



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2022 30 stp

Kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM)

Analyse av tensider i vaskemidler og tøymykner, med HPLC-UV

Analyzes of various surfactants in detergents
with HPLC-UV

Sharanya Kanagasundram

Kjemi og bioteknologi

Forord

Dette er en masteroppgave ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU), ved kjemi, bioteknologi og matvitenskap fakultetet KBM. Oppgaven er i form av en eksternt masteroppgave i samarbeid med Orkla OHPC, med laboratoriearbeid som tok sted ved Ski og Skøyen avdelingene.

Jeg vil gi en spesiell takk til Monica Skog Ravn for å ha gitt meg muligheten og full støtte for oppgaven. Likeledes vil jeg takke Ruchi Singh ved avdeling Skøyen, for å ha fulgt opp oppgaven, og gitt enormt stor støtte under denne lange prosessen. Muligheten for å få skrevet en masteroppgave hos et konsern som Orkla har vært svært nyttig, med hensyn til min fremtidige karriere i feltet. Det har også vært lærerikt i å få være med på å montere HPLC-instrumentet, og for at dere har hatt tillit i meg og gitt fullt ansvar over instrumentet og vedlikehold av denne.

Det må gis en stor takk til min veileder Dag Ekeberg ved NMBU, for å ha fulgt opp, gitt veldig gode konstruktive tilbakemeldinger og faglige innspill på arbeidet sammen med hjelpeveileder Hanne Marie Devle. Det har vært mange utfordringer under denne oppgaven, men dere har gitt stor støtte gjennom oppgaven selv med flere faktorer som stod som hinder for fremgang av denne.

Til slutt vil jeg benytte muligheten for å takke min familie og mine godeste venner for å gi meg mental støtte, ideer og oppmuntring gjennom studietiden min på NMBU, spesielt under masteroppgaven.

Oslo, Oktober 2022

Sharanya Kanagasundram

Sammen drag

Tensider er et samlenavn for overflateaktive stoffer som i økende grad blir anvendt ved mange industriområder som mat-, farmasøytisk og den kjemiske industrien. Blant disse har tensider en stor rolle innen husholdningsprodukter som vaskemidler, tøyvask, tøymyknere, hygieneprodukter med fler (Farn, 2006). For produsenter av slike husholdningsprodukter er det viktig å vite hvilke typer tensider som benyttes i de forskjellige produktene. Dette er en utfordring på grunn av manglende informasjon fra leverandørene av tensidene (Tadros, 2014).

I denne oppgaven ble en metode utviklet og validert for bestemmelse tensidene natrium laureth sulfat (SLES), dipalmitoyletyl hydroksyetylmonium metosulfat (DHM), lauraminoksid og etoksylerede alkohol tensider som tilhører ulike tensidklasser, ved bruk av high performance liquid chromatography (HPLC) med UV-vis som detektor. Analysen var utført på en Acclaim surfactant kolonne, med stasjonærfase som består av både omvendtfase- og ionebytterkromatografi. Metoden bestod av gradient separasjon med mobilfasene metanol og 0,1M ammoniumacetat buffer ved pH 5, kjørt på 25% til 80% metanol ved ulike tider for de tilhørende tensidene. Gradienten separerte DHM-komponentene i den kationiske tensidklassen. Dette som følge av at DHM-tensidene hadde høyere UV-absorbanse ved 209 nm, i forhold til metanol som absorberte ved 205 nm. Konsentrasjon av kationiske tensidene som var tilstede i tøymykner, ble funnet til å være $1,8 \pm 0,2$ mg/mL av tensid DHM-C16, og $2,5 \pm 0,2$ mg/mL for DHM-C18. Tensidklassene anioniske, amfotære og ikke-ioniske kunne ikke kvantifiseres med metoden, fordi tensidene absorberer ved lavere bølgelengder under 205 nm.

En indirekte fotometrisk metode ble benyttet som følge av at enkelte tensidklasser ikke kunne kvantifiseres. Det anioniske tensidet SLES ble valgt for metoden, med MPI som visualiseringsreagens. Mobilfase bestod av 70% acetonitril, 30% vann og 0,25 mM MPI reagens, separert på en C18-kolonne. Metoden ytet en tilfredsstillende linearitet over et stort konsentrasjonsområde ved standardkurven for tensidstandardene, R^2 - verdi på 0,9979.

Kvantifisering av SLES tensidet i tøyvask viste en konsentrasjon på $0,570 \pm 0,008$ mg/mL. For andre tensidklasser som amfotære og ikke-ioniske tensider, bør det gjøres en vurdering på metoden som ble utprøvd i utgangspunktet, og utføre analyser på alternativ detektor som en ELSD detektor for produkter som inneholder flere tensider.

1.2 Abstract

Surfactants are increasingly used in many industrial areas such as food, pharmaceutical and chemical industries. Among these, surfactants play a major role in home and personal care products such as detergents, laundry detergents, fabric softeners, hygiene products and many more (Farn, 2006). For manufacturers of household products, it is important to know the surfactants are used in the following products. This becomes a challenge due to a lack of information from the suppliers of the surfactants (Tadros, 2014).

In this thesis a qualitative method was developed and validated for the determination of four surfactants belonging to different surfactant groups, known as sodium laureth sulfate (SLES), dipalmitoylethyl hydroxyethylmonium methosulfate (DHM), lauramine oxide and ethoxylated alcohol. By performing the analysis on a high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV-vis as detector. The method was tested on an Acclaim surfactant column, with a stationary phase consisting of both reversed-phase and ion-exchange chromatography. The method consisted of gradient separation with the mobile phase methanol and 0.1M ammonium acetate buffer at pH 5. The gradient separated one of the surfactant class of cationic surfactants DHM-C16 and DHM-C18. And could be quantified since the surfactants had higher UV absorbance at 209 nm compared to the methanol, which absorbed at 205 nm. Concentration of cationic surfactants present in fabric softener was determined to be $1,8 \pm 0,2$ mg/mL of surfactant DHM-C16, and $2,5 \pm 0,2$ mg/mL of DHM-C18. Anionic, amphoteric and non-ionic surfactant classes could not be quantified, since maximum absorbance for the surfactants were lower than of methanol cut-off absorbance value at 205 nm.

An indirect photometric method was tested as a result of the fact that certain surfactant classes could not be quantified. The anionic surfactant SLES was chosen for this method, with MPI as the visualization reagent. Mobile phase consisted of acetonitrile, water and 0.25 mM MPI reagents, and separated with a C18-column. The method provided good linearity over a large concentration range of surfactant standards, R^2 value at 0.9979. Quantification of the SLES surfactant in laundry showed a concentration of 0.570 ± 0.008 mg/mL. For other surfactant classes such as amphoteric and non-ionic surfactants, an evaluation should be made on the method that was initially tested, and to be analyzed on an alternative detector such as an ELSD detector especially for products containing several surfactants.

Forkortelser

ACN	Acetonnitril
C	Celsius
CAD	Ladet aerosoldetektor
CMC	Kritisk micelle konsentrasjon
DHM	Dipalmitoyletyl hydroksyetylmonium metosulfat
ELSD	Fordampende lysspredningsdetektor
GC	Gasskromatografi
g	Gram
HPLC	High performance liquid chromatography
IPD	Indirekte fotometrisk deteksjon
L	Liter
LC	Væskeskromatografi
LOD	Deteksjonsgrense
LOQ	Kvantifiseringsgrense
M	Molar
min	Minutter
mL	Milliliter
MPI	Metylpyridinium jodid
MS	Massespektroskopi
mV	Millivolt
nm	Nanometer
PEG	Polyetylenglykoleter
Psi	Pund per kvadrattomme
PTFE	Polytetrafluoreten
RI	Brytningsindeks detektor
SLES	Natrium laureth sulfat
SLS	Natriumlaurylsulfat
UPLC	Ultra performance liquid chromatography
UV	Ultrafiolett
UV-vis	Ultrafiolett-synlig spektroskopi
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer

Innholdsfortegnelse

<i>Forord</i>	<i>i</i>
<i>1.Sammendrag</i>	<i>ii</i>
<i>1.2 Abstract</i>	<i>iii</i>
<i>Forkortelse</i>	<i>iv</i>
<i>Innholdsfortegnelse</i>	v
2 Introduksjon	1
2.1 Bruk av tensider	1
2.1.1 Tensider i industrien	1
2.1.2 Miljøeffekter av overflatiske stoffer	2
2.2 Tensid historie	2
2.3 Kunnskapstilstand av tensider	4
2.4 Målsetning	6
3 Teori	7
3.1 Tensider	7
3.1.1 Tensiders virkning.....	7
3.1.2 Klasser av tensider	10
3.1.3 Tensider valgt for analysemetoden.....	13
3.2 Kromatografi	15
3.2.1 High Performance Liquid Chromatography	15
3.2.2 Separasjonskolonne.....	16
3.2.3 Valg av mobilfase og gradientluering.....	17
3.2.4 Underliggende prinsipp bak HPLC.....	18
3.3 Deteksjon av tensider med UV- vis	20
3.4 Brytningsindeks detektor (RI)	22
3.5 Metodevalidering	24
3.5.1 Spesifisitet	24
3.5.2 Linearitet	24
3.5.3 Måleområde.....	24
3.5.4 Presisjon.....	25
3.5.5 Nøyaktighet.....	25
3.5.6 Deteksjonsgrense, LOD	25
3.5.7 Kvantifiseringsgrense, LOQ	26
3.5.8 Robusthet	26
3.5.9 Utbytte.....	26
4 Eksperimentelt	27
4.1 Materialer, reagenser og instrumentering	27
4.1.1 Prøvemateriale	27

4.1.2	Reagenser	27
4.1.3	Standardløsninger	28
4.1.4	Materialer	28
4.1.5	Instrumentelt.....	29
4.2	Metoder	29
4.2.4	Acetonitril metode.....	34
4.2.5	RI metode.....	35
4.2.6.1	Tillaging av mobilfase for analyse med IPD	36
4.2.7	Titring	37
4.2.7.1	Anionisk titring	37
4.2.7.2	Kationisk titring.....	38
5	Resultater og diskusjon	39
5.1	HPLC-UV metode med metanol som mobilfase.....	39
5.1.1	Bestemmelse av kationiske tensider i tøymykner	39
5.1.1.1	Metodevalidering: Linearitet og presisjon	40
5.1.2	Kationiske tensider i tøymykner	40
5.1.2.1	Metodevalidering: Nøyaktighet, Utbytte og Spesifisitet.....	40
5.1.2.2	Koeluering av konserveringsmiddel.....	41
5.1.2.3	Metodevalidering: LOD- verdi, LOQ-verdi og Presisjon.....	41
5.1.2.4	Videre arbeid av metode med tøymykner.....	42
5.1.3	Bestemmelse av amfotære, anioniske og ikke-ioniske tensider i oppvaskmiddel og tøyvask.....	43
5.2	HPLC-UV metode med acetonitril som mobilfase.....	46
5.3	RID metode.....	47
5.4	Indirekte fotometrisk deteksjon	49
5.4.1	Metodevalidering: LOD- verdi, LOQ-verdi, linearitet og presisjon.....	50
5.4.2	Metodevalidering: Nøyaktighet, Utbytte, spesifisitet.....	50
5.4.3	Metodevalidering: Robusthet.....	51
5.4.4	Endringer i retensjonstid.....	52
5.4.5	Videre arbeid av IPD metode.....	52
5.5	Titringemetode for analyse av tensider	53
6	Konklusjon	55
7	Referanser	56
8	Vedlegg	58

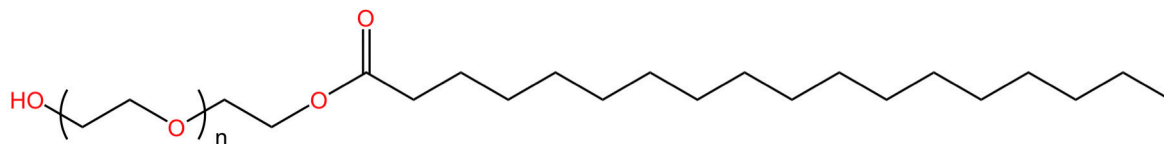
2 Introduksjon

2.1 Bruk av tensider

Overflateaktive stoffer med samlenavn tensider forekommer i mange industrielle områder alt fra husholdning, matindustri, farmasøytiske produkter med fler. Denne klassen av kjemiske komponenter har en stor rolle i et utvalg av produkter som en alminnelig husholdning benytter seg av daglig. Opp til 60% av tensider som benyttes i dag forekommer i produkter som tøyvask, vaskemidler, tøyvask, hårpleie, kosmetikk og hygieneprodukter. De resterende 40% av tensider har en stor rolle i landbruks kjemi og andre industrielle områder hvor tensidene har andre virkningsområder enn som effektene i vaskemidler (Farn, 2006). Tensider har derfor et bredt spekter av bruksområder med varierende funksjoner som medvirker i å eksempel rengjøre, fukte, skumgivende, dispergere, mykgjøre, antistatisk evner, emulgatorer med fler (Im et al., 2008).

2.1.1 Tensider i industrien

Tensider har flere bruksområder som vil virke med ulik funksjon i hver av disse. Overflateaktive stoffer som polymeriske karboksylsyrer og fettsyreester av polyetylenglykoleter (PEG) er forbindelser som i store mengder blir benyttet i jordbruk. Anvendt for tensidene evne til å gi jevn fordeling av gjødsel i jorda, samt for forbedret fukting ved rengjøring av frukt og grønt. Egenskapen til å fukte er også nødvendig i andre industri områder som stoff- og tekstilindustrien (Falbe, 1987). Tensidene medvirker ved at vann raskere fukter tøy, ved å svekke grensesnittet mellom vann og luft (Fainerman et al., 2001).



Figur 1. Fettsyreester av polyetylenglykoleter, PEG stearat

Innen farmasøytisk industri er tensider benyttet som emulgatorer for salver og kremer (Falbe, 1987). Emulgatorer er tensidforbindelser som danner stabile blandinger av forbindelser som ikke er blandbare som resultat av tensidene amfifile natur. Emulgatorer anvendes for å redusere separasjon mellom ikke-blandbare faser som gir mer homogeniserte blandinger. Et

eksempel er nødvendigheten av emulgatorer i blandinger med tilværelse av olje og vann i kremer (Egeland, 2021). Tensider i form av emulgatorer forekommer også i matindustrien for å oppnå skumhemming eller skumdanning. I bakervare kan skumdanning være essensielt for økning av volum som resulterer i porøs tekstur (Falbe, 1987).

Skumdanning er en faktor som spiller stor rolle i forbrukernes opplevelse av vaskemidler i produkter som håndsåpe, sjampo, håndoppvaskmiddel med fler. Mange tensider gir dannelse av skum gjennom absorbering av luft ved grensesnitt til væske som leder til danning av små luftbobler omsluttet av en tynn hinne med væske (Porter, 1991). En oppfatning mange forbrukere muligens kan ha er at skumdanning tilsvarer optimal rengjørings effekt i vaskemidler der skumdanning ikke alltid vil tilsvare oppvaskmidelets evne til å gjøre gjenstander rent (Johansson et al., 2007). Til sammenligning danner tøyvask minimalt med skum, men tilsvarer ikke svekket rengjøring. Denne persepsjonen om skumdannelse i vaskemidler kan øke forbruk av produkt ved sansing av lite skum (Johansson et al., 2007).

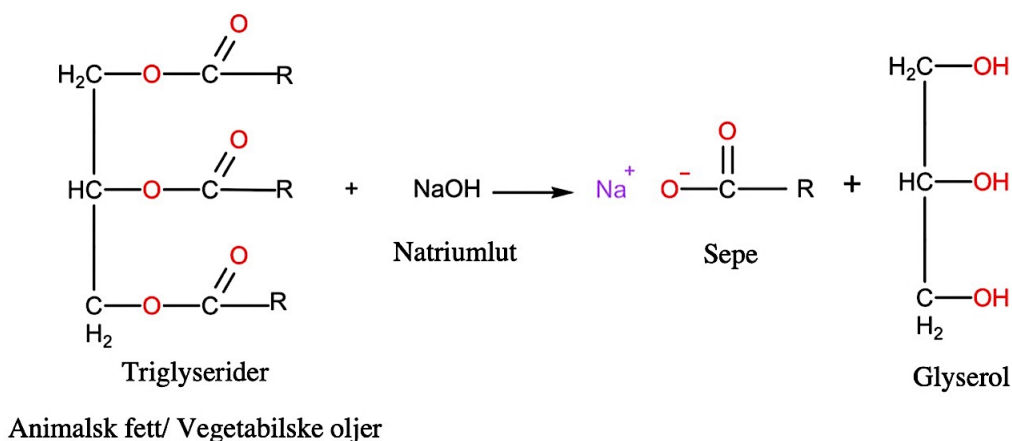
2.1.2 Miljøeffekter av overflatiske stoffer

Store mengder tensider benyttes daglig av forbrukere. For ca. 20 år siden i vest Europa ble det benyttet over 1,2 millioner tonn av tøyvask og over 4,2 millioner tonn av vaskemidler i året (Ivankovic et al., 2010). Data hentet fra år 202 var Kina blant de største forbrukerne såpe og vaskemidler med et tall på 20 millioner tonn, USA med 10 millioner tonn, fulgt av India med 7.6 millioner tonn (IndexBox AI Platform, 2021). Forbruket øker stadig med tiden og leder til uønskede miljøpåvirkninger. Tensider vil etter anvendelse slippes ut i avløpsvann, som videre akkumuleres i jord, vann og sedimenter. Med store mengder av tensider i miljøet påvirker forbindelsene økosystemet i stor grad. Større mengder tensider vil i stor grad påvirke miljøet og økosystemet. Grunnet mange av tensidene som anvendes i ulike produkter er lite biologisk nedbrytbare (Ivankovic et al., 2010). Med forbedret tensidteknologi er det økt preferanse for produktutviklere i å benytte mer biologisk nedbrytbare og biologisk kompatible tensider i formuleringer (Rhein et al., 2007).

2.2 Tensid historie

Det første beviset på tensidliknende substans kjent som sepe dateres tilbake til år 2800 fvt. i Babylon. Sepe var en formulering som inneholdt kassiolje, vann og alkali. Sepe er en

gammel og enkel tensidvariant som likner dagens anioniske tensider. Første oppriktige omtalen av sepe benyttet som rensemiddel var ved år 200 evt. nevnt i Galen manuskriptet, rapportert av en gresk lege som opplyste om tilberedning av sepe fra fett, askelut og kalk (Joshi, 2017). Sepe var fremkalt med aske fra trær og planter som inneholdt kaliumkarbonat. Det ble tillaget fra en blanding av aske, fett og vann. Blandingen ble satt på varme, og ettersom fordamping av vann tilsettes det mer aske. En kjemisk spaltning vil ta sted under prosessen kjent som forsåpning. Spalting leder til dannelse av fettsyrer som reagerer med alkalikarbonatene fra aske og danner sepe, illustrert ved figur 2 (Davidsohn, 2021).

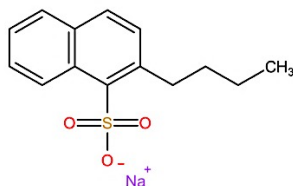


Figur 2. Viser til den tradisjonelle forsåpningsreaksjon av fett eller oljer i reaksjon med lut. Gir dannelse av glyserol og alkalialter av lange fettsyrekjeder kalt sepe

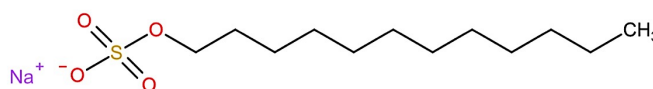
Med utviklende teknologi over tid har sepe formulering hatt sine endringer. Fra å benytte animalsk fett til vegetabiliske oljer, og fra å ha form av hard til flytende sepe. Frem til 1900-tallet holdt såpeproduksjonen seg statisk med små endringer på formuleringer. Etter 1900-tallet som følge av verdenskrigene, ledet det til mangel på animalsk fett og vegetabiliske oljer. Av den grunn ble andre alternative råstoffer benyttet og syntetisert til å gi liknende egenskaper. Dette var begynnelsen på tensidkjemien kjent i dag (Joshi, 2017).

Blant de første syntetiske tensidene forekommer kortkjedet alkyl naftalensulfonater. Fremstilt av propyl- eller butylalkoholer med naftalen som undergår sulfonering. Denne tidlige formen for tensid er fortsatt benyttet i vaskemidler som gode fuktemidler. Senere ved 1930-tallet begynte flere å søke etter syntetiske alternativer for såper. Ledet til i syntese av langkjedede sulfonerte alkoholer og langkjedede alkyl aryl sulfonater, forbindelser som ligner mer på moderne tensidmolekyler. Tensidene ble benyttet i en rekke produktkategorier som renseprodukter, vaskemidler og personlig pleie produkter. Etterhvert ble tensidene som i

utgangspunktet ble syntetisert som en midlertidig substitusjon for sepe, blitt mer ettertraktet og etablerte et nytt marked for tensidene. Grunnet til at tensidene blant annet var mer løselige, lite sensitive til hardt vann, fleksible i formuleringer og mer effektive. (Davidsohn, 2021).



Figur 3. Natrium 2-butyl-1-naftalensulfonat, fremstilt av butylalkohol og naftalen som undergår sulfonering



Figur 4. Natriumlaurylsulfat, en langkjedet tensidvariant benyttet som en alternativ for såpe

2.3 Kunnskapstilstand av tensider

For produsenter av produkter med tensider, er det lite kjennskap til tensidkomponentene benyttet i produktene. Følge av at tensider selges til produktutviklere som blandinger av tensider med liknende egenskaper og ikke som enkle forbindelser. Kilden til informasjon av de ulike tensidblandingene kommer fra leverandører som produserer de ulike overflateaktive stoffene (Tadros, 2014). I de fleste tilfellene er det mer informasjon om bruk og sikkerhet tensidblanding, og mindre informasjon om sammensettingen av tensidblanding. Kunnskapen om tensid-sammensettinger i produkter blir mer viktig ettersom standardene for de ulike råstoffene i produktene øker (Tadros, 2014).

Det finnes en rekke analytiske metoder for å kvalitativt og kvantitativ bestemmelse av tensider. Den analytiske metoden bestemmes ut i fra hvilken informasjon det etterspørres om tensidene. Dette kan variere ettersom det er etterspørsel etter analyse av mengde tensid fra ulike tensidklasser, utføre analyser av spesifikke tensidkomponent i en blanding, eller for å bestemme hvilke tensider som er tilstede i en blanding.

