

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Laboratoriotekniikka

2014

Sami Pasanen

AMFOTEERISEN TENSIDIN KVANTITATIIVINEN MÄÄRITYS PESUAINEESTA

– HPLC -menetelmän kehitys



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Sami Pasanen

AMFOTEERISEN TENSIDIN KVANTITATIIVINEN MÄÄRITYS PESUAINEESTA

Opinnäytetyössä kehitettiin menetelmä, jolla voidaan analysoida amfoteerisen tensidin pitoisuus pesuainenäytteestä kvantitatiivisesti. Opinnäytetyö tehtiin KiiltoClean Oy:lle. Työssä keskityttiin nestekromatografiamenetelmään.

Teoriaosuudessa esitellään tavallisimpia amfoteerisia tensidejä ja menetelmiä amfoteeristen tensidien analysoimiseksi erilaisista näytematriiseista.

Menetelmän kehitystä varten tutkittiin kirjallisuuslähteitä sopivan menetelmän löytämiseksi. Kirjallisuusselvityksen jälkeen päädyttiin nestekromatografisiin menetelmiin. Myös kaasukromatografiaa harkittiin, mutta se olisi ollut liian epäkäytännöllistä toteuttaa. Nestekromatografisista menetelmistä valittiin testattavaksi ne, jotka olivat toteutettavissa käytävissä olevilla välineillä. Menetelmän kehityksessä lähdettiin liikkeelle kolonnin valinnasta ja siitä, suoritettiin analyysit happamissa vai neutraaleissa olosuhteissa. Vaihtoehtoina olivat joko happamat ajo-olosuhteet ja kationinvaihtokolonne tai neutraalit ajo-olosuhteet ja käänteisfaasikolonne (C18). Lähtökohdaksi valittiin C18-kolonne ja neutraalit ajo-olosuhteet. pH-olosuhteiden valinta edellytti sopivan puskuriliuoksen löytämisen. Tämän jälkeen valittiin sopiva liuotin ja optimoitiin liuottimen pitoisuus ajoliuoksessa. Ennen kvantitatiivisia analyysejä tutkittiin vielä pH:n vaikutusta kromatogrammin muotoon puskuriliuoksen pH-alueen rajoissa ja tutkittiin, häiritsevätkö amfoteerisen tensidin sisältämät apuaineet tai pesuainenäytteen muut komponentit määrittämiä.

Kvantitatiiviset määritykset suoritettiin standardisuoraan vasten. Standardisuoran liuokset valmistettiin pesuaineen raaka-aineena käytetystä amfoteerisesta tensidistä. Menetelmällä saadut pitoisuudet olivat toistettavia pitoisuusalueella 0,1 - 0,8 mg/mL.

ASIASANAT:

Amfoteerinen tensidi, HPLC, pH, kvantitatiivinen analyysi, standardit

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Laboratory Technology

june.2014 | 46 pages

Instructors: Kimmo Nurmi, R & D Chemist, M Sc; Taina Hovinen, Senior Lecturer

Sami Pasanen

QUANTITATIVE DETERMINATION OF AMPHOTERIC SURFACTANT IN DETERGENT

The objective of this thesis was to develop a method for quantitative determination of amphoteric surfactant in detergent. The study was commissioned by KiiltoClean Oy and the focus of this work was on liquid chromatography.

In the theory part most common amphoteric surfactants and their analysis methods in different detergents are introduced.

Literature references were studied in order to find a suitable method to begin with. After the literature survey liquid chromatography methods were chosen. Gas chromatography was also considered, but would not have been practical to perform. Such liquid chromatography methods were selected for testing which could be implemented with the instruments and reagents available. The next step was to decide whether to perform the analysis in acidic conditions with a cation exchange column or in neutral conditions with an octadecyl(C18) column. A cation exchange column was available somewhat unreliable which is why neutral conditions with a C18 column were chosen. A proper buffer was selected for correct pH conditions. After that an solvent was selected and its concentration in mobile phase was optimized. The effect of mobile phase to pH on the chromatogram profile and possible interferences caused by auxiliary substance in the amphoteric surfactant or other detergent components were studied before the quantitative analyses.

The quantitative analyses were performed using a regression curve and standard solutions were prepared from the amphoteric surfactant used in detergent preparation. The results obtained by this method were repeatable between 0.1 and 0.8 mg/ mL.

KEYWORDS:

amphoteric surfactant, HPLC, pH, quantitative analysis, standards

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET (TAI SANASTO)	7
1 JOHDANTO	8
2 AMFOTEERISET TENSIDIT	9
2.1 Tensidit	9
2.2 Amfoteeriset tensidit	10
2.3 Asyyli-/dialkyylietyleenidiamiinit ja näiden johdannaiset	12
2.4 N-alkyyliaminohapot tai –iminohapot	12
2.5 Propionaatit	13
2.6 Amfolyytit	13
2.7 Amfoteerinen tensidi 1	14
3 MENETELMIÄ AMFOTEERISTEN TENSIDIEN ANALYSOIMISEKSI	17
3.1 Kaasukromatografia	17
3.1.1 Derivointi	17
3.1.2 Kemiallinen hajottaminen	18
3.2 Ohutkerroskromatografia	18
3.3 UV-spektroskopia	19
3.4 Muita menetelmiä	19
4 HPLC AMFOTEERISTEN TENSIDIEN ANALYSONNISSA	20
4.1 Kolonni	20
4.2 Ajoliuos	21
4.3 Detektorit	22
4.4 Menetelmiä	23
5 AMFOTEERISEN TENSIDIN 1 ANALYYSIT NESTEKROMATOGRAFILLA	25
5.1 Menetelmän valinta	25
5.2 Reagenssit	25
5.3 Välineet ja laitteet	26
5.4 Detektointi	27
5.5 Näytteen käsittely	28
5.6 Ajoliuos	28

5.6.1 Liuottimen valinta	28
5.6.2 Ajoliuoksen puskurointi	30
5.7 Ajoparametrit	33
5.8 Pesuainenäyte	34
5.9 Amfoteerinen tensidi 1 standardina	35
5.10 Pitoisuusalue	36
5.11 Näytteen pitoisuuden mittaaminen	37
5.12 Työturvallisuus ja jätteiden käsittely	39
5.13 Tulokset	39
5.14 Virhelähteet	41
6 MAHDOLLISIA JATKOTOIMENPITEITÄ	42
7 YHTEENVETO	44
LÄHTEET	45

LIITTEET

- Liite 1. Amfoteerisen tensidin 1 käyttäytyminen eri puskuriliuoksissa
- Liite 2. Amfoteerisen tensidin 1 eräkohtainen vertailu
- Liite 3. Esimerkki 15.5.2014 saatujen tulosten laskemisesta
- Liite 4. Menetelmäohje Amfoteerisen tensidin määrittämiseksi pesuaineesta HPLC:lla
- Liite 5. Amfoteerisen tensidin määrittäminen pesuaineesta ammoniumasetatipuskurissa

KUVAT

Kuva 1. Tensidin rakenne	9
Kuva 2. Tensidin toimintaperiaate	9
Kuva 3. Amfoteeristen tensidien luokittelu	10
Kuva 4. Tensidin amfoteerinen luonne.	11
Kuva 5. Amfolyytin rakenne.	11
Kuva 6. Amino ja imino.	13
Kuva 7. Alkyyliidimetyylibetaiinien synteesi.	14
Kuva 8. Alkyyli-1,3-dipropyylimiamiinin ja 2-kloorietikkahapon reaktiotuote	15
Kuva 9. Amfoteerisen tensidin 1 amfoteerinen luonne	15
Kuva 10. HPLC-laitteisto.	26
Kuva 11. UV-detektori ja RI-detektori	27

Kuva 12. Liuottimena 80 % metanoli	28
Kuva 13. Asetonitrili 70%.	29
Kuva 14. Asetonitrili 60%.	29
Kuva 15. 90 % metanoli.	30
Kuva 16. 80 % metanoli	30
Kuva 17. pH 6,9 MeOH 85%.	32
Kuva 18. pH 7,3 MeOH 85%	32
Kuva 19. Ajoliuoksen pH 7,3 MeOH 80%	32
Kuva 20. Ajoliuoksen pH 7,6 MeOH 80%	33
Kuva 21. Pesuainenäyte.	34
Kuva 22. Amfoteerinen tensidi 1.	35
Kuva 23. Piikin juuri	36
Kuva 24. Lineaarisuustesti	37
Kuva 25. Amfoteerinen tensidi 1 liuotettuna divetyfosfaattipuskuriin.	47
Kuva 26. Amfoteerinen tensidi 1 liuotettuna karbonaattipuskuriin.	47
Kuva 27. Piikin pinta-ala/Pitoisuus.	50
Kuva 28. Piikin korkeus/Pitoisuus.	50

TAULUKOT

Taulukko 1. Amfoteerisen tensidin 1 ominaisuuksia	15
Taulukko 2. Valmistajan antamat tiedot amfoteeriselle tensidille 1	16
Taulukko 3. Puskureita	21
Taulukko 4. cut-off-arvoja	22
Taulukko 5. Ultrapuhdas vesi.	25
Taulukko 6. Saostustesti	31
Taulukko 7. Ajoparametrit	33
Taulukko 8. Erä-testi.	36
Taulukko 9. Standardisuoran liuokset	38
Taulukko 10. Ajoparametrit	38
Taulukko 11. Systeemitesti	39
Taulukko 12. Pesuaineen tensidipitoisuus.	40
Taulukko 13. Pesuaineen amfoteerisen tensidin 1 pitoisuus	40
Taulukko 14. Parametrit	48
Taulukko 15. Eräkohtainen vertailu	48
Taulukko 16. Tulokset	49

KÄYTETYT LYHENTEET (TAI SANASTO)

Amft1	Amfoteerinen tensidi 1
AU	Absorbance unit (Absorbanssiyksikkö) ¹⁵
ELS	Evaporative light scattering (haihduttava valonsiron- tadetektori) ¹⁴
Eluentti	Ajoliuos
GC	Gas chromatography (kaasukromatografia) ⁹
HPLC	High performance liquid chromatography (Korkean erotusky- vyn nestekromatografia) ⁹
IR	Infrared (infrapuna) ⁹
Isoelektrinen piste	Se pH-alue, minkä sisällä yhdisteen kokonaisvaraus on nol- la ⁷
MS	Mass spectrometry (massaspektrometri) ⁹
NMR	Nuclear magnetic resonance(ydinmagneettinen resonanssi) ⁹
RI	Refractive index (Taitekerroin) ⁹
TLC	Thin Layer Chromatography(Ohutkerroskromatografia) ⁹
UV	Ultraviolet (Ultravioletti) ⁹

1 JOHDANTO

Amfoteerisia tensidejä käytetään erilaisissa pesuaineissa vaikuttavina aineina. Amfoteerisia tensidejä suositaan erityisesti henkilökohtaisen hygienian tuotteissa, sillä ne toimivat parhaiten neutraaleissa olosuhteissa¹. Amfoteerisia tensidejä on useita erilaisia ja opinnäytetyössä esitellään tavallisimmat teollisuuden käytössä olevat amfoteeriset tensidit. Tässä työssä mielenkiinnon kohteena oleva amfoteerinen tensidi on ”Alkyyli-1,3-dipropyliamiinin ja 2-kloorietikkahapon reaktiotuote”; cas: 139734-65-9².

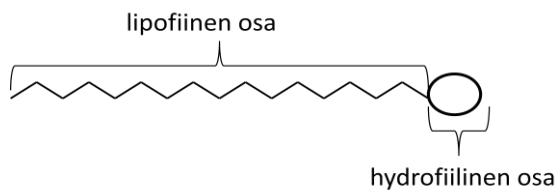
Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää menetelmä amfoteerisen tensidin pitoisuuden määrittämiseksi kvantitatiivisesti pesuainenäytteestä. Opinnäytetyö tehtiin KiiltoClean oy:lle ja menetelmällä on tarkoitus seurata pesuaineessa käytettävän amfoteerisen tensidin laatua. Menetelmän lähtökohtana oli suorittaa analyysit nestekromatografisesti. Myös muita menetelmiä, kuten kaasukromatografia harkittiin, mutta nestekromatografian katsottiin olevan sopivin vaihtoehto toteuttaa.

Menetelmäkehityksessä lähdettiin liikkeelle siitä, että etsittiin kirjallisuustalteen mahdolliset olosuhteet, joissa saataisiin amfoteerisen tensidin piikki erottumaan. Tämän jälkeen optimoitiin olosuhteet, kuten ajoliuoksessa käytettävän liuotimen pitoisuus ja ajoliuoksen pH, sekä ajoaika. Menetelmän kehityksessä käytetty laite oli Agilentin 1100-sarjan nestekromatografi, jossa oli automaattinen injektor, pumppu, kaasunpoistojärjestelmä, kolonniuuni, ultraviolettivalodetektor ja taitekerroindetektor. Mittauksissa käytettiin KiiltoCleanilta saatua amfoteerista tensidiä ja pesuainenäytettä.

2 AMFOTEERISET TENSIDIT

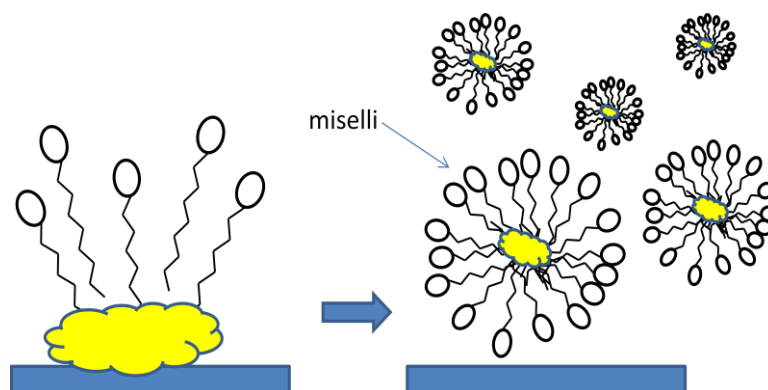
2.1 Tensidit

Tensideitä käytetään pesuaineissa aktiivinaeineina. Tensidit asettuvat veden rajapintaan siten että hydrofiilinen osa hakeutuu vettä kohti ja lipofiilinen pää vedestä pois. Kun tensidejä on tarpeeksi veden pinnalla, veden pintajännitys alenee. Tensidit ovat siis pinta-aktiivisia aineita. Tensidien puhdistava vaikutus perustuu niiden kykyyn asettua veden ja rasvan rajapintaan ja emulgoida rasva pienemmiksi tensidien ympäröimiksi osiksi eli miselleiksi. Kuvassa 1 on tensidin rakenne yksinkertaistetussa muodossa. Tensidi koostuu lipofiilisesta eli rasvahakuisesta osasta ja hydrofiilisestä eli vesihakuisesta osasta.³



Kuva 1. Tensidin rakenne

Misellissä tensidin hydrofiilinen osa osoittaa ulospäin ja lipofiilinen osa on suuntautunut misellin keskelle. Tensidit ympäröivät rasvan jolloin rasva emulgoituu vesiliuokseen.



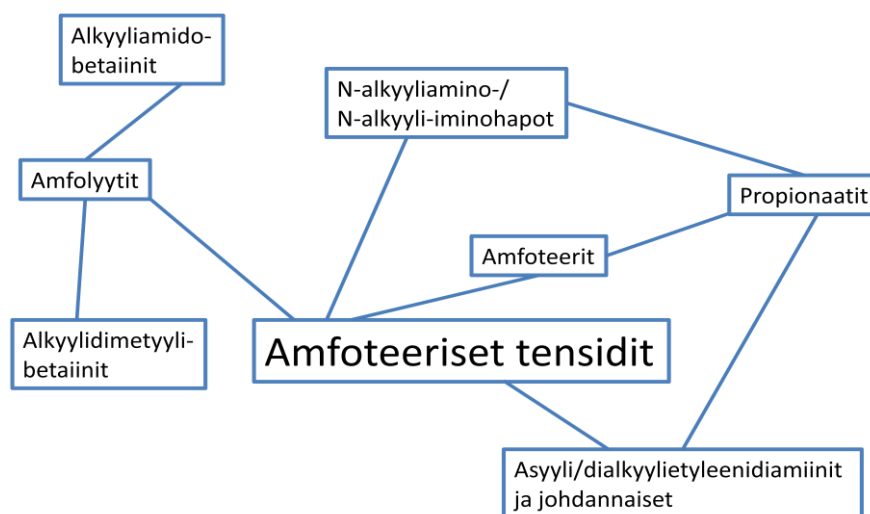
Kuva 2. Tensidin toimintaperiate

Tensidit jaetaan anionisiin, kationisiin, ionittomiin ja amfoteerisiin tensideihin. Anionisilla tensideillä on hydrofiilisessä päässä negatiivisesti varautunut funktionaalinen ryhmä, anioni. Kationisilla tensideillä funktionaalinen ryhmä on positiivisesti varautunut kationi ja ionittomilla tensideillä ei ole varausta niiden hydrofiilisessä päässä. Amfoteerisilla tensideillä on hydrofiilisessä päässä sekä positiivisesti, että negatiivisesti varautunut ryhmä. Happamissa olosuhteissa amfoteerinen tensidi menettää negatiivisen varauksensa ja tensidistä tulee kationinen. Emäksisissä olosuhteissa amfoteerinen tensidi taas menettää positiivisen varauksensa, jolloin siitä tulee anioninen.³

2.2 Amfoteeriset tensidit

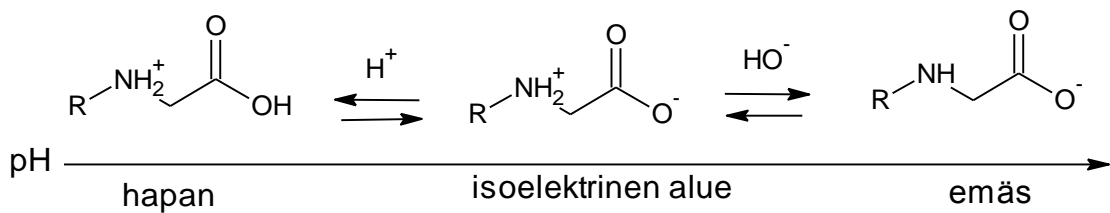
Amfoteerisia tensidejä käytetään henkilökohtaisen hygienian tuotteissa yhdessä muiden tensidien, kuten anionisten tai ionittomien tensidien kanssa. Amfoteerisia tensidejä käytetään myös teollisuudessa pesuaineina, sillä ne sietävät hyvin korkeita elektrolyyttipitoisuuksia. Amfoteerisia tensidejä käytetään vaahtoamisesta vastaavina ainesosina esimerkiksi palontorjuntatuotteissa. Amfoteerisia tensidejä käytetään hydrotrotooppeina, eli niitä käytetään parantamaan huonosti liukenevien aineiden liukoisuutta veteen.^{1;4}

Amfoteeristen tensidin luokittelu on esitetty kuvassa 3.



