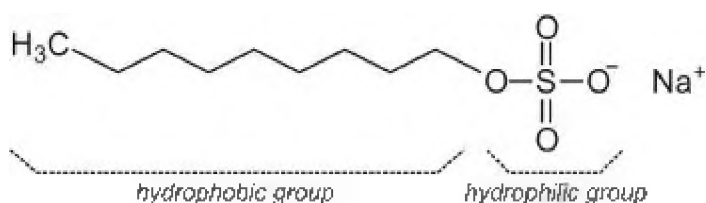
Tenzidy se dají dělit na základě několika kritérií, jako jsou jejich aplikace, biologické rozložitelnosti, jejich hydrofilních nebo hydrofobních částí, ale nejrozšířenější klasifikace je dle iontového charakteru tenzidů na iontové (aniontové, kationtové) a neiontové [42, 43, 44, 45].

1.3.1 Iontové tenzidy

1.3.1.1 Aniontové tenzidy

Největší skupina obecně používaných povrchově aktivních látek. Ve vodném prostředí dochází k disociaci molekul na záporný organický anion [karboxylát ($-\text{COO}^-$), sulfát ($-\text{OSO}_3^-$), sulfonát (SO_3^-)], který na sebe sorbuje nečistoty, a na neaktivní kation (Na^+ , K^+ , nebo Mg^{2+}). Aniontové tenzidy jsou nestálé v kyselém prostředí a neaktivnější v neutrálním a alkalickém prostředí. V praktických aplikacích jsou neúčinnější v odstraňování především hlíny, jílu nebo olejovitých skvrn. Jejich obecné schéma je popsáno na obrázku 12. Nejstarším aniontovým tenzidem je mýdlo, resp. sodná sůl vyšších mastných kyselin, kde jeho výhodou je přírodní původ a rychlá biologická odbouratelnost v aerobním prostředí.

Syntetické aniontové tenzidy jsou vyráběny primárně z mastných kyselin, jednosytných alkoholů s dlouhými uhlíkatými řetězci, benzenu, fenolu či nenasycených uhlovodíků C8-C18. V případě sulfonace se používají činidla jako oxid sírový, kyselina sírová nebo kyselina chlorsulfonová [42, 45, 46].

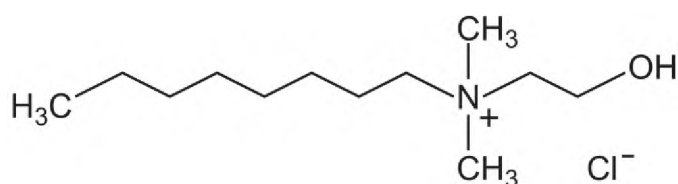


Obrázek 12: Schéma aniontového tenzidu [47]

1.3.1.2 Kationtové tenzidy

Kationické tenzidy hrají hlavní roli jako antiseptická činidla v kosmetice, obecné fungicidy, germicidy a v celé řadě dalších chemických použití. Ve vodném roztoku disociují na kladně nabitě organické ionty, které jsou povrchově aktivní, díky čemuž jsou

adsorbovány na pevné povrchy obsahující většinou záporný náboj. Obecné schéma kationtových tenzidů je znázorněno na obrázku 13. Mají nižší čisticí vlastnosti a využívají se převážně jejich změkčovací nebo mikrobiální vlastnosti a jako inhibitory koroze. Oproti aniontovým tenzidům jsou více toxické a méně biologicky rozložitelné. Jsou nestále v alkalickém prostředí, proto je jejich využití nejlepší v kyselém a neutrálním prostředí. Typickým příkladem kationtového tenzidu jsou kvartérní amoniové soli od vyšších jednosytných alkoholů nebo halogenkarboxylových kyselin [42, 44, 45, 48].



Obrázek 13: Schéma kationtových tenzidu [49]

1.3.2 Neiontové tenzidy

Neiontové tenzidy jsou dnes velmi rozšířená skupina povrchově aktivních látek. Nedisociují ve vodě, a tak jejich účinnost není ovlivněna pH. Jejich dobrá rozpustnost ve vodě je způsobena absencí náboje v molekule a také na funkčních skupinách s vysokou afinitou k vodě, jako jsou například hydroxylové, amino, nebo etherové skupiny. Neiontové tenzidy jsou netoxické a snadno biologicky odbouratelné, proto je jejich použití především v textilním průmyslu, kosmetice nebo potravinářství. Typickými podskupinami neiontových tenzidů jsou například deriváty polyglycerolů, polyoxyethylenované tenzidy, tenzidy na bázi oxidů, tenzidy s aminovým či amidickým můstkem, a jiné. Průmyslová výroba neiontových tenzidů vychází především z vyšších alkoholů, alkylfenolů a mastných kyselin, které reakcí s oxiranem produkují alkylpolyglykoethery, acylpolyglykoethery a alkylfenol-polyglykoethery [42, 44, 45, 50, 51].

1.4 Analýza neiontových tenzidů pomocí HPLC

Produkty neiontových tenzidů, převážně pak polyoxyethylenovaných tenzidů, jsou látky velmi používané již mnoho let. Jsou tvořeny molekulami s dlouhým řetězcem s hydrofilními i lipofilními vlastnostmi a jsou netěkavé. To velmi komplikuje analýzu pomocí plynové chromatografie.

V minulosti byly učiněny pokusy s tenkovrstvou i plynovou chromatografií, avšak nebyly příliš úspěšné [52-55]. Proto bylo k separaci těchto látek použití HPLC nejvíce výhodné. V roce 1975 Nakamuro a Matsumoto přišli s analýzou oxyethylenovaných oligomerů derivatizovaných acetylací, které mohou být separovány pomocí HPLC jako deriváty acetátu [56]. Na to navázal v roce 1980 Nozawa, když použil 3,5-dinitrobenzoyl chlorid pro derivatizaci mastných alkoholů s průměrným množstvím 2-7 EO jednotek, s vidinou zlepšení detekce a separace, protože tato derivatizace snižuje hydrofilní charakter molekuly [57]. Allen a Linder použili deriváty fenylisokyanátu ve spojení s UV detekcí pro separaci alkohol ethoxylátů s délkou uhlíkového řetězce C12-C18 [58]. V roce 1984 přišli jako první Aserin, Frenkel a Garti s HPLC metodou pro separaci alkoholů s 1-30 EO jednotkami bez potřeby derivatizace [59].

Alkylpolyoxyethylenované tenzidy se vyskytují jako směs různých uhlovodíkových řetězců, kombinované se směsí různého počtu EO jednotek. Předešlá studie mastných alkoholů prokázala, že HPLC s normální fází na silikagelu či -NH₂ nebo -CN modifikovaném silikagelu je schopna separovat některé tyto ethoxyláty mastných alkoholů na základě délky jejich ethoxylového řetězce [60, 61]. Avšak použití HPLC s obrácenými fázemi a mobilní fází methanol/voda může ovlivnit separaci většiny neiontových tenzidů na základě délky jejich alkylového řetězce. Každý pík poté představuje jednu délku alkylového řetězce a celou distribuci délky ethoxylového řetězce [62, 63].

Na základě těchto poznatků byla optimalizována metoda pro analýzu alkohol ethoxylátů na koloně C18 s použitím acetonitril/methanol/voda/kyselina octová jako mobilní fáze k docílení separace jak dle délky alkylového řetězce, tak dle délky ethoxylového řetězce najednou při jedné HPLC analýze. Jelikož alkohol ethoxyláty neobsahují chromoforní skupinu a nejsou tak detekovatelné v hojně používaném UV/VIS detektoru, je nutné využití jiných způsobů detekce. Velmi vhodné jak pro detekci, tak i pro následnou identifikaci složení látky je hmotnostní spektrometrie s využitím ionizace

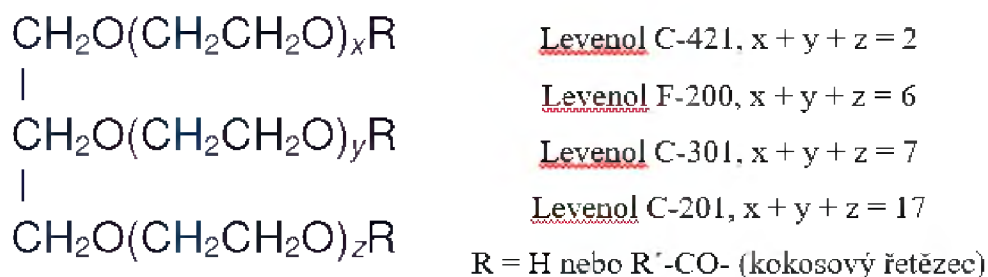
elektrosprejem. Jako další detekce při RP-LC je možno využít rozptylový detektor nebo refraktometrický detektor [64-66].

1.5 Neiontové tenzidy LEVENOL®

Firma Kao Chemicals Europa přišla na trh se s neiontovými tenzidy s obchodním názvem Levenol®. Ten je vyráběn zpracováním glycerolu, který je vedlejším produktem při zpracování tuků a olejů, v tomto případně z oleje kokosového. Po chemické stránce se jedná o polyoxyethylenestery, tj. látky které mají různý stupeň oxyethylenace. Na obrázku 14 je znázorněno obecné schéma jejich struktury. Firma Kao Chemicals Europa však bohužel na svých stránkách neuvádí více informací než jen předpokládané struktury.

Produktová řada Levenol® se vyznačuje ekologickými a toxikologickými výhodami v porovnání s ostatními neiontovými tenzidy, a to i ve 100 % koncentracích a tím je velice vhodná pro ekologické detergenty. Dále vykazují další výhody jako je vysoká senzitivita ke kůži, zůstává kapalný i za nízkých teplot a ve finálních produktech je hydrotropní.

Představuje tak novou generaci takzvaných zelených produktů, díky nízké emisi CO₂, nízké spotřebě vody a energií při výrobě v porovnání s jinými typickými neiontovými tenzidy s podobnou účinností [67, 68].



Obrázek 14: Předpokládané schéma struktury neiontových tenzidů Levenol® [67]

Levenol® C-421, chemicky polyoxyetylen (2) mono- a di- glycerid, je mírný neiontový tenzid s dobrými pěnivými a zahušťovacími vlastnostmi a detoxikačním efektem. Využívá se jako náhrada alkylpolyglykosidických (APG) či amidických detergentů v tekutých pracích prostředcích [69].

Levenol® F-200, chemicky polyoxyetylen (6) mono- a di- glycerid, je považován za nejvíce všestranný a nejúčinnější z řady Levenol®. Má perfektní hydrotropní vlastnosti, které umožňují redukci nebo dokonce i eliminaci rozpouštědel (ethylalkohol, glykoly, aj.) z konečného produktu. Jeho další výhodou je schopnost detergentce i za teploty 15 °C, což je efektivní pro čištění za nízkých teplot. Dále má změkčující schopnosti na látky, díky derivátům esterů a glycerinu. Z toho plyne pro tento tenzid pojmenování „softergent“ (z angl. detergent a softener), kdy dochází ke spojení detergentce a změkčování v rámci jedné sloučeniny a tím se minimalizuje časová a energetická náročnost použití a také se snižuje spotřeba samotného produktu [68].

Levenol® C-301, chemicky polyoxyetylen (7) mono- a di- glycerid, má ekologické a toxikologické výhody oproti ostatním neiontovým tenzidům a má nízkou pěnivost. Využívá se do tekutých čisticích prostředků pro silné znečištění, nebo jako čistič tvrdých povrchů [70].

Levenol® C-201, chemicky polyoxyetylen (17) mono- a di- glycerid, má stejně jako Levenol® C-301 ekologické a toxikologické výhody oproti ostatním neiontovým tenzidům (ethoxylované mastné alkoholy) s nízkou pěnivostí. Využívá se jako čistič tvrdých povrchů, jako přídatek do pracích prostředků či do tekutých nebo práškových čisticích prostředků pro silné znečištění [71].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Chemikálie

Pro mobilní fázi v kapalinové chromatografii byl použit acetonitril (Honeywell, Německo), pro HILIC systém byl využit octan amonný (Sigma-Aldrich, Nizozemí), mravenčan amonný (Sigma-Aldrich, Nizozemí) a kyselina octová (Sigma-Aldrich, Nizozemí). Voda pro ředění mobilních fází byla čištěna pomocí Milli-Q Reference System (MERCK, Německo).

Vzorky tenzidů pro analýzy Levenol[®] F-200, Levenol[®] C-421, Levenol[®] C-301 a Levenol[®] C-201 z produkce firmy Kao Chemicals (Barcelona, Španělsko) byly poskytnuty firmou Biesterfeld Silcom s.r.o. (Praha, Česká Republika).

2.2 Přístrojové vybavení

Výše zmíněné tenzidy byly analyzovány na kapalinovém chromatografu Shimadzu LC-20AB s šesticestným ventilem a dávkovací smyčkou 25 μ l (Shimadzu, Japonsko), dále na kapalinovém chromatografu s autosamplerem Agilent Technologies 1100 (Agilent Technologies, USA) ve spojení s refraktometrickým detektorem Shimadzu RID-10A (Shimadzu, Japonsko) a poté s rozptylovým detektorem Sedex 75 (Sedere, Francie). Hmotnostní spektra jednotlivých tenzidů byla měřena na hmotnostním spektrometru QTRAP 4500 (ABSCIEX, USA). Vzorky a mobilní fáze byly homogenizovány pomocí ultrazvukové lázně Fisherbrand FB15052 (Thermo Fisher Scientific, USA). K navažování chemikálií a vzorků byly použity analytické váhy AB204 (Mettler, Toledo). Dále byly v kapalinové chromatografii použity následující kolony:

1. Phenomenex, Luna[®] Omega 3 μ m PS C18 100 Å, 100 x 3.0 mm
2. Phenomenex, Kinetex[®] 2,6 μ m C18 100 Å, 100 x 2,1 mm
3. Phenomenex, Kinetex[®] 2,6 μ m Polar C18 100 Å, 150 x 3 mm
4. Phenomenex, Luna[®] 3 μ m HILIC 200 Å, 150 x 3 mm
5. Supelco Analytical, Ascentis[®] Express OH5 2,7 μ m, 100 x 4,6 mm

2.3 Příprava vzorků

Jelikož tenzidy Levenol[®] jsou velmi viskózní kapaliny a jsou pro analýzu potřeba pouze malé koncentrace, byl zvolen jako postup přípravy vzorku pomocí hmotnostních procent. Pro koncentraci 0,1 % bylo naváženo 1,5 mg vzorku Levenolu[®] a doplněno 1,5 ml ACN do 1,5 ml vialek. Stejným postupem byla připravena celá série koncentrací, 0,5 % (7,5 mg tenzidu / 1,5 ml ACN) a 1 % (15 mg tenzidu / 1,5 ml ACN). Takto byly připraveny vzorky rozpuštěné v acetonitrilu. Stejně byly připraveny i vzorky, které obsahovali 50 % H₂O + 50 % ACN a pro 100 % H₂O. S vodou způsobují Levenoly[®] mléčné zakalení, a tak pro měření na hmotnostním spektrometru byly používány pouze vzorky rozpuštěné v čistém acetonitrilu.

2.4 Pracovní postup pro HPLC a HPLC/MS

Analýza tenzidů byla prováděna jak v systému s obrácenými fázemi, tak i v systému HILIC. V případě detekce na refraktometrickém detektoru v RP systému byla použita kolona Luna[®] Omega 3 μm , pro detekci na rozptylovém detektoru byla navíc použita i kolona Kinetex[®] 2,6 μm a Kinetex[®] 2,6 μm Polar. Pro HILIC systém byly použity kolony Luna[®] 3 μm HILIC a Ascentis[®] Express OH5 2,7 μm .

Jako mobilní fáze pro RP systém byl použit acetonitril a destilovaná voda. Pro HILIC systém byl přidán navíc pufr octanu amonného v různých koncentracích (10 – 30 mM). Poměry mobilních fází se v průběhu optimalizace analýzy měnily a využívalo se gradientové eluce v případě použití rozptylového detektoru. Pro analýzu na refraktometrickém detektoru byla použita pouze izokratická eluce. Teploty kolony byly také součástí optimalizace a pohybovaly se v rozmezí od 20 °C do 55 °C.

Pro měření na hmotnostním spektrometru byly pro analýzu použity pouze vzorky rozpuštěné v čistém acetonitrilu. Byla měřena spektra nejdříve v RP systému s kolonou Kinetex[®] 2,6 μm Polar s průtokem 0,3 ml/min a dobou analýzy 120 min s gradientovou elucí od 20 – 100 % ACN, s následujícími parametry hmotnostního spektrometru: měření probíhalo v pozitivním režimu na lineární iontové pasti, 10 000 Da/s, dynamické plnění pasti, záznam spekter 50 – 1200 m/z, CUR 20 psi, teplota 200 °C, Gas1 40 psi, Gas2 50 psi,

ion spray napětí 4500 V, deklasterační potenciál 55 V, vstupní potenciál 10 V a kolizní energie 10 V.

Následně byly vzorky měřeny také i v HILIC systému za použití kolony Ascentis® Express OH5 2,7 μm s průtokem 0,25 ml/min a dobou analýzy 40 min s izokratickou elucí 100 % ACN s 10 mM pufrům octanu amonného. Parametry hmotnostního spektrometru byly: měření v pozitivním režimu na lineární iontové pasti, 10 000 Da/s, dynamické plnění pasti, záznam spekter 50 –1500 m/z, CUR 20 psi, teplota 200 °C, Gas1 40 psi, Gas2 50 psi, ion spray napětí 4500 V, deklasterační potenciál 55 V, vstupní potenciál 10 V a kolizní energie 10 V.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Náplní této práce bylo vypracovat a optimalizovat vhodnou analytickou metodu pro separaci a identifikaci tenzidů obchodní značky Levenol[®] F-200, Levenol[®] C-421, Levenol[®] C-301 a Levenol[®] C-201. Cílem bylo zjistit hlavní zastoupení počtu oxyethylenových jednotek, délku a množství navázaných kokoátových řetězců pomocí kapalinové chromatografie v následném spojení s hmotnostním spektrometrem. Z důvodu absence chromoforu nebylo možné použití UV/VIS detektoru, a tak bylo nutné využít jiných detektorů, v tomto případě refraktometrického a rozptylového detektoru.

Hlavní důvod, proč byla analýza prováděna v režimech RP-LC a HILIC je ten, že při RP-LC se zadržují a separují látky nepolární v závislosti na délce jejich alkylového řetězce a přítomné EO jednotky nemají na separaci prakticky žádný vliv. U HILIC systému je tomu naopak a analyt se separuje podle množství oxyethylenových jednotek.

Při separaci v systému s obrácenými fázemi se hledaly optimální podmínky separace jako je teplota, složení mobilní fáze a analytická kolona, aby došlo k rozdělení látek dle nepolární složky ve vzorku, v tomto případě podle délky alkylového řetězce kokoátu. K tomu byl nejdříve využit refraktometrický detektor. Ten se však projevil jako nevhodný kvůli problémům silného zakalení tenzidů Levenol[®] i s malým množstvím vody a taky z důvodu nutnosti konstantních podmínek při analýze.

Jako druhý bych použít detektor rozptylový, kde došlo k výraznému zjednodušení a zlepšení podmínek analýzy. Byly testovány různé kolony, teploty i složení mobilní fáze. Jako finální a optimální podmínky separace byly po mnoha testech vybrány následující: separace v režimu RP-LC na koloně Kinetex[®] 2,6 μ m Polar C18 100 Å, 150 x 3 mm, s gradientovou elucí mobilní fáze acetonitril – destilovaná voda složené od 20 % ACN do 100 % ACN za dobou 120 min + 20 min ekvilibrace kolony a ustálení podmínek před další analýzou. Analýzy probíhaly při teplotě 55 °C na koloně a s průtokem MF 0,3 ml/min.

V HILIC separaci bylo cílem rozdělit vzorky dle polární složky, tudíž dle počtu oxyethylenových jednotek. Byly tak hledány optimální podmínky separace jako u RP-LC. Problémy nastaly hned u mobilní fáze, kde po několika neúspěšných pokusech bylo možné učinit závěr, že jakékoliv množství vody ve vzorku i v MF velice zhoršuje separaci. Zároveň i faktor teploty hrál významnou roli a oproti RP-LC bylo nutné volit teplotu výrazně nižší. Souběžně s tím byly zkoušeny dvě kolony a po mnoha pokusech byly nalezeny optimální podmínky separace pro HILIC systém: kolona Ascentis® Express OH5 2,7 μm, 100 x 4,6 mm, izokratická eluce mobilní fáze 100 % ACN s aditivem 10 mM octanu amonného s délkou analýzy 30 min + 10 min ekvilibrace kolony před další analýzou, průtokem MF 0,25 ml/min při teplotě 25 °C na koloně.

Po úspěšném nalezení optimálních podmínek separace byly obě metody aplikovány v hmotnostní spektrometrii, kde byla snaha identifikovat složení daných tenzidů Levenol®. Pro vyhodnocení spekter z hmotnostního spektrometru byla vytvořena tabulka monoizotopických molekulových hmotností (příklad tabulky znázorněn v Tabulce 2, celá tabulka dostupná v Přílohách, Tabulky P1 – P4), které závisí na délce alkylového řetězce a příslušných oxyethylenových jednotek. Tyto molekulové hmotnosti poté byly hledány v MS spektrech a byla snaha je přiřadit k naměřeným hodnotám. Některé kombinace jednoho navázaného kokoátového řetězce o určité délce a počtu EO odpovídaly v monoizotopické molekulární hmotnosti modifikovanému glycerolu s navázanými dvěma kokoátovými řetězci s nižší délkou řetězce nebo menším počtem EO. U těchto případů byla k zpřesnění identifikace využita retenční data. Případná možná diference hodnot v tabulce a hodnot nalezených ve spektrech do jedné jednotky byla brána jako správná hodnota. Tato diference může být způsobena průměrováním a zpracováním MS spekter.

Tabulka 2: Příklad tabulky *monoizotopických hodnot m/z pro molekulu tenzidu*

EtO	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Glycerol	92,0	136,1	180,1	224,1	268,2	312,2	356,2	400,2	444,3	488,3	532,3
1x kokoát C2	134,1	178,1	222,1	266,1	310,2	354,2	398,2	442,2	486,3	530,3	574,3
C3	148,1	192,1	236,1	280,2	324,2	368,2	412,2	456,3	500,3	544,3	588,3
C4	162,1	206,1	250,1	294,2	338,2	382,2	426,2	470,3	514,3	558,3	602,4
C5	176,1	220,1	264,2	308,2	352,2	396,2	440,3	484,3	528,3	572,3	616,4
C6	190,1	234,1	278,2	322,2	366,2	410,3	454,3	498,3	542,3	586,4	630,4
C7	204,1	248,2	292,2	336,2	380,2	424,3	468,3	512,3	556,3	600,4	644,4
C8	218,2	262,2	306,2	350,2	394,3	438,3	482,3	526,3	570,4	614,4	658,4
C9	232,2	276,2	320,2	364,2	408,3	452,3	496,3	540,4	584,4	628,4	672,4
C10	246,2	290,2	334,2	378,3	422,3	466,3	510,3	554,4	598,4	642,4	686,4

3.1 Separace pomocí kapalinové chromatografie

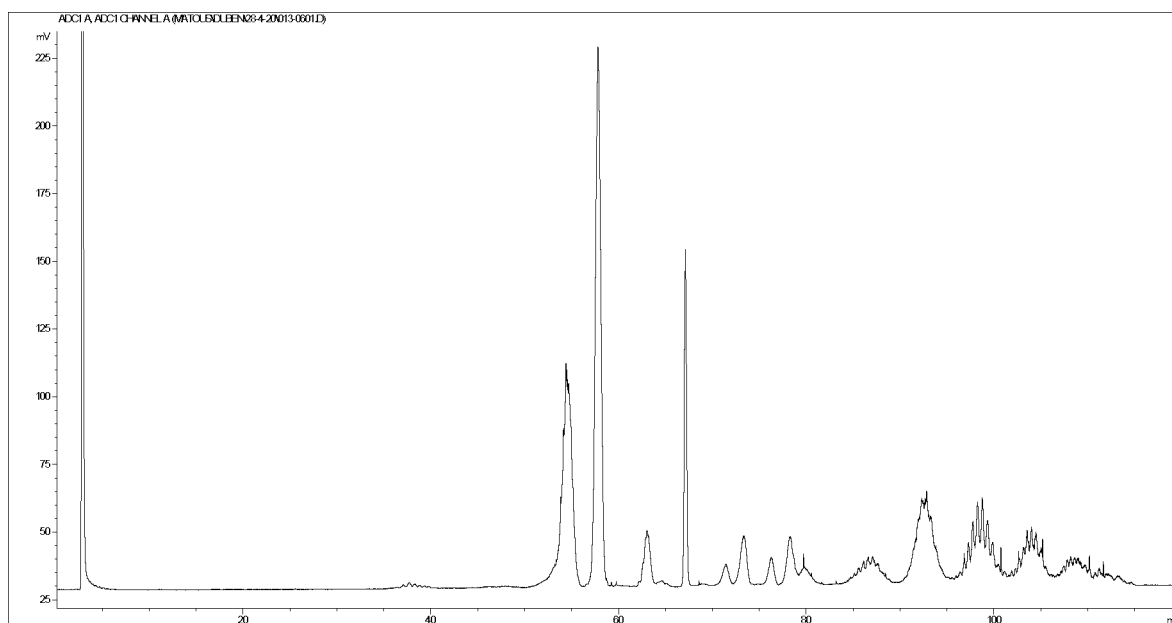
3.1.1 Separace v systému s obrácenými fázemi

Při analýze v RP-LC byl, díky absenci chromoforu v neiontových tenzidech Levenol®, zvolen jako první detektor refraktometrický (Shimadzu, RID-10A) ve spojení s kapalinovým chromatografem Shimadzu LC-20AB (Shimadzu, Japonsko) s ručním dávkováním pomocí šesticestného ventilu s dávkovací smyčkou 25 μ l. Jednotlivá měření sloužila pro zjištění ideální teploty a kolony pro další analýzy. Jelikož je refraktometrický detektor vysoce citlivý na jakékoliv změny v průběhu analýzy, nebylo možné použít gradientovou eluci. Jako první byla zvolena kolona Luna® Omega 3 μ m PS C18, a byly na ní proměřeny všechny vzorky o hmotnostních koncentracích 1 %, 0,5 % a 0,1 % (m/m) rozpuštěné ve 100 % ACN, 100 % H₂O a 50 % ACN + 50 % H₂O (v/v). Průtok byl nastaven na 0,3 ml/min a byl pro všechny analýzy neměnný. Všechny vzorky byly analyzovány pro zjištění optimální teploty pro separaci od 40 °C do 55 °C na koloně. Mobilní fáze pro izokratické měření byla použita v koncentracích acetonitril – voda: 95 %, 90 %, 85 %, 80 % acetonitrilu (v/v).

Výsledkem měření bylo zjištění, že optimální teplota pro měření na RP-LC s refraktometrickým detektorem je 50 °C na koloně (ukázkový záznam z měření jednoho z Levenolu® je uveden v obr. P1 v přílohách). Avšak nastal zde velký problém ve složení mobilní fáze a rozpouštědla vzorku. Tenzidy Levenol® se velmi intenzivně zakalují i s malým množstvím vody, a tak nelze připravit referenční celu refraktometrického detektoru tak, aby toto zakalení dokázal kompenzovat. Proto byly další separace prováděny s rozptylovým detektorem (Sedere, Sedex 75).

Použití rozptylového detektoru přineslo řadu zlepšení. Nejvýznamnější pro optimalizaci byla možnost použití gradientové eluce. Na detektoru byl po celou dobu měření tlak dusíku 3,0 bar, teplota v detekční cele 45 °C a průtok MF 0,3 ml/min. Prvotní, stejnou jako u refraktometrického měření, analýzou všech vzorků bylo zjištěno, že ideální koncentrace vzorků Levenol® je 0,1 % (m/m) při dávkování 25 μ l, a že pro izokratickou eluci nejlépe vychází složení mobilní fáze acetonitril – destilovaná voda 80 % (v/v) při teplotě 55 °C na koloně (Obr. P2). Aby bylo dosaženo optimálních výsledků, bylo nutné použít kapalinový chromatograf s autosamplerem, k dosažení jednotných analýz, a i menšího dávkovaného objemu a díky tomu i vyšších koncentrací. Pro tyto analýzy byl

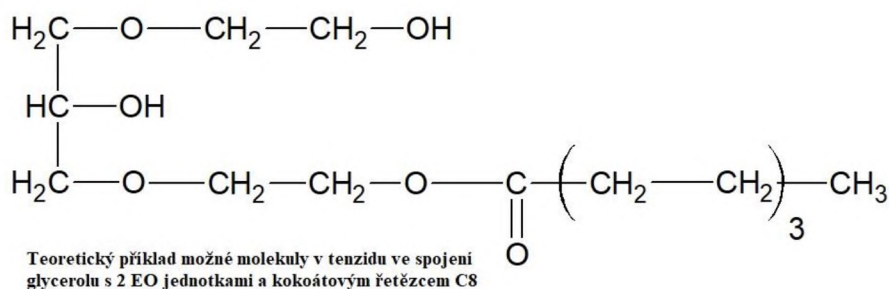
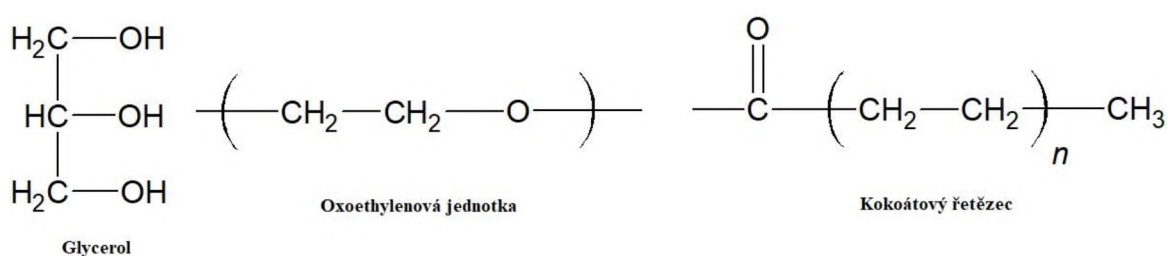
zvolen kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, USA). Jelikož odezvy vzorků byly různé, tak bylo nutné upravit dávkování, aby bylo dosaženo optimálních výsledků při stejné koncentraci vzorků. Pro Levenol® F-200 a Levenol® C-201 bylo dávkování 5 μ l, a pro Levenol® C-301 a Levenol® C-421 bylo dávkování sníženo na 2 μ l. Následně bylo využito gradientové eluce a byla zjištěna optimální koncentrace MF 20 % - 100 % ACN za dobu 120 min při teplotě 55 °C. Ukázka chromatogramu jednoho vzorku je zobrazena na obr. 15. Ostatní vzorky jsou zobrazeny v přílohách obr. P3 – P6). Z profilu píků na chromatogramech je patrné, že pro nižší homology analyzovaných tenzidů (kratší kokoátové řetězce, nižší retence) dělení podle počtu EO jednotek pozorováno nebylo a na záznamu je u těchto píků hladká obalová křivka. Pro více zadržované homology bylo pozorováno částečné dělení EO jednotek (látky eluující od 80. min dále na obr. 15). Po zjištění optimálních podmínek pro separaci bylo možné využít hmotnostní spektrometrie, kde byly použity stejné podmínky pro analýzu.



Obrázek 15: Záznam měření Levenol® C-201, dávkování 5 μ l na koloně Kinetex® 2,6 μ m Polar; dávkování 5 μ l, MF 20 % - 100 % ACN / 120 min při teplotě 55 °C a průtokem 0,3 ml/min.

Aby mohly být identifikovány píky směsi na chromatogramech zaznamenaných pomocí rozptylového detektoru, byly vzorky analyzovány rovněž pomocí spojení LC/MS. Vyhodnocení dat z hmotnostního spektrometru probíhalo pomocí vytvořené tabulky monoizotopických hmot (Tabulka 2), kde byla snaha nalézt určité hmoty v naměřených

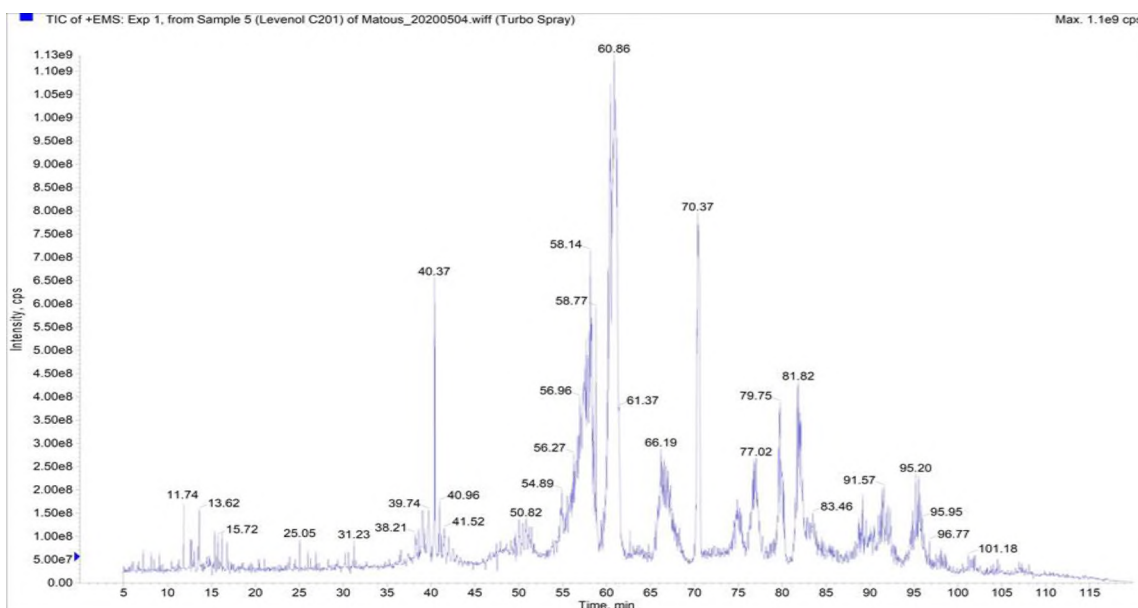
spektrech a následně určit, co a v jakém počtu je v daném vzorku obsaženo. Výpočet monoizotopických hmot vycházel z molekulové hmotnosti glycerolu ($C_3H_8O_3$; $M_w = 92,0473$ g/mol) ke kterému byla, vždy po jedné, připočtena oxyethylenová jednotka (CH_2CH_2O - ; $M_w = 44,0262$ g/mol). Následně bylo nutné do tabulky zahrnout kokoátový řetězec (tj. koncovou methylovou skupinu CH_3 - a karbonyl $C=O$; $M_w = 43,0184$ g/mol) a methylenové skupiny tvořící vlastní délku alkylového řetězce ($-CH_2CH_2-$; $M_w = 28,0313$ g/mol) a nakonec odečíst molekulovou hmotnost jednoho atomu vodíku (H ; $M_w = 1,0078$ g/mol), případně dvou atomů, v případě dvou navázaných kokoátových řetězců. Jednotlivá schémata vzorců jsou znázorněna na obr. 16.



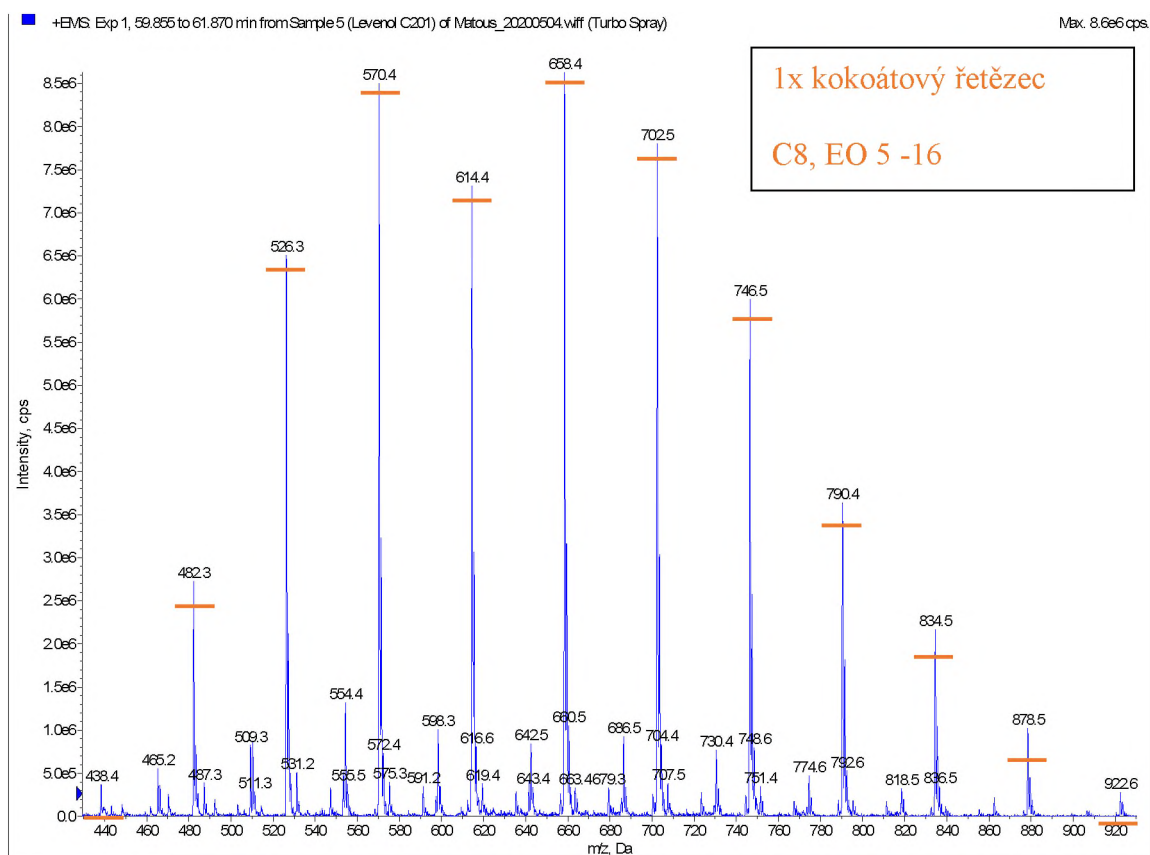
Obrázek 16: Schéma vzorců ke stanovení monoizotopických hmotností tenzidů Levenol®

Sestavením těchto částí vznikly tabulky monoizotopických hmotností (Tabulky P1 – P4). Následně byly tyto hmotnosti, respektive jejich protonovaná forma odpovídající protonované molekule $[M+H]^+$, hledány v hmotnostních spektrech a byly hledány jisté posloupnosti a spojitosti mezi určitými hmotnostmi. Pro přiřazení hmotností byly použity pouze spektra ze záznamu pozitivních iontů. Jelikož bylo získáno velice mnoho dat byl pro ukázkou vybrán jeden z Levenolu® (Levenol® C-201) a na něm je názorně ukázán princip vyhodnocení výsledků. Všechny ostatní Levenoly® byly vyhodnocovány naprosto stejným způsobem a v diplomové práci jsou uvedeny pouze výsledky vyhodnocení.

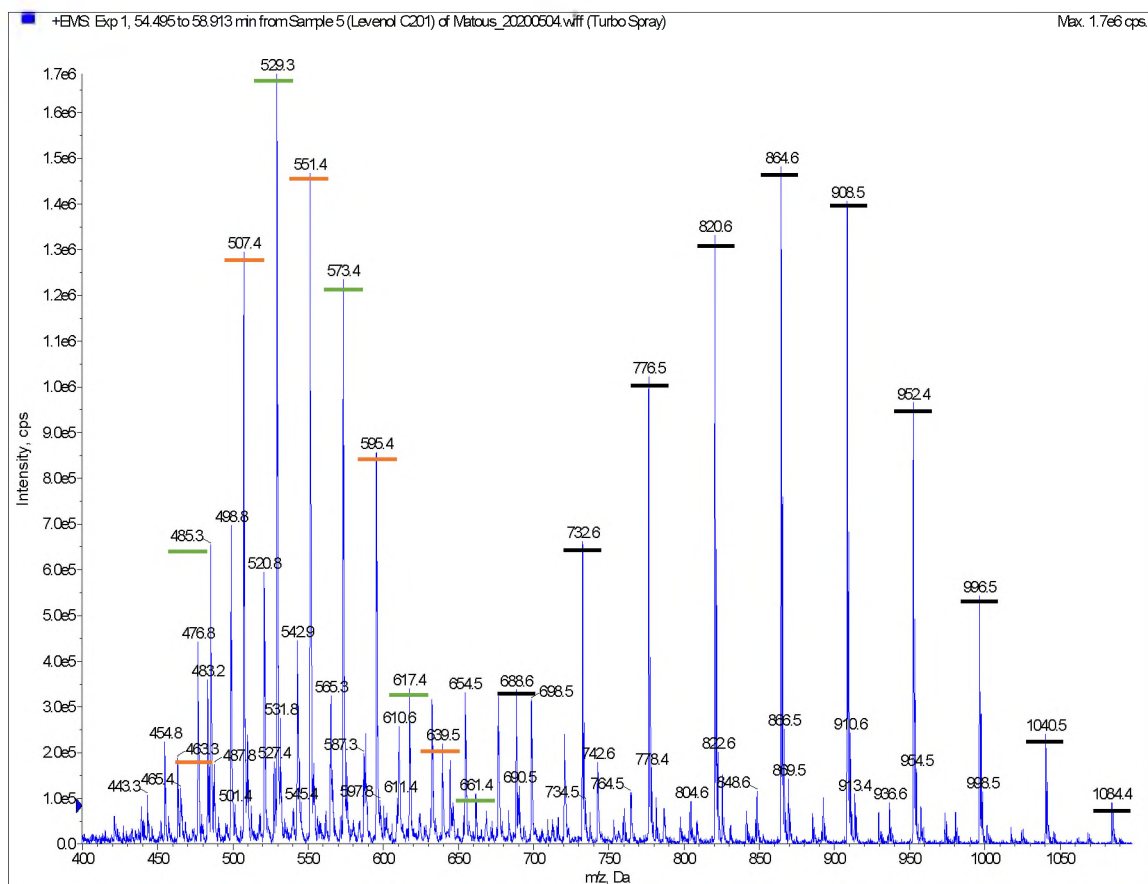
Na obrázku 17 je zobrazen celkový iontový proud ze záznamu kladných iontů, na kterém je vidět dostatečná separace jednotlivých složek. U jednotlivých piků byly poté zjišťovány hodnoty m/z a hledány v tabulce monoizotopických hmotností.



Obrázek 17: Celkový iontový proud vzorku Levenol® C-201; dávkování 5 µl, kolona Kinetex® 2,6 µm Polar, MF 20 % - 100 % ACN / 120 min, teplota 55 °C, průtok 0,3 ml/min



Obrázek 18: Spektrum tenzidu Levenol® C-201, v čase 60 - 62 min; dávkování 5 µl, kolona Kinetex® 2,6 µm Polar, MF 20 % - 100 % ACN / 120 min, teplota 55 °C, průtok 0,3 ml/min



Obrázek 19: Spektrum tenzidu Levenol® C-201, v čase 56 - 59 min; dávkování 5 μ l, kolona Kinetex® 2,6 μ m Polar, MF 20 % - 100 % ACN / 120 min, teplota 55 $^{\circ}$ C, průtok 0,3 ml/min

1x kokoátový řetězec, C7, EO 11 – 20

1x kokoátový řetězec, C5, EO 7 – 11

1x kokoátový řetězec, C29, EO 4 – 13

1x kokoátový řetězec, C27, EO 0 – 4

2x kokoátový řetězec, C14, EO 4 – 13

2x kokoátový řetězec, C2, EO 7 – 11

1x kokoátový řetězec, C16 EO 3 – 7

Na příkladech na obrázku 18 je zobrazeno ukázkové přiřazení nalezených monoizotopických hmotností nalezených v čase 60 – 62 min. Je zde velmi dobře vidět jedna, nejintenzivnější posloupná řada, která byla díky tabulce monoizotopických hmotností identifikována jako molekula odpovídající modifikovanému glycerolu s jedním navázaným kokoátovým řetězcem s délkou alkylového řetězce C8 a množstvím EO jednotek od 5 do 16. Diference mezi zaznamenanými signály odpovídají jedné oxyethylenové jednotce

o $\Delta m/z = 44$. Tato nalezená informace souhlasí s informací od výrobce, který uvádí že u toho tenzidu Levenol® C-201 by se mělo průměrně nacházet 17 EO jednotek.

Na obrázku 19 je komplikovanější spektrum nalezené v čase 56 – 59 min. Jsou zde vidět tři posloupné řady o diferenci $\Delta m/z = 44$, což je hodnota, která byla primárně hledána. Zde nastává problém, který dělal problém i v interpretaci ostatních vzorků. Jednotlivé monoizotopické hmotnosti se v tabulce občas opakují a tím formálně odpovídají nalezené hmotnosti více výsledkům.