Den enkleste formen for bestemmelse av tensider er en enkel påvisningsmetode med kloroform-vann løsemiddel og tensid som indikator. Denne kvalitative analysemetoden kan gjenkjenne dominerende klasse av tensider i en blanding, og egner seg ikke for bestemmelse

av flere tensidklasser med lik konsentrasjon. Metoden er dermed ikke den mest ideelle metoden i praksis for analyser av flere tensidklasser, som følge av metodens begrensinger (Cullum, 1994).

Kvantitativ bestemmelse med volumetrisk titrering er blant de mest benyttede metodene for tensidanalyser. Analysen utføres som en syre-base titrering ved å utnytte ladningene på de ulike tensidene. Under titrering vil anionisk overflateaktivmiddel titrere kationisk overflateaktivmiddel, og omvendt basert på analysematerialet. Med bedret kunnskap innen titreringsteknologi har metoden for å utføre titreringer blitt mer brukervennlig ved hjelp av automatiserte titreringsmetoder. Automatiserte titreringsmetoder er optimale med hensyn til tid, produktivitet, nøyaktighet og presisjon. Til tross for at titreringsmetoden er en mer lettvent metode for å bestemme mengde anion og kationiske tensider, er ikke metoden like optimal for andre tensider som ikke-ioniske. Ikke-ioniske tensider har mer komplisert og tidskrevende prepareringsmetode sammenlignet med andre tensidklasser (Cullum, 1994).

Til grunn for at tensidene ofte blir solgt i form av tensidblandinger av flere tensider, er det økt etterspørsel fra produktutviklere i å forstå hvilke komponenter som inngår i produktene. Titreringsmetoder er ikke egnet for identifisering av forbindelser, følgelig av metoden bestemmer total konsentrasjonen av de ulike tensidklassene. For ikke-aromatiske tensider er dette mer krevende. Følgende av mange alkylhomologer, termisk ustabilitet, høy polaritet og mangel på kromoforer (Im et al., 2008).

Kromatografiske metoder er mer egnet for å analysere tensidblandinger, med varierte strukturer og egenskaper. Dette gjelder teknikker som ionekromatografi (IC), væskrokromatografi (LC), og gasskromatografi (GC) (Im et al., 2008). Analyse av tensider rapportert av Dufour *et al.*, siterer at LC er den mest egnete kromatografiske metoden for separasjon av ulike amfifile molekyler. Væskrokromatografi mer spesifikt high performance liquid chromatography (HPLC) eller ultra performance liquid chromatography (UPLC), er kromatografiske teknikker benyttet innad store deler av kommersiell industri (Traverso-Soto et al., 2012).

Rapporten av Dufour *et al.*, siterer at GC blant alle teknikker er den den minst egnete metoden for analyse av ioniske tensider som følge av at GC krever flyktige forbindelser (Dufour et al., 2020). Dette kan unngås med LC metoder ettersom at den er egnet for å bestemme ikke-

flyktige forbindelser med ulik molekylvekt, og derivatisering av slike vil være unødvendig. Metoden kan også kombineres med en rekke detektorer som ultrafiolett-synlig spektroskopi detektor (UV-vis), fordampende lysspredningsdetektor (ELSD), ladet aerosoldetektor (CAD) eller et massespektrometer (MS) (Traverso-Soto et al., 2012).

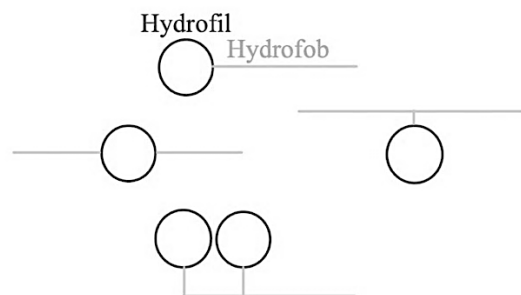
2.4 Målsetning

Hensikten for oppgaven var å etablere og validere en analysemetode, for å kvantitativt og kvalitativt identifisere tensider i vaskemidler og tøymykner, med enkel prøveopparbeidelse. Analysen ble utført gjennom kromatografisk separasjon av de ulike tensidklassene med HPLC-UV med bruk av tensid spesifikk separasjonskolonne. Kromatografiske metoden skulle sammenlignes med en etablert titeringsmetode, med målinger av anioniske og kationiske tensider. Sammenligning ble foretatt for å avklare om hvilken metode som var betydeligst effektiv i bestemmelsen av tensider i ulike kommersielle produkter gjengitt som produkt 1, 2, og 3. Oppgaven skulle utføres på en ubrukt HPLC-UV, som skulle gi innsikt i hvordan et HPLC-instrument blir installert, opprettholde rutiner for instrumentet, og bli kjent med programvaren LabSolutions.

3 Teori

3.1 Tensider

Tensider er et samle navn for overflateaktive stoffer. Strukturen til tensider består av et eller flere hydrofilisk(e) del(er) og et eller flere hydrofobisk(e) del(er), vist ved figur 5. Tensider er ofte benyttet i løsemidler som vann. De har en hydrofob hale som virker vannavstøtende, og et hydrofilt hode som virker vanntiltrekkende. Den hydrofile delen av et tensid kan bestå av et anion, kation, zwitterion, eller uten ladning med sterkt polare grupper (Farn, 2006). Den hydrofile terminalenden av tensidet bestemmer tensidklassen forbindelsen tilhører. Den hydrofobe delen av et tensid består av en lang lineær hydrokarbonkjede med ulike funksjonelle grupper, forgreninger, mettet eller umettet med dobbelt/trippelbindinger (Farn, 2006).



Figur 5. Generell struktur av tensider. Noen eksempler av en rekke mulige tensid strukturer. Tensider har et hydrofilt hode og en hydrofob hale. (Piorr, 1987)

3.1.1 Tensiders virkning

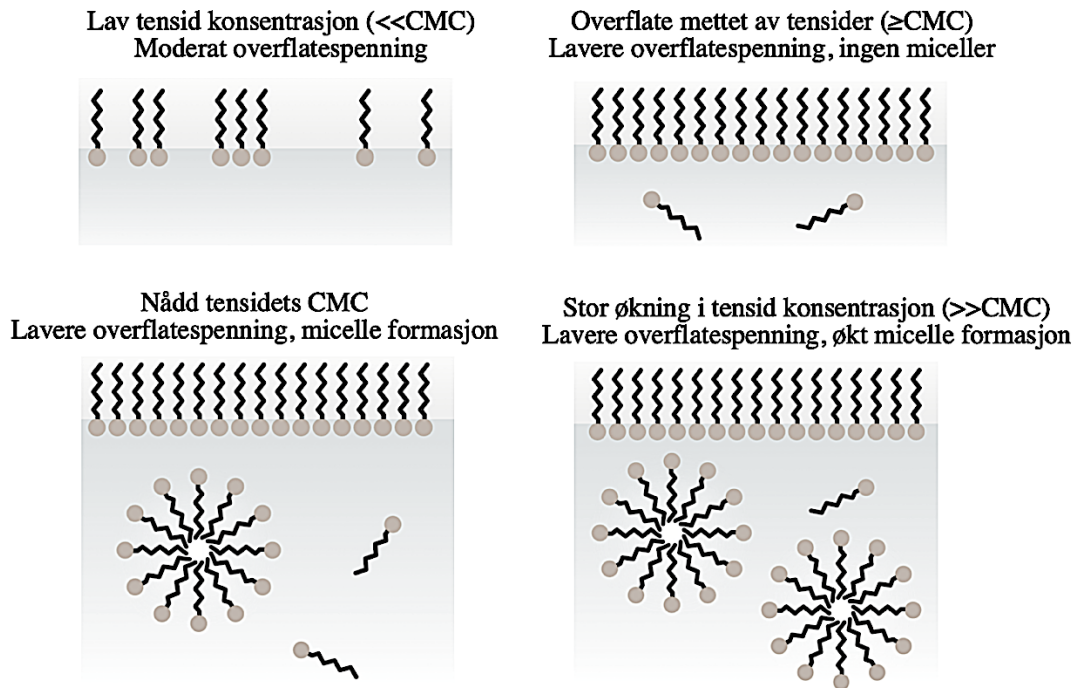
Tensidenes hovedoppgave er å utføre overflateaktivitet gjennom å redusere overflate- og grensesnittspenning. Overflaten er grensen mellom ulike ikke-blandbare faser. Det kan være grensen mellom væske-væske, gass-væske eller væske-fast stoff. Et kjent eksempel på overflatespenning er mellom vann og luft, og grensesnittspenningen mellom olje og vann (Farn, 2006).

Overflatespenning (γ), oppstår ved væskeoverflater. I væske vil det være tilstede intermolekylære krefter mellom molekylene. Denne vil være like stor mellom og rundt molekylar internt i væsken. Kraften er også kjent som kohesjon som oppstår mellom identiske

molekyler. Unntaket er for molekylene som befinner seg på overflaten av væsken i kontakt med gass, hvor de intermolekylære kreftene vil trekke molekylene sidelengs og innover væsken. Dette leder til at molekylene øverst vil være tettere pakket, og utgjør en hinne som kan brytes opp med en spesifikk mengde energi kjent som overflateenergi (Hofstad,2019). Grensesnittspenning (γ) er en effekt likt overflatespenning, men oppstår mellom to ikke-blandbare faser. Mellom de ulike fasene oppstår interaksjoner i form av adhesjon ved at fasene kommer i kontakt gjennom elektrostatiske og mekaniske krefter (Laurén, 2018).

Effektene nevnt ovenfor ligger i bakgrunn for tensidenes virkning. Tensider i kontakt med vann danner et lag på topp i form av tensidmonomerer ved grensen mellom vann og luft. Det hydrofile hodet av tensidet vil binde til vann, og den hydrofobe halen vil støte vekk fra vann opp mot luft. Denne oppstillingen av tensidene leder til minking av overflatespenningen mellom vann og luft (Ahmed, 2020). Gjennom økning av mengde tensider dannes lukkede aggregater kalt miceller. Aggregatene har en tredimensjonal form laget av tensider med hydrofob hale pekende innover vekk fra vann, og hydrofilt hode pekende utover mot vann. Den minste konsentrasjonen for å danne miceller og indikasjonen på at vannoverflaten er mettet av tensider, er kjent som kritisk micelle konsentrasjon (CMC) (Ahmed, 2020).

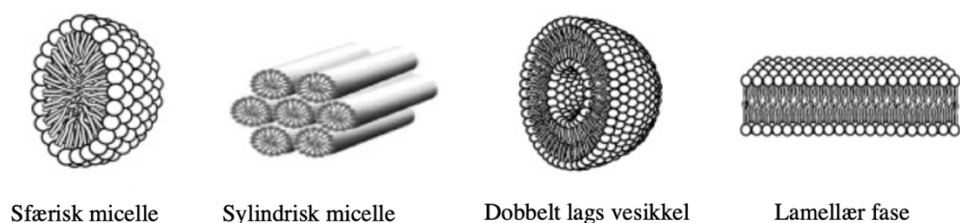
Kritisk micelle konsentrasjon varierer ved ulike tensidtyper. Kritisk micelle konsentrasjonsverdi av tensider bestemmer endringer i overflate- eller grensesnittspenning. Micelledannelse er illustrert ved figur 6. Miceller påvirker grensesnittspenning hvor to ikke-blandbare faser er tilstede. Micelleaggregater løser opp olje eller voks på ulike overflater som vann alene ikke kan utføre. Ved økning av tensidkonsentrasjon over CMC vil tensidmonomerene øverst på fasen ha konstant konsentrasjon, overflatespenningen vil holde seg konstant med liten endring og samtidig som at micellekonsentrasjonen i løsningen øker. Micellene kan også ha invers form ved at hydrofob hale stikker ut og hydrofilt hode pakkes inn, dersom løsemiddelet er upolar (Farn, 2006).



Figur 6. Illustrasjon av økende tensid konsentrasjon som påvirker overflatespenningen. Danner også miceller som kan påvirke grensesnittspenningen (Ahmed, 2020). Figuren viser at ved økning av tensid konsentrasjon holdes konsentrasjonen av tensidmonomerlaget på topp konstant, men får økning av antall miceller.

Miceller kan ha flere tredimensjonale former. Formen på de ulike micellene er basert på geometrien av de spesifikke tensidene. Det ønskes at tensidmolekylene pakkes tett sammen. Hvor godt tensidene blir pakket baserer seg på flere faktorer som ladningen av det hydrofile hodet, eller arealet til den hydrofobe halen som leder til ulike micelleformer (Farn, 2006).

Sfæriske miceller er små aggregater som dannes ved tilstedeværelsen av enkeltkjedet hydrofob del og stort hydrofilt hode. Med små hydrofilt terminal for eksempel ikke-ioniske og enkeltkjedet hydrofob del, danner miceller mer sylindrerformet struktur. Micelleformene kan også forekomme i form av vesikler, liposomer, og fleksible dobbeltlag som formes av dobbeltkjededede eller forgrenede hydrofobe haler og et stort hydrofilt hode. Tensider med stor hydrofil gruppe, eller store hydrofobe haler kan ikke pakkes tett på grunn av molekylstrukturen, grunnet dette danner følgende tensider lamellær struktur kjent som dobbelt lag struktur (Farn, 2006).



Figur 7. Illustrasjon over noen micelleformer, dannet av enkelte tensider som har nådd forventet CMC-verdi. Eksemplene ovenfor viser miceller dannet med vann som løsemiddel (Wang et al., 2019)

3.1.2 Klasser av tensider

Tensider klassifiseres i to hovedgrupper etter kjemien av den hydrofile terminalen av tensidet. Ioniske og ikke-ioniske tensider er hovedgruppene og kan deles videre inn i 4 klasser. Anioniske, kationiske, amfotære og ikke-ioniske tensider er de såkalte tensidklassene. Klassene beskriver kjemien av den hydrofile terminalenden av tensidet, de anioniske har negativt ladet, kationiske har positivt ladet, amfotære kjent som zwitterioniske har både positiv og negativ ladet terminal ende, og ikke-ioniske tensider er alle tensider som har en nøytral terminal ende (Ahmed, 2020).

3.1.2.1 Anioniske tensider

Anioniske tensider finnes i en rekke med vaskemidler på markedet, grunnet tensidets lave produksjonskostnader og lettvinthet (Porter, 1991). Anioniske tensider kan effektivt fjerne overflater med skitt, leire og enkelte oljeflekker. Rensing inntreffer når de anioniske tensidene ioniserer i vann og danner negativ ladning. Denne ladningen binder seg til de positive ladningene som befinner seg på leire, og løser opp leiren fra overflaten (Johansson et al., 2007). I mange land hvor vann er hardere følger av tilstedeværelsen av kalsium og magnesium, kan anioniske tensider bli sensitivisert av vannet. I slike tilfeller kan tensidene binde seg til metallionene og danne utfelling. For å unngå utfelling tilsettes kompleksdanner for å danne komplekser med metallionene i hardt vann slik at produktene kan virke optimalt (Schmitt, 2001).

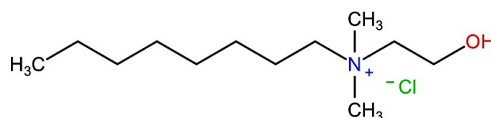
Anioniske tensider har en lang varierende hydrofob hale med ulike kjemiske grupper for det hydrofile hodet. De vanligste hydrofile gruppene som kommersielt er tilgjengelige på markedet er følgende:

Karboksylyater	$C_nH_{2n+1}COO^-X^+$
Sulfater	$C_nH_{2n+1}OSO_3^-X^+$
Sulfonater	$C_nH_{2n+1}SO_3^-X^+$
Fosfater	$C_nH_{2n+1}OPO(OH)O^-X^+$

12-16 karbon atomer er vanlig for den lineære alkylgruppen som former den hydrofobe halen, for optimal virkning av tensid. Lineære hydrofobe kjeder er foretrukket for økt effektivitet og gir mer nedbrytbart tensid (Tadros, 2014).

3.1.2.2 Kationiske tensider

Kationiske tensider er tensider med en positivt ladet gruppe på den hydrofile delen av tensidet. Positivt ladet nitrogen atom forekommer ved mange kationiske tensider benyttet i industrien. Eksempler på tensidene er alkyl kvaternære ammoniumsalter, benzyl alkyl dimetyl ammoniumsalter, amidoamin kvartær, «esterquats» og med fler. Kationiske tensider skiller seg fra andre tensidklasser, grunnet tensidets høye virkningsgrad. Tensidene kan binde til en rekke typer negative overflater (ull, fiber, papir osv.). I tillegg til at de kan modifisere overflateegenskaper ved å gjøre hydrofileoverflater til hydrofobe og omvendt (Mishra et al., 2007).



Figur 8. Eksempel på et alkyl kvaternærssystem med alkylgruppe bundet til nitrogen

Ulempen med kationiske tensider er at de er lite egnet til vask, grunnet til at de ikke er effektive ved nøytral pH, gir dårlig suspensjonskraft som følge av lange karbonkjeder, og høye produksjonskostnader. Kationiske tensider er nyttige i produkter som tøymyknere med antistatiske egenskaper. Tensidene absorberes på tekstiloverflater med de hydrofobiske gruppene av molekylet pekende oppover, og leder til minking av friksjon mellom tekstiloverflatene som gir myknende effekt på tøy (Mishra et al., 2007).

Tensidklassen kan også finnes igjen i en rekke desinfeksjonsmidler, følgelig av tensidets antimikrobielle egenskaper. Tensidene som benyttes for antibakterielle egenskaper er ulik kationiske tensider som har antistatiske og kondisjonerende egenskaper. Mekanismen tar sted

i form av kationiske tensider med positiv ladning har høy affinitet til negative ladninger ved grensesnittet til mikrober. Affinitet mellom tensidet og mikrober leder til en kjedereaksjon av cellevegg gjennomtrengning, reaksjon med cytoplasmisk membran, utløsning av intracellulære materialer, degradering av proteiner og nukleinsyrer, som resulterer i celledød (Falk, 2019). Kvaternære ammonium komponenter har høyest antimikrobiell effekt i sammenligning til mange andre kationiske tensider. Dette innebærer at ikke alle kationiske tensider har høy antibakteriell effekt, grunnet strukturelle variasjoner i tensidet og mikrobenes respons til tensidene (Falk, 2019).

3.1.2.3 Amfotære tensider

Amfotære tensider forekommer både som anioner og kationer, avhengig av pH verdien i systemet. Ved lave pH verdier (<3) vil molekylet ha positiv ladning og danne kationisk terminal, og ved økende pH (>6) vil molekylet danne negativ ladning og danne anionisk terminal. Ved nøytral pH vil molekylet nå det isoelektriske punktet av tensidet (Tadros, 2014). Amfotære tensider er ikke benyttet i like stor skala som andre tensider, grunnet store produksjonskostnader. Tensidene anvendes betydeligst i produkter for personlig pleie som følge av dens mindre irriterende natur på hudoverflater (Schmitt, 2001). Tensidklassen finnes igjen i produkter som dusjsåper, håndvask, hånd oppvaskmidler, sjampo og med fler. De vanligste formene for amfotære tensider er N-alkyl betainer, N-alkyl aminosyrer og aminoksider. Amfotære tensider er i tillegg kompatible med andre tensidklasser ved at de danner blandende miceller, som kan forsterke løseligheten av tensidene. Et eksempel er i lag med anioniske tensider hvor amfotære tensider virker som skumforsterkere (Tadros, 2014).

3.1.2.4 Ikke-ioniske tensider

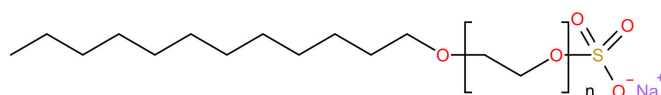
Alkohol etoksylater, alkylfenol etoksylater, fettsyre etoksylater og glyserolestere er typiske ikke-ioniske tensider. Denne type tensider består av en hydrofil terminal uten ladning. Den hydrofile terminal enden er ofte i form alkoholer (R-OH), ester (R-O-R'), eller andre grupper som oksider (Porter, 1991). Ikke-ioniske tensider er mer foretrukket enn andre tensider lik de anioniske, grunnet toleranse til hardt vann og av de lave CMC verdiene for tensidene. Dette resulterer i at tensidet er mer effektivt ved små konsentrasjoner av micelle aggregatene. Tensidet har liknende effekt som anioniske tensider hvor de ikke-ioniske er mer effektive på å

fjerne olje smuss i syntetisk tekstil. Av den grunn kan ikke-ioniske tensider finnes igjen i en rekke tøyvask produkter ofte i lag med anioniske tensider for økt effekt (Schmitt, 2001).

Anioniske tensider benyttes ofte i kombinasjon med ikke-ioniske tensider. Mange ikke-ioniske tensider har stor grad et lite polart hydrofilt hode. Følgende vil de være betydelig mindre løselig i løsemidler som vann. Anioniske tensider vil ved slike tilfeller virke som hydrotroper ved å solubilisere mindre løselige komponenter. Konsentrasjonen av anioner vil være tilstrekkelig lite at anioniske micelledanning kan unngås (Al-Sabagh, 2011).

3.1.3 Tensider valgt for analysemetoden

For analysene ved denne oppgaven ble fire tensider valgt ut fra hver tensidklasse. For kvantitativ bestemmelse av anioniske tensider var tensidet natrium laureth sulfat (SLES) valgt (komposisjon: Alkoholer, C12-14, etoksylert, sulfatert, natriumsalt).

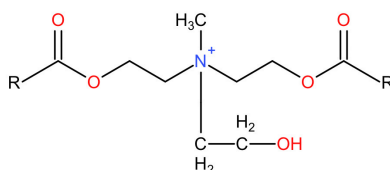


Figur 9. Natrium laureth sulfat (anionisk tensid)

Natrium laureth sulfat fremstilles ved tilsetning av fire oksyetylengrupper til et alkohol bundet til ulike karbonkjedelengder varierende fra C12-14, komponenten blir sulfatert for å øke løseligheten av tensidet i vann og skumdannelse. Sulfatering påfører tensidet negativ ladning, karakteristisk for anioniske tensider. Denne type tensid er ikke like sensitiv til hardt vann som andre liknende anioniske tensider. Derfor er tensidet SLES mer foretrukket ovenfor andre tensider. Natrium laureth sulfat forekommer i en rekke produkter som sjampo, tøyvask, flytende og pulverisert vaskemiddel (Schmitt, 2001).