Kuva 3. Amfoteeristen tensidien luokittelu

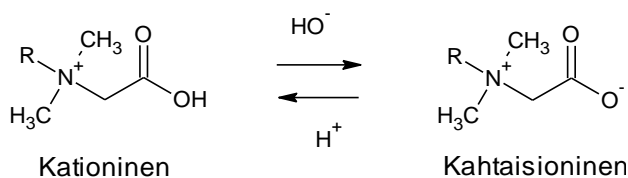
Amfoteereiksi kutsutut amfoteeriset tensidit esiintyvät kolmessa eri muodossa riippuen ympäristön vetyionikonsentraatiosta (pH). Happamissa oloissa amfoteerin karboksyylihapporyhmään kiinnittyy protoni jolloin tensidistä tulee kationinen. Emäksisissä oloissa aminoryhmä luovuttaa ylimääräisen protoninsa jolloin tensidistä tulee anionien. Tensidin amfoteerinen luonne on kuvassa 4. Amfoteerisilla tensideillä on happamien ja emäksisten olosuhteiden välissä pH-alue, jolloin amfoteeriset tensidit esiintyvät kahtaisionimuodossa. Tätä pH-aluetta kutsutaan amfoteerisen tensidin isoelektriseksi alueeksi.^{5;6}



Kuva 4. Tensidin amfoteerinen luonne.

Monessa eri artikkelissa, jossa on aiheena amfoteeristen tensidien analysointi, on analysoitu amfolyytteja. Tässä opinnäytetyössä on sovellettu näitä menetelmiä, joten amfolyytit on otettu mukaan tähän opinnäytetyöhän. Amfolyytit sisältävät täysin kvaternäärisen aminoryhmän, eivätkä voi esiintyä kuin kahtaisioni-, tai kationisessa muodossa. Kuvassa 5 on esitetty amfolyytin rakenne. Kvaternäärisellä aminoryhmällä tarkoitetaan, että typpiatomiin on kiinnittynyt neljä orgaanista ryhmää.⁷

Koska amfolyytit eivät kykene esiintymään anionisessa muodossa, se että luokitellaanko ne kationisiksi vai amfoteerisiksi tensideiksi ei ole täysin vakiintunut.



Kuva 5. Amfolyytin rakenne.

Pääasiassa amfoteeriset tensidit jaetaan kahteen alaluokkaan:

1. Asyyli-/dialkyylietyleenidiamiinit ja näiden johdannaiset
2. N-alkyyliaminohapot

Molemmat alaluokat kuuluvat amfoteereihin.⁵

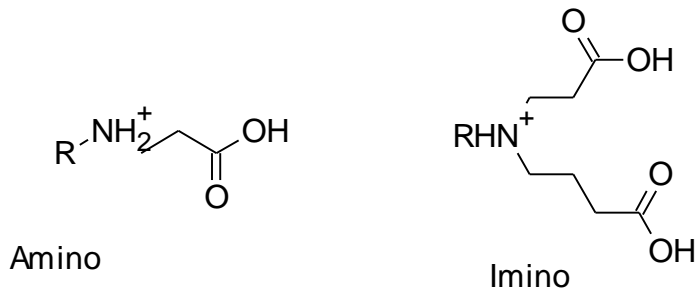
2.3 Asyyli-/dialkyylietyleenidiamiinit ja näiden johdannaiset

Asyyli-/dialkyylietyleenidiamiineja sekä näiden johdannaisia myydään sekä happoina, joko vesiliuoksina tai pastoina, että happojen suoloina. Tämän luokan aineet eivät ilmene yhtenä tiettyinä yhdisteinä, vaan ne sisältävä useita eri reaktiotuotteita, joita on muodostunut synteessin aikana. Tällaisia epäpuhtauksia ovat muun muassa amiinisaippuat ja kompleksiset sekundääriset amiinit. Kuitenkin nämä usean eri aineen seokset toimivat kokonaisuutena amfoteerisina tensideinä ja ovat neutraaleissa olosuhteissa kahtaisionisina. Asyyli-/dialkyylietyleenidiamiineja valmistetaan alkyylimidatsolista ja kloorietikka- tai akryylihaposta¹. Asyyli-/dialkyylietyleenidiamiinit ovat vesiliukoisia ja ne ovat vesiliuoksissa stabiileja eivätkä hajoa veden vaikutuksesta. Kuitenkin isoelektrisessä pisteessä, jolloin yhdisteen kokonaisvaraus on nolla, liukoisuus veteen on huonompi^{1;7}. Ne ovat verrattain huonoja emulgaattoreita ja niitä käytetään yhdessä muiden tensidien kanssa. Näitä yhdisteitä käytetään shampoissa vähentämään silmien ärsytystä.⁵

2.4 N-alkyyliaminohapot tai -iminohapot

N-alkyyliaminohapot ovat aminohappojen johdannaisia. Monet tämän luokan yhdisteet ovat *b*-alaniinin tai *b*-N(2-karboksylietyyli)-alaniinin johdannaisia. N-alkyyliaminohappoja myydään myös happoina sekä happojen natriumsuoloina. Suolat ja iminohapot ovat hyvin vesiliukoisia.^{1;5}

Jos työssä on vain kaksi orgaanista ryhmää, yhdiste on "amino". Jos orgaanisia ryhmiä on kolme, yhdiste on "imino". Kuvassa 6 näkyy yhdisteiden rakenteellinen ero.⁵



Kuva 6. Amino ja imino.

N-alkyyliaminohapot vaahtoavat hyvin neutraaleissa ja emäksisissä olosuhteissa, mutta ne menettävät vaahtoamisominaisuutensa happamissa oloissa. Nämä yhdisteet ovat hydrolyttisesti stabiileja, mikä tarkoittaa että ne reagoivat huonosti emäksien ja happojen kanssa. Koska N-alkyyliaminohapot vähentävät silmien ärsytystä, niitä käytetään kosmetiikassa ja henkilökohtaisen hygienian tuotteissa.^{1;5}

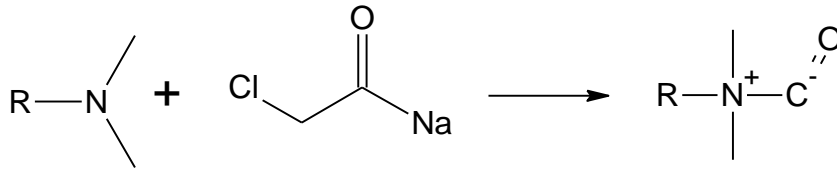
2.5 Propionaatit

Propionaatteja on sekä asyyli-/dialkyylietyleenidiamiinien, että N-alkyyliamino- tai iminohappojen alaluokissa. Propionaateilla isoelektrinen alue on pH-alueella 2 - 4, jolloin ne esiintyvät kahtaisionimuodossa. Isoelektrisellä alueella propionaattien liuokoisuus veteen on huonompi, kuin alueen ulkopuolella. Isoelektristä aluetta alhaisemmassa pH:ssa propionaatit ovat kationisessa muodossa ja korkeammassa pH:ssa ne ovat anionisessa muodossa. pH-alueella 4,5 - 8,5 propionaattien molemmat funktionaaliset ryhmät ovat aktiivisia. Aminoryhmä vastaa yhdisteen pysyvyydestä ja karboksyyli-ryhmä vastaa vaahtoavuudesta.⁵

2.6 Amfolyytit

Amfolyytteihin kuuluvat alkyylidimetyyllibetaiinit löydettiin alun perin juurikkaista 1876. Näiden aineiden kysyntä on ollut nousussa koska ne ovat mietoja tensidejä. Amfolyytit ovat hydrolyttisesti stabiileja yhdisteitä. Alkyylidimetyyllibetaiinit

valmistetaan alkyylidimetyylistä ja natriumklooraatista.⁵ Synteesi on esitetty kuvassa 7.



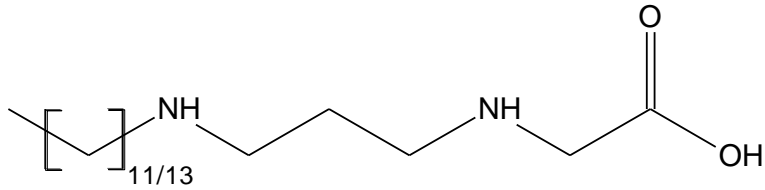
Kuva 7. Alkyylidimetyyllibetaiinin synteesi.⁵

Alkyyliamidobetaiinit sisältävät amidiryhmän, joka saa aikaiseksi runsaan vaahtoamisen. Tämän takia alkyyliamidobetaiineja käytetään runsaasti vaahtoavissa tuotteissa kuten kylpyvaahdossa. Yhdisteet ovat hydrolyyttisesti epävakaita, eli ne reagoivat helpommin veden kanssa, jos niitä käytetään vahvasti happamissa tai emäksisissä oloissa⁸. Yleinen tämän ryhmän tuote on kokoamidopropyylibetaiini. Alkyyliamidobetaiinit voidaan jakaa vielä kolmeen alaluokkaan; vähäsuolaisiin betaiineihin, lauryylimyristiiniamidobetaiineihin, ja setyylibetaiineihin. Muita amfolyyttejä ovat sulfonibetaiinit ja imidatsoliiniamfoteerit.⁵

2.7 Amfoteerinen tensidi 1

Tässä työssä keskitytään yhteen amfoteeriseen tensidiin, jonka nimi on Alkyyli-1,3-dipropyliamiinin ja 2-kloorietikkahapon reaktiotuote; englanniksi yhdisteen nimi on Amines, N-C10-16-alkyltrimethylenedi-, reaction products with chloroacetic acid. Tässä työssä yhdistettä kutsutaan lyhyesti nimellä amfoteerinen tensidi 1.²

Amfoteerisen tensidin 1 rakenne on kuvassa 8. Rakennekaava on saatu tensidin valmistajalta.



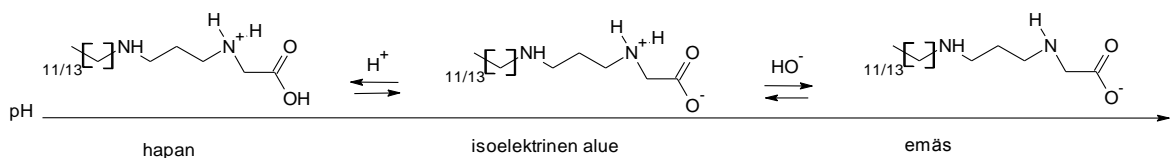
Kuva 8. Alkyyli-1,3-dipropyliamiinin ja 2-kloorietikkahapon reaktiotuote

Amfoteerisen tensidin 1 muita tietoja on taulukossa 1.² pH on saatu käyttöturvaviedotteesta⁸.

Taulukko 1. Amfoteerisen tensidin 1 ominaisuuksia

CAS	139734-65-9
Moolimassa	280,79 g/mol (keskiarvo)
Ulkonäkö	vaaleankeltainen, tahmea
Pintajännitys	27 mN/m (20 % liuos)
Höyrynpaine (20 °C)	$1,9 \times 10^{-6}$ hPa
Syttymispiste	> 400 °C
pH	7,5-8,0
Tiheys	1,00 g/cm ³
Liukoisuus veteen	> 208,3 g/L

Amfoteerisen tensidin 1 amfoteerinen luonne on esitetty kuvassa 9. Taulukossa 2 on esitetty amfoteerisen tensidin 1 valmistajan analyysitodistuksessa määritämät raja-arvot.



Kuva 9. Amfoteerisen tensidin 1 amfoteerinen luonne

Taulukko 2. Valmistajan antamat tiedot amfoteeriselle tensidille 1

Viskositeetti / 20 °C (mPas)	<= 200
Kloridipitoisuus (%)	1,75-1,85
pH	7,7-8,3
Tiheys / 20 °C (g/mL)	0,9950-1,0050

Valmistajan tietojen mukaan amfoteerinen tensidi 1 on biosidi, eli se tuhoaa mikrobeja tehokkaasti. Amfoteerinen tensidi 1 tuhoaa niin grampositiivisia, kuin gramnegatiivisia bakteereja. Se tehoaa myös hiivoihin ja homeisiin sekä viruksiin, kuten immuunikatovirukseen, herpeskseen ja rotavirukseen. Amfoteerinen tensidi 1 soveltuu käytettäväksi niin alkoholi-, kuin vesiliuoksissa ja sopii kovien pintojen putsaamiseen kotikäytössä ja teollisuudessa.

Analyysitodistuksista kävi ilmi, että jokaisella valmistetulla erällä on eri ominaisuudet taulukon 2 rajojen sisällä. Tämä tuli ottaa huomioon menetelmän kehityksessä. Aiheesta lisää kappaleessa viisi.

3 MENETELMIÄ AMFOTEERISTEN TENSIDIEN ANALYSOIMISEKSI

Joskus voi olla tarpeen erotella analysoitavat tensidit muista näytteen komponenteista ennen varsinaisia analyyseja. Tensidejä voidaan erotella tislamalla, uuttamalla tai saostamalla. Preparatiivisella ioninvaihtokromatografialla voidaan erottaa tensidejä toisistaan sekä epäpuhtauksista.⁹

Tässä kappaleessa käsitellään eri menetelmiä, joita käytetään amfoteeristen tensidien kvalitatiiviseen ja kvantitatiiviseen analyysiin. Koska tämän työn pääpaino on nestekromatografiassa, tämä analytiikka käsitellään tarkemmin kappaleessa neljä.

3.1 Kaasukromatografia

3.1.1 Derivointi

Kaasukromatografialla (GC) ei voida suorittaa suoraa analyysiä amfoteerisille tensideille johtuen niiden huonosta haihtuvuudesta. Näin ollen tensidit pitää derivoida paremmin haihtuvaan muotoon.⁹

Denis Campeaun ja Ilona Grudan julkaisussa analysoidaan alkyyliminoprolyylyglysiinityypisiä amfoteerisia tensidejä. Määritettäviä molekyyliä olivat, N-alkyylipropyylyglysiinit, N-alkyyliamiinit ja N-alkyylipropyyliamiinit. Menetelmää kuvataan nopeaksi tarkaksi, herkäksi ja verrattain edulliseksi. Käytettävä kolonni oli 1,8 metriä pitkä, pakattu 3 % SE-30-kolonni ja injektointilavuus 10 mikrolitraa (µL). Injektointi suoritettiin 60 °C:ssa ja lämpötila nostettiin 240 °C asti 15 °C/min. Typpikaasun virtausnopeus oli 30 L/min. Ajoaika oli 15 tai 20 minuuttia. Standardituotteet syntetisoitiin laboratoriossa. Näyte käsiteltiin ensin kylmäkuivaamalla ja loppu vesi poistettiin atseotrooppisella tislauksella. Diaminohapot esteröitiin refluksimalla 1,5 tuntia metanolissa, johon oli lisätty kloorivetyhappoa. Esterin eristämiseen käytettiin natriumbikarbonaattia ja uutto tapahtui klo-

roformilla. Kaikki syntetisoidut tuotteet karakterisoitiin infrapunaspektroskoopilla(IR).¹⁰

Menetelmällä saavutettiin hyvä erotus. Esimerkiksi kahdella pitkäketjuisella yhdisteellä, joilla oli eroa hiiliketjussa vain kahden hiilen verran, retentioaikojen ero oli yli minuutti. Menetelmällä ei määritetty tarkkoja pitoisuuksia, vaan aineiden suhteellinen esiintyvyys yhdisteissä määritettiin kromatogrammien piikkien suhteellisten kokojen perusteella.¹⁰

3.1.2 Kemiallinen hajottaminen

Tensidien kemiallisella hajottamisella saadaan hajotettua tensidit helposti haihtuviin osiin, jotka analysoidaan GC:llä. Hoffmanin eliminaatiota suositellaan kvaternäärisille amiineille. Hoffamin eliminaatiossa kvaternäärinen amiini hajotetaan tertiääriseksi amiini- tai alkeenifraktioiksi lämmittämällä tai antamalla reagoida emäksen kanssa korkeassa lämpötilassa. Helpommin haihtuvat fraktiot johdetaan kaasukromatografiin.⁹

3.2 Ohutkerroskromatografia

Ohutkerroskromatografia (TLC) on tehokas menetelmä tensidien kvalitatiiviselle analyysille, mutta se vaatii kokeneen analysoijan. Parhaimmillaan TLC:lla voidaan suorittaa kvalitatiiviset määritykset 150 standardia vasten käänteisfaasi- ja normaalifaasisysteemeillä. Lopullisen tuloksen varmistamiseksi levystä voidaan leikata irti osa, jossa on mielenkiinnon kohteena oleva näyte, uuttaa se irti levystä ja analysoida näyte IR:lla. Yksinkertainen menetelmä muutaman tensidin sisältävälle näytteelle, on käyttää stationäärifaasina aluminalevyjä ja eluenttina 100 % isopropanolia. Ajon jälkeen levyjä ruiskutetaan pinakryptoolinkeltaisella visualisointia varten. Erottelu tapahtuu värin sekä R_f -arvon perusteella. R_f -arvo saadaan kun jaetaan liuenneen aineen kulkema matka liuottimen kulkemalla matkalla¹¹. TLC:lla voidaan suorittaa myös kaksiulotteinen analyysi, missä ensimmäisellä ajolla erotellaan kationiset anioniset ja ionittomat tensidit toisistaan

x-akselilla. Tämän jälkeen ajo suoritetaan toiseen suuntaan y-akselilla, jolloin erotetaan esimerkiksi kationiset tensidit toisistaan.⁹

3.3 UV-spektroskopia

UV-spektroskopia sopii tensideille, jotka sisältävä akryyliryhmän. Amfoteerisiin tensideihin voidaan happamissa olosuhteissa soveltaa samoja värjäysmenetelmiä kuin kationisille tensideille, koska happamissa olosuhteissa amfoteriset tensidit ovat kationisia.⁹

Disulfiinin sininen, $C_{27}H_{31}NaO_6S_2$, sopii kationisten tensidien analyysiin¹². Tämän menetelmän käyttö edellyttää kationisten tensidien eristämistä ioninvaihtokromatografialla. Jokaisella analysointikerralla on valmistettava omat standardiliuokset sillä liuosten ja näytteiden käsittely vaikuttaa tuloksiin. Oranssi II, eli natriumpara-(2-hydroksi-1-naftyyliatso)bentseenisulfonaatti, sopii useille kationisille ja anionisille tensideille. Tämä menetelmä on usein yhdistetty vakiovirtausnäytteenäytteenälyysiin (FIA) menetelmän automatisoimiseksi.⁹

3.4 Muita menetelmiä

IR-spektroskopia on yleinen orgaanisten yhdisteiden analyysimenetelmä, joka sopii hyvin TLC:n tueksi. IR-spektroskopiaa varten näyte on kuivattava hyvin. Tavallisesti kuivaus 105 °C:ssa sopii hyvin, paitsi yhdisteille, joissa on hapen ja typen välinen sidos. Nämä yhdisteet täytyy kylmäkuivata. Ydinmagneettisella resonanssilla (NMR) pystytään hyvin tunnistamaan eri yhdisteitä, mutta niiden on oltava puhtaita. Sähkökemiaan perustuvilla mittauksilla voidaan todeta kationisen tai anionisen tensidin läsnäolo.^{9;13}

Massaspektrometriaa (MS) käytettäessä on hyvä käyttää pehmeää ionisaatiotekniikkaa haihtuvien ionien aikaansaamiseksi. MS sopii parhaiten kvaternäärisille ja tertiäärisille amiineille, alkyylimido- ja alkyylidimetyylibetaiineille, aminohapoille ja fosfatideille.⁹

4 HPLC AMFOTEERISTEN TENSIDIEN ANALYSONNISSA

Korkean erotuskyvyn kromatografia (HPLC) sopii hyvin tuotteille, joissa on vain muutama analysoitava yhdiste. Amfoteeristen tensidien detektointiin harkittiin käytettäväksi joko taitekerroin(RI)- tai ultravioletti(UV)-detektoria alhaisella aallonpituudella. Amfoteereja, jotka esiintyvät suoloina, ei voida yhdistää ionipari-reagenssien kanssa UV-absorption aikaansaamiseksi. Käänteinen UV-absorptio sopii lähinnä epäpuhtauksien analysoimiseen. Joitakin yhdisteitä voidaan saada detektoitua kolonnin jälkeisillä reaktioilla.⁹

Amfoteeriset tensidit esiintyvät happamissa oloissa kationisessa muodossa. Näissä olosuhteissa saadaan amfoteerisista tensideistä erotettua ionittomat ja anioniset tensidien käyttäen kationinvaihtokolonnia. Neutraaleissa oloissa, jolloin amfoteerit ilmenevät kahtaisionisessa muodossa, ne voidaan erotella kationisista ja anionisista tensideistä alkyyliryhmän hiiliketjun pituuden perusteella.⁹

4.1 Kolonni

Koska opinnäytetyössä päädyttiin käyttämään joko kationinvaihtokolonnia happamissa ajo-olosuhteissa tai kääntesfaasikolonnia(C18) neutraaleissa ajo-olosuhteissa, tässä osiossa keskitytään vain näihin kahteen kolonniin. Menetelmän valinnan prosessi on kuvattu kappaleessa viisi.