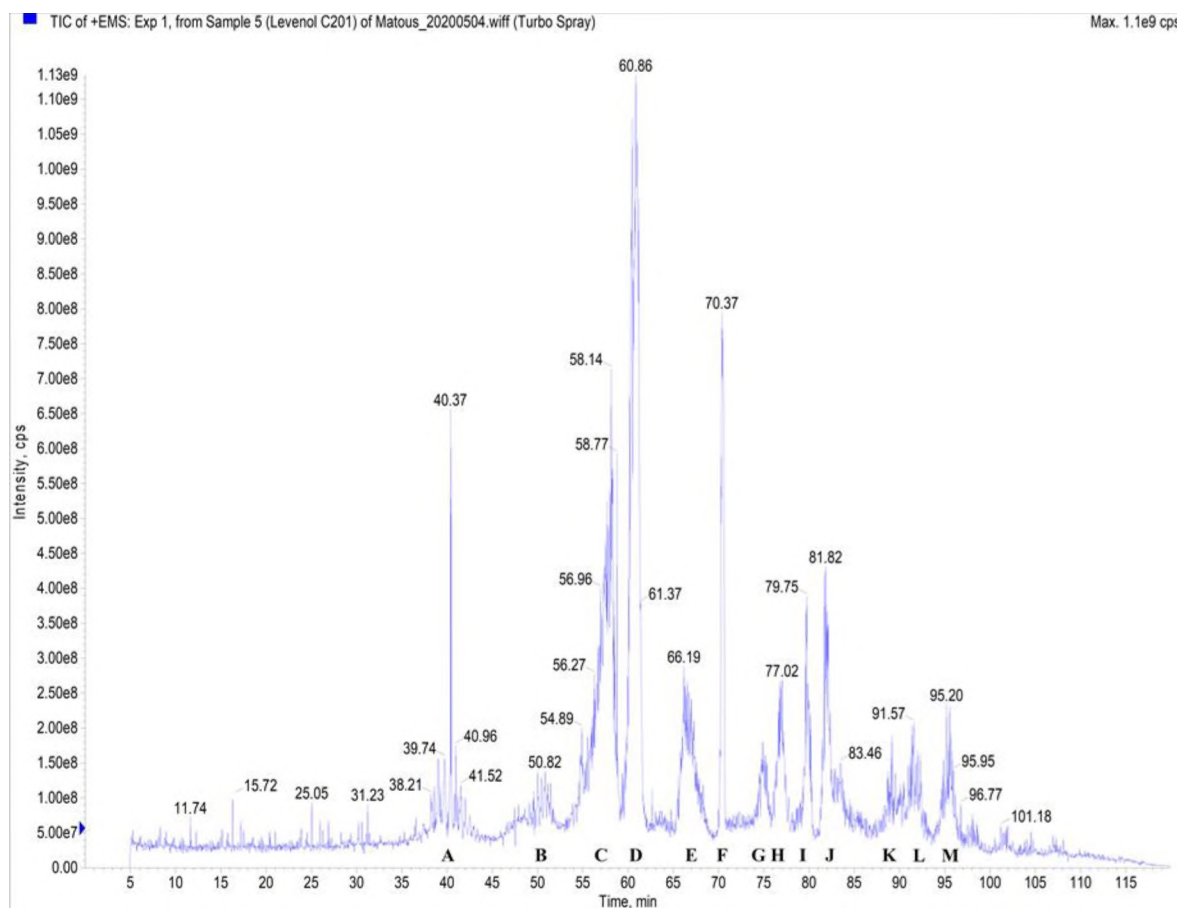
Posloupnost podtrhnutá černě odpovídá modifikovanému glycerolu jak s jedním navázaným kokoátovým řetězcem s délkou alkylového řetězce C7 a množstvím EO jednotek od 11 do 20, jednomu navázanému kokoátovému řetězci s délkou alkylového řetězce C29 a množstvím EO jednotek od 4 do 13, tak ale i se dvěma navázanými kokoátovými řetězci s délkou alkylového řetězce C14 a množstvím EO jednotek od 4 do 13. Jelikož je velice nepravděpodobné, že by tyto hodnoty odpovídaly všem třem výsledkům najednou, bylo nutné logickou úvahou vybrat ten výsledek, který by měl odpovídat údajům, které jsou dány od výrobce a to, že průměrné množství EO jednotek v tomto daném tenzidu je 17. S touto informací je vysoce pravděpodobné, že tato řada monoizotopických hmot odpovídá glycerolu s jedním kokoátovým řetězcem C7 a 17 EO.

U zeleně podtrhnuté řady m/z lze stejnou logickou úvahou vyřadit pouze výsledek s jedním kokoátovým řetězcem C27 a EO 0 – 4. U ostatních dvou výsledků není bohužel možné pouze na základě MS spektra určit, který z nich je správný, v teoretické úrovni jsou správné oba. U oranžové řady je výsledek jednoznačný.

Tímto vyhodnocením byl získán výsledek, že tedy tento separovaný pík v čase 56 – 59 min obsahuje 1x, C7, EO 11 – 20; 1x, C5, EO 7 – 11; 2x, C2, EO 7 – 11 nebo 1x, C16, EO 3 – 7. Na základě interpretace dat a s přihlédnutím k informacím od výrobce by se dalo určit, že tento pík odpovídá primárně modifikovanému glycerolu s jedním navázaným kokoátovým řetězcem s délkou alkylového řetězce C7 a množstvím EO jednotek od 11 do 20. Tento výsledek také koresponduje se separací celého vzorku, kdy se v RP-LC separují jednotlivé píky dle délky alkylového řetězce od nejkratší po nejdelší, jak je zobrazeno na spektru obrázku 20.

Tímto postupem byl vyhodnocován každý pík každého vzorku a na konci zaneseny výsledky do spektra celkového iontového proudu jednotlivých vzorků. Pro nedostatek prostoru v rámci diplomové práce jsou uvedena v přílohách spektra s vyhodnocením

a výsledky pouze od jednoho vzorku (Levenol® C-201). Pro ostatní vzorky (Levenol® F-200, Levenol® C-301 a Levenol® C-421) jsou do výsledků uvedena pouze zpracovaná a vyhodnocená spektra celkového iontového proudu pro jednotlivé vzorky.



- A: 1x, C3, EO 14 - 21 / 1x, C4, EO 6 - 14
 B: 1x, C5, EO 13 - 20 / 1x, C6, EO 8 - 14 / 2x, C2, EO 13 - 20 / 2x, C3, EO 5 - 14
 C: 1x, C7, EO 11 - 20 / 2x, C2 EO 7 - 10
 D: 1x, C8, EO 5 - 16
 E: 1x, C9, EO 11 - 21 / 2x, C3, EO 11 - 21
 F: 1x, C10, EO 5 - 17 / 2x, C5, EO 5 - 17
 G: 1x, C11, EO 9 - 20 / 2x, C9, EO 4 - 8
 H: 1x, C8, EO 7 - 11 / 1x, C16, EO 10 - 19 / 2x, C19, EO 3 - 12
 I: 1x, C12, EO 5 - 16
 J: 1x, C17, EO 4 - 14 / 2x, C8, EO 4 - 14
 K: 1x, C17, EO 9 - 11 / 2x, C4, EO 8 - 11
 L: 1x, C11, EO 8 - 13 / 1x, C22, EO 5 - 10 / 2x, C11, EO 5 - 10 / 2x, C16, EO 2 - 6
 M: 1x, C21, EO 4 - 12 / 2x, C10, EO 7 - 14

Popis:

Označení píku: počet kokoátových řetězců, délka kokoátového řetězce, množství oxoethylenovaných jednotek

Obrázek 20: Vyhodnocení MS spektra vzorku Levenol® C-201; dávkování 5 µl, kolona Kinetex® 2,6 µm Polar, MF 20 % - 100 % ACN / 120 min, teplota 55 °C, průtok 0,3 ml/min

Kompletně vyhodnocené MS spektrum vzorku Levenol® C-201 analyzovaného v systému RP-LC je zobrazeno na obrázku 20. Je zde vidět separace 13ti píků,

a také problematika vícečetných výsledků. Jednotlivá MS spektra monoizotopických hmot pro jednotlivé píky byla vyhodnocena a logickou úvahou byly do výsledků vybrány molekuly, které jsou zapsány v obrázku 20 a to pouze ty, které korespondují s průměrným počtem EO jednotek uváděné od výrobce a také s posloupností separace. Ta odpovídá charakteru a podstatě RP-LC, kdy se separace je založena na retenci nepolární části molekuly v koloně, a tak se vzorek dělí podle délky alkylového řetězce (na základě methylenové selektivity). Tyto dvě podstaty poskytly dohromady výsledek pro separaci Levenolu® C-201.

Na záznamu je vidět separace glycerolu s délkou alkylového řetězce jednoho kokoátu C3 se 14 – 21 EO (pík A), až po píku M, kde je na konci separován jeden kokoátový řetězec o délce C21 s EO 4 -12. Samozřejmě je možné i navázání více kokoátových řetězců na molekulu glycerolu. To, jak jsou prostorově orientovány se nám pomocí LC/MS nepodařilo určit. Podařilo se však určit, že v žádném vzorku se nenacházely více než dva kokoátové řetězce najednou. U vzorku Levenol® C-201 je viditelná separace dvou kokoátových řetězců o délce C2 a EO 13 – 20 v píku B, až po C16, EO 2 – 6 u píku L. U těchto dvojnásobných řetězců není tak jednoznačná posloupnost v separaci, ale určitý trend v prodlužující se délce retence je patrný.

Naměřená spektra molekulových hmotností pro Levenol® C-201 jsou uvedena v přílohách pod obrázkem P7 – P19. Naprosto stejným způsobem byly identifikovány i ostatní vzorky, jejichž výsledky jsou zobrazeny na obr. P20 – P22 v přílohách.

3.1.2 Separace v HILIC systému

Jelikož se v RP-LC námi analyzované tenzidy separují primárně podle délky alkylového řetězce přítomného kokoátu, bylo nutné provést analýzu i v jiném systému, který dokáže analyt separovat podle počtu přítomných oxyethylenových jednotek. Proměřením vzorků při různých teplotách (20 °C – 45 °C) bylo zjištěno, že optimální teplota na koloně pro měření v HILIC systému je 25 °C. Vyšší teploty nejsou příliš vhodné, protože retence analytu na HILIC kolonách není příliš velká, a tak je nutné retenci spíše zvýšit. Ke zjištění optimálního dávkování bylo vyzkoušeno několik různých objemů (0,5 µl – 5µl). Jako nejlepší vyšlo dávkování 0,5 µl. U vyšších objemů docházelo k dosažení limitů detektoru.

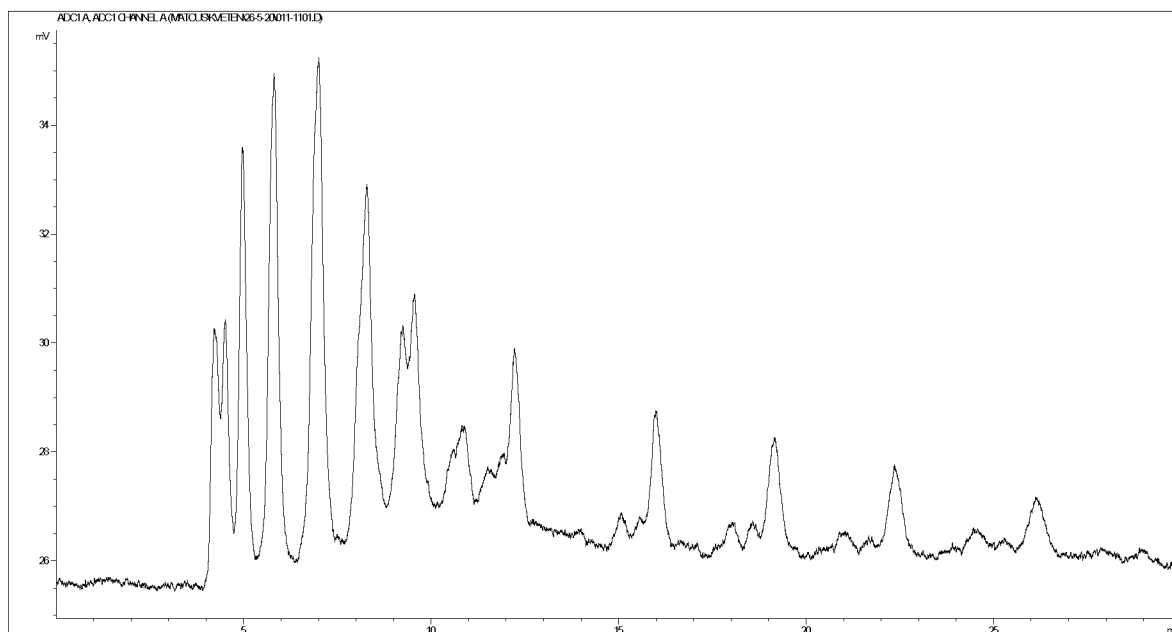
Jako první byla využita kolona Luna® 3 µm HILIC a upravena mobilní fáze 0,2 % (v/v) kyselinou octovou, která byla přidána jak do acetonitrilu, tak i do destilované vody. Poté probíhala analýza gradientovou elucí začínající na 99 % ACN po dobu 5 min a s následným klesáním až na 50 % ACN po dobu 120 min pro teploty 25 °C – 45 °C (vzorové záznamy z měření jsou dostupné v přílohách, Obr. P23 a P24) s dávkováním 1 µl. Sice se jako nejlepší pro separaci projevila teplota 25 °C, ale obecně analýzy nebyly úplně úspěšné a bylo nutné změnit kyselinu octovou za octan amonný nebo mravenčan amonný. Z obou pufrů byla namíchána MF acetonitril – destilovaná voda s koncentrací 30 mM pufru. Separace byly prakticky stejné, ale oba pufrы jsou špatně rozpustné v ACN, a tak byl následně zvolen octan amonný jako nejvhodnější pro přípravu MF s vysokým podílem ACN převážně kvůli nižším problémům s rozpustností. Díky naměřeným datům bylo zjištěno, že ideální teplota pro analýzu v systému HILIC je 25 °C (Obr. P25, P26). Ani po změně MF se separace na koloně Luna HILIC příliš nezlepšila, proto byla pro další analýzy zvolena nová kolona Ascentis® Express OH5.

Díky této koloně bylo možné snížit čas analýzy až na 30 min. První analýza byla provedena s mobilní fází složenou z 97 % ACN a 3 % H₂O (v/v) a přídavkem 20 mM octanu amonného. Průtok MF byl nastaven na 0,5 ml/min, čas analýzy byl 60 min s 20 min ekvilibrací a dávkováno bylo 0,5 µl 1 % (m/m) vzorku rozpuštěného v 100 % ACN, 100 % H₂O a 50 % ACN + 50 % H₂O (Obr. P27).

Jelikož toto nastavení nebylo ideální, byla zvolena izokratická eluce s MF složenou z 99 % ACN a 1 % H₂O (v/v) s přídavkem 10 mM octanu amonného. Ta byla zvolena z důvodu, že při poměru 99:1 nastávají problémy s čerpadlem a nedostatečným promícháním MF vstupující do kolony. Proto bylo izokratické řešení lepší a efektivnější volbou. Průtok byl snížen na polovinu, tedy na 250 µl/min. S tímto novým poměrem mobilní fáze došlo k výraznému zlepšení separace díky klesajícímu množství vody v MF (Obr. P28 – P31). Dále bylo zjištěno, že pro toto nastavení stačí ke kompletní separaci pouze polovina původního času, tedy 30 minut a 10 minut ekvilibrací. Následně byly proměřeny i ostatní vzorky rozpuštěné ve 100 % H₂O a 50 % ACN + 50 % H₂O. Porovnání jejich separace oproti 100 % ACN jsou znázorněny na Obr. P32 – P35. Z tohoto srovnání vyplývá, že pro další analýzy byly použity výhradně vzorky rozpuštěné ve 100 % ACN, jelikož jakákoliv přítomnost vody, ať už v MF nebo ve vzorku zhoršuje poměrně výrazně separaci.

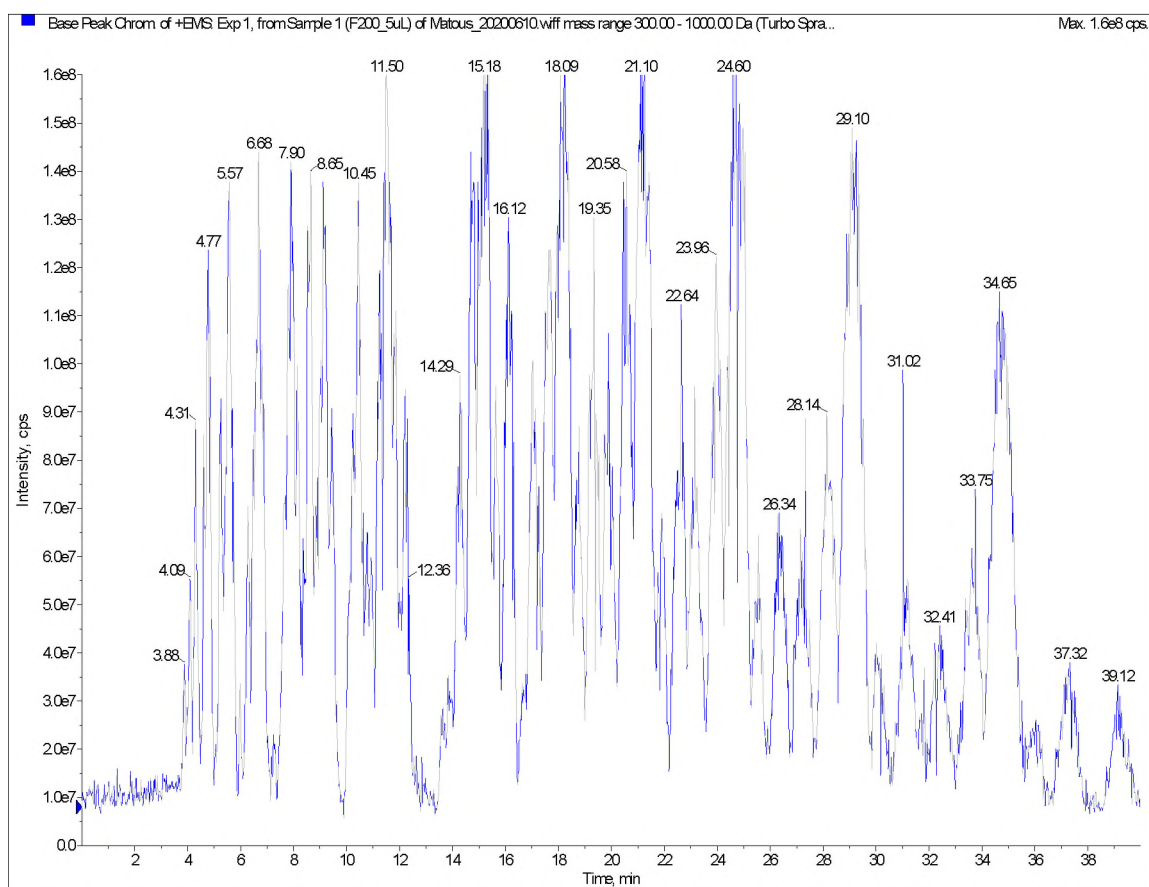
Po tomto zjištění byla také opět testována kolona Luna® 3 µm HILIC pro ověření, zda bude separace lepší či horší vůči koloně Ascentis® Express OH5. Analýza proběhla za naprosto identických podmínek, avšak separace se nezlepšila, tudíž byla kolona Ascentis® Express OH5 vyhodnocena jako ideální pro analýzu těchto tenzidů a následně byla použita i v LC/MS (Obr. P36 – P39).

V návaznosti na zjištění, že mobilní fáze s 99 % ACN byla lepší než 97 % ACN, byla vyzkoušena i MF se 100 % ACN s 10 mM octanem amonným. Zde však nastal problém s rozpustností octanu. I 1 % (v/v) destilované vody stačilo na dostatečné rozpuštění octanu ve zbytku MF. Octan se velmi špatně rozpouští v čistém acetonitrilu (rozpuštění v ultrazvukové lázni po dobu nejméně 30 min). S touto novou MF 100 % ACN (v/v) s 10 mM octanem amonným byla provedena analýza se stejnými podmínkami jako v předchozí analýze (dávkování 0,5 µl, průtok 0,25 ml/min, doba analýzy 30 min + 10 min ekvilibrace). Výsledek byl dle předpokládané teorie správný a separace se velmi zlepšila. Toto finální nastavení separace bylo dále použito pro analýzu a identifikaci na hmotnostním spektrometru. Ukázková separace vzorku Levenol® F-200 je znázorněna na obr. 21. Ostatní vzorky jsou zobrazeny v přílohách jako obr. P40 – P42.

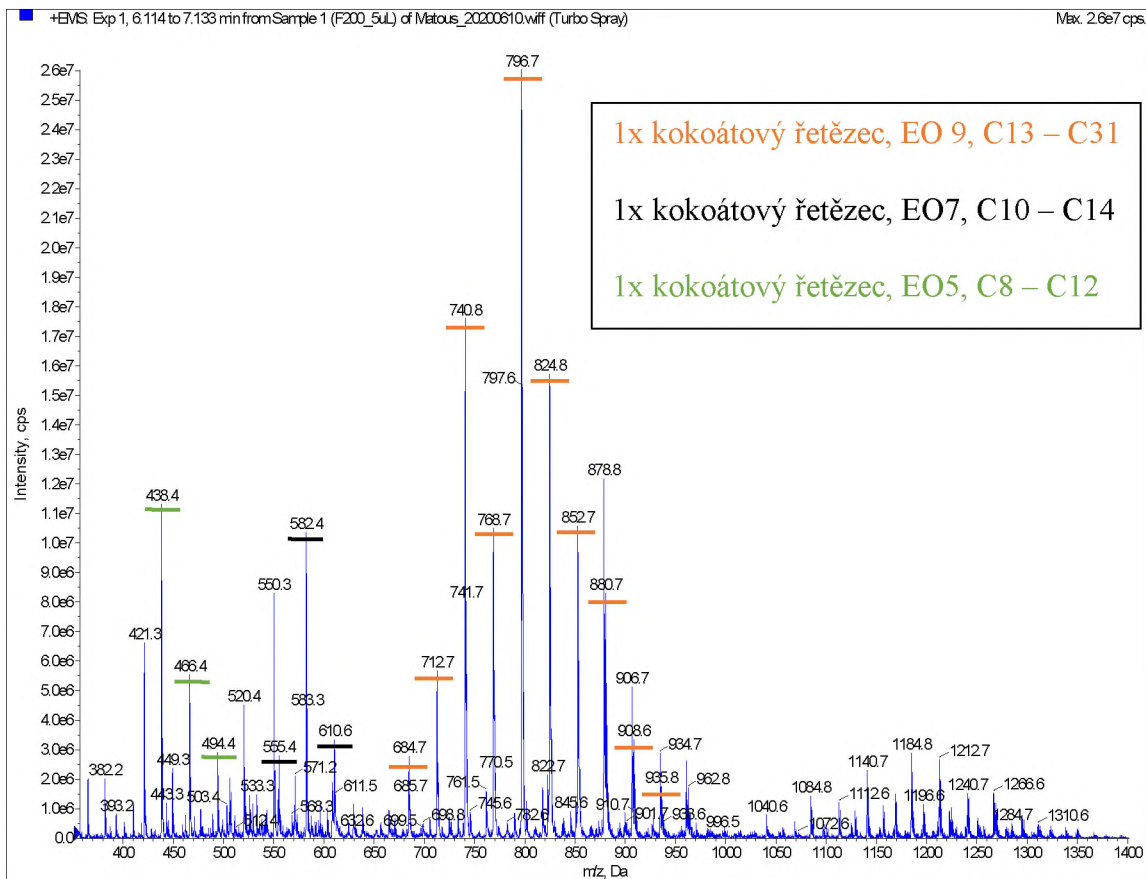


Obrázek 21: Záznam měření Levenol® F-200; dávkování 0,5 µl, kolona Ascentis® Express OH5, s izokratickou elucí MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný s průtokem 0,25 ml/min, dobou analýzy 30 min při teplotě 25 °C

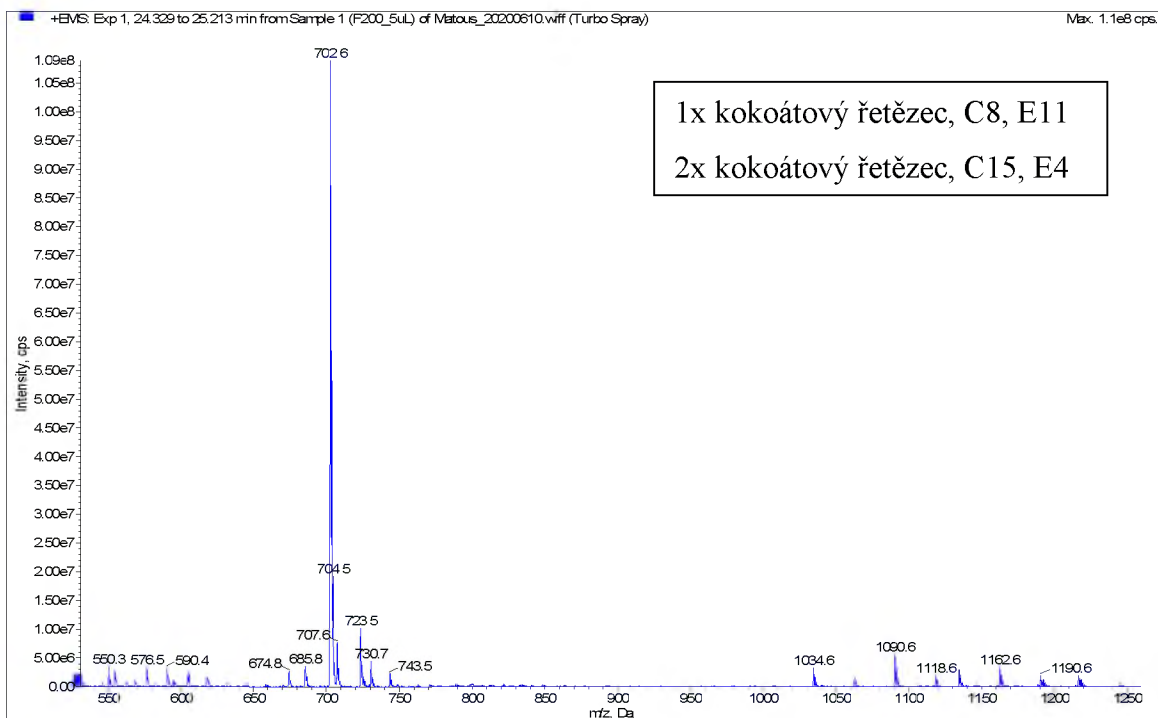
K vyhodnocení dat byl použit stejný postup jako byl použit při vyhodnocení MS spekter u RP-LC. Záznam z MS měření v HILIC systému již nebyl tak detailní jako u RP-LC. Proto byl HILIC systém na MS využit spíše pro porovnání a potvrzení výsledků z RP-LC. Na obrázku 22 je zobrazen celkový iontový proud pro vzorek Levenol® F-200, který byl upraven a jsou zobrazeny pouze signály v rozmezí 300 – 1000 m/z.



Obrázek 22: Celkový iontový proud vzorku Levenol® F-200; dávkování 0,5 µl, kolona Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný s průtokem 0,25 ml/min, dobou analýzy 30 min a teplotou 25 °C



Obrázek 23: Spektrum tenzidu Levenol® F-200, v čase 6 - 7 min; dávkování 0,5 µl, kolona Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný s průtokem 0,25 ml/min, dobou analýzy 30 min a teplotou 25 °C



Obrázek 24: Spektrum tenzidu Levenol® F-200, v čase 24 - 25 min; dávkování 0,5 µl, kolona Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný s průtokem 0,25 ml/min, dobou analýzy 30 min a teplotou 25 °C

Jak již bylo zmíněno u vyhodnocení RP-LC/MS, pro každý pik bylo zobrazeno spektrum s m/z a nalezené hodnoty poté hledány v tabulce monoizotopických hmotností a následně přiřazeny jednotlivým kombinacím.

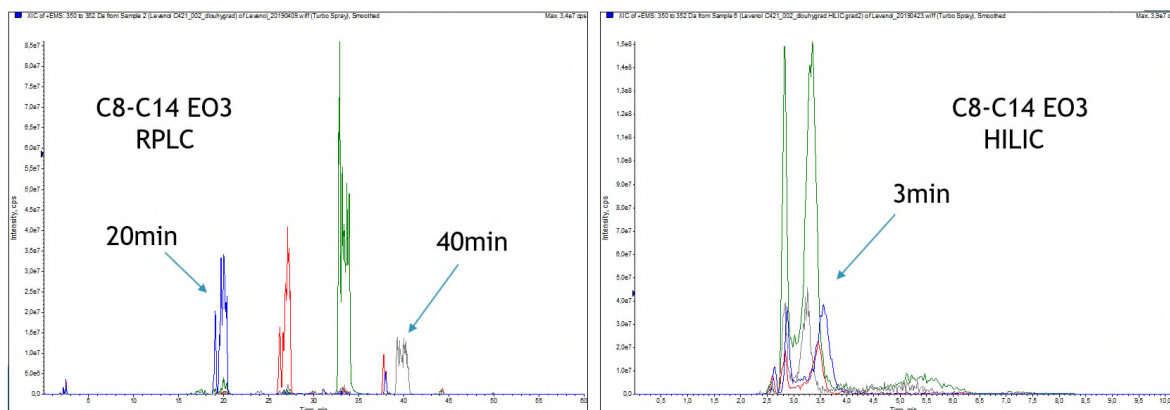
Na spektru na obrázku 23 je ukázáno vyhodnocení měření MS v režimu HILIC. Monoizotopické hmotnosti nalezené v čase 6 -7 min byly pomocí tabulky 2 přiřazeny následujícím teoretickým molekulám, kdy v jednom čase lze nalézt molekuly obsahující jak jeden kokoátový řetězec s devíti EO 9 a délkou řetězce C13 – C31, tak i molekulu s jedním kokoátovým řetězcem se sedmi EO a délkou alkylového řetězce C10 – C14 a zároveň i molekulu s jedním kokoátovým řetězcem s pěti EO a alkylovým řetězcem C8 – C12. Všechny tři molekuly jsou teoreticky možné, jelikož nedochází k překrytí jednotlivých monoizotopických hmot, ale jsou separované odděleně. Logické série odpovídají jedné EO o $\Delta m/z = 44$. Dle intenzity a délce posloupné řady je však pravděpodobné, že hlavní zastoupení u tohoto píku má molekula obsahující jeden kokoátový řetězec s devíti EO 9 a délkou řetězce C13 – C31. Jak je zde vidět, oproti RP-LC zde dochází k separaci na základě oxyethylenových jednotek a z tohoto důvodu byl zvolen právě režim HILIC jako doplňkové měření.

Na obrázku 24 je další spektrum v čase 24 – 25 min MS/HILIC. Zde je znázorněný odlišný výsledek než u obrázku 23. Nenajdeme zde žádnou posloupnou řadu, avšak pouze jeden velice intenzivní pik, který odpovídá buď molekule obsahující jeden kokoátový řetězec o délce řetězce C8 s jedenácti EO, nebo molekule se dvěma kokoátovými řetězci o délce C15 a čtyřmi EO. Zde opět není možná jednoznačná identifikace pouze na základě MS, avšak vzhledem k udávanému průměrnému množství EO, které se dle výrobce má rovnat šesti, je pravděpodobné, že se jedná o možnost druhou.

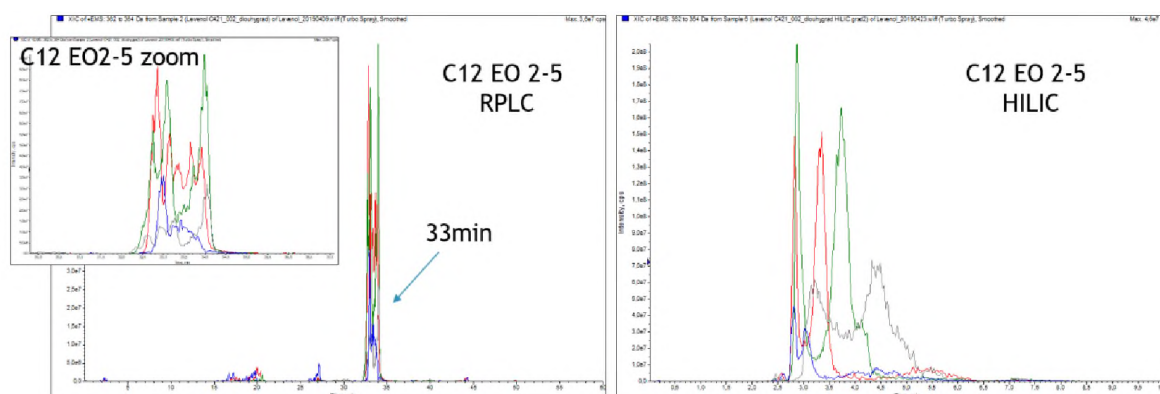
Tímto způsobem byly vyhodnoceny všechny možné píky vzorku Levenol® F-200 a jejich záznamy jsou k dispozici v přílohách pod obr. P43 – P78. Následně byly také vyhodnoceny i ostatní vzorky, avšak kvůli velkému množství dat a složitosti vzorku není možné uvést přímo do obrázku spektra výsledky, jako je tomu u výsledků z měření RP-LC/MS. V přílohách jsou uvedena pouze spektra celkového iontového proudu ostatních vzorků (Obr. P79 – P81). Kvůli přehlednosti byly nalezené hodnoty zpracovány do tabulky (Tabulka 3 a Tabulky P5 – P11) a následně hledány v MS spektrech z měření v RP-LC/MS. Podrobnějšímu popisu interpretace je věnována následující kapitola.

3.1.3 Komplexní charakterizace tenzidů Levenol®

Jak bylo možné předpokládat, separace v režimech HILIC a RP-LC se chovala odlišně. Zatímco v systému RP-LC dochází k separaci na základě délky alkylového řetězce, u systému HILIC nehraje délka alkylového řetězce prakticky žádnou roli a separace probíhá dle počtu oxyethylenových jednotek. Schéma rozdílu separací v těchto systémech je znázorněno na obrázku 25 a 26.



Obrázek 25: Rozdíl separace EO 3 v závislosti na délce alkylového řetězce



Obrázek 26: Rozdíl separace C12 v závislosti na EO jednotkách

Po vyhodnocení MS spekter všech vzorků ze systému RP-LC a HILIC byla snaha zkompletovat tyto dvě série výsledků do výsledné charakterizace tenzidů. K vyhodnocení byly použity výsledky z RP-LC/MS, kdy nalezené molekulové hmotnosti různých molekul tenzidů byly hledány ve výsledcích získaných ze systému HILIC/MS. Nalezené shodné hmoty byly poté zaneseny do tabulky na základě jejich retenčních časů, ke zjištění trendů retence (ukázková tabulka tenzidu Levenol® F-200 je znázorněna v Tabulce 3; výsledky pro ostatní vzorky jsou v tabulkách P5 – P11). Překvapivé zjištění bylo, že u každého vzorku se nacházela alespoň jedna, někdy i více molekul separované v různé, poměrně vzdálené časy, kdy však tento trend nejsme schopni momentálně vysvětlit (viz molekula tenzidu F-200 C16 EO5).

Tabulka 3: Vyhodnocení MS u Levenol® F-200 s jedním kokoátovým řetězcem; hodnoty v tabulce odpovídají retenčním časům, při kterých byl daný signál m/z nalezen ve spektru.

EtO-	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
Glycerol									25,56	30,01											
1x k kokoát C2										19,9	23,15										
C3																					
C4				12,21				9,12	12,21	16,12		22,64	26,34	31,02	37,32						
C5																					
C6			5,57					11,5	15,18			25,56	30,01								5,57
C7																					
C8						6,68	8,65	11,5	3,9; 15,18	18,09	21,1	24,7	29,1	4,77; 34,65	5,57		7,9	8,65			
C9																					
C10						6,68	8,65	6,68; 11,5	15,18	18,09	20,53	23,96	28,14	4,77; 33,75	5,57		7,9	8,65			
C11																					
C12						4,77; 6,68	5,57; 8,65	6,68; 30,45; 21,5	4,77; 15,18; 20,04	17,02	19,9	23,15	27,33	32,41	39,12		7,9	8,65			
C13			5,57							3,9; 6,68		9,12									
C14								3,9; 4,77	3,9; 6,68	4,77	6,68	7,9	22,64	26,34							
C15												9,12	10,45	12,21							
C16					3,9	10,45			6,68												
C17								4,77; 14,29	5,57; 17,02	6,68; 19,9	7,9; 23,15	9,12; 27,33	10,45; 32,41	12,21; 38,12	14,29						
C18																					
C19			22,64						4,77		6,68	7,9	9,12	10,45	11,5; 12,21						
C20																					
C21																					
C22									4,77	5,57	6,68	7,9	9,12	10,45	11,5						
C23									4,77		6,68	7,9	9,12	10,45	11,5						
C24																					
C25									4,77		6,68	7,9	9,12	10,45	11,5						
C26																					25,56
C27											6,68	7,9									
C28																					
C29											6,68	7,9									
C30																					
C31											6,68	7,9									
C12 EO7						6,68; 10,45; 11,5															
C12 EO8						14,29; 15,18; 30,01															
C16 EO5						3,9; 4,1; 4,77; 5,57; 9,12; 10,45															
C21 EO4						25,56; 27,33; 30,01															

Na tabulce 3 je velmi dobře vidět, jak probíhá separace v systému HILIC, kdy se látky separují podle počtu oxyethylenových jednotek, kdy nižší retenci mají molekuly obsahující menší počet EO a že délka alkylového řetězce nemá na retenci vliv. Zajímavým zjištěním bylo také to, že nejmenší retenci má u vzorku Levenol® F-200 s jedním kokoátovým řetězcem složení EO 7, C15 – C25. S přibývajícimi EO retence v této délce alkylového řetězce úměrně roste až do maximálního počtu 19 EO, avšak kratší

alkylové řetězce C4 – C14 se stejným počtem EO mají výrazně vyšší retenci, která také s přibývajícím EO roste. Stejný trend byl nalezen u všech ostatních vzorků, kromě Levenol® C-421. Vzhledem k jeho poměrně jednoduchému složení, obsahujícím průměrný počet dvou EO, oproti ostatním vzorkům je to však přijatelný výsledek, jelikož díky malému počtu EO se tyto trendy nemají takovou šanci projevit.

Problémem při interpretaci byl fakt, že sice naměřená spektra v RP-LC jsou jednodušší, ale v tomto systému nejsou rozděleny příslušné EO jednotky, resp. mají na retenci malý vliv. V HILIC systému jsou tenzidy separovány podle polární oxyethylenové skupiny, která je pro interpretaci vhodnější, ale zato jsou spektra o dost složitější. Velký rozdíl je vidět na porovnání spekter z HILIC a RP-LC v MS.

Naměřená spektra jsou poměrně komplexní a struktura tenzidů byla určena na základě výpočtu v tabulkách. Pro potvrzení by bylo vhodné provést měření MS². To by však vedlo k ještě více komplikovanému zpracování dat, protože z každého spektra by vzniklo ještě další, tandemové, které by bylo nutné interpretovat. Další možná analýza by byla ve dvourozměrné chromatografii ve spojení RP-LC a HILIC, kde by bylo možné využít výhody, kdy se oba systémy vzájemně doplňují. Tím by se tato komplexní charakterizace dala spojit do jedné analýzy. Nevýhodou této 2D chromatografie je, že jedna ze dvou separací musí proběhnout velmi rychle. Tím se dá předpokládat, že účinnost separace nebude tak vysoká jako v případě oddělených analýz [72]. Z časových důvodů však nebylo možné tato měření v rámci této diplomové práce provést.

Dalším problémem pro analýzu jsou výchozí suroviny, jelikož pochází z přírodního zdroje, a tak složení není vždy úplně čisté a totožné, je velmi obtížné stanovit například optimální délku alkylového řetězce acylglycerolu, který by měl pocházet z kokosového oleje. Ke zvýšení přesnosti výsledků by bylo nutné mít k dispozici výchozí kokosový olej a provést u něj separaci např. pomocí derivatizace a následné analýzy na plynovém chromatografu [73]. Tím by byla získána přesná struktura výchozího kokosového oleje a následná identifikace tenzidů by byla o to jednodušší a přesnější.

Pomocí kapalinové chromatografie v systému RP-LC a HILIC a následné analýzy v hmotnostní spektrometrii se však podařilo optimalizovat analytické metody pro separaci neiontových tenzidů Levenol® F-200, Levenol® C-421, Levenol® C-201 a Levenol® C-301. Nalezené monoizotopické hmotnosti z MS definující počet oxyethylenových jednotek vázaných na acylglycerolu odpovídají průměrnému množství,

které uvádí výrobce a zároveň odpovídá i délka alkylových řetězců kokosovému oleji, ze kterého by měly být tyto tenzidy vyráběny.

4 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce byla optimalizace analytické metody pro charakterizaci neiontových tenzidů na bázi oxyethylenovaných acylglycerolů, konkrétně vzorků obchodního názvu Levenol® C-421, Levenol® C-201, Levenol® C-301 a Levenol® F-200.

Chromatografické analýzy probíhaly v systému s obrácenými fázemi a v systému hydrofilních interakcí. Bylo využito několika typů kolon pro oba systémy. Nejlepší výsledky poskytovala v RP-LC kolona Kinetex® 2,6 μm Polar a pro systém HILIC se nejvíce osvědčila kolona Ascentis® Express OH5. Dále bylo nutno optimalizovat teplotu na koloně pro oba systémy, kdy ideální teplota pro separaci v RP-LC byla 55 °C, a pro HILIC 25 °C. Bylo také testováno mnoho mobilních fází a zjištěno, že pro systém RP-LC byla nejvhodnější gradientová eluce mobilní fáze acetonitril – destilovaná voda od 20 % ACN do 100 % ACN za 120 min. Pro HILIC systém se nejvíce osvědčila izokratická eluce s mobilní fází 100 % ACN s přidavkem 10 mM octanu amonného.

Pro analýzu hmotnostní spektrometrií byly vytvořeny tabulky monoizotopických hmotnostní acylglycerolu s různým stupněm oxyethylenace. Podle této tabulky byly následně naměřené hodnoty m/z hledány a přiřazovány daným molekulám. Na základě kombinace chromatografického chování a informací získaných z hmotnostních spekter byly vzorky tenzidů komplexně charakterizovány.

5 LITERATURA

- 1 KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- 2 LAWRENCE, James F. *Organic trace analysis by liquid chromatography*. Orlando: Academic Press, 1981. ISBN 0124391508.
- 3 DEYL, Zdeněk. *Separation methods*. New York, NY, USA: Sole distributors for the U.S.A. and Canada, Elsevier Science Pub. Co., 1984. ISBN 04-448-0527-3.
- 4 CHURÁČEK, Jaroslav a Pavel JANDERA. *Separace látek: Kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie*. 1. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1981. ISBN 541 183 (075 8).
- 5 Česla, P. *Derivatizace pro separační techniky (Základy kapalinové chromatografie)*. Pardubice: UP FChT, 2016.
- 6 KELLNER, R. *Analytical chemistry: the approved text to the FECS curriculum analytical chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH, 1998. ISBN 3-527-28881-3.
- 7 KARLÍČEK, Rolf. *Analytická chemie pro farmaceuty*. 4., nezměn. vyd. Praha: Karolinum, 2013. ISBN 978-80-246-2202-6.
- 8 NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Hradec Králové: Nováková Lucie, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- 9 NEUE, Uwe D. *HPLC columns: theory, technology, and practice*. New York: Wiley-VCH, 1997. ISBN 0-471-19037-3.