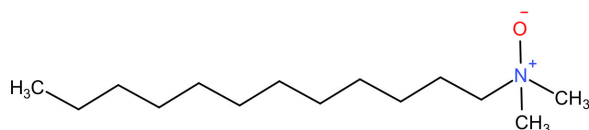
Dipalmitoyletyl hydroksyetylmonium metosulfat (DHM) (komposisjon: Fettsyrer C16-18 (partall) og C18 umettede reaksjonsprodukter med trietanolamin dimetylsulfat kvaternært) var det kationiske tensidet benyttet i analyse metoden. Dipalmitoyletyl hydroksyetylmonium metosulfat, faller innen gruppen ester kvaternære ammonium komponenter av kationiske tensider kjent som «esterquats». Denne type tensidgruppe av kationer har en kvaternær ammoniumgruppe bundet til to fettsyrekjeder som kan variere i størrelse fra C16 til C18. Fettsyrekjedene har en estergruppe hver som forebedrer prosessen for biologisk nedbrytning.

Av den grunn er DHM et mer foretrukket tensid ovenfor andre og blir benyttet i produkter som tøymyknere (Mishra et al., 2007).



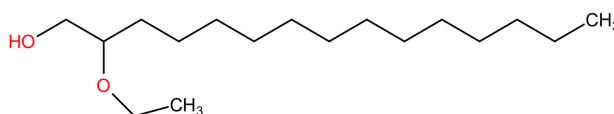
Figur 10. Dipalmitoyletyl hydroksyetylmonium metosulfat (Kationisk tensid)

Det amfotære tensidet anvendt i analysen er tensidet lauraminoksid (komposisjon: Aminer, C12-14 (partall)-alkyldimetyl, N-oksider). Lauraminoksid har et aminoksid gruppe fremstilt fra alkyldimetylaminer og hydrogenperoksid. Det amfotære tensidet benyttes i lag med anioniske tensider for å gi økt overflateaktivitet, virker som skum-stabilisator og som en forsterker for en rekke anioniske tensider. Tøyvask, flytende vaskemiddel og sjampo er en liste av produkter som inneholder aminoksid tensider. Karakteristisk for produktene er evnen til å danne overdreven mengde skum ledet av at aminoksid tensider virker i lag med anioniske tensider (Friedli, 2001). I nøytrale systemer vil aminoksider vise ikke-ioniske egenskaper (Porter, 1991).



Figur 11. Lauraminoksid (amfotær tensid)

Ikke-ioniske tensider med komposisjon: (Alkoholer, C13-15, forgrenet og lineær, etoksylert) var benyttet i oppgaven. Etoksylerte alkoholer er en stor gruppe tensider innen den ikke-ioniske klassen av tensider. Fremstilles ved tilsetning av etylenoksid til forgrenede/lineære alkoholer med kalilut som katalysator, en prosess som foregår uten løsemiddel. Etoksylerte alkohol tensider forekommer i produkter som tøyvask, ofte i lag med anioniske tensider (Schmitt, 2001).



Figur 12. 2-etoksyntadekan-1-ol (Ikke-ionisk tensid)

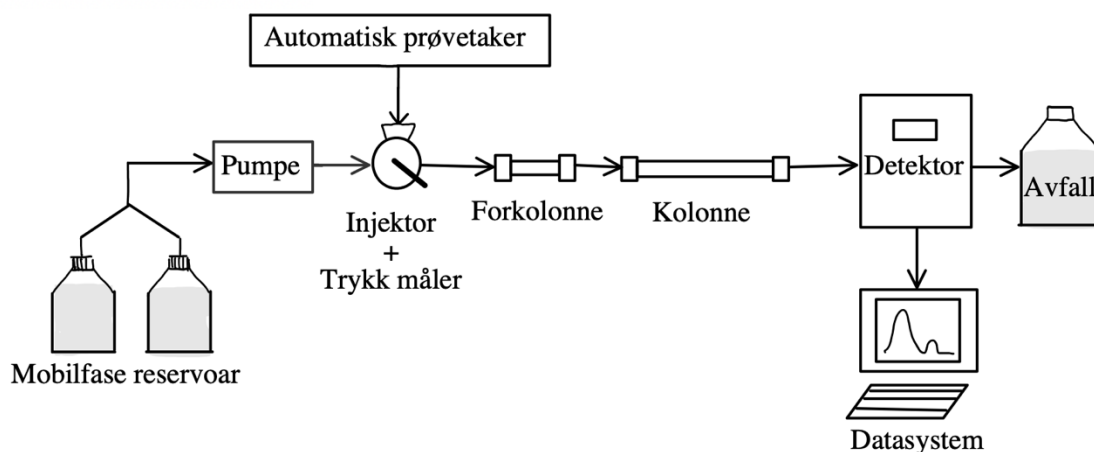
3.2 Kromatografi

Kromatografiske metoder blir benyttet for separasjon av komponenter i en blanding. Separasjon baserer seg på komponentenes affinitets forskjeller til ulike faser kjent som stasjonær og mobilfase (Skoog et al., 2014). Denne separasjonsmetoden har siden 1930 vært en veletablert laboratorisk metode, først oppdaget og videreutviklet av den russiske botanikeren M.S.Tswett. Metoden til dags dato er benyttet innenfor et bredt område av industrielle sektorer som farmasøytisk-, mat-, kjemisk industri, rettsmedisin og med fler (Poole, 2003).

3.2.1 High Performance Liquid Chromatography

Blant de mest anvendte metodene innen kromatografi, er LC-metoden benyttet i stor grad for en rekke analyser. Væskekromatografi er en kromatografisk metode basert på separasjon av komponenter løst i løsemiddel med mobilfase bestående av reagenser i væskeform. Med tid har separasjonsmetoden blitt videreutviklet med bedret separasjonsevner, kvalitative evner og kvantifiseringsevner av analytter som løses opp i løsemiddel. Eksempler på LC metoder benyttet ved mange industrielle områder til dags dato er HPLC og UPLC (Miller, 2009)

Oppsett av HPLC er skjematisk presentert ved figur 13. Et HPLC-instrument består av et mobilfasereservoar, høytrykkspumpe som hjelper med konstant flyt av mobilfase gjennom systemet, en injeksjonsautomat som tar imot prøve fra en automatisk prøvetaker, en forkolonne med filtreringsegenskaper som beskytter kolonnen fra kontaminering og store partikler, en kolonne som står for separasjon av analytt ved hjelp av stasjonærfase. Etersom prøvene eluderer ved separasjon vil komponentene detekteres av en detektor før analytt og mobilfase pumpes ut i avfall. De detekterte absorbanse verdiene av de ulike komponentene vil konverteres gjennom et signal til et datasystem og gir tolkbart kromatogram (Wibetoe et al., 2021).



Figur 13. Skjematisk illustrasjon av HPLC med detektor, hvor resultatene lest av detektoren presenteres i et datasystem.

3.2.2 Separasjonskolonne

Prøver som injiseres i injektoren er en blanding av ulike komponenter som kan analyseres kvantitativt eller kvalitativt. For å utføre følgende analyser må prøven transporteres gjennom en kolonne hvor komponentene separeres etter deres affinitet til mobilfasen og stasjonærfasen. Hvor stor affinitet de ulike komponentene har til stasjonærfasen og mobilfasen kommer av type kjemisk binding de spesifikke komponentene har til de ulike fasene, beskrevet av prosessene adsorpsjon og absorpsjon (Miller, 2009).

Separasjonskolonner for kromatografiske analyser velges utfra hvilke forbindelser som skal analyseres. For tensidanalyser er Acclaim Surfactant Plus fra Thermofisher den mest kompatible kolonnen (Dionex, 2009).. Kolonnen kan bestemme ulike type tensider av anioniske, kationiske, ikke-ioniske og amfotære tensider. Kolonnen er silika-basert med ulike funksjonelle grupper, som gir en blanding av separasjonsmekanismene omvendt fase kromatografi og ionebytterkromatografi (Dionex, 2009).

Omvendt fase kromatografi er blant de mest valgte kromatografiske mekanismene. Denne går ut på at kolonnen er laget av en upolar stasjonærfase benyttet av en mer polar mobilfase. Går ut på at upolare komponenter har større affinitet til upolar stasjonærfase og vil binde seg til kolonnen. De mer polare komponentene i prøvematerialet vil binde seg til den polare mobilfasen (Miller, 2009) Ettersom mobilfase matrisen endrer seg over tid vil interaksjoner mellom upolare forbindelser og stasjonærfase oppløses. Ved tensidanalyser med Acclaim Surfactant Plus kolonner vil den hydrofobiske retensjonen virke i stor grad på ikke-ioniske og

amfotære tensider. Omvendt fase kromatografi har i tillegg virkning på anioniske og kationiske tensider, men ikke i like stor grad som ionebytterkromatografi har for ioniske tensider. (Thermofisher, 2012).

For anioniske og kationiske tensidanalyser benyttes ionebytterkromatografi mekanismen som befinner seg i det samme kolonnematerialet. Denne kromatografiske metoden baserer seg på elektrostatiske interaksjoner mellom ladete komponenter og motsatt ladet stasjonærfase (Coskun, 2016). Acclaim Surfactant Plus kolonnen benytter denne metoden ved å påføre elektrostatiske frastøtninger til kationiske tensider, og påføre retensjon av anioner for alle anioniske tensider (Thermofisher, 2012). Anionbytte retensjon, er en metode hvor kationer i mobilfasen løser opp ionebinding mellom de anioniske tensidene og stasjonærfasen. Retensjonstid for tensidene med ulik hydrofilgruppe, kan bli endret ved å utføre justeringer av mobilfase matrisen. Oppnås ved endring av pH eller ionestyrken til mobilfasen (Coskun, 2016).

Kombinasjonen av mekanismene ovenfor bestemmer om hvor lenge de ulike tensidene oppholder i kolonnen bundet til stasjonærfasen. Tiden enhver forbindelse oppholder i kolonnen fra injeksjon til deteksjon beskrives av retensjonstiden t_r (Miller, 2009).

3.2.3 Valg av mobilfase og gradienteluering

De intermolekylære kreftene mellom analytt og stasjonærfasen bestemmer valget av mobilfasen. For omvendt fase kromatografi som baserer seg på upolaritet er mobilfasen polar. Mobilfasen i omvendtfasekromatografi er en blanding av vann og et organisk løsemiddel som acetonitril (ACN) eller metanol. For ionebytterkromatografi er målet for mobilfasen å løse opp ionebindingen mellom stasjonærfasen og de ioniske forbindelsene. I den forstand vil mobilfasen være en blanding av vann, et motsatt ladet ionisk salt, og en buffer for å redusere utfordringer med robusthet. Her kan saltkonsentrasjon eller pH endres for eludering av ioniske forbindelser (Taylor, 2014).

For analyser av ulike tensider under en analyse kan gradient eludering benyttes. Gradient eludering i HPLC betyr at komposisjon av mobilfase er endret enten kontinuerlig eller i en serie av ulike trinn (Skoog et al., 2014). Tensidanalyser som benytter seg av to ulike mobilfaser A (omvendtfase) og B (ionebytte). Kan det programmeres et blandingsprogram av

A og B. Ved start vil det være tilstede stor mengde buffer A, og med tid vil B øke i mengde samt som A reduserer. Dette resulterer i at upolare komponenter som er bundet til stasjonærfasen, eluderes først før ioniske forbindelser som er bundet til stasjonærfasen eluderes og detekteres av UV-vis (Miller, 2009).

3.2.4 Underliggende prinsipp bak HPLC

High performance liquid chromatography er en mer avansert metode komparativt til den litt eldre metoden LC. Metoden er mer foretrukket på grunn av instrumentets evne til å gi økt sensitivitet, effektivitet, oppløsning og analysehastighet. Til forskjell fra tidligere LC metoder har HPLC en høytrykkspumpe hvor separasjon kan oppnås ved trykk opp mot 400 bar (Majors, 2007). Dette er ikke gjennomførbart på en enkel LC system til tross for at den er avhengig av at separasjon tar sted ved at mobilfasen beveger seg langs kolonnen med gravitasjonen (Miller, 2009).

Van Deemters ligning (1) er et underliggende prinsipp bak HPLC instrumentet. Ligningen beskriver forholdet mellom strømningshastighet (u) og plate høyde (H).

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_s + C_m)u \quad (1)$$

For økt kromatografisk oppløsning er det ønskelig å ha lave platehøyder (H) som leder til økt platetall (N) basert på kolonne lengde (L) (ligning (2)). Dette leder til økt kolonne effektivitet som samt gir smale og spisse grafer.

$$H = \frac{L}{N} \quad (2)$$

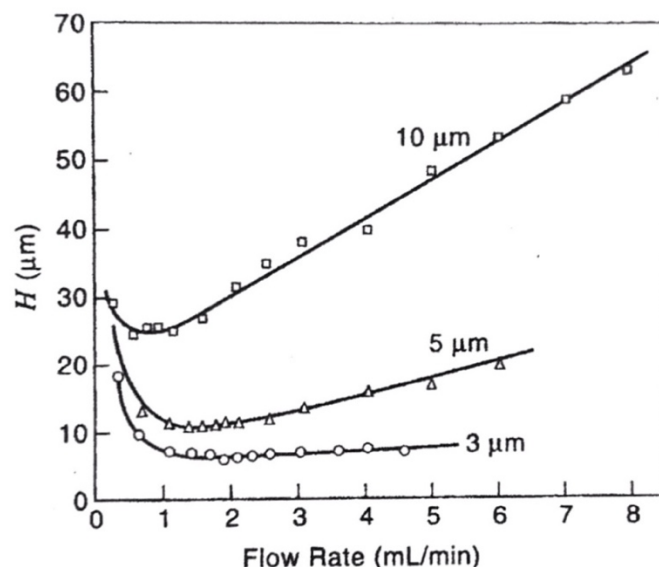
Mangel på kolonne effektivitet er forårsaket av båndutvidelse. Følgende av hvordan kolonnen er pakket, vil det senke raten av masseoverføring av matriksen som beveger seg gjennom kolonnen. Van deemter ligningen (1) beskriver fysiske prosesser som leder til båndutvidelse (Skoog et al., 2014):

1. Eddydiffusjon (A), analyttmolekyler med mobilfasen passerer kolonnen fra start til slutt gjennom ulike veier etter hvordan stasjonærfasen er pakket ettersom den møter på hindringer underveis. Dette fører til at noen vil nå detektoren raskere enn andre. For å unngå denne type diffusjon kan små partikler av pakkemateriale benyttes. Dette medfører tettere pakking av stasjonærfase, der mobilfasen har flere homogene veier å strømme gjennom (Skoog et al., 2014).

2. Langsgående molekylær diffusjon (B), beskriver hvordan analyttmolekylene beveger seg fra et område med høy konsentrasjon til et område med lavere konsentrasjon over tid. Dette kan unngås ved bruk av høy strømningshastighet av mobilfasen, slik at analyttmolekylene ikke får mulighet til å spre seg i kolonnematerialet som reduserer oppholdstiden i kolonnen (Miller, 2009).

3. Masseoverføring (C), beskriver to prosesser basert på mobilfasen og stasjonærfasen. Masseoverføring i stasjonærfase (C_s) beskriver diffusjon av analyttmolekyler inn eller på stasjonærfasen. Sterke bindinger mellom analytt til stasjonærfasen, medfører til at det tar lenger tid til at analytt kan eludere fra kolonnen. Den andre prosessen er masseoverføring i mobilfase (C_m). Mobilfasen vil i utgangspunktet konstant bevege seg inn og ut av kolonnen, men med ulik hastighet. Dette kommer av at mobilfasen møter på partikler av stasjonærfasen som den beveger seg, eller at den påvirkes av friksjon fra kolonne veggen. Masseoverføring ved stillestående mobilfase kan også lede til båndutvidelse. Som et resultat av at mobilfasen blir holdt igjen av porøse partikler i stasjonærfasen, vil den også holde igjen noen analyttmolekyler i porene (Skoog et al., 2014).

Prosessene som inngår i båndutvidelse beskrevet av Van Deemters plot, kan tydeliggjøre hvorfor HPLC gir bedret effektivitet til sammenligning med den mer tradisjonelle LC metoden. Et av forskjellene mellom en enkel LC system og HPLC, er effekten av stasjonærfasens partikkelstørrelse. Denne effekten kan i større grad merkes med litt mer utviklede LC metoder som UPLC. Mindre partikkelstørrelse av pakkemateriale leder til lav platehøyde (H) som resulterer i høyt platetall (N), vist ved figur 14 (Miller, 2009). Som resultat av at små partikler fører til redusert eddy diffusjon i følge van Deemters ligning (1). Figur 14 viser at mindre partikkelstørrelser ikke gir drastiske endringer i platetall selv med høy strømningshastighet, som påvirker analysetiden. Leder til at flere analyser kan gjøres på et lite tidsrom som øker produktiviteten under analyse av flere prøver (Taleuzzaman et al., 2015). Acclaim Surfactant Plus fra Thermofisher kolonnen med partikkelstørrelse på 3 μm benyttet i analysen, vil gi lav platehøyde i forhold til standard kolonne med partikkelstørrelse på 5 μm .



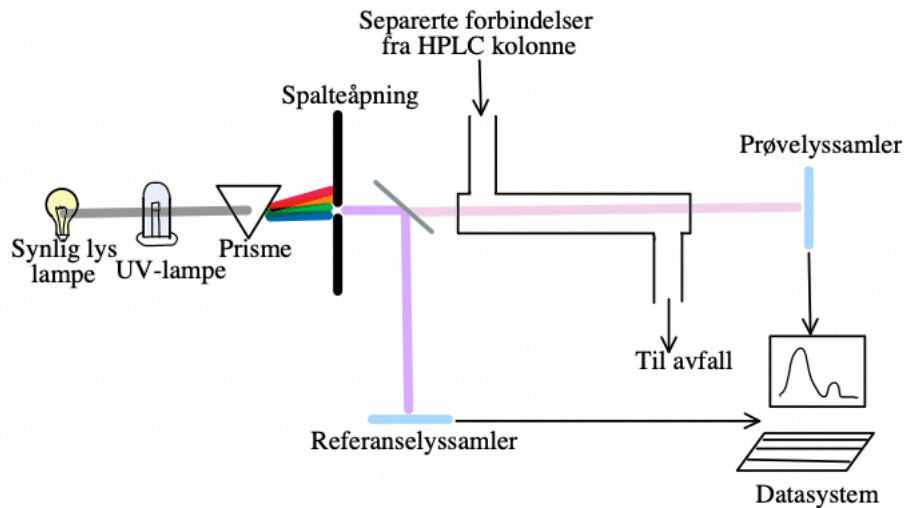
Figur 14. Effekt av stasjonærfasens partikkelstørrelse på platehøyden (H), satt opp mot strømningshastigheten (u). (Miller, 2009).

3.3 Deteksjon av tensider med UV- vis

Det finnes en rekke HPLC detektorer blant disse finnes detektorer som UV-vis, Massespektrometer (MS), brytningsindeks detektor (RI) og fordampende lysspredningsdetektor (ELSD). For en analysemetode velges detektor ut i fra analysetype og instrumentelle betingelser inkludert kolonne valg. UV-vis detektor også kjent som ultrafiolett-synlig spektroskopi er den vanligste detektoren benyttet ved mange farmasøytiske og kjemiske industrier. UV-detektor er mer foretrukket grunnet detektorens pålitelighet, brukervennlighet og universelle respons av forbindelser med kromoforer (Dong et al., 2019).

En UV-vis detektor er en ikke destruktiv metode for HPLC analyser, som betyr at prøven kan brukes til videre analyser. Detektoren er også kjent som en variabel-bølgelengde UV detektor (VWD). Figur 15 viser til en skjematisk fremstilling av en UV-vis detektor. En lampe sender synlig lys gjennom en UV-lampe som gir kontinuerlig emisjon i intervallet 190-600 nm. Denne samlingen av bølgelengdeintervallet sendes inn i en monokromator laget av et prisme. En passende bølgelengde for analysen separeres fra andre bølgelengder ved spalteåpningen, og sendes videre inn i detektoren. En stråledeler fordeler lyset inn i referanse lyssamler, der resten av lyset sendes inn i strømningscellen. I strømningscellen vil lyset treffe kontinuerlig de separerte forbindelsene fra HPLC kolonnen. Som forbindelsene absorberer den valgte bølgelengden som sendes inn, vil en prøvelyssamler på den andre siden av strømningscellen

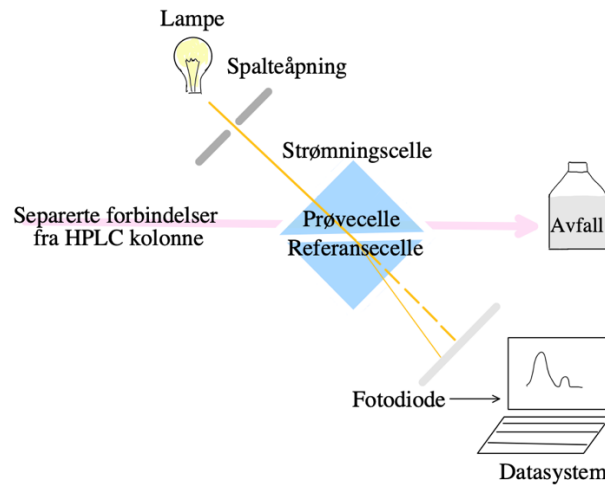
måle uabsorbert lys. Absorbansen som blir registrert av prøvematerialet og referanselyssamleren, vil leses opp som et datasignal av et datasystem og danner et tolkbar kromatogram (Dong et al., 2019).



Figur 15. Skjematisk fremstilling av en UV-vis detektor. Viser hvordan et datasystem samler inn signal fra prøve etter separering fra HPLC kolonne.

For tensidanalyser kan en UV-vis detektor være passende til hensikt for at gradienteluering kan benyttes. En UV-vis detektor kan kun detektere forbindelser med kromoforer som kan være vanskelig for de sist nevnte tensidene ved kapittel 3.1.3, på grunn av fravær av kromoforer. Likevel kan mange forbindelser bli detektert av UV-vis over bølglengden 190 nm. Dette bekreftes ved hjelp av en bølgeskanner, der komponentene absorberer UV-lys over et intervall av bølglengder. De valgte tensidene i denne analysen kan kvantitativt bestemmes med UV-vis detektor ved intervallet 201-209 nm (Ekeberg, 2022).