Ensimmäinen vaihtoehtoinen kolonni, C18-kolonni, on yleisin HPLC-kolonni. Kolonnissa stationäärifaasina on pooliton oktadekyyli, joka on sidottu kolonnin silikan silanoryhmiin. Mitä poolittomampi liuotin on käytössä, sitä paremmin liuotin eluoi näytemolekyylit kolonnista.¹⁴

Ioninvaihtokromatografiassa stationäärifaasin sähköiset varaukset vetävät puoleensa näytemolekyylin vastakkaisen varauksen omaavia osia. Kationinvaihtokolonni sisältää negatiivisesti varautuneita ryhmiä. Erottelu perustuu siihen, että

stationäärifaasin negatiivisesti varautuneet osat vetävät puoleensa näytemolekyylin positiivisesti varautuneita osia.¹⁵

4.2 Ajoliuos

Isokraattisella ajolla tarkoitetaan ajoa, jossa ajoliuoksen koostumus pysyy koajan samana. Gradienttijaossa ajoliuoksen koostumusta muutetaan ajon kuluessa. Käytettäessä kationinvaihtokolonna ajoliuos on hapan ja C18-kolonnin kanssa käytetään neutraaleja ajo-olosuhteita.^{9;15}

Näyte, joka sisältää funktionaalisia happo- tai emäsryhmiä vaatii pH:n kontrollointia. pH:n kontrolloimiseksi käytetään puskuriliuosta, jotta pH pysyy samana vaikka systeemiin lisättäisiin pieni määrä happoa tai emästä. Puskuriliuos valmistetaan joko heikosta haposta ja sen vastinemäksestä tai heikosta emäksestä ja sen vastinhaposta.^{16;17}

Puskuriliuoksiin käytettävillä reagensseilla on oma pH-alue minkä sisällä niiden toiminta on parhaimmillaan. Taulukossa 3 on kuvattu tässä työssä potentiaalisten puskureiden pH-alueet.^{17;18}

Taulukko 3. Puskureita

Puskuri	pH-alue
Fosfaatti	1,1 - 3,1
Fosfaatti	6,2 - 8,2
Formaatti	2,7 - 4,7
Asetaatti	3,8 - 5,8
Tris-HCl	7,3 - 9,3
Ammoniumbikarbonaatti	6,6 - 8,6

Jos halutaan vain tuoda ajoliuoksen pH alas, eikä puskuroivalla vaikutuksella ole niin paljon merkitystä, voidaan käyttää 0,1 % fosforihappoa tai 0,1 % trifluoroetikkahappoa tuomaan pH noin kahteen.¹⁷

HPLC-analytiikassa käytettävissä liuottimilla on jokaisella tietty valon aallonpituuden arvo jonka yläpuolella ne ovat läpinäkyviä. Tätä arvoa kutsutaan liuottimien cut-off-arvoiksi¹⁹. Taulukossa 4 on yleisempien HPLC-liuottimien cut-off-arvoja¹⁴.

Taulukko 4. cut-off-arvoja

Liuotin	cut-off (nm)
Metanoli	205
Asetonitriili	190
Tetrahydrofuraani	212
Vesi	190

4.3 Detektorit

UV-detektorin detektointi perustuu Beerin lakiin,

$$A = \epsilon lc$$

missä A = absorbanssiyksikkö, c = liuoksen konsentraatio ja ϵ = absorptiokerroin. UV-detektorilla voidaan siis analysoida aineita, joissa on UV-valoa absorboivia osia. Detektorissa näyte johdetaan ajoliuoksen mukana pitkulaisen kennon kautta, jonka läpi kulkee UV-säde määritetyllä aallonpituudella. UV-detektori sopii hyvin gradienttiajolle. Mitä paremmin näytteen komponentit absorboivat UV-valoa, sitä suurempia piikkejä saadaan kromatogrammiin. UV-detektorilla ei voida analysoida molekyyliä, joissa ei ole UV-valoa absorboivia osia. UV-detektori on herkkä ja sillä voidaan analysoida pieniäkin pitoisuuksia.¹⁵

Diodirividetektori mittaa myös valon aallonpituutta. Diodirividetektorilla voidaan mitata kerralla analysoitavan näytteen koko spektri. Kehittyneimmillä laitteilla voidaan analysoida spektri alueella 0,0005 - 3 absorbanssiyksikköä (AU).¹⁵

RI-detektori sopii kaikenlaisten aineiden mittaamiseen, mutta sen detektointirajat ovat noin 1000 kertaa heikommat kuin UV-detektorilla. RI-detektorissa ajoliuosta johdetaan kahteen kennoon, joiden molempien läpi kulkee valonsäde. Ajoliuosta, joka sisältää näytettä, johdetaan vain toisen kennon läpi ja laite ver-

taa kahden valonsäteen välistä taitekerrointa. Valon taitekertoimen määrittäminen perustuu Snellin lakiin:

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2$$

missä n = liuoksen taitekerroin ja θ = kulma jonka valo taittaa. RI-detektori ei sovi gradienttiajolle, sillä kennojen ajoliuoksia ei voida vaihtaa jatkuvalla tahdilla.¹⁵

Haihduttava valonsironta(ELS)-detektori sopii yhdisteille, joilla on huomattavasti heikompi haihtuvuus kuin ajoliuoksella. Detektorilla ajoliuos, joka sisältää näytteen, johdetaan typpikaasuun ja neulan läpi, joka muokkaa ajoliuoksen ja näytteen tietyksi malliseksi pisaroiksi. Ajoliuos haihtuu pois systeemistä ja näytteen kiinteät hienojakoiset partikkelit jatkavat detektointivyöhykkeelle. Tämän vyöhykkeen kautta kulkee lasersäde. Näytteen partikkelit osuvat lasersäteeseen ja aiheuttavat sen hajoamisen. Laite havainnoi tämän säteen hajonnan. Mitä suurempi massa näytteellä on, sitä suurempi piikki saadaan kromatogrammiin. ELS-detektori sopii hyvin gradienttiajolle eivätkä liuotinrintamapiikit aiheuta häiriötä. ELS-detektori on herkempi kokobetaineille kuin UV-detektori.^{13;15}

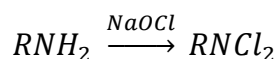
4.4 Menetelmiä

HPLC-menetelmiä amfoteeristen tensidien analysoimiseksi on julkaistu enimmäkseen betaiinityypisistä tensideistä, kuin muun tyyppisistä amfoteerisistä tensideistä¹³. Menetelmiä amfoteeristen tensidien määrittämiseen sekä kvantitatiivisesti, että kvalitatiivisesti on monia ja tässä osiossa käsitellään niitä menetelmiä, joita on harkittu tai sovellettu tämän työn yhteydessä.

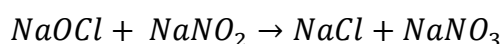
König ja Strobel ovat kehittäneet HPLC-menetelmän, jolla mitataan tensidien, lähinnä anionisten, pitoisuuksia hammastahnasta. Menetelmässä on RP-18-kolonne. Tässä julkaisussa suositellaan käytettäväksi ajoliuoksena 90 % metanolia, jos mitataan ionittomien tai amfoteeristen tensidien pitoisuutta pH:ksi suositellaan 6 - 7. Detektointiin käytetään RI-detektoria ja menetelmälle luetaan detektointirajaksi 20 µg/ mL.²⁰

Tegelerin, Ruessin ja Gmhalin kehittämässä menetelmässä mitattiin alkyylilibetaiinien ja kokoamidopropyylilibetaiinien pitoisuuksia pesuainenäytteissä käyttäen kationinvaihtokolonnia ja happamia olosuhteita. Detektointiin käytettiin diodirivi-detektoria aallonpituudella 210 nm. Kationinvaihtokolonni oli Nucleosil 100-5 SA, 5 µm 4 x 250 mm. Ajo oli isokraattinen 1 mL/min ja ajoliuoksena oli 70 % asetonitriili ja 30 % 0,05 molaarista litiumhydroksidia, jonka pH:ksi oli säädetty 1,6 fosforihapolla. Menetelmän selektiivisyys perustuu siihen, että anioniset ja ionittomat tensidit eluoituvat kolonnista nopeasti ja amfoteerisille tensideille saadaan happamissa olosuhteissa pidempi retentio. Menetelmällä on saatu määritettyä tensidien pitoisuuksia 0,1 - 2,0 % pitoisuusalueella. Näytteet oli laimennettu 1:10 ja 1:20.²¹

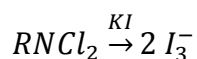
Kolonnin jälkeisellä detektointimenetelmällä tensideille suoritetaan kemiallinen käsittely kolonnin ja detektorin välissä. Tässä menetelmässä käytettiin ODS-3, 3 µm kolonnia ja ajoliuos koostui 60 % asetonitriilistä ja 40 % vedestä. Detektointi tapahtui UV-detektorilla 355 nm aallonpituudella. Kolonnissa tapahtuneen erotuksen jälkeen alaniinit muutetaan hypokloraatilla vastaaviksi N-kloroamiineiksi.



Ylimääräinen hypokloriitti tuhoetaan nitriitillä.



N-kloroamiinit muutetaan trijodideiksi ja detektointi suoritettiin 355 nm.



Menetelmä vaatii usean pumpun kytkemisen laitteeseen sekä reaktiokammion, jonka lämpötila pidetään 60 °C:ssa. Menetelmälle on annettu lineaarisiksi alueeksi 0,3 - 12 µg.²¹

5 AMFOTEERISEN TENSIDIN 1 ANALYYSIT

NESTEKROMATOGRAFILLA

5.1 Menetelmän valinta

Menetelmäksi harkittiin sekä GC-, että HPLC-menetelmiä. Campeaun ja Grudan GC-menetelmä olisi ollut hyvä ja se olisi soveltunut myös toimeksiantajalle paremmin kuin HPLC. Menetelmässä on vaativa näytteen käsittely, ja tämän lisäksi lopputuotteen puhtaus olisi vaatinut GC-MS -analyysin, jota ei nyt ollut saatavilla, niin GC-menetelmä päätettiin hylätä. Myös kolonnin jälkeinen detektointimenetelmä olisi ollut liian raskas toteuttaa, sillä se olisi vaatinut usean eri pumpun kytkemisen yhdeksi järjestelmäksi ja tämän lisäksi olisi vielä tarvittu reaktiokammio, joten menetelmä hylättiin.

Jäljelle jääneet kirjallisuudesta löydetyt HPLC-menetelmät olivat joko neutraalit pH-olosuhteet ja C18-kolonne, tai happamat ajo-olosuhteet ja kationinvaihtokolonne.

5.2 Reagenssit

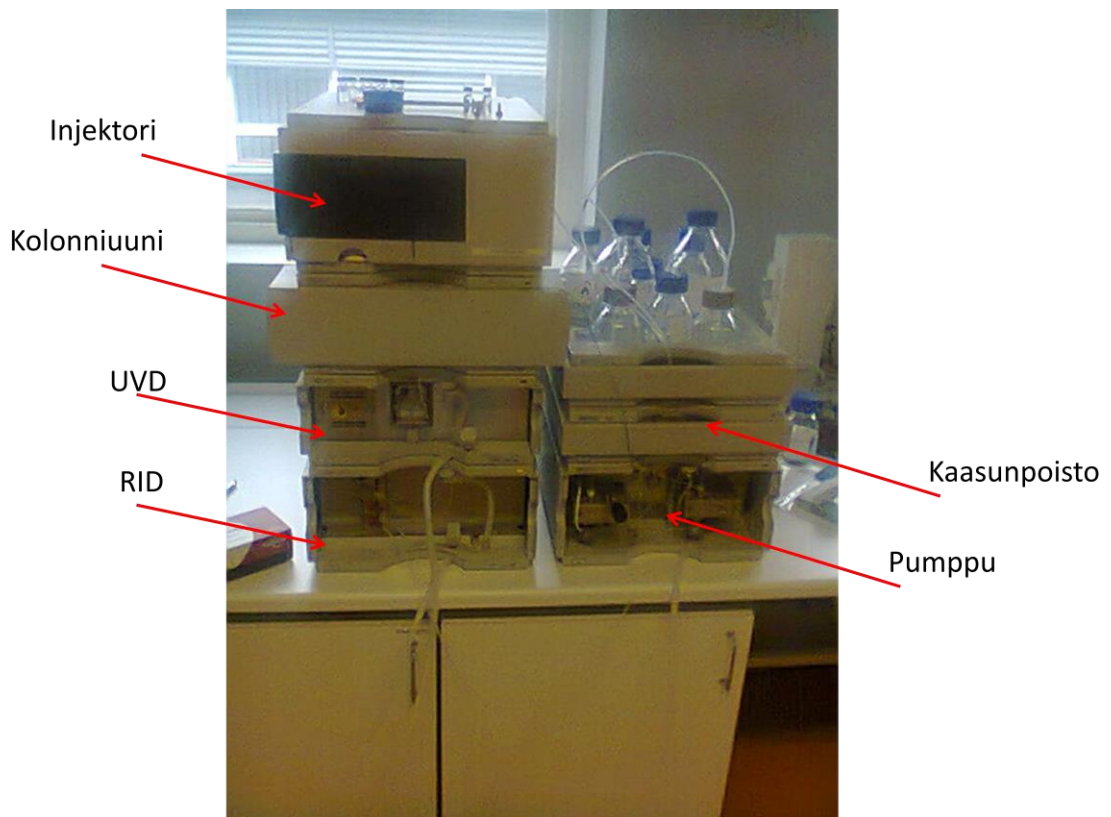
Ajoliuoksessa käytettävät metanoli ja asetonitrili olivat HPLC-laatuisia. Puskuriliuoksissa käytettävät reagenssit olivat analyysilaatua. Vesi oli ultrapuhdasta vettä, jonka tiedot ovat Taulukossa 5. Vesilaite oli Sartorius Aurium® Pro. pH-mittarin virittämiseen käytettävät puskurit olivat kaupallisia puskuriliuoksia.

Taulukko 5. Ultrapuhdas vesi.

Sähkönjohtavuus (MΩ*cm)	18,2
TOC (ppb)	< 5
Endotoksiini (EU/mL)	0,001

5.3 Välineet ja laitteet

Reagenssien ja näytteiden punnitsemiseen käytettiin analyysivaakaa. pH-mittari viritettiin aina työkerran alussa ja lisäksi määritettiin millivolttien valuma 60 sekunnin aikana. HPLC-laite oli Agilentin 1100-sarjan laite, jossa oli kytkettynä sekä UV-, että RI-detektori. Lisäksi käytössä oli kolonniuuni. Käytetty HPLC-laitteisto on kuvassa 10. Kolonni oli Agilent Eclipse C18 XDB/ 140 x 150 mm/ 5 µm.



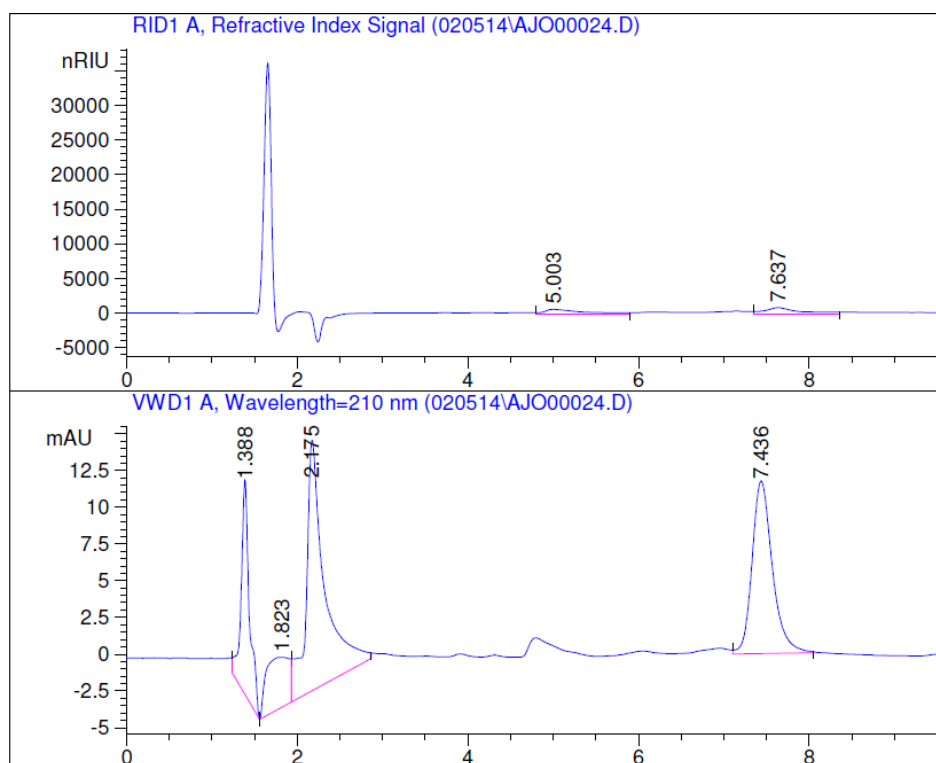
Kuva 10. HPLC-laitteisto.

Näytteet liotettiin DIN A-luokan mittapulloihin ja laimennossarjojen valmistamisessa käytettiin täyspipettejä. Täyspipettien luokka vaihteli DIN AS:n ja DIN B:n välillä pipettien saatavuuden mukaan. Muita käytettäviä välineitä olivat ruiskut, ruiskusuodattimet, dekanterilasit, näytepullot ja imusuodatuslaitteisto ajoliuosten suodattamiseksi. Ruiskusuodattimet olivat Whatman 0,45 µm polypropylene

housing ja puskuriliuoksen suodatuksessa käytettiin GH Polypro 0,45 µm -suodatinkalvoa.