- 10 BIDLINGMEYER, Brian A. *Practical HPLC methodology and applications*. New York: Wiley, 1992. ISBN 0-471-57246-2.
- 11 Lab-training.com [online]. @ 2019 [cit. 2019-12-10].
Dostupné z: <https://s21507.pcdn.co/wp-content/uploads/2011/12/Diagram-1.jpg>
- 12 SMITH, Roger M. *Gas and liquid chromatography in analytical chemistry*. New York: Wiley, 1988. ISBN 0-471-90980-7.
- 13 DE SAEGER, S. *Determining mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing, 2011. ISBN 978-1-84569-674-0
- 14 WILSON, Ian D. a C. F. POOLE. *Handbook of methods and instrumentation in separation science*. Burlington, MA: Elsevier/Academic Press, 2009. ISBN 978-0-12-375095-2.
- 15 GÜNZLER, Helmut a Alex WILLIAMS. *Handbook of analytical techniques*. New York: Wiley-VCH, 2001. ISBN 3-527-30165-8.
- 16 Sample Injection – Cheminert 6 port valve. In: *VICI* [online]. Švýcarsko: Valco Instruments, 2020 [cit. 2020-04-15]. Dostupné z: https://www.vici.com/support/app/c_app11.php
- 17 Tabulka: Vlastnosti LC detektorů. *HPLC.CZ* [online]. 2012 [cit. 2020-04-02]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Teorie/table_detectors.html

- 18 MAGNUSSON, Lars-Erik, Donald S. RISLEY a John A. KOROPCHAK. Aerosol-based detectors for liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2015, **1421**, 68-81 [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.07.045. ISSN 00219673.
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967315010134>
- 19 ELSD - DETEKTOR. *Hplc.cz* [online]. [cit. 2020-03-19]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/Teorie/ELSD.htm>
- 20 PESEK, Joseph J., Maria T. MATYSKA, Surekha GANGAKHEDKAR a Rukhsana SIDDIQ. Synthesis and HPLC evaluation of carboxylic acid phases on a hydride surface. *Journal of Separation Science* [online]. 2006, **29**(6), 872-880 [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.1002/jssc.200500433. ISSN 1615-9306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200500433>
- 21 PESEK, Joseph J., Maria T. MATYSKA a Seema J. PRABHAKARAN. Synthesis and characterization of chemically bonded stationary phases on hydride surfaces by hydrosilation of alkynes and dienes. *Journal of Separation Science* [online]. 2005, **28**(18), 2437-2443 [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.1002/jssc.200500249. ISSN 1615-9306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200500249>
- 22 LI, Ruiping a Junxiong HUANG. Chromatographic behavior of epirubicin and its analogues on high-purity silica in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2004, 1041(1-2), 163-169 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.04.033. ISSN 00219673.
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967304006338>

- 23 STREGE, Mark A., Stephanie STEVENSON a Steve M. LAWRENCE. Mixed-Mode Anion–Cation Exchange/Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography–Electrospray Mass Spectrometry as an Alternative to Reversed Phase for Small Molecule Drug Discovery. *Analytical Chemistry* [online]. 2000, 72(19), 4629-4633 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1021/ac000338b. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac000338b>
- 24 ALPERT, Andrew J., Mukta SHUKLA, Ashok K. SHUKLA, et al. Hydrophilic-interaction chromatography of complex carbohydrates. *Journal of Chromatography A* [online]. 1994, 676(1), 191-202 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/0021-9673(94)00467-6. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0021967394004676>
- 25 CHURMS, Shirley C. Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on size exclusion. *Journal of Chromatography A* [online]. 1996, 720(1-2), 151-166 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/0021-9673(95)00305-3. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0021967395003053>
- 26 OYLER, Alan R., Barbara L. ARMSTRONG, Jessica Y. CHA, Marilyn X. ZHOU, Qing YANG, Robin I. ROBINSON, Richard DUNPHY a David J. BURINSKY. Hydrophilic interaction chromatography on amino-silica phases complements reversed-phase high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for peptide analysis. *Journal of Chromatography A* [online]. 1996, 724(1-2), 378-383 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/0021-9673(95)00987-6. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0021967395009876>

- 27 YOSHIDA, Tatsunari. Peptide separation by Hydrophilic-Interaction Chromatography: a review. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* [online]. 2004, 60(3), 265-280 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.jbbm.2004.01.006. ISSN 0165022X Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165022X04000090>
- 28 HAO, Zhigang, Chih-Ying (Joey) LU, Baiming XIAO, Naidong WENG, Barry PARKER, Michael KNAPP a Chi-Tang HO. Separation of amino acids, peptides and corresponding Amadori compounds on a silica column at elevated temperature. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, 1147(2), 165-171 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.02.057. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967307003226>
- 29 ALPERT, Andrew J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography A* [online]. 1990, 499, 177-196 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)96972-3. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300969723>
- 30 NAIDONG, Weng. Bioanalytical liquid chromatography tandem mass spectrometry methods on underivatized silica columns with aqueous/organic mobile phases. *Journal of Chromatography B* [online]. 2003, 796(2), 209-224 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2003.08.026. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023203006603>
- 31 BUSZEWSKI, Bogusław a Sylwia NOGA. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2012, 402(1), 231-247 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1007/s00216-011-5308-5. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-011-5308-5>

- 32 BUI, Nhat Thi Hong, Jeroen J. VERHAGE a Knut IRGUM. Tris(hydroxymethyl)aminomethane-functionalized silica particles and their application for hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science* [online]. 2010, 33(19), 2965-2976 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1002/jssc.201000154. ISSN 16159306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201000154>
- 33 HEMSTRÖM, Petrus a Knut IRGUM. Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science* [online]. 2006, 29(12), 1784-1821 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1002/jssc.200600199. ISSN 1615-9306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200600199>
- 34 HEMSTRÖM, Petrus a Knut IRGUM. Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science* [online]. 2006, 29(12), 1784-1821 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1002/jssc.200600199. ISSN 1615-9306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200600199>
- 35 IDBORG, H, L ZAMANI, P EDLUND, I SCHUPPEKOISTINEN a S JACOBSSON. Metabolic fingerprinting of rat urine by LC/MSPart 1. Analysis by hydrophilic interaction liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* [online]. 2005, 828(1-2), 9-13 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2005.07.031. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023205005192>
- 36 CUBBON, Simon, Timothy BRADBURY, Julie WILSON a Jane THOMAS-OATES. Hydrophilic Interaction Chromatography for Mass Spectrometric Metabonomic Studies of Urine. *Analytical Chemistry* [online]. 2007, 79(23), 8911-8918 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1021/ac071008v. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac071008v>

- 37 RAJAWAT, Jyotika a Gagandeep JHINGAN. Mass spectroscopy. Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources [online]. Elsevier, 2019, 2019, s. 1-20 [cit. 2020-05-26]. DOI: 10.1016/B978-0-12-816548-5.00001-0. ISBN 9780128165485.
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128165485000010>
- 38 Schematic of a typical en:mass spectrometer. In: Wikipedia.org [online]. 2008 [cit. 2020-03-25]. Dostupné z: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0d/Mass_Spectrometer_Schematic.svg
- 39 MELLON, F.A. MASS SPECTROMETRY | Principles and Instrumentation. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* [online]. Elsevier, 2003, 2003, s. 3739-3749 [cit. 2020-03-25]. DOI: 10.1016/B0-12-227055-X/00746-X. ISBN 9780122270550. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B012227055X00746X>
- 40 http://holcapek.upce.cz/teaching/Mol_spek/Mol_spek_prednaska6_MS.pdf, citováno 09. 06. 2012.
- 41 Molekula mýdla. In: Wikipedia.org [online]. 3.3.2006 [cit. 2020-03-24]. Dostupné z: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/76/Molekula_m%C3%BDdla.PNG
- 42 ŠMIDRKAL, J. Tenzidy a detergenty dnes. Chem. Listy, 1999, vol. 93, No. 7, s. 421–427. [ISSN 0009-2770]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_07_421-427.pdf
- 43 MYERS, Drew. Surfaces, interfaces, and colloids: principles and applications. 2. New York: Wiley-VCH, 1999. ISBN 978-0-471-33060-8.

- 44 MYERS, Drew. Surfactant science and technology. New York, N.Y.: VCH, 1988. ISBN 0-89573-339-0.
- 45 NAKAMA, Y. Surfactants. Cosmetic Science and Technology [online]. Elsevier, 2017, 2017, s. 231-244 [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1016/B978-0-12-802005-0.00015-X. ISBN 9780128020050. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012802005000015X>
- 46 WILLIAMS, Jesse J. Formulation of Carpet Cleaners. Handbook for Cleaning/Decontamination of Surfaces [online]. Elsevier, 2007, 2007, s. 103-123 [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1016/B978-044451664-0/50004-8. ISBN 9780444516640. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444516640500048>
- 47 Quora.com [online]. @ 2017 [cit. 2020-03-24]. Dostupné z: <https://qph.fs.quoracdn.net/main-qimg-89e8ddf67c657e4e351aea99d9a10290-c>
- 48 YAMINI, Yadollah, Neda FEIZI a Morteza MORADI. Surfactant-Based Extraction Systems. Liquid-Phase Extraction [online]. Elsevier, 2020, 2020, s. 209-239 [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1016/B978-0-12-816911-7.00007-4. ISBN 9780128169117. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128169117000074>
- 49 The Essential Chemical Industry - online [online]. @ 2013 [cit. 2020-03-24]. Dostupné z: [https://www.essentialchemicalindustry.org/images/stories/190_surfactants/16-19-surfactant_16_\(15\).jpg](https://www.essentialchemicalindustry.org/images/stories/190_surfactants/16-19-surfactant_16_(15).jpg)
- 50 CULLUM, D. C. *Introduction to surfactant analysis*. New York: Blackie Academic & Professional, 1994. ISBN 07-514-0025-4.

- 51 JIANG, C. a J. MA. DE-INKING OF WASTE PAPER: FLOTATION. *Encyclopedia of Separation Science* [online]. Elsevier, 2000, 2000, s. 2537-2544 [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1016/B0-12-226770-2/05881-6. ISBN 9780122267703. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0122267702058816>
- 52 MCCOY, Richard N. a Anson B. BULLOCK. Determination of oxyethylene distribution in condensates of primary alcohols with ethylene oxide. *Journal of the American Oil Chemists' Society* [online]. 1969, **46**(6), 289-295 [cit. 2020-04-01]. DOI: 10.1007/BF02545006. ISSN 0003021X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1007/BF02545006>
- 53 FAVRETTO, L., G. PERTOLDI MARLETTA a L. FAVRETTO GABRIELLI. Rapid determination of the molecular-weight distribution of ethylene glycol oligomers by thin-layer chromatography and their photometric evaluation. *Journal of Chromatography A* [online]. 1970, **46**, 255-260 [cit. 2020-04-01]. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)83995-3. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300839953>
- 54 STANCHER, B., L. FAVRETTO GABRIELLI a L. FAVRETTO. Analysis of polyoxyethylene non-ionic surfactants by coupling gas-liquid and thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 1975, **111**(2), 459-462 [cit. 2020-04-01]. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)99304-X. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196730099304X>
- 55 GILDENBERG, L. a J. R. TROWBRIDGE. Gas-liquid chromatographic separation of ethylene oxide adducts of fatty alcohols via their acetate esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society* [online]. 1965, **42**(1), 69-71 [cit. 2020-04-01]. DOI: 10.1007/BF02558261. ISSN 0003021X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1007/BF02558261>

- 56 NAKAMURA, Kiyoshi a Isao MATSUMOTO. *NIPPON KAGAKU KAISHI* [online]. 1975, (8), 1342-1347 [cit. 2020-04-01]. DOI: 10.1246/nikkashi.1975.1342. ISSN 2185-0925. Dostupné z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/nikkashi1972/1975.1342?from=CrossRef>
- 57 NOZAWA, Akio a Toshio OHNUMA. Improved high-performance liquid chromatographic analysis of ethylene oxide condensates by their esterification with 3,5-dinitrobenzoyl chloride. *Journal of Chromatography A* [online]. 1980, **187**(1), 261-263 [cit. 2020-04-01]. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)87898-X. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196730087898X>
- 58 ALLEN, M. C. a D. E. LINDER. Ethylene oxide oligomer distribution in nonionic surfactants via high performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of the American Oil Chemists' Society* [online]. 1981, **58**(10), 950-957 [cit. 2020-04-01]. DOI: 10.1007/BF02659666. ISSN 0003021X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1007/BF02659666>
- 59 ASERIN, A., M. FRENKEL a N. GARTI. HPLC analysis of nonionic surfactants. Part IV. Polyoxyethylene fatty alcohols. *Journal of the American Oil Chemists' Society* [online]. 1984, **61**(4), 805-809 [cit. 2020-04-01]. DOI: 10.1007/BF02672142. ISSN 0003021X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1007/BF02672142>
- 60 DESBÈNE, P. L., B. DESMAZIÈRES, V. EVEN, J. J. BASSELIER a L. MINSSIEUX. Analysis of non-ionic surfactants used in tertiary oil recovery. Optimisation of stationary phase in normal phase partition chromatography. *Chromatographia* [online]. 1987, **24**(1), 857-861 [cit. 2020-04-02]. DOI: 10.1007/BF02688599. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02688599>

- 61 KUDOH, Megumu, Hitomi OZAWA, Shintaro FUDANO a Kazuro TSUJI. Determination of trace amounts of alcohol and alkylphenol ethoxylates by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A* [online]. 1984, **287**, 337-344 [cit. 2020-04-02]. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)87709-8. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967301877098>
- 62 KUDOH, Megumu. Separation of alcohol ethoxylates by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 1984, **291**, 327-330 [cit. 2020-04-02]. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)95035-0. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300950350>
- 63 KÖNIG, Hans, Roland RYSCHKA a Werner STROBEL. Separation, identification and determination of non-ionic surfactants using high-performance liquid chromatography. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie* [online]. 1985, **321**(3), 263-267 [cit. 2020-04-02]. DOI: 10.1007/BF00470368. ISSN 0016-1152. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00470368>
- 64 ZHU, JingKe. Liquid chromatography-mass spectrometry of nonionic surfactants using electrospray ionization. *Journal of Surfactants and Detergents* [online]. 2015, **7**(4), 421-423 [cit. 2020-04-02]. DOI: 10.1007/s11743-004-0327-5. ISSN 1097-3958. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1007/s11743-004-0327-5>
- 65 LEE, Yong Hwa, Eun Sook JEONG, Hwang Eui CHO a Dong-Cheul MOON. Separation and determination of polyethylene glycol fatty acid esters in cosmetics by a reversed-phase HPLC/ELSD. *Talanta* [online]. 2008, **74**(5), 1615-1620 [cit. 2020-04-02]. DOI: 10.1016/j.talanta.2007.10.020. ISSN 00399140. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914007007035>

- 66 TRATHNIGG, B., D. THAMER, X. YAN, B. MAIER, H.-R. HOLZBAUER a H. MUCH. Characterization of ethoxylated fatty alcohols using liquid chromatography with density and refractive index detection II. Quantification in liquid chromatography under critical conditions. *Journal of Chromatography A* [online]. 1994, **665**(1), 47-53 [cit. 2020-04-02]. DOI: 10.1016/0021-9673(94)87030-6. ISSN 00219673.
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0021967394870306>
- 67 BRANDSTEINOVÁ E., ČESLA P., Mikysek T., Vytřas K.: Neiontové tenzidy jako produkty oxyethylenace glycerolu – LC/MS analýza a potenciometrické titrace, in Vytřas K., Šmidrkal J. (Eds.): LI. seminář o tenzidech a detergentech, Sb. předn., str. 5-17. Univerzita Pardubice, Pardubice 2018.
- 68 http://www.kaochemicalseu.com/sites/default/files/related_files/basic_page/levenol_laundry_2011_eng_a4_2011-03.pdf; [cit. 2020-04-02]
- 69 LEVENOL C-421. *Kao Chemicals Global* [online]. Kao Corporation, 2020 [cit. 2020-04-02]. Dostupné z: https://chemical.kao.com/en/products/B0017205_en/
- 70 LEVENOL C-301. *Kao Chemicals Global* [online]. Kao Corporation, 2020 [cit. 2020-04-02]. Dostupné z: https://chemical.kao.com/en/products/B0017498_en.html
- 71 LEVENOL C-201. *Kao Chemicals Global* [online]. Kao Corporation, 2020 [cit. 2020-04-02]. Dostupné z: https://chemical.kao.com/en/products/B0017204_en.html
- 72 GROENEVELD, Gino, Melissa N. DUNKLE, Marian RINKEN, Andrea F.G. GARGANO, Ayako DE NIET, Matthias PURSCH, Edwin P.C. MES a Peter J. SCHOENMAKERS. Characterization of complex polyether polyols using comprehensive two-dimensional liquid chromatography hyphenated to high-resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2018, 1569, 128-138 [cit. 2020-06-26]. DOI: 10.1016/j.chroma.2018.07.054. ISSN 00219673.
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967318309385>

- 73 PONTOH, Julius. Gas Chromatographic Analysis of Medium Chain Fatty Acids in Coconut Oil. *The Journal of Pure and Applied Chemistry Research* [online]. 2016, 5(3), 157-161 [cit. 2020-06-26]. DOI: 10.21776/ub.jpacr.2016.005.03.255. ISSN 23024690. Dostupné z: <http://jpacr.ub.ac.id/index.php/jpacr/article/view/255/pdf>

6 PŘÍLOHY

Tabulka P 1: Tabulka *monoizotopických hodnot m/z pro tenzid s jedním kokoátovým řetězcem a EO 1-10*

EtO	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Glycerol	92,0	136,1	180,1	224,1	268,2	312,2	356,2	400,2	444,3	488,3	532,3
1x kokoát C2	134,1	178,1	222,1	266,1	310,2	354,2	398,2	442,2	486,3	530,3	574,3
C3	148,1	192,1	236,1	280,2	324,2	368,2	412,2	456,3	500,3	544,3	588,3
C4	162,1	206,1	250,1	294,2	338,2	382,2	426,2	470,3	514,3	558,3	602,4
C5	176,1	220,1	264,2	308,2	352,2	396,2	440,3	484,3	528,3	572,3	616,4
C6	190,1	234,1	278,2	322,2	366,2	410,3	454,3	498,3	542,3	586,4	630,4
C7	204,1	248,2	292,2	336,2	380,2	424,3	468,3	512,3	556,3	600,4	644,4
C8	218,2	262,2	306,2	350,2	394,3	438,3	482,3	526,3	570,4	614,4	658,4
C9	232,2	276,2	320,2	364,2	408,3	452,3	496,3	540,4	584,4	628,4	672,4
C10	246,2	290,2	334,2	378,3	422,3	466,3	510,3	554,4	598,4	642,4	686,4
C11	260,2	304,2	348,3	392,3	436,3	480,3	524,4	568,4	612,4	656,4	700,5
C12	274,2	318,2	362,3	406,3	450,3	494,3	538,4	582,4	626,4	670,5	714,5
C13	288,2	332,3	376,3	420,3	464,3	508,4	552,4	596,4	640,4	684,5	728,5
C14	302,2	346,3	390,3	434,3	478,4	522,4	566,4	610,4	654,5	698,5	742,5
C15	316,3	360,3	404,3	448,3	492,4	536,4	580,4	624,4	668,5	712,5	756,5
C16	330,3	374,3	418,3	462,4	506,4	550,4	594,4	638,5	682,5	726,5	770,5
C17	344,3	388,3	432,3	476,4	520,4	564,4	608,4	652,5	696,5	740,5	784,6
C18	358,3	402,3	446,4	490,4	534,4	578,4	622,5	666,5	710,5	754,5	798,6
C19	372,3	416,4	460,4	504,4	548,4	592,5	636,5	680,5	724,5	768,6	812,6
C20	386,3	430,4	474,4	518,4	562,4	606,5	650,5	694,5	738,5	782,6	826,6
C21	400,4	444,4	488,4	532,4	576,5	620,5	664,5	708,5	752,6	796,6	840,6
C22	414,4	458,4	502,4	546,4	590,5	634,5	678,5	722,5	766,6	810,6	854,6
C23	428,4	472,4	516,4	560,5	604,5	648,5	692,5	736,6	780,6	824,6	868,7
C24	442,4	486,4	530,5	574,5	618,5	662,5	706,6	750,6	794,6	838,6	882,7
C25	456,4	500,5	544,5	588,5	632,5	676,6	720,6	764,6	808,6	852,7	896,7
C26	470,4	514,5	558,5	602,5	646,5	690,6	734,6	778,6	822,6	866,7	910,7
C27	484,5	528,5	572,5	616,5	660,6	704,6	748,6	792,6	836,7	880,7	924,7
C28	498,5	542,5	586,5	630,5	674,6	718,6	762,6	806,6	850,7	894,7	938,7
C29	512,5	556,5	600,5	644,5	688,6	732,6	776,6	820,6	864,7	908,7	952,7
C30	526,5	570,5	614,5	658,6	702,6	746,6	790,6	834,7	878,7	922,7	966,8

Tabulka P 2: Tabulka *monoizotopických hodnot m/z pro tenzid s jedním kokoátovým řetězcem a EO 11-20*

EtO	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Glycerol	576,3	620,4	664,4	708,4	752,4	796,5	840,5	884,5	928,5	972,6
1x kokoát C2	618,3	662,4	706,4	750,4	794,5	838,5	882,5	926,5	970,6	1014,6
C3	632,4	676,4	720,4	764,4	808,5	852,5	896,5	940,5	984,6	1028,6
C4	646,4	690,4	734,4	778,5	822,5	866,5	910,5	954,6	998,6	1042,6
C5	660,4	704,4	748,4	792,5	836,5	880,5	924,6	968,6	1012,6	1056,6
C6	674,4	718,4	762,5	806,5	850,5	894,5	938,6	982,6	1026,6	1070,6
C7	688,4	732,5	776,5	820,5	864,5	908,6	952,6	996,6	1040,6	1084,7
C8	702,4	746,5	790,5	834,5	878,5	922,6	966,6	1010,6	1054,6	1098,7
C9	716,5	760,5	804,5	848,5	892,6	936,6	980,6	1024,6	1068,7	1112,7
C10	730,5	774,5	818,5	862,5	906,6	950,6	994,6	1038,7	1082,7	1126,7
C11	744,5	788,5	832,5	876,6	920,6	964,6	1008,6	1052,7	1096,7	1140,7
C12	758,5	802,5	846,6	890,6	934,6	978,6	1022,7	1066,7	1110,7	1154,7
C13	772,5	816,5	860,6	904,6	948,6	992,6	1036,7	1080,7	1124,7	1168,8
C14	786,5	830,6	874,6	918,6	962,6	1006,7	1050,7	1094,7	1138,7	1182,8
C15	800,5	844,6	888,6	932,6	976,7	1020,7	1064,7	1108,7	1152,8	1196,8
C16	814,6	858,6	902,6	946,6	990,7	1034,7	1078,7	1122,7	1166,8	1210,8
C17	828,6	872,6	916,6	960,7	1004,7	1048,7	1092,7	1136,8	1180,8	1224,8
C18	842,6	886,6	930,6	974,7	1018,7	1062,7	1106,8	1150,8	1194,8	1238,8
C19	856,6	900,6	944,7	988,7	1032,7	1076,7	1120,8	1164,8	1208,8	1252,8
C20	870,6	914,7	958,7	1002,7	1046,7	1090,8	1134,8	1178,8	1222,8	1266,9
C21	884,6	928,7	972,7	1016,7	1060,7	1104,8	1148,8	1192,8	1236,9	1280,9
C22	898,6	942,7	986,7	1030,7	1074,8	1118,8	1162,8	1206,8	1250,9	1294,9
C23	912,7	956,7	1000,7	1044,8	1088,8	1132,8	1176,8	1220,9	1264,9	1308,9
C24	926,7	970,7	1014,7	1058,8	1102,8	1146,8	1190,8	1234,9	1278,9	1322,9
C25	940,7	984,7	1028,8	1072,8	1116,8	1160,8	1204,9	1248,9	1292,9	1336,9
C26	954,7	998,7	1042,8	1086,8	1130,8	1174,8	1218,9	1262,9	1306,9	1351,0
C27	968,7	1012,8	1056,8	1100,8	1144,8	1188,9	1232,9	1276,9	1321,0	1365,0
C28	982,7	1026,8	1070,8	1114,8	1158,8	1202,9	1246,9	1290,9	1335,0	1379,0
C29	996,7	1040,8	1084,8	1128,9	1172,9	1216,9	1260,9	1305,0	1349,0	1393,0
C30	1010,8	1054,8	1098,8	1142,9	1186,9	1230,9	1274,9	1319,0	1363,0	1407,0

Tabulka P 3: Tabulka *monoizotopických hodnot m/z pro tenzid se dvěma kokoátovými řetězci a EO 1-10*

EtO-	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Glycerol	92,0	136,1	180,1	224,1	268,2	312,2	356,2	400,2	444,3	488,3	532,3
2x kokoát C2	176,1	220,1	264,1	308,1	352,2	396,2	440,2	484,3	528,3	572,3	616,3
C3	190,1	234,1	278,1	322,2	366,2	410,2	454,2	498,3	542,3	586,3	630,3
C4	232,1	276,2	320,2	364,2	408,2	452,3	496,3	540,3	584,3	628,4	672,4
C5	246,1	290,2	334,2	378,2	422,3	466,3	510,3	554,3	598,4	642,4	686,4
C6	288,2	332,2	376,2	420,3	464,3	508,3	552,4	596,4	640,4	684,4	728,5
C7	302,2	346,2	390,3	434,3	478,3	522,3	566,4	610,4	654,4	698,4	742,5
C8	344,3	388,3	432,3	476,3	520,4	564,4	608,4	652,4	696,5	740,5	784,5
C9	358,3	402,3	446,3	490,4	534,4	578,4	622,4	666,5	710,5	754,5	798,5
C10	400,3	444,3	488,4	532,4	576,4	620,4	664,5	708,5	752,5	796,6	840,6
C11	414,3	458,4	502,4	546,4	590,4	634,5	678,5	722,5	766,5	810,6	854,6
C12	456,4	500,4	544,4	588,5	632,5	676,5	720,5	764,6	808,6	852,6	896,6
C13	470,4	514,4	558,4	602,5	646,5	690,5	734,6	778,6	822,6	866,6	910,7
C14	512,4	556,5	600,5	644,5	688,5	732,6	776,6	820,6	864,7	908,7	952,7
C15	526,5	570,5	614,5	658,5	702,6	746,6	790,6	834,6	878,7	922,7	966,7
C16	568,5	612,5	656,6	700,6	744,6	788,6	832,7	876,7	920,7	964,7	1008,8
C17	582,5	626,5	670,6	714,6	758,6	802,7	846,7	890,7	934,7	978,8	1022,8
C18	624,6	668,6	712,6	756,6	800,7	844,7	888,7	932,8	976,8	1020,8	1064,8
C19	638,6	682,6	726,6	770,7	814,7	858,7	902,7	946,8	990,8	1034,8	1078,8
C20	680,6	724,7	768,7	812,7	856,7	900,8	944,8	988,8	1032,8	1076,9	1120,9
C21	694,6	738,7	782,7	826,7	870,8	914,8	958,8	1002,8	1046,9	1090,9	1134,9
C22	728,6	772,6	816,6	860,7	904,7	948,7	992,7	1036,8	1080,8	1124,8	1168,8
C23	756,5	800,5	844,6	888,6	932,6	976,6	1020,7	1064,7	1108,7	1152,8	1196,8
C24	784,4	828,5	872,5	916,5	960,5	1004,6	1048,6	1092,6	1136,6	1180,7	1224,7
C25	812,3	856,4	900,4	944,4	988,5	1032,5	1076,5	1120,5	1164,6	1208,6	1252,6
C26	840,3	884,3	928,3	972,4	1016,4	1060,4	1104,4	1148,5	1192,5	1236,5	1280,5
C27	868,2	912,2	956,3	1000,3	1044,3	1088,4	1132,4	1176,4	1220,4	1264,5	1308,5
C28	896,1	940,2	984,2	1028,2	1072,2	1116,3	1160,3	1204,3	1248,3	1292,4	1336,4
C29	924,0	968,1	1012,1	1056,1	1100,2	1144,2	1188,2	1232,2	1276,3	1320,3	1364,3
C30	952,0	996,0	1040,0	1084,1	1128,1	1172,1	1216,1	1260,2	1304,2	1348,2	1392,2

Tabulka P 4: Tabulka *monoizotopických hodnot m/z pro tenzid se dvěma kokoátovými řetězci a EO 11-20*

EtO-	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Glycerol	576,3	620,4	664,4	708,4	752,4	796,5	840,5	884,5	928,5	972,6
2x kokoát C2	660,4	704,4	748,4	792,4	836,5	880,5	924,5	968,5	1012,6	1056,6
C3	674,4	718,4	762,4	806,5	850,5	894,5	938,5	982,6	1026,6	1070,6
C4	716,4	760,4	804,5	848,5	892,5	936,6	980,6	1024,6	1068,6	1112,7
C5	730,4	774,5	818,5	862,5	906,5	950,6	994,6	1038,6	1082,6	1126,7
C6	772,5	816,5	860,5	904,6	948,6	992,6	1036,6	1080,7	1124,7	1168,7
C7	786,5	830,5	874,5	918,6	962,6	1006,6	1050,7	1094,7	1138,7	1182,7
C8	828,5	872,6	916,6	960,6	1004,6	1048,7	1092,7	1136,7	1180,8	1224,8
C9	842,6	886,6	930,6	974,6	1018,7	1062,7	1106,7	1150,7	1194,8	1238,8
C10	884,6	928,6	972,7	1016,7	1060,7	1104,7	1148,8	1192,8	1236,8	1280,8
C11	898,6	942,6	986,7	1030,7	1074,7	1118,8	1162,8	1206,8	1250,8	1294,9
C12	940,7	984,7	1028,7	1072,7	1116,8	1160,8	1204,8	1248,9	1292,9	1336,9
C13	954,7	998,7	1042,7	1086,8	1130,8	1174,8	1218,8	1262,9	1306,9	1350,9
C14	996,7	1040,8	1084,8	1128,8	1172,8	1216,9	1260,9	1304,9	1348,9	1393,0
C15	1010,7	1054,8	1098,8	1142,8	1186,9	1230,9	1274,9	1318,9	1363,0	1407,0
C16	1052,8	1096,8	1140,8	1184,9	1228,9	1272,9	1317,0	1361,0	1405,0	1449,0
C17	1066,8	1110,8	1154,9	1198,9	1242,9	1286,9	1331,0	1375,0	1419,0	1463,0
C18	1108,9	1152,9	1196,9	1240,9	1285,0	1329,0	1373,0	1417,0	1461,1	1505,1
C19	1122,9	1166,9	1210,9	1255,0	1299,0	1343,0	1387,0	1431,1	1475,1	1519,1
C20	1164,9	1208,9	1253,0	1297,0	1341,0	1385,1	1429,1	1473,1	1517,1	1561,2
C21	1178,9	1223,0	1267,0	1311,0	1355,0	1399,1	1443,1	1487,1	1531,1	1575,2
C22	1212,9	1256,9	1300,9	1344,9	1389,0	1433,0	1477,0	1521,1	1565,1	1609,1
C23	1240,8	1284,8	1328,9	1372,9	1416,9	1460,9	1505,0	1549,0	1593,0	1637,0
C24	1268,7	1312,7	1356,8	1400,8	1444,8	1488,9	1532,9	1576,9	1620,9	1665,0
C25	1296,6	1340,7	1384,7	1428,7	1472,7	1516,8	1560,8	1604,8	1648,8	1692,9
C26	1324,6	1368,6	1412,6	1456,6	1500,7	1544,7	1588,7	1632,8	1676,8	1720,8
C27	1352,5	1396,5	1440,6	1484,6	1528,6	1572,6	1616,7	1660,7	1704,7	1748,7
C28	1380,4	1424,4	1468,5	1512,5	1556,5	1600,6	1644,6	1688,6	1732,6	1776,7
C29	1408,3	1452,4	1496,4	1540,4	1584,4	1628,5	1672,5	1716,5	1760,5	1804,6
C30	1436,3	1480,3	1524,3	1568,4	1612,4	1656,4	1700,4	1744,5	1788,5	1832,5

Tabulka P 5: Vyhodnocení MS u Levenol® F-200 se dvěma kokoátovými řetězci; hodnoty v tabulce odpovídají retenčním časům, při kterých byl daný signál m/z nalezen ve spektru.

EtO-	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Glycerol																
2xkokoát C2																
C3												25,56				
C4																
C5								22,64		18,09	20,53	23,96	28,14	33,75	5,57	
C6										3,9						
C7								3,9			22,64					
C8							10,45	14,29	5,57; 17,02	19,9	23,15	27,33	32,41	39,12	14,29	
C9													26,34			
C10		25,56			25,56; 27,3	4,1		4,77	5,57							
C11																
C12									5,57							
C13		16,12		22,64; 23,15	26,34	31,02	37,32									
C14																
C15			18,09	21,1	4,1; 24,7	29,1	34,65	5,57								
C16																
C17	10,45			19,9	23,15	27,33	32,41	39,12								
C18																
C19									19,9	22,64		30,01				
C20																
C21									19,9	22,64		30,01				
C22																
C23									19,9	22,64		30,01				
C24																
C25																

Tabulka P 6: Vyhodnocení MS u Levenol® C-301 s jedním kokoátovým řetězcem; hodnoty v tabulce odpovídají retenčním časům, při kterých byl daný signál m/z nalezen ve spektru.

EtO-	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Glycerol							35,78							
1xkokoát C2														
C3										17,65				
C4		6,56						8,64						
C5														
C6								8,64						
C7										15,33; 18,3; 18,97; 21	21; 31,91	31,91; 35,78	35,78	
C8					6,56	6,56	8,64	11,65		15,33	18,3	21		
C9			5,43										35,78	35,78
C10							6,56	8,64	11,65	15,33				
C11			5,43										35,78	
C12							4,9	8,64	11,65					
C13		4,9	5,43	6,56										
C14								8,64						
C15			5,43						4,9					
C16								8,64		5,43	6,56	8,64		
C17		11,65	5,43; 33		6,56	8,27			4,9					
C18										5,43	6,56	8,64		
C19									4,9					
C20										5,43	6,56	8,64		
C21									4,9					
C22											6,56	8,64		
C23									4,9					
C24											6,56	8,64		
C25														
C26									4,9					
C7 E08		15,33; 18,3; 18,97; 21												
C7 E09		17,65; 18,3; 18,97; 21; 26,97												

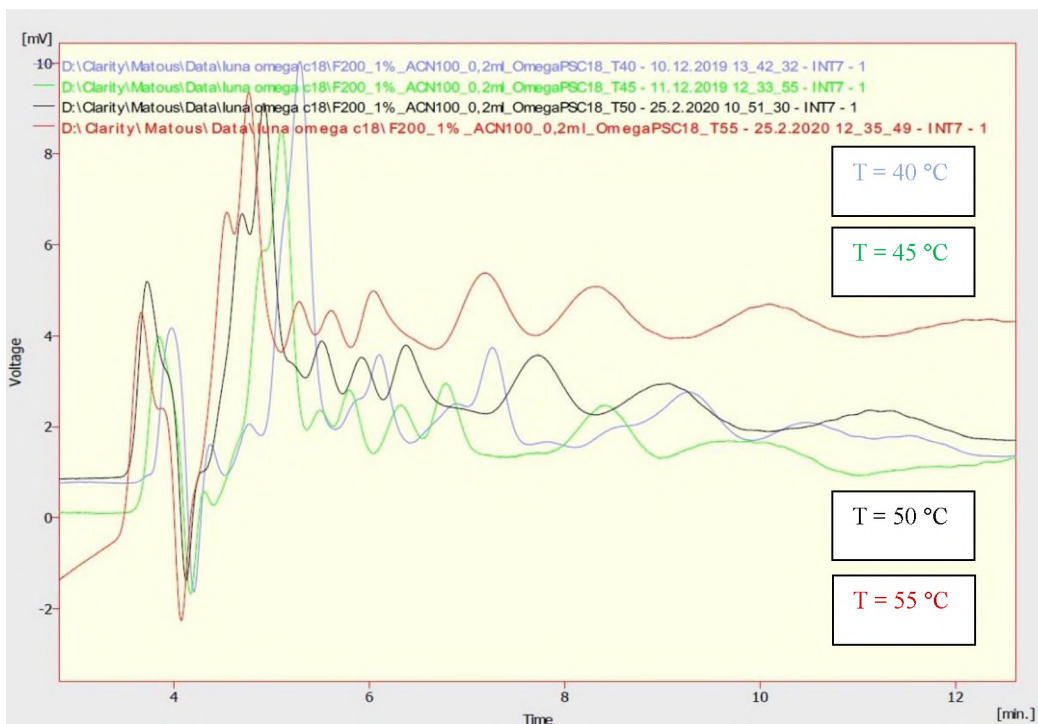
Tabulka P 7: Vyhodnocení MS u Levenol® C-301 se dvěma kokoátovými řetězci; hodnoty v tabulce odpovídají retenčním časům, při kterých byl daný signál m/z nalezen ve spektru.

EtO-	0	1	2	3	4	5	6
Glycerol							
2xkokoát C2							
C3							
C4							
C5							
C6		4,9					
C7							
C8		11,65				8,27	
C9							
C10							
C11	33						
C12							
C13							
C14		21	26,97	21; 31,91	31,91		
C15							
C16							
C17							
C18							
C19							
C20							
C21				8,27			
C22							

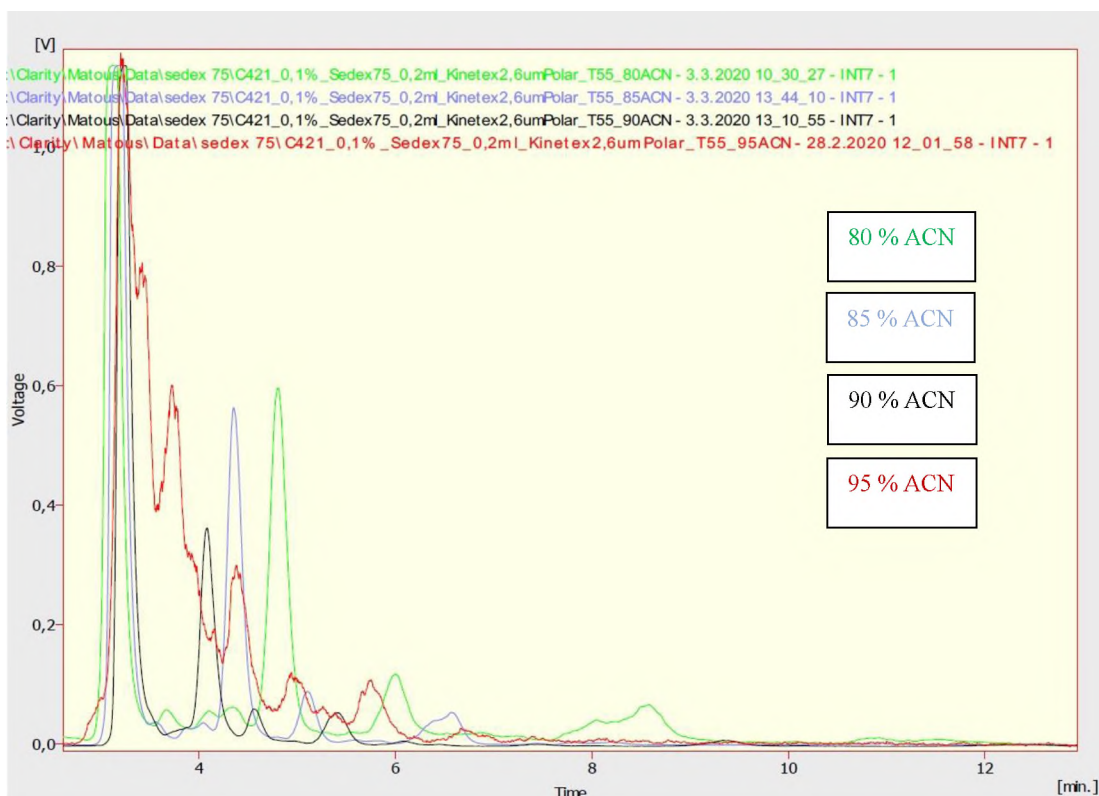
Tabulka P 8: Vyhodnocení MS u Levenol® C-201 se dvěma kokoátovými řetězci; hodnoty v tabulce odpovídají retenčním časům, při kterých byl daný signál m/z nalezen ve spektru.

EtO-	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Glycerol																
2xkokoát C2																
C3																
C4																
C5												23,84				
C6			5,59		8,57					5,66						
C7																
C8		8,57; 10,39	20,45; 21,03; 22,5		4,76; 5,59; 8,57			4,76	5,59; 17,01	5,66	7,95	9,19	10,39			
C9																
C10					4,76; 7,95; 9,19			4,76	5,59	6,66	7,95	27,13	10,39			
C11										34,84						
C12								4,76	5,59	5,66		9,19	10,39			
C13					26,28											
C14							2; 6,13	20,45								7,95
C15					24,67											
C16																7,95
C17					22,5; 23,84	27,13										
C18		5,59														
C19																
C20	4,76			7,95	9,19											
C21										23,84						

Tabulka P 9: Vyhodnocení MS u Levenol® C-201 s jedním kokoátovým řetězcem; hodnoty v tabulce odpovídají retenčním časům, při kterých byl daný signál m/z nalezen ve spektru.

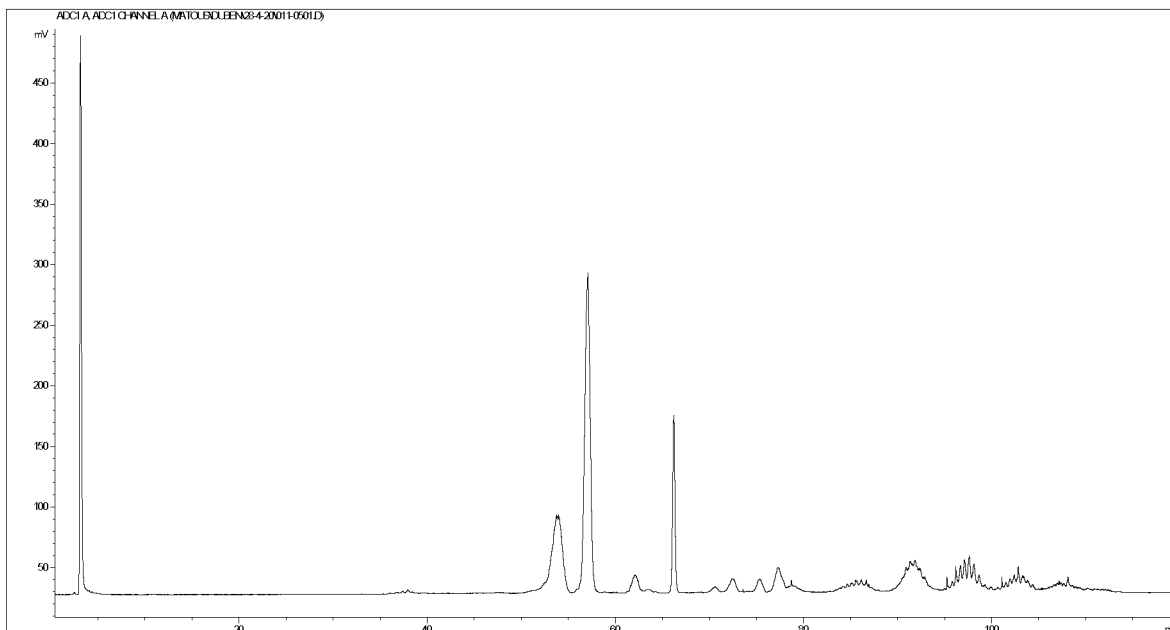


Obrázek P 1: Záznam z měření RP-LC na koloně Luna® Omega 3 µm PS C18 s refraktometrickým detektorem: Porovnání retence dle teploty od 40 °C do 55 °C u Levenol® F-200; MF (ACN – destilovaná voda) 90 % ACN s průtokem 0,3 ml/min a dávkováním 25µl pomocí smyčky

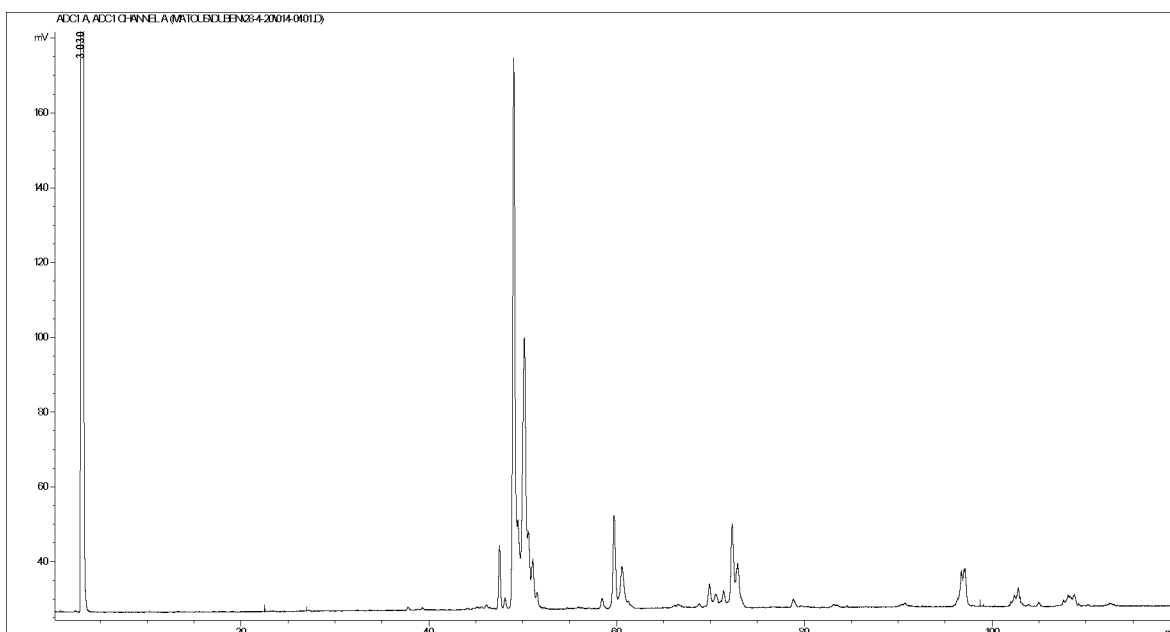


Obrázek P 2: Záznam z měření vzorku u Levenol® C-421 v RP-LC na koloně Kinetex® 2,6 µm Polar s rozptylovým detektorem Sedex 75: Porovnání různé koncentrace MF při teplotě 55 °C, s průtokem 0,3 ml/min a dávkováním 25µl pomocí smyčky

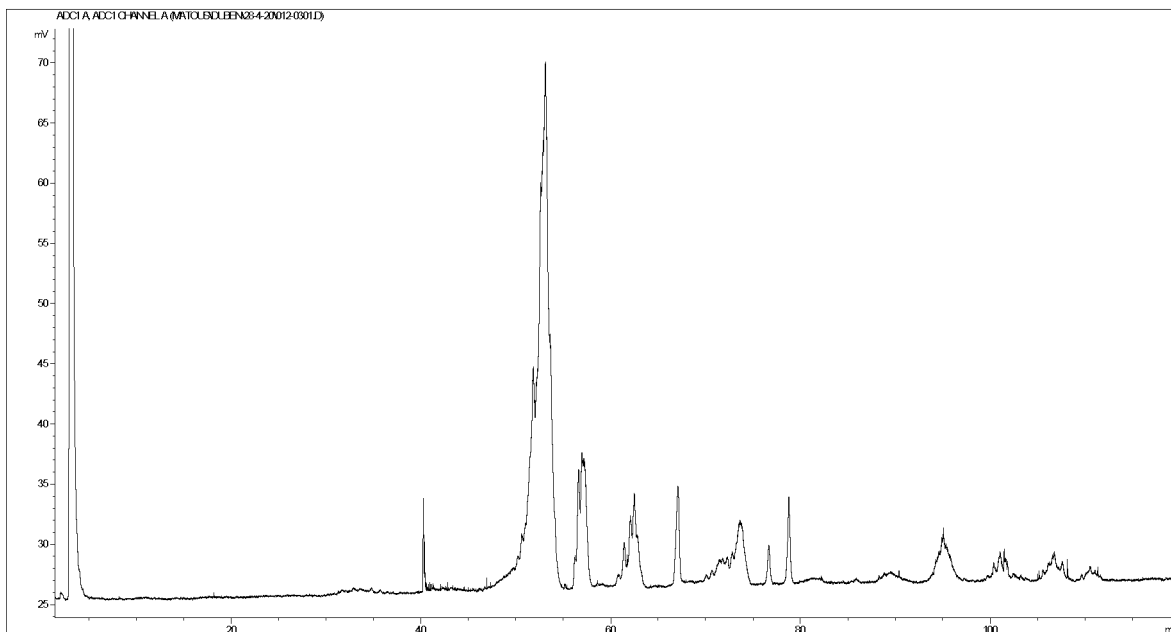
Záznamy z měření RP-LC na koloně Kinetex® 2,6 µm Polar s rozptylovým detektorem Sedex 75.