3.4 Brytningsindeks detektor (RI)



Figur 16. Skjematisk diagram av en RI detektor

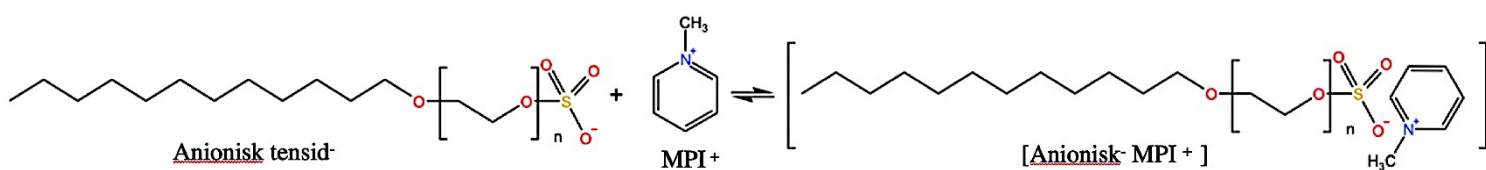
En brytningsindeks detektor (RI) er en universell detektor som baserer seg på lysbrytningsprinsipp. Detektoren er universell grunnet for at den kan utføre en rekke deteksjoner av forbindelser som har ulike brytningsindeks fra mobilfasen. Denne type detektor var preferert for tensidanalyser lenger tilbake i tid før teknologien avanserte seg og nye kom på markedet. En RI detektor kan kun benyttes av metoder som bruker isokratisk mobilfase sammensetning, grunnet sensitiviteten til temperatur og trykkendringer. Detektoren er følgelig egnet ved tilfeller med god separasjon av forbindelser fra kolonnen (Robinson et al., 2005).

En RI detektor er skjematisk presentert ved figur 16. Lys som emitteres fra lampe sendes gjennom en spalte inn i strømningscellen. Cellen består av to sider, prøvecelle og referansecelle. Prøvecellen er området hvor analytt sendes gjennom etter separasjon fra kolonnen, og referansecellen er området fylt med mobilfase på forhånd før analysen. Lysstrålen vil bevege seg rett uten brytning dersom prøvesiden inneholder ren mobilfase som referansecellen. Lyset vil danne en rettstråle som leses av ved fotodioden i form av å danne et spaltebilde. Ved bevegelse av de separerte analyttforbindelsene vil det oppstå endringer med lyset fra lampen, ved at lysets brytningsindeks endres. Lyset vil ikke lenger bevege seg i en rett stråle, men danner brytninger av lyset i forhold til forbindelsen den treffer. Dette danner et forskjøvet spaltebilde respektivt til forbindelsen og leses av et datasystem. For å gi optimal deteksjon av forbindelsene er det nødvendig at både mobilfasen og løsemiddelet består av samme matrise (Shimadzu, 2022).

3.5 Indirekte fotometrisk deteksjon

Indirekte fotometrisk deteksjon også kjent som IPD er en metode hvor forbindelser uten kromoforer kan detekteres med UV-vis, og for å unngå derivatisering. For å utføre indirekte deteksjon av tensider er det nødvendig med et UV-absorberende salt kjent som visualiseringsreagens (Zahrobsky et al., 2005). Eksempler på UV-absorberende salter er metylen blå, naftalensulfonat, koppar-, cerium- eller sølvsalt. I denne oppgaven skal et pyridinium salt mer spesifikt metylpyridinium jodid salt (MPI), benyttes for å gi bedret UV-vis deteksjon av ønsket komponent (Zahrobsky et al., 2005).

Metylpyridinium jodid, er en aromatisk kvartær ammoniumforbindelse salt med positivt ladet nitrogen. Den positive ladningen er avgjørende for analyser av anioniske tensidforbindelser i form av alifatiske sulfonater. Natrium laureth sulfat som analyseres i denne oppgaven er av typen alifatisk sulfonat. Figur 17 viser til hvordan tensidet vil reagere med et UV-absorberende salt (Zahrobsky et al., 2005).



Figur 17. Reaksjon mellom anionisk tensid og MPI-reagens, som danner et kompleks av komponentene, som har absorbanse ved 258 nm.

Mobilfasen bringer MPI reagentet inn i instrumentet. I møte med anioniske tensid former forbindelsene et kompleks av anioniske tensid og MPI. Komplekset muliggjør deteksjon av det anioniske tensidet ved en bølglengde på 258 nm (Zahrobsky et al., 2005). Det anioniske tensidet i seg selv har veldig lav absorbanse ved bølglengde på 202 nm. Ved lave bølglengder øker sjansen for absorpsjon av andre komponenter i prøvematerialet med UV-vis.

3.5 Metodevalidering

Prosedyren metodevalidering benyttes for å utføre en rekke vurderinger for å fastslå at en analytisk metode er egnet for sin tiltenkte analytiske anvendelse (Gupta, 2015). Prosedyren kan benyttes ved innføring av nye analytiske metoder, eller for metoder som allerede eksisterer hvor det er foretatt endringer i selve metoden eller komposisjonen av analyse materiale (Gupta, 2015). Validering foretas ved generering av kjemisk data ved bruk av ytelsesindikatorer som inkluderer spesifisitet, linearitet, målområde, presisjon, nøyaktighet, deteksjonsgrense (LOD), kvantifiseringsgrense (LOQ), og robusthet (Rao, 2018).

3.5.1 Spesifisitet

Er evnen til å bestemme analytt av interesse nøyaktig og spesifikt, i nærvær av andre komponenter som er tilstede i prøvematiser. Andre komponenter innebærer urenheter, matrisekomponenter, nedbrytningsprodukter, og nært beslektede komponenter som analysen metoden er upåvirket av (Gupta, 2015). Parameteren kontrolleres ved å benytte blindprøver (uten analytt) målt i forventet tidsperiode for analytt (Rao, 2018). En annen metode for kontroll av spesifisitet er sammenligning med andre analytiske prosedyrer. For å kunne observere i hvor stor grad analytt separerer seg fra andre komponenter (Gupta, 2015).

3.5.2 Linearitet

Linearitet bestemmes ved tillaging av en serie med standarder med kjent konsentrasjon, minimum fem ulike. Konsentrasjonene strekker seg i området hvor man finner forventede verdier av analytt, ofte mellom 50-150% (Rao, 2018). Verdiene fra standardserien kan plottes inn som signaler som funksjon av analyttkonsentrasjon, og kan vise til om det er en lineær sammenheng. Linearitet i graf med standardkonsentrasjoner forutsetter at testresultatene vil være proporsjonale til analyttkonsentrasjoner innenfor et måleområde (Gupta, 2015).

3.5.3 Måleområde

Måleområdet i en analysemetode er intervallet mellom nedre og øvre konsentrasjoner av analytt i prøver bestemt med nøyaktighet, presisjon og linearitet (Miller, 2009).

Linearitetstesten gjengitt ved kapittel 3.4.2, utføres i dette målområdet.

3.5.4 Presisjon

Presisjon uttrykker hvor nære en rekke med målverdier er hverandre i en kjemisk analyse, hentet fra homogenprøve under gitte betingelser. Parameteren uttrykkes som standardavviket eller variansen mellom rekken av målverdier. Presisjon kan deles inn i tre underkategorier som påvirker parameterens sluttverdi. Disse er repeterbarhet, mellomliggende presisjon og reproduserbarhet (Miller, 2009).

Repeterbarhet er presisjon oppnådd under like betingelser over et kort tidsintervall. Dette innebærer generering av liknende målverdier for samme prøve, innhentet av en og samme analytiker, gjennom flere prepareringer av den samme prøven på et instrument (Lister, 2005). Mellomliggende presisjon innebærer variasjon forårsaket av laboratoriske omstendigheter, dette tilsvarer analyse utfører av forskjellige analytikere, over ulike dager eller benyttelse av ulike utsyr (Miller, 2009). Den siste metoden for måling er kjent som reproduserbarhet, er basert på presisjon i analysen mellom ulike laboratorier utført ved og av ulik lokasjon, instrument og analytiker. Reproduserbarhet går i lag med standardisering av metode (Miller, 2009).

3.5.5 Nøyaktighet

Nøyaktighet uttrykker nærheten av målverdiene uthentet fra en analytisk metode, har til den sanne verdi. Sann verdi kan være en referanse verdi eller en akseptert standard verdi (Gupta, 2015).

3.5.6 Deteksjonsgrense, LOD

Deteksjonsgrensen LOD, er en parameter på minste mengde analytt i en prøve som kan detekteres, men som ikke kan kvantifiseres. Dersom signal for analytt er 3 ganger større enn standardavviket for signal av blankprøve, kan det hevdes til at analytt er tilstede. LOD-verdi kalkuleres ved å benytte standardavvik av respons (σ) og stigningstallet for kalibreringskurven (S) (likning 3) (Lister, 2005).

$$LOD = \frac{3.3 * \sigma}{S} \quad (3)$$

3.5.7 Kvantifiseringsgrense, LOQ

Lavest mulig konsentrasjon av analytt i en prøve som detekteres og kvantifiseres, kan uttrykkes av kvantifiseringsgrensen LOQ. Parameteren bestemmes ut ifra signal til støy ratio av $S/N=10:1$, og kalkuleres med standardavvik av respons (σ) og stigningstallet for kalibreringskurven (S) (likning 4) (Rao, 2018).

$$LOQ = \frac{10 \cdot \sigma}{S} \quad (4)$$

3.5.8 Robusthet

Mål på en analytisk metodes kapasitet til å motstå og forbli upåvirket av små variasjoner, ved bevisst regulering av analyse parametere gir indikasjon på at metoden er egnet og pålitelig for konvensjonell bruk. Typiske variasjoner er som følger endring i pH, mobilfasekomposisjon, kolonne, strømningshastighet, ekstraksjons tid med fler (Gupta, 2015). Ved oppdagelse av store etter effekter av de små variasjonene tas det hensyn til og inkluderes i sikkerhetserklæringen for analyse metoden (Gupta, 2015) (Miller, 2009).

3.5.9 Utbytte

Utbytte uttrykket i prosent er mål på analyttrespons etter kromatografisk metode i forhold til analyttmengde før prøveopparbeidelse. Parameteren viser til hvor stor andel av analytt som har gått tapt ved prøveopparbeidelse, utbytte vil gjengi mengde analytt som utvinnes (Vogel et al., 1996). Utbytte blir i denne oppgaven uttrykt fra den forventede konsentrasjonen av komponentene i prøvematerialene. Følgende av at uttrykket ikke er dekkende for arbeidet utført i oppgaven.

4 Eksperimentelt

4.1 Materialer, reagenser og instrumentering

Prøvene i denne analysen består av tre produkter som finnes på markedet. Produktene ble valgt i henhold til at de var blant de mest solgte vaskemidlene og tøymykner på markedet, samt for å kunne danne et større bilde på de spesifikke tensidene benyttet i produktene. I oppgaven vil de tre produktene bli gjengitt som, produkt 1, produkt 2 og produkt 3. Disse består av ulike tensider som forklart ved tabell 3.

4.1.1 Prøvemateriale

Tabell 3. Liste over analysematerialene benyttet i analysen. Har valgt 3 ulike kommersielle vaskemidler og tøymykner som finnes på markedet. Produktene vil være navngitt som i tabellen.

Prøve	Produkttype	Innhold av tensider
Produkt 1	Oppvaskmiddel	Anion og amfotær
Produkt 2	Tøyvask	Anion og ikke-ionisk
Produkt 3	Tøymykner	Kation

4.1.2 Reagenser

Tabell 1. Liste over reagenser benyttet i oppgaven ved metodene for HPLC, UV-skanning og titrering med tilhørende produsent

Reagenser	Produsent
Destillert vann	Millipore
Ammoniumacetat $\geq 98.0\%$, AnalaR NORMAPUR® ACS, Reag. Ph. Eur. analytisk reagens	VWR
Eddiksyre $\geq 100\%$, LiChropur® for HPLC, Supelco®	Merck
Metanol $\geq 99.8\%$, HiPerSolv CHROMANORM® Reag. Ph. Eur., gradient kvalitet for HPLC	VWR
Acetonitrile HPLC Grade	VWR
1-Metylpyridinium jodid	Sigma-Aldrich
Etanol	VWR
Sitronsyre (1M)	VWR
Berol 185 (1%)	Millipore
Hyamin® 1622- 0.004 M	Millipore
Na-Laurysulfat- 0.004 M	Millipore

4.1.3 Standardløsninger

Tabell 2. Liste over råstoff benyttet som standarder i separasjonsanalyse med HPLC, gjengitt med tilhørende leverandør

Råstoff	Leverandør
Kationisk tensid: Stepantex® PA-85G	Stepan Europe S.A.S
Anionisk tensid: Marlinat 240/70 RSBO-MB	Sasol Germany GmbH
Amfotær tensid: Empigen OB	Innospec Manufacturing Park
Ikke-ionisk tensid: Lutensol AO7	BASF SE

4.1.4 Materialer

Tabell 4. Liste over materialer og utstyr benyttet i oppgaven ved metodene for HPLC, UV-skanning, titrering og IPD med tilhørende produsent

Materialer	Produsent
Kolonne: Acclaim Surfactant Plus, 3 µm, 4,6 x 10mm	Thermo Fisher Scientific
Forkolonne: Acclaim Surfactant Plus 5 µm, 4,6 x 150mm	Thermo Fisher Scientific
Kolonne IPD metode: Restek Pinnacle II C18 HPLC Columns, 3µm Particle Size	Restek
Vann rensesystem: RiOs™ 5 Smart	Millipore
Magnetrorer: Ika ret magnetic stirrer	Gemini BV
pH meter: inoLab™ 7110 Benchtop	WTW™
Urglass 60 mm	Bohemia Cristal
Eppendorfrør 15 mL PP, 118x16,5mm transparent patch	Nerliens Meszansky
Sprøyter, tredelt, HENKE-JECT®	Henke-Sass, Wolf
Sprøytefilter PTFE, 45 µm/25mm, klar	Nerliens Meszansky
Autosampler hetteglass: Vial scr. 1,5ml cl.gl., 32x11,6mm, transparent	VWR
Pipetter justerbart volum: 100-1000 µL og 5-10 mL	Finnpipette
Vannbad: 1003 Waterbath	GFL
Varmeskap	Termaks
Flaske, smal hals, med gjenge, DURAN® PROTECT (1000 mL)	DWK Life Sciences
Tørrvekt aluminiums brett: Moisture Analyzer Sample Pans	Mettler Toledo™
Begerglass	VWR
Målekolbe 500 mL	VWR
Analyse vekt: CP224S Analytical Balance weight	Sartorius
Ristebord: PSU-20i, Multi-functional Orbital Shaker	Biosan
pH meter: inoLab™ 7110 Benchtop	WTW™
Referanse elektrode 6.0726.1 til kationaktivitet	Metrohm USA 60507120
Referanse elektrode 6.0726.100 til anionaktivitet	Metrohm USA 60507120
Glasspipette 10 mL	VWR
Peleusballong	VWR
Kvartskyvetter 10 mm	VWR

4.1.5 Instrumentelt

Tabell 5. Liste over kromatografisk instrumentering, med tilhørende produsent og programvare

HPLC system	Produsent
Degasser DGU-20As	Shimadzu Scientific Instruments
Autosampler SIL-20A HT	Shimadzu Scientific Instruments
Kolonneovn CTO-20A	Shimadzu Scientific Instruments
Væskekromatografi LC-20AD	Shimadzu Scientific Instruments
UV-vis detektor SPD-20AV	Shimadzu Scientific Instruments
RI detektor RID-10A	Shimadzu Scientific Instruments
Kromatografisk programvare: LabSolutions	Shimadzu Scientific Instruments

Tabell 6. Liste over ytterligere instrumenter benyttet for metodene UV-skanning og titrering med tilhørende programvare

Instrumenter og tilhørende programvarer	Produsent
Autotitrator: 836 Titrand system W/Two 800 Dosing Unit	Metrohm USA 60507120
Titrerings programvare: tiamo™, Titration software	Metrohm USA 60507120
Spektrofotometer: Biochrom Libra S32 PC	Biochrom
Spektrofotometer programvare: Biochrom Acquire Wavescan	Biochrom
Tørrvekt: Halogen Moisture Analyzer HE53 (230V)	Mettler Toledo™

4.2 Metoder

4.2.1 UV-skanning for bestemmelse av bølglengde

UV-skanning ble utført for å finne ved hvilken bølglengde de ulike tensidene gir utslag med spektrofotometer. For anioniske, ikke-ioniske og amfotære tensider veide ut 0,2-0,5 g av hvert tensid. Fortynnet løsningen opp til 10 mL med metanol, og for å oppløse tensidene i fortynningene ble tensidfortynningene satt i varmebad ved 60 °C i 2 minutter. Kationiske tensidet i sammenligning til de andre tensidene har høy sensitivitet til UV-lys, dermed veide ut ca. 0,03 g av tensid og fulgte samme prosedyre med fortynning til 10 mL og oppvarming.

Fra enhver fortynning var det tatt ut 1 mL inn i kvartskyvetter som var målt opp mot 1 mL blankprøve med metanol på spektrofotometeret. UV-skanning tok plass ved å måle tensidfortynningene på et intervall av ulike bølglengder fra 190 til 300 nm. Bølglengden

registrert ved høyest absorbans ble senere benyttet for utførelsen av tensidanalyse med HPLC-UV.

4.2.2 HPLC parametere

Analyse av de ulike tensidklassene ble analysert med tilsvarende instrumentelle betingelser. HPLC-instrumentet inneholdt en Shimadzu LC-20AD pumpe, Shimadzu SIL-20A HT autosampler, Shimadzu CTO-20A kolonneovn, Shimadzu SPD-20AV UV-vis detektor, med forkolonne Acclaim Surfactant Plus 5 μm (4,6 x10mm) og Acclaim Surfactant Plus, 3 μm , (4,6 x150mm) kolonne fra Thermo Fisher. Data fra kromatografisk separasjon ble samlet og behandlet gjennom programvaren LabSolutions fra Shimadzu.

4.2.3 HPLC-UV metode med metanol som mobilfase

4.2.3.1 Standard- og kontrollprøve preparering

Under analysene i oppgaven ble tensidråstoffer benyttet som standarder. For å kunne lage konsentrasjonsrekke av standardene måtte riktig tensidkonsentrasjon bestemmes i de ulike råstoffene. For å finne mengde tensider var 1 g av hvert råstoff veid inn på et urglass og satt inn i varmeskap på 60 grader. Ved fordamping av vann eller annet løsemiddel kunne mengde tensid utregnes målt i prosent. Mengde tensid ble beregnet da vekten av urglass med råstoff nådde en konstant vekt over tid. Utregnede konsentrasjoner av tensid var videre benyttet for tillaging av standarder. Hver standard ble veid ut og fortynt opp til 10 mL med HPLC-grad metanol i eppendorfrør. For å løse opp standardene i metanol, ble eppendorføyrene satt til risting i 30 min og satt av til ro i 30 min, for å fjerne skum og uløselige partikler (Im et al., 2008).

Før overføring av standardene inn i autosampler hetteglassene, ble disse enkeltvis filtrert gjennom et polytetrafluoreten (PTFE) (45 μm) sprøytefilter og for å unngå uønsket kontaminering som kan være tilstede i råstoffene. Deretter ble 1 mL av hver tensidstandard med tilhørende konsentrasjonsrekke overført inn i autosampler hetteglasser. Tabell 7 viser til valgte konsentrasjoner av de ulike standardene.

Tabell 7. Oversikt over valgte standardkonsentrasjoner for hver tensidklasse utgitt i mg/mL. Beregnet med fortynningsformelen $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$.

Tensidklasse	Sett av standardkonsentrasjoner utgitt i mg/mL					
Kation	2,34	3,12	3,90	4,29	4,68	5,46
Anion	1,00	10,00	20,00	40,00	50,00	60,00
Ikke-ionisk	0,11	0,63	1,15	6,31	11,47	-
Amfotær	3,21	6,42	12,83	16,04	19,25	25,66

Det var laget et sett med kontroller ved siden av standardene, disse ble laget med høyeste standardkonsentrasjonen vist ved tabell 7. Kontrollene ble satt på analyse flere ganger under analysen mellom blankprøver, standarder og analytt. Kontrollene ble preparert på lik metode som standardene. Etter innveiling av riktig mengde standard for kontrollprøvene, ble prøvene fortynnet opp til 10 mL med metanol. Prøverørene ble satt til risting i 30 min, og satt til ro i 30 min. Kontrollene var deretter filtrert gjennom et PTFE (45 µm) sprøytefilter. Lik standardprøvene ble kontrollene overført inn i autosamplere hetteglassene før injisering i instrument.

4.2.3.2 Blankprøve

En blankprøve uten analytt ble laget for at mulige forurensinger kunne oppdages. Blankprøve i denne analysen bestod av rent løsemiddel av 1 mL metanol (HPLC-grad). Blank ble satt til analyse mellom hver tensidklasse for å sikre at ingen analytt fra tidligere analyse var tilstede i kolonnen.

4.2.3.3 Prøveopparbeidelse

Standardene ble veid opp og fortynnet med metanol (HPLC-grad) til 10 mL i et eppendorfrør. Etter fortynning var prøvene satt på ristebord ved 30 minutter til alt prøvemateriale hadde oppløst seg. Etter risting var disse satt i ro for å fjerne luftbobler dannet under risting. Før injisering i HPLC-UV instrumentet ble prøvene filtrert gjennom et PTFE (45 µm) sprøytefilter for å fjerne uønskede materialer. Overførte 1 mL prøve inn i autosamplere hetteglass før programmet ble startet sammen med tensidstandarder, kontroll- og blankprøvene. Tabell 8 viser til mengde prøvemateriale som ble veid inn.

Tabell 8. Oversikt over innveid mengde prøvemateriale av de ulike vaskemidlene og tøymykner. Innveid (g) viser til mengde produkt veid opp for tensidene i det lineære området av standardkurven. Produktene var veid opp for vanlig analyse på lav bølgelengde fra 202-209 nm.

Prøve (n)	Produkttype	Tensid	Innveid (g)
Produkt 1 (6)	Oppvaskmiddel	Anion, Amfotær	0,204
Produkt 2 (6)	Tøyvask	Anion, ikke-ionisk	0,360
Produkt 3 (6)	Tøymykner	Kation	0,271

*(n)-antall paralleller av hvert prøvemateriale

4.2.3.4 Tillaging av mobilfaseløsninger for analyse

En 0,1M ammoniumacetatbuffer ble laget ved å veie 7,78 g ammoniumacetat, løste dette i 998 g destillert vann i en 1L flaske og justerte pH til 5 med eddiksyre. For mobilfasen av organisk løsemiddel ble en 1L flaske fylt opp med HPLC-grad metanol. Metanol ble valgt som mobilfase fordi det benyttes som løsemiddel i prøvemateriale, kontroller- og standardprøver.