5.4 Detektointi

Detektointiin oli käytössä RI-detektori ja UV-detektori. Kuvassa 11 on ylemmässä kromatogrammissa amfoteerisen tensidin 1 RI-signaali, ja alemmassa on UV-signaali. Voidaan todeta, että UV-detektori on selkeästi herkempi kuin RI-detektori, mikäli analysoitavasta molekyylistä vain löytyy UV-valoa absorboivia ryhmiä.



Kuva 11. UV-detektori ja RI-detektori

Ensisijaiseksi detektointimenetelmäksi valittiin UV-detektori.

5.5 Näytteen käsittely

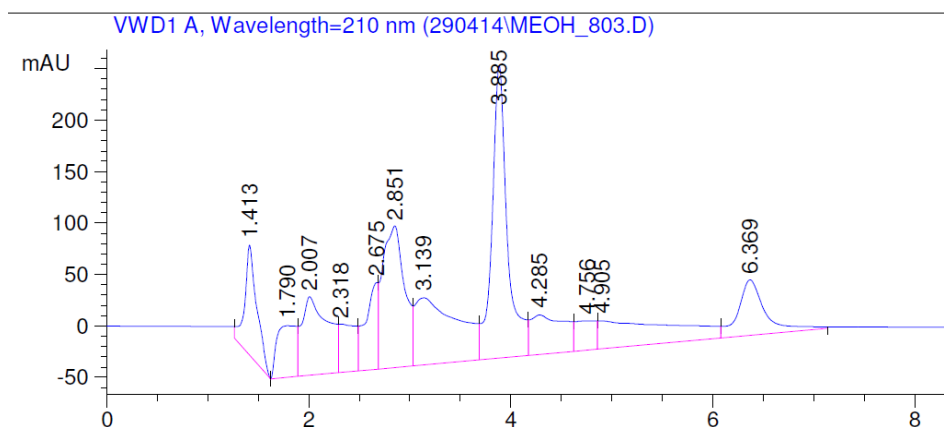
Sekä amfoteerinen tensidi 1, että pesuainenäyte liuotettiin tarkkaan tilavuuteen ajoliuosta ja suodatettiin ruiskusuodattimien läpi näytepulloihin. Muuta näytteen käsittelyä ei tarvittu.

5.6 Ajoliuos

Ajoliuos koostui tässä yhteydessä liuottimesta, vedestä ja puskurireagenssista sekä pH:n säätöön käytetystä haposta. Työn aikana suoritettiin useita eri kokeiluja erilaisilla puskuriliuoksilla ja eri liuottimilla.

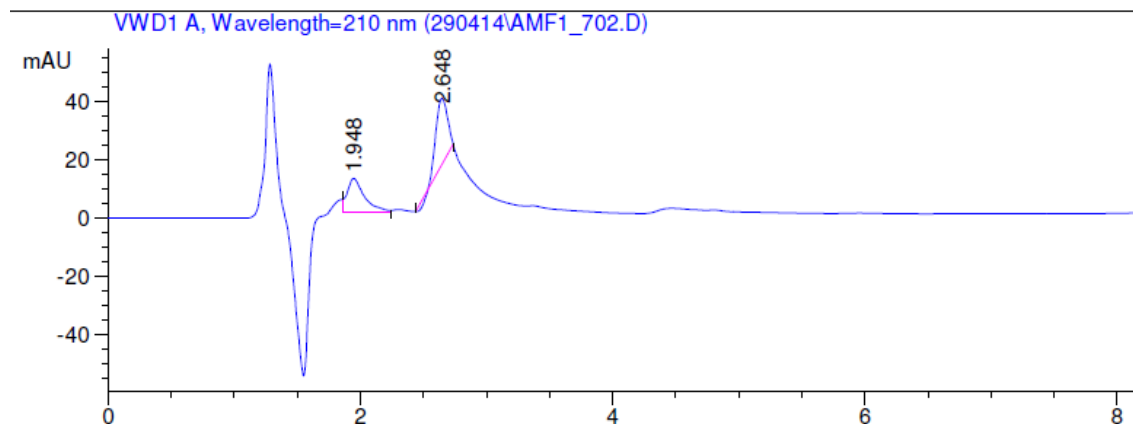
5.6.1 Liuottimen valinta

Ajoliuoksessa käytettäväksi liuottimeksi harkittiin joko metanolia tai asetonitriliä. Aluksi saatiin metanolipitoisella ajoliuoksella erottumaan piikkejä amfoteerisesta tensidistä 1. Kuvassa 12 erottuu selkeästi usea piikki. Ajoliuoksena on 80 % metanoli puskuroituna Tris-HCl:lla ja pH oli 7,2. Kromatogrammien integrointiin ei kiinnitetty huomiota vielä tässä vaiheessa.



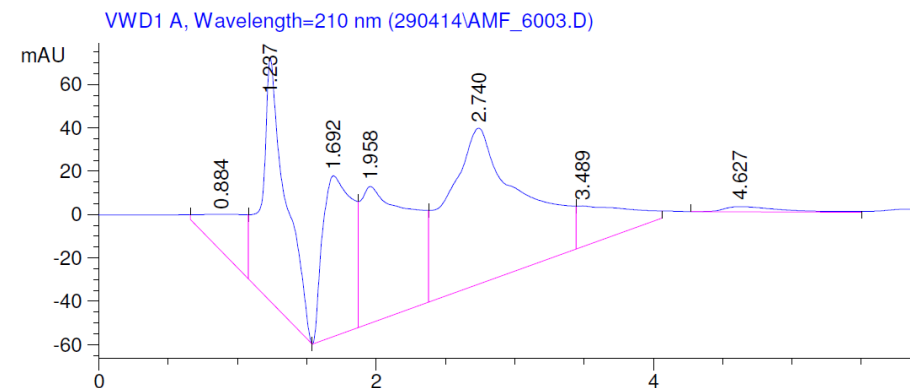
Kuva 12. Liuottimena 80 % metanoli

Asetonitriliä kokeiltiin useissa eri pitoisuuksissa pH:n ollessa 7,1 - 6,8 ja asetonitriliin pitoisuus oli 70 %, 60 % tai 50 %. Kuvassa 13 asetonitriliin pitoisuus on 70 % ja pH oli 7,1. Asetonitriliillä erottumaan satu piikki oli pieni ja leveä.



Kuva 13. Asetonitrili 70%.

Kromatogrammissa, joka on kuvassa 14, on ajettu amfoteerinen tensidi 1 60 % asetonitriliillä pH:n ollessa 7,0, mutta erottuvuus ei parantunut yhtään. Tämän lisäksi piikit olivat leveitä.

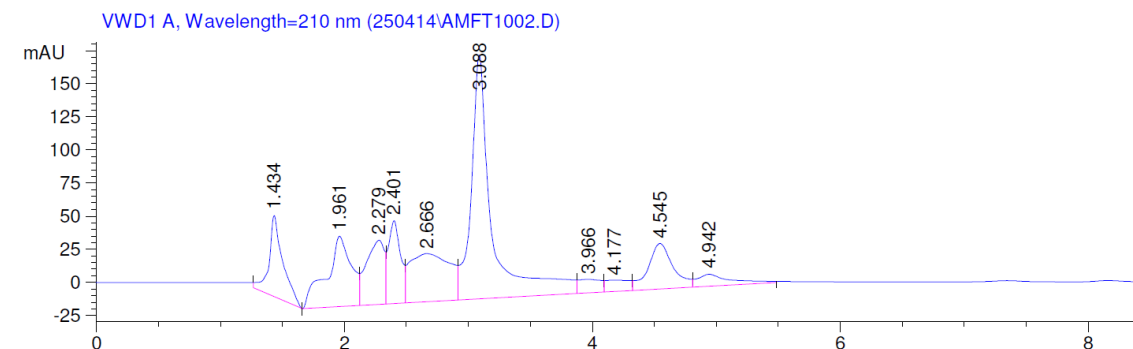


Kuva 14. Asetonitrili 60%.

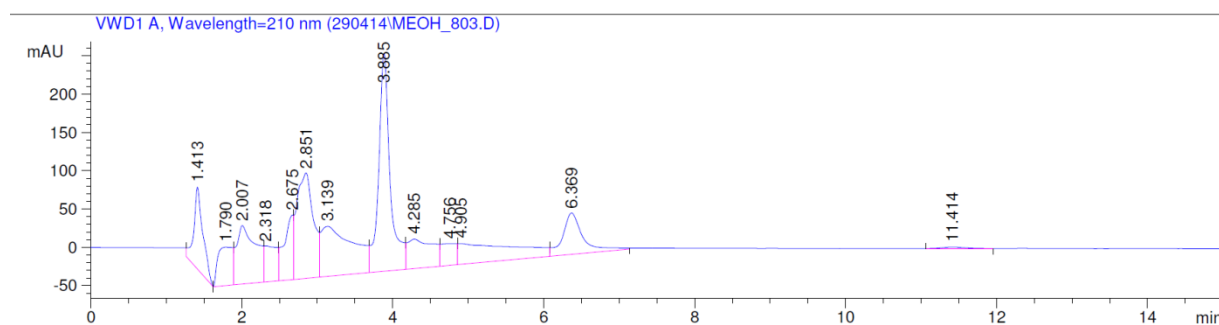
Koska asetonitriliillä ei saatu kunnollisia piikkejä aikaiseksi verrattuna metanolilla saatuihin piikkeihin, valittiin liuottimeksi metanoli.

Sopivan liuottimen löydyttyä piti optimoida liuottimen pitoisuus ajoliuoksessa. Liian voimakkaalla pitoisuudella kaikki näytteen komponentit tulivat kolonnista liian nopeasti, eikä kunnan erottuvuutta saatu aikaiseksi. Liian laimealla me-

tanolilla ajoaika venyi liian pitkäksi. Kuvassa 15 metanolin pitoisuus on 90 % ja näytteenä on amfoteerinen tensidi 1. Kolmen minuutin kohdalla tulevaa piikkiä häiritsi piikkiä edeltävä muodostelma. Kuvan 16 kromatogrammista voidaan todeta, että 80 % metanolissa erottuvuus oli jo hieman parempi.



Kuva 15. 90 % metanoli.



Kuva 16. 80 % metanoli

5.6.2 Ajoliuoksen puskurointi

Jotta näyte saatiin pysymään halutussa muodossa, oli ajoliuos puskuroitava haluttuun pH-lukemaan. Neutraaliin puskuriliuokseen harkittiin käytettäväksi joko bikarbonaattia tai divetyfosfaattia¹⁷. Ongelmaksi muodostui kuitenkin, että Amfoteerinen tensidi 1 sakkautui natriumdivetyfosfaatin kanssa. Näyte ei sakkautunut ammoniumasetaatin kanssa, joten varmistettiin yksinkertaisella liuotuskokeella johtuiko näytteen sakkautuminen natriumista vai divetyfosfaatista. Taulukossa 6 on liuotuskokeen tulokset.

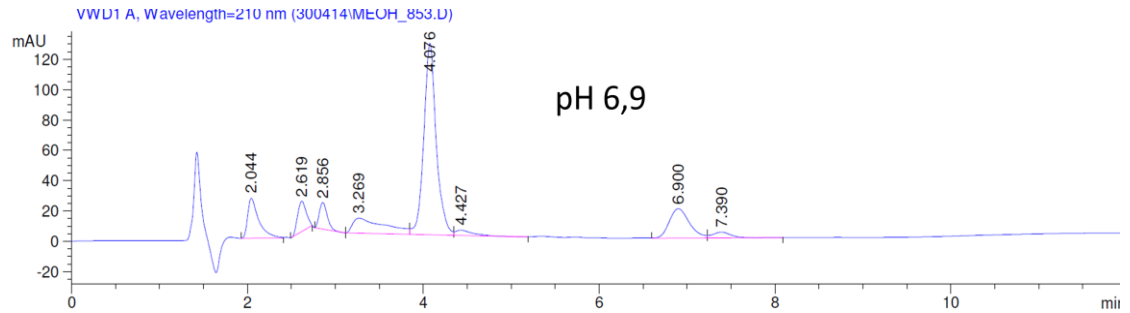
Taulukko 6. Saostustesti

Reagenssi	M(g/mol)	Punnittava määrä (g)	Punnittu(g)	Saostuma
Ammoniumasettaatti	77,08	0,19	0,22	Ei
Natriumdivetyfosfaatti	156,01	0,39	0,44	Kyllä
Natriumasettaatti	136,08	0,34	0,35	Ei
Ammoniumdivetyfosfaatti	115,03	0,28	0,29	Kyllä

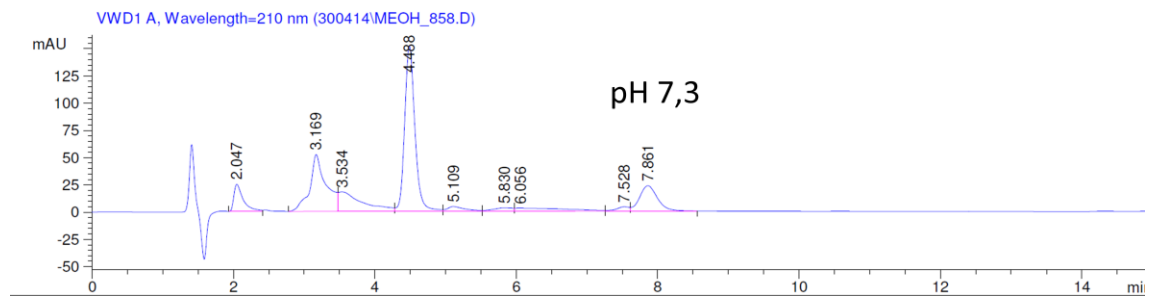
Tulosten perusteella voidaan todeta, että saostuminen johtui divetyfosfaatista. Kun näyte liuotettiin ammoniumkarbonaattiin, muodostui opalisovaa samennusta. Saostuminen ei johtunut ammoniumasettaatista, joten sen oli johduttava karbonaattista. Tämä ehkäisi näiden puskuriliuosten käytön kokonaan. Liitteessä 1 on esitetty amfoteerisen tensidin 1 käyttäytyminen divetyfosfaatin ja karbonaatin kanssa. Tris-HCl osoittautui potentiaalisesti puskuriliuokseksi neutraalilla alueella. Tris-HCl:n käytettävä pH-alue oli 7,3 - 9,3.¹⁸

Tris-HCl-puskuriliuos valmistettiin punnitsemalla tris(hydroksimetyyli)-metyyliamiini -reagenssia tarkka määrä, joka liuotettiin veden ja liuottimen seokseen²². Puskuriliuoksen konsentraatioksi valittiin 0,01 M²³. Punnittiin Tris siten, että puskuriliuoksen pitoisuus oli noin 0,01 M. Ajoliuoksessa oli aina vettä vähemmän, joten dekanteriin lisättiin ensin koko käytettävä vesimäärä ja sen jälkeen lisättiin metanolia lähelle haluttua tilavuutta. Säädettiin pH suolahapolla halutuksi ja siirrettiin liuos mittapulloon. Huuhdeltiin dekanteri liuottimella ja kaadettiin dekanterista mittapulloon ja täytettiin merkkiin asti. Valmistettu liuos suodatettiin imusuodatuslaitteistolla. Suodatuksen jälkeen liuos siirrettiin HPLC-ajoliuospulloon ja liuoksesta otettiin talteen sopiva määrä näytteiden laimennoksia varten.

Puskuriliuoksen pH-lukemalla oli merkitystä piikkien muotojen kannalta. Kuvassa 17 on amfoteerisen tensidin piikki 85 % metanolissa pH:n ollessa 6,9 ja kuvassa 18 on ajettu samoissa olosuhteissa yhtä väkevä näyte, mutta pH:ksi oli säädetty 7,3.

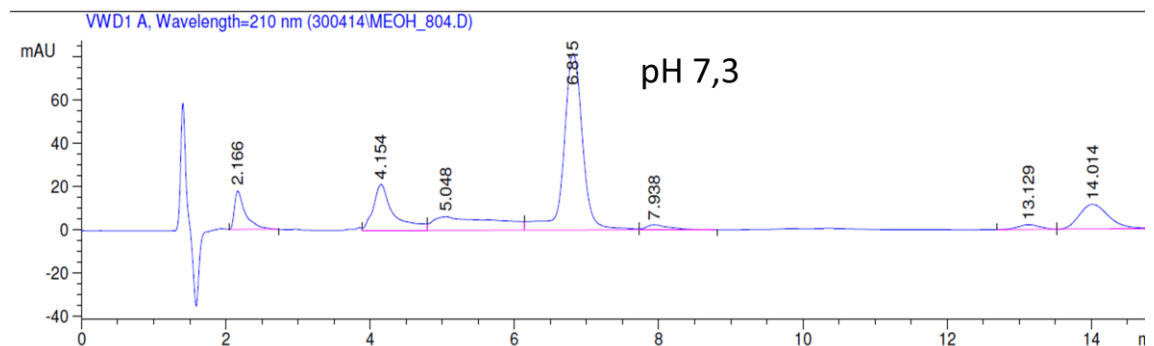


Kuva 17. pH 6,9 MeOH 85%.

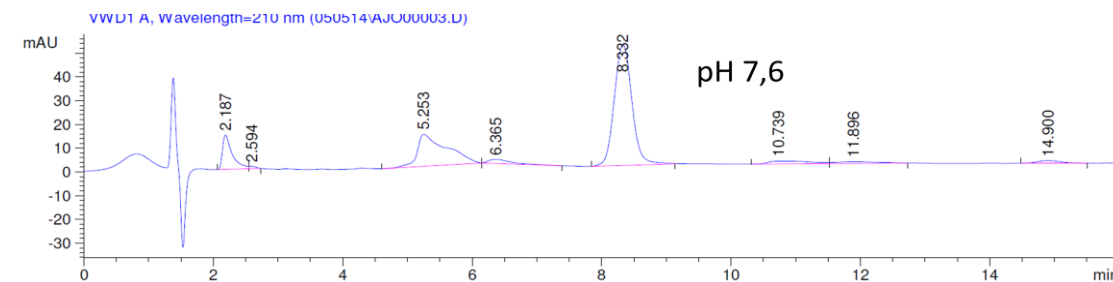


Kuva 18. pH 7,3 MeOH 85%

Voidaan todeta, että pH:n ollessa 7,3 saavutetaan pohajviivaerotus ja häntiminen on vähäisempää. Näin ollen pH oli parempi pitää yli 7. pH 7,3 oli Tris-HCl:n käyttöalueen rajalla. Taulukossa 1 olevien tietojen mukaan amfoteerisen tensidin pH on 7,5 - 8,0, joten kokeiltiin vielä millaiset tulokset saavutettiin tällä pH-alueella. Koska piikit olivat vielä lähellä toisiaan, päätettiin metanolin pitoisuutta laskea 80 %:iin. Kuvassa 19 ajoliuoksen pH on 7,3 ja kuvassa 20 ajoliuoksen pH on 7,6 metanolin pitoisuuden ollessa 80 %.