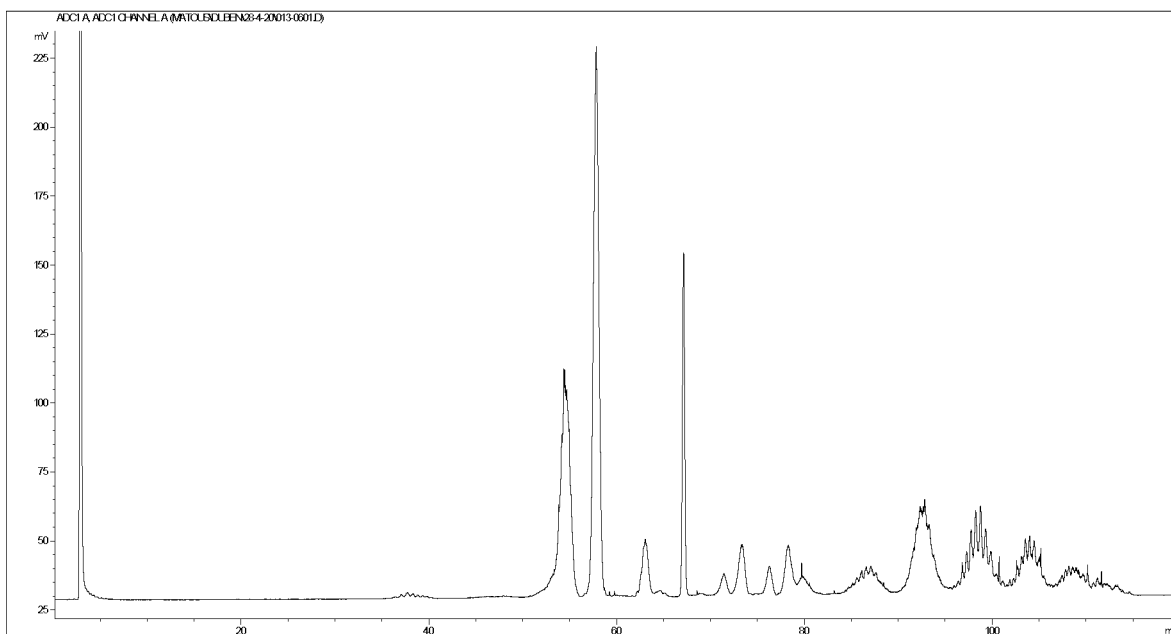
Obrázek P 3: Záznam měření Levenol® F-200 na koloně Kinetex® 2,6 µm Polar; dávkování 5 µl, MF 20 % - 100 % ACN / 120 min při teplotě 55 °C a průtokem 0,3 ml/min.



Obrázek P 4: Záznam měření Levenol® C-421 na koloně Kinetex® 2,6 µm Polar; dávkování 2 µl, MF 20 % - 100 % ACN / 120 min při teplotě 55 °C a průtokem 0,3 ml/min.

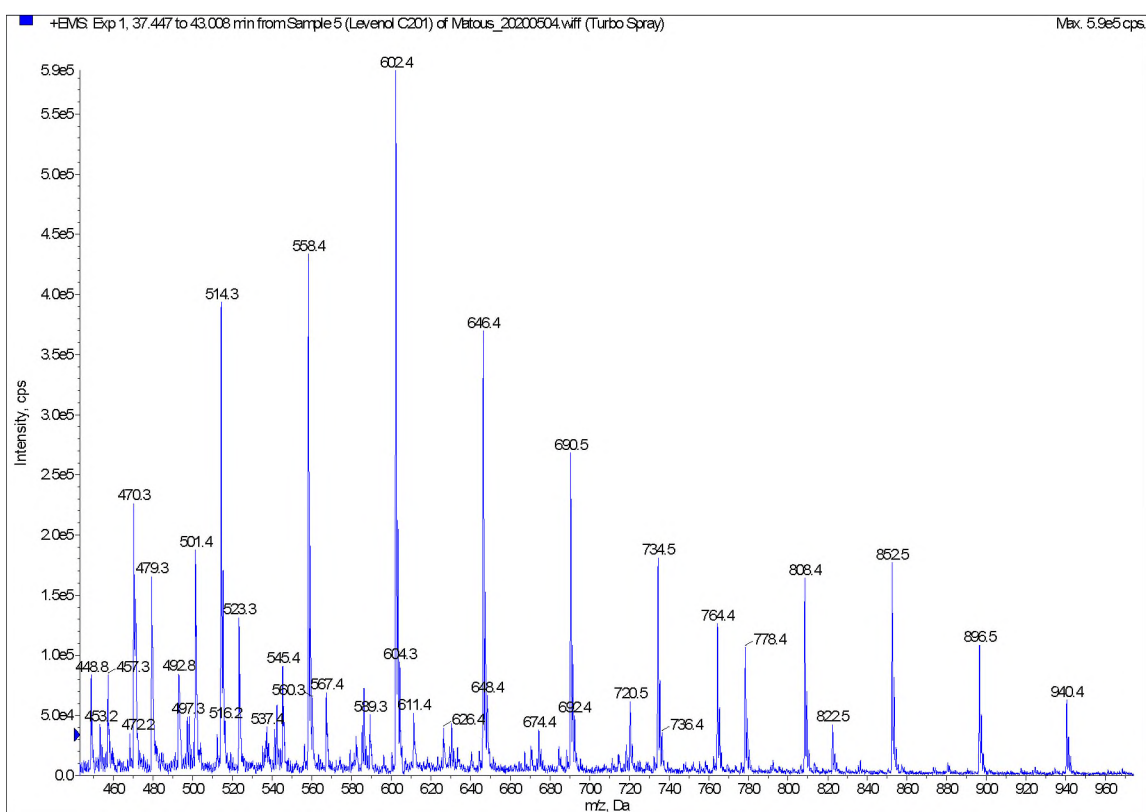


Obrázek P 5: Záznam měření Levenol® C-301 na koloně Kinetex® 2,6 μ m Polar; dávkování 2 μ l, MF 20 % - 100 % ACN / 120 min při teplotě 55 °C a průtokem 0,3 ml/min.

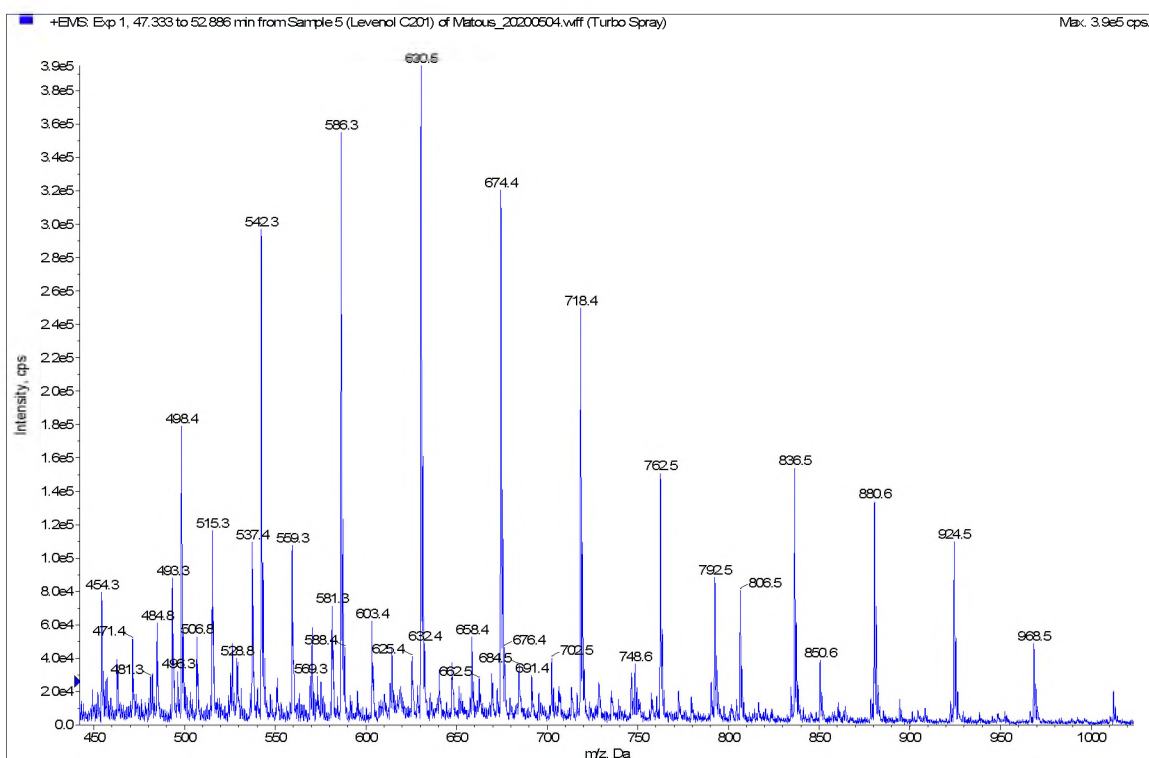


Obrázek P 6: Záznam měření Levenol® C-201 na koloně Kinetex® 2,6 μ m Polar; dávkování 5 μ l, MF 20 % - 100 % ACN / 120 min při teplotě 55 °C a průtokem 0,3 ml/min.

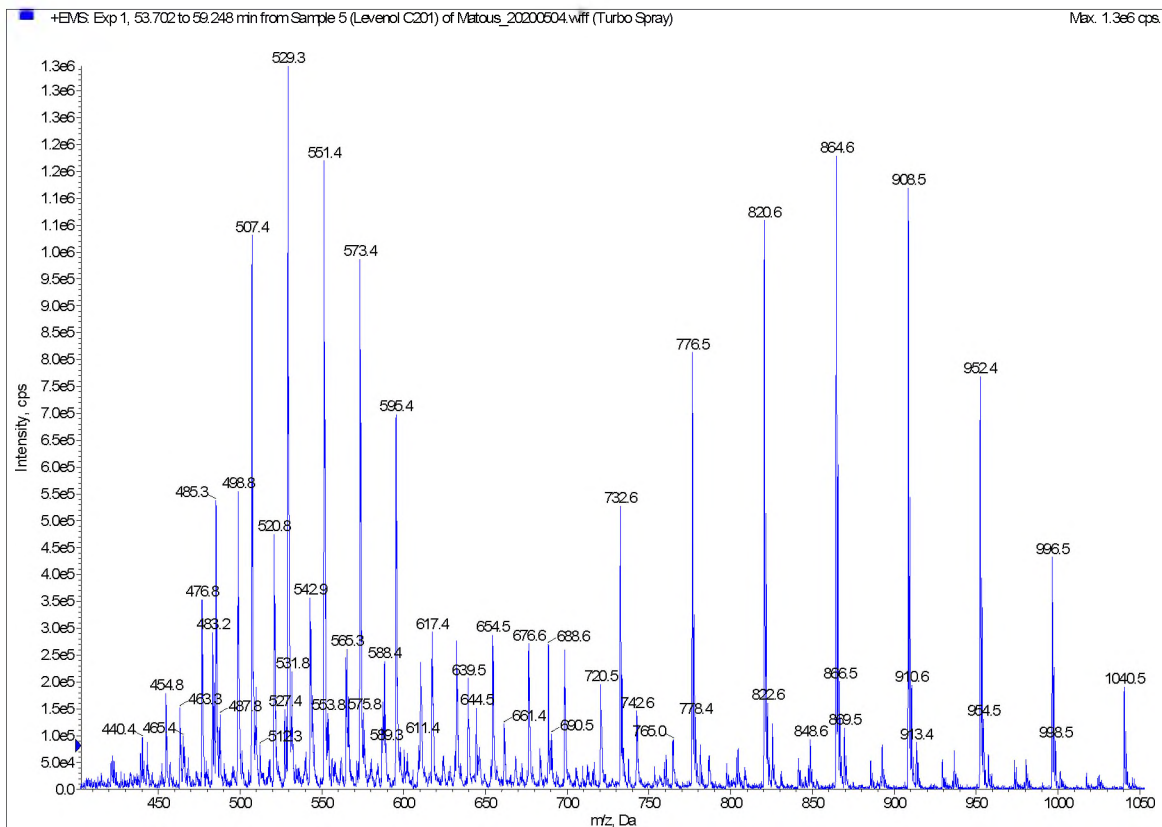
Záznamy z MS měření RP-LC vzorku Levenol® C-201.



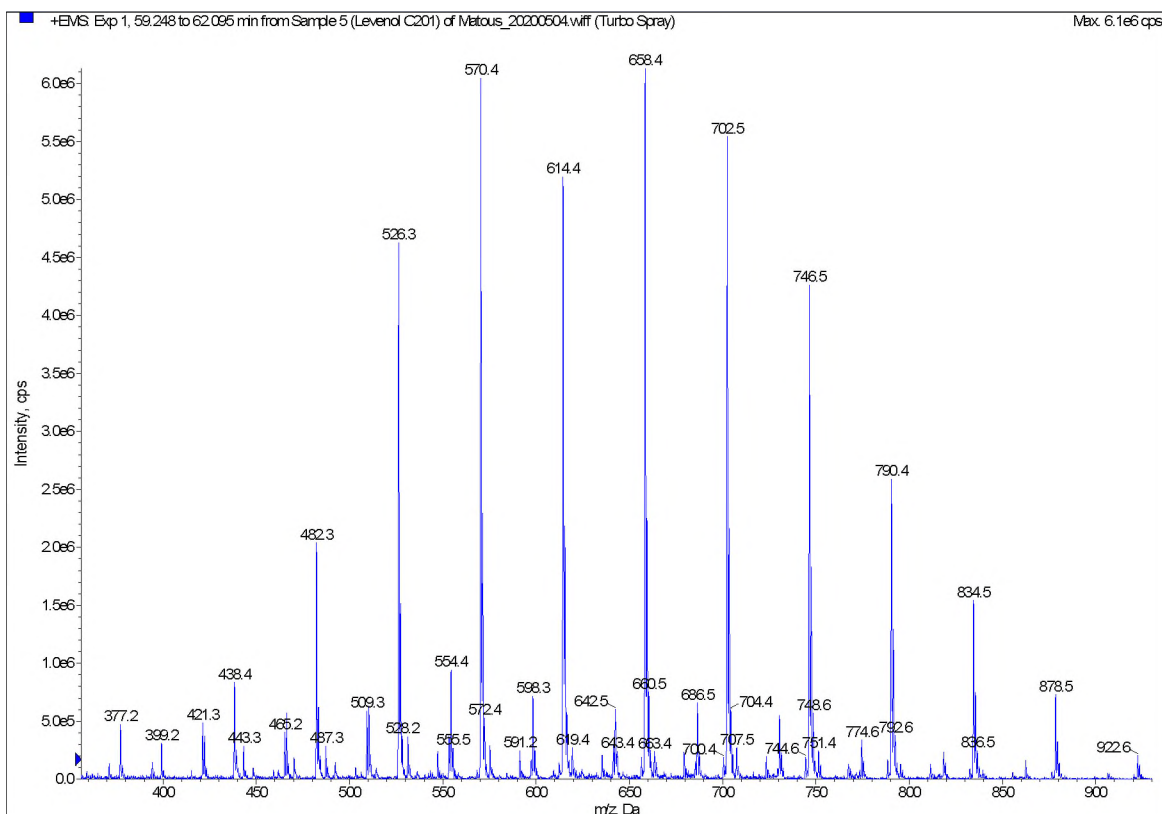
Obrázek P 7: MS spektrum tenzidu Levenol® C-201; dávkování 5 μ l, kolona Kinetex® 2,6 μ m Polar, MF 20 % - 100 % ACN / 120 min, teplota 55 °C, průtok 0,3 ml/min



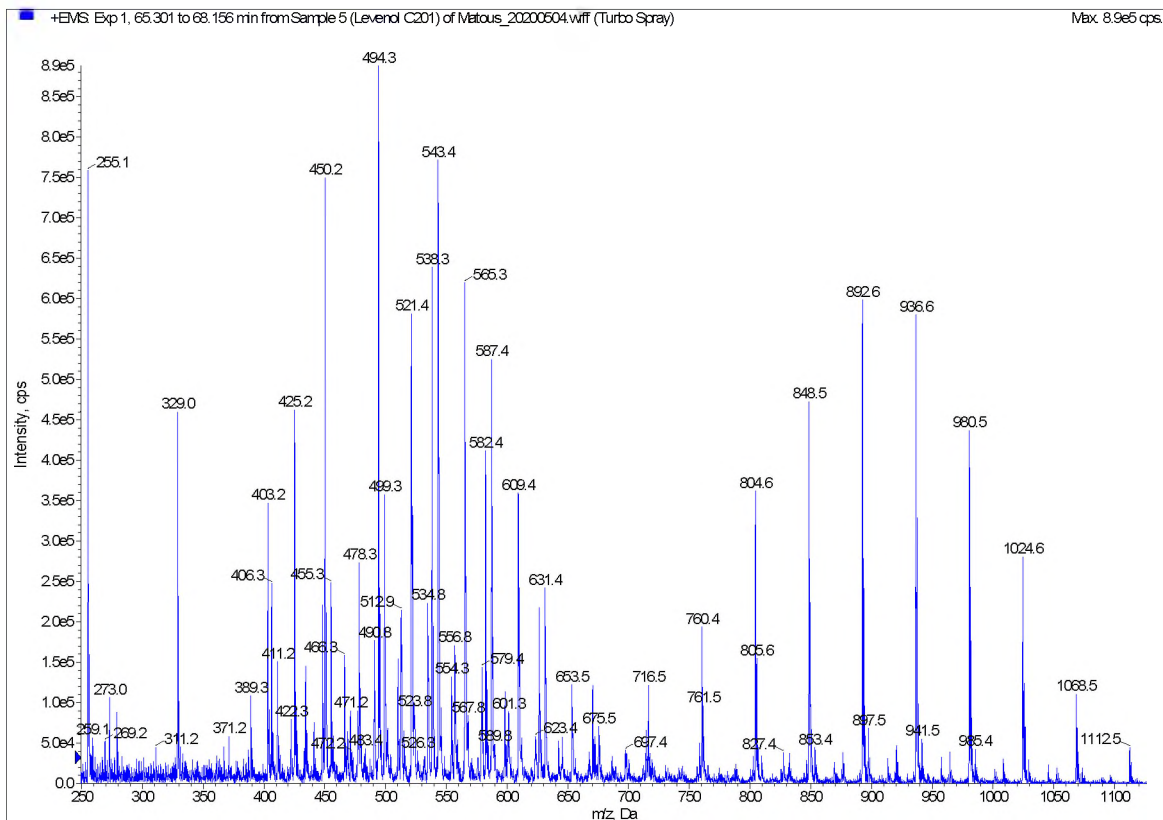
Obrázek P 8: MS spektrum tenzidu Levenol® C-201; dávkování 5 μ l, kolona Kinetex® 2,6 μ m Polar, MF 20 % - 100 % ACN / 120 min, teplota 55 °C, průtok 0,3 ml/min



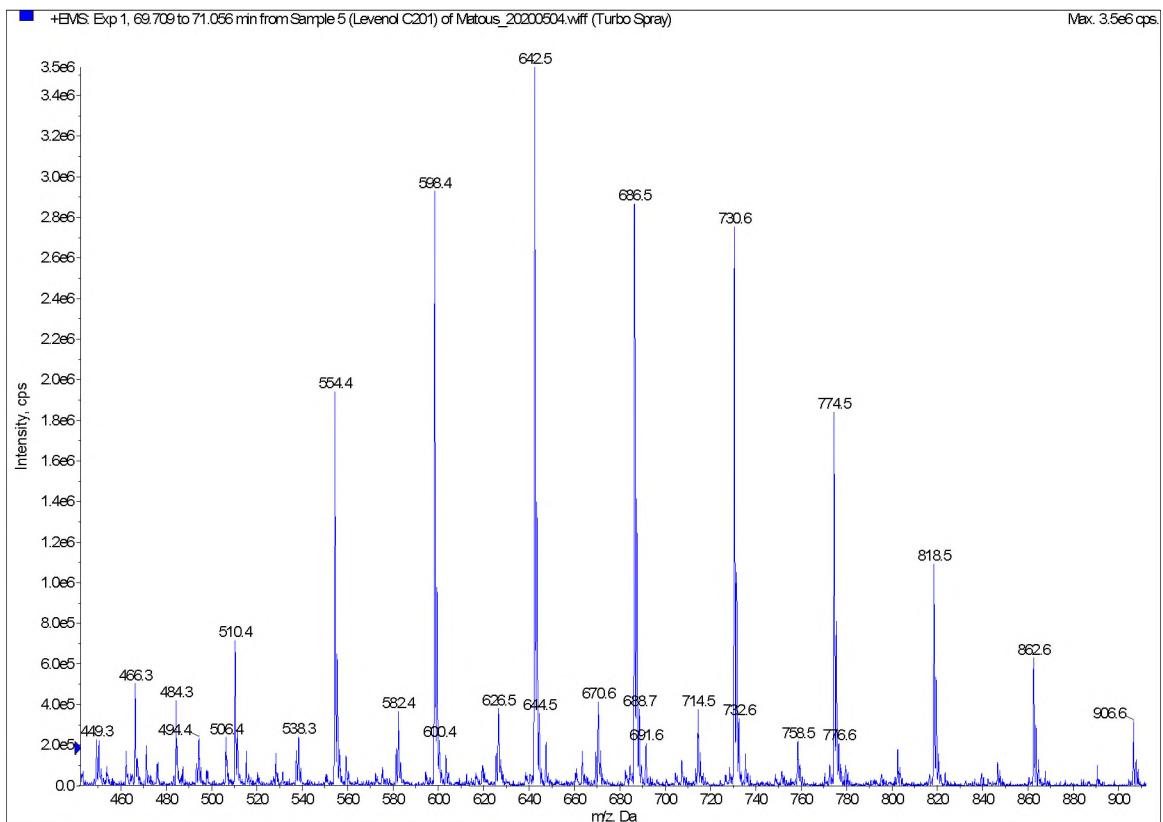
Obrázek P 9: MS spektrum tenzidu Levenol® C-201; dávkování 5 μ l, kolona Kinetex® 2,6 μ m Polar, MF 20 % - 100 % ACN / 120 min, teplota 55 $^{\circ}$ C, průtok 0,3 ml/min



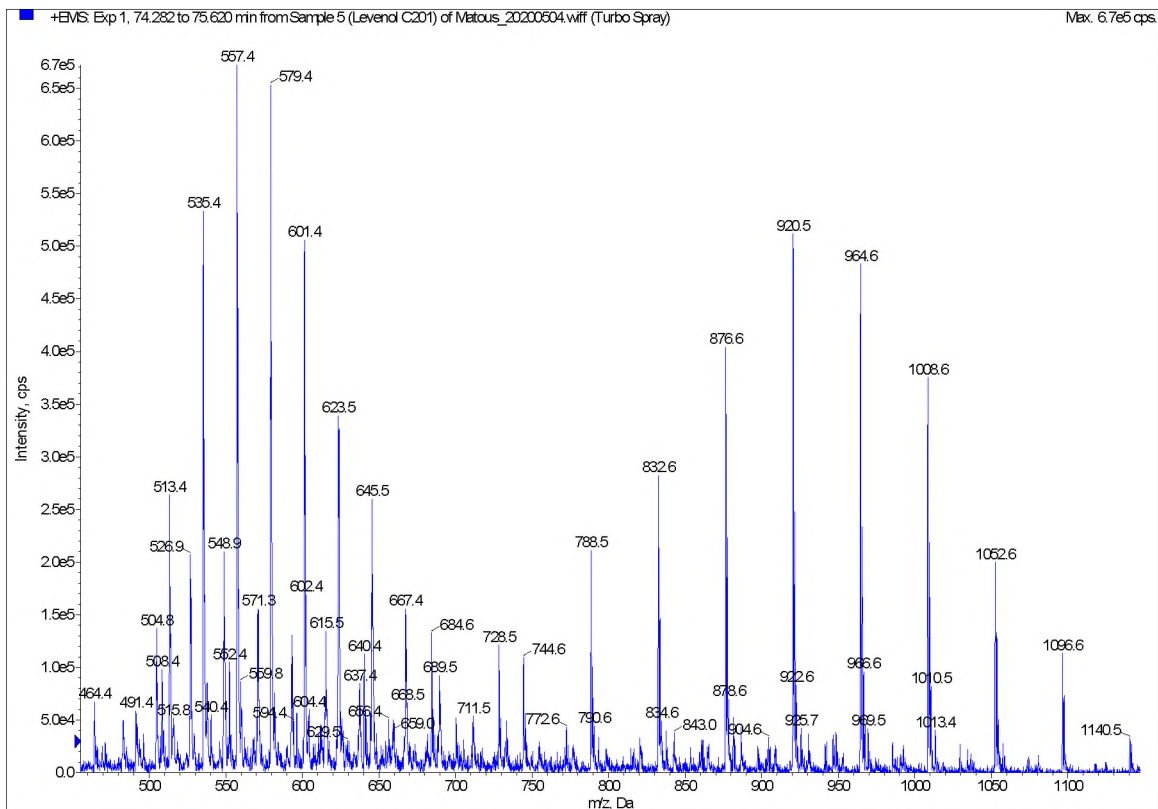
Obrázek P 10: MS spektrum tenzidu Levenol® C-201; dávkování 5 μ l, kolona Kinetex® 2,6 μ m Polar, MF 20 % - 100 % ACN / 120 min, teplota 55 $^{\circ}$ C, průtok 0,3 ml/min



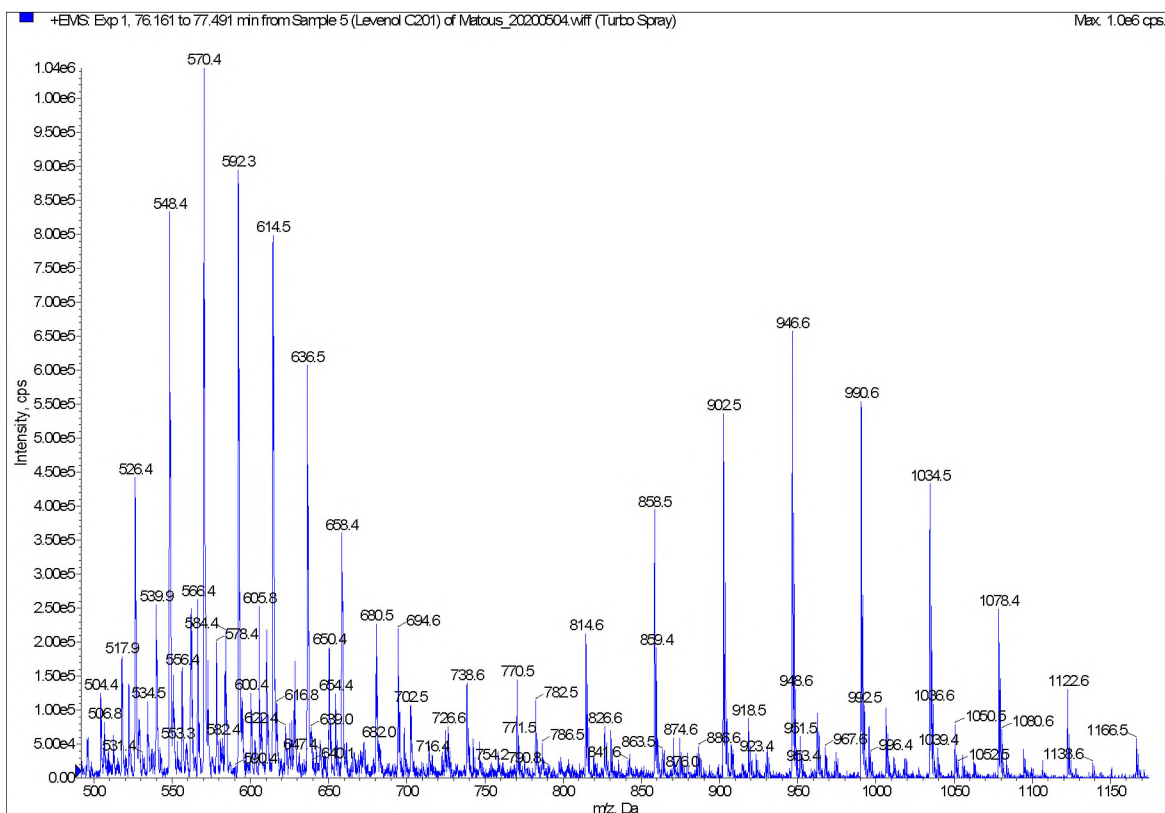
Obrázek P 11: MS spektrum tenzidu Levenol® C-201; dávkování 5 µl, kolona Kinetex® 2,6 µm Polar, MF 20 % - 100 % ACN / 120 min, teplota 55 °C, průtok 0,3 ml/min



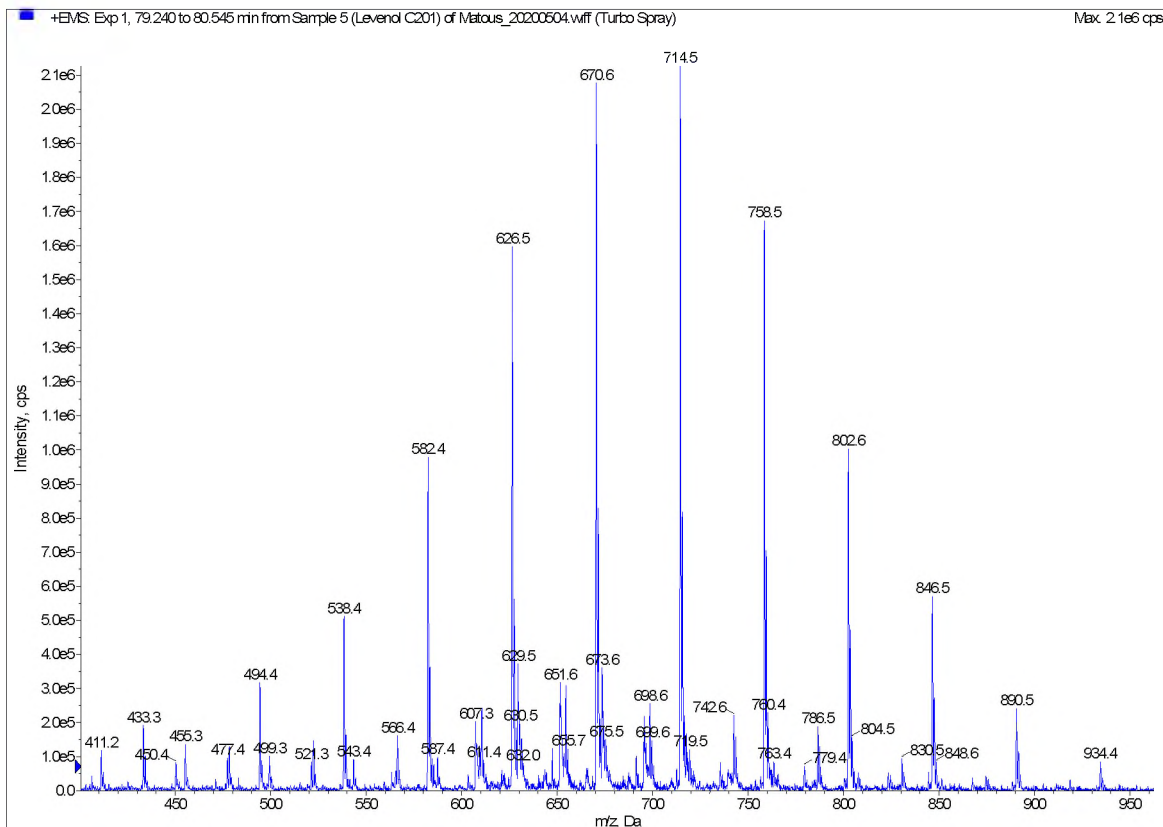
Obrázek P 12: MS spektrum tenzidu Levenol® C-201; dávkování 5 µl, kolona Kinetex® 2,6 µm Polar, MF 20 % - 100 % ACN / 120 min, teplota 55 °C, průtok 0,3 ml/min



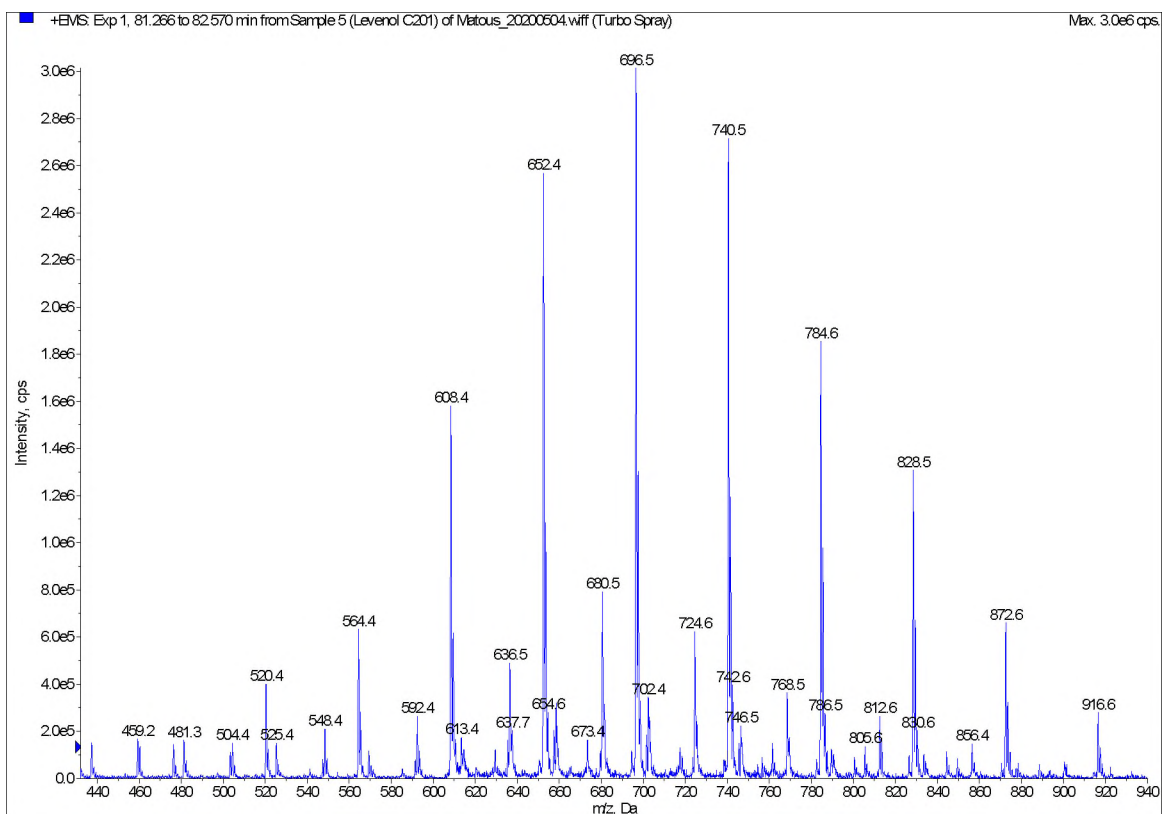
Obrázek P 13: MS spektrum tenzidu Levenol® C-201; dávkování 5 µl, kolona Kinetex® 2,6 µm Polar, MF 20 % - 100 % ACN / 120 min, teplota 55 °C, průtok 0,3 ml/min



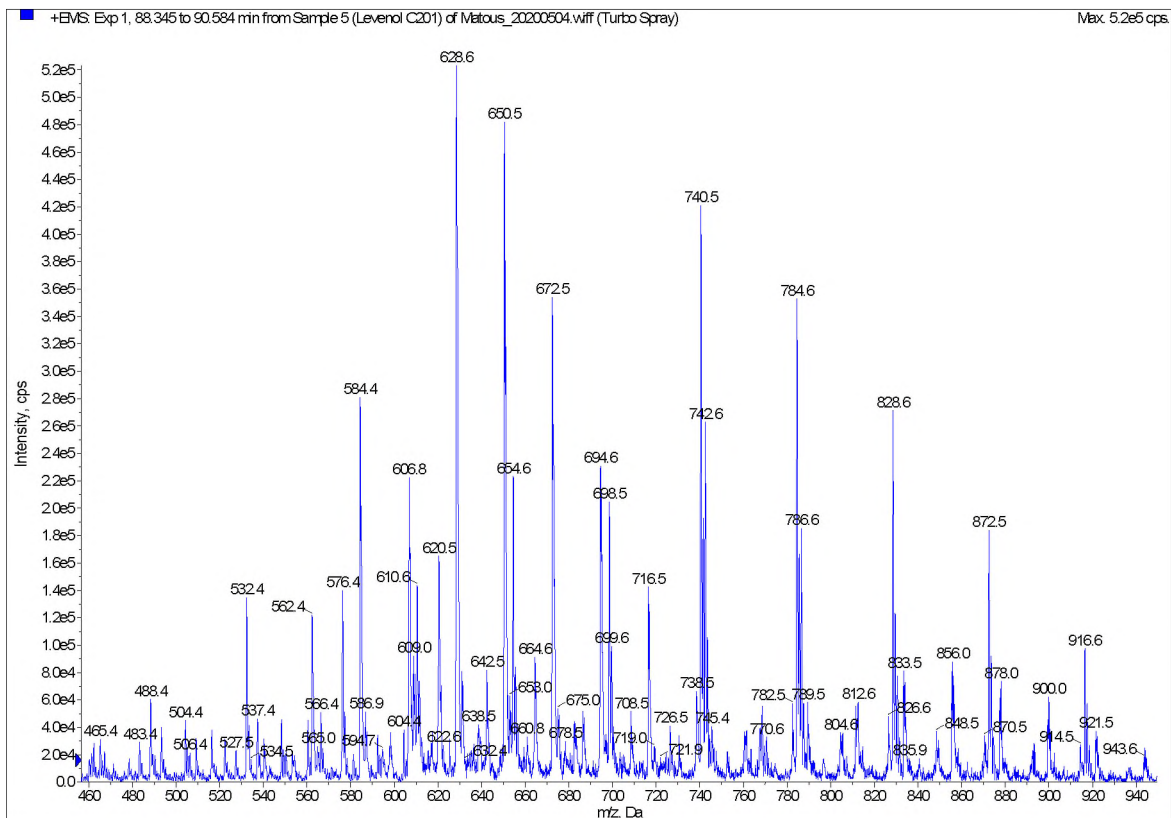
Obrázek P 14: MS spektrum tenzidu Levenol® C-201; dávkování 5 µl, kolona Kinetex® 2,6 µm Polar, MF 20 % - 100 % ACN / 120 min, teplota 55 °C, průtok 0,3 ml/min



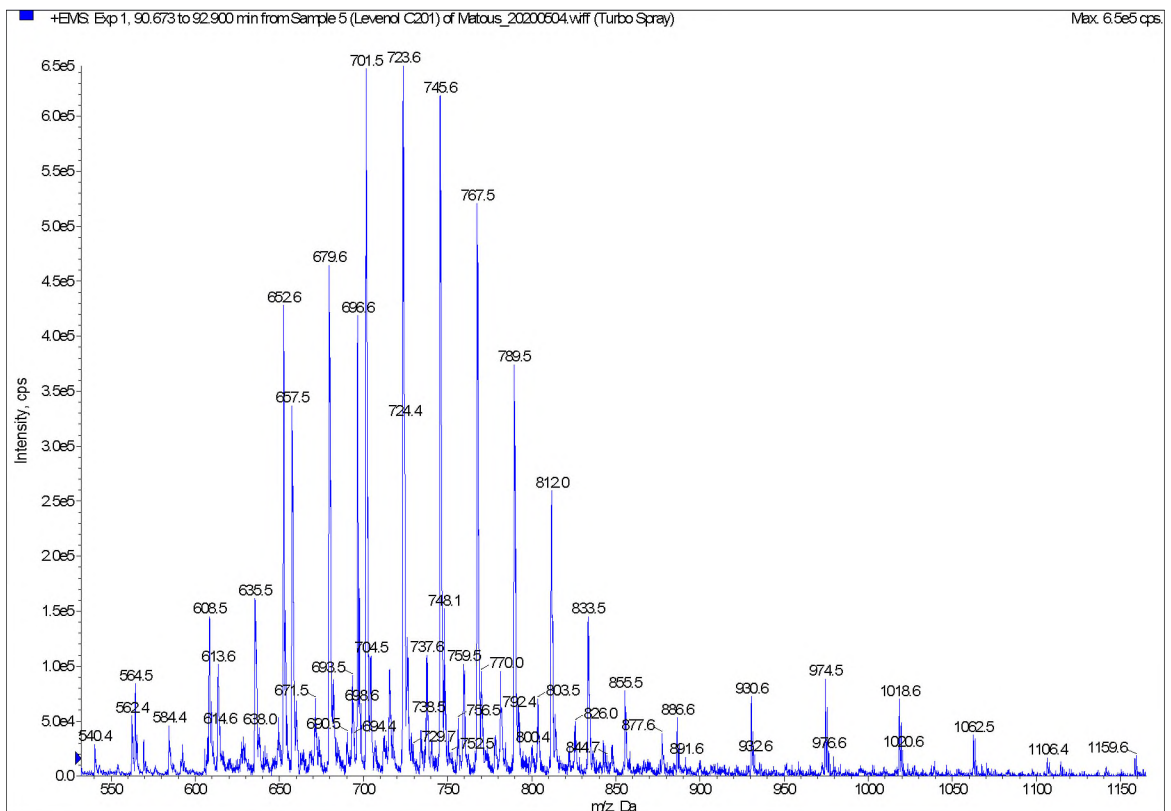
Obrázek P 15: MS spektrum tenzidu Levenol® C-201; dávkování 5 µl, kolona Kinetex® 2,6 µm Polar, MF 20 % - 100 % ACN / 120 min, teplota 55 °C, průtok 0,3 ml/min



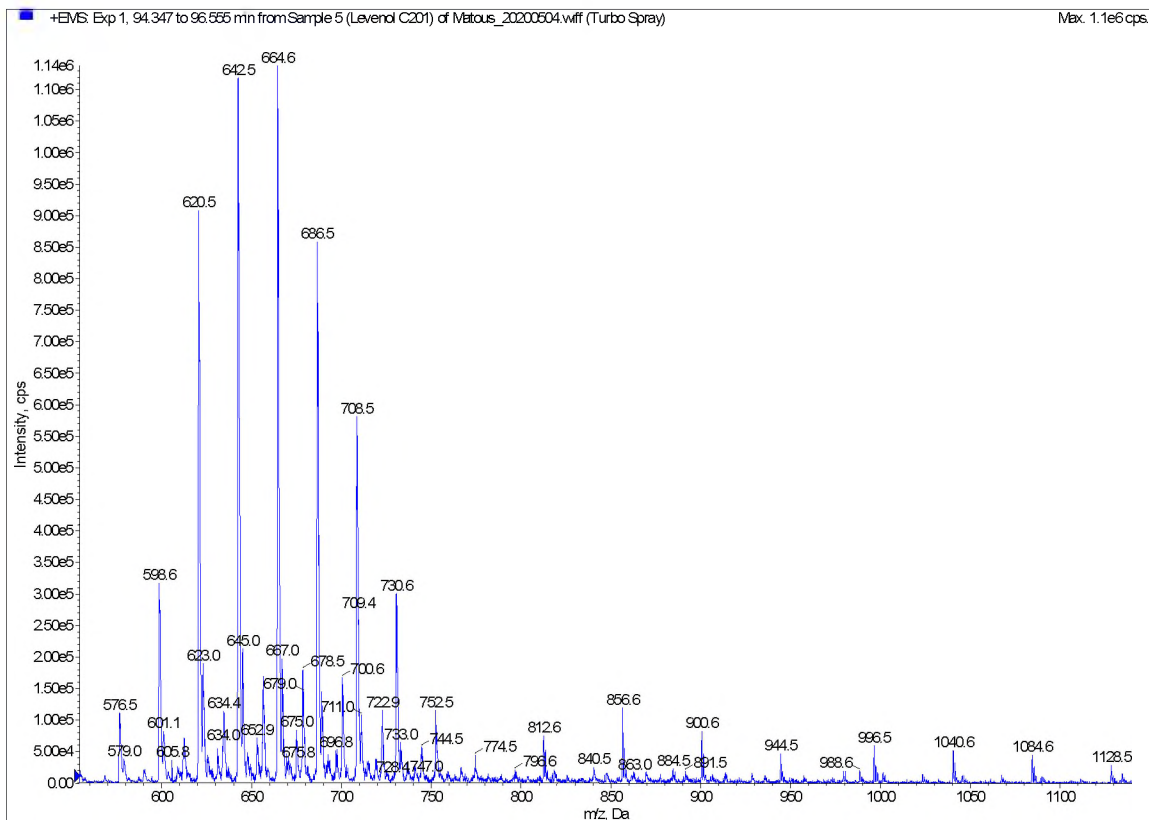
Obrázek P 16: MS spektrum tenzidu Levenol® C-201; dávkování 5 µl, kolona Kinetex® 2,6 µm Polar, MF 20 % - 100 % ACN / 120 min, teplota 55 °C, průtok 0,3 ml/min



Obrázek P 17: MS spektrum tenzidu Levenol® C-201; dávkování 5 μ l, kolona Kinetex® 2,6 μ m Polar, MF 20 % - 100 % ACN / 120 min, teplota 55 $^{\circ}$ C, průtok 0,3 ml/min

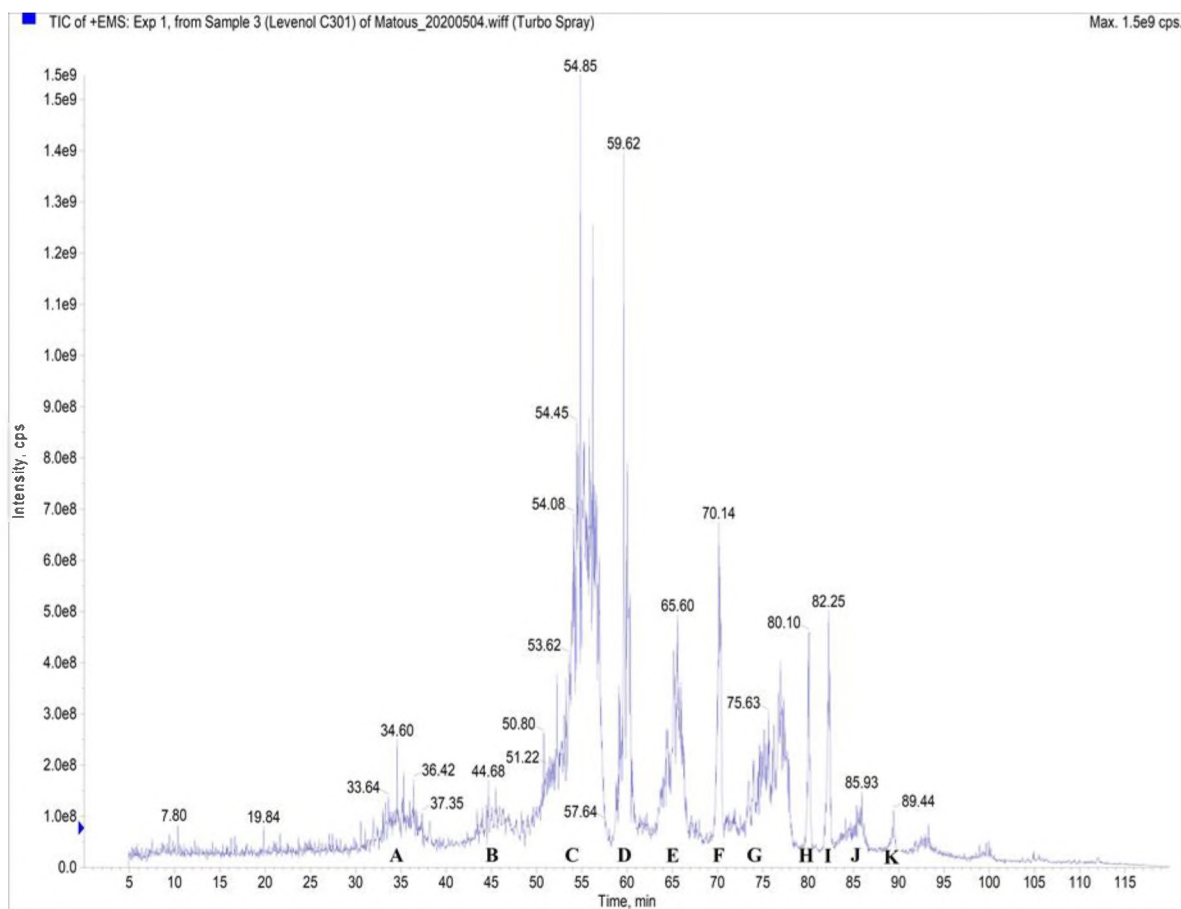


Obrázek P 18: MS spektrum tenzidu Levenol® C-201; dávkování 5 μ l, kolona Kinetex® 2,6 μ m Polar, MF 20 % - 100 % ACN / 120 min, teplota 55 $^{\circ}$ C, průtok 0,3 ml/min



Obrázek P 19: MS spektrum tenzidu Levenol® C-201; dávkování 5 µl, kolona Kinetex® 2,6 µm Polar, MF 20 % - 100 % ACN / 120 min, teplota 55 °C, průtok 0,3 ml/min

Záznamy výsledků ostatních vzorků tenzidů.

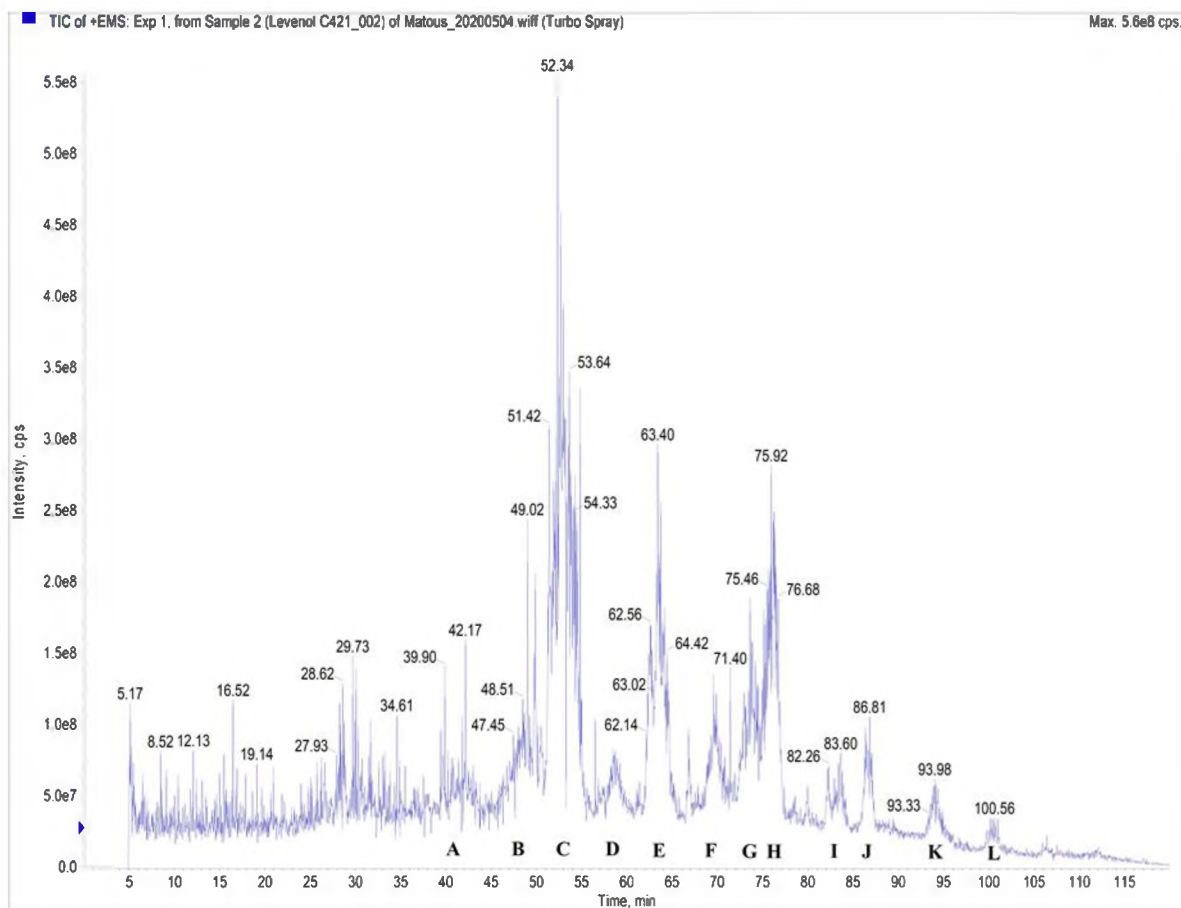


- A:** 1x, C3, EO 7 - 15 / 1x, C25, EO 0 - 8 / 2x, C12, EO 0 - 8
B: 1x, C5, EO 7 - 15 / 1x, C27, EO 0 - 8 / 2x, C2, EO 0 - 8
C: 1x, C7, EO 7 - 15 / 2x, C14 EO 0 - 8
D: 1x, C8, EO 3 - 9 / 1x, C13, EO 1 - 5
E: 1x, C9, EO 7 - 14 / 2x, C4, EO 6 - 16 / 2x, C12, EO 0 - 7
F: 1x, C10, EO 3 - 9
G: 1x, C10, EO 7 - 10 / 1x, C11, EO 7 - 13 / 1x, C16, EO 6 - 12 / 2x, C16, EO 0 - 6
H: 1x, C12, EO 3 - 11 / 1x, C17, EO 1 - 4 / 2x, C8, EO 1 - 4 / 2x, C18, EO 4 - 10
I: 1x, C11, EO 3 - 8 / 1x, C17, EO 2 - 8 / 2x, C8, EO 2 - 8
J: 1x, C13, EO 6 - 13 / 1x, C16, EO 6 - 13 / 2x, C19, EO 0 - 6
K: 1x, C14, EO 3 - 9 / 1x, C19, EO 1 - 3

Popis:

Označení piku: počet kokoátových řetězců, délka kokoátového řetězce, množství oxoethylenovaných jednotek

Obrázek P 20: Výsledek MS spektra tenzidu Levenol® C-301; dávkování 5 µl, kolona Kinetex® 2,6 µm Polar, MF 20 % - 100 % ACN / 120 min, teplota 55 °C, průtok 0,3 ml/min

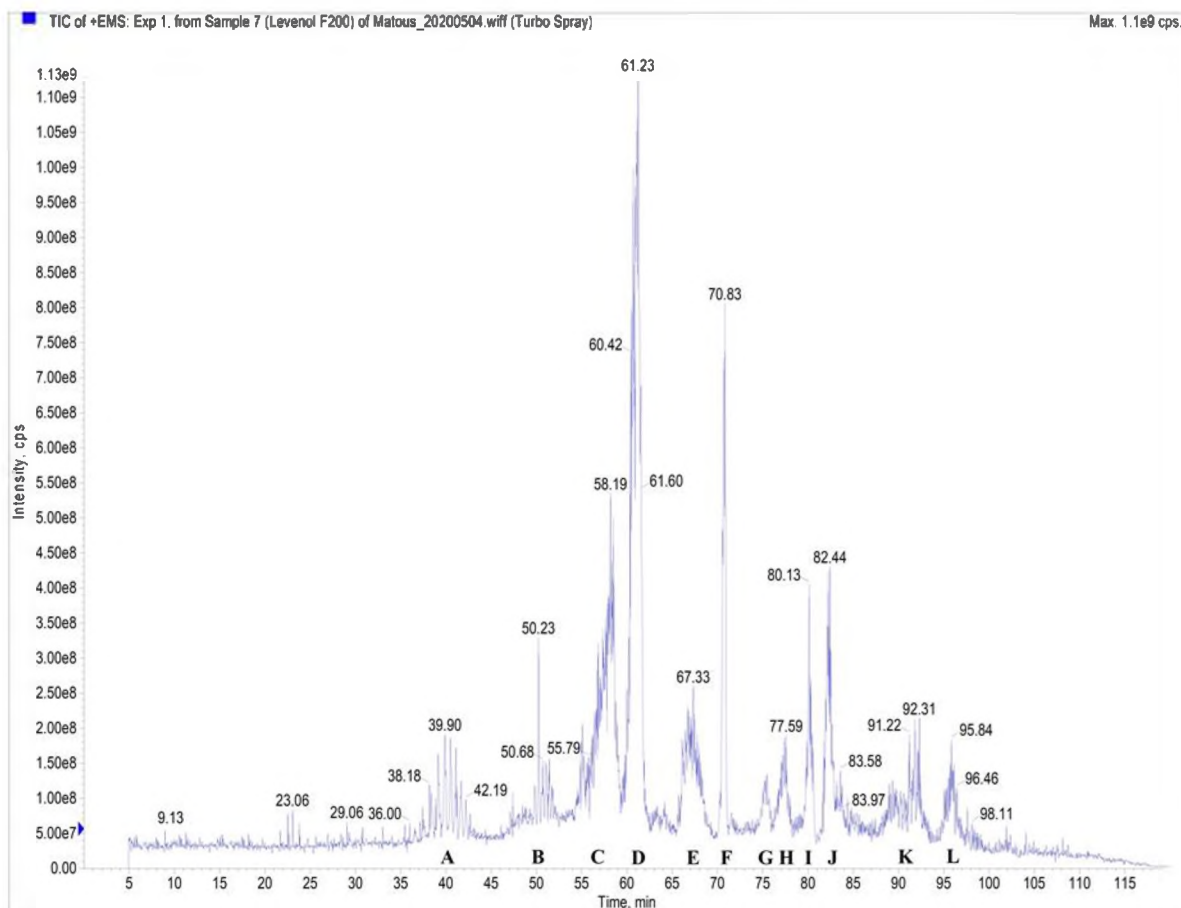


- A: 1x, C10, EO 1 - 4 / 2x, C5, EO 1 - 4
 B: 1x, C11, EO 3 - 7 / 2x, C11, EO 1 - 3
 C: 1x, C12, EO 1 - 5
 D: 1x, C13, EO 0 - 3 / 2x, C6, EO 0 - 3
 E: 1x, C14, EO 1 - 5 / 2x, C3, EO 6 - 8
 F: 1x, C13, EO 2 - 6 / 1x, C4, EO 4 - 6
 G: 1x, C16, EO 1 - 5 / 1x, C5, EO 5 - 9
 H: 1x, C10, EO 4 - 8 / 2x, C5, EO 4 - 8
 I: 1x, C18, EO 1 - 4 / 1x, C7, EO 5 - 8
 J: 1x, C16, EO 3 - 6 / 1x, C10, EO 5 - 8 / 2x, C5, EO 5 - 8
 K: 1x, C18, EO 4 - 7 / 1x, C12, EO 5 - 8
 L: 1x, C20, EO 3 - 7 / 1x, C14, EO 5 - 9 / 2x, C7, EO 5 - 9

Popis:

Označení piku: počet kokoátových řetězců, délka kokoátového řetězce, množství oxoethylenovaných jednotek

Obrázek P 21: Výsledek MS spektra tenzidu Levenol® C-421; dávkování 5 µl, kolona Kinetex® 2,6 µm Polar, MF 20 % - 100 % ACN / 120 min, teplota 55 °C, průtok 0,3 ml/min



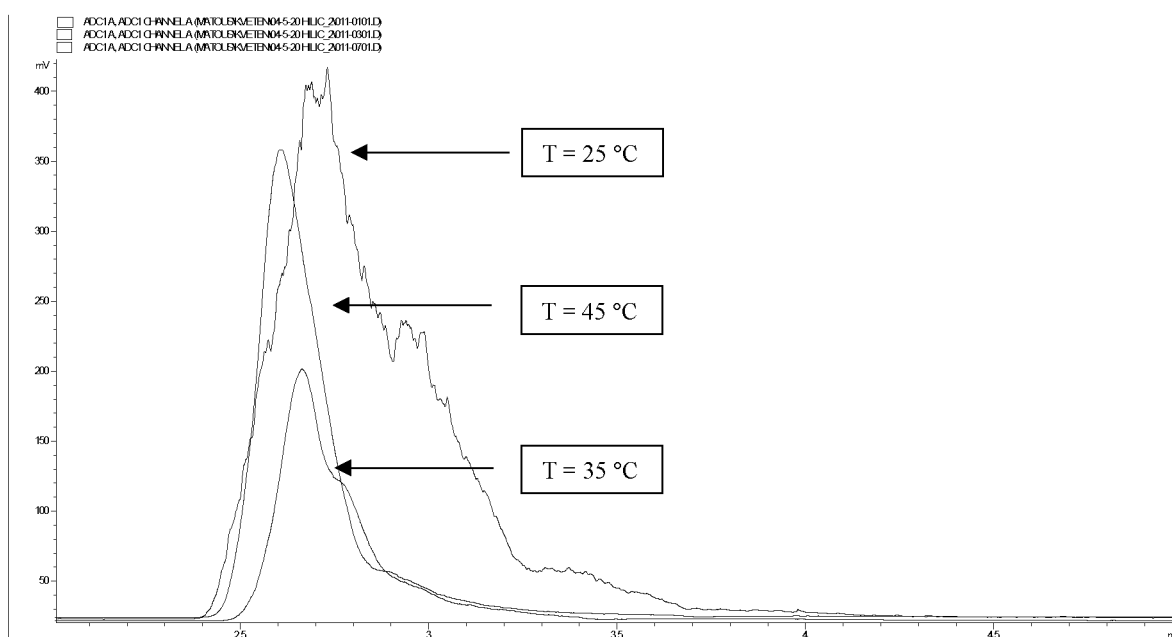
- A: 1x, C3, EO 13 - 21 / 1x, C4, EO 6 - 13 / 2x, C12, EO 6 - 14
 B: 1x, C6, EO 7 - 14
 C: 1x, C5, EO 7 - 10 / 1x, C14, EO 6 - 10 / 2x, C14 EO 4 - 14 / 2x, C12, EO 1 - 7
 D: 1x, C8, EO 5 - 16
 E: 1x, C12, EO 3 - 7
 F: 1x, C10, EO 5 - 16
 G: 1x, C11, EO 9 - 20 / 2x, C9, EO 4 - 8
 H: 1x, C16, EO 9 - 19
 I: 1x, C12, EO 5 - 16
 J: 1x, C19, EO 4 - 9 / 1x, C17, EO 4 - 14 / 2x, C8, EO 4 - 14
 K: 1x, C11, EO 9 - 14 / 1x, C9, EO 7 - 10 / 2x C4, EO 7 - 10 / 2x C16 EO 2 - 6
 L: 1x, C10, EO 8 - 11 / 1x, C21, EO 4 - 7 / 2x, C10, EO 4 - 7 / 2x, C5, EO 8 - 11

Popis:

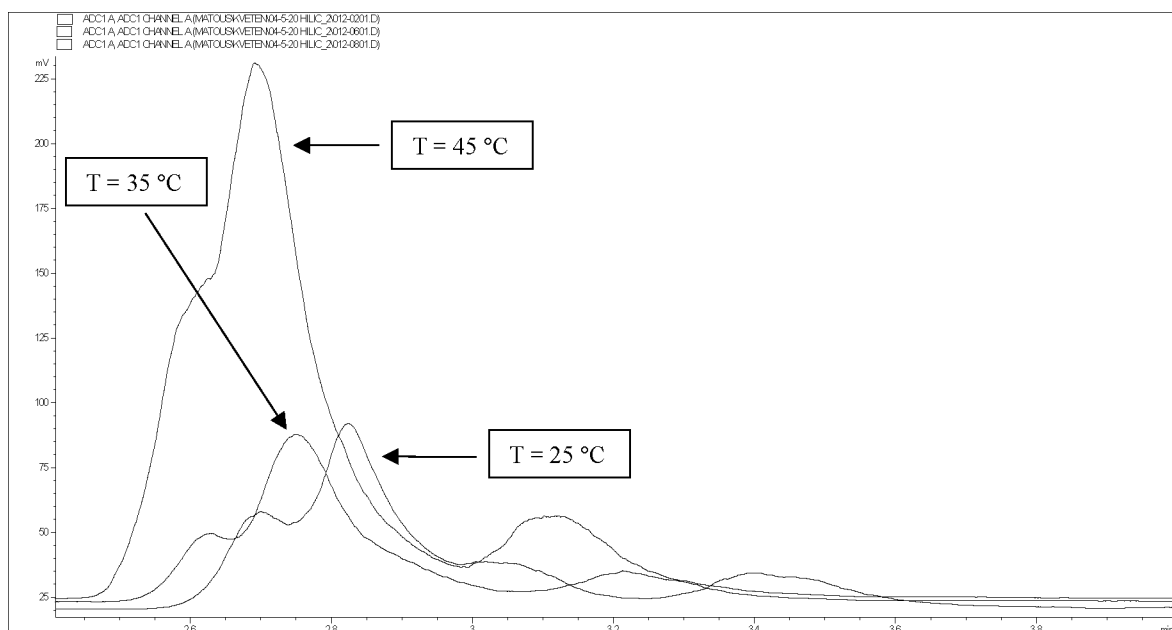
Označení piku: počet kokoátových řetězců, délka kokoátového řetězce, množství oxoethylenovaných jednotek

Obrázek P 22: Výsledek MS spektra tenzidu Levenol® F-200; dávkování 5 µl, kolona Kinetex® 2,6 µm Polar, MF 20 % - 100 % ACN / 120 min, teplota 55 °C, průtok 0,3 ml/min

Záznamy z měření HILIC ke zjištění teploty k separaci.

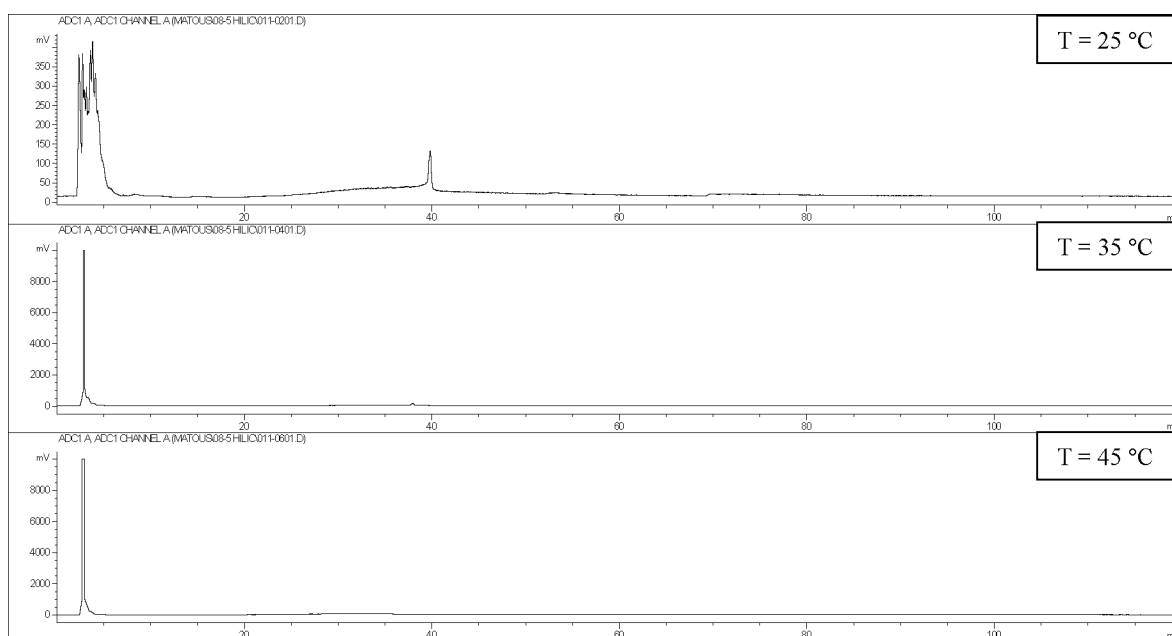


Obrázek P 23: Záznam měření Levenol® F-200, teploty: 25 °C, 35 °C, 45 °C; dávkování 5 μ l, MF (ACN – voda) s gradientem 99 % ACN – 50 % ACN / 120 min s aditivem 0,2 % (m/m) kyseliny octové při průtoku 350 μ l/min.

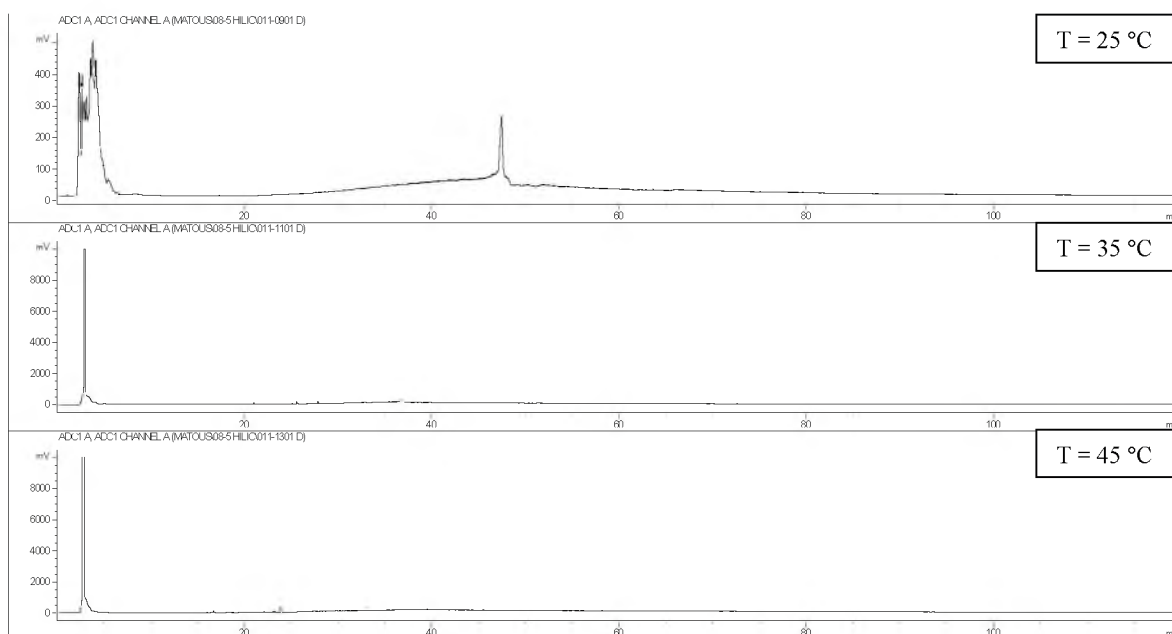


Obrázek P 24: Záznam měření Levenol® C-301, teploty: 25 °C, 35 °C, 45 °C; dávkování 5 μ l, MF (ACN – voda) s gradientem 99 % ACN – 50 % ACN / 120 min s aditivem 0,2 % (m/m) kyseliny octové při průtoku 350 μ l/min.

Záznamy z měření HILIC k určení vhodného pufru.

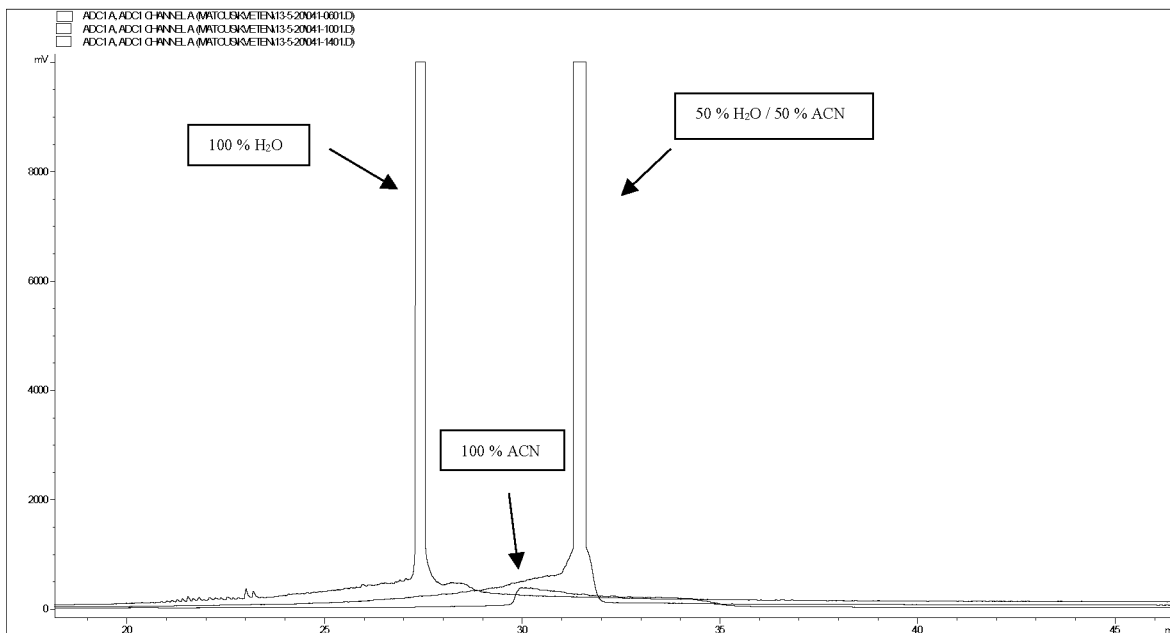


Obrázek P 25: Záznam měření Levenol® F-200 na koloně Luna® 3 μm HILIC, MF s 30 mM mravenčanem amonným, teploty: 25 °C, 35 °C, 45 °C; MF (ACN – voda) s gradientem 99 % ACN – 50 % ACN / 120 min s aditivem 30 mM octanu amonného a mravenčanu amonného při teplotách 25 – 45 °C při průtoku 350 $\mu\text{l}/\text{min}$ a s dávkováním 1 μl .



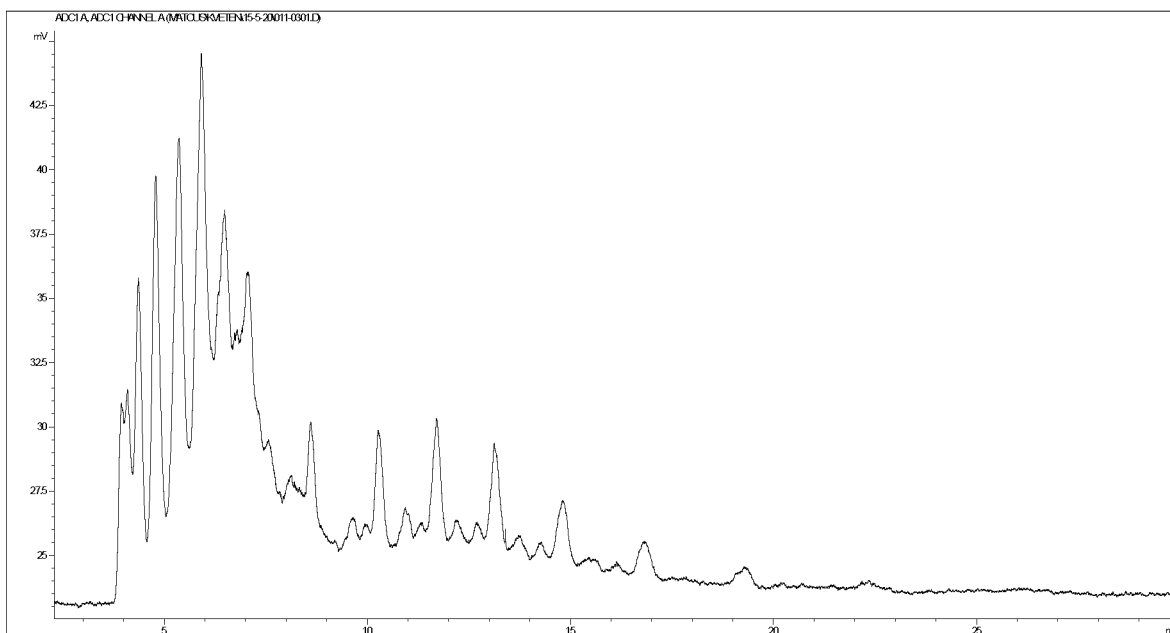
Obrázek P 26: Záznam měření Levenol® F-200 na koloně Luna® 3 μm HILIC, MF s 30 mM octanem amonným, teploty: 25 °C, 35 °C, 45 °C; MF (ACN – voda) s gradientem 99 % ACN – 50 % ACN / 120 min s aditivem 30 mM octanu amonného a mravenčanu amonného při teplotách 25 – 45 °C při průtoku 350 $\mu\text{l}/\text{min}$ a s dávkováním 1 μl .

Záznam měření HILIC na koloně Ascentis® Express OH5.

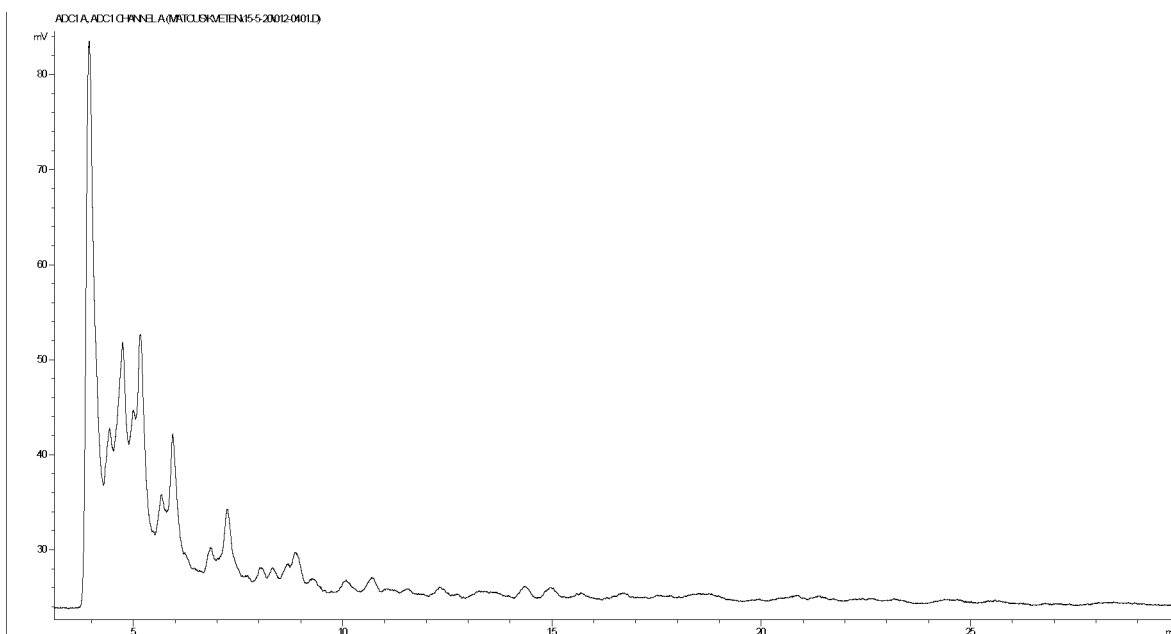


Obrázek P 27: Záznam měření rozdílných rozpouštědel vzorku v MF 97 % ACN - 3 % H₂O na koloně Ascentis® Express OH5; dávkování 0,5 µl vzorků o koncentraci 1 % (m/m), izokratická eluce MF (ACN – destilovaná voda) 97 % ACN + 20 mM octan amonný s průtokem 0,5 ml/min a délkou analýzy 60 min při teplotě 25 °C.

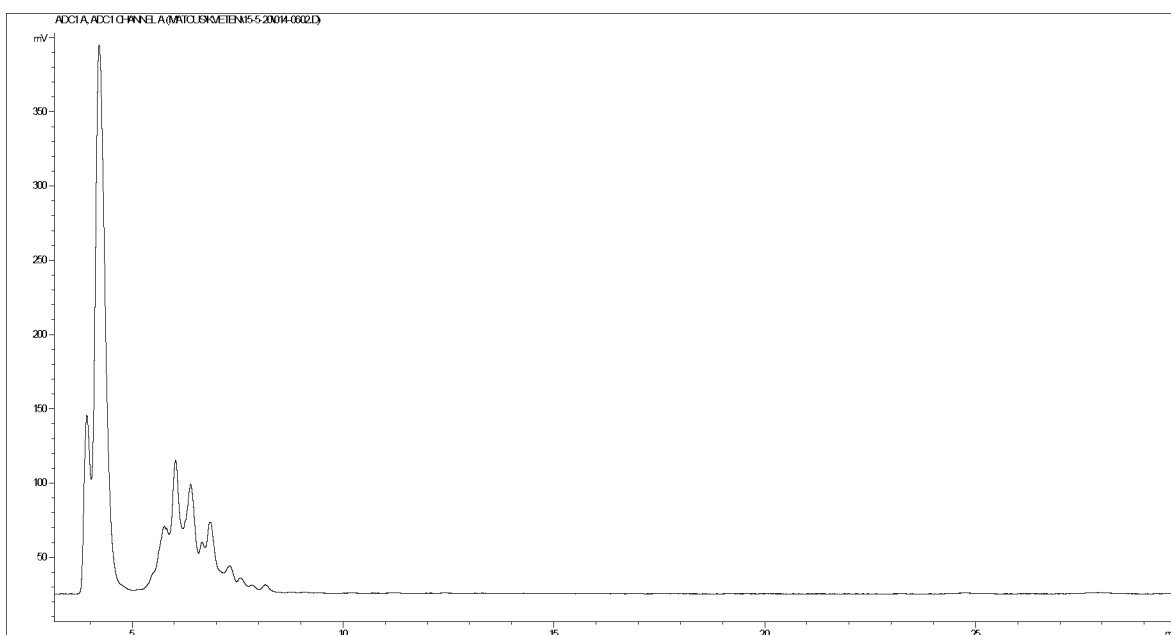
Záznamy měření HILIC na koloně Ascentis® Express OH5.



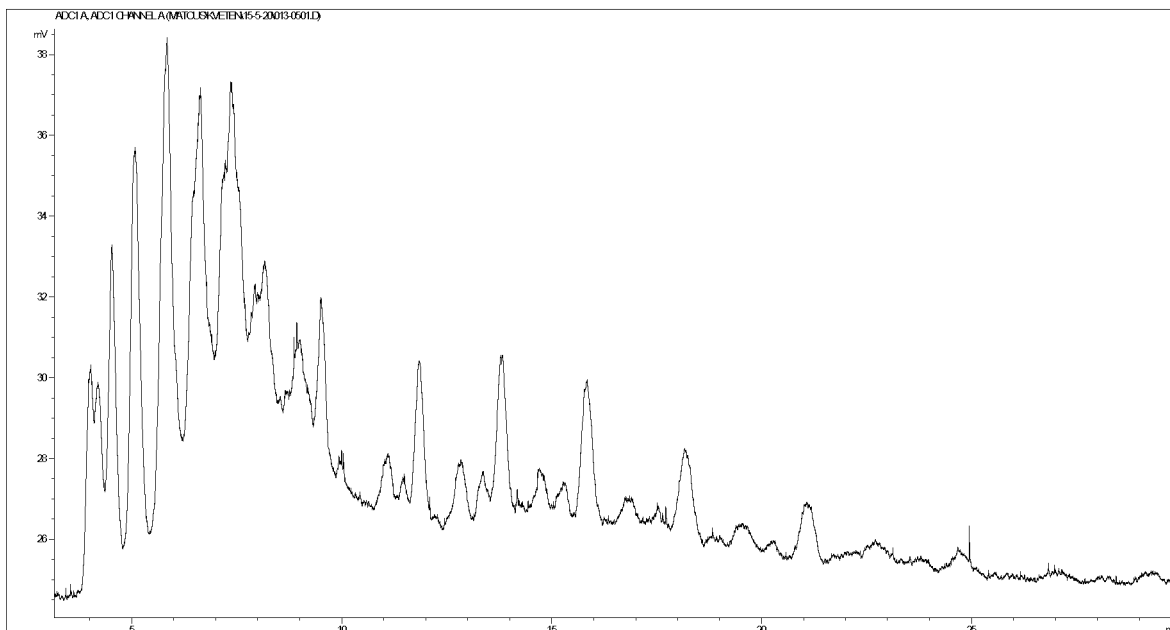
Obrázek P 28: Záznam měření Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5 v izokratickém režimu MF 99 % ACN + 1% H₂O + 10 mM octan amonný s průtokem 250 µl/min, dávkováním 0,5 µl při teplotě 25 °C.



Obrázek P 29: Záznam měření Levenol® C-301 na koloně Ascentis® Express OH5 v izokratickém režimu MF 99 % ACN + 1% H₂O + 10 mM octan amonný s průtokem 250 µl/min, dávkováním 0,5 µl při teplotě 25 °C.

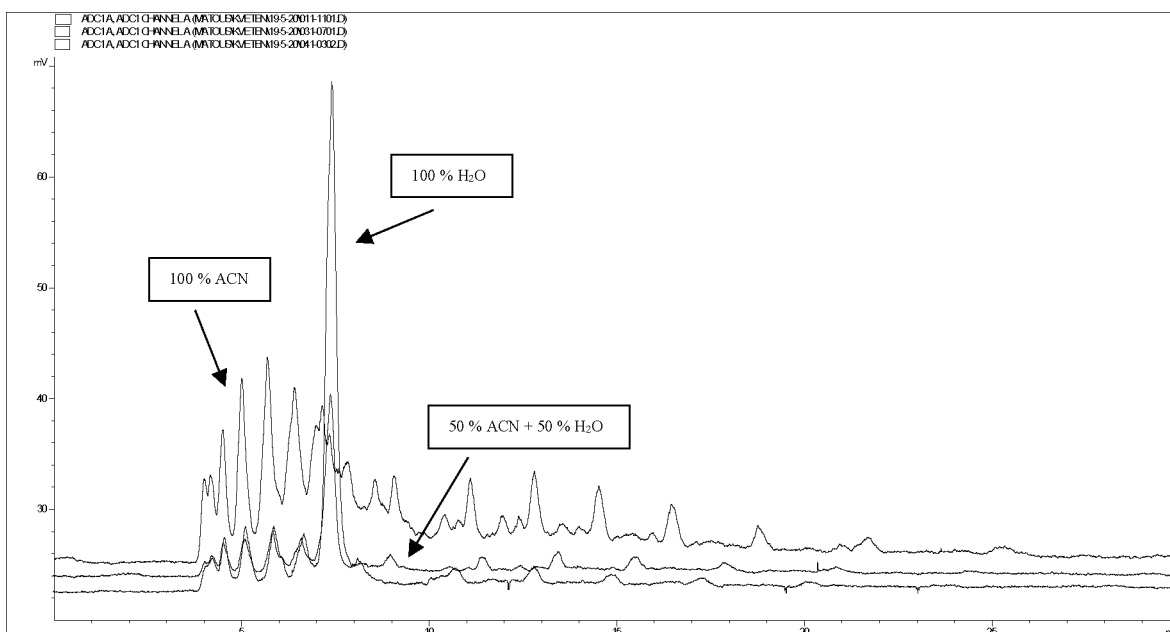


Obrázek P 30: Záznam měření Levenol® C-421 na koloně Ascentis® Express OH5 v izokratickém režimu MF 99 % ACN + 1% H₂O + 10 mM octan amonný s průtokem 250 µl/min, dávkováním 0,5 µl při teplotě 25 °C.

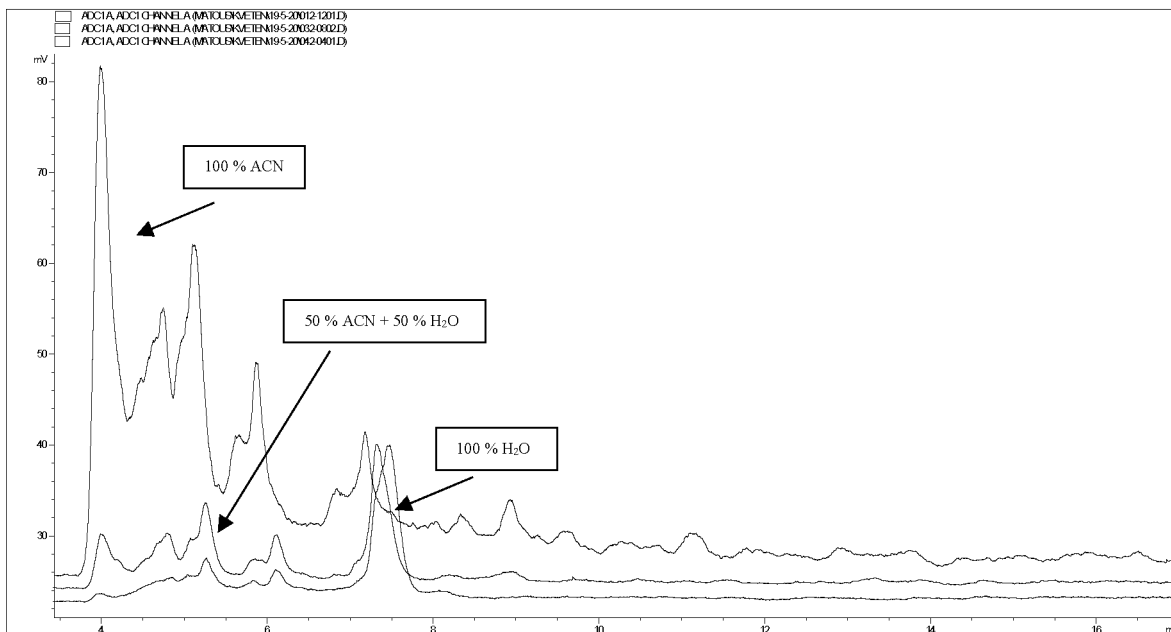


Obrázek P 31: Záznam měření Levenol® C-201 na koloně Ascentis® Express OH5 v izokratickém režimu MF 99 % ACN + 1% H₂O + 10 mM octan amonný s průtokem 250 μ l/min, dávkováním 0,5 μ l při teplotě 25 °C.

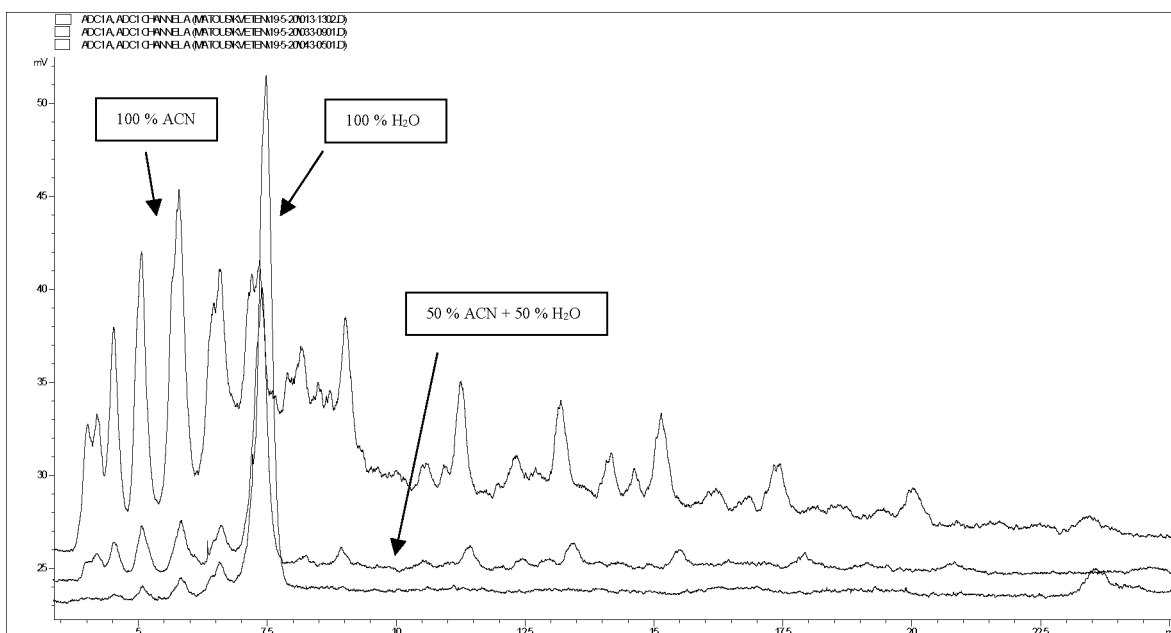
Záznamy měření HILIC pro porovnání vzorků rozpuštěných v 100 % ACN, 100 % H₂O a 50 % ACN + 50 % H₂O při teplotě 25 °C na koloně Ascentis® Express OH5.



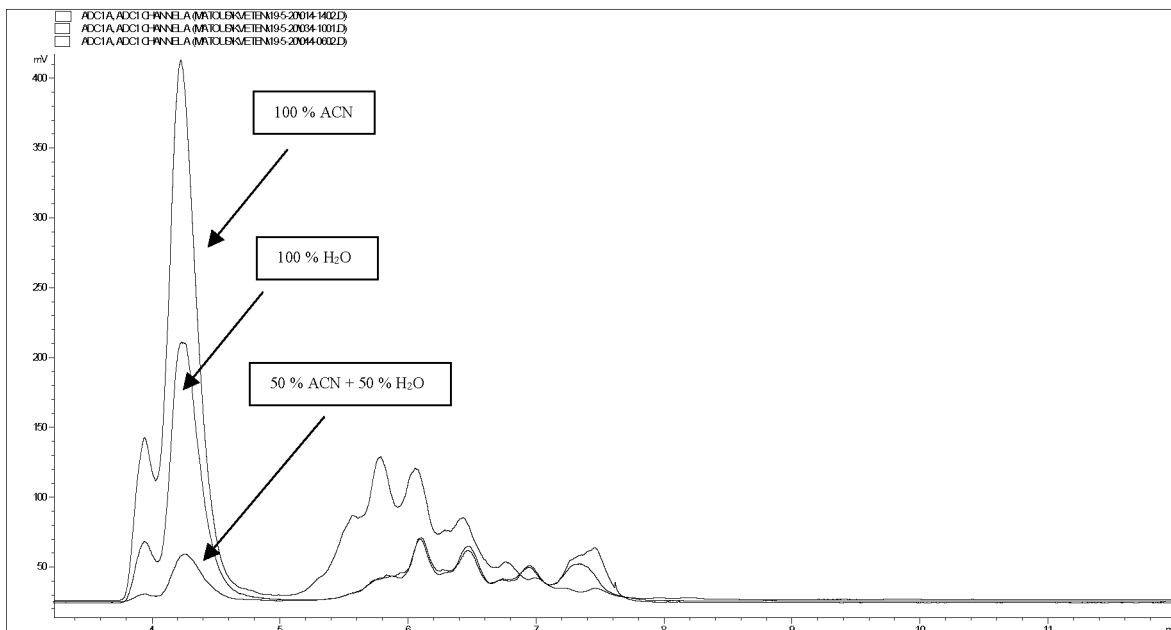
Obrázek P 32: Záznam měření Levenol® F-200 rozpuštěného ve 100 % ACN, 100 % H₂O a 50 % ACN + 50 % H₂O při teplotě 25 °C na koloně Ascentis® Express OH5 v izokratickém režimu MF 99 % ACN + 1 % H₂O + 10 mM octan amonný s průtokem 0,25 ml/min, dávkováním 0,5 μ l a teplotou 25 °C.



Obrázek P 33: Záznam měření Levenol® C-301 rozpuštěného ve 100 % ACN, 100 % H₂O a 50 % ACN + 50 % H₂O při teplotě 25 °C na koloně Ascentis® Express OH5 v izokratickém režimu MF 99 % ACN + 1 % H₂O + 10 mM octan amonný s průtokem 0,25 ml/min, dávkováním 0,5 µl a teplotou 25 °C.

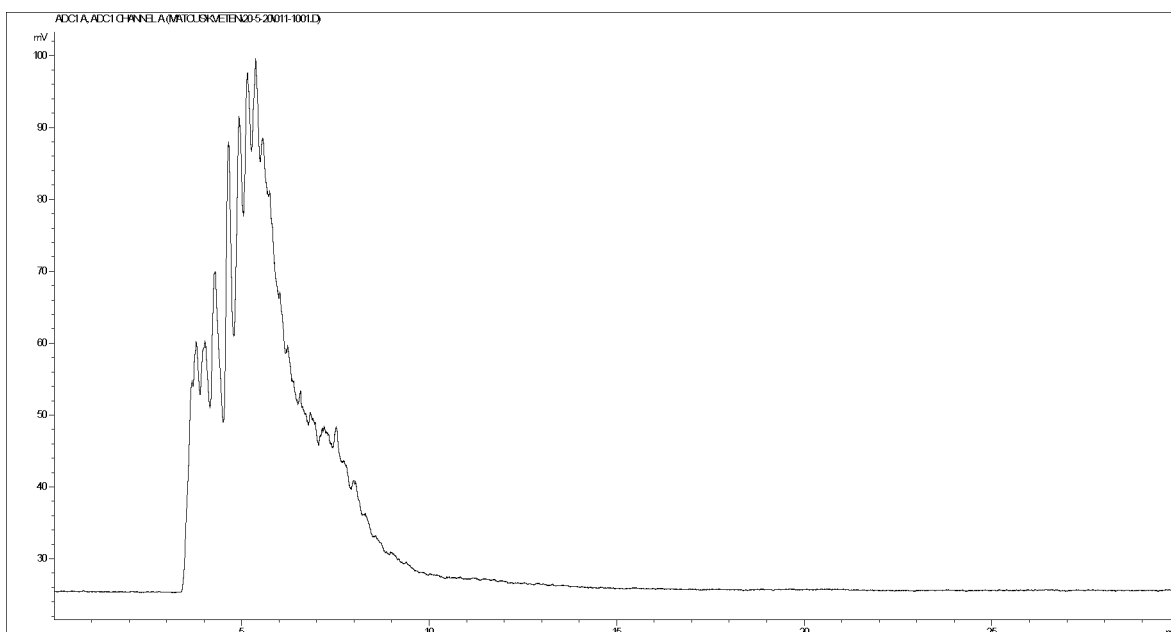


Obrázek P 34: Záznam měření Levenol® C-201 rozpuštěného ve 100 % ACN, 100 % H₂O a 50 % ACN + 50 % H₂O při teplotě 25 °C na koloně Ascentis® Express OH5 v izokratickém režimu MF 99 % ACN + 1 % H₂O + 10 mM octan amonný s průtokem 0,25 ml/min, dávkováním 0,5 µl a teplotou 25 °C.

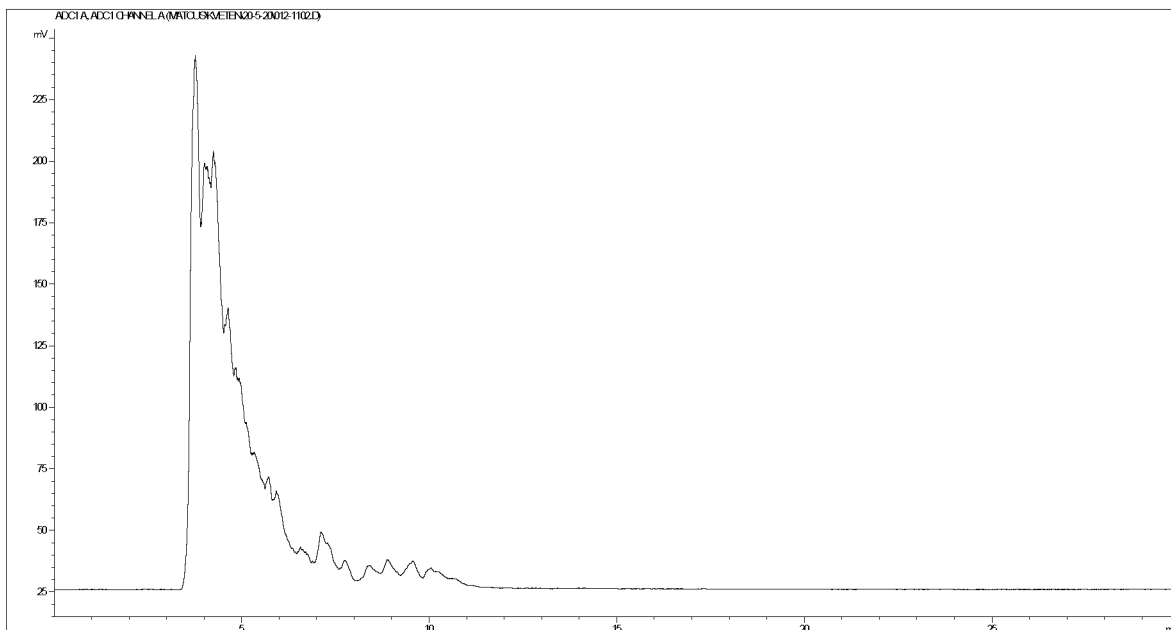


Obrázek P 35: Záznam měření Levenol® C-421 rozpuštěného ve 100 % ACN, 100 % H₂O a 50 % ACN + 50 % H₂O při teplotě 25 °C na koloně Ascentis® Express OH5 v izokratickém režimu MF 99 % ACN + 1 % H₂O + 10 mM octan amonný s průtokem 0,25 ml/min, dávkováním 0,5 µl a teplotou 25 °C.

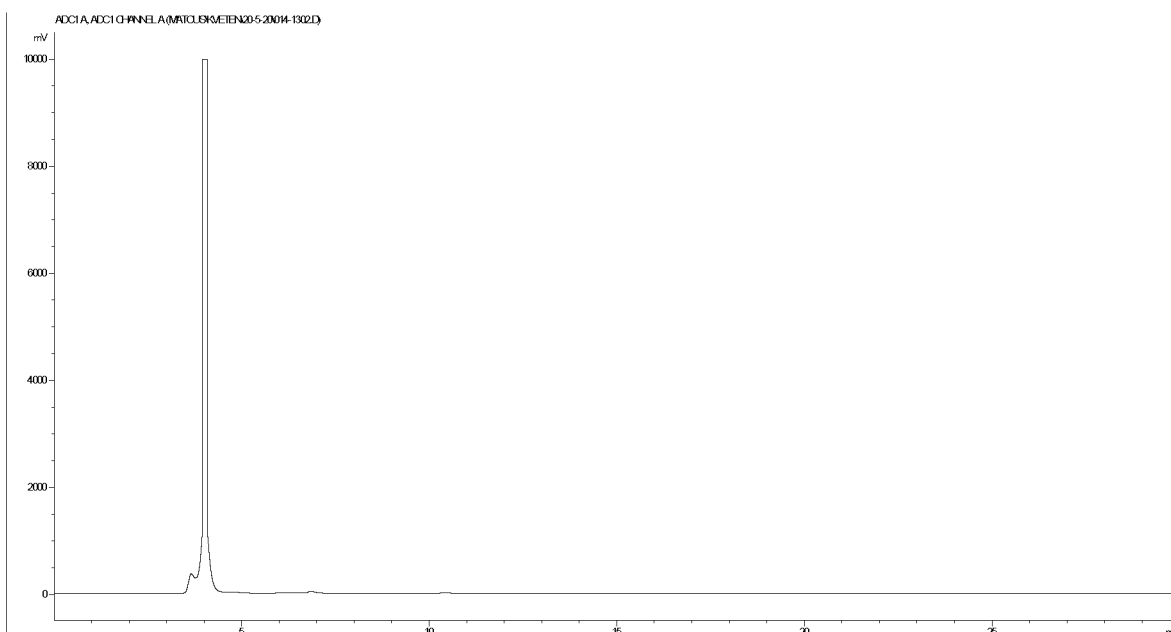
Záznamy měření HILIC na koloně Luna® 3 µm HILIC.



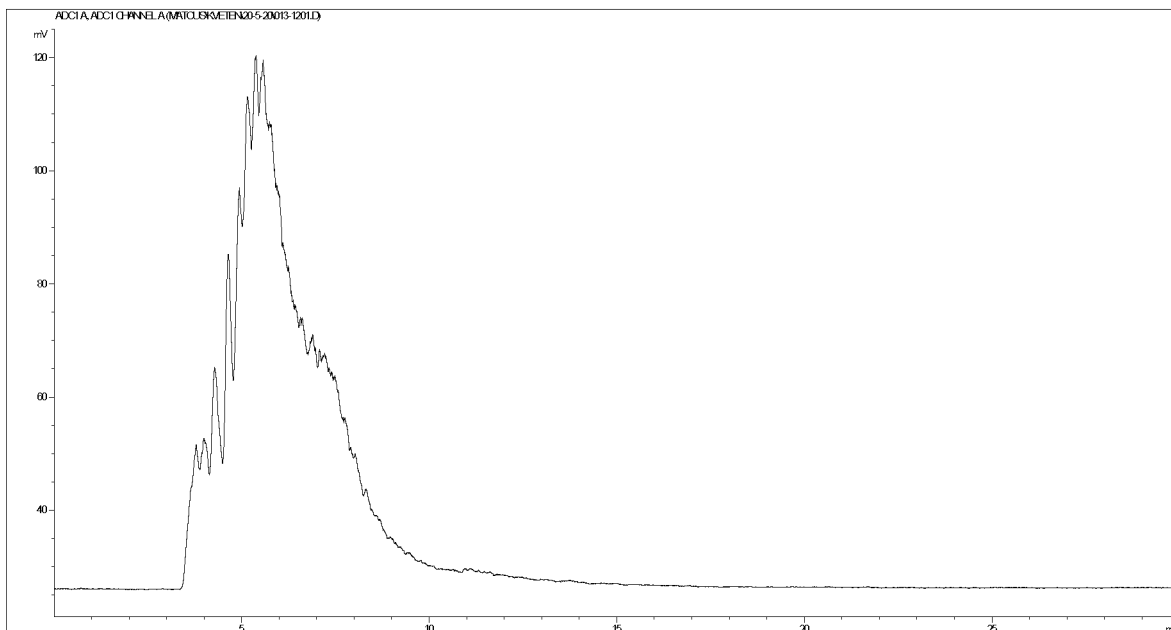
Obrázek P 36: Záznam měření Levenol® F-200 na koloně Luna® 3 µm HILIC při teplotě 25 °C v izokratickém režimu MF 99 % ACN + 1 % H₂O + 10 mM octan amonný s průtokem 0,25 ml/min a dávkováním 0,5 µl.



Obrázek P 37: Záznam měření Levenol® C-301 na koloně Luna® 3 µm HILIC při teplotě 25 °C v izokratickém režimu MF 99 % ACN + 1 % H₂O + 10 mM octan amonný s průtokem 0,25 ml/min a dávkováním 0,5 µl.

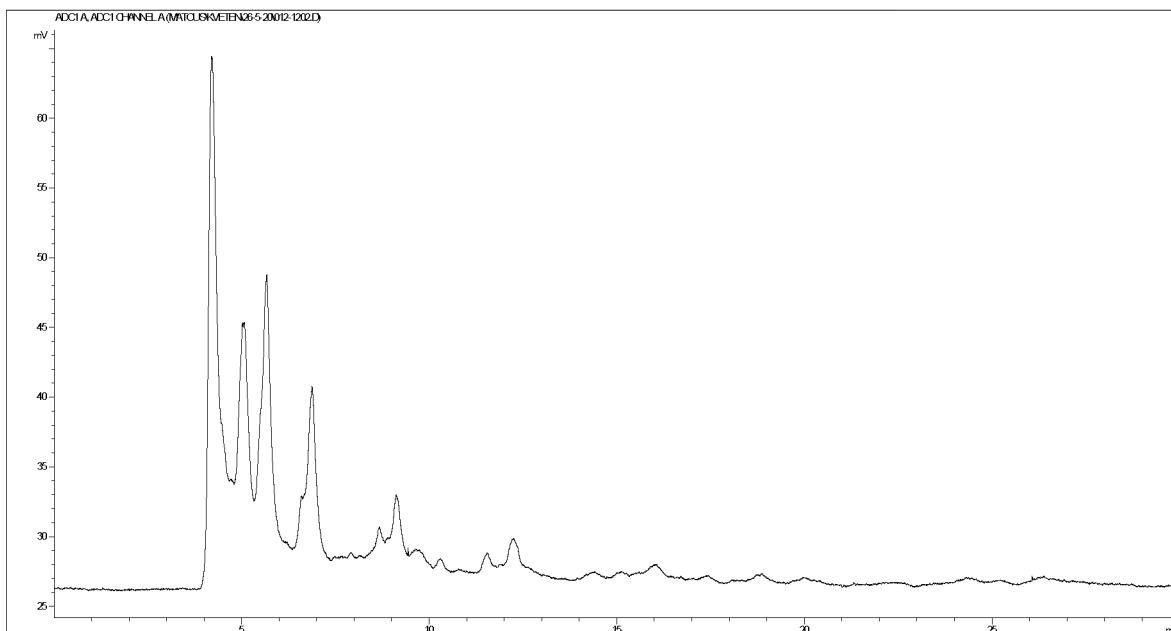


Obrázek P 38: Záznam měření Levenol® C-421 na koloně Luna® 3 µm HILIC při teplotě 25 °C v izokratickém režimu MF 99 % ACN + 1 % H₂O + 10 mM octan amonný s průtokem 0,25 ml/min a dávkováním 0,5 µl.

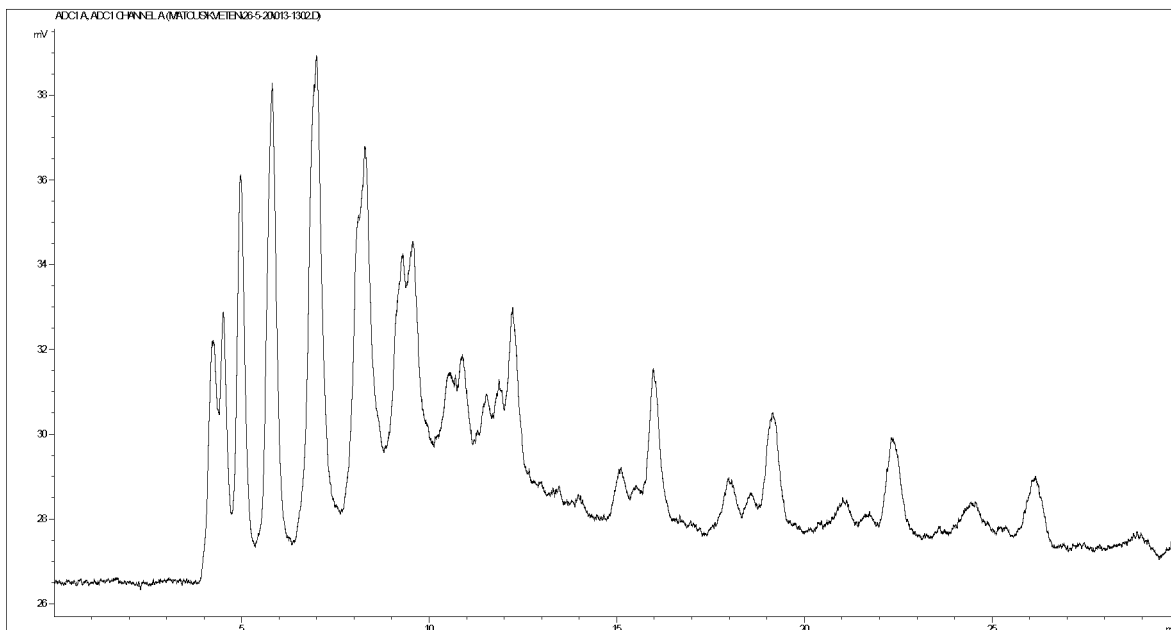


Obrázek P 39: Záznam měření Levenol® C-201 na koloně Luna® 3 µm HILIC při teplotě 25 °C v izokratickém režimu MF 99 % ACN + 1 % H₂O + 10 mM octan amonný s průtokem 0,25 ml/min a dávkováním 0,5 µl.

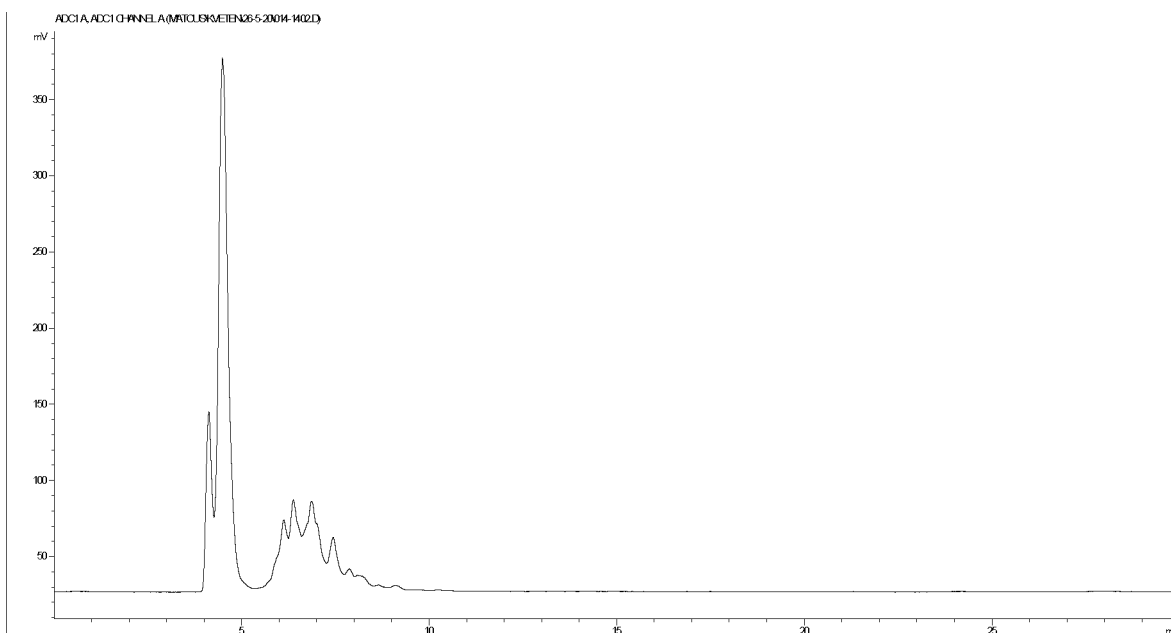
Záznamy měření HILIC na koloně Ascentis® Express OH5.



Obrázek P 40: Záznam měření Levenol® C-301 na koloně Ascentis® Express OH5 v izokratickém režimu MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný s průtokem 0,25 ml/min, dávkováním 0,5 µl, dobou analýzy 30 min a při teplotě 25 °C.

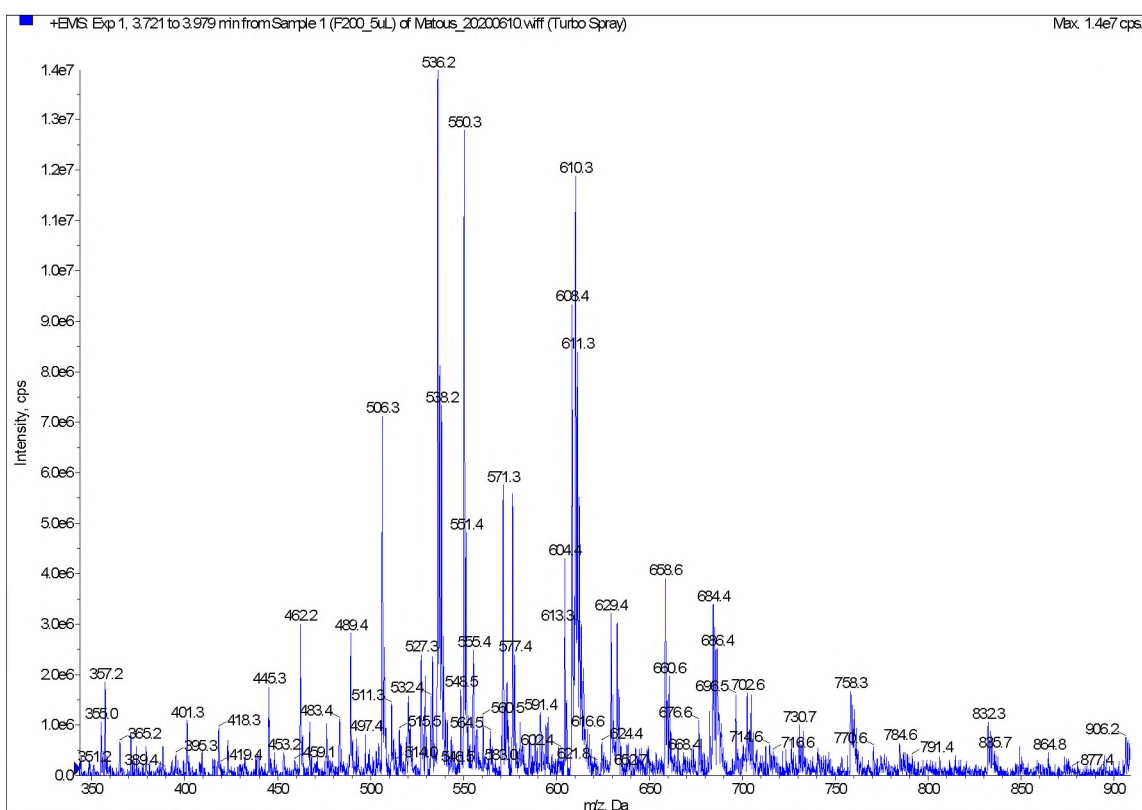


Obrázek P 41: Záznam měření Levenol® C-201 na koloně Ascentis® Express OH5 v izokratickém režimu MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný s průtokem 0,25 ml/min, dávkováním 0,5 µl, dobou analýzy 30 min a při teplotě 25 °C.

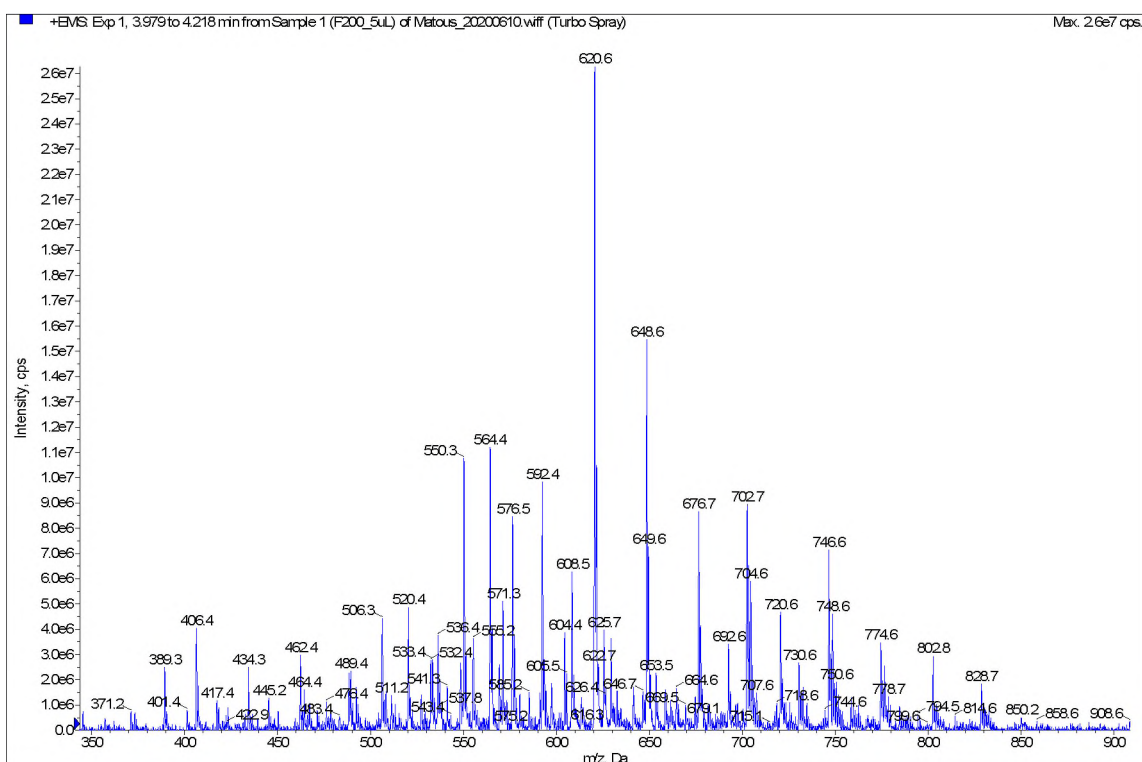


Obrázek P 42: Záznam měření Levenol® C-421 na koloně Ascentis® Express OH5 v izokratickém režimu MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný s průtokem 0,25 ml/min, dávkováním 0,5 µl, dobou analýzy 30 min a při teplotě 25 °C.

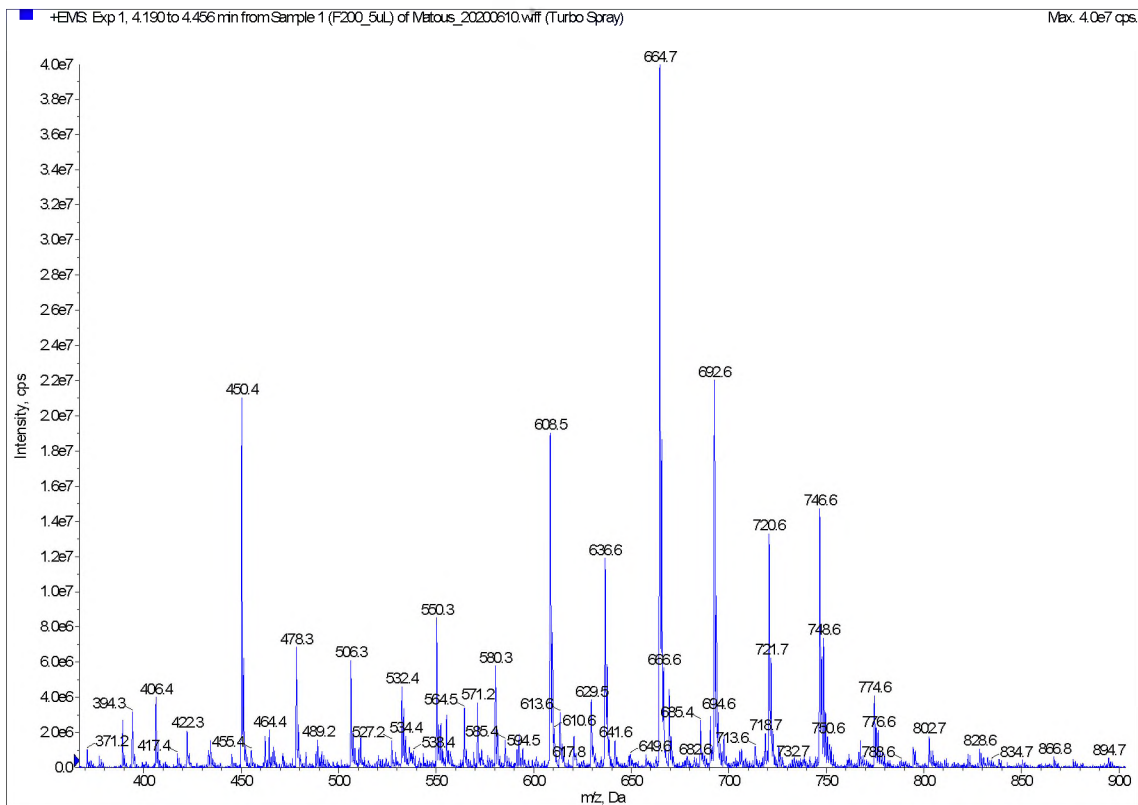
Záznamy z MS měření HILIC vzorku Levenol® F-200.



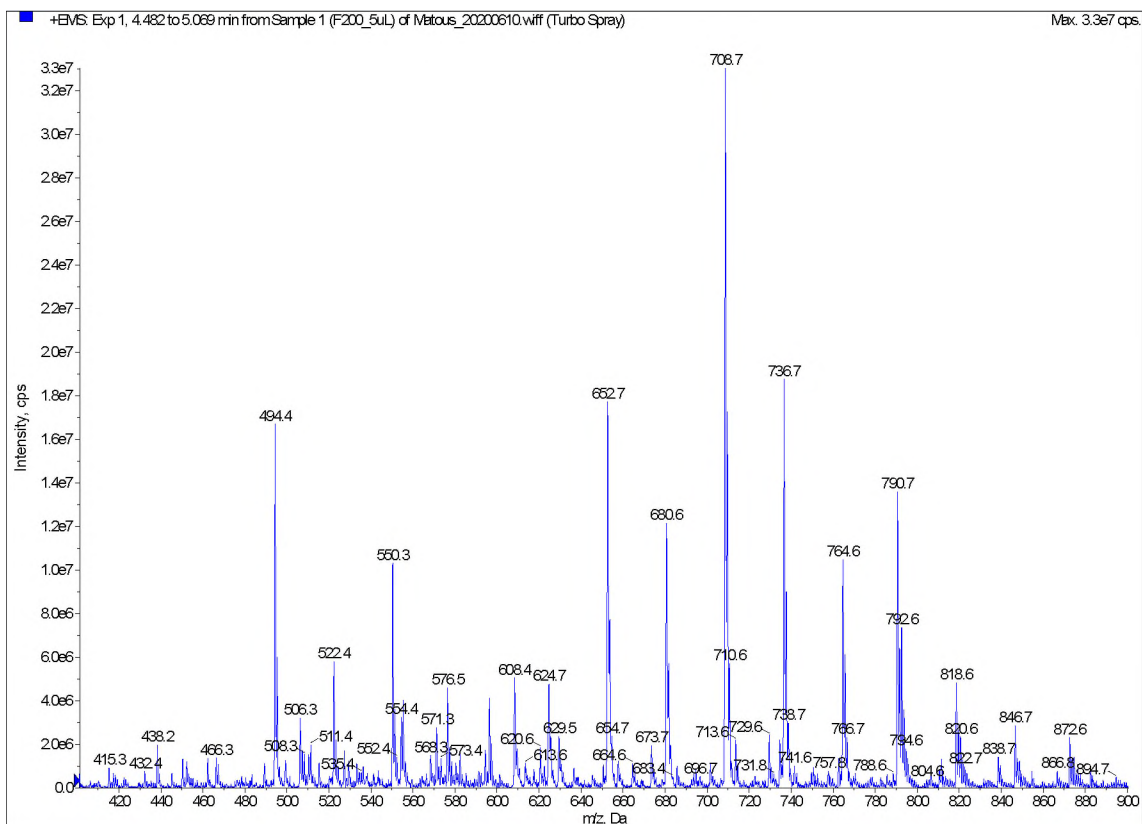
Obrázek P 43: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



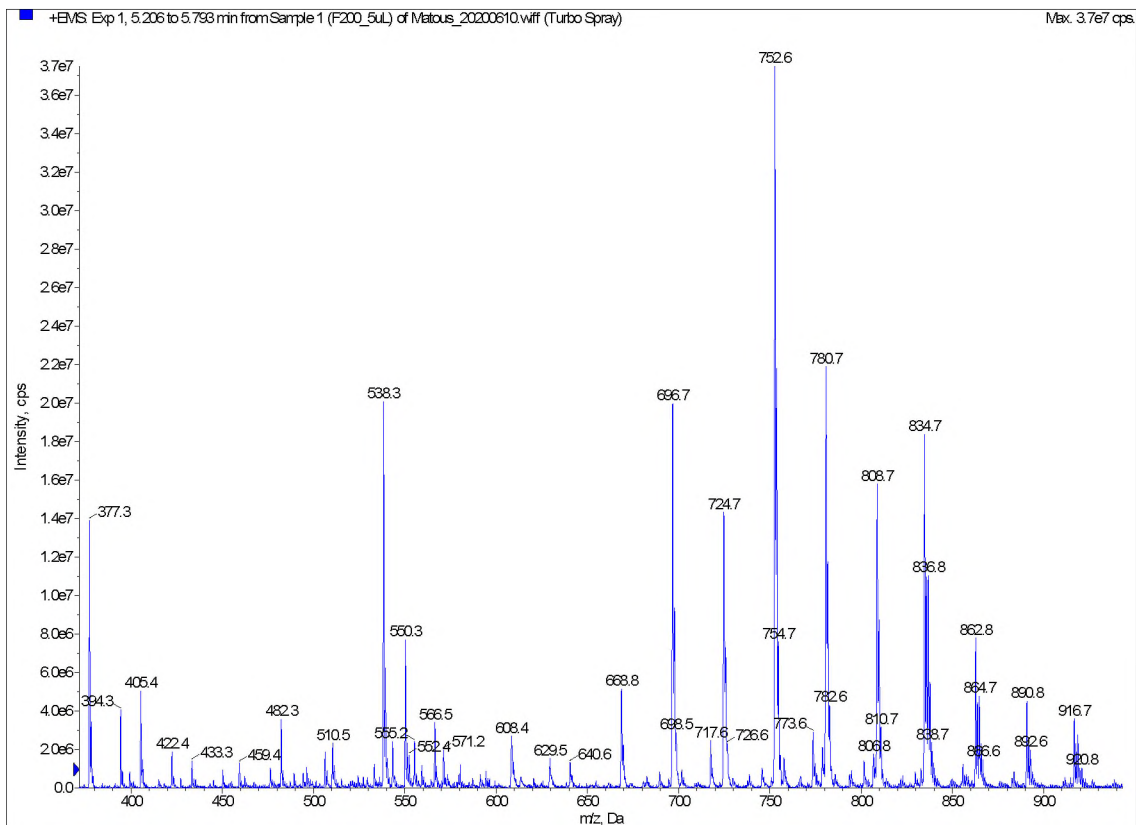
Obrázek P 44: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



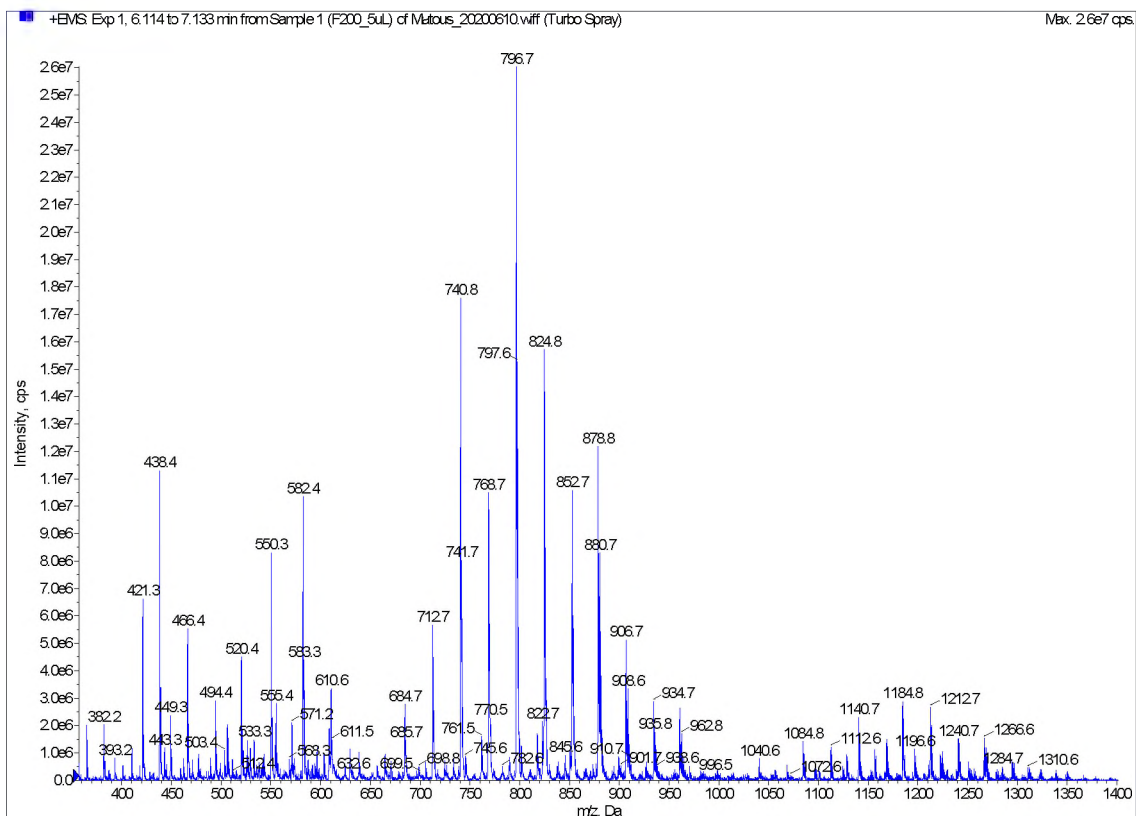
Obrázek P 45: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



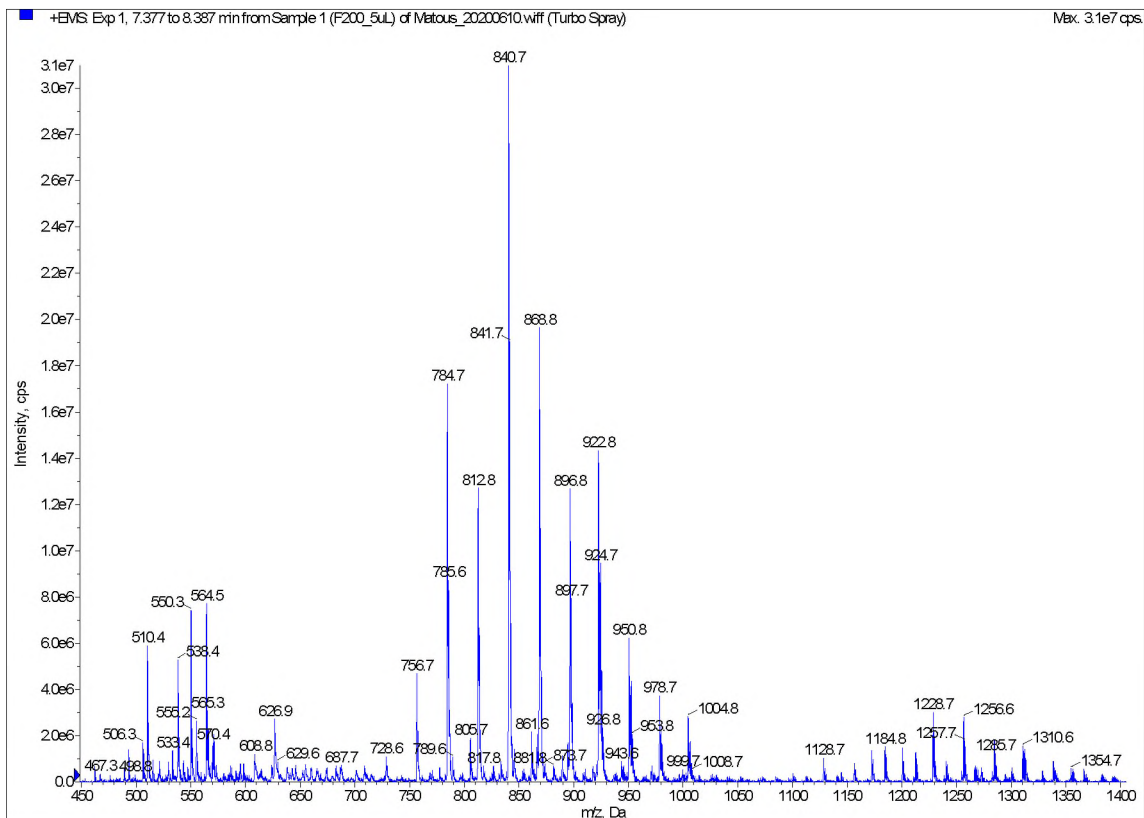
Obrázek P 46: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



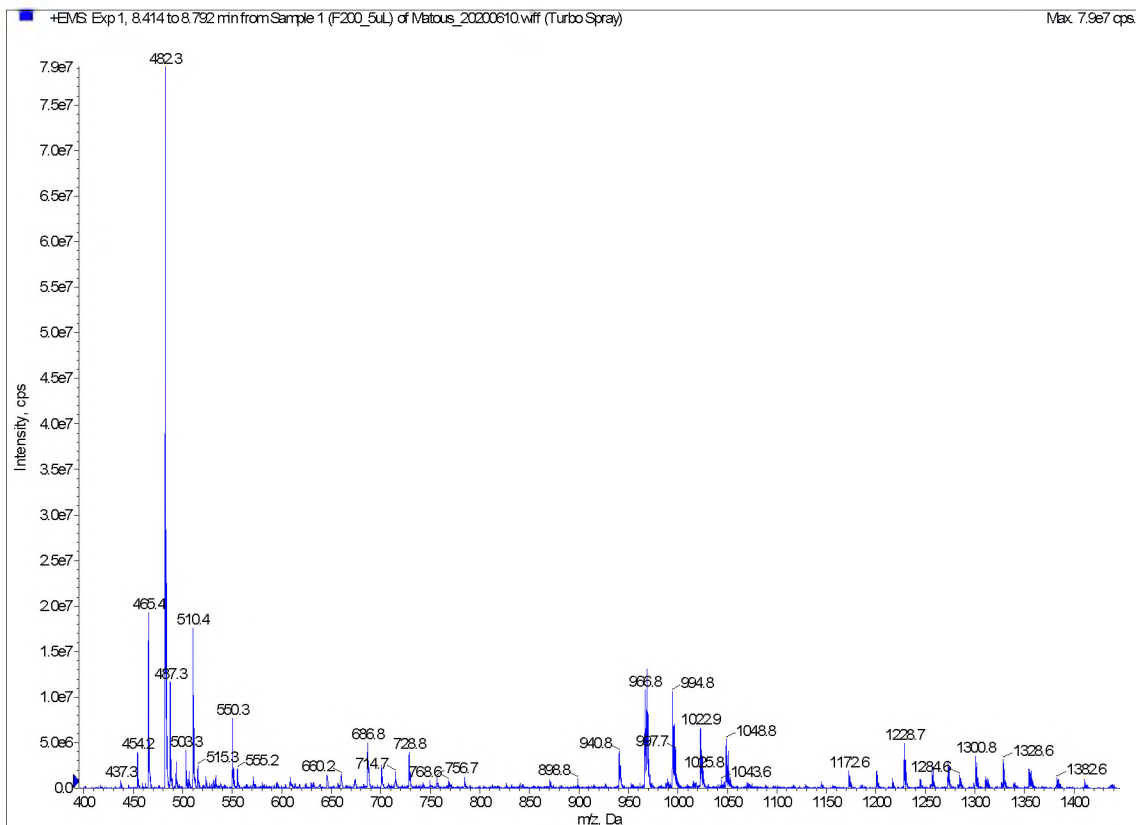
Obrázek P 47: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



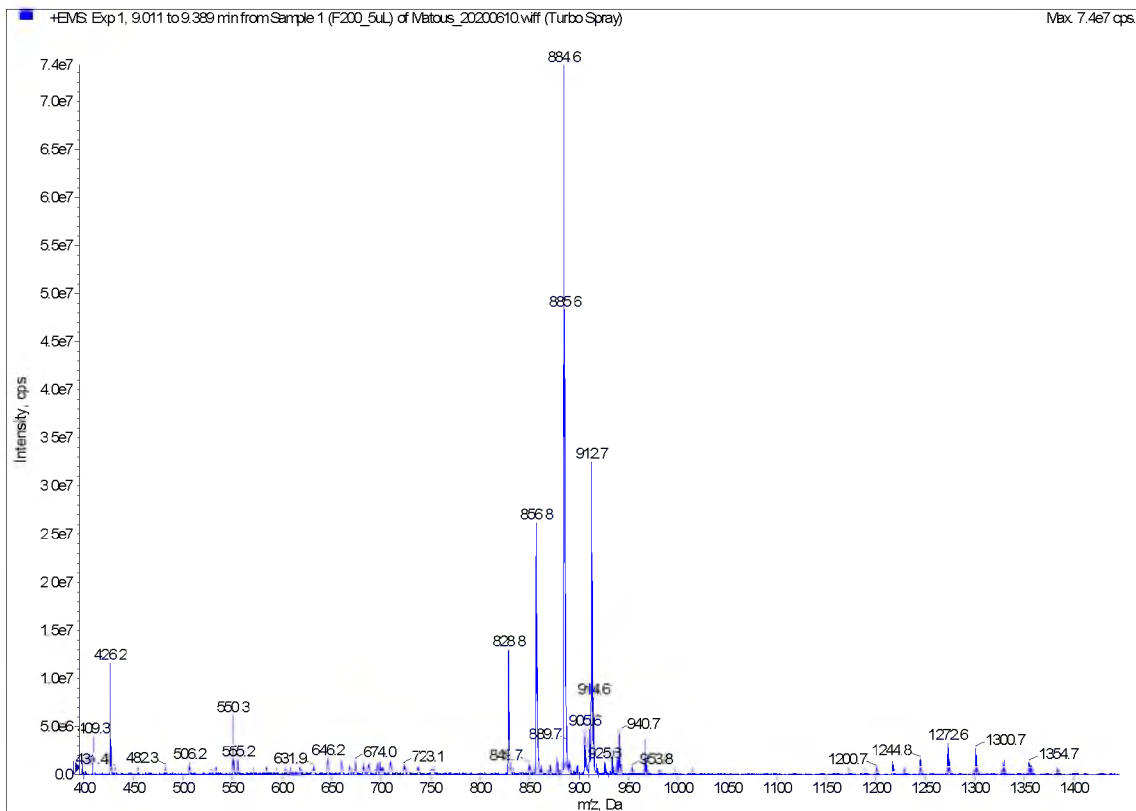
Obrázek P 48: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



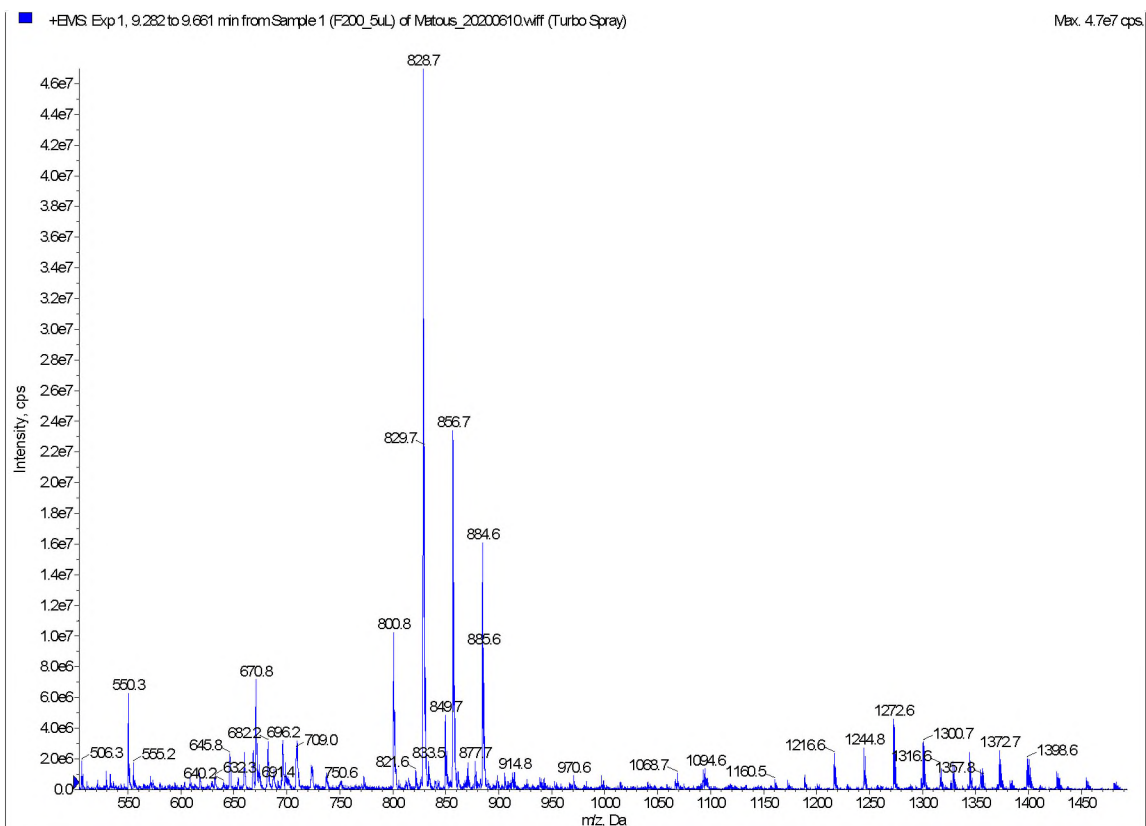
Obrázek P 49: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



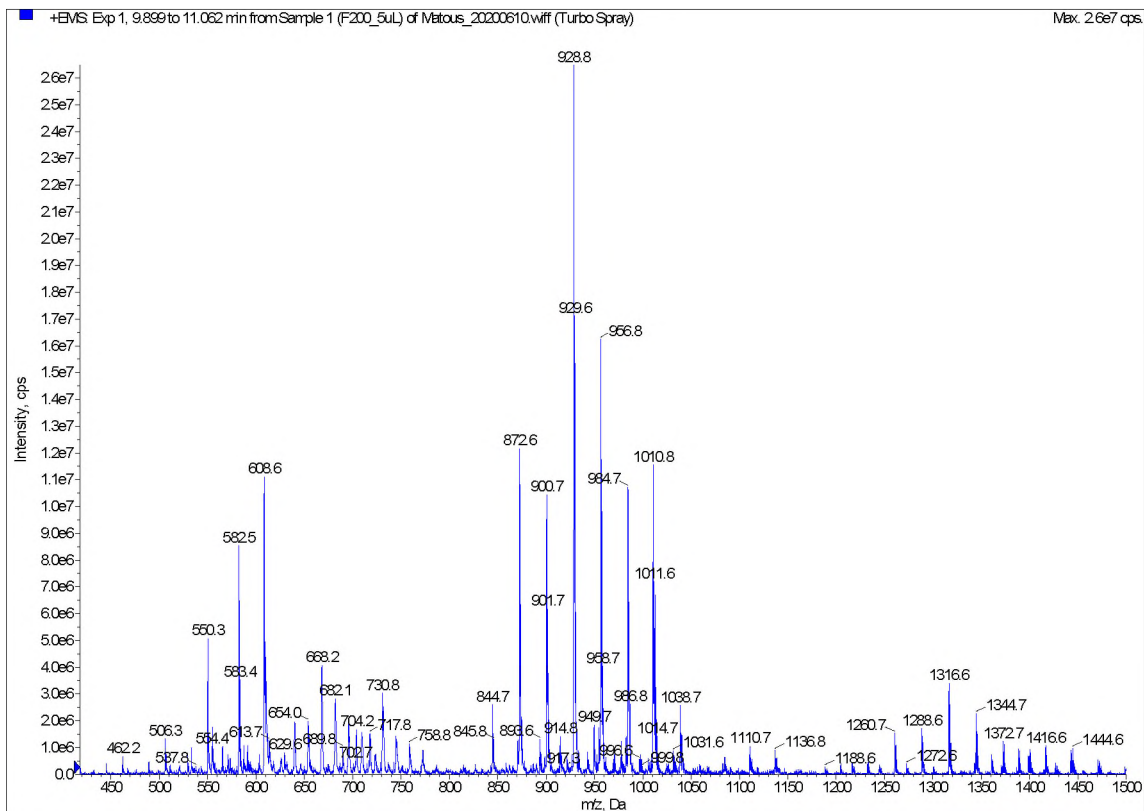
Obrázek P 50: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



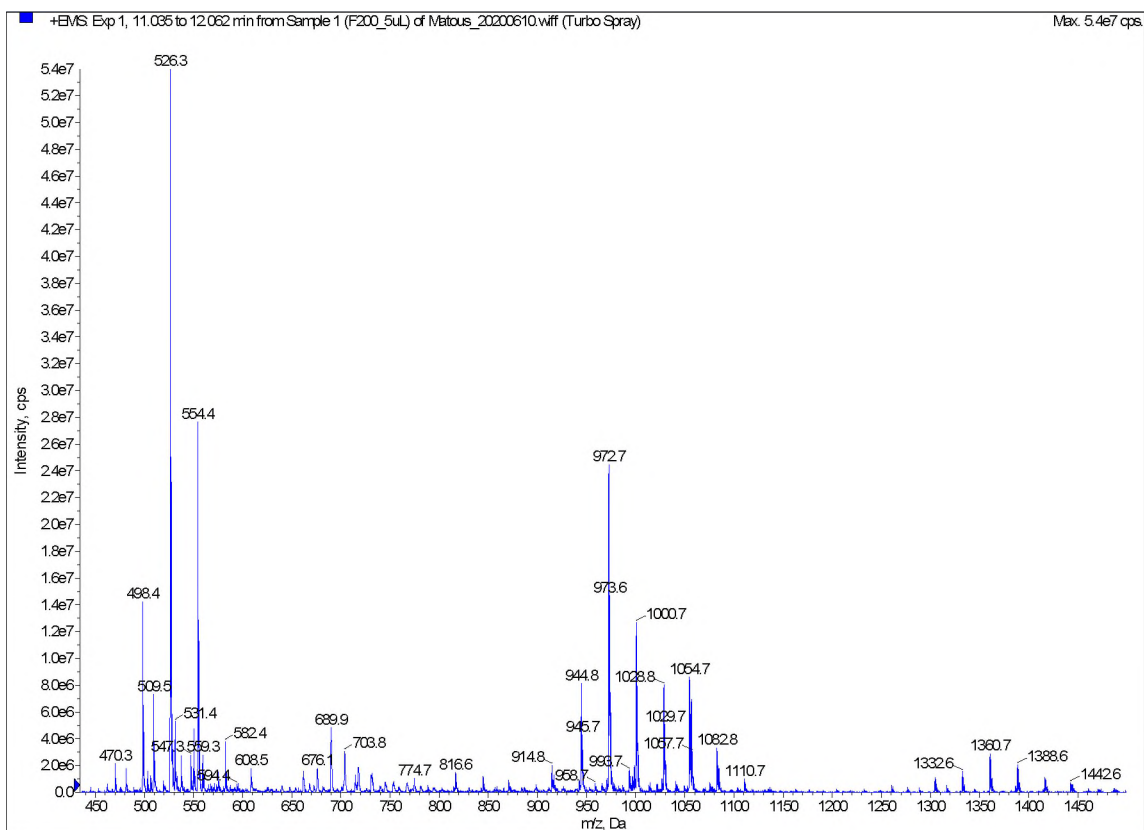
Obrázek P 51: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



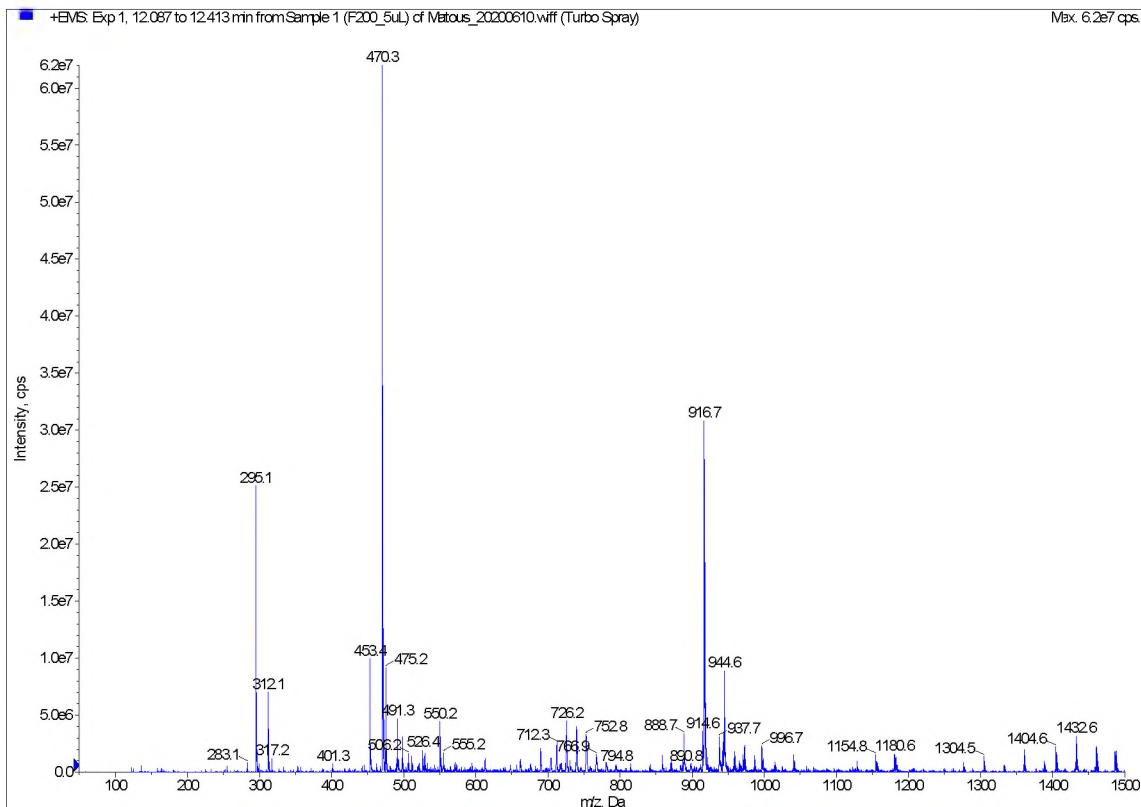
Obrázek P 52: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



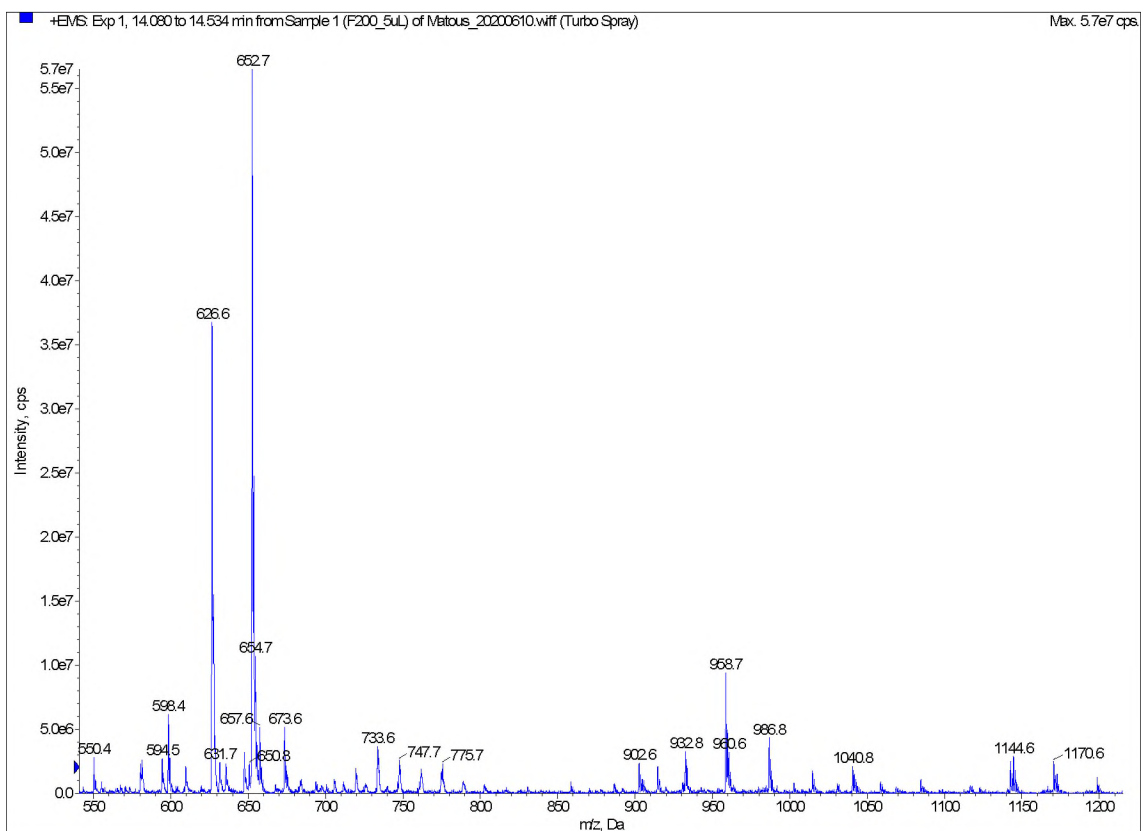
Obrázek P 53: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



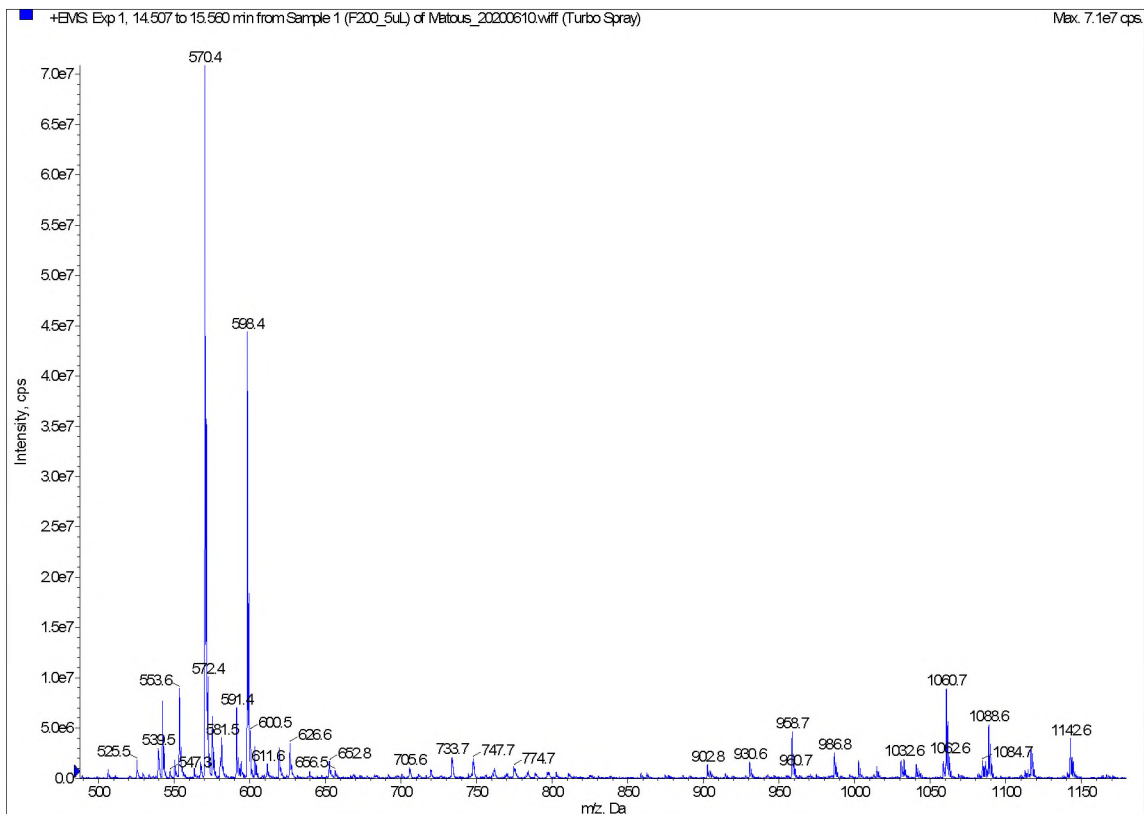
Obrázek P 54: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



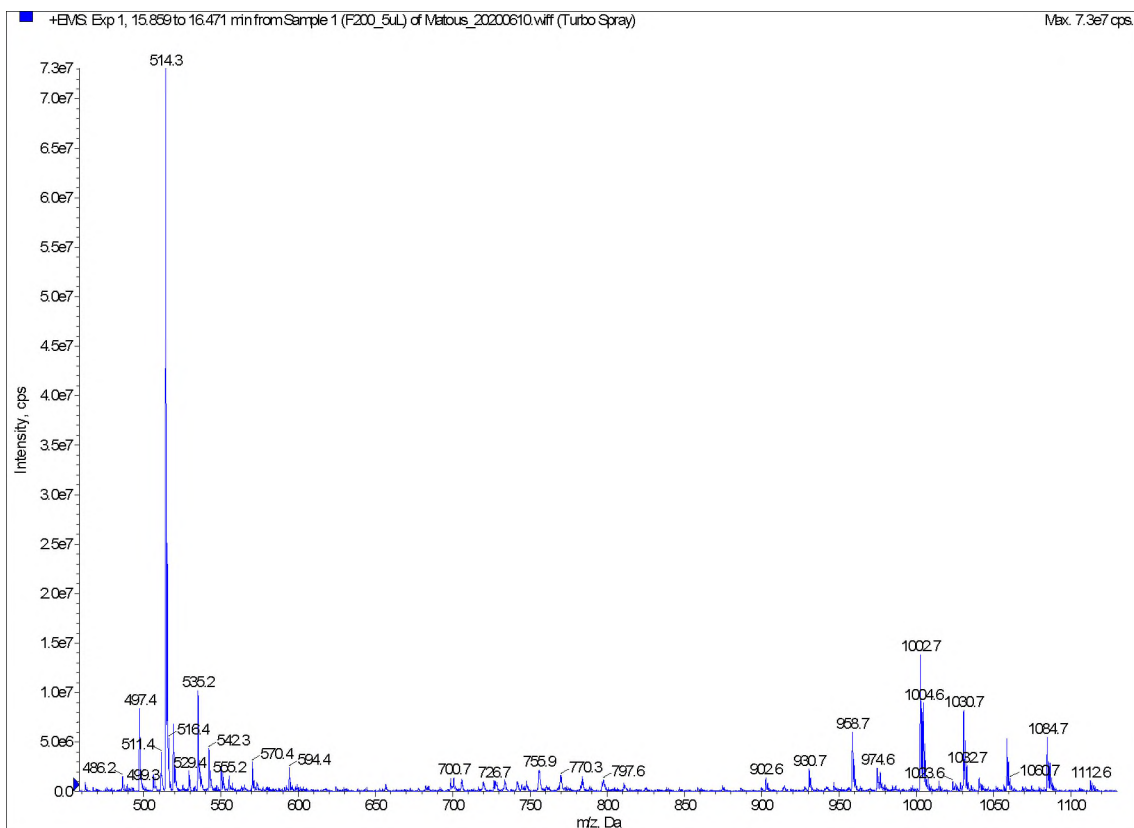
Obrázek P 55: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



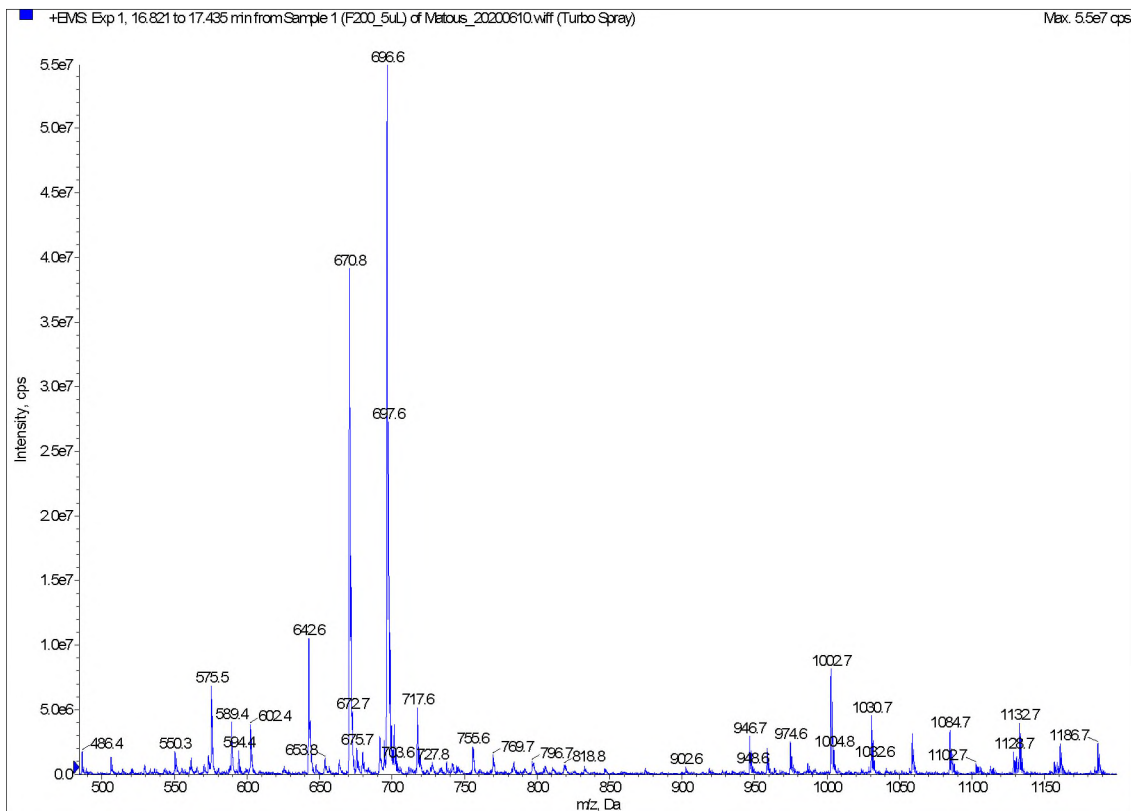
Obrázek P 56: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



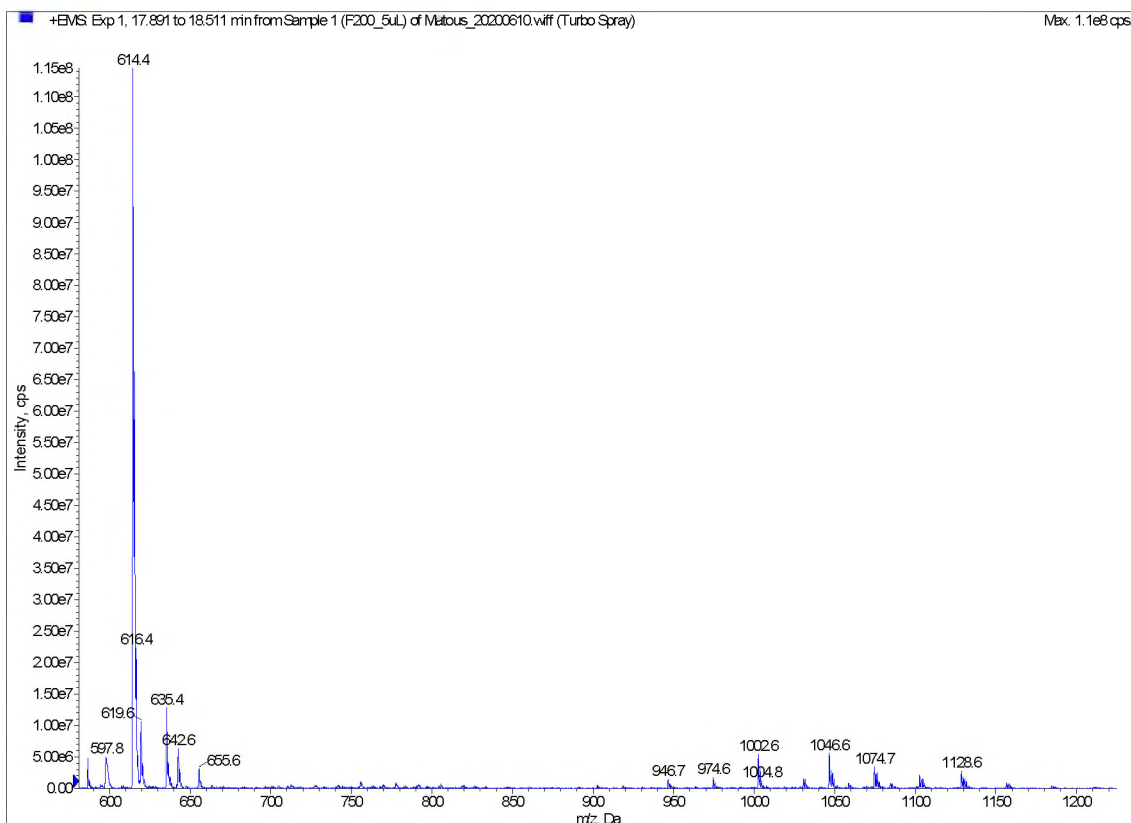
Obrázek P 57: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



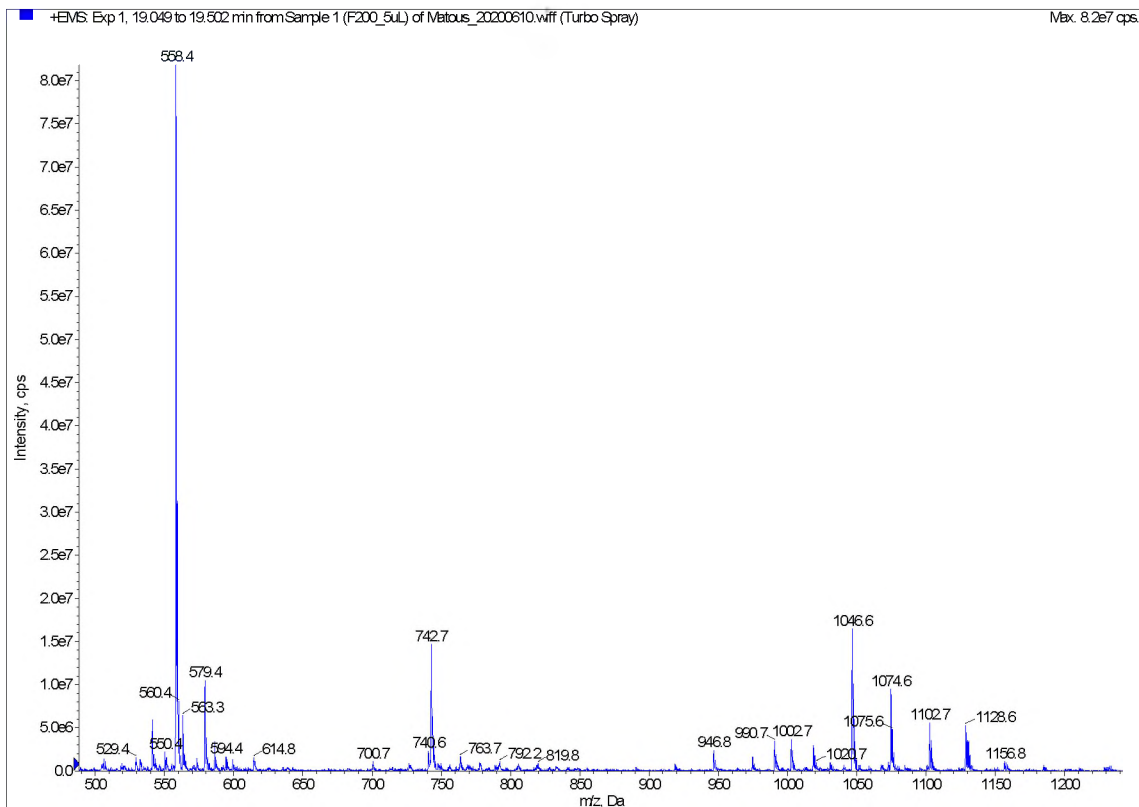
Obrázek P 58: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



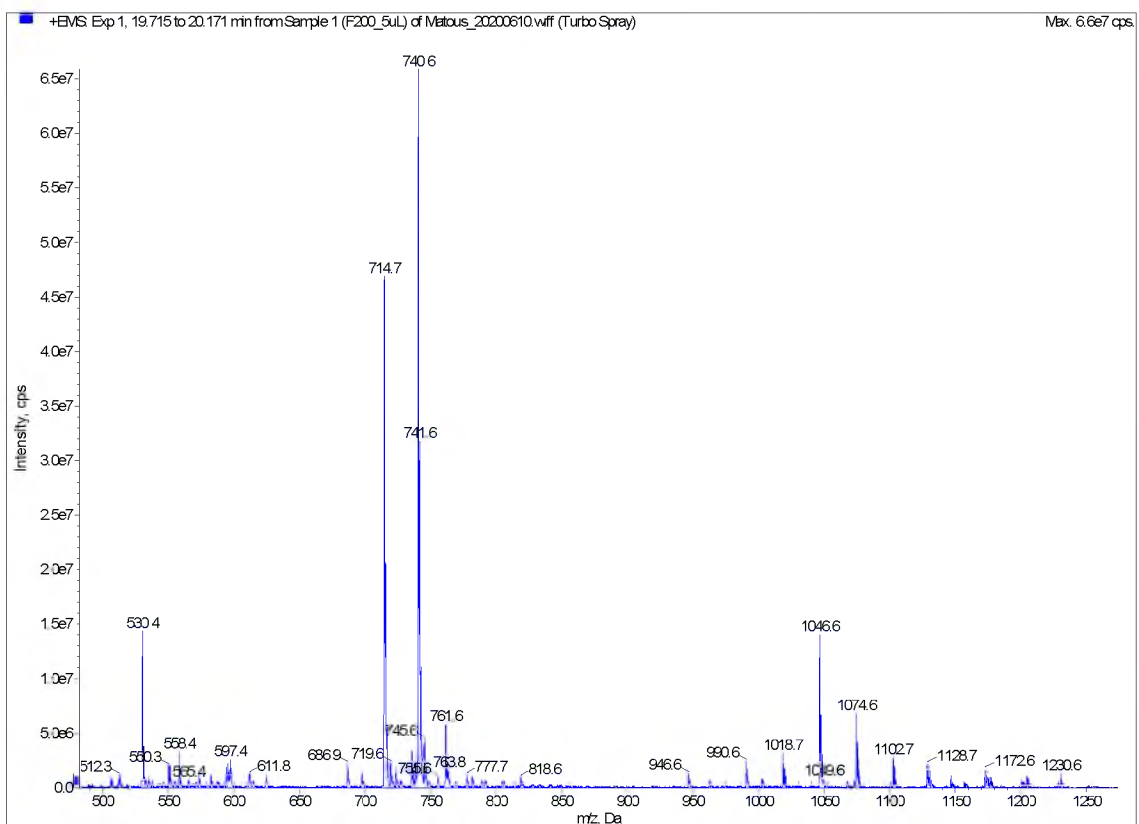
Obrázek P 59: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



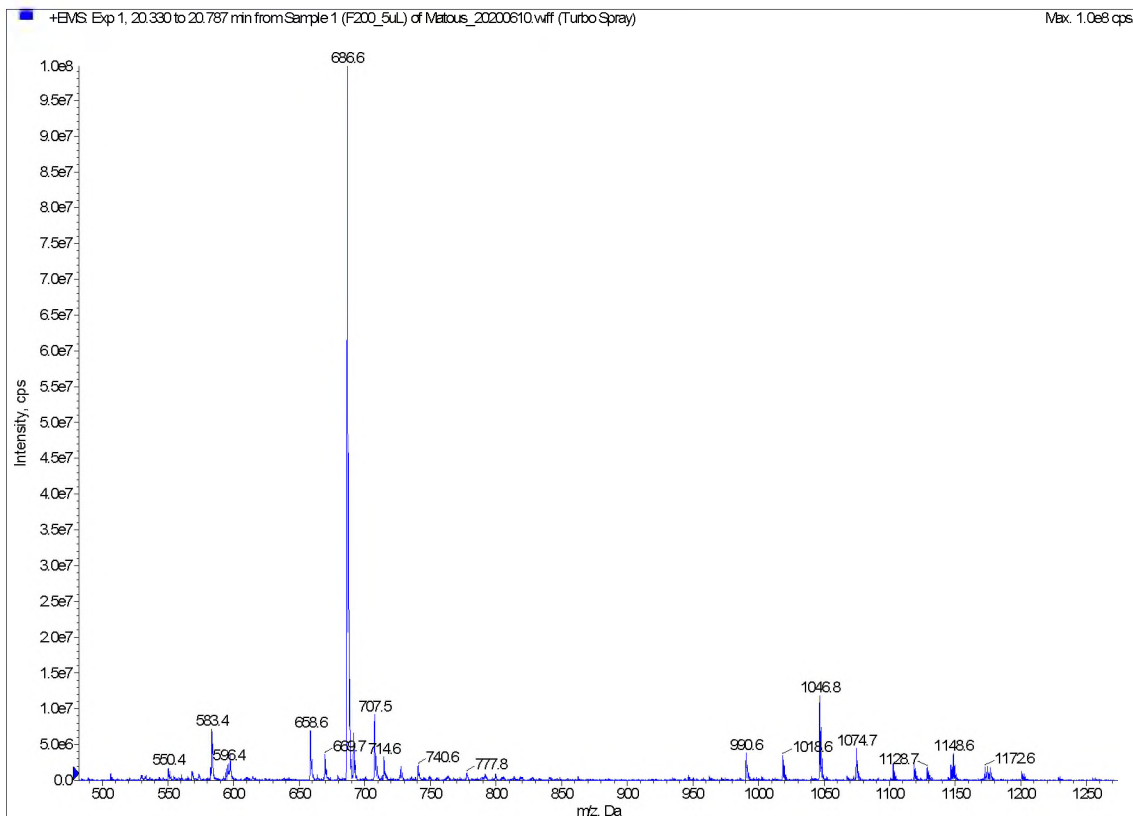
Obrázek P 60: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



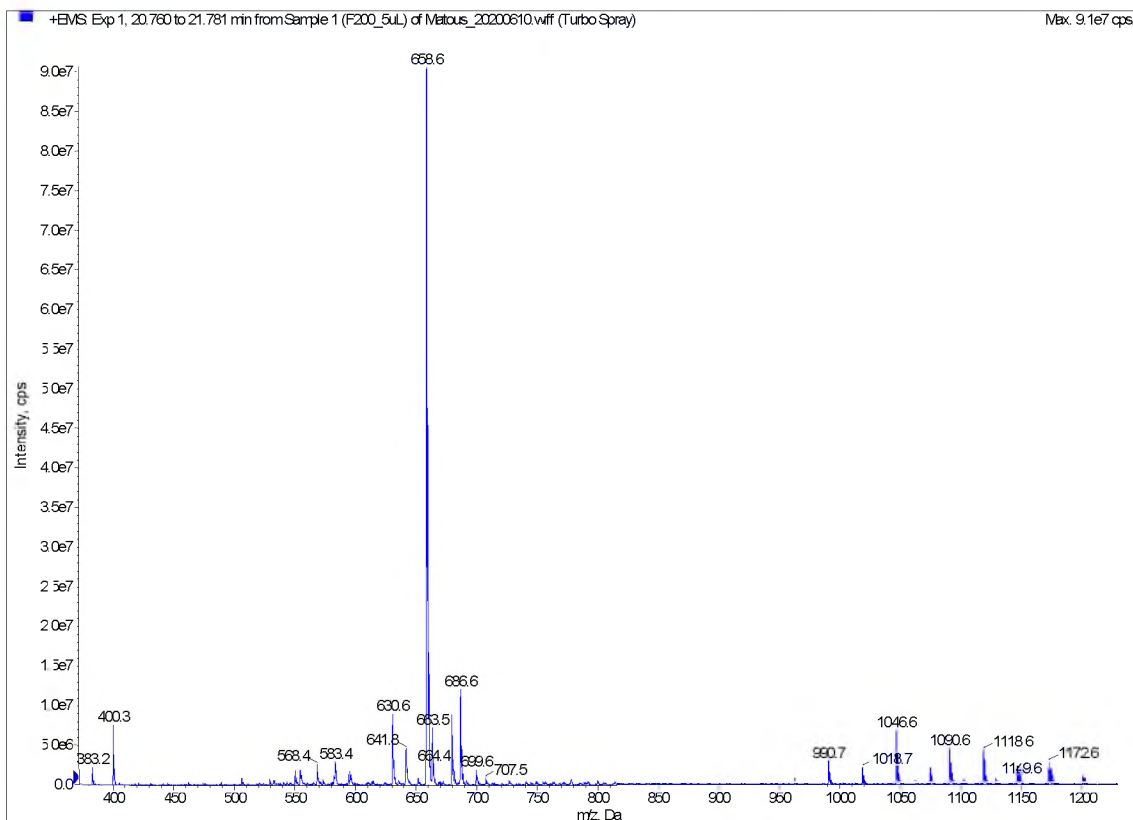
Obrázek P 61: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



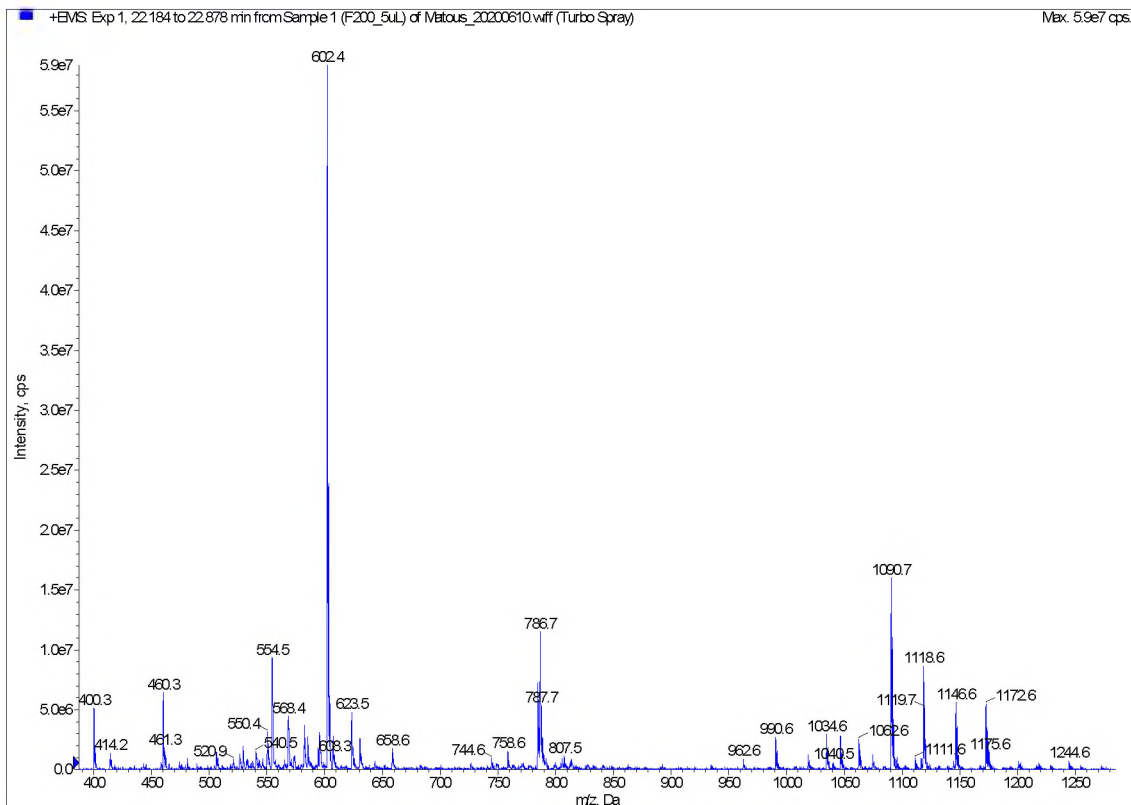
Obrázek P 62: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



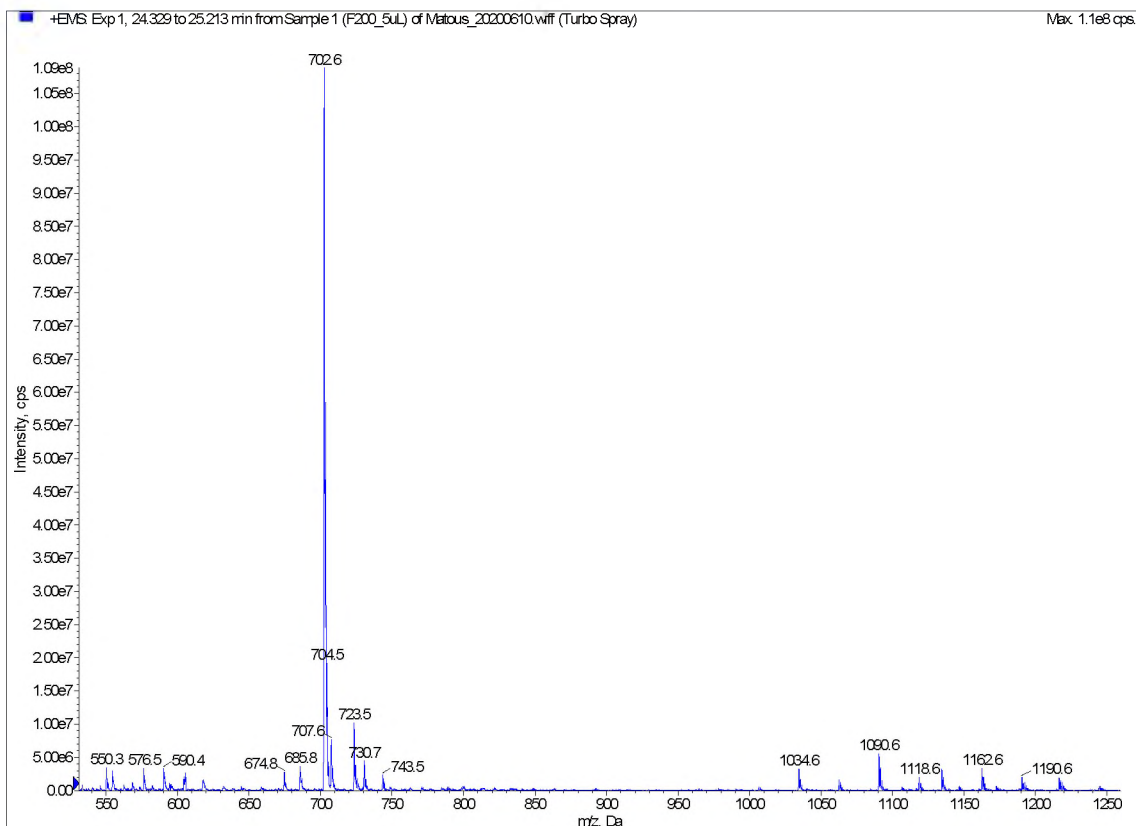
Obrázek P 63: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



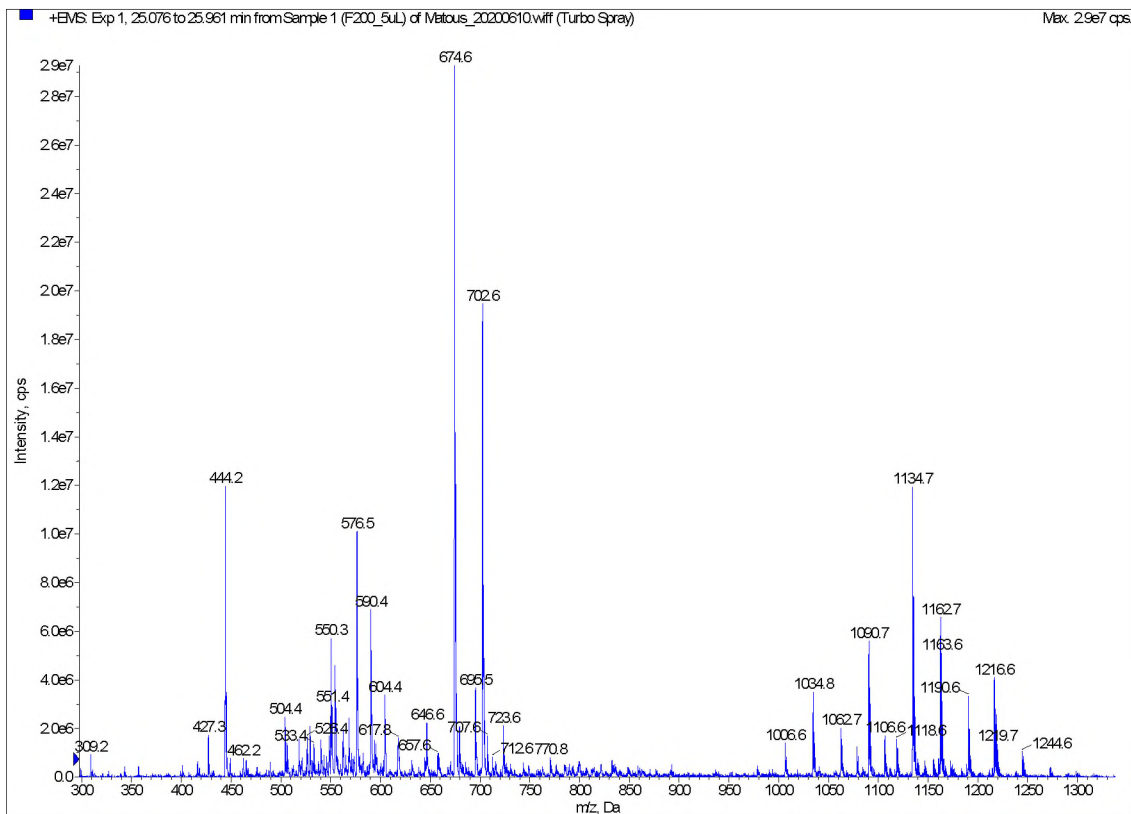
Obrázek P 64: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



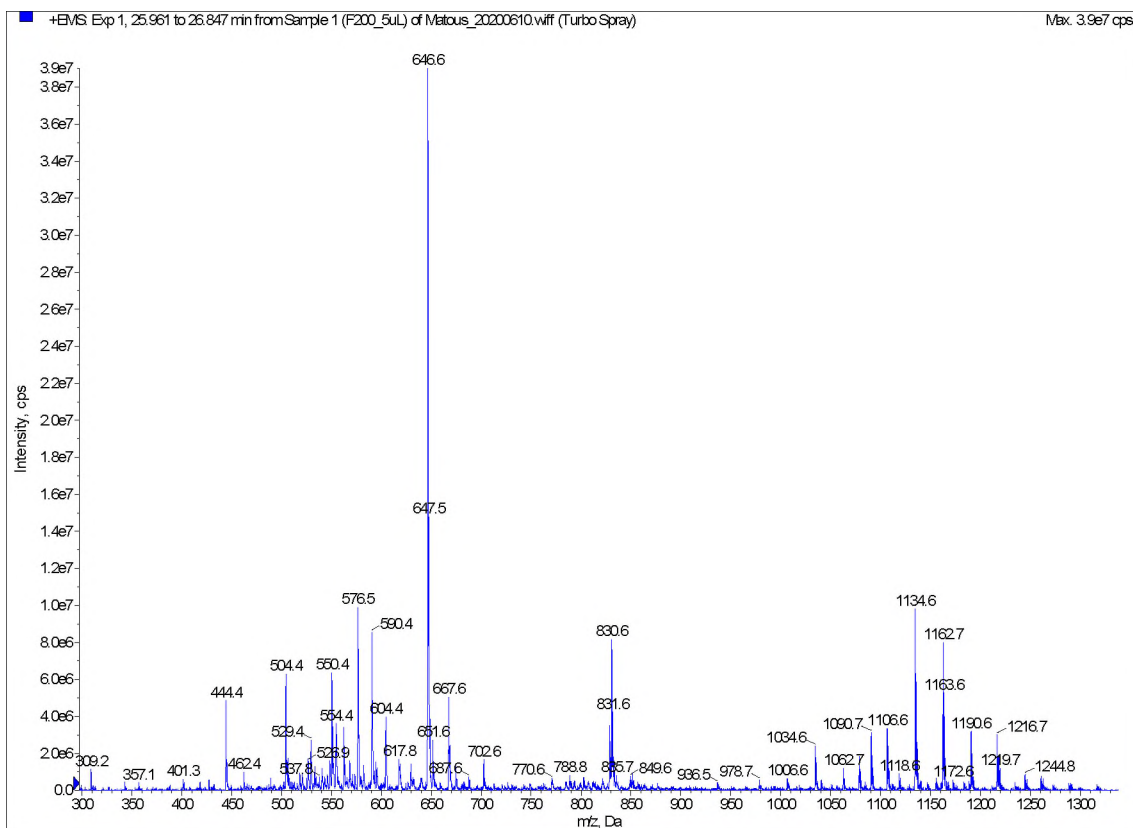
Obrázek P 65: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



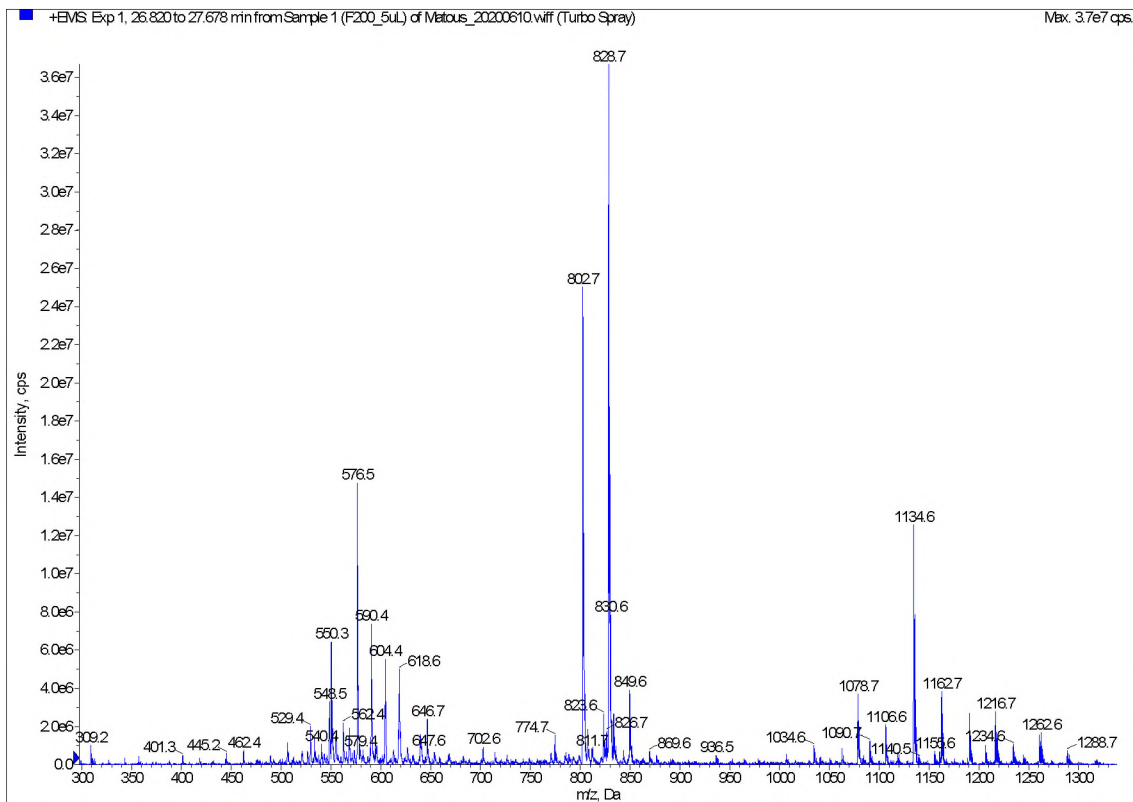
Obrázek P 66: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



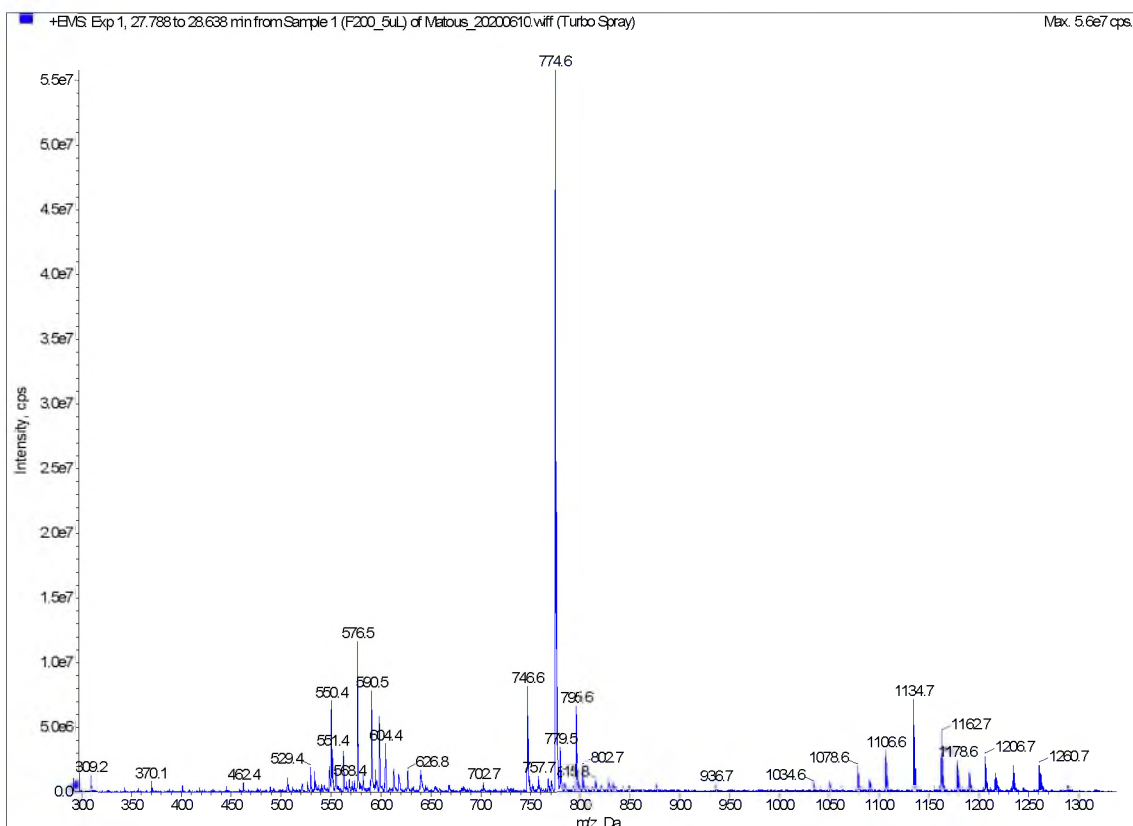
Obrázek P 67: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



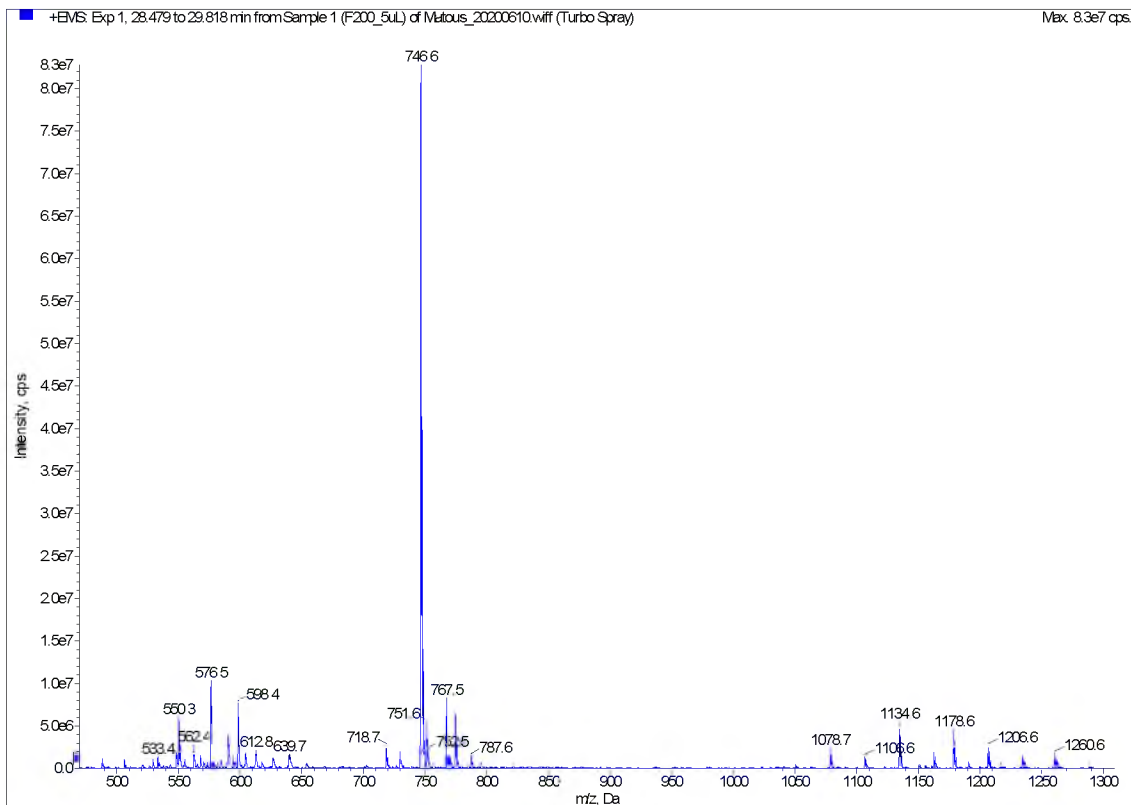
Obrázek P 68: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



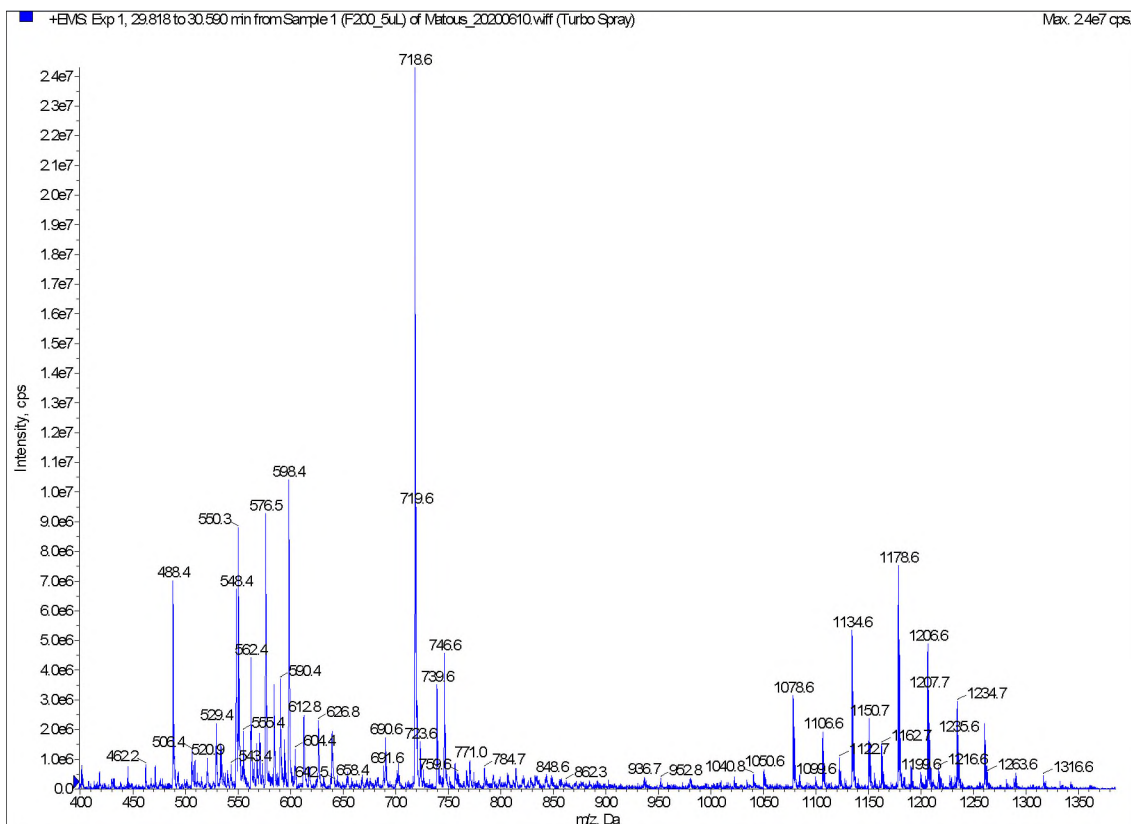
Obrázek P 69: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



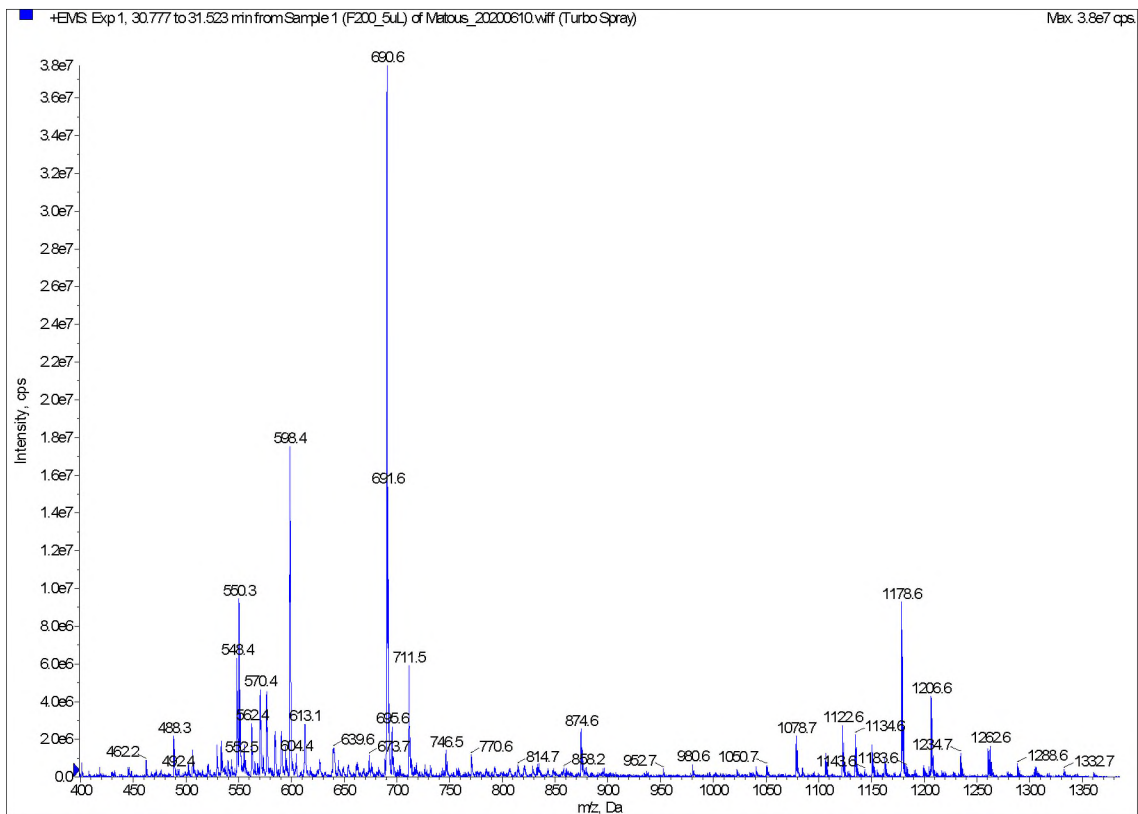
Obrázek P 70: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



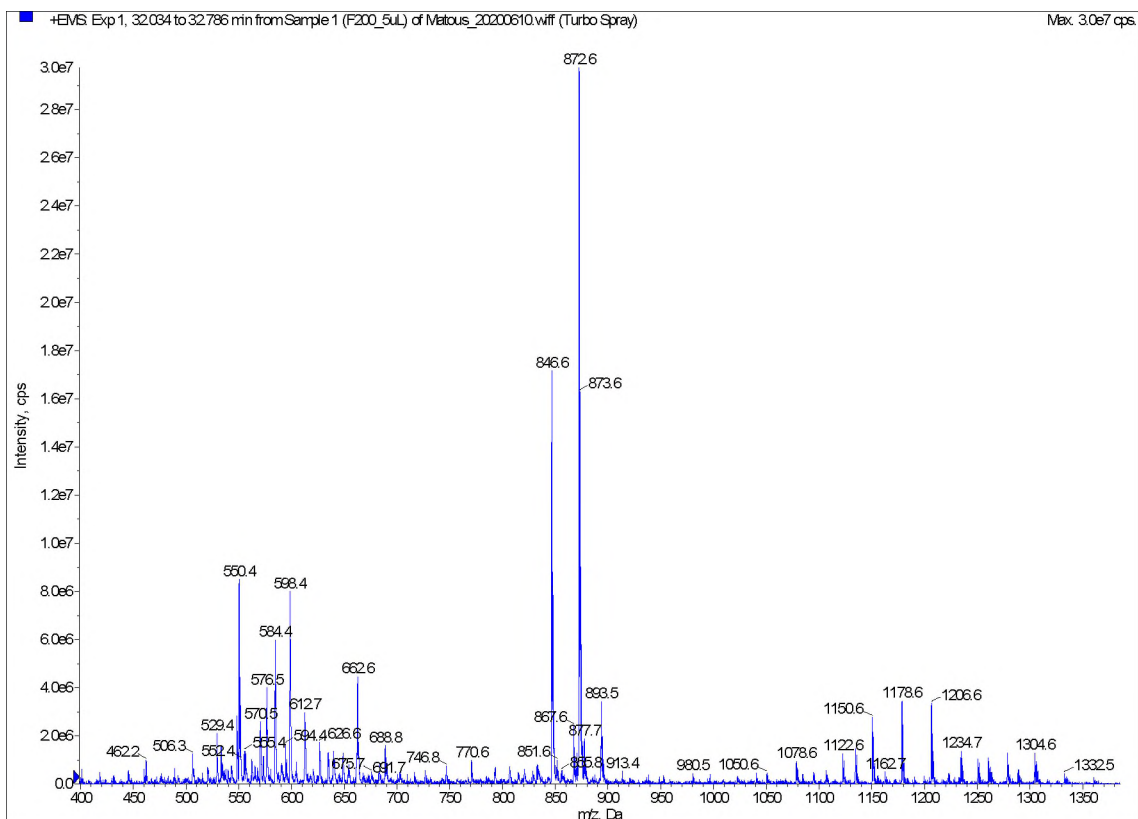
Obrázek P 71: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



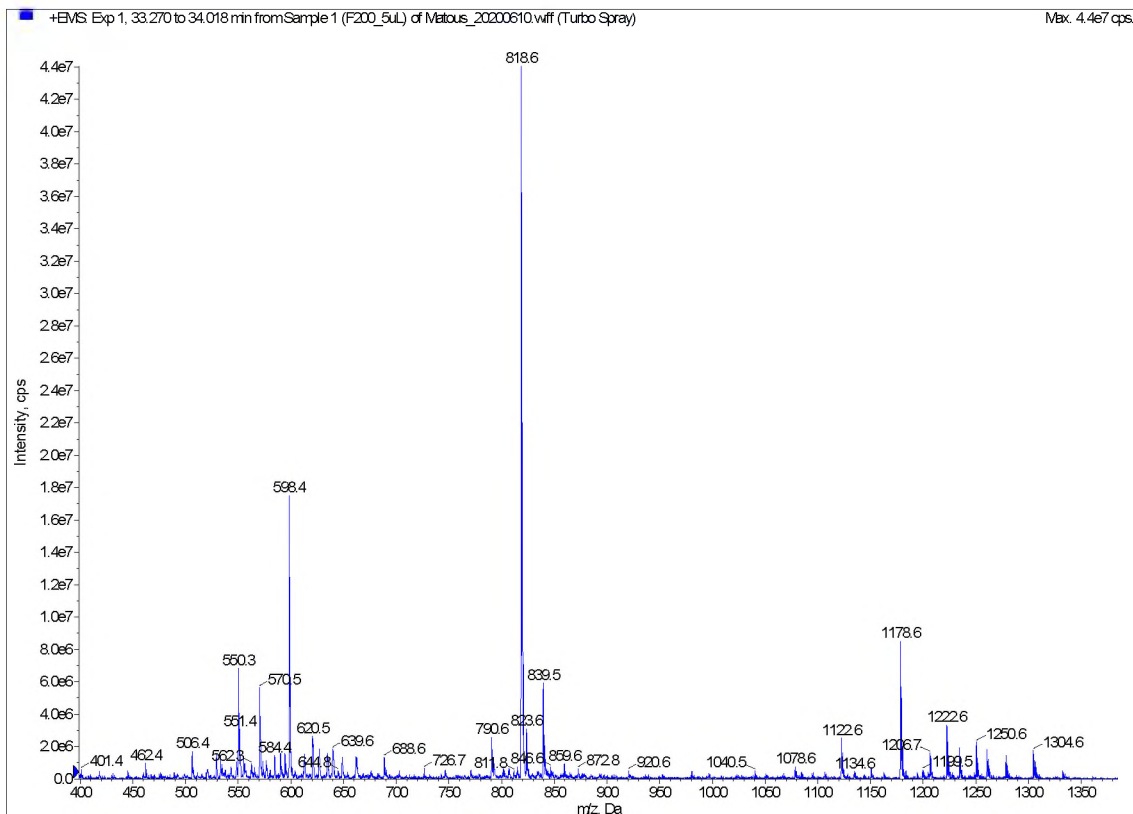
Obrázek P 72: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



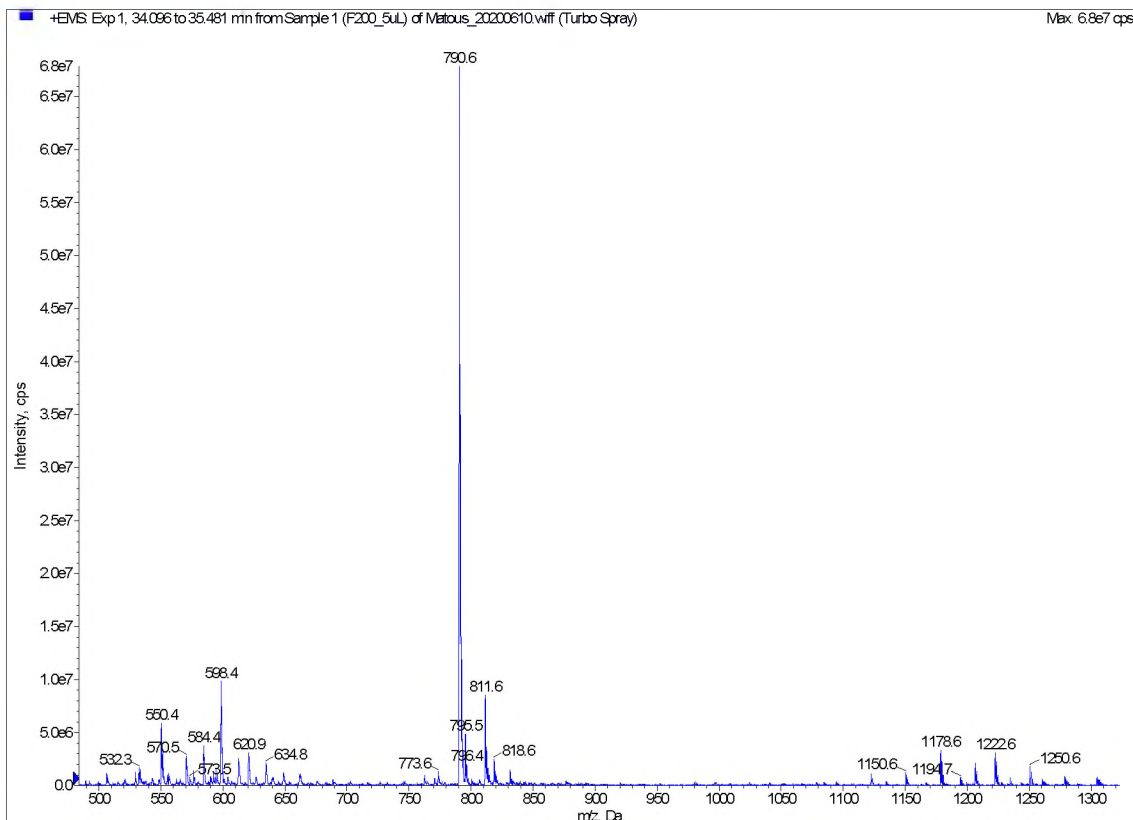
Obrázek P 73: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



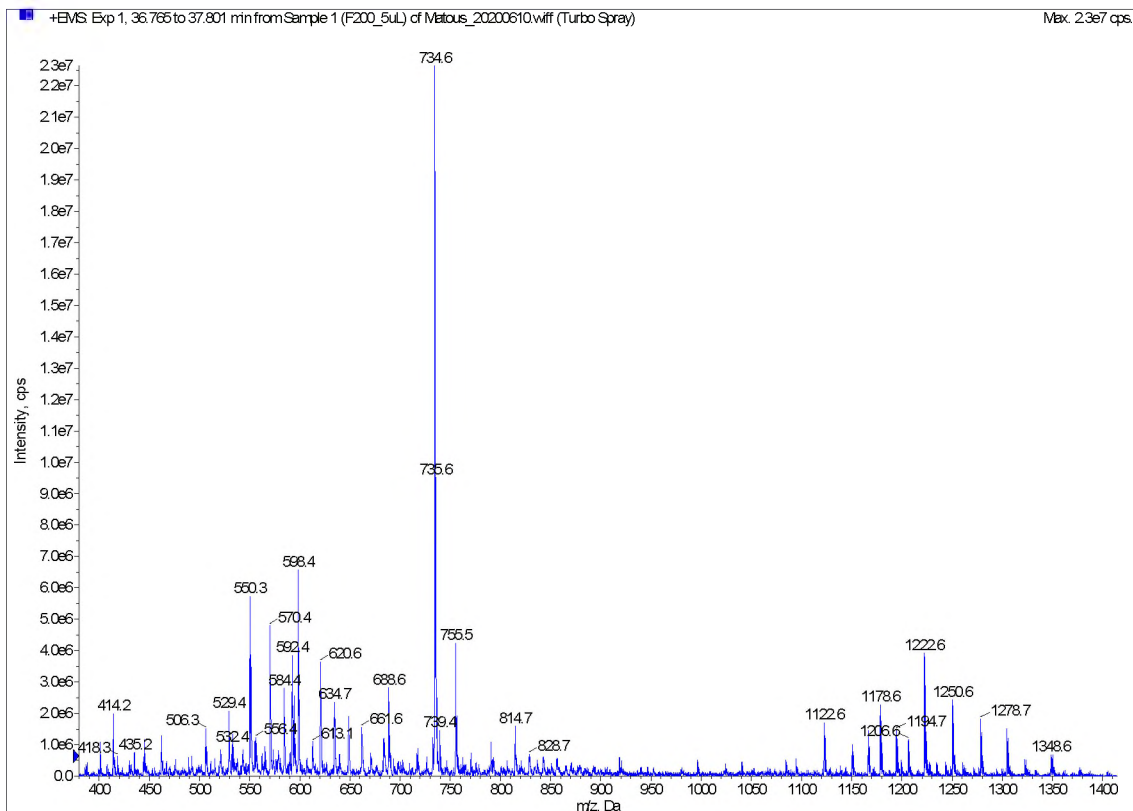
Obrázek P 74: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



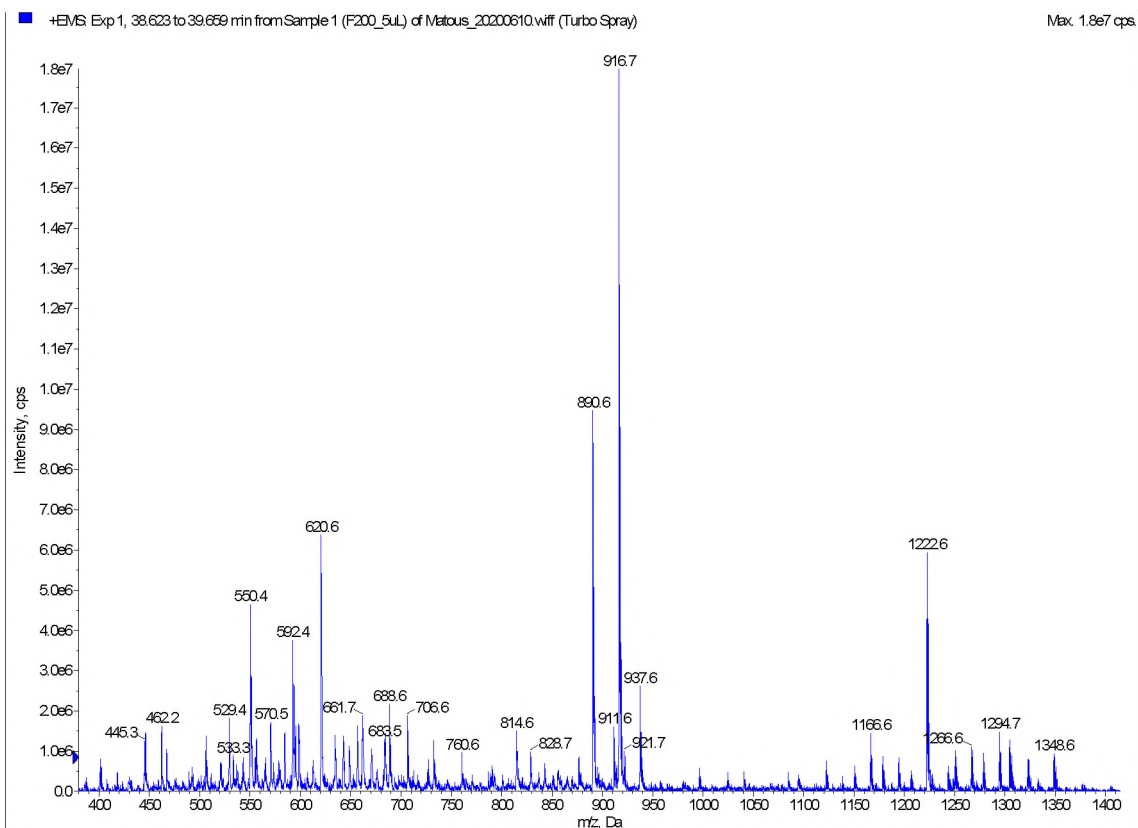
Obrázek P 75: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.



Obrázek P 76: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.

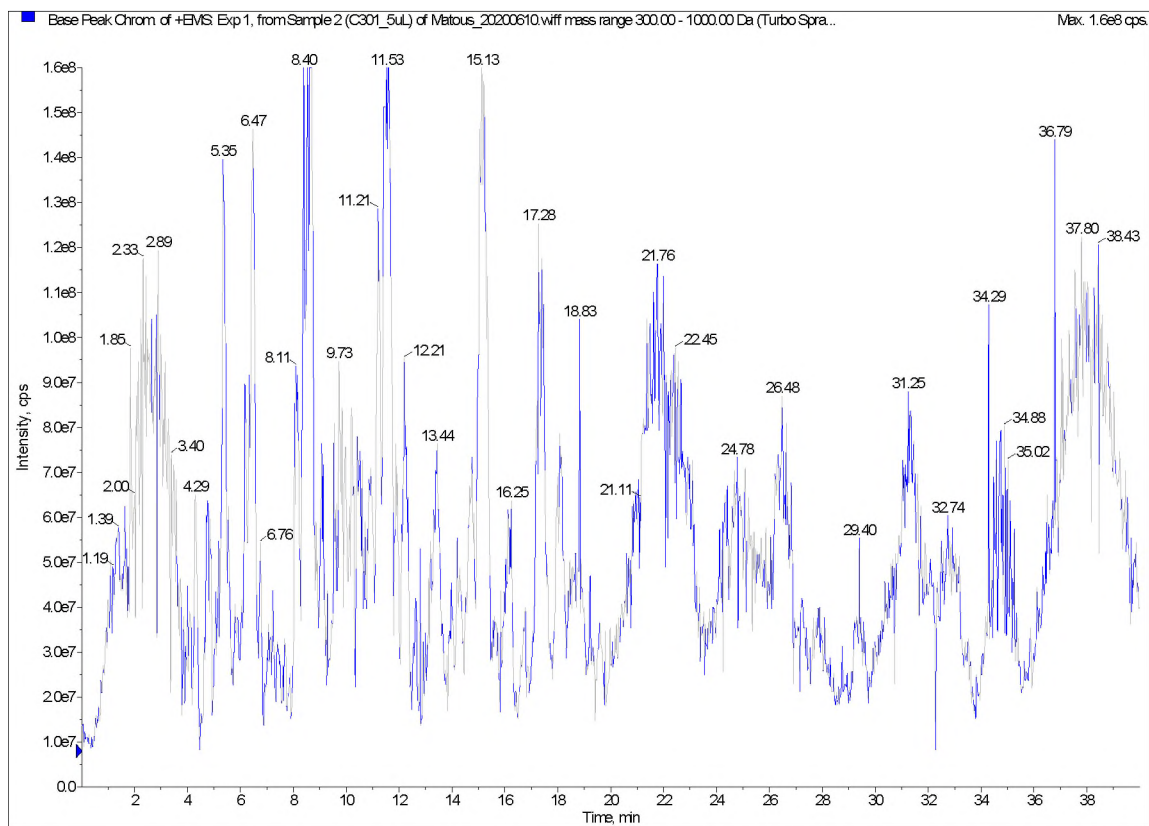


Obrázek P 77: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.

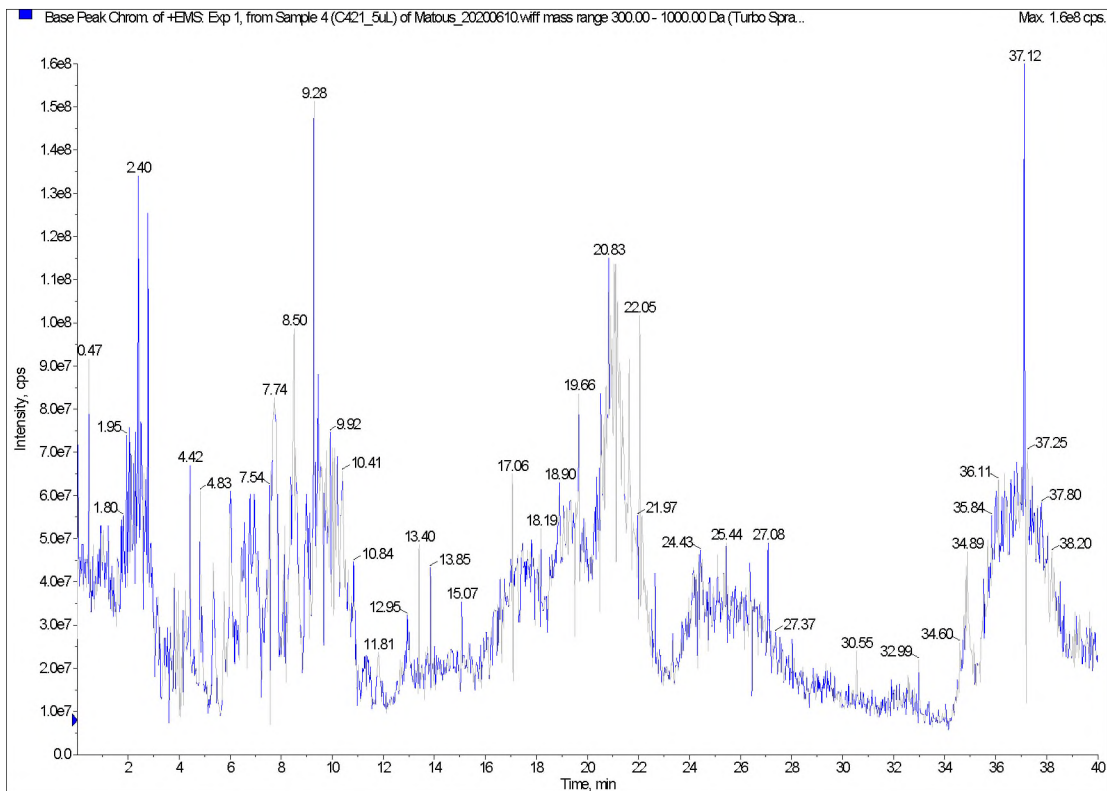


Obrázek P 78: MS spektrum tenzidu Levenol® F-200 na koloně Ascentis® Express OH5, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C, průtok 0,25 ml/min dávkování 0,5 µl.

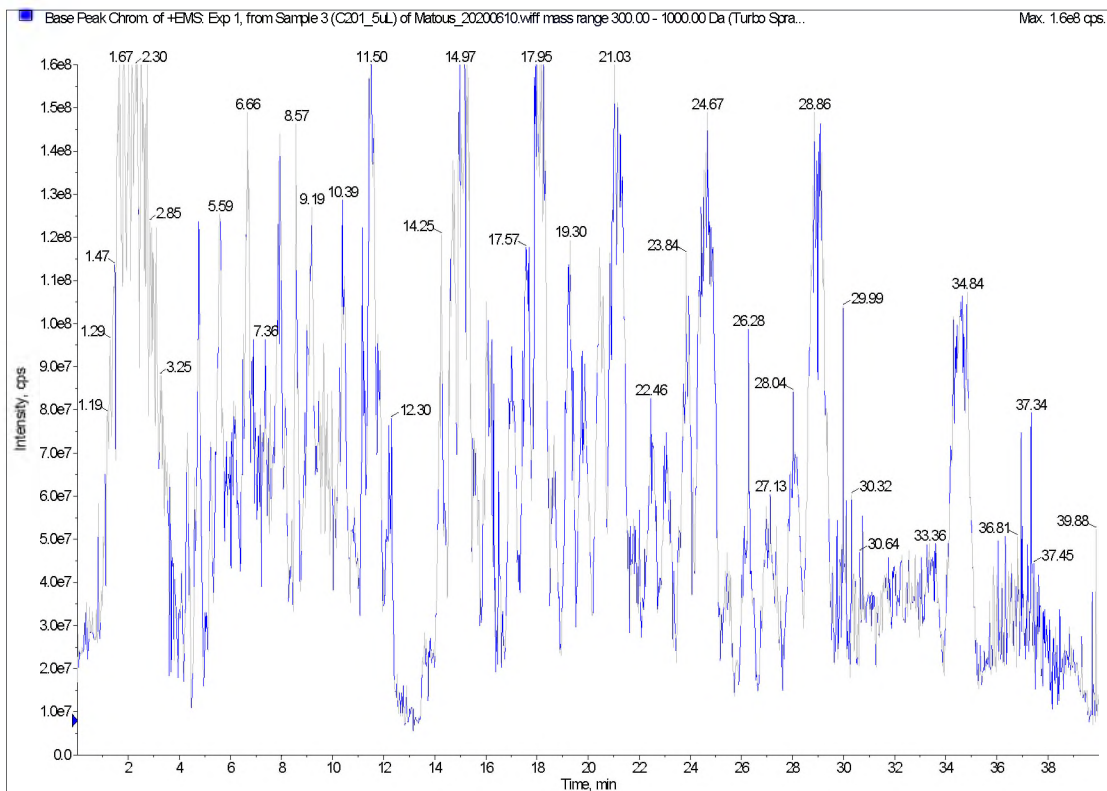
Výsledné záznamy celkového iontového proudu v pozitivním režimu analýzy vzorků tenzidů Levenol® v systému HILIC/MS.



Obrázek P 79: Výsledné TIC MS spektrum tenzidu Levenol® C-301 na koloně Ascentis® Express OH5; dávkování 0,5 µl, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C a průtok 0,25 ml/min



Obrázek P 80: Výsledné TIC MS spektrum tenzidu Levenol® C-421 na koloně Ascentis® Express OH5; dávkování 0,5 µl, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C a průtok 0,25 ml/min



Obrázek P 81: Výsledné TIC MS spektrum tenzidu Levenol® C-201 na koloně Ascentis® Express OH5; dávkování 0,5 µl, MF 100 % ACN + 10 mM octan amonný, doba analýzy 30 min, teplota 25 °C a průtok 0,25 ml/min