4.2.3.5 Mobilfase gradient

Ved analyse av flere tensider simultant, var det nødvendig å benytte lineær gradienteluering for å få optimal separasjon av de ulike komponentene. Det ble derfor laget et gradientoppsett av metanol (HPLC-grad) (A), og buffer ammoniumacetat (0.1M) med pH 5 (B). Gradient ble satt av til 15 min som tilsvarte analys tiden av hver standard, analyse-, blank- og kontrollprøver. I denne delen av metoden ble det benyttet to gradientprogrammer, ett for anioniske, amfotære og ikke-ioniske tensider presentert ved tabell 9 (Thermofisher, 2012), og et gradientprogram for de kationiske tensidene er vist ved tabell 10 (Thermofisher, 2012).

Tabell 9. Gradienteluering med metanol (HPLC-grad) (A), og buffer 0,1 M ammoniumacetat ved pH 5 (B). Med tilhørende tid for å skjematisk illustrere hvordan gradienten endret seg.

Tid (min)	Konsentrasjon (%)	
	A	B
0	25	75
10	85	15
15	85	15

Tabell 10. Gradienteluering med ACN (HPLC-grad) (A), og buffer 0,1 M ammoniumacetat ved pH 5 (B), for kationiske tensider og tøyemykner. Med tilhørende tid for å skjematisk illustrere hvordan gradienten endret seg.

Tid (min)	Konsentrasjon (%)	
	A	B
0	35	65
10	85	15
15	85	15

4.2.3.6 Instrumentelle betingelser

For optimal separering av de ulike tensidkomponentene var det fastsatt enkelte betingelser på instrumentet, både for HPLC og UV-vis som detektor. Det ble kjørt gradienteluering av mobilfasene metanol (HPLC-grad) (A) og bufferen ammoniumacetat (0.1M) med pH 5 (B), med strømningshastighet på 0,6 mL. Injiserte et volum på 5 µL av analyse-, standard-, blank- og kontrollprøver ved bruk av autosampler. Injeksjonsloopen hadde en størrelse på 100 µL. For separasjon av tensidene i kolonnen var kolonnetemperaturen justert til 30 °C.

Bølgelengdene registrert for de tilhørende tensidene var viktig ved analyse av de ulike komponentene gjennom et UV-vis detektor. For å kunne få utslag av tensidet på kromatogrammet, var det nødvendig å stille inn riktig bølgelengde for detektoren. Anioniske, amfotære, og ikke-ioniske tensidene absorberte ved et intervall fra 201-203 nm. Detektoren av den grunn var stilt inn ved 202 nm. Under analyse av kationiske tensider som absorberer UV-lys ved høyere bølgelengde var detektoren stilt inn på 209 nm.

4.2.3.7 Oppsett av analysemateriale på HPLC-UV

Tabell 11. Oppsett over injiseringsrekkefølgen av standard-, blank-, kontroll- og analyseprøver for hver tensidklasse. Hver prøveparallel ble kjørt ved to omganger. For vaskemiddelene som inneholdt flere enn ett tensid, var en ny rekke med standarder kjørt for prøvene.

Autosampler posisjon	Prøve
1	Blank
2	Kontroll prøve
3	Blank
4	Tensid standard 1
5	Tensid standard 2
6	Tensid standard 3
7	Tensid standard 4
8	Tensid standard 5
9	Blank
10	Kontroll
11	Produkt parallell 1
12	Produkt parallell 1.2
13	Produkt parallell 2
14	Produkt parallell 2.2
15	Produkt parallell 3
16	Produkt parallell 3.2
17	Kontroll prøve

4.2.4 Acetonnitril metode

Ved kapittel 4.2.3 var metoden utført med metanol som mobilfase. For å sikre om at mobilfasen ikke påvirker analyseresultatene ble ACN valgt som mobilfase (Thermo Scientific, 2013). Til grunn for at ACN absorberer UV-lys ved lavere bølgelengde (190 nm). Denne metoden ble utført det anioniske tensidet og produkt 1, for å undersøke om metoden leverte mer optimale resultater.

4.2.4.1 Mobilfase gradient

For metoden med ACN ble det benyttet en endret gradienteluering med tid satt av for kondisjonering av kolonnen. Mobilfasen bestod av ACN (HPLC-grad) (A) og buffer ammoniumacetat (0.1M) med pH 5 (B) tillaget som ved kapittel 4.2.3.4.

Tabell 12. Viser til oppsett av gradient med ACN (A) og ammoniumacetat buffer (B) som mobilfase. Negativ tid viser til kondisjoneringstid, hvor det ble testet ut to ulike tider for kondisjonering gjengitt som tid 1 og tid 2.

Tid 1 (min)	Tid 2 (min)	Konsentrasjon (%)	
		A	B
-10	-20	25	75
0	0	25	75
10	10	85	15
15	15	85	15

Under denne delen med utprøving av metode med ACN som mobilfase ble det innsett at baselinjen begynte å danne irregulær støy. For å stabilisere baselinjen var det nødvendig med å installere en mobilfasemixer på HPLC-UV instrumentet etter pumpen, slik at mobilfasene A og B fikk lenger vei til kolonnen, og kunne blandes godt før mobilfasen nådde denne, figur. VII viser til den ustabile baselinjen. Mobilfasen ble kjørt på to ulike mobilfasehastigheter både på 0,6 mL/min og 1 mL/min for å observere om det utgjorde noe forskjell i hvordan komponentene ble separert.

4.2.4.2 Standard- og analyseprøvetillaging

Standard- og analyseprøvene ble laget med lik metode som ved kapittel 4.2.3. Til erstatning for 100% ren metanol, ble det benyttet en 25% løsning av metanol for fortyningene laget med destillert vann slik at metanol absorberer minst mulig ved den gitte bølgelengden. Det var nødvendig med 25% metanol blanding for at standard- og analyseprøvene løste seg opp i løsemiddelet, med hensyn til de høye standardkonsentrasjonene. For enhver prøve ble det injisert 10 µL, med justering av kolonnetemperatur til 30°C.

4.2.5 RI metode

Standardene ble også kjørt på RI detektor for å undersøke en alternativ detektor, og unngå utfordringer med UV-absorbansse ved lave bølgelengder. For denne metoden ble det fulgt samme prosedyre som for tillaging av standardprøve ved kapittel 4.2.3.1. Det ble utført analyse av en standardkonsentrasjon på 10 mg/mL fra hver tensidklasse. Injisert med et injiseringsvolum på 10 µL, med justering av kolonnetemperatur til 30°C.

Mobilfasesammensetningen benyttet i metoden bestod av metanol (A) og ammoniumacetat (B) analysert på isokratisk metode. Mobilfasehastigheten var satt av til 0,6 mL/min, med analysetid på 15 min per standardprøve. Det ble testet ulike konsentrasjonssammensetninger av mobilfase A og B, for å finne ved hvilke konsentrasjoner av mobilfasene som dannet optimale topper. Konsentrasjonssammensetninger som ble utprøvd var av 60:40, 40:60 og 85:25 (A:B).

4.2.6 Indirekte fotometrisk deteksjon

I denne delen av analysen ble det anioniske tensidet SLES analysert med indirekte fotometrisk deteksjon.

4.2.6.1 Tillaging av mobilfase for analyse med IPD

Det ble laget en 1 liter flaske med mobilfase for analysen som inneholdt 70 %, ACN 30 % destillert vann og 0,25 mM MPI. Visualiseringsreagenset ble veid og rørt inn i mobilfasen med magnetrører. Blandingen av ACN med vann gir absorpsjon av varme som resulterer i at mobilfase blandingen blir kald. Mobilfasen av den grunn ble laget i forveien for å kjøles ned til romtemperatur før analyse på HPLC-UV (Zahrobsky et al., 2005).

4.2.6.2 Tillaging av standard- og analyseprøver

Tillaging av standard- og analyseprøver følger samme prosedyre som for analyse med metanol metoden ovenfor ved kapittel 4.2.3. Endringer fra den metoden er ved innveid mengde standard- og analyseprøvematerialer, og at disse ble fortynnet med eluent sammensetningen som bestod av 70% ACN og 30% vann. Tabell 13 viser valgte standardkonsentrasjoner som befinner seg i området 0,05- 1 mg/mL av anioniske standard (Zahrobsky et al., 2005). For tillaging av standarder ble det laget en 0,1 g stamløsning løst i 10 mL av SLES tensidet. Stammløsning ble tillaget som en løsning på at analysevekten ikke kunne veie opp lavere masser med opp til fire desimaler. Kontrollprøve ble tillaget ved benyttelse av høyeste standardkonsentrasjon, og ble analysert flere ganger under analysen. Veide ut 0,0204 g av produkt 2 og fortynnet i 70:30 ACN og vannblanding med et totalvolum på 10 mL. Produkt 2 ble valgt ovenfor produkt 1, for å håndtere færrest mulige tensider med liknende struktur av amfotære og anioniske tensider. Fem paralleller av hver standardkonsentrasjon ble kjørt. Tre paralleller av hver analyseprøve ble preparert og analysert fem ganger.

Tabell 13. Oversikt over valgte standardkonsentrasjoner i området 0,05-1 mg/mL.

Standardene ble fortynnet i ACN og vann blanding på 70:30 forhold, og fortynnet opp til 10 mL i totalvolum

	Sett av standardkonsentrasjoner utgitt i mg/mL						
Anion	0,05	0,075	0,1	0,25	0,5	0,75	1

4.2.6.3 Instrumentelle betingelser

For analyse av anioniske tensider med IPD-metode var det enkelte instrumentelle betingelser som måtte endres fra metodene i kapitlene ovenfor. Benyttet kolonnen Restek Pinnacle II C18 HPLC Columns, 3 μ m. Mobilfasen som var forblandet med en konsentrasjonsratio på 70:30 av ACN og vann med 0,25 mM MPI, ble kjørt med en mobilfasehastighet på 0,8 mL/min. Injisert standard-, kontroll- og prøvevolum var på 10 μ L, og ble målt på UV-detektor med en bølgelengde på 258 nm. Total analysetid for hver prøve var satt av til å være 12 min. Komponentet SLES skulle ha retensjonstid rundt 5 min (Zahrobsky et al., 2005). For separasjon av tensidklassene gjennom kolonnen var kolonnetemperaturen satt av til 30 °C.

4.2.7 Titrering

Oppgaven skal gi en forståelse for hvor effektiv separasjonsmetoden med HPLC, er i forhold til den mer tradisjonelle titreringsmetoden for analyser av tensider. Tensidanalyse ved titrering er basert på addisjon av små mengder titrant til prøve, med registrering av endringen ved elektrisk spenning (mV). Titreringsanalyse ble utført på både anioniske og kationiske tensider, for å kvantitativt bestemme mengde anion og kation ved valgte vaskemidler.

4.2.7.1 Anionisk titrering

For produktanalyse av produkt 1 veide inn ca. 5 g oppvaskmiddel i en 500 mL målekolbe med 10 mL etanol for å løse partikulært materiale i produkt før det ble tilsatt destillert vann opp til 500 mL. For produkt 2 veide inn 7 g tøyvask inn i målekolbe før fortynning med destillert vann opp til 500 mL. Fortynningene ble satt på magnetrører til produktene løste seg opp.

Før analyse tok ut 10 mL fra fortynningen med glasspipette og peleusballong, inn i et 150 mL begerglass. Tilsatte 80 mL destillert vann, 1 mL sitronsyre (1M) og 2 mL berol 185 (1%) i

begerglasset før blandingen ble klargjort for titrering. Til titrering var tilhørende ionisk tensidelektrode og anionisk referanseelektrode satt på autotitratoren, og prøven ble analysert med assistanse av titeringsprogramvare tiamo TM.

4.2.7.2 Kationisk titrering

Kationisk tensidanalyse for produkt 3, fulgte samme prosedyre som for anionisk tensid. Veide inn ca. 5 g av produkt 3 inn i 500 mL målekolbe med analysevekt, og fortynnet opp til 500 mL med destillert vann. Tøymykner fortynningen ble løst opp med magnetrører før 10 mL av fortynnet prøve ble pipetert ut med glasspipette og pelesballong inn i 150 mL begerglass. I samme begerglass ble 80 mL destillert vann, 1 mL sitronsyre (1M) og 2 mL berol 185 (1%) tilsatt før blandingen ble klargjort for titrering. Autotitratoren ble klargjort med ionisk tensidelektrode og kationisk referanseelektrode, og prøven ble analysert med assistanse av titeringsprogramvare tiamo TM.

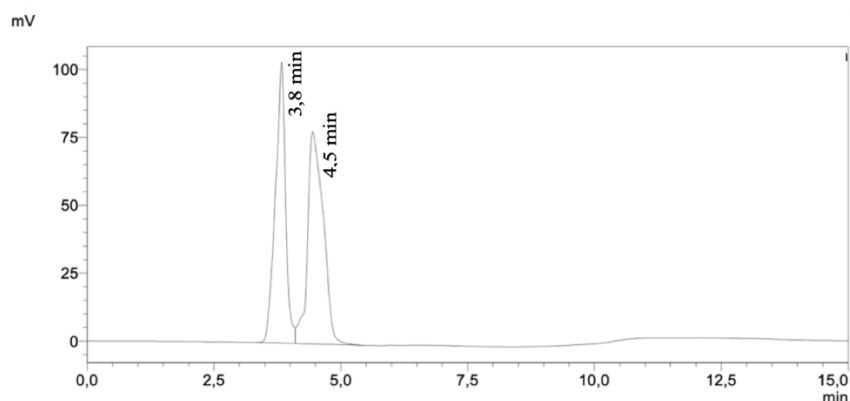
5 Resultater og diskusjon

5.1 HPLC-UV metode med metanol som mobilfase

5.1.1 Bestemmelse av kationiske tensider i tøymykner

Produkt 3 var analysert med HPLC-UV for bestemmelse av mengde kationiske tensider. En ekstern standard ble benyttet i form av et råstoff. Dette er råstoffet som blir benyttet i produkt 3, og har verken høy renhetsgrad eller en bestemt konsentrasjonsmengde av de kationiske tensidene. For å kvantifisere tensider med råstoff som standard ble mengde tørrstoff i råstoffet bestemt til å være 86,7% av kationiske tensider.

Kromatogrammet viste til separasjon av to topper fra den kationiske standarden. Kationiske tensidet DHM har en karbonkjede bestående av 16 karboner og den andre 18 karboner i råstoffet vist ved figur 10. De ulike forbindelsene ble separert ved ulike retensjonstider. Forbindelsen DHM-C16 ved topp 1 med retensjonstid på 3,8 min og DHM-C18 ved topp 2 med retensjonstid på 4,5 min. Kromatogrammet for den kationiske tensidstandard er illustrert ved figur 18. For å finne konsentrasjonen av DHM-C16 og DHM-C18 ble forholdet mellom forbindelsene beregnet. Forholdet ble beregnet til å være 0,85 og holdt seg konstant mellom toppene ved de ulike konsentrasjonene av standarden. Forholdet ble benyttet for å beregne frem til konsentrasjonene for DHM-16 og DHM-C18, presentert ved standardkurven vedlegg I og II.



Figur 18. Kromatogram for kationisk tensid standard, viser DHM-C16 ved 3,8 min og DHM-C18 ved 4,5 min. Målt ved bølglengde 209 nm.

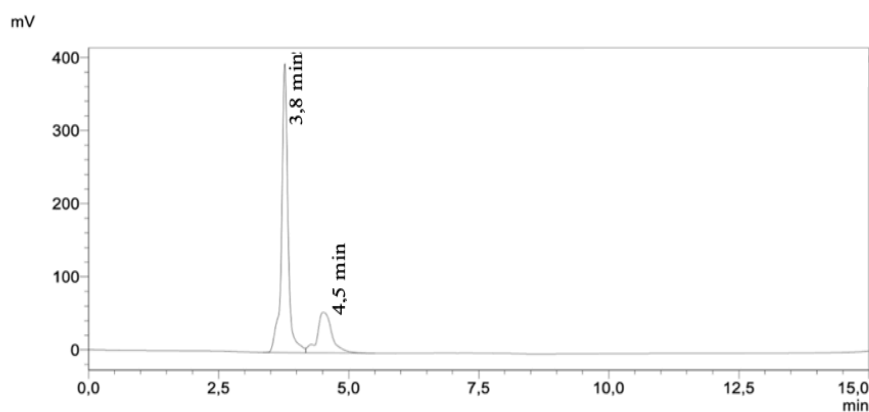
5.1.1.1 Metodevalidering: Linearitet og presisjon

Det ble analysert tre paralleller av hver standardkonsentrasjon for å sikre for at lite instrumentelle variasjoner var tilstede etter injisering. Blankprøver av ren metanol ble kjørt mellom hver standardkonsentrasjon for å hindre «carry-over» i form av overdrag av uønskede komponenter. Dette viser til den repeterbare presisjonen av metoden. Det ville ha vært store avvik i tall dersom instrumentet ikke virket optimalt. Standardkurven indikerer til god korrelasjon mellom standardkonsentrasjonene og de resulterte topp arealene. Korrelasjonen beskrives av lineariteten for de valgte standardene gjengitt som R^2 -verdier. For DHM-C16 var R^2 -verdi 0,9846 og for DHM-C18 var R^2 -verdi 0,9946. R^2 -tallene har en verdi nær 1, som beskriver at modellene laget som standardkurver kan benyttes for bestemmelse av kationiske tensider i ukjent prøve.

5.1.2 Kationiske tensider i tøymykner

5.1.2.1 Metodevalidering: Nøyaktighet, Utbytte og Spesifisitet

Kromatogram av de kationiske tensidene i tøymykner er vist ved figur 19. Tabell 14 beskriver resultatene fra analysen av kationiske tensider med metanol som mobilfase. Konsentrasjon av DHM-C16 var beregnet til å være $1,8 \pm 0,2$ mg/mL og for DHM-C18 var konsentrasjonen beregnet til å være $2,5 \pm 0,2$ mg/mL. Den forventede konsentrasjonen av tensidene i produkt 3 var 0,45 mg/mL av DHM-C16 og 2,67 mg/mL av DHM-C18. Resultatene viser til at den reelle konsentrasjon av DHM-C18 stemmer overens med den forventede konsentrasjonen med 92% av DHM-C18, i motsetning til 397% av DHM-C16 fra den forventede konsentrasjonen av DHM-C16. Metoden har økt spesifisitet til DHM-C18 komponenter, til sammenligning med DHM-C16 komponentene. For forbindelsen DHM-C16 var den beregnede konsentrasjonen drastisk høyere enn forventet. Med betraktning til dette ble det undersøkt om andre forbindelser i produktet hadde lik retensjonstid som DHM-C16.



Figur 19. Kromatogrammet for produkt 3 som inneholdt kationiske tensider. Målt ved bølgelengde 209 nm.

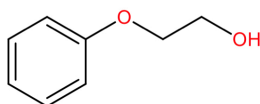
Tabell 14. Oversikt over beregnede konsentrasjoner av tøyemykner analyseprøve, LOD, LOQ, og kontroll prøve, for hvert kationisk tensid.

Konsentrasjoner (n)	DHM-C16 (mg/mL)	DHM-C18 (mg/mL)
Analytt konsentrasjon (9)	1,8 ± 0,2	2,4 ± 0,2
LOD	0,110	0,420
LOQ	0,320	1,28
Kontroll konsentrasjon (3)	0,791 ± 0,002	4,670 ± 0,003

*(n)- antall paralleller av produkt 3 eller standarder som ble kjørt før bestemmelse av gjennomsnittlig konsentrasjon

5.1.2.2 Koeluering av konserveringsmiddel

Det ble først undersøkt mistanke om koeluering ved å teste ut flere konsentrasjonsgradienter vist ved figur III i vedlegg. Endring av gradient resulterte i ingen endringer i kromatogram. Av den grunn ble hver enkeltingrediens fra produkt 3 kjørt med lik metode. Det ble observert ett konserveringsmiddel med lik retensjonstid som DHM-C16 ved tid 3,8 min. Konserveringsmiddelet fikk utslag med UV-vis detektor på grunn av tilstedeværelsen av kromoforer. Strukturen av konserveringsmiddel er vist ved figur 20.



Figur 20. Konserveringsmiddelet 2-fenoksyetanol med lik retensjonstid som DHM-C16

5.1.2.3 Metodevalidering: LOD- verdi, LOQ-verdi og Presisjon

Fra standardkurven tilhørende forbindelsen DHM-C16 var beregnet LOD-verdi 0,110 mg/mL og LOQ-verdi 0,320 mg/mL. For DHM-C18 var LOD-verdi beregnet til å være 0,420 mg/mL og LOQ-verdi 1,28 mg/mL. LOQ-verdien for DHM-C16 falt inn under det lineære området hvor standard detekteres. Dette beskrives også av figur I hvor konsentrasjoner under 0,320

mg/mL falt utenfor det lineære området. Det var vanskelig å justere denne verdien for DHM-C18 med hensyn til at LOD-verdi var høyere enn startkonsentrasjonen for det lineære området (figur II i vedlegg). Følgende av at standardkurvene ble dannet ut ifra en råstoffstandard som inneholdt forbindelse DHM-C16 og DHM-C18.

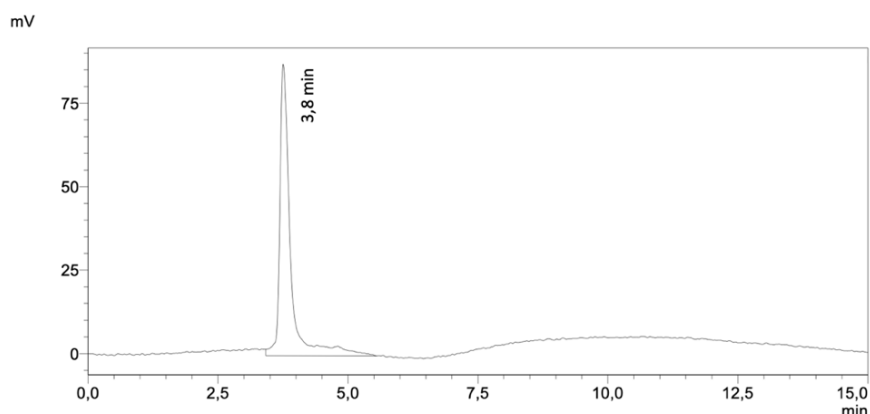
For å sikre om at det ikke var til stede store instrumentelle variasjoner ble 3 kontrollprøver kjørt gjennom med jevne mellomrom mellom standard- og analyseprøvene. Lav standardavvik indikerer små instrumentelle eller metodiske avvik ved analysen som viser til økt presisjon. For videre analyser av produkt 3 med tensidet DHM er det til fordel å benytte standarder tilgjengelig på markedet som kontrollprøve for å sikre at det ikke har oppstått avvik med råvarestandard.