Kuva 19. Ajoliuoksen pH 7,3 MeOH 80%



Kuva 20. Ajoliuksen pH 7,6 MeOH 80%

Kuvien 19 ja 20 kromatogrammien perusteella todettiin, että pH:n ollessa 7,6, 8 minuutin kohdalla tulevan piikin kohdalla saavuttiin parempi pohjaviivaerotus. Valittiin menetelmän pH:ksi 7,6.

5.7 Ajoparametrit

Ajoparametrit olivat: kuinka paljon liuosta syötetään ja mistä linjasta, ajonopeus, injektointitilavuus, pysäytysajankohta, painerajat, UV-detektorin aallonpituus ja kolonniuunin lämpötila. Myös RI-detektorin lämpötila säädettiin koska molempien detektoreiden tuli olla päällä, jotta HPLC saatiin toimimaan. RI-detektoria ei kuitenkaan käytetty näissä mittauksissa. Taulukossa 7 on esimerkki ajoparametreista.

Taulukko 7. Ajoparametrit

pvm	15.5.2014
A:	MeOH:Tris-HCl (8:2), pH 7,64
B:	
Inj.vol:	20 µL
Stop time:	17 min
Flow speed:	1,0 mL/min
Max p:	200 bar
Min p:	5 bar
VWD:	210 nm
T(kolonniuuni)	25 °C

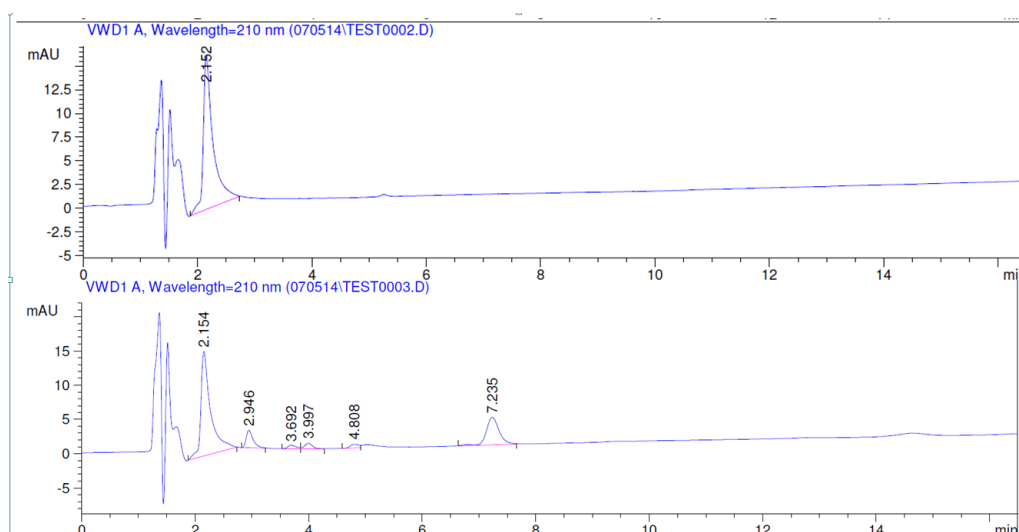
Ajoissa käytettiin vain yhtä ajolinjaa kerrallaan. Ajonopeudeksi valittiin 1 mL/min¹⁴. Ajonopeuden muutoksen vaikutuksia ei kokeiltu.

Ajoaika riippui siitä kuinka väkevällä liuottimella ajettiin ja mikä oli liuoksen pH. Esimerkiksi 80 % metanolilla pH:n ollessa 7,3 amfoteerisen tensidin 1 suurin osa piikeistä tuli kahdeksan minuutin kuluessa, mutta vielä 15 minuutin kohdalla tuli yksi piikki. Tämän takia ajoliuos oli syytä pitää 16 minuutissa. Pitkässä ajossa, jossa pH oli 7,6, ajoaika lisättiin 17 minuuttiin, sillä pH:n muutos vaikutti piikkien retentioaikaan.

UV-spektrofotometrillä mitattiin, millä aallonpituudella amfoteerinen tensidi antaa korkeimman piikin. Tämä aallonpituus jäi alle 190 nm. Jos UV-detektorin aallonpituutta lasketaan liian alas, niin taustan kohina nousee. 210 nm on vielä turvallisella alueella. Metanolin cut-off -arvo on 205 nm, joten tämän alapuolelle ei aallonpituutta voi laskea.

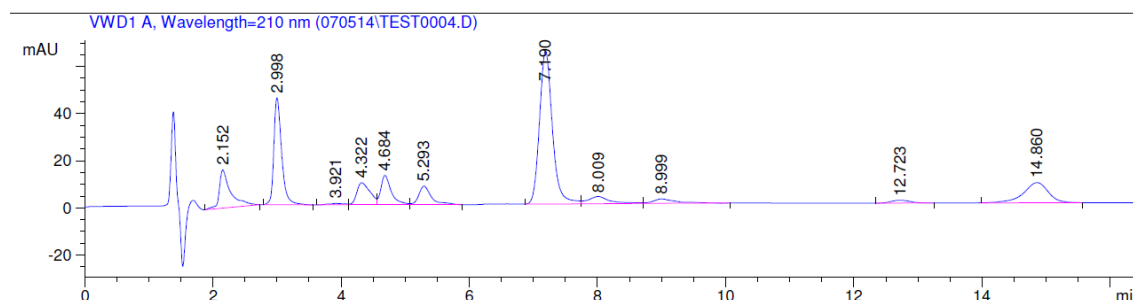
5.8 Pesuainenäyte

Haluttiin saada varmuus siitä, että pesuaineesta mitattavat kromatogrammin piikit todellakin johtuivat itse amfoteerisesta tensidistä 1, eikä mistään muista näytteen komponenteista. KiiltoCleanilta saatiin erillinen pesuainenäyte, josta puuttui tarkoituksella amfoteerinen tensidi 1. Kuvassa 21 on alempana kromatogrammi pesuaineesta, joka sisälsi amfoteerista tensidiä 1 ja ylempänä pesuaineesta josta, tensidi puuttui kokonaan.



Kuva 21. Pesuainenäyte.

Pesuaineesta, joka ei sisällä amfoteerista tensidiä 1, ei eluoidu mitään havaittavaa seitsemän minuutin kohdalla. Pesuainenäytteestä, joka sisältää amfoteerista tensidiä 1, eluoituu selkeä piikki seitsemän minuutin kohdalla ja pienempi piikki noin kolmen minuutin kohdalla. Kuvassa 22 on kromatogrammi amfoteerisesta tensidistä 1, joka on ajettu samoissa ajo-olosuhteissa.



Kuva 22. Amfoteerinen tensidi 1.

Amfoteerinen tensidi 1 antoi samoissa ajo-olosuhteissa piikin seitsemän minuutin ja kolmen minuutin kohdalla. Näiden tulosten pohjalta voidaan todeta, että näytteen muut komponentit eivät aiheuta häiriötä amfoteerisen tensidin 1 kanssa.

5.9 Amfoteerinen tensidi 1 standardina

Amfoteerisella tensidillä 1 on eräkohtaisia eroja. Ajettiin neljästä eri erästä Amfoteerista tensidiä 1, joista yksi, Amft1, oli siitä erästä, jota on käytetty tässä työssä standardisuoran liuoksia varten. Piikki, jonka pinta-ala laskettiin, oli se joka eluoitui noin seitsemän minuutin kohdalla. Taulukossa 8 on kerrottu kunkin erän konsentraation ja piikin pinta-alan suhde, sekä piikkien korkeuden ja konsentraation suhde.

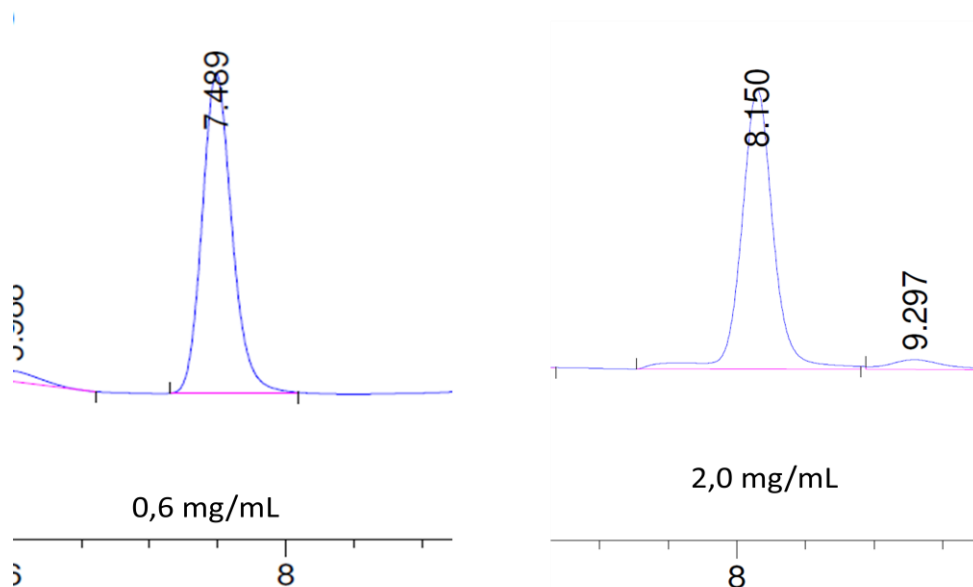
Taulukko 8. Erä-testi.

Näyte	Pinta-ala/Konsetraatio	Korkeus/Konsetraatio
Amft1	158,04	8,94
36	160,12	9,76
57	170,52	10,39
35	158,40	9,99

Tuloksista huomataan, että eri erillä on eroa yhden piikin pinta-alan ja konsentraation suhteen. Tämän analyysin tarkempi kuvaus on Liitteessä 2.

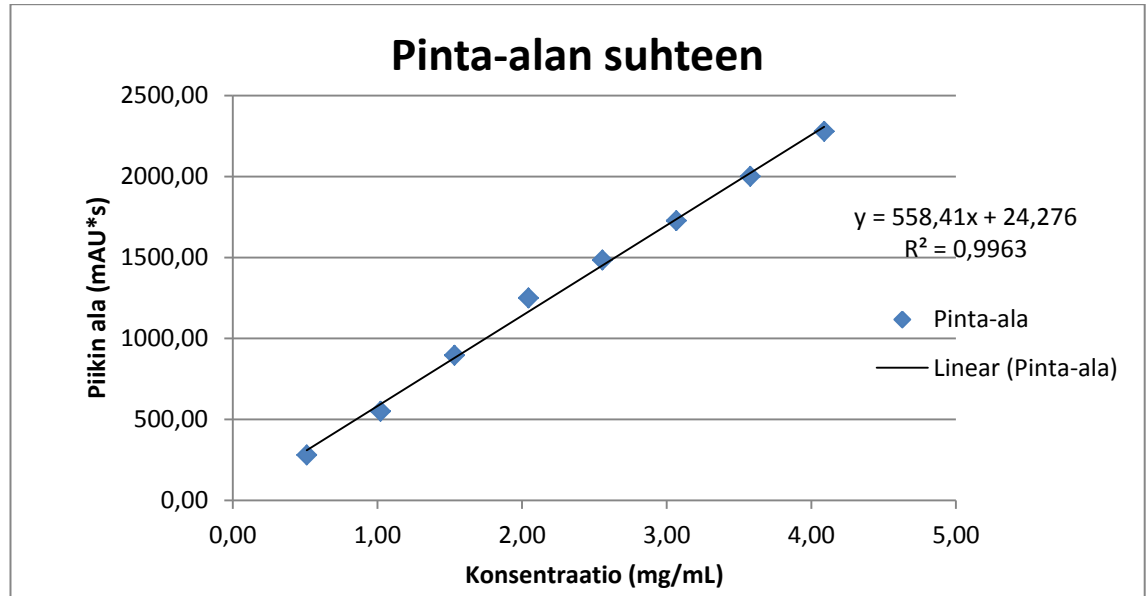
5.10 Pitoisuusalue

Pitoisuusalueen määrittämisessä testattiin lineaarisuutta pitoisuusalueella 0,5 - 4,0 mg/mL. Systeemitesti tehtiin pitoisuudella 2 mg/mL. Amfoteerisen tensidin pitoisuuden kasvaessa näytteen piikkien juuret muuttuivat epätasaisemmiksi. Kuvassa 23 on verrattu 0,6 mg/mL ja 2,0 mg/mL vahvuisten näytteiden piikkejä.



Kuva 23. Piikin juuri

Kuvasta voidaan huomata, että väkevämmällä pitoisuudella tausta on epätasaisempi piikin juuressa kuin laimeammalla pitoisuudella. Kuvassa 24 on standardisuora pitoisuusalueella 0,5 - 4,0 mg/mL.



Kuva 24. Linearisuustesti

Standardisuoran korrelaatiokerroin on vielä hyvä. Vahvemmassa päässä saattaa ilmetä pientä kaareutumista.

5.11 Näytteen pitoisuuden mittaaminen

Näytteen pitoisuus mitattiin standardisuoraa vasten. Standardisuoran liuokset valmistettiin amfoteerisen tensidin 1 kantaliuoksesta jonka pitoisuus oli noin 1 mg/mL. Kantaliuos valmistettiin punnitsemalla tarkasti amfoteerista tensidiä 1 mittapulloon ja liuotettiin ajoliuokseen. Standardisuoran liuokset valmistettiin kantaliuoksesta laimentamalla taulukon 9 mukaisesti.

Taulukko 9. Standardisuoran liuokset

Pipetoitu kantaliuosta (mL)	liuotustilavuus (mL)	≈Pitoisuus(mg/mL)
2	20	0,1
2	10	0,2
4	10	0,4
6	10	0,6
8	10	0,8

Pesuainenäytteen oletettu pitoisuus oli noin 1,5 % (pitoisuus kysytty KiiltoCleanilta), joten jotta näyte osui standardisuoralle, laskettiin näytteen punnittava määrä seuraavalla kaavalla:

$$m = \frac{\text{liuoksen pitoisuus} \times V}{\text{näytteen tensidipitoisuus}}$$

missä m = punnittava massa (mg), V = punnitun näytteen liuotustilavuus (mL) ja näytteen oletettu tensidipitoisuus ilmaistaan desimaalilukuna 0,015. Esimerkiksi minimimäärä, jota näytettä oli punnittava, laskettiin:

$$m = \frac{0,1 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 10 \text{ mL}}{0,015} \approx 66,67 \text{ mg}$$

Maksimimäärä, mitä näytettä kannatti punnita, laskettiin samalla kaavalla ja määrä oli 533,33 mg. Näytteet ja standardit liuotettiin ajoliuokseen. Ajoliuos oli noin 0,01 M Tris-HCl ja pH oli 7,6. Ajoparametrit on ilmoitettu taulukossa 10.

Taulukko 10. Ajoparametrit

Ajoliuos	MeOH:Tris-HCl (8:2), pH 7,6
Inj.vol:	20 µL
Stop time:	17 min
Flow speed:	1,0 mL/min
Max p:	200 bar
Min p:	5 bar
VWD:	210 nm
T(kolonniuuni)	25 °C

Jokaisella ajokerralla injektoitiin pelkkää ajoliuosta injektoinnista aiheutuvan taustan selvittämiseksi. Systeemitestiä, jolla mitattiin injektoinnin toistettavuutta, varten injektoitiin kuusi kertaa peräkkäin 0,6 mg/mL standardiliuosta. Jokaista standardisuoran liuosta injektoitiin kolme kertaa ja standardisuoralle päätyi kolmen injektoinnin keskiarvo. Pesuainenäytteestä otettiin kolme rinnakkaista, joista jokaisesta otettiin kolme injektointia. Pitoisuus sekä toistettavuus laskettiin piikkien pinta-alan perusteella. Näillä parametreilla tehtiin yhteensä neljä ajoa. Liitteessä 3 on menetelmäohje.

5.12 Työturvallisuus ja jätteiden käsittely

Tässä työssä käsiteltiin paljon liuottimia, joten suojakäsineitä käytettiin aina kun oltiin tekemisissä liuottimien kanssa. Liuottimia käsiteltiin suuria määriä vetokaapissa. Puskuriliuosten pH:n säätöön käytettävien väkevien happojen kanssa oli suojakäsineet ja lisäksi oli noudatettava erityistä varovaisuutta. Metanolia sisältävä HPLC-jäte voitiin hävittää kaatamalla vetokaapissa viemäriin runsaan veden kanssa. Kaikki asetonitriliä sisältänyt HPLC-jäte kerättiin omiin säilytyspulloihin ja toimitettiin ongelmajätelaitokselle hävitettäväksi

5.13 Tulokset

Taulukossa 11 on kuvattu systeemitestien tulokset.

Taulukko 11. Systeemitesti

Systeemitesti 0,6 mg/ mL	
Ajo(pvm)	RSD(%)
6.5.2014	0,34
9.5.2014	0,74
13.5.2014	0,73
15.5.2014	0,44

Tuloksista huomataan, että injektoinnin toistettavuus on hyvä näissä pitoisuuksissa. Taulukossa 12 on pesuainenäytteelle saatu pitoisuus.

Taulukko 12. Pesuaineen tensidipitoisuus.

Pesuaineen tensidipitoisuus			
Ajo(pvm)	Pitoisuus(%)	RSD(%)	Huom
6.5.2014	1,48	1,94	näytteet jäivät standardisuoran alapuolelle
9.5.2014	1,40	0,89	
13.5.2014	1,42	2,63	
15.5.2014	1,43	1,12	
ka	1,43		

Jos 6.5.2014 tehdyn ajon tulokset jätetään keskiarviosta pois, saadaan pesuaineen keskimääräiseksi tensidipitoisuudeksi 1,42 mg /mL. Taulukossa 13 on pesuaineelle mitattu amfoteerisen tensidin 1 pitoisuus ilman 6.5.2014 tuloksia.

Taulukko 13. Pesuaineen amfoteerisen tensidin 1 pitoisuus

Pesuaineen tensidipitoisuus		
Ajo(pvm)	Pitoisuus(%)	RSD(%)
9.5.2014	1,40	0,89
13.5.2014	1,42	2,63
15.5.2014	1,43	1,12
ka	1,42	
s	0,015	
RSD(%)	1,08	

13.5.2014 suoritettussa ajossa tulosten suhteellinen keskihajonta on suurempi, mutta vielä kohtuullinen. Tulokset jäivät kuitenkin hieman alle oletetun tuloksen 1,5 %. Liitteessä 4 on esimerkki taulukoitujen tulosten laskemisesta.

Kun Amfoteerisen tensidin pitoisuutta mitattiin standardisuoraa vasten, joka on kuvassa 23, saatiin pesuaineen amfoteerisen tensidin 1 pitoisuudeksi 1,35 % ja suhteellinen keskihajonta oli 1,95 %. Tämä vahvistaa että sillä on merkitystä tulosten kannalta, että millä pitoisuusalueella mittaukset tehdään.