5.1.2.4 Videre arbeid av metode med tøymykner

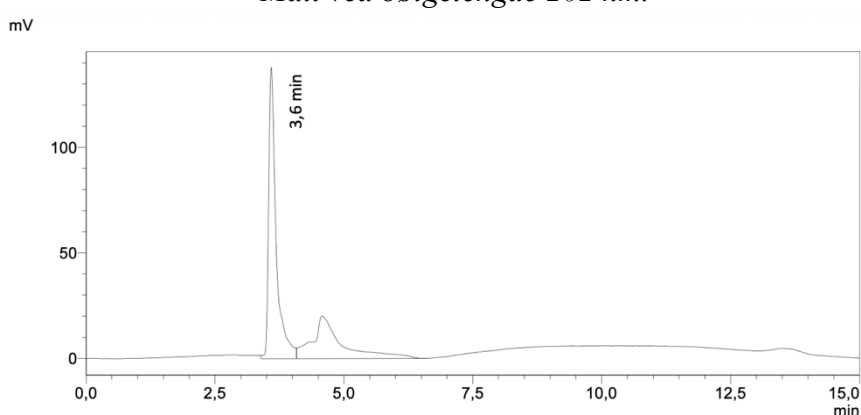
For analyser av tøymykneren fremover vil det være ideelt å utføre prøveopparbeidelse i form av ekstraksjon før analyse. Grunnet tilstedeværelsen av koelusjon av konserveringsmiddelet vist ved figur 20 vil ekstraksjon av konserveringsmiddelet være til fordel for å kunne bestemme konsentrasjon av de kationiske tensidene i produktet.

5.1.3 Bestemmelse av amfotære, anioniske og ikke-ioniske tensider i oppvaskmiddel og tøyvask

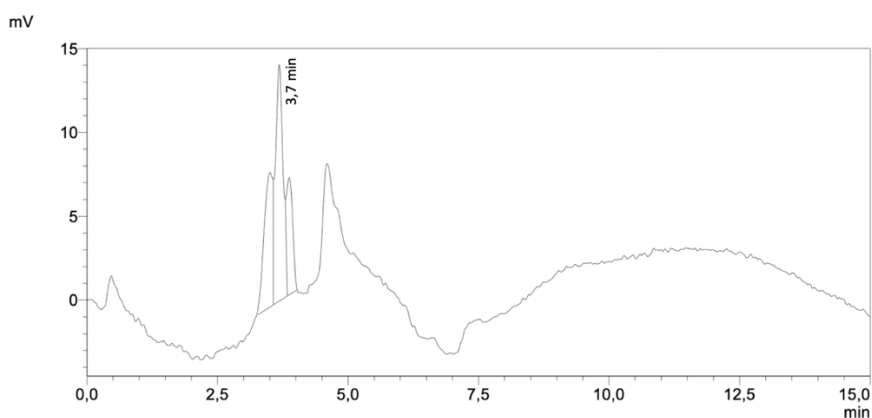
Til forskjell fra de kationiske tensidene ved kapittel 5.1 som ble analysert ved bølglengde 209 nm, begynte metoden å gi avvikende resultater ved analyse av de anioniske, amfotære og ikke-ioniske tensidene. Skyldes analyse ved lavere bølglengde på 202 nm. Denne bølglengden er i underkant av metanol mobilfasen som absorberer UV-lys ved 205 nm. Dette forårsaket usikre resultater som gjorde det utfordrende å beslutte hvorvidt kromatogrammet viste til tensidtopp eller løsemiddeltopp. Figur 21-23 viser til kromatogrammene av tensidklassene løst i metanol som løsemiddel og kjørt med metanol og ammoniumacetat som mobilfase. Tilhørende standardkurver er presentert i vedlegg (figur IV-VI). Standardene var tillaget ut ifra beregnet mengde tørrstoff av tensidråstoffene, 73% anionisk, 32% amfotære og 96% ikke-ionisk.



Figur 21. Kromatogram for anionisk tensid standard av SLES med retensjonstid på 3,8 min. Målt ved bølgelengde 202 nm.



Figur 22. Kromatogram for den amfotære tensid standarden av lauraminoxid med retensjonstid på 3,6 min. Målt ved bølgelengde 202 nm.

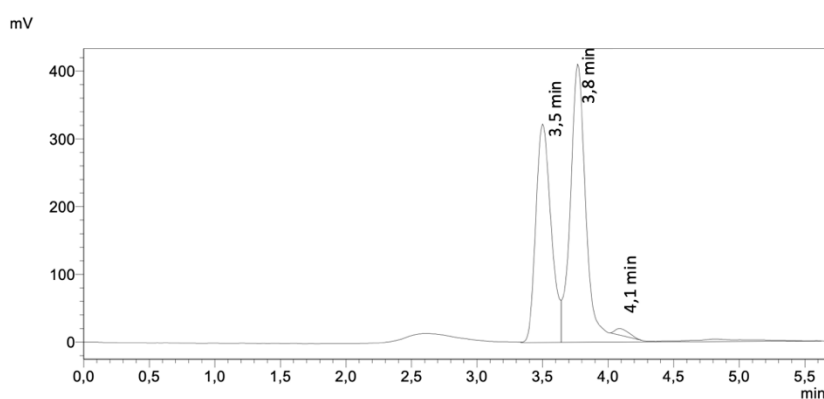


Figur 23. Kromatogram for ikke-ionisk tensid standard av 2-etoksyntadekan-1-ol med retensjonstid på 3,7 min. Målt ved bølgelengde 202 nm. Tensidet ble fortynnet 10 ganger for å gi bedre separering av toppene som forklarer lav intensitet. Midterste topp ved 3,7 min. var det ikke-ioniske tensidet basert på at toppen endret seg proporsjonalt med økende tensid konsentrasjon.

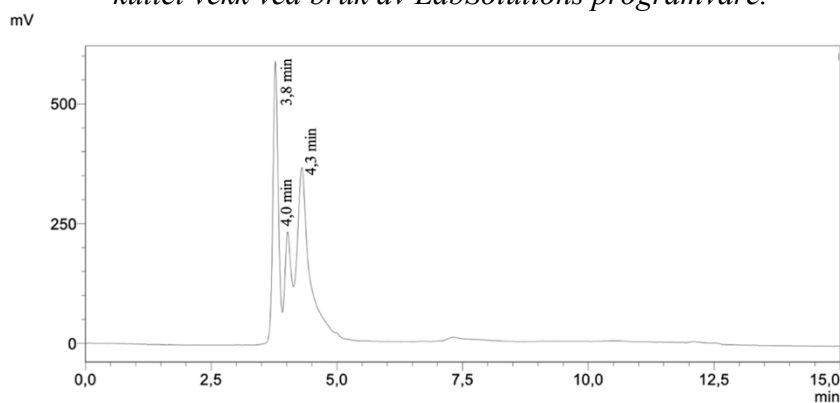
Ulempen ved å analysere analytter ved lave bølgelengder følger med at andre komponenter i prøvematriksen også gir utslag. Dette inkluderer flere forbindelser med dobbeltbindinger og

andre komponenter som metanol. Løsemiddelet metanol ble benyttet i metoden for å løse opp prøvematerialene fullstendig. Dette for å ikke etterlate spor av prøvepartikler ved benyttelse av høye konsentrasjoner av prøvematerialer. Til grunn for løselighet ble metanol anvendt som løsemiddel i analysen og dermed også gunstig i å benytte lik matriks for mobilfasen.

Anelsen om observasjon av løsemiddeltopp ble ikke tenkt over før etter at standardene ble analysert og prøvene ble satt til analyse. I motsetning til standardene, ga ikke prøvematerialet optimal separering av tensidene. Dette ble innsett da intensiteten til toppene for produktenes kromatogram var uvanlig høy og retensjonstidene ikke stemte overens med standardene som ble analysert tidligere. Figur 24 og 25 viser til kromatogram hentet fra produkt 1 og 2. Det ble kjørt flere ulike fortynninger av produktene for å ta rede på hvorvidt lavere konsentrasjoner av produktene resulterte i bedre separasjon, samt utført forsøk på ulike gradientprogrammer med mistanke om koeluering. Ved analyse av standardene ble ikke dette oppdaget grunnet av at tensidstandardene hadde ulike retensjonstider, samtidig som at økning av tensidkonsentrasjon ledet til økning av intensiteten til tensid toppene.



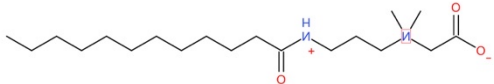
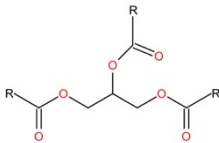
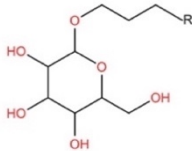
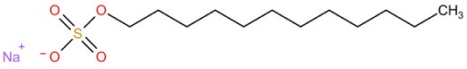
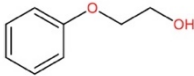
Figur 24. Kromatogram for produkt 1 bestående av anionisk og amfotær tensid, målt ved bølgelengde 202 nm. Analysetid var på 15 min, der de resterende minuttene ved grafen ble kuttet vekk ved bruk av LabSolutions programvare.



Figur 25. Kromatogram for produkt 2 bestående av anionisk og ikke-ionisk tensid, målt ved bølgelengde 202 nm.

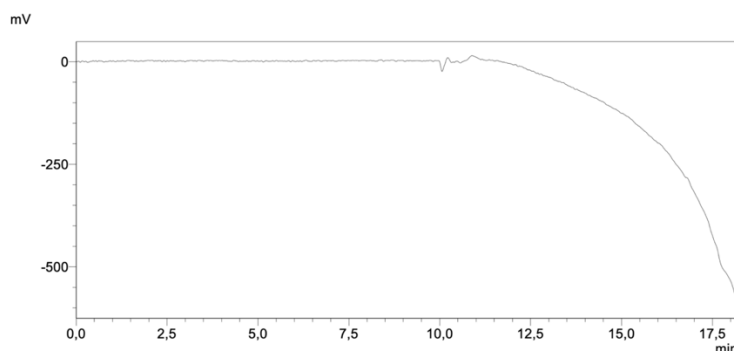
For å undersøke muligheten for koeluering ved analyse av produkt 1 og 2, ble hver enkelt ingrediens kjørt på HPLC-UV med lik prøvepreparering. Tabell 15 viser oversikt over komponenter med lik retensjonstid som toppene observert ved analyse av produktene ved figur 24 og 25. I tillegg til at andre komponenter gir utslag med UV-detektor, så har også de kjemiske egenskapene til tensidene som helhet i produktene stor påvirkning på separasjon. Spesifikt ved produkt 1 som inneholder etanol. Tilsetning av etanol i produkt medvirker endringer av tensidstrukturene i produktene som å danne et nettverk liknende struktur mellom disse. Dette kan påvirke separeringen av tensidene som følge av at tensidene i de ulike produktene kan i liten grad ha avvikende struktur fra standardene.

Tabell 15. Oversikt over komponenter med lik retensjonstid som observert ved kromatogrammene ovenfor ved figur 24 og 25. Tabellen viser til tilstedeværelsen av koeluering under analyse av produkt 1 og 2

Produkt	Retensjonstid (min)	Struktur
1	3,5	 Kokamidopropylbetain (C17)
1	3,5	 Glyserider C8-C10, etoksyleret
1	3,8+4,1+4,6	 D-glukopyranose oligomerisk, C10-16 alkyl glukosider
2	3,9+4,0	 Natriumlaurylsulfat (C12-14)
2	3,8	 2-fenoksyetanol

5.2 HPLC-UV metode med acetonnitril som mobilfase

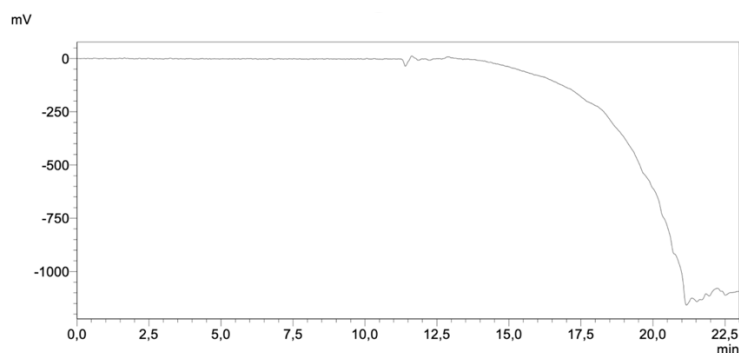
Metanol som løsemiddel resulterte i ikke identifiserbare topper av tensidklassene anioniske, ikke-ioniske og de amfotære tensidene ettersom metanol kan absorbere UV-lys ved lave bølgelengder under 205 nm. For å unngå absorpsjon av metanol ble en alternativ mobilfase ACN benyttet som erstatning for metanol. Acetonnitril ble valgt ettersom at den absorberer UV-lys ved bølgelengder lavere enn 190 nm. For å vurdere om denne metoden gir deteksjon av tensider etter separering, ble metoden anvendt på det anioniske tensidet SLES. Figur 26-27 viser til kromatogram ved analyse av anionisk tensid ved to ulike konsentrasjoner.



Figur 26. Kromatogram illustrerer 10 mg/mL anionisk tensid løst i løsemiddel bestående av vann og 25% metanol (HPLC-grad). Analysen ble avsluttet grunnet ingen utslag av topp.

Ved høy konsentrasjon som 10 mg/mL, var det nødvendig å tilsette 25% metanol for å løse opp standarden i løsemiddelet. Metanol ble anvendt som løsemiddel til hensikt å oppløse små uløste tensidpartikler i produktet. Det var derfor gunstig i å benytte likt løsemiddel for både standard- og analyseprøvene. Etter analysen av dette anioniske tensidet som resulterte i fravær av anionisk tensidtopp, oppstod en mistanke om avvik på detektoren grunnet tilstedeværelse av urenheter i detektorcellen. Det ble undersøkt og bekreftet av en serviceingeniør at detektoren var velfungerende.

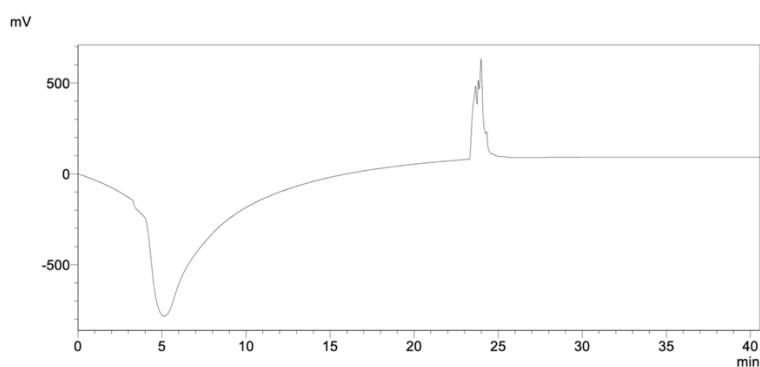
Samme analyse ble utprøvd ved økning av tensid standardkonsentrasjon til 50 mg/mL (figur 27). Ved økning av konsentrasjon 5 ganger skulle det bli observert en mer tydelig topp fra kromatogrammet som tilhørte 10 mg/mL, men det var ingen tegn til dette (figur 27). I tillegg ble det utført analyser av standardene løst i rent vann for å se om 25 % metanol påvirket analysen. Ved denne metoden av prøvepreparering ble det også observert like kromatogrammer som ved figurene 26 og 27.



Figur 27. Kromatogram illustrerer 50 mg/mL anionisk tensid løst i løsemiddel bestående av vann og 25% metanol (HPLC-grad). Analysen ble avsluttet da kurven begynte å flate seg ut

Videre ble det utført en analyse av produkt 1 vist ved figur 28, for å undersøke om kolonnen var defekt. Grunnet i å observere om andre komponenter i produktet ga utslag med UV-vis detektor. De resulterte toppene i kromatogrammet ved figur 28, oppvekket mistanke om defekt kolonne. Leverandør ble kontaktet for å bekrefte om kolonnen var defekt.

Leverandører konkluderte med at kolonnen ikke var defekt, men at de valgte forbindelsene ikke var kompatible med detektoren. Kromatogrammet ved analyse av produkt 1 med ACN og ammoniumacetat som mobilfase, viste til topper av ingredienser som står for det røde fargestoffet til oppvaskmiddelet fra tid 23-24 min.



Figur 28. Kromatogram av analyse med produkt 1, viste til lite separering av forbindelsene i produktet. Figuren viser til analyse som inkluderte kondisjonering av kolonne til tid 20 min.

5.3 RID metode

Acetonitril metoden ved kapittel 5.2 med UV-vis som detektor var ikke en passende metode for analysen av de ønskede tensidene. Det ble derfor vurdert å benytte en alternativ detektor, for å unngå utfordringene i å benytte lave bølgelengder med UV-vis som detektor. Deteksjon

med UV-vis var ikke passende detektor for tensidene valgt i oppgaven, med hensyn til at de manglet kromoforer. Figur VIII-XI i vedlegg, viser resultatene fra analyser av de ulike tensidklassene. Kromatogrammene anviste at tensidene fra de ulike tensidklassene hadde lik retensjonstid. Dette antydte at komponentene ikke hadde retensjon til stasjonærfasen.

Det ble også utført flere analyser av standarder med lavere standardkonsentrasjoner, og endret mobilfasesammensetning. Endringene resulterte i endret retensjonstid i helhet, men tensidene hadde eludering ved lik retensjonstid. Det optimale i denne sammenheng hadde vært å få en senere retensjonstid, for å kunne unngå mistanke om tilstedeværelsen av løsemiddeltopp. For å sikre om at tensidene ikke var bundet igjen i kolonnen ble det også utført tekstanalyser med lenger analysetid, for å kunne angi at toppene som ble observert ikke var løsemiddeltopper. Økning av tid resulterte med å gi ingen topper etter 3,9 min, lik metoden med kortere analysetid. Dette viser også til at metoden ikke er passende for analyser av produktene testet i denne oppgaven. Grunnet for at en isokratisk metode ved tilværelsen av flere tensidklasser i samme prøve, medfører til å gi lik retensjonstid for alle tensidklassene.

Tensidklassene med hensyn til struktur, varierer ikke i stor grad basert på kjedelengde. Medfører at isokratisk mobilfase ikke vil være den mest optimale for slike analyser ved tilstedeværelsen av flere tensider med liknende struktur. Figurene VIII-XI i vedlegg viser også til en mengde støy ved baselinje som et resultat av at RI detektor yter dårlig sensitivitet. Resultatene samlet ved kapittel 5.2 og 5.3 kan og hintes til at det var feil med kolonnen, muligens ødelagt. Forklarer at det ikke ble observert noe retensjon ved kapittel 5.2 og at alle tensidklassene hadde lik retensjonstid ved kapittel 5.3.

Tabell 16. Oversikt over retensjonstid og mobilfasesammensetning, retensjonstid var lik for alle tensidklassene. Benyttet mobilfasene (A) metanol og (B) 0,1 M ammoniumacetatbuffer pH 5. Det ble kjørt 2 paralleller av hver prøve, som resulterte i lik retensjonstid for alle tensidklassene.

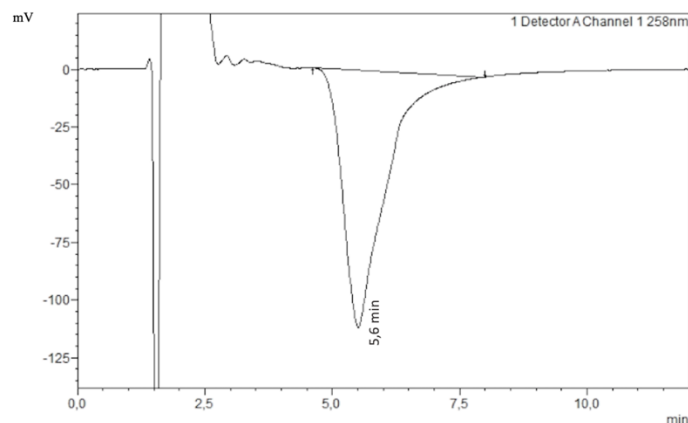
Mobilfasesammensetning (A:B)	Retensjonstid (min)
40:60	3,8
60:40	3,8
85:25	3,9

5.4 Indirekte fotometrisk deteksjon

Med hensyn til budsjett og tid var det utfordrende å utgjøre en vurdering for innkjøp av en alternativ detektor. En detektor mer optimal for metoden er en ELSD detektor. Detektoren er fordelaktig ved at den er mer sensitiv, støtter gradientanalyser og unngår kompliserte prøveprepareringer i form av derivatisering.

Det ble derfor gjort en vurdering på hvordan en UV-detektor fortsatt kunne anvendes, men med en alternativ metode som kunne unngå utfordringene som kommer ved bruk av lav bølgelengde. I denne delen av analysen ble det anioniske tensidet SLES analysert ved bruk av indirekte fotometrisk deteksjon. Dette ble utført som en del av videre arbeid, følgende av at RI, og UV-deteksjon ved lave bølgelengder ikke var passende for de valgte tensidene i denne oppgaven.

Indirekte fotometrisk metode ble i utgangspunktet kjørt på Acclaim Surfactant Plus kolonnen fra Thermofisher. Utførelsen av IPD metode på kolonnen viste til ingen forventede topper av både standard- og analyseprøve, figur XIII i vedlegg. Dette kunne vært som følge av at metoden ikke var kompatibel med en kolonne som inneholdt både omvendt fase og ionebytter separasjonsmekanismer, at metoden ikke var anvendelig på SLES forbindelser, eller at kolonnen var defekt som mistenkt fra tidligere i forsøket. For å sikre at metoden var anvendelig på SLES som analytt ble Acclaim surfactant kolonnen byttet ut med en Restek Pinnacle II C18 kolonne. En kolonne basert på omvendt fase kromatografi. Figur 29, viser til kromatogram fra analysen av det anioniske tensidet SLES med C18 kolonne.