5.14 Virhelähteet

Työssä ensimmäinen virhelähde on amfoteerisen tensidin 1 puhtaus. Valmistaja on ilmoittanut, että amfoteerisen tensidin 1 tuotteen aktiiviaineen pitoisuus on 30 %. Mittauksissa on luotettu tähän arvoon. Puskuriliuoksissa käytettävät reagenssit voivat aiheuttaa taustahäiriötä, koska ne eivät ole HPLC -laatuisia. Kvantitatiivisissa määryksissä amfoteerisen tensidin 1 punnitseminen on kriittinen kohta. Koska tensidi on venyvä ja vaahtoavaa ainetta, on punnitsemisessä oltava tarkka sen suhteen, että tensidiä ei jää valumaan mittapullon suulle. Pesuaine on liukasta ainetta, joka tulee pipetistä nopeasti pois. Punnitustilanteessa muita virhelähteitä ovat staattinen sähkö sekä ilmanpaineen ja lämpötilan vaihtelut, jotka aiheuttavat virhettä vaa'an antamaan tulokseen. Näytteiden laimentamisessa on huomioitavaa pipettien sekä mittapullojen aiheuttamat virheet sekä tekijästä johtuva virhe.

Ajoliuoksen valmistamisessa ei noudatettu perinteisiä menetelmiä, joiden mukaan Tris-reagenssi olisi pitänyt liuottaa tarkkaan tilavuuteen vettä ja vasta sitten sekoittaa metanolin kanssa. Koska ajoliuoksen valmistuksessa meneteltiin erilailla, sillä saattoi olla vaikutusta tuloksiin.

Laitteistosta aiheutuvia virheitä voivat olla injektioinnista aiheutuvat virheet, joiden vaikutus todennetaan injektioinnin toistettavuustestillä. Kolonnista aiheutuvat virheet ovat myös mahdollisia. Kolonniin on voinut jäädä epäpuhtauksia.

Tulosten integrointi on tekijästä johtuva virhe. Integrointi on oltava tarkkaan määritettyä, jotta tulokset ovat aina vertailukelpoisia. Vahvemmillä pitoisuuksilla, 1 - 2 mg/mL integroinnin parametreja oli muutettava, jotta saatiin piikin pohjavii-va nostettua negatiiviselta tasolta nollatasolle.

6 MAHDOLLISIA JATKOTOIMENPITEITÄ

Mittauksissa tuli ilmi, että tensideillä saattaa olla eräkohtaisia eroja kromatogrammin piikkien intensiteetin suhteen. Tämän varmistamiseksi suositellaan, että mitataan saman pesuaineen amfoteerisen tensidin 1 pitoisuutta eri eristä valmistettuja standardisuoria vasten ja vertaillaan tuloksia keskenään, että saadaanko joka erällä sama tulos.

Menetelmälle suositellaan validointia. Validointia varten tulee määrittää hyväksytyt virherajat menetelmälle. Validoinnin yhtydessä määritetään detektointi- ja kvantitatiivisen määrittelyn raja-arvot tarkemmin.

Kolonnin lämpötilan muuttaminen voi vaikuttaa etenkin ionisten yhdisteiden retentioaikaan. Tässä opinnäytetyössä ei tutkittu miten kolonnin lämpötilan muuttaminen vaikuttaa kromatogrammeihin. Lämpötilaa muuttamalla voidaan saada ajoaika lyhennettyä¹⁵. Yksi menetelmä lämpötilan vaikutuksen tutkimiseksi voi olla, että lähdetään liikkeelle 20 °C:sta ja nostetaan ajolämpötilaa 5 °C jokaisella ajokerralla.

Näissä määrittelyissä laskettiin pitoisuus vain yhden piikin perusteella. Kappaleessa 5.8 todetaan, että amfoteerinen tensidi 1 antoi vähintään kaksi piikkiä. Amfoteerisen tensidin hiiliketjun pituus voi vaihdella välillä 11 - 13 ja eripituisten hiiliketjujen suhteellinen esiintyvyys vaihtelee eräkohtaisesti, joten tulokset kannattaisi laskea ainakin näiden kahden piikin yhteen laskettua pinta-alaa vasten. Tämä tosin vaatii piikkien täydellistä tunnistamista.

Koska ajoliuosta ei valmistettu perinteisesti, kannattaa kokeilla valmistaa ajoliuos siten että ensin punnitsee Tris -reagenssin ja liuottaa sen lähelle lopullista tilavuutta vettä. Tämän jälkeen säädetään pH ja siirretään liuos mittapulloon ja täytetään vedellä merkkiin asti ja suodatetaan. Vasta tässä vaiheessa yhdistetään Tris -puskuriliuos ja liuotin halutussa suhteessa.

Tris-HCl-menetelmäkehityksen aikana kokeiltiin myös muita puskuriliuoksia. Ammoniumformaattipuskuriliuoksella ei saatu aikaiseksi kunnollista erottuvuut-

ta, mutta ammoniumasetaattipuskurilla, pH-alueella 5 - 4, saatiin erotettua Amfoteerisesta tensidistä 1 aiheutuva piikki. Häntiminen oli tosin runsasta ja resoluutio on huono. Menetelmällä voidaan päästä lyhyempään ajoikaan tai laimeampaan metanolipitoisuuteen, jos häntiminen saadaan loppumaan. Menetelmästä tarkempia tietoja löytyy Liitteessä 5.

7 YHTEENVETO

Valmiiden tuotteiden tensidipitoisuuksien analysoiminen on haastava ja aikaa vievä prosessi jopa kokeneelle laboratoriolle⁹. Tässäkin työssä lähtökohtana oli, että pelkästään piikin saaminen esille pelkästään amfoteeriselle tensidille 1 tulee olemaan haastavaa. Tässä työssä onnistuttiin luomaan menetelmä, jolla saatiin toistettavasti mitattua halutun tensidin pitoisuus pesuainenäytteestä. Menetelmä ei kuitenkaan ole valmis, vaan menetelmälle on syytä toteuttaa kappaleessa 6 ehdotetut toimenpiteet.

KiiltoCleanilla ei tällä hetkellä ole hallussaan HPLC:ta. Kuitenkin HPLC on hyvä menetelmä erilaisten tensidien pitoisuuksien määrittämiseksi. HPLC:lla ajolosuhteita voidaan helposti muuttaa. Etenkin amfoteeristen tensidien kohdalla pH:ta muuttamalla voidaan vaikuttaa tensidien retentioon. Tämä menetelmä ei välttämättä sovi kaikille amfoteerisille tensideille ja näytematriiseille, mutta voi toimia hyvänä lähtökohtana tensidien määrittämiseksi.

Amfoteeristen tensidien määrittämisessä aloitettiin siitä, että missä pH:ssa ja millä kolonnilla tensidi saataisiin erottumaan. Toinen lähtökohta oli detektorin valinta. RID on hyvä yleisdetektori, mikäli näytemolekyyli ei sisällä UV-valoa absorboivia ryhmiä. Kun erotusta saatiin aikaiseksi, seuraavaksi varmistettiin, että tensidin mahdolliset apuaineet eivät aiheuttaneet häiriötä. Kun oli varmistettu siitä, että erottumaan saatu piikki johtui tensidistä, voitiin kokeilla saatiinko kyseinen tensidi näkymään mitattavana olevassa pesuaineessa, tai muussa näytematriisissa. Samalla varmistettiin, että näytematriisin muut komponentit eivät aiheuttaneet häiriötä, esimerkiksi jos jollakin komponentilla olisi ollut sama retentioaika kuin määritettävällä tensidillä. Kun nämä asiat oli varmistettu, voitiin kokeilla toistettavuutta ja optimoida kromatogrammiin muoto mahdollisimman selkeäksi muokkaamalla ajoliuoksen liuottimen pitoisuutta, ajoliuoksen pH:ta ja määrittämisen lämpötilaa. Tästä eteenpäin menetelmän kehitys jatkuu menetelmän validointina.

LÄHTEET

- ¹ Broze, G. 1999. Handbook of detergents: Part A: Properties. New York, USA: Marcel Dekker, Inc
- ² College voor de toelating van gewasbeschermingsmiddelen en biociden. Viitattu 13.4.2014. http://www.ctb.agro.nl/ctb_files/13710_01.html
- ³ Napari, P. 1993. Orgaaninen kemia. Helsinki: Opetushallitus
- ⁴ Krüss. Viitattu 29.5.2014. <http://www.kruss.de/application-of-surfactants>
- ⁵ O'Lenick, A. J. 2005. *Surfactants: Strategic Personal Care Ingredients*. Chicago, USA: Allured Publishing corporation
- ⁶ Bruice, P. Y. 2006. *Essential Organic Chemistry*. New Jersey, USA: Pearson Education, Inc.
- ⁷ Petrucci, R. H.; Harwood, W. S.; Herring, F. G.; & Madura, J. D. (2007). *General Chemistry, 9th edition*. New Jersey USA: Pearson Education, Inc
- ⁸ JohnsonDiversey. (2005). *SAFETY DATA SHEET*. Viitattu 13.4.2014. http://www.dbm-ltd.co.uk/hygiene/products/johnsondiversey/chemicals/open_plant_cleaning/disinfectants/tego_2000_MSDS.pdf
- ⁹ Schmitt, T. M. 2001. Analysis of surfactants, Second edition. New York, USA: Marcel Dekker, Inc.
- ¹⁰ Campeau, D.; & Gruda, I. (1987). Analysis of Amphoteric Surfactant of the Alkylaminopropylglycine Type by Gas Chromatography. *Journal of Chromatography*. 405: 305-310
- ¹¹ Fried, B.; & Sherma, J. 1999. *Thin-Layer Chromatography, Fourth edition*. New York. USA: Marcel Dekker, Inc.
- ¹² Merck Millipore. *Merck Millipore*. Viitattu 17.4.2014. http://www.merckmillipore.com/is-bin/INTERSHOP.enfinity/WFS/Merck-SE-Site/en_US/-/EUR/ViewPDF-Print.pdf?RenderPageType=ProductDetail&CatalogCategoryID=ghGb.s1L_mIAAAEWs.EfVhTI&ProductUUID=toyb.s1OM5sAAAEa9T9qKZJM&PortalCatalogUUID=t02b.s1LX0MAAAEWc9UfVhTI
- ¹³ Waldoff, H.; & Spilker, R. 2005. Handbook of Detergents: Part C: Analysis. New York, USA: Marcel Dekker, Inc.
- ¹⁴ Harris, D. C. 2009. Exploring Chemical Analysis, 4th edition. New York, USA: W.H. Freeman and Company.
- ¹⁵ Harris, D. C. 2003. Quantitative Chemical Analysis, 6th edition. New York: W. H. Freeman and Company.
- ¹⁶ Lehtiniemi, K.; & Turpeenoja, L. (2007). *Abi: Kemia*. Keuruu: Otava.
- ¹⁷ Dolan, J. A Guide to HPLC and LC-MS Buffer Selection. Viitattu 24.4.2014. http://www.hplc.eu/Downloads/ACE_Guide_BufferSelection.pdf
- ¹⁸ Laserchrom. Understanding pH Buffers. High-quality buffers (solutions, solids or concentrates) Viitattu 27.4.2014. <http://www.laserchrom.co.uk/LaserchromHPLC-pHBufferGuide.htm>

¹⁹ Katz, E.; Eksteen, R.; Schoenmakers, P.; & Miller, N. 1998. Handbook of HPLC. New York, USA: Marcel Dekker, Inc.

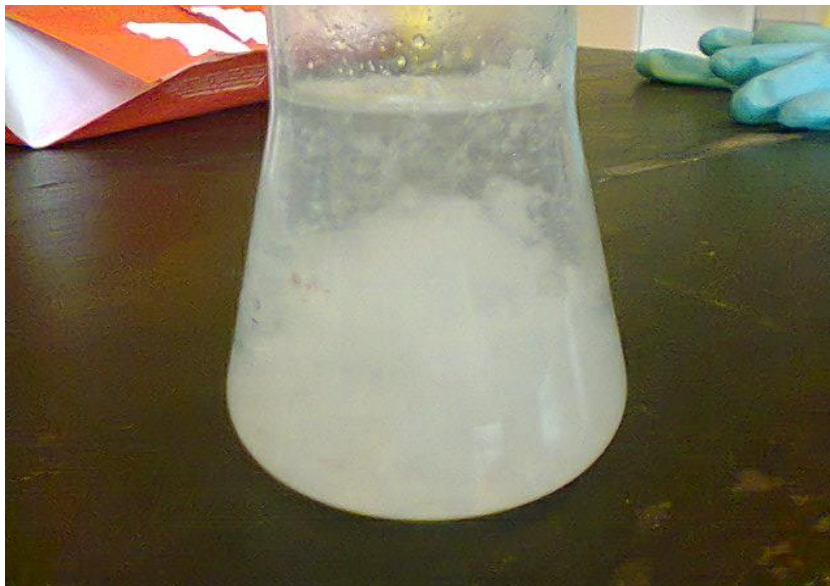
²⁰ König, H.; & Strobel, W. (1988). Analysis of surfactants in toothpastes by HPLC. Fresenius Z Anal Chem. 331: 435-438.

²¹ Angela Tegeler, W. R. (1995). Determination of amphoteric surfactants in cosmetic cleansing products by high-performance liquid chromatography on a cation-exchange column. Journal of Chromatography . 715: 195-198.

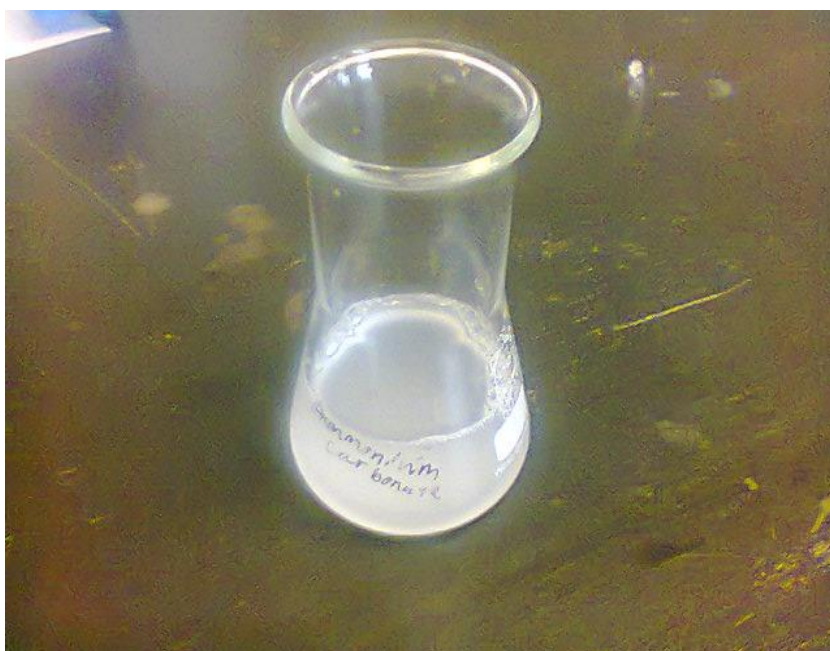
²² Drexel University. Department of Neurobiology and Anatomy. Viitattu 5.5.2014. <http://neurobio.drexelmed.edu/gaoweb/resources/common%20buffers%20and%20stock%20solutions.pdf>

²³ Verma, S. *Reversed-phase HPLC Buffers*. Supelco Analytical. Viitattu 5.5.2014. http://ccc.chem.pitt.edu/wipf/Web/HPLC_RP_Buffers.pdf

Amfoteerisen tensidin 1 käyttäytyminen eri puskuriliuoksissa



Kuva 25. Amfoteerinen tensidi 1 liuotettuna divetyfosfaattipuskuriin.



Kuva 26. Amfoteerinen tensidi 1 liuotettuna karbonaattipuskuriin.

Amfoteerisen tensidin 1 eräkohtainen vertailu

Taulukko 14. Parametrit

pvm	16.5.2014
A:	MeOH:Tris-HCl (8:2), pH 7,66
B:	
Inj.vol:	20 µL
Stop time:	17 min
Flow speed:	1,0 mL/min
Max p:	200 bar
Min p:	5 bar
VWD:	210 nm
T(kolonniuuni)	25 °C
T(RID)	25 °C

Taulukko 15. Eräkohtainen vertailu

Näyte	Punnittu (mg)	Liutustilavuus (mL)	Konsentraatio (mg/mL)	Pinta-ala (mAU*s)	Korkeus (mAU)	Pinta-ala/Pitoisuus	Korkeus/pitoisuus
A_1	116,41	25	4,66	762,89	43,58	163,8	9,4
A_2	129,30	25	5,17	772,00	40,17	149,3	7,8
A_3	122,99	25	4,92	792,14	47,70	161,0	9,7
36_1	130,34	25	5,21	841,64	49,13	161,4	9,4
36_2	130,69	25	5,23	831,32	50,94	159,0	9,7
36_3	119,69	25	4,79	765,57	48,41	159,9	10,1
57_1	120,19	25	4,81	799,31	48,54	166,3	10,1
57_2	131,03	25	5,24	899,70	55,51	171,7	10,6
57_3	151,14	25	6,05	1049,73	63,37	173,6	10,5
35_1	125,45	25	5,02	809,81	50,18	161,4	10,0
35_2	116,50	25	4,66	719,28	46,04	154,4	9,9
35_3	130,23	25	5,21	830,62	52,53	159,5	10,1

Konsentraatio laskettiin kaavalla:

$$Konsentraatio = \frac{\text{punnttu määrä}}{\text{liutustilavuus}}$$

$$Konsentraatio = \frac{116,41 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} \approx 4,66 \text{ mg/mL}$$

Piikin pinta-ala ja korkeus on ilmoitettu kahden injektoinnin keskiarvona.

Pinta-ala/Pitoisuus laskettiin kaavalla:

$$\frac{\text{Piikin pinta - ala}}{\text{Pitoisuus}}$$

$$\frac{762,89}{4,66} \approx 163,8$$

ja Korkeus/Pitoisuus laskettiin kaavalla:

$$\frac{\text{Piikin korkeus}}{\text{Pitoisuus}}$$

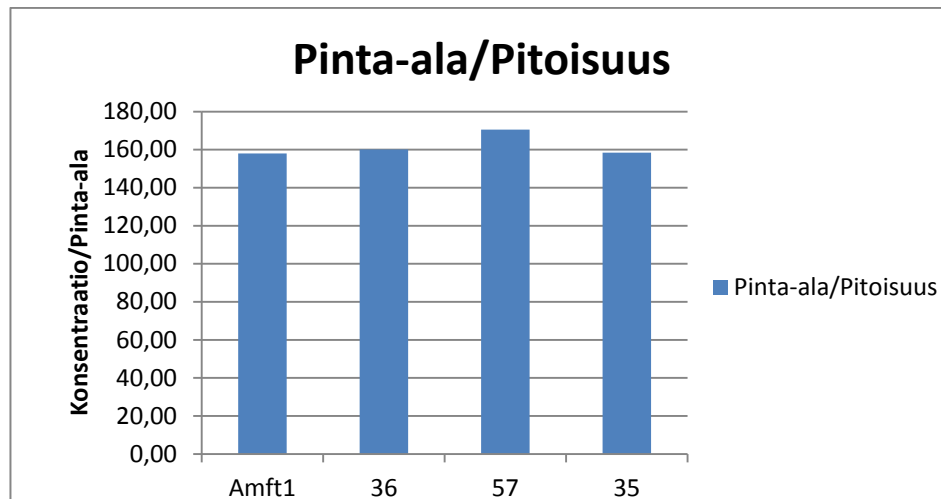
$$\frac{43,58}{4,66} \approx 9,4$$

Taulukko 16. Tulokset

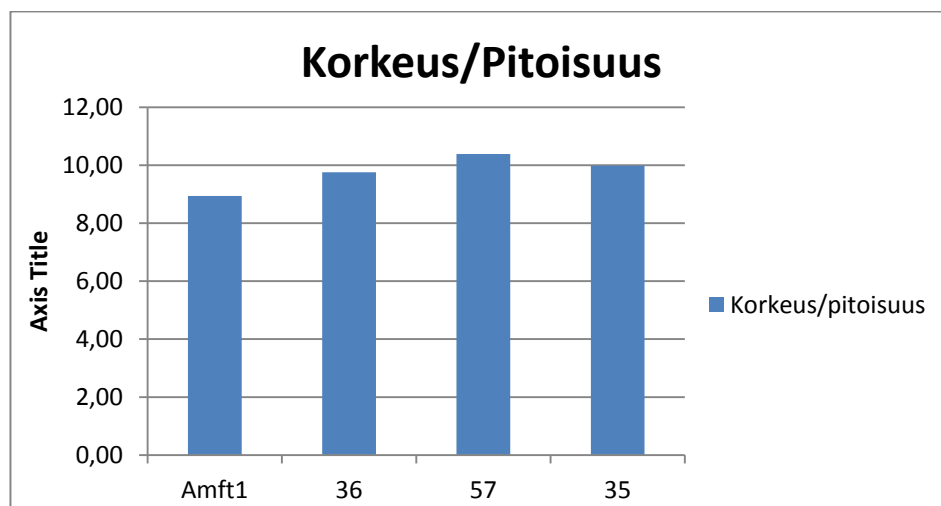
Näyte	Pinta-ala/Pitoisuus	Korkeus/Pitoisuus
Amft1	158,04	8,94
36	160,12	9,76
57	170,52	10,39
35	158,40	9,99

Taulukossa ilmoitetut arvot ovat kolmen rinnakkaisen keskiarvo.

Muodostettiin kaaviot:



Kuva 27. Piikin pinta-ala/Pitoisuus.



Kuva 28. Piikin korkeus/Pitoisuus.

Tulosten perusteella näyttäisi, että erä 57 antaa isommat piikit. Erät 36 ja 35 ovat samaa tasoa. Ainakin piikin korkeuden perusteella käytössä ollut Amft1, joka oli toimitettu syksyllä 2013 antaa hieman heikompia arvoja kuin tuoreemat erät. Pinta-alan suhteen ero ei ole niin suuri.

Ainakin näiden tulosten perusteella voi olla järkevää mitata pesuaineen amfooterisen tensidin pitoisuus samaa erää vasten, jota on käytetty raaka-aineena pesuaineessa.

Menetelmäohje Amfoteerisen tensidin määrittämiseksi pesuaineesta HPLC:lla

1 YLEISTÄ

Tämä menetelmä on tarkoitettu määrittämään kvantitatiivisesti Amfoteerisen tensidin, Alkyyli-1,3-dipropyliamiinin ja 2-kloorietikkahapon reaktiotuote, pitoisuus pesuainenäytteestä.

2 SOVELTAMISALUE

Tämä menetelmä sopii kohdassa 1 määritetyille amfoteeriselle tensidille. Menetelmä soveltuvuutta muille amfoteerisille tensideille ei ole testattu.

3 PERIAATE

Näytteet ja standardit injektoidaan ajoliuosvirtaan. Amfoteerinen tensidin on saatu ympäristön pH:ta muokkaamalla kahtaisioniseen muotoon jolloin se saadaan viipymään kolonnissa ja erottumaan muusta näytematriisista. Detektointi perustuu molekyylien ultraviolettivaloa absorboivien ryhmien (kromoforien) detektointiin. Jos analysoitavat molekyylit eivät sisällä kromoforeja, niin taitekerroindetektor (RID) on vartenotettava vaihtoehto detektointinille. Taitekerroindetektor ei ole yhtä herkkä kuin UV-detektor

4 HÄIRIÖT

Amfoteerisen tensidin apuaineet ja pesuainenäytteen muut komponentit eivät aiheuta häiriötä. Määritettävän amfoteerisen tensidin pitoisuuden kasvaessa taustan epätasaisuus määritettävän piikin juurella kasvaa. Tämä vaikuttaa piikin pinta-alan mittaamiseen ja integrointiin.

5 VÄLINEET JA LAITTEET

5.1 HPLC - laite

- kaasunpoistojärjestelmä
- pumppu, jossa vähintään kaksi ajolinjaa
- automaattinen injektori
- kolonniuuni, jossa 6 μ L loop, Katso Kuva 1.
- kolonni/ Agilent Eclipse C18-XDB/ 140 x 150 mm/ 5 μ m/ PN: 993967-902/ SN: USKH057779/ LN: P09081
- esikolonni/ Phenomenex/ Security Guard/ Cartridge kit/ Part No: KJO 4282/ UIM: Ea
- phenomenex/ Security Guard Cartridge/ Part No: AJO 4302-S
- UV-detektori
- ohjaus- ja tietojenkäsittely-yksikkö



Kuva 1. Kolonniuuni

5.2 Välineet

Kaikki näytteen ja standardien kanssa kosketuksissa oleva lasimateriaali huuhdellaan ultrapuhtaalla vedellä.

- mittapulloja DIN A
- täyspipettejä DIN AS (DIN B, jos ei ole AS luokkaa saatavilla)
- dekantterilaseja
- mittalasi, 250 mL
- Imusuodatuslaitteisto, esim. Merck Millipore
- Suodatinkalvo/ GH Polypro/ 47 mm/ 0,45 µm
- Ruiskuja 2 mL
- Ruiskusuodatin/Whatman/ 13 mm/ 0,45 µm/ polypropylene housing
- pH –mittari ja pH elektrodi
- magneettisekoittaja
- HPLC -pulloja

6 REAGENSIT

Käytettävä vesi on ultrapuhdasta, joka täyttää taulukon 1 parametrit.

Taulukko 1. Ultrapuhdas vesi

Sähkönjohtavuus (MΩ*cm)	18,2
TOC (ppb)	< 5
Endotoksiini (EU/mL)	0,001

Käytettävä metanoli on HPLC-laatua ja Tris(hydroksimetyyli)-metyyliamiini sekä pH-säätöön käytettävä väkevä HCl ovat analyysilaatua.

6.1 Tris-HCl ajoliuos

Liutetaan 1,6 g Tris –reagenssia 200 mL vettä 1L dekantterilasiin ja lisätään metanolia noin 950 mL asti. Säädetään HCl:lla pH 7,6. Siirretään liuos 1000 mL mittapulloon. Kaadetaan tilkka metanolia samaan 1L dekantterilasiin pyöräytetään pari kertaa ja kaadetaan 1000 mL mittapulloon merkkiin. Sekoitetaan liuos kääntelemällä mittapulloa 15 kertaa. Imusuodatetaan liuos imusuodatuslaitteella suodatinkalvon (GH Polypro) läpi ja siirretään HPLC-pulloon. Lopullisen liuoksen Tris:n konsentraatio on noin 13 mmol/L ja metanolipitoisuus on 80 %

Liuosta kannattaa tässä vaiheessa varata esim. 200 mL dekantterilasiin näytteiden ja standardien käsittelyä varten. Pistetään yhteen näytepulloon ajoliuosta ajoliuosinjektioita varten. Tätä liuosta ei tarvitse ruiskusuodattaa.

6.2 Amfoteerisen tensidin kantaliuos

Punnitaan tarkasti noin 167 mg Amfoteerista tensidiä 50 mL mittapulloon esim. pasteur-pipetillä. Liutetaan kohdan 6.1 liuokseen.

6.3 Standardisuoran vertailuliuokset

Valmistetaan standardisuoran liuokset pipetoimalla kohdan 6.2 liuosta ja laimentamalla kohdan 6.1 liuoksella taulukon 2 mukaisesti.

Taulukko 2. Standardisuoran liuokset.

Pipetoitu kantaliuosta (mL)	liuotustilavuus (mL)	≈Pitoisuus(mg/mL)
2	20	0,1
2	10	0,2
4	10	0,4
6	10	0,6
8	10	0,8

Standardiliuokset ruiskusuodatetaan ajoliuospulloihin

6.4 Huuhteluliuos

Kaada mittalasilla 50 mL vettä 250 mL HPLC-pulloon. Lisää mittalasilla 200 mL metanolia ja sekoita hyvin. Tällä liuksella huuhdellaan kolonni ajon päätteeksi.

7 TYÖN SUORITUS

7.1 Näytteiden valmistus

Punnitse analysoitavaa pesuainenäytettä tarkasti noin 70 - 530 mg ja liuota kohdan 6.1 liuksella 10 mL mittapulloon. Jotta näyte osuisi suoralle, täytyy punnittavan näytteen osua annettujen rajojen väliin. Valmistetaan vähintään kolme rinnakkaista näytettä. Näytteet ruiskusuodatetaan näytepulloihin.

7.2 Laitteen käynnistys

Laitteen käynnistyksessä noudatetaan yleisiä periaatteita. Ajolinjat huuhdellaan (Purge) ajoliuksella ja varmistetaan, että ilmakuplia ei esiinny. Tämän jälkeen säädetään ajonopeus 1mL/min ja ajetaan kolonniin kohdan 6.1 liuosta ja annetaan signaalien tasapainottua.

7.3 Ajoparametrit ja sekvenssi

Taulukossa 3 on ajon parametrit ja Taulukossa 4 on ohjelmoitavan sekvenssin tiedot.

Taulukko 3. Ajoparametrit

Ajoliuos	MeOH:Tris-HCl (8:2), pH 7,6
Inj.vol:	20 µL
Stop time:	17 min
Flow speed:	1,0 mL/min
Max p:	200 bar
Min p:	5 bar
VWD:	210 nm
T(kolonniuuni)	25 °C
T(RID)	25 °C

Taulukko 4. Sekvessin tiedot

Näyte	Ajojen lukumäärä
Ajoliuos	1
0,6 mg/ mL	6
Ajoliuos	1
0,1 mg/ mL	3
0,2 mg/ mL	3
0,4 mg/ mL	3
0,6 mg / mL	3
0,8 mg / mL	3
Ajoliuos	1
Pesuaine_1	3
Pesuaine_2	3
Pesuaine_3	3

Ohjelmoidaan metodin parametrit ja sekvenssi. Ajon päätteeksi ohjelmoidaan kolonnin huuhtelu kohdan 6.4 liuoksella 1,7 mL/min 40 minuutin ajan.

8 TULOSTEN LASKEMINEN

Systemitestin tulokset Taulukossa 5.

Jokaisesta standardisuoran liuoksesta otetaan kolme injekointia. Standardisuoraan pistetään näiden kolmen injektioonin keskiarvo. Kohdan 6.2 liuoksen tensidipitoisuus lasketaan kaavalla:

$$\frac{m}{V} \times 0,3$$

missä

m = punnittu massa (mg)

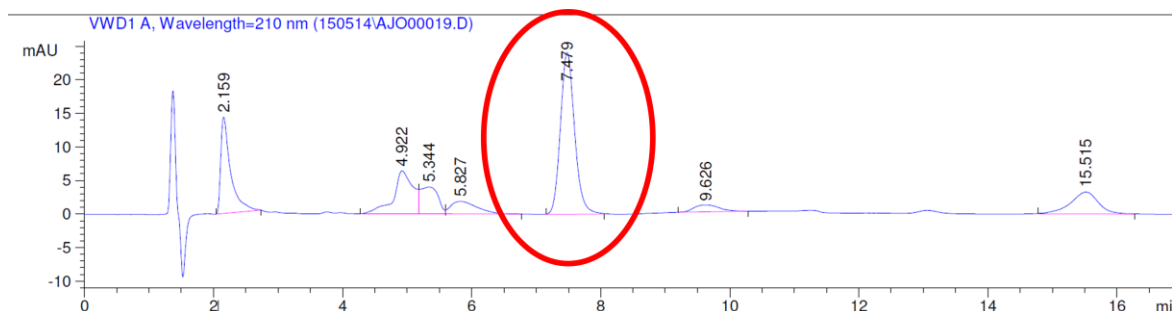
V = liuotustilavuus (mL)

Kerroin 0,3 tulee siitä, että Amfoteerisen tensidin aktiiviaineen pitoisuus on 30 %.

Standardisuoran liuosten pitoisuus lasketaan kaavalla:

$$\text{Kantaliuoksen pitoisuus} \times \frac{V(\text{kantaliuosta pipetoitu})}{V(\text{liuotustilavuus})}$$

Amfoteerisen tensidin kromatogrammissa on usea piikki. Näytteen pitoisuus määritetään 7 - 8 minuutin kohdalla eluoituvasta piikistä. Katso Kuva 2.



Kuva 2. Tensidipiikki

Standardisuora määritetään piikin pinta-alasta ja standardin pitoisuudesta siten, että x-akselille tulee pitoisuudet (mg/mL) ja y-akselille piikkien pinta-alat (mAU*s) (Kuva 3). Näytteiden sisältämän Amfoteerisen tensidin näytekohtainen pitoisuus

lasketaan standardisuoran yhtälöllä:

$$y = ax + b \rightarrow x = \frac{y - b}{a}$$

, missä

y = näytteen piikin pinta-ala

a = standardisuoran kulmakerroin

b = standardisuoran y-akselin leikkauspiste

ja x ilmoitetaan yksikössä mg/mL

Jokaisesta näytteestä otettiin kolme injektointia. Yhden rinnakkaisen tensidipitoisuus on näiden kolmen injektoinnin keskiarvo. Kunkin pesuainenäytteen lopullinen tensidipitoisuus ilmoitetaan massaprosentteina ja lasketaan kaavalla:

$$\frac{\text{Näytteen amfoteerisen pitoisuus}}{\text{Näytteen pesuainepitoisuus}} \times 100\%$$

Näytteen pesuainepitoisuus lasketaan kaavalla:

$$\frac{m(\text{Pesuaine})}{V(\text{Liuotustilavuus})}$$

ja ilmoitetaan yksikössä mg/mL.

Pesuaineen amfoteerisen tensidin pitoisuus ilmoitetaan vähintään kolmen rinnakkaisen massaprosentin keskiarvona.

9 TYÖTURVALLISUUS

Liuottomia ja happoja käsiteltäessä on noudatettava varovaisuutta ja pidettävä suojakäsineitä ja suojalaseja. Liuottimia on käsiteltävä vetokaapissa.

Esimerkki 15.5.2014 saatujen tulosten laskemisesta

Systemitestillä selvitetään injektoinnin toistettavuutta. Taulukossa 1 on laskettu systemitestin keskiarvo ja keskihajonta 15.5.2014 tuloksista. Systemitestin tulos on laskettu piikin pinta-alasta.

Taulukko 1. Systemitesti

Amft1 STD 0,6/ Systemitesti						
Ajo	Retentioaika (min)	Type	Leveys (min)	Pinta-ala(mAU*s)	Korkeus(mAU)	Area(%)
1	7,279	BB	0,2172	364,20895	25,786	38,185
2	7,311	BB	0,2156	365,75281	25,91365	38,1282
3	7,325	BB	0,2157	366,27451	25,9395	37,88
4	7,336	BB	0,2174	367,39996	25,97782	38,1196
5	7,344	BB	0,2161	367,97626	26,00227	38,0443
6	7,345	BB	0,2162	368,54614	26,01902	38,2446
ka	7,32		0,22	366,69	25,94	38,10
SD	0,03		0,00	1,60	0,08	0,13
SD(%)	0,34		0,35	0,44	0,33	0,33

Jokaisesta standardisuoran liuksesta otettiin kolme injektointia ja näiden kolmen injektoinnin keskiarvo otettiin standardisuoralle. Taulukossa 6 on standardisuoran liusten tulokset.

Taulukko 2. Standardisuoran liukset

Amft1_0,1						
Ajo	Retentioaika (min)	Type	Leveys (min)	Pinta-ala(mAU*s)	Korkeus(mAU)	Area(%)
1	7,374	BB	0,2326	62,54225	4,05012	25,5165
2	7,378	BB	0,2285	60,42329	4,00445	24,9243
3	7,391	BB	0,228	59,72795	4,03669	24,2653
ka	7,38		0,23	60,90	4,03	24,90
SD	0,01		0,00	1,47	0,02	0,63
SD(%)	0,12		1,10	2,41	0,58	2,51

Amft1_0,2						
Ajo	Retentioaika (min)	Type	Leveys (min)	Pinta-ala(mAU*s)	Korkeus(mAU)	Area(%)
1	7,396	PB	0,2242	118,94753	8,07887	30,5749
2	7,402	PB	0,2237	118,06343	8,04098	30,9874
3	7,418	BB	0,227	119,3134	8,04165	31,1488
ka	7,41		0,22	118,77	8,05	30,90
SD	0,01		0,00	0,64	0,02	0,30
SD(%)	0,15		0,79	0,54	0,27	0,96

Amft1_0,4						
Ajo	Retentioaika (min)	Type	Leveys (min)	Pinta-ala(mAU*s)	Korkeus(mAU)	Area(%)
1	7,42	BB	0,2361	255,77515	16,50311	38,3914
2	7,437	PB	0,2257	237,15144	16,10471	36,923
3	7,452	PB	0,2248	234,52367	16,00405	36,9272
ka	7,44		0,23	242,48	16,20	37,413867
SD	0,02		0,01	11,59	0,26	0,8465713
SD(%)	0,22		2,74	4,78	1,63	2,2627207

Amft1_0,6						
Ajo	Retentioaika (min)	Type	Leveys (min)	Pinta-ala(mAU*s)	Korkeus(mAU)	Area(%)
1	7,465	BB	0,2363	365,12674	23,91868	40,662
2	7,479	BB	0,2349	368,10034	24,10778	40,2491
3	7,489	BB	0,2333	368,90189	24,17684	43,5547
ka	7,48		0,23	367,38	24,07	41,4886
SD	0,01		0,00	1,99	0,13	1,8011659
SD(%)	0,16		0,64	0,54	0,56	4,3413513

Amft1_0,8						
Ajo	Retentioaika (min)	Type	Leveys (min)	Pinta-ala(mAU*s)	Korkeus(mAU)	Area(%)
1	7,519	VB	0,2562	481,31601	29,45414	41,1578
2	7,528	VB	0,254	483,77609	29,70992	43,0528
3	7,537	VB	0,25	480,50879	29,91339	44,1819
ka	7,53		0,25	481,87	29,69	42,7975
SD	0,01		0,00	1,70	0,23	1,5281292
SD(%)	0,12		1,24	0,35	0,78	3,5706038

Näytteen amfoteerisen tensidin tai punnitun näytteen pitoisuus on ilmoitettu taulukossa 3.

Taulukko 3. Punnitut näytteet ja amfoteerinen tensidi 1.