Figur 29. Kromatogram av anioniske tensidet SLES som kompleksforbindelse med MPI reagens, ved konsentrasjon 1 mg/mL. Målt ved bølgelengde 258 nm

En IPD metode kan resultere i dannelsen av enten positivt eller negativt signal, som observeres ved figur 29. Negativt signal skyldes av avtakende mengde visualiseringsreagenssalter (MPI) som er nødvendig for å opprettholde elektronnøytralitet. Figur 29, viser også til et område med høyt signal ved tid 1-3 min. Toppene har blitt beskåret vekk i kromatogrammet ovenfor for at signalet til standarden skulle bli presentert mer tydelig. Toppene som forekommer ved tid 1-3 min, er vanlig forekomst av MPI reagenset før den innstiller likevekt vist ved figur 17.

5.4.1 Metodevalidering: LOD- verdi, LOQ-verdi, linearitet og presisjon

Standardkurven ved figur XII i vedlegget, viser til en tilfredsstillende R^2 verdi på 0,9979. Dette beskriver at standardkurven for de gitte konsentrasjonene kan benyttes for å kvantitativt bestemme anioniske tensider i ukjente prøvematerialer. Tabell 17, viser til både LOD- og LOQ-verdier som stemmer overens med det gitte intervallet som metoden beskrev, et konsentrasjonsintervall på 0,05-1 mg/mL. Det anioniske tensidet kunne først kvantifiseres på en konsentrasjon over 0,06 mg/mL, som stemte overens med det gitte intervallet på 0,05-1 mg/mL. Tabellen viser også til at metoden ytet god presisjon til grunn for at arealene for toppene avvirket i svært liten grad, beskrevet standardavvikene.

Tabell 17. Oversikt over beregnede konsentrasjoner av produkt 2 analyseprøve, LOD, LOQ, og kontroll prøve laget fra høyeste standardkonsentrasjon, fra anioniske tensidet.

Konsentrasjoner (n)	SLES (mg/mL)
Analyse konsentrasjon (15)	0,570 ± 0,008
LOD	0,020
LOQ	0,061
Kontroll konsentrasjon (3)	1,000 ± 0,002

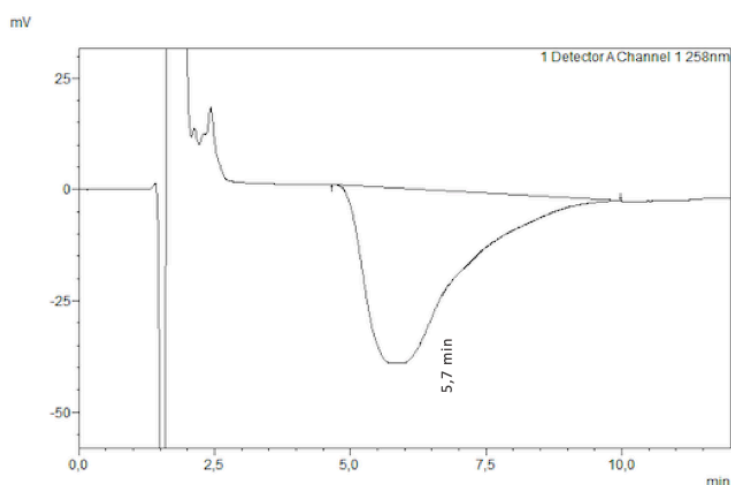
*(n)- antall paralleller av produkt 2. Det ble laget 3 paralleller av produkt 2, hvor hver av prøvene ble kjørt 5 ganger

5.4.2 Metodevalidering: Nøyaktighet, Utbytte, spesifisitet

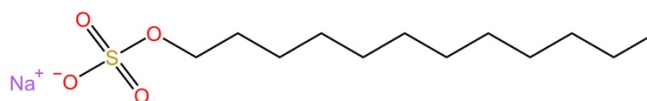
Den reelle konsentrasjonen beregnet ved tabell 17, viser at analytt konsentrasjon avviker i stor grad fra den forventede konsentrasjonen som har en verdi på 0,10 mg/mL. Utgjør 570% fra den forventede konsentrasjonen av tensidet i produkt 2. Dette kan skyldes tilsetning av uønsket økt mengde tensid i produkt under tillaging. Eller at det tilsvarende anioniske tensidet som befinner seg i produktet kjent som natriumlaurylsulfat, var grunnen til avviket.

Natriumlaurylsulfat forbindelsen kan stå for den økte beregnede konsentrasjonen, som følge

av at kolonnen ikke separerer forbindelsene, og forbindelsene kom under samme topp med lik retensjonstid. Dette kan observeres ved figur 30, hvor ved tid 5,7 min er det tilstede en bred usymmetrisk topp. Figur 31, viser strukturen av det anioniske tensidet natriumlaurylsulfat (SLS), som har liknende struktur som SLES. Dette betyr at det skulle forventes å observere to toppe, hvor hver av toppene i kromatogrammet representerte SLS og SLES tensidene. Dette beskriver svakhet i metodens spesifisitet, fra å skille det spesifikke tensidkomponentet fra andre komponenter i samme prøvematriks. Andre faktorer som generelt skylder brede toppe for både analyse- og standardprøvene er mobilfasesammensetning, stasjonærfasesammensetning av kolonne, og valg av kolonne med hensyn til mobilfasehastighet.



Figur 30. Kromatogram av anioniske tensidet SLES som finner sted i produkt 2.



Figur 31. Natriumlaurylsulfat (SLS), anionisk tensid

5.4.3 Metodevalidering: Robusthet

For å sikre at metoden er robust for små variasjoner som kan oppstå under både preparering og underanalyse, ble det utført noen bevisste endringer av ulike parameter betingelser. Tabell 18, viser resultater fra å endre kolonne temperatur og mobilfasesammensetning. Tabellen viser til at både retensjonstid (figur XX) og beregnet konsentrasjon avviker fra parameteren som ble satt ved utgangspunktet for metoden. Dette viser til at metoden er mindre robust og

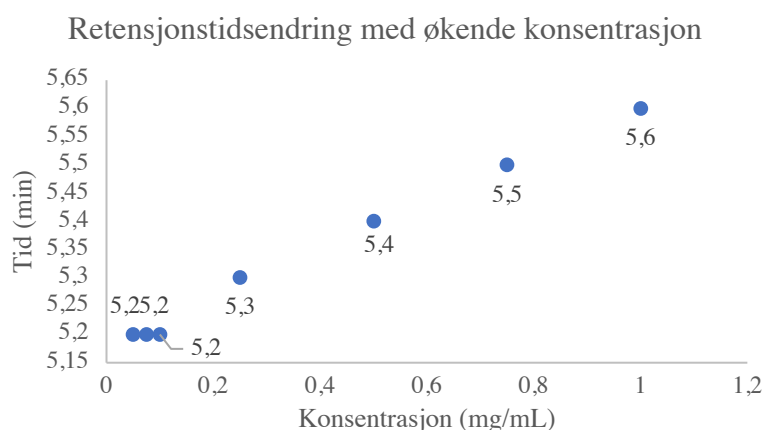
stabil, og må bearbeides videre for konvensjonell bruk av metoden for analyse av anioniske tensider i vaskemidler.

Tabell 18. Skjematisk oversikt over resultater av produkt 2, kjørt med ulike betingelser for å finne ut om metoden var robust for små variasjoner av ulike parametere. Verdiene var beregnet utfra standardkurvene fra figur XIX i vedlegg.

Parameter	Betingelser	Retensjonstid (min)	Konsentrasjon (mg/mL)
Mobilfase (ACN:Vann)	68:32	6,5	0,454 ± 0,00778
Temperatur	32 °C	6,7	0,453 ± 0,00636

5.4.4 Endringer i retensjonstid

En trend ble oppdaget ved at retensjonstiden endret seg med økende konsentrasjon. Basert på metoden som er valgt for denne analysen kan dette være som et resultat av reaksjonstiden mellom anionisk tensid og MPI reagens. Dette viser til svakheter med metoden, som følge av at MPI reagenset binder til SLES under separeringsprosessen i kolonnen, og ikke som ved mange andre derivatiseringsprosesser hvor et spesifikt derivat blir fremstilt på forhånd under prøveopparbeidelse. Figur 32 viser til denne trenden hvor høyere konsentrasjon av det anioniske tensidet leder til lenger reaksjonstid med visualiseringsreagens.



Figur 32. Viser til endring av retensjonstid for komplekset av anioniske tensidet med MPI reagens, hvor retensjonstiden endret med økende konsentrasjon av SLES

5.4.5 Videre arbeid av IPD metode

For videre arbeid med IPD metode, kan det gjøres en vurdering på benyttelse av en alternativ kolonne som består av en andre stasjonærfaser for å oppnå signaler av smalere topper. Eksempel på stasjonærfase kan være en C8-kolonne, som fører til raskere eluering til sammenligning med en C18 kolonne. Andre metoder på å få smalere topper på er ved endring

av mobilfasehastighet for en raskere eluering av komponentene. Her må det vurderes en alternativ kolonne, følgende av at kolonnen i IPD metoden hadde lavt maksimums trykk for å kunne utføre analysen ved en hastighet på 1 mL/min.

5.5 Titreringsmetode for analyse av tensider

Titreringsmetode er blant de mest benyttede metodene innenfor tensidanalyser. I denne oppgaven ble en titreringsmetode foretatt på vaskemidlene og tøyemykneren som ble analysert med HPLC-UV metoden. Til forskjell fra kromatografiske metoder der tensider kan skilles fra hverandre, vil titreringsmetode utgi totalkonsentrasjonen av en tensidklasse. Det ble utført analyse av anioniske tensider i produkt 1 og 2, og kationiske tensider i produkt 3. Tabell 19 beskriver tensidaktivitet utgitt i prosent.

Tabell 19. Bestemte tensid konsentrasjoner av total anionisk tensidaktivitet, og total kationisk tensidaktivitet beregnet i produkt 1, 2 og 3. Målt med autotitrator, ved bruk av ionisk tensidelektrode og referanseelektrode

Konsentrasjoner (n)	Anionisk aktivitet (%)	Kationisk aktivitet (%)
Produkt 1 (10)	15,5 ± 0,622	-
Produkt 2 (10)	7,47 ± 0,09	-
Produkt 3 (10)	-	12,8 ± 0,143

*(n)-antall paralleller av produkt 1,2 og 3.

Produkt 1 og produkt 2 inneholder flere anioniske tensider. Dette blir gjenspeilt ved resultatene utgitt ved tabell 19, til grunn for at denne hadde høyere anionisk tensidaktivitet enn forventet. Det anioniske tensidkomponentet SLES hadde forventet tensidaktivitet på 6,29 % i produkt 1, og 4,89 % i produkt 2. Viser til at det er tilstede flere forbindelser i form av anioniske tensider i produktene som medfører til høyere anionisk aktivitet. I tillegg til at flere ulike anioniske tensider er tilstede gir amfotære tensider også utslag som anioniske tensider ved en pH på 6,5.

Produkt 2 inneholdt det anioniske tensidet SLES. Forventet tensidaktivitet for det spesifikke tensidet i produkt 2 hadde en prosentandel på 4,89 %. Det forventede er lavere enn målt verdi med autotitrator, som følge av tilstedeværelsen av flere tensider i produktet i form av anioniske komponenter som reagerte med titrant. Forventet verdi for kationiske tensider i produkt 3 hadde en verdi på 11,53%. Dette avviket fra målt totalkonsentrasjon av kationiske tensider under titreringsanalysen. Gir indikasjon på at utgitt konsentrasjon av kationisk tensid

i råstoff fra leverandør ikke stemte overens med den reelle konsentrasjon. Standardavviket beskriver aktivitetsmåling av tensidene, der målingene ikke avviker i stor grad fra hverandre. Dette forekommer når konsentrasjon av råstoff øker som løsemiddelet fordampes med tid. Det betyr at tensidblandingen hadde høyere konsentrasjon i utgangspunktet før den ble tilsatt i produkt.

En stor fordel med titreringsanalyser er at total konsentrasjon av tensider kan bestemmes, med betraktning til at de tilhører den samme tensidklassen. Ulempen kommer først når andre tensidklasser eksempelvis amfotære tensider, som består av zwitterioner forstyrrer analysen ved å gi utslag som enten anioniske eller kationiske tensider avhengig av pH-verdi. Kromatografiske metoder i sammenligning kan skille mellom slike tensider. En kromatografisk metode er mer effektiv i form av tid, fordi metoden ikke trenger konstant observasjon og kan hoppe til neste prøve uten å måtte fysisk sette på nye prøver. For en konvensjonell laboratorie kan teknikken være mer fordelaktig til den litt eldre titreringsmetoden hvor det konstant er nødvendig med oppsyn og kan ta opp til 1.5 timer for analyse av 10 paralleller med prøver.

Den kromatografiske metoden beskrevet i denne oppgaven var effektiv på enkle produktblandinger, men ikke med flere tensider tilstede. Dette gjenspeiles ved at én av kationiske tensidets konsentrasjon kunne bestemmes ved produkt 3. I sammenligning til produkt 1 og 2 som bestod av flere ulike tensider. Det samme gjelder for bestemmelse av tensid aktivitet ved hjelp av titrering som kan bestemme konsentrasjon av ett tensid dersom produktet består kun av det ene tensidet. Dette er vist ved tabell 19 som viser at produkt 1 og 2 hadde mye høyere konsentrasjon enn forventet, i motsetning til produkt 3 som inneholdt kun kationiske tensider.

Selv om titreringsmetoden kan bestemme totalkonsentrasjonen av kationiske tensider, er det likevel uklart om hvilke kationiske tensidkomponenter som er tilstede i produktet. En kromatografisk metode som HPLC-UV kan klart skille mellom kationiske tensider gjennom separering. Dette er illustrert ved figur 19, som gir forklaring på hvilke tensid komponenter som blir benyttet i produkt 3, mer spesifikt hvilken kjedelengde forbindelsene har. Dette er et grunnlag for at metoden kan benyttes på andre tensider som har absorbanse ved høyere bølgelengder, men med hensyn til produktene som utvelges til analyser består av enkle systemer med færre ingredienser.

6.Konklusjon

Titreringsmetoden er foreløpig en mer egnet metode for bestemmelse av tensider, til sammenligning med den kromatografiske metoden som ble prøvd ut ved denne oppgaven. Med hensyn til konvensjonell bruk på enkle laboratorier. UV-vis detektoren var ikke kompatibel for tensidforbindelsene i oppgaven, til tross for at separering tok sted var ikke det tilstrekkelig for å kvantifisere tensidene.

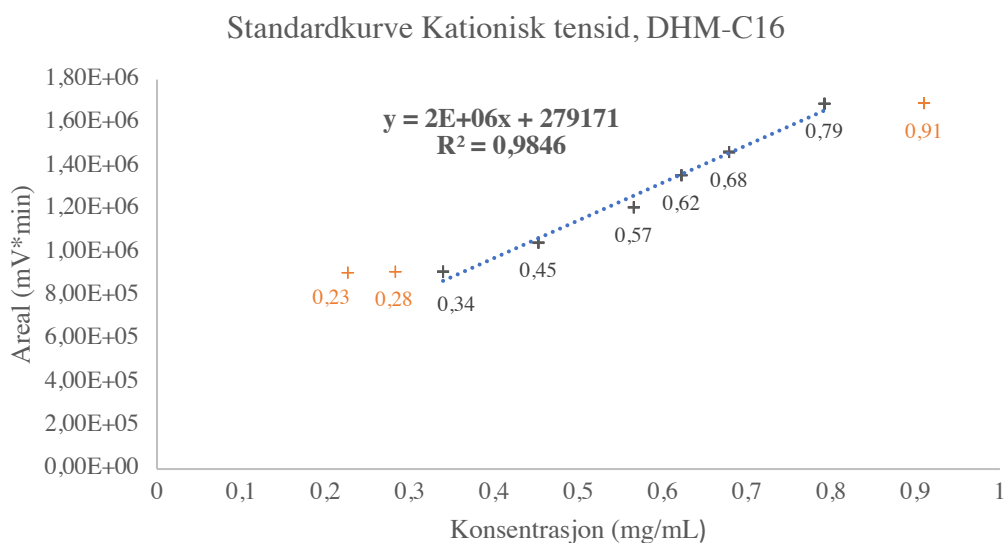
Ved benyttelse av en alternativ detektor som en ELSD detektor, vil det være større mulighet for å observere de forventede resultatene av flere tensidklasser og flere typer tensider innenfor disse. Frem til da er IPD en enkel metode som kan være anvendelig for enkle tensidblandinger og for enkel rutinedrift. Metoden har potensiale til forbedringer ved å prøve ut ulike betingelser som konsentrasjoner av mobilfaser, injiseringsvolum, kolonne temperatur med fler. Videre kan denne metoden anvendes på andre forbindelser i form av anioniske og kationiske tensider, ved bruk av andre kompatible visualiseringsreagenser. Dersom det er ønskelig å analysere alle tensidklasser som inkluderer ikke-ioniske tensider, kan det gjøres en vurdering å utføre analyser ved bruk av prøveopparbeidelse med derivatisering av tensidforbindelser som skal analyseres.

7. Referanser

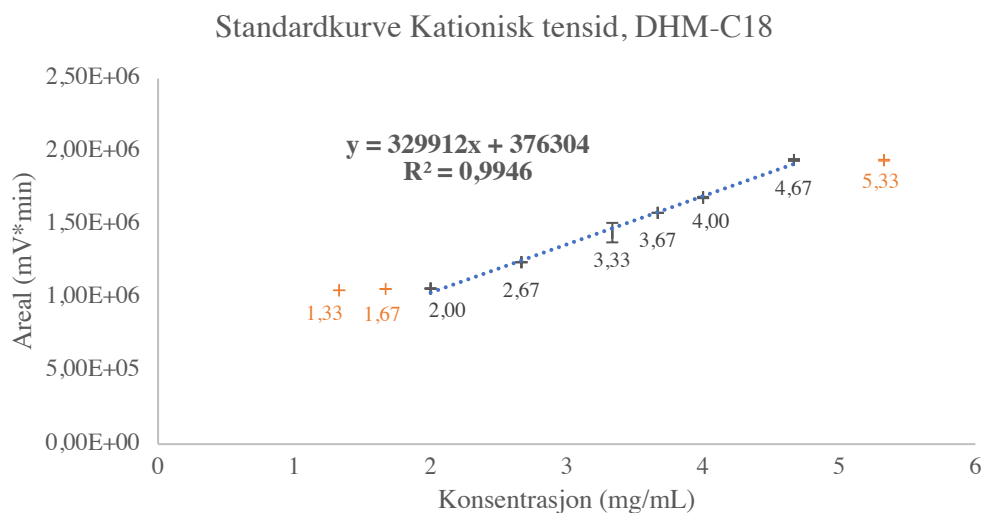
- Ahmed, E., (2020). "Breaking Down" Surfactants: What they are, how they work, and their role in the pandemic. Dispersa.Inc. Hentet 25.februar.2022
<https://www.dispersa.ca/blog/what-are-surfactants-and-how-do-they-work/>
- Al-Sabagh, A. M., Nasser, N. M., Migahed, M.A., Kandil, N.G., (2011). *Effect of chemical structure on the cloud point of some new non-ionic surfactants based on bisphenol in relation to their surface active properties*. Egyptian Journal of Petroleum. Volume 20, Issue 2 Pages: 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2011.06.006>
- Coskun, O., (2016). *Separation techniques: Chromatography*. North Clin Istanbul. 3(2):156–60. <https://dx.doi.org/10.14744/2Fnci.2016.32757>
- Cullum, D. C., (1994). *Introduction to surfactant analysis*. Springer-Science+Buisness Media. Pages: 352 ISBN 978-94-010-4574-2
- Davidsohn, A.S., (2021). *Soap and detergent*. Encyclopedia Britannica. Hentet 5. Mars. 2022
<https://www.britannica.com/science/soap>
- Dionex, (2009). *Product manual for Acclaim Surfactant*. Dionex Corporation. Document No.0650987. Hentet 20. Februar .2022
<http://www.cromlab.es/Articulos/Columnas/HPLC/Thermo/Acclaim/SURF/41787-Man-065087-03Acclaim-Surfactant-Jul09.pdf>
- Dong, M. W., Wysocki, J., (2019). *Ultraviolet Detectors: Perspectives, Principles and Practices*. LCGC North America. Volume 37, Issue 10 Pages: 750–759
<http://www.cromlab.es/Articulos/Columnas/HPLC/Thermo/Acclaim/SURF/41787-Man-065087-03Acclaim-Surfactant-Jul09.pdf>
- Dufour, A., Thiébaud, D., Ligiero, L., Loriau, M., Vial, J., (2020). *Chromatographic behavior and characterization of polydisperse surfactants using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography hyphenated to High-Resolution Mass Spectrometry*. Journal of Chromatography A, Elsevier, 2020, 1614, pp.460731. [ff10.1016/j.chroma.2019.460731](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460731) ff. [ffhal-03078576f](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460731)
- Egeland, E.S., (2021). *Emulgator*. Store Norske Leksikon. Hentet 4. Mars. 2022.
<https://snl.no/emulgator>
- Ekeberg, D., 2022. Norges miljø- og biovitenskapelige universitet, Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM), Ås. *Personlig fortalt*.
- Farn, R. J., (2006). *Chemistry and Technnology of Surfactants*. Blackwell publishing. Pages: 336 Pages. ISBN-13: 978-14051-2696-0
- Fainerman, V. B., Möbius, D., Miller, R., (2001). *Surfactants Chemistry, Interfacial Properties, Applications*. Elsevier. Volume 13, Pages 1-661. ISBN: 978-0-444-50962-8
- Falbe, J., (1987). *Surfactants in Consumer Products, Theory, Technology and Application*. Springer, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-71545-7>
- Falk, N. A., (2019). *Surfactants as Antimicrobials: A Brief Overview of Microbial Interfacial Chemistry and Surfactant Antimicrobial Activity*. Journal of surfactants and detergents vol. 22,5 (2019): 1119-1127. doi:10.1002/jsde.12293
- Friedli, F. E., (2001). *Detergency of speciality surfactants*. Marcel dekker. Surfactant science series volume 98. ISBN:0-8247-0491-6
- Gupta, P. C., (2015). *Method Validation of Analytical Procedures*. PharmaTutor. 3(1); 32-39. ISSN: 2347 - 7881
- Hofstad, K.,(2019). Overflatespenning (enhet). Store norske leksikon. Hentet 25. februar.2022
https://snl.no/overflatespenning_-_enhet
- Im, S. H., Jeong, Y. H., Ryoo, J. J., (2008). *Simultaneous analysis of anionic, amphoteric,*