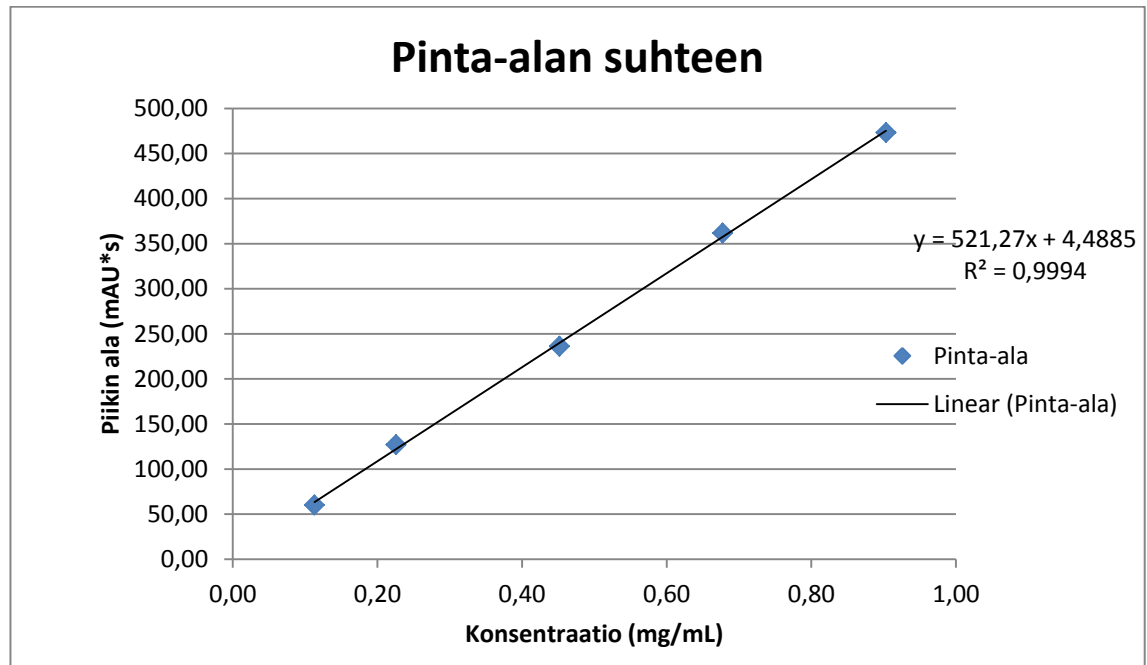
Näyte	punnittu (mg)	liuotustilavuus (mL)	Pitoisuus(mg/ mL)
Amft1	93,1	25	1,12
Pesuaine_1	510,35	10	51,04
Pesuaine_2	515,31	10	51,53
Pesuaine_3	520,83	10	52,08

Standardisuoran liukset valmistettiin laimentamalla Amft1 –kantaliuosta taulukon 4 mukaisesti. Piikin pinta-ala sarakkeessa on ilmoitettu taulukon 2 standardiliuosten injektointien kolmen injektoinnin keskiarvo.

Taulukko 4. Standardisuoran liukset.

Pipetoitu (mL)	liuotustilavuus (mL)	Pitoisuus(mg/mL)	Piikin ala (mAU*s)
2	20	0,11	60,90
2	10	0,22	118,77
4	10	0,45	242,48
6	10	0,67	367,38
8	10	0,89	481,87

Standardisuora muodostettiin taulukon 4 arvojen perusteella.



Kuva 1. Standardisuora

Pesuainenäytteestä otettiin kolme rinnakkaista ja jokaisesta rinnakkaisesta otettiin kolme injektointia. Taulukossa 5 on pesuaineiden tulokset.

Taulukko 5. Pesuainenäytteet.

Pesuaine_1				
Ajo	Retentioaika (min)	Type	Pinta-ala(mAU*s)	Pitoisuus ala(mg/mL)
1	7,418	BB	386,7702	0,71
2	7,373	BB	423,17813	0,78
3	7,37	VB	391,5076	0,72
ka	7,37		400,49	0,74
SD	0,00		19,79	0,04
SD(%)	0,03		4,94	4,94

Pesuaine_2				
Ajo	Retentioaika (min)	Type	Pinta-ala(mAU*s)	Pitoisuus ala(mg/mL)
1	7,365	BB	393,52795	0,73
2	7,364	BB	396,83417	0,73

3	7,364	BB	397,38776	0,73
ka	7,36		395,92	0,73
SD	0,00		2,09	0,00
SD(%)	0,01		0,53	0,53

Pesuaine_3				
Ajo	Retentioaika (min)	Type	Pinta-ala(mAU*s)	Pitoisuus ala(mg/mL)
1	7,364	BB	398,63257	0,74
2	7,365	BB	399,39648	0,74
3	7,363	BB	407,88483	0,75
ka	7,36		401,97	0,74
SD	0,00		5,14	0,01
SD(%)	0,01		1,28	1,28

Taulukossa 6 on ilmoitettu jokaisen rinnakkaisen kolmen injektioonin keskiarvot ja lopullinen tulos on ilmoitettu kolmen rinnakkaisen tuloksen keskiarvona.

Taulukko 6. Tulokset

	Pesuaine	Amft1 pitoisuus	Pesuaineen Amft1 pitoisuus
Pesuaine	Pitoisuus (mg/mL)	Pitoisuus ala (mg/mL)	Pitoisuus ala (%)
1	51,04	0,74	1,45
2	51,53	0,73	1,42
3	52,08	0,74	1,42
ka			1,43
SD			0,02
SD(%)			1,12

Amfoteerisen tensidin määrittäminen pesuaineesta ammoniumasetatipuskurissa

1 YLEISTÄ

Tämä menetelmä on tarkoitettu määrittämään kvantitatiivisesti Amfoteerisen tensidin, Alkyyli-1,3-dipropyliamiinin ja 2-kloorietikkahapon reaktiotuote, pitoisuus pesuainenäytteestä. Menetelmässä on käytetty Ammoniumasetatipuskuriliuosta. Menetelmällä on ainoastaan saatu aikaiseksi erottuvuus ja osoitettu, että Amfoteerisen tensidin apuaine, etikkahappo, ei aiheuta häiriötä.

2 VÄLINEET JA LAITTEET

2.1 HPLC - laite

- kaasunpoistojärjestelmä
- pumppu, jossa vähintään kaksi ajolinjaa
- Automaattinen injektor
- Kolonniuuni, jossa 6 µL loop
- Kolonni/ Agilent Eclipse C18-XDB/ 140 x 150 mm/ 5 µm/ PN: 993967-902/ SN: USKH057779/ LN: P09081
- Esikolonni/ Phenomenex/ Security Guard/ Cartridge kit/ Part No: KJO 4282/ UIM: Ea
- Phenomenex/ Security Guard Cartridge/ Part No: AJO 4302-S
- RID
- Ohjaus- ja tietojenkäsittely-yksikkö

2.2 Välineet

Kaikki näytteen ja standardien kanssa kosketuksissa oleva lasimateriaali huuhdellaan ultrapuhtaalla vedellä.

- mittapulloja DIN A

- dekantterilaseja
- mittalasi, 250 mL
- Imusuodatuslaitteisto, esim. Merck Millipore
- Suodatinkalvo/ GH Polypro/ 47 mm/ 0,45 µm
- Ruiskuja 2 mL
- Ruiskusuodatin/Whatman/ 13 mm/ 0,45 µm/ polypropylene housing
- pH –mittari ja pH elektrodi
- magneettisekoittaja
- HPLC -pulloja

3 REAGENSIT

Käytettävä vesi on ultrapuhdasta, joka täyttää taulukon 1 parametrit.

Taulukko 1. Ultrapuhdas vesi

Sähkönjohtavuus (MΩ*cm)	18,2
TOC (ppb)	< 5
Endotoksiini (EU/mL)	0,001

Käytettävä metanoli on HPLC -laatua ja ammoniumasetaatti sekä pH-säätöön käytettävä väkevä etikkahappo ovat analyysilaatua.

3.1 Ammoniumasetaattipuskuriliuos

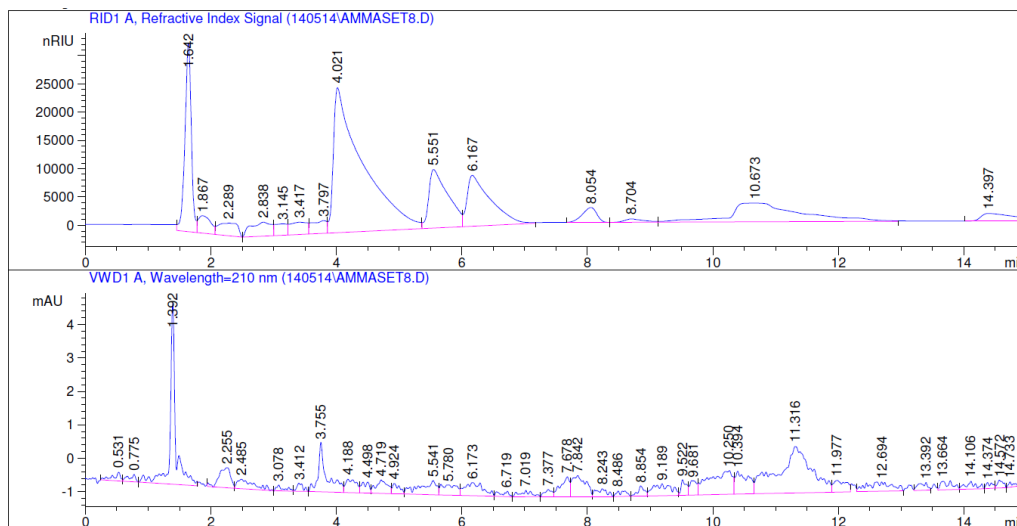
Ammoniumasetaattia punnitaan siten, että lopullisen liuoksen pitoisuus on noin 0,01 mol/L. Ammoniumasetaatti liuotetaan veteen ja metanolia lisätään melkein lopulliseen tilavuuteen asti. pH säädetään väkevällä etikkahapolla, liuos siirretään mittapulloon ja täytetään metanolilla merkkiin asti. Liuos imusuodatetaan suodatinkalvon (GH polypro) läpi.

3.2 Näytteiden laimennos

Näytteet liuotettiin kohdan 3.1 ajoliuokseen. Amfoteerist tensidiä punnittiin siten, että aktiivaiineen pitoisuus näytteessä oli noin 2 mg /mL. Eli 10 mL näyteliuosta varten punnittiin noin 67 mg Amfoteerista tensidiä 1. Näyteliuokset ruiskusuodattettiin näytepulloihin.

4 PERIAATE

Tässä ajoliuoksessa Amfoteerinen tensidi ei absorboi UV-valoa, vaan näytteiden detektointiin käytetään taitekerroin detektoria RID. Kuvassa 1 on ylempänä RID signaali ja alempana VWD –signaali.



Kuva 1. RID vs UVD.

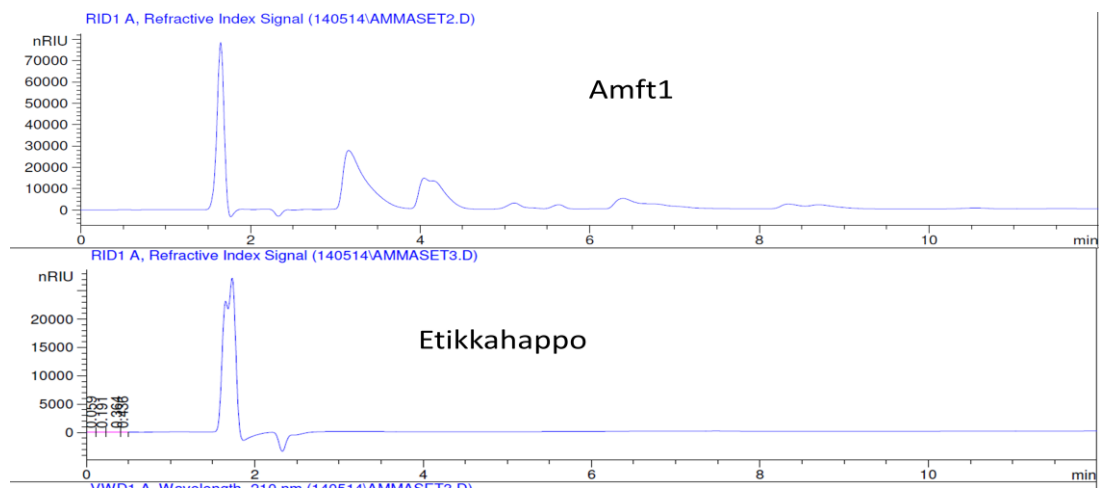
Kuvasta 1 huomataan, että RID:lla saadaan selkeästi parempi signaali kuin UVD:lla.

Ajoparametrit olivat:

pvm	14.5.2014
A:	MeOH:Ammoniumasetate (7:3), pH 4,1
B:	
Inj.vol:	20 µL
Stop time:	12 min
Flow speed:	1,0 mL/min
Max p:	200 bar
Min p:	5 bar
VWD:	210 nm
T(kolonniuuni)	25 °C
T(RID)	25 °C

5 HÄIRIÖT

Amfoteerisen tensidin apuaine, etikkahappo ei aiheuta häiriötä, kuten Kuvasta 2 voidaan todeta.



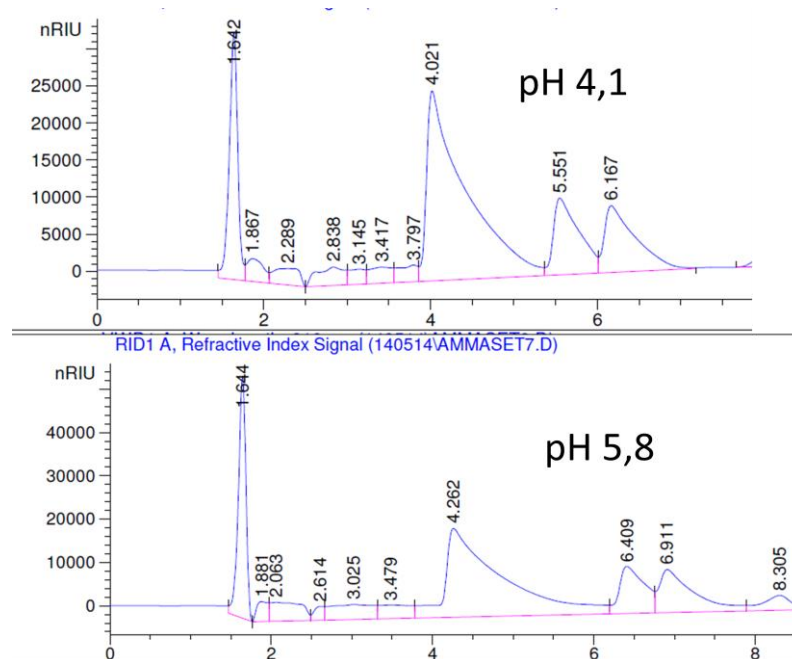
Kuva 2. Häiriötekijät.

Ajoparametrit olivat:

pvm	14.5.2014
A:	MeOH:Ammoniumasetate (7:3), pH 5,2
B:	
Inj.vol:	20 µL
Stop time:	12 min
Flow speed:	1,0 mL/min
Max p:	200 bar
Min p:	5 bar
VWD:	210 nm
T(kolonniuuni)	25 °C
T(RID)	25 °C

6 PH -VAIKUTUS

pH:lla on vaikutusta piikkien häntimisen kannalta, kuten Kuvasta 3 voidaan huomata.



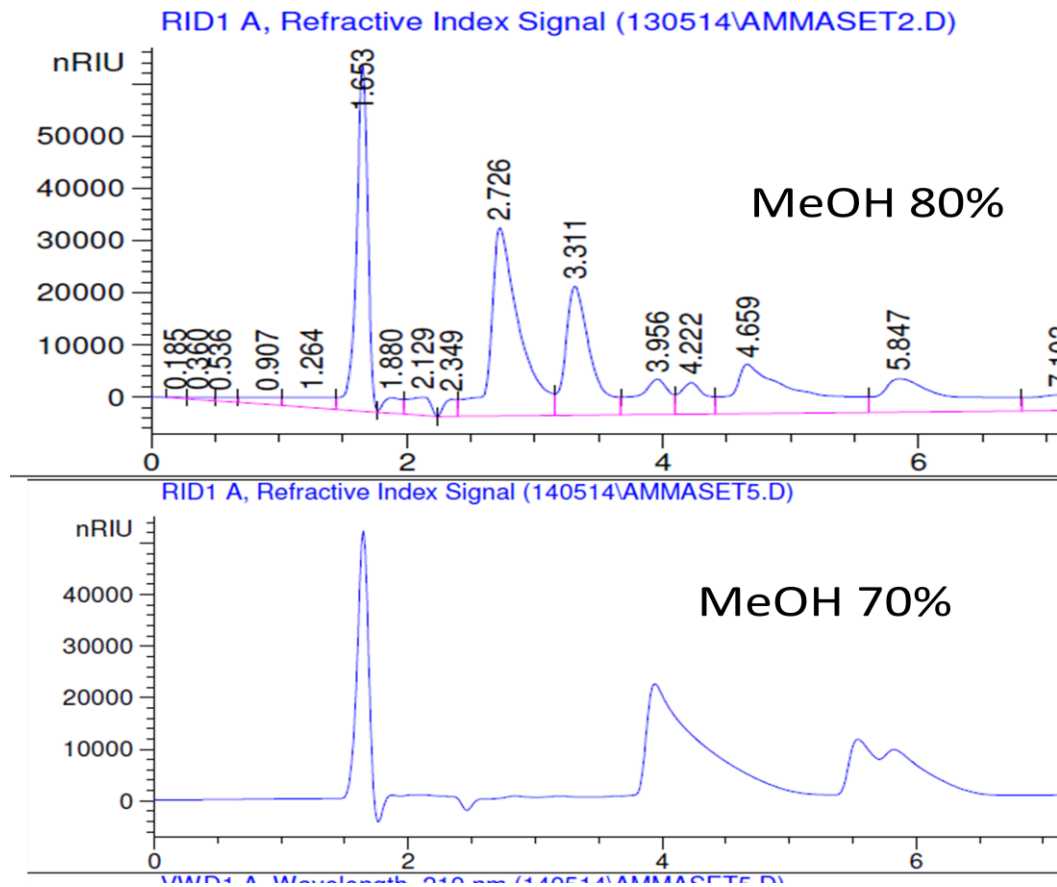
Kuva 3. pH vaikutus

Kuvasta voidaan huomata, että pH:n ollessa 4,1 piikkien häntiminen on vähäisempää.

7 METANOLIN PITOISUUS

Metanolin pitoisuuden laskeminen ei parantanut resoluutiota, vaan pelkästään

lisäsi häntimistä. Katso kuva 4.



Kuva 4. Metanolin pitoisuus

8 YHTEENVETO

Tällä menetelmällä ei ehditty testaamaan enempää. Menetelmällä voidaan päästä lyhyempään ajoaikaan kuin Tris-HCl menetelmällä. Menetelmällä voidaan saada selkeämpiä piikkejä aikaiseksi, mikäli piikkien häntiminen saadaan kuriin ja resoluutiota parannettua.