- nonionic and cationic surfactant mixtures in shampoo and hair conditioner by RP-HPLC/ELSD and LC/MS.* Analytica Chimica Acta, Volume 619, Issue 1, Pages 129-136, ISSN 0003-2670, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.03.058>.
- IndexBox AI Platform, (2021). The Global Soap and Detergent Market Expands Eco-Friendly Product Lines to Meet Growing Demand. Global trade. Hentet. 05.oktober.2022 <https://www.globaltrademag.com/the-global-soap-and-detergent-market-expands-eco-friendly-product-lines-to-meet-growing-demand/>
- Ivanković, T., Hrenović, J., (2010). *Surfactants in the Environment.* Archives of Industrial Hygiene and Toxicology, vol.61, no.1, pp.95-110. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-61-2010-1943>
- Johansson, I., Somasundaran, P., (2007). *Handbook for cleaning/decontamination of surfaces.* Elsevier. Pages: 992, 1st Edition. ISBN: 9780080555539
- Joshi, T. P., (2017). *A short history and preamble of surfactants.* International Journal of Applied Chemistry. Research India Publications. Volume 13, Number 2 pp. 283-292, ISSN 0973-1792.
- Laurén, S., (2019). What is the difference between surface and interfacial tension). Biolinn Scientific. Hentet 25.februar.2022 <https://www.biolinnsientific.com/blog/what-is-the-difference-between-surface-and-interfacial-tension>
- Lister, A. S., (2005). 7 - *Validation of HPLC Methods in Pharmaceutical Analysis.* Separation Science and Technology, Academic Press. Volume 6, Pages 191-217. [https://doi.org/10.1016/S0149-6395\(05\)80051-0](https://doi.org/10.1016/S0149-6395(05)80051-0)
- Majors, R. E., (2007). *Column Pressure Considerations in Analytical HPLC.* LCGC North America, Volume 25, Issue 11, Pages: 1074–1092. Hentet 15.mars.2022 <https://www.chromatographyonline.com/view/column-pressure-considerations-analytical-hplc-0>
- Miller, J. M., (2009). *Chromatography - Concepts and Contrasts* (2 ed.). John Wiley and Sons. Pages: 520. ISBN: 978-0-470-53025-2.
- Mishra, S., Tyagi, V. K., (2007). *Esterquats: the novel class of cationic fabric softeners.* J Oleo Sci. 2007;56(6):269-76. Doi:10.5650/jos.56.269
- Piorr, R., (1987). *Structure and Application of Surfactants.* Falbe, J. (eds) Surfactants in Consumer Products. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-71545-7_2
- Poole, C. F., 2003. *The essence of chromatography.* Department of Chemistry, Detroit, USA: Elsevier.
- Wibetoe, G. S. E., 2021. *Høypresisjonsvæskekromatografi*, s.l.: Store norske leksikon.
- Zahrobsky, M., Camporese, D., Rist, Ø., Carlsen, P. H. J., (2005). Analysis of aliphatic sulfonate surfactants using ion-pair detection. Molecules 2005, 10, Pages 1179-1189. <https://doi.org/10.3390/10091179>

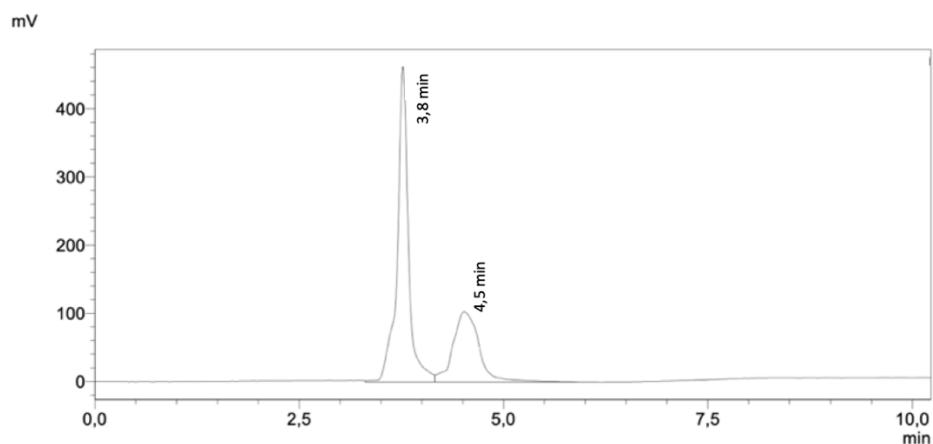
8. Vedlegg



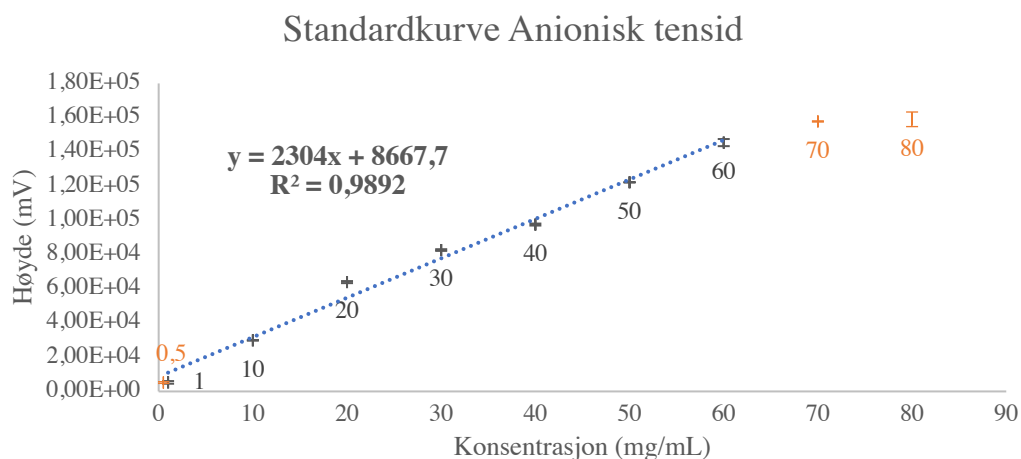
Figur I. Standardkurve for DHM-C16 tensidene. Fremstilt av ekstern DHM standarder, med areal (mV*min) på y-aksen og konsentrasjoner på x-aksen. Sort avvik betegner standardavviket for hver standard konsentrasjon, oppnådd ved analyse av standardene ved to paralleller. Oransje datapunkter viser til konsentrasjonen hvor kurven flater seg ut og faller utenfor det lineære området.



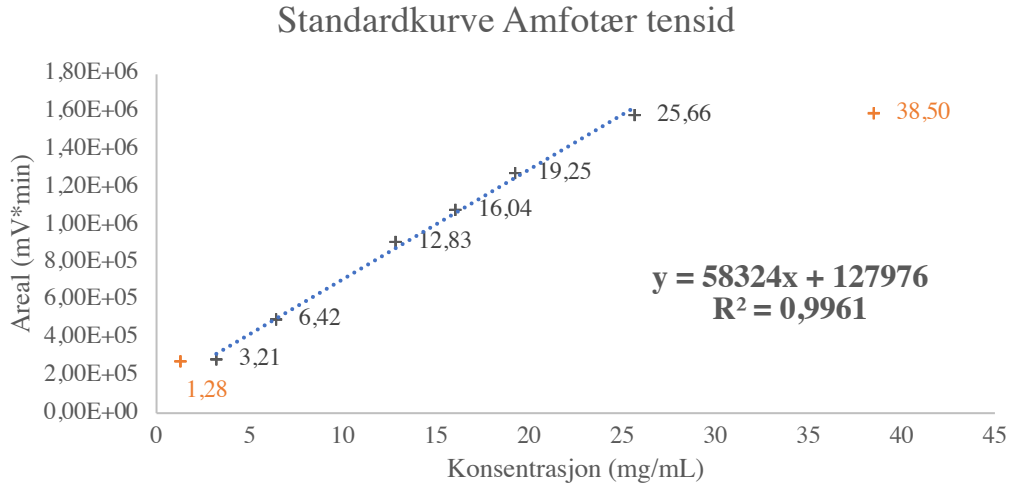
Figur II. Standardkurve for DHM-C18 tensidene. Fremstilt av ekstern DHM standarder, med areal (mV*min) på y-aksen og konsentrasjoner på x-aksen. Sort avvik betegner standardavviket for hver standard konsentrasjon, oppnådd ved analyse av standardene ved tre paralleller. Oransje datapunkter viser til konsentrasjonen hvor kurven flater seg ut og faller utenfor det lineære området.



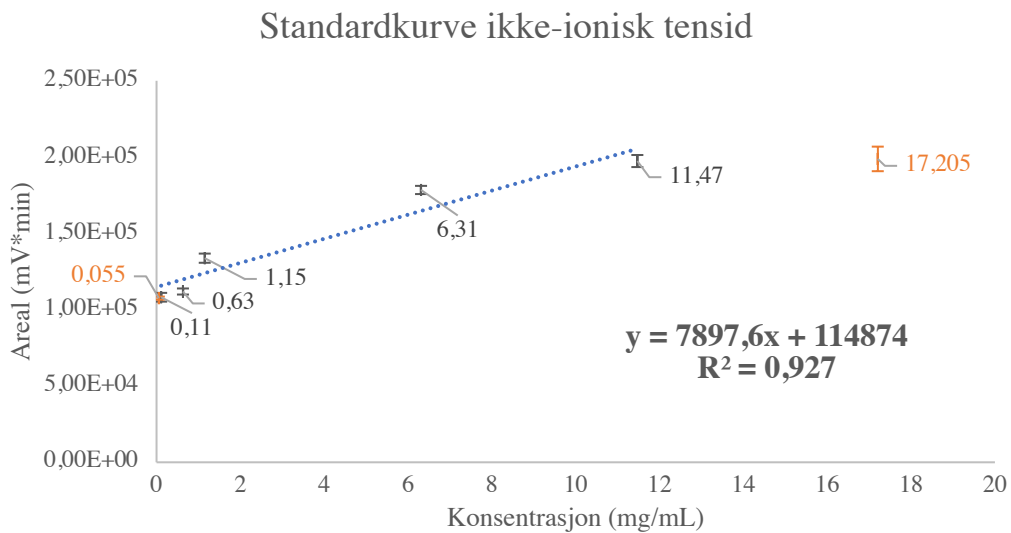
Figur III. Undersøkte antakelse om koeluering av andre komponenter i produkt 3. Det ble testet ulike konsentrasjoner av mobilfase A og B, som resulterte i samme kromatogram. (Eksempler på konsentrasjoner som ble testet var 40(A):60(B) og 90(A):10(B))



Figur IV, Standardkurve for anionisk tensid, SLES. Fremstilt med høyde (mV) på y-aksen og konsentrasjoner på x-aksen. Sort avvik betegner standardavviket for hver standard konsentrasjon, oppnådd ved analyse av standardene ved tre paralleller. Oransje datapunkter viser til konsentrasjonen hvor kurven flater seg ut og faller utenfor det lineære området.



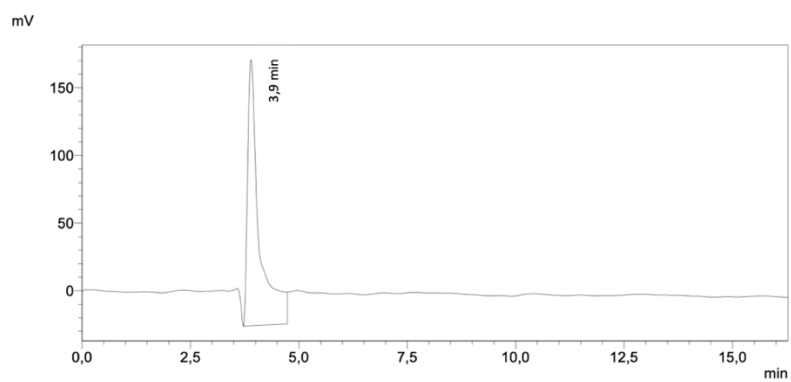
Figur V, Standardkurve for amfotær tensid, lauraminoksid. Fremstilt med areal (mV*min) på y-aksen og konsentrasjoner på x-aksen. Sort avvik betegner standardavviket for hver standard konsentrasjon, oppnådd ved analyse av standardene ved tre paralleller. Oransje datapunkter viser til konsentrasjonen hvor kurven flater seg ut og faller utenfor det lineære området.



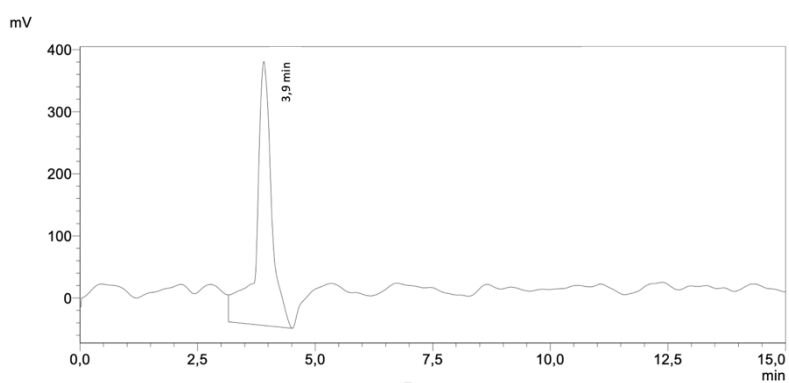
Figur VI, Standardkurve for ikke-ionisk tensid, 2-etoksyntadekan-1-ol. Fremstilt med areal (mV*min) på y-aksen og konsentrasjoner på x-aksen. Sort avvik betegner standardavviket for hver standard konsentrasjon, oppnådd ved analyse av standardene ved tre paralleller. Oransje datapunkter viser til konsentrasjonen hvor kurven flater seg ut og faller utenfor det lineære området



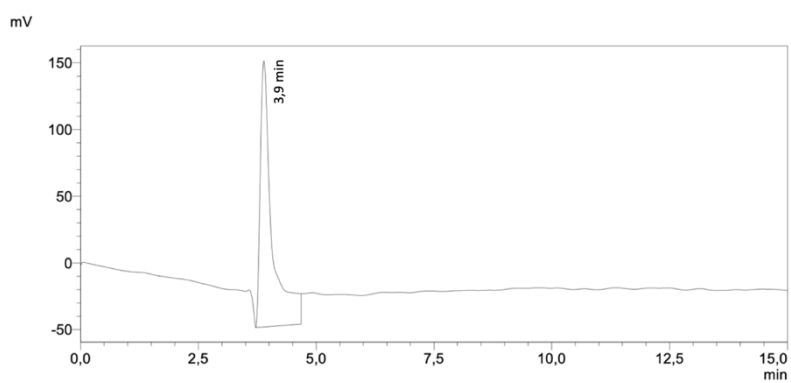
Figur VII. Bilde av baselinjen før montering av mobilfase mixer



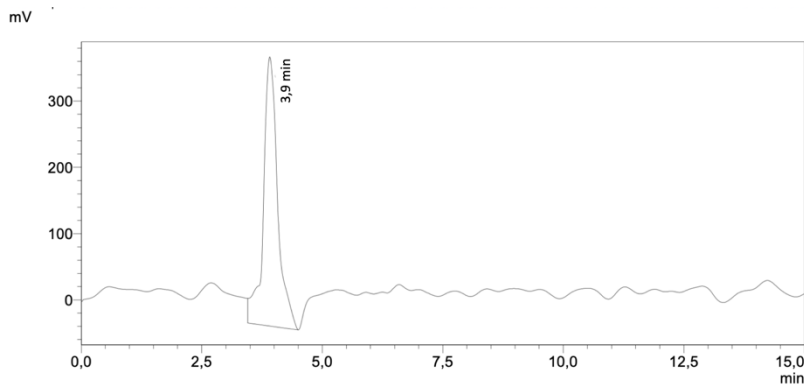
Figur VIII. Kromatogram av anionisk tensid 10 mg/mL



Figur IX. Kromatogram av ikke-ionisk tensid 10 mg/mL

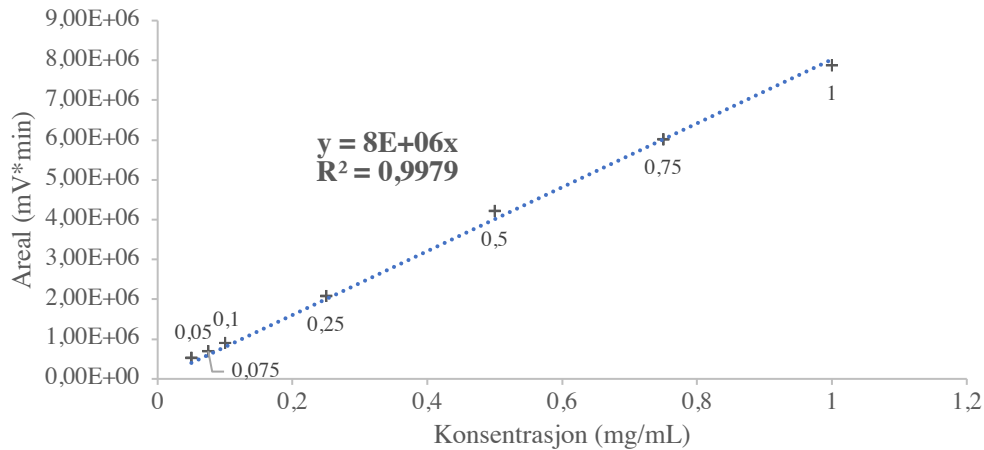


Figur X. Kromatogram av amfotær tensid 10 mg/mL

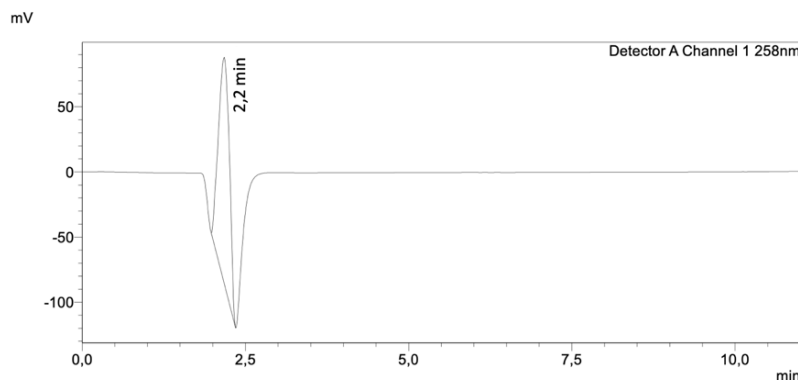


Figur XI. Kromatogram av ikke ionisk tensid 5 mg/mL. Det ble laget en 10 mg/mL løsning i utgangspunktet, men ble fortynnet som følge av at topp til 10 mg/mL ikke dannet symmetrisk topp

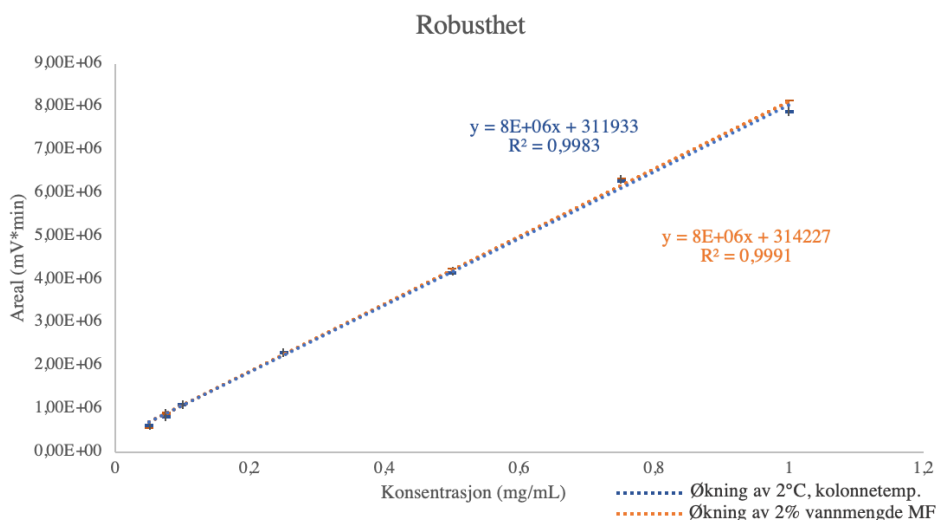
Standardkurve av anionisk tensid (IPD)



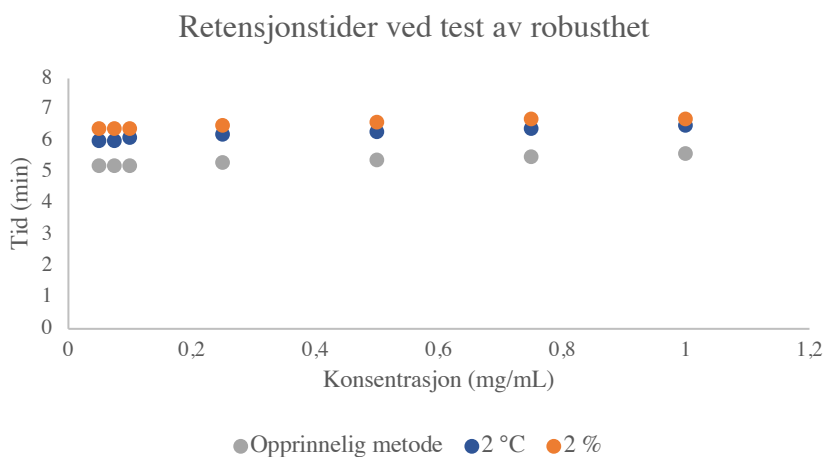
Figur XII. Standardkurve for anionisk tensid, SLES, dannet med IPD metoden. Fremstilt med høyde (mV) på y-aksen og konsentrasjoner på x-aksen. Sort avvik betegner standardavviket for hver standard konsentrasjon oppnådd ved analyse av standardene ved 5 paralleller



Figur XIII. Kromatogram av anioniske tensidet SLES som kompleksforbindelse med MPI reagens, ved konsentrasjon 1 mg/mL. Målt ved bølgelengde 258 nm. Analysert på en Acclaim surfactant kolonne. Topp ved 2,2 min viser til MPI reagens, før innstilling av likevekt.



Figur XIX. Standardkurve laget fra analyser av SLES standarder med endret betingelser for å teste robustheten av metoden



Figur XX. Retensjonstidene av de ulike standard konsentrasjonene, hentet fra å endre betingelsene for de ulike parameterne (mobilfase og kolonne temperatur)



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway