# Methodenentwicklungen zur Analyse und Charakterisierung komplexer kosmetischer Rohstoffe mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

Untersuchung von Paraffinen, Wollwachs und Wollwachsprodukten und kohlenhydrat-basierten Polymeren

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Julia K. Pruns**

aus Hamburg

Hamburg 2003

1. Gutachter: Prof. Dr. W. A. König

2. Gutachter: Prof. Dr. W. Francke

Tag der Disputation: 5. Februar 2004

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2000 bis November 2003 unter der Leitung von Prof. Dr. W. A. König am Institut für Organische Chemie der Universität in Hamburg durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. W. A. König danke ich für seine konstruktive Betreuung und wissenschaftliche Unterstützung sowie für die Ermöglichung einer Kooperation mit der Industrie und das fortwährende Interesse während der Anfertigung dieser Arbeit.

# Inhaltsverzeichnis

**1 Einleitung 1**

**2 Zielsetzung 3**

**3 Allgemeiner Teil 4**

3.1 Massenspektrometrie ..... 4

3.1.1 Geschichte und Techniken in der Massenspektrometrie ..... 4

3.1.2 LDI-TOF und MALDI-TOF Massenspektrometrie ..... 8

3.1.3 MALDI-TOF Methoden ..... 10

3.1.4 Auswertung von MALDI-TOF Spektren ..... 12

3.2 Multivariate Datenauswertungen ..... 13

3.3 Kernmagnetische Resonanz Spektroskopie (NMR) ..... 15

3.3.1 Prinzip der NMR-Spektroskopie ..... 15

3.4 Paraffinöle, mikrokristalline Wachse und Vaseline ..... 16

3.4.1 Grundlagen ..... 16

3.4.2 Analyse von Paraffinen ..... 18

3.5 Wollwachs und Wollwachsprodukte ..... 19

3.5.1 Grundlagen ..... 19

3.5.2 Analysenmethoden ..... 21

3.6 Chitosane, Polyquaternium-10 und Guar-HPTMA ..... 21

3.6.1 Grundlagen ..... 21

**4 Spezieller Teil 24**

4.1 MALDI-TOF MS von Paraffinen ..... 24

4.1.1 Methodenentwicklung ..... 24

4.1.2 Ionisierungsverhalten von Paraffinen in der LDI-TOF MS ..... 46

4.1.3 Interpretation der MALDI-TOF Massenspektren ..... 58

4.1.4 Vergleich und Ergänzung der MALDI-TOF MS Methode mit GC, GPC, FD-MS, NMR und anderen Methoden ..... 67

4.1.5 Charakterisierung der LDI-TOF Spektren mittels PCA ..... 87

4.2 MALDI-TOF MS von Wollwachs ..... 94

4.2.1 Kationen ..... 94

4.2.2 Matrices ..... 95

4.2.3 Charakterisierung von Wollwachs ..... 96

4.2.4 Charakterisierung von Wollwachsalkoholen (Eucerit®) ..... 102

4.2.5 Charakterisierung von Wollwachssäuren ..... 104
4.2.6 Charakterisierung von Glyceryl Lanolate (Neocerit®) ..... 106
4.2.7 Zusammenfassung ..... 109
4.3 Analytik von Chitosan, Guar-HPTMA und Polyquaternium-10 nach Hydrolyse ..... 110
4.3.1 Methodenentwicklungen ..... 110
4.3.2 Analyse von Chitosan, Guar-HPTMA und Polyquaternium-10 nach Hydrolyse ..... 118
4.3.3 Zusammenfassung ..... 126

**5 Zusammenfassung 128**

**6 Summary 130**

**7 Experimenteller Teil 132**
7.1 MALDI-TOF Massenspektrometer ..... 132
7.2 LDI-TOF MS von Paraffinen und Wachsen ..... 133
7.2.1 Testen von 29 Matrices ..... 133
7.2.2 Optimierung des Silber/Proben-Verhältnisses: ..... 133
7.2.3 Lösemittelfreie Präparation ..... 134
7.2.4 Abhängigkeit der Dehydrierung, des Signal/Rausch-Verhältnisses und der Auflösung von der Laserenergie ..... 135
7.2.5 Charakterisierung von Paraffinen ..... 136
7.2.6 Hauptkomponentenanalyse der Paraffinöle und Vaseline ..... 136
7.3 Gaschromatographie ..... 137
7.4 UV-Spektrophotometrie ..... 138
7.4.1 Photometrie der Matrices ..... 138
7.5 Felddesorptions- und Feldionisations-MS ..... 140
7.6 GPC ..... 141
7.7 NMR-Spektroskopie ..... 141
7.7.1 Nachweisgrenzenbestimmung von Olefinen ..... 142
7.8 Methodenentwicklung für Wollwachs ..... 142
7.9 Methodenentwicklung für Chitosan, Guar-HPTMA und Polyquaternium-10 ..... 144
7.10 Saure Hydrolyse von Chitosan, Polyquaternium-10 und Guar-HPTMA ..... 145

**8 Anhang** **147**

8.1 UV-Spektren der Matrices ..... 147

8.2 MALDI-TOF Massenspektren von Wachsen ..... 161

8.3 Tabellenanhang ..... 163

8.3.1 Ergebnistabelle der NMR-Versuche ..... 163

8.3.2 Tabellen zu Wollwachs und Wollwachsprodukten ..... 163

8.3.3 Tabellen zu Polyquaternium-10 ..... 166

8.3.4 Tabellen zu Guar-HPTMA ..... 167

8.3.5 Tabellen zu Chitosan ..... 168

8.4 Chemikalien- und Gefahrstoffanhang ..... 169

**9 Literaturverzeichnis** **172**

# Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| Abb. | Abbildung |
| 3-AC | 3-Aminochinolin |
| 9-ACA | 9-Anthracencarbonsäure |
| a.i. | absolute Intensität |
| amu | atomic mass unit |
| ANT | Anthracen |
| 9-BA | 9-Bromanthracen |
| BDNA | 2-Brom-4,6-dinitroanilin |
| 9-CA | 9-Chloranthracen |
| $C_n$ | Kohlenstoffkettenlänge n |
| 3-CCA | 3-Hydroxy-$\alpha$-cyanozimtsäure |
| 4-CCA | 4-Hydroxy-$\alpha$-cyanozimtsäure |
| CSA | 5-Chlorsalicylsäure |
| Da | Dalton |
| DHB | 2,5-Dihydroxy-benzoesäure |
| DT | Dithranol |
| EGS | Ethylenglycolmonosalicylester |
| EI | Elektronenstoß-Ionisierung |
| ESI | Elektrospray-Ionisierung |
| FA | Ferulasäure |
| FAB | Fast Atom Bombardment |
| FD | Felddesorption |
| FI | Feldionisation |
| FUC | L-Fucose |
| GC | Gaschromatographie |
| GLY | Glycerin |
| GPC | Gelpermeationschromatographie |
| HABA | 2-(4'-Hydroxybenzolazo)-benzoesäure |
| HPTMA | Hydroxypropyl-trimethylammoniumchlorid |
| IAA | 3-Indolacrylsäure |
| INCI | International Nomenclature of Cosmetic Ingredients |
| LC | Flüssigchromatographie |
| LD | Laserdesorption |
| LDI | Laserdesorption-Ionisation |

| | |
|---|---|
| MALDI | Matrix-assisted laser desorption/ionization |
| min. | Minute |
| MS | Massenspektrometrie |
| MSA | 5-Methoxysalicylsäure |
| m/z | Masse pro Ladung |
| n | Anzahl der Messwerte |
| 9-NA | 9-Nitroanthracen |
| NIC | Nicotinsäure |
| NMR | Kernresonanzspektroskopie |
| NPD | 2-Nitrophenyldodecylether |
| NPO | 2-Nitrophenyloctylether |
| OD | 2-Octyldodecanol |
| OG | Octylglucopyranosid |
| o/w | Öl in Wasser |
| PD | Polydispersität (Verteilungsbreite) |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PIC | 3-Hydroxypicolinsäure |
| POPOP | 1,4-Bis(5-phenyl-2-oxazolyl)-benzen |
| PPG | Polypropylenglycol |
| PSD | Post source decay |
| RET | t-Retinolsäure |
| SA | Sinapinsäure |
| SD | Standardabweichung |
| sec. | Sekunde |
| S/N | Signal zu Rausch-Verhältnis |
| Tab. | Tabelle |
| TFA | Trifluoressigsäure bzw. Trifluoroacetat |
| THA | 2,4,6-Trihydroxyacetophenon |
| THF | Tetrahydrofuran |
| TOF | time-of-flight |
| UV | ultraviolett |
| V | Volt |
| w/o | Wasser in Öl |

# 1 Einleitung

Kosmetische Mittel sind in der Regel komplex zusammengesetzte Gemische aus vielen verschiedenen Rohstoffen [1]. Diese dienen unterschiedlichen Aufgaben in dem jeweiligen Produkt und können durch ihre Zusammensetzung und Qualität das fertige Produkt beeinflussen. Viele dieser Rohstoffe sind ihrerseits vielfältig zusammengesetzt, so dass häufig eine Kenntnis der genauen chemischen Zusammensetzung nicht vorliegt. Oftmals können kleine Qualitätsunterschiede eines Rohstoffes die Stabilität oder andere Eigenschaften eines kosmetischen Mittels stark verändern.

Paraffinöle (*Paraffinum liquidum*), mikrokristalline Wachse (*Cera microcristallina*) und Vaseline (*Petrolatum*) sind unpolare Rohstoffe petrochemischen Ursprungs. Sie sind weit verbreitet in Produkten auf Emulsionsbasis wie Cremes, Lotions, Babyölen oder Lippenstiften [1]. Herkunftsbedingt können Paraffinrohstoffe aus hunderten – wenn nicht sogar tausenden – Inhaltsstoffen bestehen. Die Zusammensetzung kann je nach Ort der Erdölgewinnung sowie der Verarbeitung variieren.

Ebenfalls sehr vielschichtig zusammengesetzt sind Wollwachse und Wollwachsprodukte. Dabei handelt es sich um das Wollfett, das der Schafwolle anhaftet. Dieses kann nach der Wollwäsche aus der Waschflotte zurück gewonnen werden. Das Wollwachs und seine Derivate finden in der kosmetischen und pharmazeutischen Industrie vielfach Anwendung aufgrund ihrer hautpflegenden oder sogar wundheilenden Eigenschaften. Wollwachsprodukte werden zusätzlich auch als so genannte „Wasser-in-Öl“ (w/o) Emulgatoren eingesetzt [2].

Um die Zusammensetzung eines Rohstoffes aufklären und die Qualität beurteilen zu können, sind leistungsfähige Analysenverfahren notwendig. Die MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight*) Massenspektrometrie ermöglicht aufgrund der Anregung mittels eines Laserimpulses eine besonders weiche Form der Ionisierung. Dies macht es möglich, komplexe Gemische als solche massenspektrometrisch zu untersuchen, da – im Gegensatz zur Elektronenstoßionisierung (*Electron impact,* EI), fast keine Fragmentierungen auftreten.

Die MALDI-TOF Massenspektrometrie wurde daher neben ihrem Haupteinsatzfeld, der Analyse von Proteinen und Peptiden [3-10], auch zur Analyse von Polymeren eingesetzt [11-21]. Da die Bildung relativ stabiler Ionen in der Gasphase für eine erfolgreiche massenspektrometrische Untersuchung notwendig ist, wurden zuerst vor allem relativ polare Polymere wie z. B. ethoxylierte oder propoxylierte Rohstoffe analysiert [22, 23]. Unpolarere Rohstoffe wie Polystyrole und Polybutadiene sind schwieriger zu analysieren [24-31]. Eine Ionisierung gelingt aber dennoch, indem Silber-, Kupfer- oder andere Kationen-Addukte der unpolaren Moleküle erzeugt werden.

Methodenentwicklungen in der MALDI-TOF Massenspektrometrie sind häufig mit einem hohen Zeitaufwand verbunden, da die genauen Vorgänge des Desorptions- und Ionisierungsprozesses noch nicht genau aufgeklärt sind. Vielmehr basieren neue MALDI-TOF Methoden oftmals auf empirischen Studien zur Ermittlung der günstigsten Matrix, geeigneter Zusätze von Metallsalzen und optimaler technischer Bedingungen.

Die MALDI-TOF Methode bietet ein hohes Potential zur Analyse komplexer Gemische, insbesondere wenn diese von oligomerer oder polymerer Natur sind. Dieses kann besonders hilfreich sein, um die Zusammensetzung vielschichtiger kosmetischer Rohstoffe näher zu charakterisieren.

Eine derartig entwickelte massenspektrometrische Methode kann – in Verbindung mit einem geeigneten Auswerteverfahren – helfen, die chemische Zusammensetzung von Rohstoffen zu untersuchen und Abweichungen in der Qualität abzubilden. Weiterhin ist die MALDI-TOF Massenspektrometrie geeignet, um interdisziplinär mit anderen Verfahren (z. B. der Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie, LC/MS, oder der Kernresonanz-Spektroskopie, NMR) das Wissen über bestimmte Rohstoffe oder Rohstoffklassen zu vertiefen.

# 2 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen komplex zusammengesetzte kosmetische Rohstoffe mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie charakterisiert werden. Hierfür gilt es, die optimalen Geräte- und Präparationsbedingungen zu finden, was erst durch systematische Methodenentwicklungen erreicht werden kann. Ein weiterer Schwerpunkt stellt die detaillierte Interpretation und Auswertung der Massenspektren dieser vielschichtig zusammengesetzten Rohstoffe dar.

Weiterhin soll die Anwendbarkeit der MALDI-TOF Massenspektrometrie für Wollwachs und Wollwachsprodukte geprüft werden, ebenso für komplex zusammengesetzte Rohstoffe auf Hexosebasis wie Chitosan, Polyquaternium-10 und Guar Hydroxypropyl-trimethylammoniumchlorid (Guar-HPTMA).

Dabei ergaben sich folgende Aufgaben:

- Systematische Methodenentwicklung für die MALDI-TOF Massenspektrometrie von Paraffinölen, mikrokristallinen Wachsen und Vaseline
- Entwicklung einer Methode zur reproduzierbaren Auswertung der komplexen Massenspektren mittels chemometrischer Verfahren
- Anwendung von anderen Analysenverfahren (u. a. NMR, Gaschromatographie (GC)) zur Charakterisierung der Paraffine und Vergleich mit den MALDI-TOF Ergebnissen.
- MALDI-TOF Methodenentwicklung und Charakterisierung von Wollwachsen und Wollwachsprodukten.
- MALDI-TOF Methodenentwicklung und Charakterisierung von Chitosanen, Polyquaternium-10 und Guar-HPTMA z. T. nach saurer Hydrolyse

# 3 Allgemeiner Teil

## 3.1 Massenspektrometrie

### 3.1.1 Geschichte und Techniken in der Massenspektrometrie

Die Anfänge der Massenspektrometrie lassen sich bis in das Jahr 1899 zurückverfolgen, in dem *J. Thomson* erste Experimente zur Massenspektrometrie veröffentlicht hatte [32]. Die Arbeiten von *A. J. Dempster* und von *F. W. Aston* ermöglichten später die Auftrennung und den Nachweis der verschiedenen natürlichen Isotope [33-35]. Der Durchbruch in der instrumentellen chemischen Analytik erfolgte in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts. Heute ist die Massenspektrometrie neben der NMR eine der wichtigsten Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung chemischer Verbindungen.

Bei der Massenspektrometrie wird der Analyt zunächst ionisiert und in die Gasphase überführt. Anschließend werden die Ionen im Vakuum durch einen Massenanalysator gemäß ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis ($m/z$) getrennt und schließlich detektiert. Besonders das verwendete Ionisierungsverfahren und der Massenanalysator beeinflussen die Charakteristika der Massenspektren. Im Folgenden sollen diese Bauteile daher näher vorgestellt werden.

#### Ionenquelle

Die Ionenquelle stellt zusammen mit dem Einlass-System ein entscheidendes Merkmal des Massenspektrometers dar. Die Elektronenstoß-Ionisierung (**EI**) ist die klassische Ionisierungsmethode der Massenspektrometrie [36]. Die Proben müssen gasförmig in die unter Hochvakuum stehende Quelle eingeführt werden, wo sie mit einen Elektronenstrahl beschossen und hierdurch ionisiert werden (siehe Gl. 1).

$$\mathrm{M} + e^- \rightarrow \mathrm{M}\bullet^+ + 2e^- \qquad \textbf{Gl. 1}$$

Diese relativ harte Form der Ionisierung führt zu einer mehr oder minder starken Fragmentierung, welche für das jeweilige Ion charakteristisch ist. Durch die Standardisierung des Elektronenstrahls auf 70 eV, besitzen die Massenspektren eine hohe Reproduzierbarkeit. Infolgedessen sind umfangreiche Spektrenbibliotheken vorhanden, die bei einer Identifizierung unbekannter Substanzen eingesetzt werden können. Die EI besitzt heutzutage immer noch eine recht hohe Bedeutung, insbesondere als Detektionsmethode für die Gaschromatographie, die für eine Kopplung mit der EI-MS besonders geeignet ist.

Bei der Chemischen Ionisierung (**CI**) wird durch Elektronenstoß-Ionisierung ein sog. Reaktandgas ionisiert. Hierdurch entstehen relativ energiereiche Primärionen, welche durch Ionen-Molekül-Reaktionen die Probe ionisieren [37]. Die CI ist insgesamt eine wesentlich schonendere Ionisierungsform als die EI. Es entstehen generell energieärmere $[M+H]^+$-Ionen und damit auch weniger Fragmente.

Die Thermospray-Ionisierung ermöglicht eine Kopplung der Flüssigchromatographie mit der Massenspektrometrie. Das Lösemittel wird durch Erhitzen verdampft, während die Tröpfchen durch eine Kapillare in den Vakuumbereich fließen. Die Ionen werden dort durch Coulomb-Explosionen freigesetzt. Weiterentwicklungen stellen die Ionisierung bei Atmosphärendruck (**API**) und die chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck (**APCI**). Durch ein starkes elektrostatisches Feld zwischen der Sprühnadel und einer Gegenelektrode bei der Elektrospray Ionisierung (**ESI**) konnte eine besonders weiche Ionisierung erreicht werden [38, 39]. Durch ihre hohe Empfindlichkeit und die ausgezeichneten Kopplungsmöglichkeiten mit der Flüssigchromatographie ist die ESI-MS heute eines der wichtigsten massenspektrometrischen Ionisierungsverfahren, um polare organische Substanzen, insbesondere Proteine und Peptide sowie Polymere zu analysieren.

Bei der Felddesorptions- (**FD/MS**) und Feldionisations-Massenspektrometrie (**FI/MS**) wird ebenfalls ein elektrisches Feld verwendet, um die Probe zu ionisieren und zu desorbieren. Diese Verfahren eignen sich besonders, um unpolare Stoffe zu analysieren [40, 41]. FI- bzw. FD/MS sind verglichen mit der MALDI-TOF MS schon recht alte Verfahren. Der Begriff „Feldionisa-

tion“ wird zum ersten mal bereits 1972 von *Severin et al*. erwähnt [41]. Die FI- und FD/MS wurde bereits von Anfang an zur Analyse von Mineralölfraktionen eingesetzt [40, 42]. Das Prinzip der FD/MS ist in Abb. 1 dargestellt.

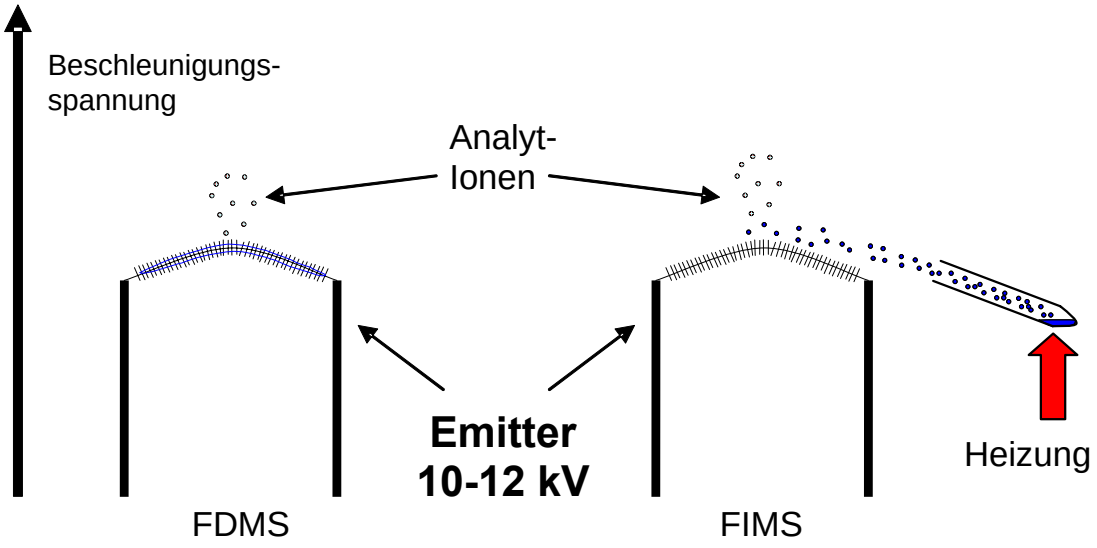



**Abb. 1. Prinzip der Feldionisations- und Felddesorptionsmassenspektrometrie.**

Bei der FI/MS wird der Analyt verdampft. Beim Passieren des Wolfram-Emitters werden die Moleküle durch ein starkes elektrisches Feld ionisiert. Für die FD/MS wird eine Probenlösung direkt mit einer Mikroliterspritze auf den Emitter dosiert. Dieser wird danach in das Gerät eingeschleust. Auch hier werden die Ionen durch das elektrische Feld erzeugt, wobei die Ionenausbeute bei der FD/MS wesentlich höher ist als bei der FI/MS, da sich die Analytmoleküle direkt im elektrischen Feld auf dem Emitter befinden.

Um Oberflächenanalysen durchzuführen, lässt sich die Sekundärionenmassenspektrometrie (**SIMS**) einsetzen, bei der die feste Oberfläche mit einem Partikelstrahl beschossen wird, der Sekundärionen herausschlägt. Bettet man die Analytmoleküle in eine schwerflüchtige flüssige Matrix ein, so kann diese den Ionisierungsprozess unterstützen. In der Annahme, dass der Beschuss nur mit schnellen Atomen durchgeführt werden könne, wurde dieses Verfahren Fast Atom Bombardment (**FAB**) genannt [37].

Auch bei der *Laser Desorptions Ionisierung* (**LDI**) konnte durch die Verwendung einer Matrix eine wesentliche Verbesserung der Analysenbedin-

gungen herbei geführt werden. Die daraus resultierende matrix-assisted laser desorption/ionisation (**MALDI**)-Quelle wird in Kapitel 3.1.2 ausführlich behandelt.

**Massenanalysatoren**

Im Massenanalysator werden die von der Ionenquelle kommenden Ionen nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis ($m/z$) getrennt. Hierfür haben sich im Wesentlichen vier unterschiedliche Verfahren durchgesetzt. **Sektorfeld-Instrumente** kombinieren ein Magnetfeld und ein elektrisches Feld miteinander und können dadurch eine hohe Auflösung erreichen. Auch die Trennung der Ionen in dem Hochfrequenzfeld eines **Quadrupol-Stabsystems** ist weit verbreitet. Eine weitere Möglichkeit ist das Einfangen der Ionen in einer elektrischen (**Ion Trap**, IT) oder magnetischen Ionenfalle (**Ionenzyklotron-Resonanz-Zelle**, ICR) mit anschließender Massenanalyse. Gerade letzteres Verfahren (insbesondere die Fourier-Transform-ICR (**FT-ICR**) ermöglicht extrem hohe Auflösungen und eine hohe Massengenauigkeit, weshalb sie immer mehr Bedeutung erlangt hat.

Die Flugzeit-Massenspektrometrie (**Time-of-Flight**, TOF) ermittelt die Ionenmasse über deren Flugzeit von der Quelle zum Detektor. Der erste TOF Detektor wurde bereits 1948 von *Cameron und Eggers* vorgestellt [43]. Das dort beschriebene Gerät war aufgrund seiner schlechten Auflösung praktisch kaum nutzbar. Bereits in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts folgten aber erste Geräte mit praktischem Nutzwert [44, 45]. Die Flugzeit-Massenspektrometrie ermöglicht prinzipiell einen unbegrenzten messbaren Massenbereich. Hinzu kommt, dass in einem Linear-TOF auch neutrale Teilchen detektiert werden können. Die Funktionsweise wird in Kapitel 3.1.2 näher behandelt.

Die Kombination von mehreren Massentrennverfahren wie z. B. Quadrupol-TOF („Q-TOF“) oder auch die Hintereinanderschaltung mehrerer Quadrupole („Triple-Quad“) sowie die Ionenfalle ermöglichen MS-MS bzw. sogar $MS^n$-Analysen. Durch letztere können auch Fragment-Ionen weiter fragmentiert werden, um Anhaltspunkte über die Struktur zu erhalten. Die Qualität bzw. Intensität der Massenspektren nimmt mit jeder weiteren MS-Ebene ab, wobei die Selektivität zunimmt.

### 3.1.2 LDI-TOF und MALDI-TOF Massenspektrometrie

Bei der LDI Massenspektrometrie werden die Proben in einer dünnen Schicht auf einen metallenen Probenteller aufgebracht und mit einem gepulsten Laser bestrahlt. Durch die eingestrahlte Energie findet im Idealfall eine Ionisierung und Desorbierung in die Gasphase statt. Dabei treten oft auch Fragmentierungen auf, da die hohe Laserenergie zu lokalen Aufheizungen führen kann. Der Massenbereich der mittels LDI-TOF untersuchbaren Ionen ist eingeschränkt. In der Regel handelt es sich dabei um Substanzen mit einer molaren Masse kleiner 1000 g/mol.

Durch die Einführung einer Matrix konnte die Empfindlichkeit der LDI-Messungen wesentlich gesteigert und auch der messbare Massenbereich vergrößert werden. Die ersten Veröffentlichungen zum Thema *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight* (MALDI-TOF) Massenspektrometrie befassen sich vor allem mit der Untersuchung von Proteinen [46, 3-5, 47]. Dabei ist der praktisch kaum eingeschränkte Massenbereich des TOF-Analysators von großem Nutzen.

In Abb. 2 ist ein schematischer Aufbau eines MALDI-TOF Massenspektrometers abgebildet. In einem diskontinuierlichen Prozess wird die in die Matrix eingebettete Probe durch einen Laserimpuls angeregt. Proben- und Matrixmoleküle gehen durch eine Art lokale Mikroexplosion in die Gasphase über. Durch eine an den Probenteller angelegte Spannung und durch Stoßprozesse in der sich entwickelnden Gaswolke wird ein Teil der Proben- und Matrixmoleküle ionisiert.

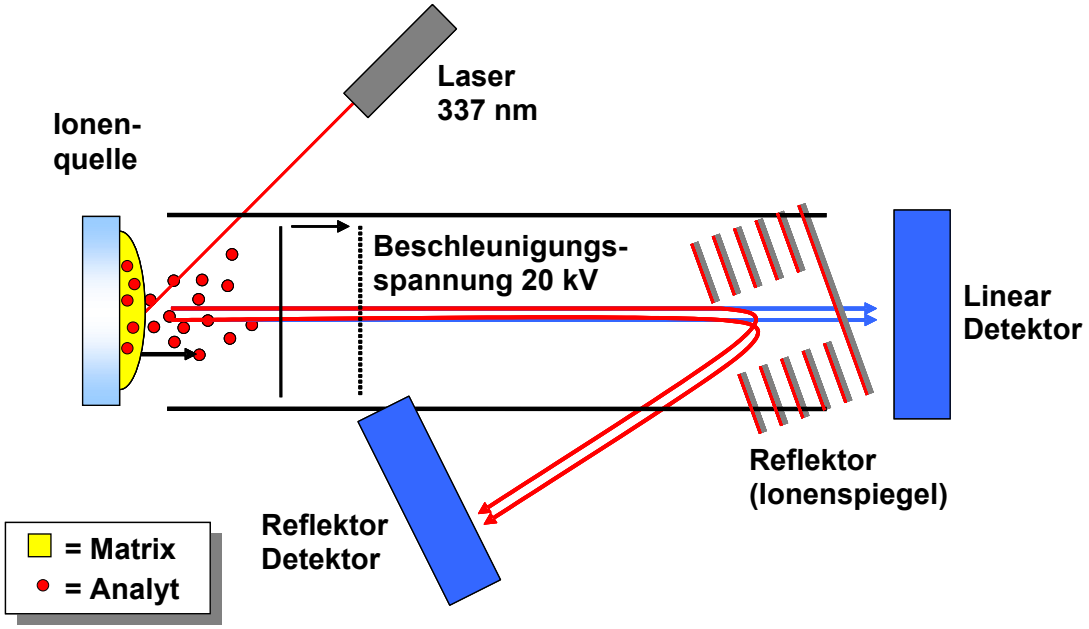



**Abb. 2. Schematischer Aufbau eines MALDI-TOF Massenspektrometers.**

Eine gewisse Zeit nach dem Laserimpuls wird nun die Beschleunigungsspannung angeschaltet, die die Ionen in Richtung des Detektors beschleunigt. Dabei befinden sich die Ionen nach Passieren eines geerdeten Gitters in einer feldfreien Drift-Strecke. Die kinetische Energie aller Ionen gleicher Ladung ist nach der Beschleunigung gleich, da sie die gleiche Potentialdifferenz durchlaufen [37]; die Geschwindigkeit der Ionen hängt somit nur von ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis ($m/z$) ab und kann nach Gl. 2 berechnet werden.

$$v = \sqrt{\frac{2 \cdot e \cdot U}{m}}$$

$v$ = Geschwindigkeit [m/s]
$e$ = Ionenladung [C]
$U$ = Spannung [V]
$m$ = Ionenmasse [kg]

**Gl. 2**

Werden die Ionen bei ihrem Auftreffen auf den Detektor registriert, so kann ihre Masse über die Flugzeit ermittelt werden. Die Wurzel aus der Flugzeit ist dabei proportional zum $m/z$-Wert [37]. Eine Kalibrierung kann über Substanzen bekannter Masse erfolgen.

Der optional einsetzbare Reflektor (vergl. Abb. 2) erzeugt ein mehrstufiges, elektrisches Feld, wodurch die Ionen in ihrer Flugbahn reflektiert und auf

einem zweiten Detektor registriert werden. Diese Technik erlaubt es, kleinere Unterschiede in der kinetischen Energie gleich schwerer Ionen auszugleichen. Etwas schnellere Teilchen tauchen tiefer in den Reflektor ein und verweilen dort auch länger als etwas langsamere Teilchen [48]. Durch diesen „Trampolineffekt“ können mit dem MALDI-TOF Massen-Auflösungen um ein Vielfaches gesteigert werden.

### 3.1.3 MALDI-TOF Methoden

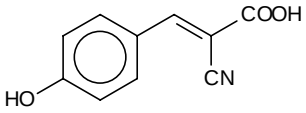
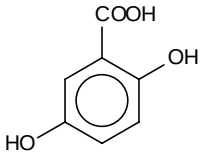
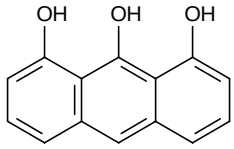
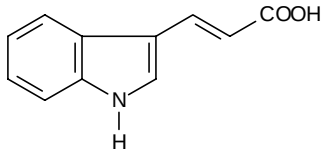
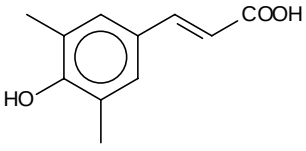
Eine Methodenentwicklung dient dem Zweck, eine bisher analytisch schwer zugängliche Substanz mit der hierfür getesteten Methode messen zu können. Hierfür müssen häufig verschiedene Parameter optimiert werden, um die optimalen Bedingungen zu erhalten. Bei der MALDI-TOF MS sind die Ionisierungsprozesse nur teilweise aufgeklärt, obwohl es einige viel versprechende Ansätze hierzu gibt [29, 30, 49-64]. Weil viele verschiedene Präparationsbedingungen getestet werden müssen, sind MALDI-TOF Methodenentwicklungen häufig sehr aufwändig. Neben der Auswahl der Matrix muss entschieden werden, ob und – falls ja – welches Kation in Form eines Salzes zugesetzt werden soll. Weiterhin kann auch die Menge der eingesetzten Substanzen bzw. das Mengenverhältnis zwischen Analyt, Matrix und ggf. Kation den Erfolg der Analyse wesentlich beeinflussen. Besonders schwierig kann eine Methodenentwicklung werden, wenn das verwendete Kation die Auswahl der Matrix beeinflussen kann und umgekehrt. So haben z. B. *Rashidezadeh et al*. herausgefunden, dass sich Polystyrole mit einer Kombination von trans-Retinolsäure und Silberkationen gut messen lassen. Auch die Kombination von Dithranol mit Palladiumionen ist gut geeignet. Dagegen war die Kombination aus trans-Retinolsäure und Palladiumionen nicht erfolgreich [31].

In der MALDI-TOF MS werden viele verschiedene Substanzen als Matrices eingesetzt [65]. Vielen ist gemeinsam, dass sie bei der Wellenlänge des Lasers (337 nm bei Stickstofflasern) absorbieren und so eventuell eine Ionisierung unterstützen. Auch flüssige Matrices haben Verwendung gefunden, wobei aber nur schwerflüchtige Substanzen verwendet werden können, die

im Hochvakuum lange genug auf dem Probenteller verbleiben [66-69]. Tab. 1 zeigt eine Auswahl an gebräuchlichen MALDI-TOF Matrices.

Für eine MALDI-TOF Präparation wird gewöhnlich eine Probenlösung mit einer Matrixlösung gemischt und diese Lösung auf den Probenteller aufgebracht. Die Matrix wird dabei zumeist im 100 bis 10000-fachen molaren Überschuss eingesetzt. Nach Verdunsten des Lösemittels bleibt eine meist kristalline Matrixschicht zurück, in die die Probenmoleküle idealerweise eingebettet sind [70]. Hierfür ist ein Lösemittel oder Lösemittelgemisch zwingend erforderlich, in welchem sowohl die Matrix als auch der Analyt löslich sind. Es ist schon eine Vielzahl an potentiellen Matrixsubstanzen in der Literatur vorgestellt worden (z. B. [5, 65, 70]), jedoch bezieht sich die Mehrzahl der Veröffentlichungen auf die Analytik von Biomolekülen [5, 65, 70].

**Tab. 1. Eine Auswahl an üblichen MALDI-TOF Matrices**

| Matrix | Strukturformel |
|---|---|
| **4-Hydroxy-α-cyanozimtsäure (4-CCA)** |  |
| **2,5-Dihydroxybenzoesäure (2,5-DHB)** |  |
| **Dithranol (DT)** |  |
| **3-Indolylacrylsäure (3-IAA)** |  |
| **Sinapinsäure (SA)** |  |

Die Matrix soll bei dem Ionisierungsprozess mehrere Funktionen erfüllen. Zum einen wird sie üblicherweise im Überschuss zugegeben, so dass durch die Matrixmoleküle ein Verband aus Probenmolekülen verdünnt wird. Dadurch, dass Probenmoleküle möglichst wenig Agglomerate mit anderen Probenmolekülen bilden, soll die Desorption und Ionisierung unterstützt werden. Durch die Absorption der Matrix im Wellenlängenbereich des Lasers nimmt sie Energie auf und soll zum einen die Probenmoleküle vor der direkten Pyrolyse durch den Laser schützen. Zum anderen sollen große Mengen an Matrixmolekülen in einer Art Mikroexplosion verdampfen und dabei Probenmoleküle mit sich reißen. Durch Stoß-Prozesse der energiereichen Matrixmoleküle mit den desorbierten Probenmolekülen soll ein Teil der Energie auf diese übertragen werden, wodurch deren Ionisierung unterstützt werden kann [70].

Neben der Auswahl der richtigen Matrix und eines Kationenzusatzes ist auch die Präparationstechnik entscheidend. Zum einen können Matrix und Probe gemischt auf den Probenteller aufgebracht werden. Oder es wird zuerst eine Schicht Matrix auf den Teller gegeben und nach deren Kristallisation die Probenlösung dazu pipettiert. Eine relativ neue Methode ist eine lösemittelfreie Präparation, bei der die Matrix mit der Probe in einer Kugelmühle verrieben und als Pulver auf den Probenteller gebracht wird. Durch diese Methode können auch schwerlösliche Substanzen gemessen werden [71, 72].

### 3.1.4 Auswertung von MALDI-TOF Spektren

Durch die sanfte Ionisierung werden bei der MALDI-TOF Massenspektrometrie wenig bzw. keine Fragmente erhalten. Metastabile Zerfälle (d. h. Zerfälle in der feldfreien Driftregion) fallen im Linearmodus lediglich durch eine Peakverbreiterung auf. Die Fragmente besitzen nach dem Zerfall zwar eine geringere kinetische Energie aber immer noch die gleiche Geschwindigkeit wie vor dem Zerfall. Infolgedessen treffen sie in etwa zum gleichen Zeitpunkt wie das Mutter-Ion auf den Detektor und werden auch mit der gleichen Masse registriert.

Wird dagegen ein Reflektor-Detektor benutzt, so werden Fragmente aus metastabilen Zerfällen überproportional beschleunigt und tragen so zum Grundrauschen bei. Insbesondere Matrix-Cluster, die während der Flugzeit zerfallen verursachen das Rauschen in MALDI-Spektren. Dies wurde von *Krutchinsky und Chait* durch die Verwendung von *Post Source Decay* (PSD) MALDI-TOF MS herausgefunden, indem sie Ionen aus dem Rauschen an beliebigen Stellen im Spektrum analysiert haben [73]. Die PSD-Technik ermöglicht es, durch gezieltes Absenken der Reflektorspannung auch die Massen der Fragmente von metastabilen Zerfällen zu messen.

Aus MALDI-TOF Massenspektren von Polymeren lassen sich Kenndaten nach den Gleichungen Gl. 3 bis Gl. 5 gewinnen.

$$M_n = \frac{\Sigma A_i M_i}{\Sigma A_i} \qquad \textbf{Gl. 3}$$

$$M_w = \frac{\Sigma A_i M_i^2}{\Sigma A_i M_i} \qquad \textbf{Gl. 4}$$

$$PD = \frac{M_n}{M_w} \qquad \textbf{Gl. 5}$$

Dabei bezeichnet $A_i$ die Signalfläche und $M_i$ die Masse des *i*-ten Ions. $M_n$ beschreibt die zahlen-gemittelte Molmasse (*number-averaged molecular weight*) und $M_w$ die gewichts-gemittelte Molmasse (*weight-averaged molecular weight*). Die Polydispersität $PD$ beschreibt die Breite einer Verteilung.

## 3.2 Multivariate Datenauswertungen

Multivariate Datenauswertungen ermöglichen es, komplexes z. T. auch stark voneinander abhängiges Datenmaterial derart auszuwerten, dass „echte“ signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Proben leichter herausgearbeitet und eine vereinfachte grafische Darstellung ermöglicht wird. Als Auswertemethode für die Messergebnisse vieler, prinzipiell ähnlicher Paraffinproben wurde die Hauptkomponentenanalyse gewählt, die gerade bei hochgradig voneinander abhängigen Daten eine Reduktion des Datenmaterials auf wesentliche Merkmale erleichtert.

Bildlich werden die Hauptkomponenten ermittelt, indem die Achse im n-dimensionalen Raum gesucht wird, entlang derer die Daten die größte Varianz aufweisen. Anschließend sucht man die nächste Achse, die senkrecht auf der ersten steht und die höchstmögliche Varianz der Daten aufzeigt. Dieses Verfahren lässt sich bis zu n mal durchführen, so dass schließlich n neue Achsen vorliegen. Die ersten enthalten dabei ein Maximum an Informationen über den Datensatz, während die letzten eher das Rauschen erfassen.

Mathematisch lässt sich die Hauptkomponentenanalyse als Eigenwertproblem darstellen. Eigenvektoren und Eigenwerte sind nur für quadratische Matrizen $\mathbf{Z}$ definiert und folgen der Gleichung Gl. 6.

$$\mathbf{Ze} = \mathbf{e}\lambda \qquad \textbf{Gl. 6}$$

mit dem Eigenvektor $\mathbf{e} \neq 0$ und dem Eigenwert $\lambda$ der $(n \times n)$ Matrix $\mathbf{Z}$. Eine quadratische Matrix der Dimension $(n \times n)$ kann maximal $n$ Eigenvektoren aufweisen. Diese lassen sich nach der Gleichung Gl. 7 beschreiben.

$$\mathbf{ZE} = \mathbf{E}_{\text{diag}}(\lambda_1, \ldots \lambda_n) \qquad \textbf{Gl. 7}$$

$\mathbf{E}$ ist eine orthonormale Matrix. Die Eigenvektoren stehen jeweils orthogonal zueinander.

Bevor eine Datenmatrix (=Streumatrix) einer Hauptkomponentenanalyse unterworfen wird, kann diese zuvor skaliert werden, um das Verhalten von Ausreißern günstig zu beeinflussen. Zum einen kann durch Subtrahieren des Mittelwertes von jeder Variablen die Kovarianzmatrix erzeugt werden, oder die Daten werden standardisiert, d. h. nach Subtraktion des Mittelwertes wird jede Variable durch die Standardabweichung dividiert. Durch dieses Verfahren entsteht die Korrelationsmatrix, die einen Mittelwert von 0 und eine Standardabweichung von 1 aufweist. Durch Anwendung dieses Verfahrens kann vermieden werden, dass einzelne Variablen das Ergebnis überproportional beeinflussen. Das geeignete Skalierungsverfahren wird häufig nach empirischen Tests ausgewählt. Eine Standardisierung ist jedoch immer dann notwendig, wenn die Eingabevariablen unterschiedliche Dimensionen aufweisen.

# 3.3 Kernmagnetische Resonanz Spektroskopie (NMR)

## 3.3.1 Prinzip der NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie ist eine sehr wichtige Methode, die in der wissenschaftlichen Forschung oft angewandt wird, um die Strukturen unbekannter Substanzen aufzuklären. Die Methode beruht darauf, dass jeder Kern sich um die eigene Achse dreht und dabei ein Magnetfeld erzeugt. Das magnetische Moment

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{p} \qquad \textbf{Gl. 8}$$

mit

$$\vec{p} = \frac{h}{2\pi}\sqrt{I(I+1)} \qquad \textbf{Gl. 9}$$

ist von dem Kernspin $\vec{p}$ und dem gyromagnetischen Verhältnis $\gamma$ abhängig. Letzteres ist für jedes Isotop spezifisch. $I$ ist die Spinquantenzahl und $h$ das Planck'sche Wirkungsquantum.

Der Gesamtspin des Kerns setzt sich aus dem Protonen- und Neutronenspin zusammen und wird analog zum Elektronenspin quantenmechanisch behandelt, da dieser nur diskrete Werte als Vielfaches des Planck'schen Wirkungsquantums annehmen kann [74]. Es ist auch möglich, dass sich die Spins in ihrer Summe ausgleichen ($I = 0$), dann besitzt das Isotop keinen Kernspin und auch kein Kernmoment. Der Richtungsvektor des magnetischen Moments kann in diesem Falle (z. B. bei $^{12}C$) in jede beliebige Richtung zeigen, demzufolge sind solche Isotope für die NMR-spektroskopische Messung nicht geeignet.

Bringt man einen Atomkern mit $I \neq 0$ in ein Magnetfeld $\vec{B}$, so richtet sich das magnetische Moment parallel oder antiparallel zum Magnetfeld aus. Dabei kann es aber nicht jeden beliebigen Zustand annehmen, sondern nur eine bestimmte Anzahl an Zuständen, die sich aus seiner Spinquantenzahl ergeben. Für Spin-½ Isotope (z. B. $^{1}H$ und $^{13}C$) sind dies zwei Zustände, deren Energieniveaus sich gemäß Gl. 10 und Gl. 11 beschreiben lassen ($B_0$ = magnetische Flussdichte).

$$E_{½} = \frac{1}{2}\gamma\frac{h}{2\pi}B_0 \qquad \textbf{Gl. 10}$$

$$E_{-½} = -\frac{1}{2}\gamma\frac{h}{2\pi}B_0 \qquad \textbf{Gl. 11}$$

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi}B_0 \qquad \textbf{Gl. 12}$$

Durch einen Radiofrequenzimpuls (RF-Impuls) mit der Resonanzfrequenz (siehe Gl. 12) kann ein Teil der Kerne aus der Achse gekippt werden. Dabei nehmen diese Energie auf und wechseln in ein höheres Energieniveau. Durch die Richtungsänderung wird in einer Empfängerspule eine Spannung induziert, die die Relaxation der Kerne abbildet [75].

Die Resonanzfrequenzen weichen je nach chemischer Umgebung der Kerne geringfügig voneinander ab. Durch die Messung dieser Frequenz können somit Informationen über die Art der beobachteten Kerne ermittelt werden. Mit Hilfe der $^{1}$H- und $^{13}$C-NMR lassen sich Rückschlüsse auf die Art und Struktur der untersuchten Kohlenwasserstoffe ziehen. Diese Methode wurde daher als Ergänzung zur MALDI-TOF Messung der Paraffine herangezogen, um die dort gewonnenen Erkenntnisse zu bestätigen und zu vertiefen.

## 3.4 Paraffinöle, mikrokristalline Wachse und Vaseline

### 3.4.1 Grundlagen

Bei Paraffinölen (INCI: *Paraffinum liquidum*), mikrokristallinen Wachsen (INCI: *Cera microcristallina*) und Vaseline (INCI: *Petrolatum*) handelt es sich um Mischungen gesättigter Kohlenwasserstoffe. Diese werden durch verschiedene Prozesse aus Erdöl gewonnen [76]. Sie dienen als wichtige Rohstoffe bei der Fertigung kosmetischer Formulierungen und finden u. a. Einsatz in Cremes, Lotionen, Baby- und Massageölen und Badezusätzen [77]. Paraffine können eine komplexe Mischung von Alkanen und Isoalkanen sowie Cycloalkanen und deren Isomere enthalten [76]. Olefine und Aromaten

sind in den Paraffinen dagegen nicht erwünscht, da sie die Haltbarkeit der Produkte herabsetzen oder zur Bildung unangenehmer Gerüche führen können.

Die große Vielfalt an vorhandenen Strukturen erschwert eine strukturaufklärende Analyse; infolgedessen ist eine Untersuchung dieser Produkte auf molekularer Ebene und eine Korrelation der Zusammensetzung mit den physikalischen und chemischen Eigenschaften des Paraffins immer noch eine Herausforderung.

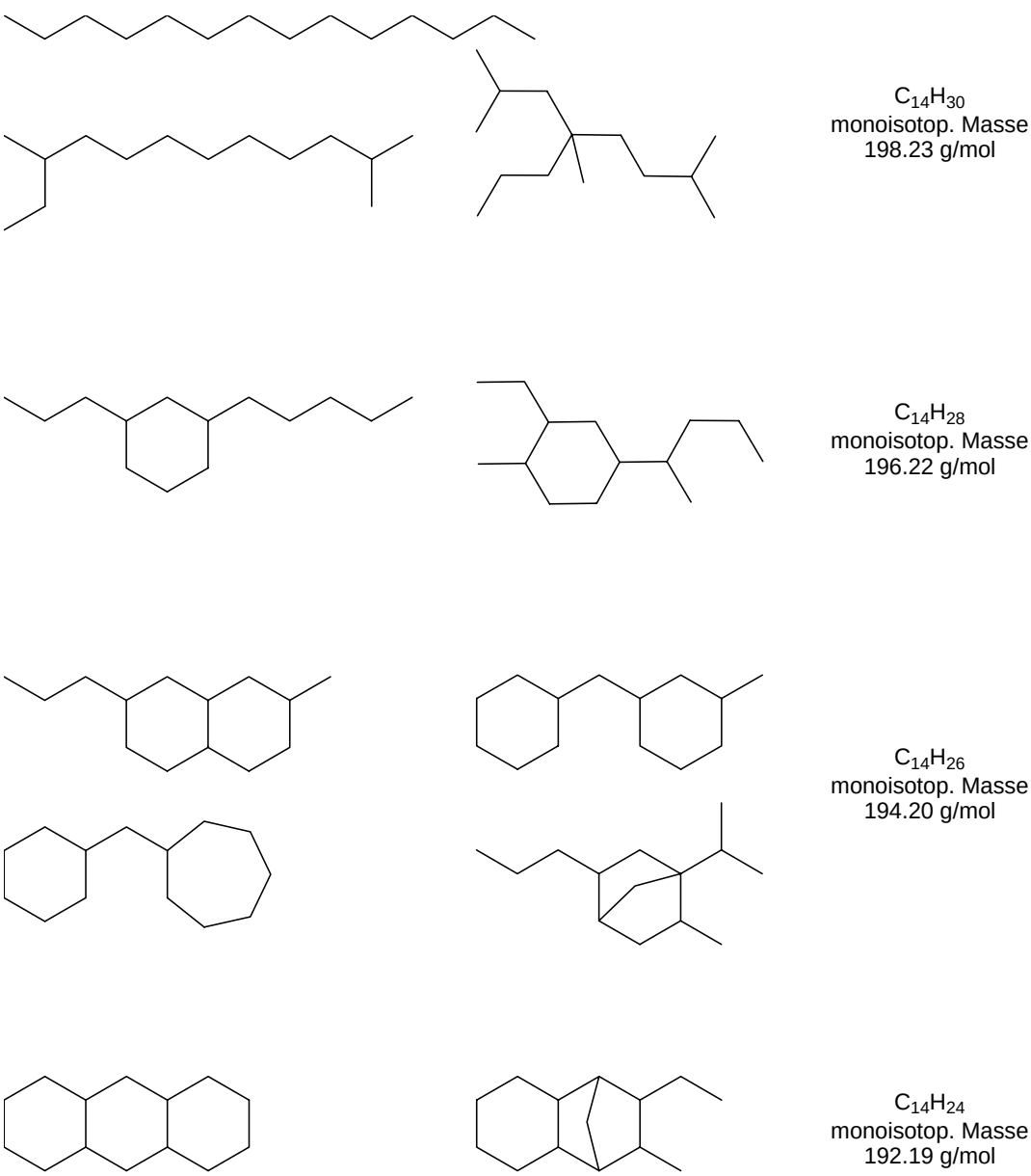



**Abb. 3. Auswahl an möglichen Strukturen für Alkane und Cycloalkane mit 14 Kohlenstoffatomen.**

In Abb. 3 ist eine Sammlung von möglichen Beispielstrukturen für Alkane und Cycloalkane für die Kettenlänge von 14 Kohlenstoffatomen aufgeführt. Cycloalkane sind in Erdölprodukten je nach Herkunft und Behandlung enthalten. Die genaue Zusammensetzung ist nicht bekannt. Prinzipiell ist eine Vielzahl von Strukturen möglich. Es müssen nicht ausschließlich Ringe mit 6 Kohlenstoffatomen vorkommen. Auch Ringe mit 5 oder 7 Kohlenstoffatome sowie Kohlenstoffbrücken sind denkbar. Die 6-Ringe werden aber aufgrund ihrer Stabilität als am wahrscheinlichsten angesehen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Proben von *Cera microcristallina*, *Petrolatum* und vier unterschiedliche Klassen von *Paraffinum liquidum* untersucht.

### 3.4.2 Analyse von Paraffinen

Es gibt eine große Anzahl analytischer Methoden, um Paraffine zu charakterisieren. In der Mehrheit handelt es sich dabei um die Bestimmung physikalischer Parameter wie z. B. der Viskosität, des Brechungsindex, der Dichte oder dem Schmelz- und Tropfpunkt. Die meisten dieser Methoden geben Aufschluss über Eigenschaften der Paraffine, jedoch wenig Informationen über die strukturelle Zusammensetzung.

Mit Hilfe der NIR-Spektroskopie kann ein Anhaltspunkt über den Naphthengehalt gewonnen werden, da die Cycloalkane eine charakteristische Bande im Spektrum aufweisen.

Die Kohlenstoff-Zusammensetzung (*Carbon Type Composition*) nach DIN 51378 [78] nutzt einen Zusammenhang zwischen der Dichte, dem Brechungsindex, der Viskosität und der Kohlenstoff-Zusammensetzung aus, um aus den messbaren physikalischen Daten Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der Probe zu ziehen [79]. Diese Methode liefert ein „Maß für die Menge an Kohlenstoff-Atomen, die sich in einer paraffinischen, naphthenischen oder aromatischen Bindung“ befinden.

Eine Auftrennung von Paraffinen in deren Einzelbestandteile mittels Gaschromatographie ist aufgrund der Komplexität der Proben oftmals nur unzureichend möglich. Zum einen sieden manche Bestandteile erst bei so hohen Temperaturen, dass diese auch bei Durchführung einer Hochtemperatur-Gaschromatographie auf der Säule verbleiben. Zum anderen zeigen solche

Paraffine anstelle von definierten Peaks breite Anhebungen der Basislinie über einen weiten Retentionsbereich, die die unaufgelöste komplexe Mischung widerspiegeln [80-82].

In der Literatur sind erste Erkenntnisse zum Thema MALDI-TOF von gesättigten Kohlenwasserstoffen beschrieben worden. *Kühn et al.* gelang die MALDI-TOF Analyse von Polyethylen und Kerzenwachs [83]. In jüngerer Zeit ist von *Dutta und Harayama* die Untersuchung von Alkanen aus Rohölfraktionen beschrieben worden [81].

## 3.5 Wollwachs und Wollwachsprodukte

### 3.5.1 Grundlagen

Bei Wollwachs handelt es sich um das Talgdrüsen-Sekret von Schafen. Dieses wird bei der Wollwäsche von der Wolle entfernt und kann anschließend aus der Waschflotte durch Zentrifugation zurückgewonnen werden [2]. Raffiniertes Wollwachs bezeichnet man als Lanolin, welches erstmals 1882 in einem Patent von Braun [84] genannt wird.

Der Gebrauch von Wollwachs als pflegender Bestandteil in Salben lässt sich bis in das antike Griechenland zurückverfolgen, wo bereits im Jahre 60 A.D. die Gewinnung von Wollwachs bei der Wollwäsche beschrieben ist [85]. Wollwachs ist ein „Wachs“ im chemischen Sinne, eine komplexe Mischung, die vor allem von Estern aus Fettalkoholen und Fettsäuren dominiert wird [2]. Neben den Fettalkoholen sind eine Reihe von Sterinen (vor allem Cholesterin und Lanosterin) vorhanden, die ebenfalls als Ester der Fettsäuren vorliegen. Durch die Fülle an Säuren, Alkoholen und Sterinen sind rein rechnerisch über 10.000 verschiedene Ester denkbar [86]. Weiterhin ermöglicht die Anwesenheit von Hydroxyfettsäuren und Diolen auch die Bildung von Diestern [87].

Aus Wollwachs bzw. Lanolin werden durch die hydrolytische Spaltung der Wachs-Ester sowohl die Wollwachs-Alkohole (Eucerit®) als auch die Wollwachssäuren gewonnen. Letztere lassen sich durch Veresterung mit Glycerin in die entsprechenden Glycerinester umwandeln (Neocerit®) [2].

Die Fettsäuren haben Kettenlängen von $C_7$ bis $C_{41}$, dabei kann es sich um aliphatische Fettsäuren und deren Isoformen handeln, aber auch Hydroxyfettsäuren und ihre Isoformen sind vorhanden.

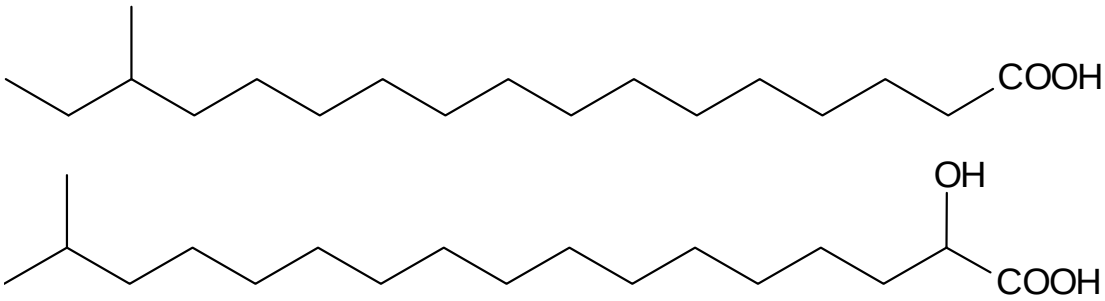



**Abb. 4. Beispielstrukturen für im Wollwachs enthaltene Fettsäuren und Hydroxyfettsäuren**

Als Alkohole kommen aliphatische Alkohole, Isoalkohole, Diole und ihre Isoformen vor. Die Kettenlängen variieren zwischen $C_{14}$ und $C_{36}$.

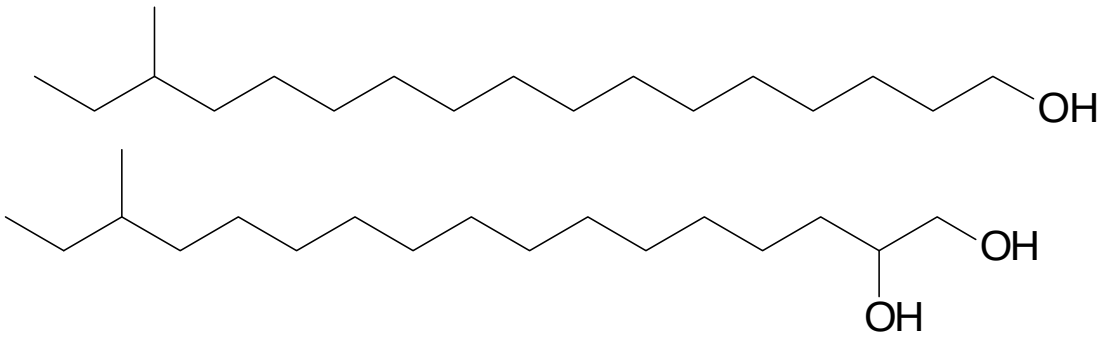



**Abb. 5. Beispielstrukturen von im Wollwachs enthaltenen Alkoholen und Diolen.**

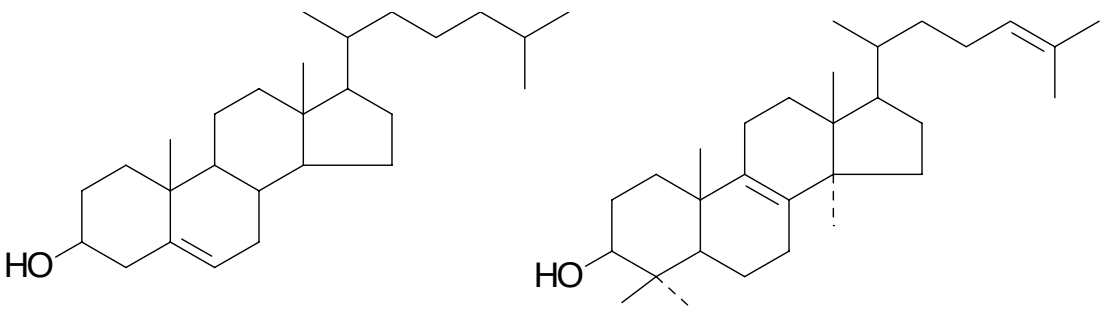



**Abb. 6. Beispiele für im Wollwachs enthaltene Sterine. Cholesterin (links) und Lanosterin (rechts).**

Der wichtigste Vertreter der Sterine ist das Cholesterin. Neben diesem sind Lanosterin, Dihydrolanosterin, Agnosterin und andere vorhanden.

### 3.5.2 Analysenmethoden

Wollwachs ist aufgrund seiner Komplexität schwierig zu charakterisieren. Daher wird Wollwachs meistens fraktioniert und über die Fraktionen charakterisiert [2, 88-91]. Apparativ wird hierfür überwiegend die Gaschromatographie genutzt. In den letzten Jahren wurden Methoden zur thermisch unterstützten Hydrolyse und Methylierung (THM) von Wollwachsen entwickelt [92]. Dabei werden die Ester in einem Schritt gespalten und methyliert. Danach können die Fettsäuremethylester gaschromatographisch identifiziert werden. Der Einsatz der MALDI-TOF Massenspektrometrie zur Charakterisierung von Wollwachs und Wollwachsprodukten ist bisher in der Literatur nicht beschrieben.

## 3.6 Chitosane, Polyquaternium-10 und Guar-HPTMA

### 3.6.1 Grundlagen

Chitosane sind besonders wegen ihrer verdickenden und filmbildenden Eigenschaften in der kosmetischen Industrie hoch geschätzt. Sie werden aus Chitin gewonnen, welches sich durch eine -NH-CO-$CH_3$ anstelle der -$NH_2$ Gruppe unterscheidet. Ab einem Deacetylierungsgrad von 50% oder mehr spricht man von Chitosan [93]. Eine MALDI-TOF Methode zur Untersuchung hochmolekularer Chitosane ist bisher nicht publiziert worden, nach *Letzel et al.* können aber Oligochitosane mittels MALDI-TOF untersucht werden [94].

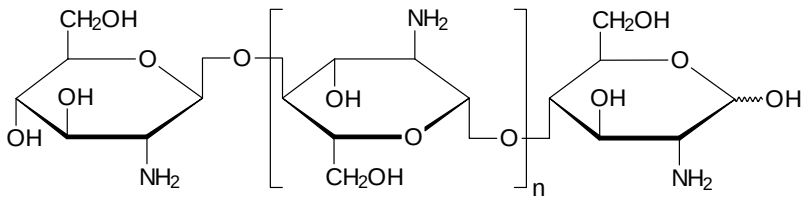



**Abb. 7. Oligochitosan, voll deacetyliert, n=0-4**

Polyquaternium-10 (s. Abb. 8) wird bevorzugt in der Haarkosmetik zu Conditioning-Zwecken eingesetzt. Dabei handelt es sich zumeist um hochpolymere Moleküle (mit M>250000 g/mol) mit einem Cellulose-Grundgerüst und einem charakteristischen Anteil an Seitenketten mit freien quartären Ammoniumgruppen. Diese bewirken ein besonders gutes Aufziehen auf das Haar.

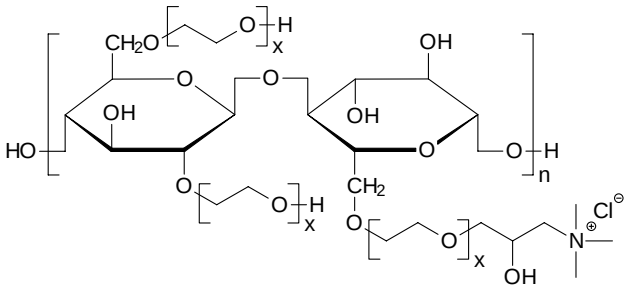


**Abb. 8. Polyquaternium-10. Prinzipiell sind alle freien Hydroxygruppen mit Ethylenoxid bzw. mit Propylenoxid-trimethylammoniumchlorid verethert [95] (teilweise angedeutet).**

Bei Guar Hydroxypropyl-trimethylammoniumchlorid (Guar-HPTMA) handelt es sich ebenfalls um eine hochpolymere Substanz mit einer quartären Ammoniumgruppe in der Seitenkette (s. Abb. 9). Dabei besitzt das Polymer ein Rückrat aus Mannose-Einheiten, von dem Seitenketten aus Galactose abzweigen. Guar-HPTMA findet in der Kosmetik ebenfalls Verwendung als Hairconditioner.

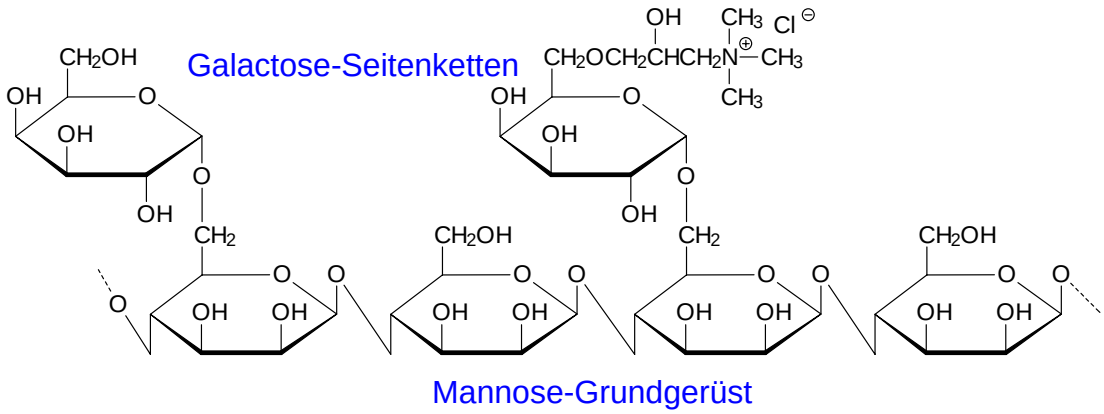



**Abb. 9. Guar Hydroxypropyl-trimethylammoniumchlorid (Guar-HPTMA)**

Als Analysenmethode zur Bestimmung der mittleren molekularen Masse von Polyquaternium und Chitosanen hat sich die Gelpermeationschromatographie (GPC) etabliert. Durch die hohen Molmassen (bis über 1.000.000 g/mol) sind diese Polymere oftmals mit anderen Methoden analytisch nicht zugänglich. Der Deacetylierungsgrad von Chitosan lässt sich titrimetrisch erfassen [96].

# 4 Spezieller Teil

## 4.1 MALDI-TOF MS von Paraffinen

Die MALDI-TOF Massenspektrometrie, stellt ein leistungsfähiges Verfahren dar, um Informationen über Anwesenheit und Verteilung einzelner Inhaltsstoffe zu erhalten. Eine Ionisierung der Probenmoleküle ist für die Aufnahme eines Massenspektrums unbedingt erforderlich. Da Paraffinöle, mikrokristalline Wachse und Vaseline vor allem aus gesättigten Kohlenwasserstoffen bestehen, ist es schwierig, mit einem „weichen“ Ionisierungsverfahren wie der MALDI-Technik ausreichend stabile Ionen in der Gasphase zu erzeugen. Hierfür wurde eine systematische Methodenentwicklung durchgeführt.

### 4.1.1 Methodenentwicklung

Vor Messung einer Probe müssen geeignete Präparations- und Messbedingungen vorliegen. Sind diese nicht bekannt, so muss eine Methodenentwicklung durchgeführt werden, an deren Ende im Erfolgsfalle eine Methode vorliegt, die eine Analyse der betreffenden Substanz ermöglicht.

Methodenentwicklungen bei der MALDI-TOF MS basieren zumeist auf Erfahrungswerten, da die grundlegenden physikalischen und chemischen Prozesse der MALDI-Ionisierung noch nicht hinreichend aufgeklärt sind. Die Qualität der Spektren hängt dabei vom Ionisierungsvermögen der Probe, von der verwendeten Matrix, zugesetzten Kationen und der Präparationstechnik selbst ab [9, 31, 50, 97]. Insofern ist eine systematische Untersuchung der Präparations- und Analysenbedingungen notwendig, um mögliche Zusammenhänge mit der Ionisierbarkeit des Analyten aufzuzeigen. Dazu müssen die Einflussfaktoren der Methode identifiziert und in einem geeigneten Rahmen modifiziert werden, um die optimalen Bedingungen zu ermitteln. Folgende Parameter wurden ausgewählt:

1. Zusatz von Kationen
2. Matrix
3. Mengenverhältnis Matrix:Probe
4. Mengenverhältnis Kation:Probe
5. Verwendete Lösemittel
6. Präparationstechnik

### Zusatz von Kationen

Zusätze von verschiedenen Kationensalzen sind bei der MALDI-TOF MS üblich, um die Ionisierung der Analyten zu verbessern oder gar erst möglich zu machen. Dabei bilden diese häufig temporär stabile Komplexe mit dem Analyten, die sich im Massenspektrum mit dem Signal $[M+Kation]^+$ zeigen. Die Kationenzusätze Natrium, Kalium, Lithium, Silber, Gold, Cäsium, Palladium, Kupfer, Zink und Eisen wurden auf Ihre Eignung zur Unterstützung der Ionisierung von Paraffinproben hin getestet.

Von den Salzen Natriumchlorid, Kaliumsulfat, Lithiumchlorid, Silbernitrat, Tetragold(III)-säure, Cäsiumhydroxid-hydrat, Palladium(II)-acetylacetonat, Kupfer(II)-nitrat-trihydrat, Zinkchlorid und Eisen(II)-chlorid wurden wässrige Lösungen mit 5.0 mg/mL (Tetrachlorgold(III)-säure 1.0 mg/mL) angefertigt. Von dieser Lösung wurden 0.5-1.0 µL auf den Probenteller pipettiert und trocknen gelassen. Auf die Salzschicht wurden anschließend 0.5-1.0 µL einer Probe von *Cera microcristallina* (1 mg/mL in THF) pipettiert.

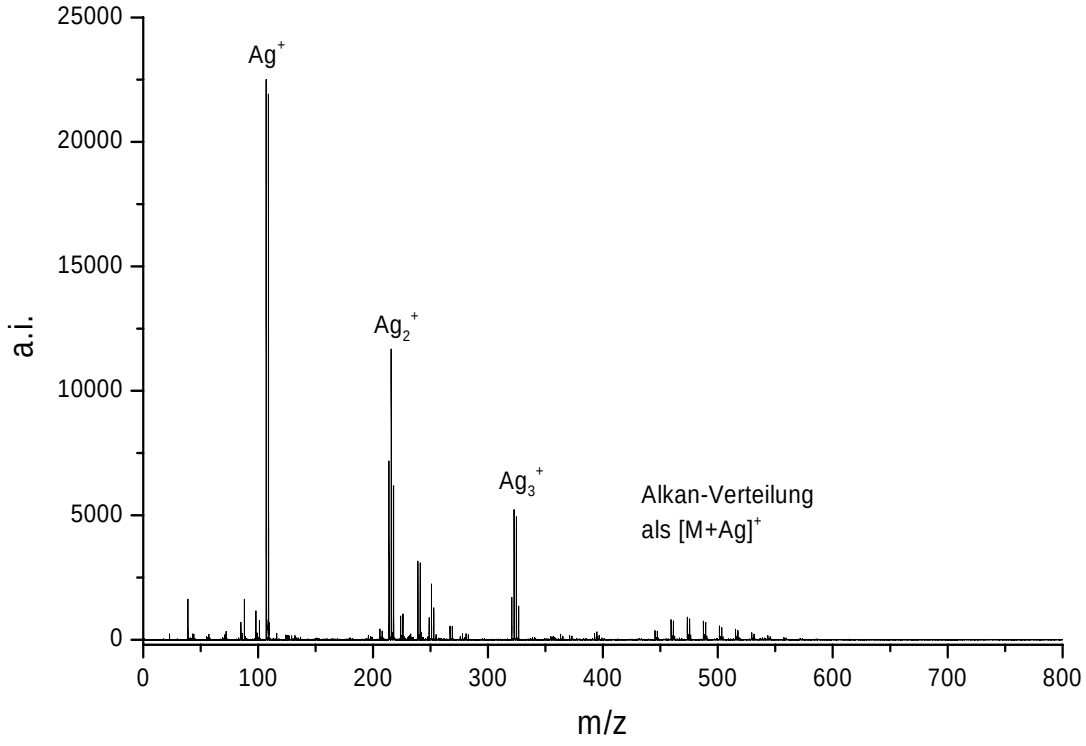



**Abb. 10. LDI-TOF Massenspektrum von *Cera microcristallina*, Wachs 1, unter Zusatz von Silbernitrat bei der Präparation. Die intensivsten Peaks sind das Silberkation und Silbercluster.**

Von den getesteten Kationen zeigten sich nur bei Lithium und Silber Signale von $[Alkan+Li]^+$ bzw. $[Alkan+Ag]^+$. In Abb. 10 ist ein LDI-TOF Spektrum der Präparation mit Silbernitrat zu sehen. Die Peaks mit der größten Intensität sind das Silberkation und Silbercluster. Im Massenbereich über *m/z* 400 zeigt sich die Verteilung der Alkane in Form der Silberaddukte.

Die extrem hohe Intensität der Silber- und Silbercluster-Peaks im Vergleich zu den Alkan-Peaks liegt vermutlich nicht nur an der großen Menge an Silberionen auf dem Probenteller. Vielmehr kann hier angenommen werden, dass die Silberionen, da sie bereits im Silbernitrat als Ionen vorliegen, lediglich von der Oberfläche des Probentellers desorbiert werden müssen, um ein Signal zu liefern. Die unpolaren Kohlenwasserstoff-Moleküle müssen zusätzlich zum Desorptionsprozess ionisiert werden. Dieses geschieht offensichtlich unter anderem durch die Anlagerung eines Silberkations, wodurch ein einfach positiv geladenes Silberaddukt vorliegt. Dieses muss so stabil sein, dass es die Flugzeit (wenige Mikrosekunden) in dem TOF-Flugrohr übersteht.

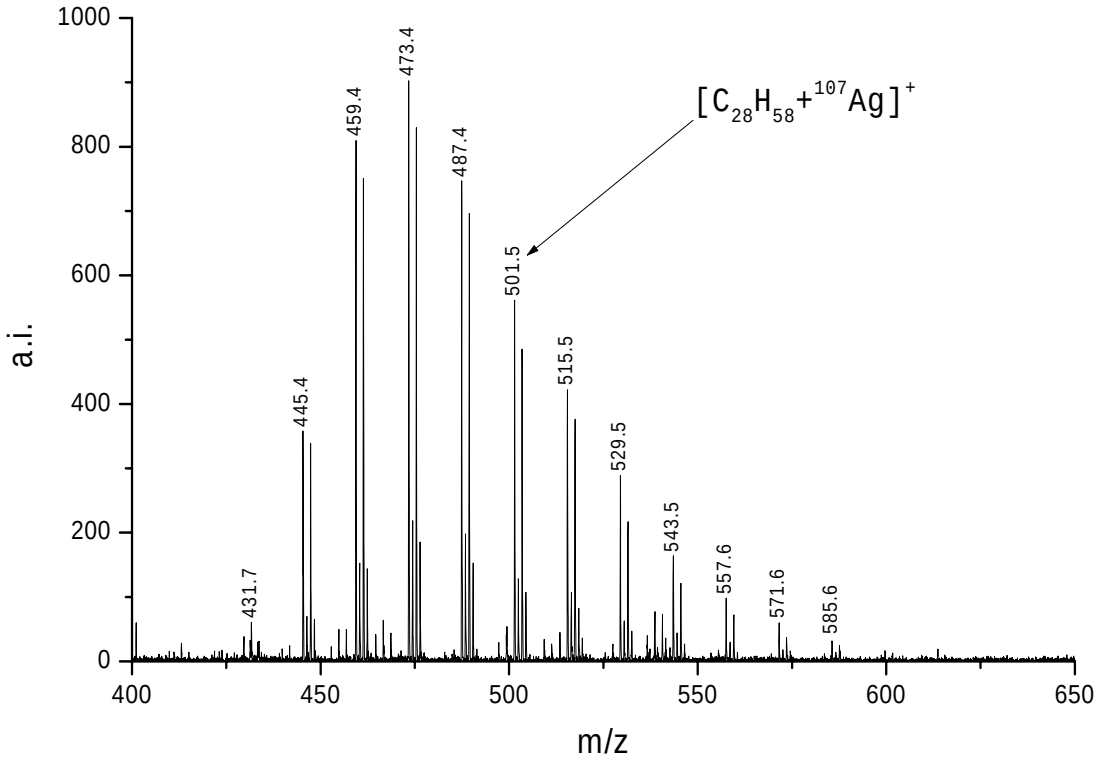



**Abb. 11. LDI-TOF Spektrum von *Cera microcristallina*, Silberaddukte, Ausschnitt von Abb. 10.**

Aus diesem Grund ist die Anzahl an Silberionen, die zum Detektor gelangen wahrscheinlich höher als die Anzahl der registrierten Kohlenwasserstoff-Silberaddukte.

Abb. 11 zeigt einen Ausschnitt aus dem LDI-TOF Spektrum der Abb. 10 mit der Verteilung der Alkane aus dem mikrokristallinen Wachs. Durch die zwei Silberisotope mit den Molmassen von 106.9 g/mol (51.8 % natürlicher Anteil) und 108.9 g/mol (48.2 % natürlicher Anteil) [98] resultiert jedes Alkan in Form typischer Doppelpeaks. Die Auflösung des Massenspektrums ist ausreichend, um die neben den Hauptpeaks befindlichen $^{13}C$-Isotop-haltigen Alkane abzubilden. Anhand der Molmassen der Adduktpeaks lassen sich die Kettenlängen der Alkane nach der Summenformel $C_nH_{(2n+2)}Ag$ zuordnen. Dieses Wachs enthält demnach Alkane mit Kettenlängen von $C_{23}$ (mit *m/z* 431) bis $C_{34}$ (mit *m/z* 585). Die Signale von n-Alkanen und Isoalkanen können aufgrund gleicher molarer Massen nicht unterschieden werden.

Weiterhin ist auffällig, dass die Verteilung eine deutliche Asymmetrie aufweist. Dies deutet darauf hin, dass eine Diskriminierung von Signalen über einen Teil der Probensignale stattfindet. Gestützt wird diese Annahme von der Tatsache, dass bereits Alkane mit Kettenlängen kleiner $C_{24}$ flüchtig genug sind, um bei dem im Massenspektrometer üblicherweise vorherrschenden Hochvakuum (ca. $10^{-7}$ mbar) langsam zu verdampfen. [81, 83] Das Diskriminierungsverhalten der Kohlenwasserstoffe wird daher genauer in Kapitel 4.1.2 behandelt.

Ein LDI-TOF Massenspektrum mit Lithiumaddukten von Cera *microcristallina* war im Vergleich zu den Silberaddukten wesentlich schwieriger zu erreichen. Der Probenteller musste zeitaufwändig nach so genannten „Sweet Spots“ abgesucht werden, an denen es möglich war, irgendein Signal der Lithiumaddukte zu detektieren. Diese Signale waren zudem meist von geringer Intensität. Dies gestaltet die Aufnahme eines Spektrums sehr langwierig und liefert schlecht reproduzierbare Spektren.

Die Peaks der Lithiumaddukte (s. Abb. 12) sind von geringer Intensität und weisen ein vergleichsweise geringes Signal/Rausch-Verhältnis (S/N) auf. Zudem sind die Signale mit Kettenlängen kleiner $C_{25}$ bzw. größer $C_{30}$, welche in Abb. 11 noch deutlich erkennbar sind, nicht vorhanden.

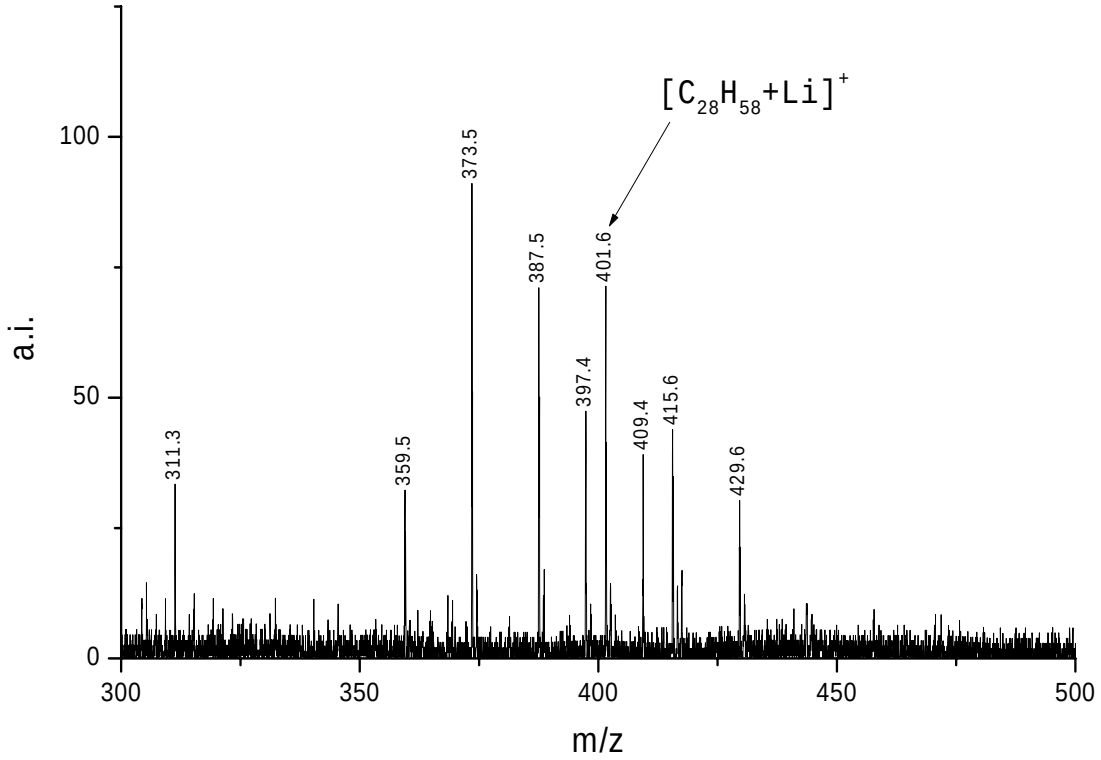



**Abb. 12. LDI-TOF Spektrum von *Cera microcristallina*, Lithiumaddukte**

Ein Vorteil der Lithiumaddukte ist die relativ hohe natürliche Isotopenreinheit. Das Hauptisotop mit einer molaren Masse von 7.0 g/mol stellt 92.5 % des Gesamtvorkommens dar [98]. Dadurch ist in dem Massenspektrum im Wesentlichen nur ein Addukt pro Molekülmasse vorhanden, so dass die Interpretation erleichtert ist. Diese kann durch die Überlagerung mehrerer Peaks bei den Silberaddukten erschwert sein.

Die Ergebnisse geben Grund zur Annahme, dass Silber als einziger kationischer Zusatz in der Lage ist, MALDI-TOF bzw. LDI-TOF Spektren der Paraffine von hoher Intensität zu produzieren. Die folgenden Untersuchungen konzentrieren sich daher auf Silber als kationischen Zusatz.

### Verwendung einer Matrix

Es wurde untersucht, ob eine der Matrixsubstanzen in der Lage ist, die Qualität der Silberpräparation (s. Seite 25ff) zu verbessern. In Tab. 2 sind die getesteten Matrixsubstanzen und ihre in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen aufgeführt. Es wurde eine Reihe von in der MALDI-TOF Massenspektrometrie üblicherweise verwendeten Substanzen ausgewählt. 4-

Hydroxy-α-cyanozimtsäure ist eine weit verbreitete Matrix für unterschiedliche Analyte wie Peptide, Cyclodextrine und eine ganze Reihe von polymeren Substanzen [23, 65, 99, 100]. Parallel dazu wurde die sich nur durch die Stellung der Hydroxy-Gruppe unterscheidende 3-Hydroxy-α-cyanozimtsäure geprüft. Neben 4-CCA gehört die 2,5-Dihydroxybenzoesäure zu den am häufigsten in der Literatur beschriebenen und am besten charakterisierten Matrices. Die Anwendungsbereiche reichen von Proteinen und Peptiden über Polymere auf Kohlenhydratbasis bis hin zu Triglyceriden und anderen Fettsäureestern [101-104]. Auch der Einsatz von 2,5-DHB zur Analyse von Polyisopren, Polyisobutylen und Polystyrol ist publiziert worden [105].

**Tab. 2. Auflistung der getesteten Matrixsubstanzen und ihrer in dieser Arbeit durchgängig verwendeten Abkürzungen**

| Substanz | Abk. | Substanz | Abk. |
|---|---|---|---|
| 3-Aminochinolin | 3-AC | 3-Hydroxy-α-cyanozimtsäure | 3-CCA |
| Anthracen | ANT | 4-Hydroxy-α-cyanozimtsäure | 4-CCA |
| 9-Anthracencarbonsäure | 9-ACA | 3-Hydroxypicolinsäure | PIC |
| 1,4-Bis(5-phenyl-2-oxazolyl)-benzen | POPOP | 3-Indolylacrylsäure | IAA |
| 9-Bromanthtracen | 9-BA | 5-Methoxysalicylsäure | MSA |
| 2-Brom-4,6-dinitroanilin | BDNA | Nicotinsäure | NIC |
| 9-Chloranthracen | 9-CA | 9-Nithroanthracen | 9-NA |
| 5-Chlorsalicylsäure | CSA | 2-Nitrophenyldodecylether | NPD |
| 2,5-Dihydroxybenzoesäure | DHB | 2-Nitrophenyloctylether | NPO |
| Dithranol | DT | 2-Octyldodecanol | OD |
| Ethylenglycolmonosalicylester | EGS | Octylglucopyranosid | OG |
| Ferulasäure | FA | *trans*-Retinolsäure | RET |
| L-Fucose | FUC | Sinapinsäure | SA |
| Glycerin, wasserfrei | GLY | 2,4,6-Trihydroxyacetophenon | THA |
| 2-(4'-Hydroxybenzolazo)-benzoesäure | HABA | | |

Es stellte sich aber heraus, dass Dithranol und *trans*-Retinolsäure für unpolarere Polymere wesentlich besser geeignet sind [26, 28, 29, 31, 106-108].

Neben Dithranol als Anthracenderivat und auch Anthracen selbst wurde auch die Verwendung anderer Anthracenderivate wie 9-Nitroanthracen oder 9-Anthracencarbonsäure beschrieben [17, 19, 29, 50, 109, 110].

Für die hier durchgeführten Versuche wurden zudem die Organohalogen-Derivate 9-Chloranthracen und 9-Bromanthracen ausgewählt. Weitere Matrices, die laut Literatur z. T. auch für unpolarere Analyten verwendet werden, sind 3-Indolylacrylsäure, 3-Aminochinolin, Nicotinsäure, 2-Brom-2,4-dinitroanilin, 2-(4'-Hydroxybenzolazo)-benzoesäure, 1,4-Bis(5-phenyl-2-oxazolyl)-benzen, 2,4,6-Trihydroxyacetophenon, Sinapinsäure, 5-Methoxysalicylsäure, Ferulasäure, L-Fucose und 5-Chlorsalicylsäure [25, 65]. Es gibt auch verschiedene flüssige Matrices, die für verschiedene Analysenzwecke eingesetzt werden können. Glycerin als klassische FAB-Matrix [37] wurde hier ebenso eingesetzt wie 2-Nitrophenyloctylether, welcher als unpolare Matrix auch eher für unpolare Proben geeignet ist [13]. Zu diesem Zweck wurde in dieser Studie auch 2-Nitrophenyldodecylether getestet, welcher einen noch unpolareren Charakter besitzt. Zusätzlich wurden der unpolare Alkohol Octyldodecanol, das tensidähnliche Octylglucopyranosid und der Ethylenglycolmonosalicylester geprüft. Schließlich wurden in Vorversuchen die Stoffe Naphthalin (aufgrund der Ähnlichkeit zum Anthracen) und Salicylsäure (als Vergleich zu vielen Salicylsäurederivaten) untersucht. Diese erwiesen sich jedoch im Hochvakuum des Massenspektrometers als zu flüchtig. Als Probe für diese Tests wurde ein Alkan-Mischstandard, beschrieben in Kap. 7.2.1 auf Seite 133, verwendet. Die Präparation wurde ebenfalls wie in Kap. 7.2.1 beschrieben, durchgeführt. Der Alkan-Mischstandard wurde mit den 29 Matrix-Substanzen in Tab. 2 getestet, wobei jede Matrix in 5 verschiedenen Konzentrationen eingesetzt und mit der matrixlosen Präparation verglichen wurde.

Es zeigte sich, dass fast sämtliche der getesteten Matrix-Substanzen bereits in geringen Konzentrationen das Probensignal unterdrücken. In Abb. 13 ist dies beispielhaft an der Matrix Dithranol dargestellt. Im oberen Teil der Grafik ist das Spektrum ohne Verwendung der Matrix gezeigt. In fünf Schritten wurde anschließend die Menge der Matrix gesteigert und ein Massenspektrum aufgenommen. Es ist klar erkennbar, dass die Intensität der Alkan-

Peaks mit steigender Menge an Matrix abnimmt. Gleichzeitig nehmen störende Peaks wie Silbercluster oder Silber-Matrix-Addukte zu. Bei Verwendung der 10.0 mg/mL Dithranol-Lösung zur Präparation sind die auftretenden Störungen sehr stark, obwohl diese Menge an Matrix durchaus in der Größenordnung verbreiteter Präparationsprotokolle liegt. Bei anderen Matrices war dieses Verhalten noch extremer. So konnten z. B. bei *trans*-Retinolsäure bei einer eingesetzten Konzentration von 5.0 mg/mL bereits keine Alkan-Signale mehr detektiert werden.

In Tab. 3 ist eine subjektive Gliederung der Matrices nach ihrer Eignung bzw. Nicht-Eignung zur Analyse des Alkanstandards aufgelistet. Es fällt auf, dass sich anhand der Strukturen bzw. der funktionellen Gruppen der verschiedenen Substanzen kein Muster abzeichnet, nach dem diese Rangliste erklärbar ist. So wurden die Probensignale von der Matrix NPO kaum beeinflusst, während die chemisch sehr ähnliche Substanz NPD die Probensignale deutlich unterdrückte, bzw. viele störende Matrix-Silber Addukte im Spektrum auftraten.

Auch finden sich Matrices mit funktionellen Gruppen wie Säure- und Hydroxygruppen sowohl im oberen als auch im unteren Bereich der Tabelle. Es wird daher vermutet, dass eine ganze Reihe von Faktoren an dem Ionisierungsprozess beteiligt sind, von denen abhängt, ob eine Matrix für eine bestimmte Probe geeignet ist oder nicht.

Ein wichtiger Faktor bei der Desorption/Ionisierung ist, wie das eingestrahlte Laserlicht von der Matrix aufgenommen und ggf. an die Probenmoleküle weitergeleitet wird. Daher kann das Absorptionsverhalten der Matrices bei der eingestrahlten Laserwellenlänge von 337 nm von großem Einfluss sein. Um diesen Sachverhalt aufzuklären, wurden die Matrices UV-photometrisch charakterisiert. Hierfür wurden UV-Spektren der Substanzen aufgenommen und zusätzlich die relative Absorption der einzelnen Substanzen bei 337 nm bestimmt (Durchführung und Berechnung siehe Kap. 7.4). Die Werte dieser Bestimmung lassen sich ebenfalls Tab. 3 entnehmen, die UV-Spektren der Matrices sind in Anhang 8.1 abgebildet.

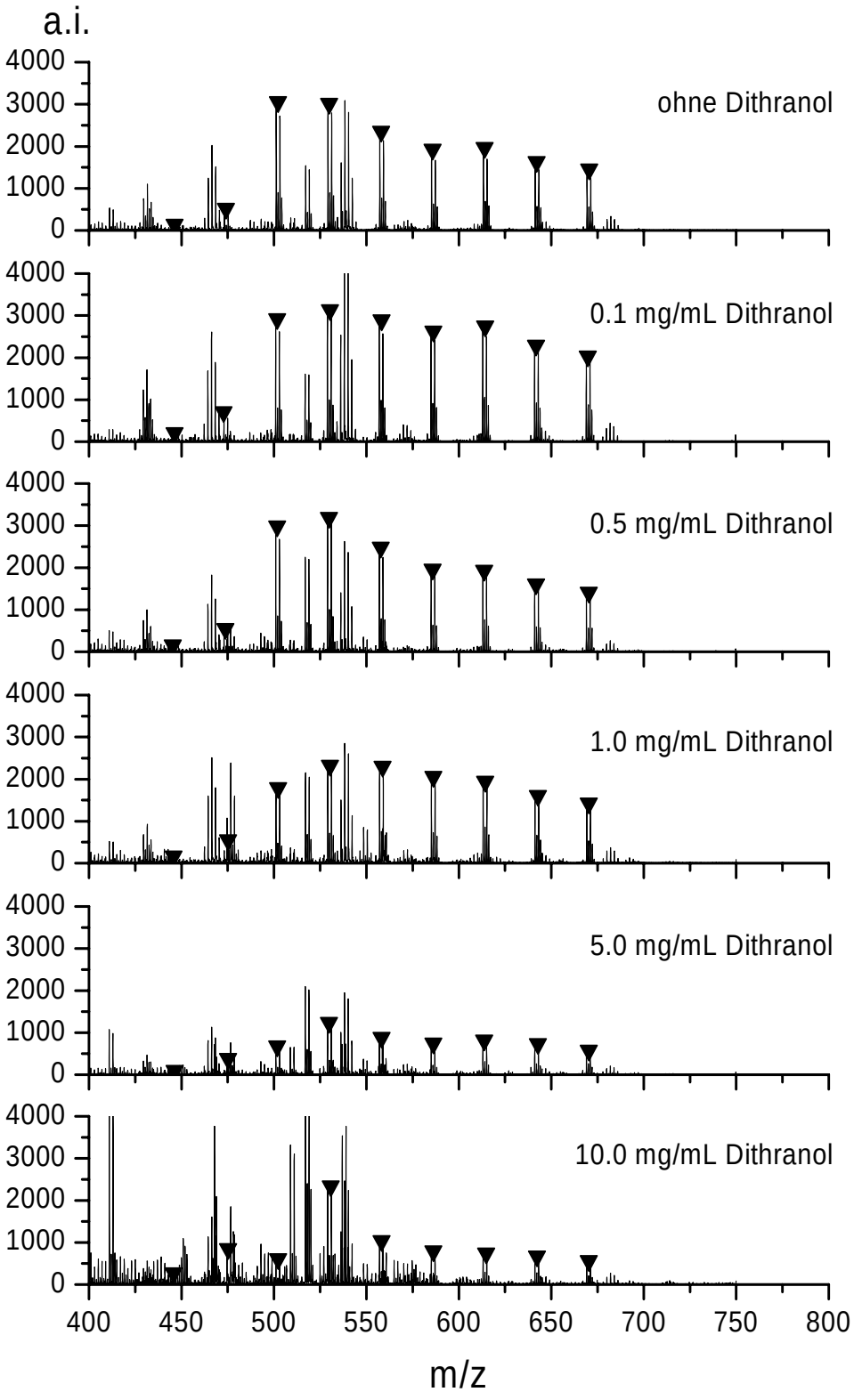



**Abb. 13. MALDI-TOF Spektren des Alkan-Mischstandards mit Verwendung unterschiedlicher Mengen der Matrix Dithranol. Die Alkan-Silberaddukte von $C_{24}$-$C_{40}$ sind mit einem ▼ gekennzeichnet. Der Maßstab in allen Spektren ist gleich gehalten.**

**Tab. 3. Subjektive Einstufung der Matrices in eine Rangliste geordnet nach ihrer Eignung bzw. Nicht-Eignung, die Alkane im MALDI-TOF Massenspektrometer messbar zu machen. Abkürzungen der Matrices siehe Tab. 2. $\varepsilon_{rel}$ = relative Absorption der Matrix bei 337 nm in [ $\frac{AU}{cm*mmol/L}$ ]**

| Nr. | Matrix | $\varepsilon_{rel}$ | Nr. | Matrix | $\varepsilon_{rel}$ | Nr. | Matrix | $\varepsilon_{rel}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | NPO | 2.5 | **11** | GLY | <0.1 | **21** | THA | 4.0 |
| **2** | NIC | <0.1 | **12** | BDNA | 11.8 | **22** | PIC | 0.5 |
| **3** | OG | <0.1 | **13** | FUC | <0.1 | **23** | FA | 8.3 |
| **4** | ANT | 4.6 | **14** | MSA | 3.9 | **24** | RET | 104.7 |
| **5** | 9-BA | 2.6 | **15** | EGS | <0.1 | **25** | IAA | 21.1 |
| **6** | CSA | 1.0 | **16** | DHB | 4.3 | **26** | 3-AC | 3.4 |
| **7** | 9-NA | 2.5 | **17** | HABA | 21.2 | **27** | 3-CCA | 5.2 |
| **8** | 9-ACA | 3.3 | **18** | SA | 16.1 | **28** | 4-CCA | 36.5 |
| **9** | DT | 7.2 | **19** | NPD | 2.0 | **29** | POPOP | 144.3 |
| **10** | 9-CA | 2.9 | **20** | OD | <0.1 | | | |

Es zeigt sich, dass die stärker bei 337 nm absorbierenden Matrices tendenziell weiter unten in der Tabelle stehen. Es sind aber auch sowohl absorbierende als auch weniger oder nicht-absorbierende Matrices im oberen Bereich der Tabelle anzutreffen, ebenso wie nicht UV-aktive Matrices im unteren Bereich. Daher wird davon ausgegangen, dass auch die Absorptionseigenschaften der Matrix bei der Laserwellenlänge nur einen Teilaspekt des Ionisierungsverhaltens der Matrix ausmachen. Dies wird auch von *Preston-Schaffter et al*. [111] unterstützt, die ebenfalls keine direkte Korrelation zwischen Qualität der Matrix und UV-Absorption bei der Laserwellenlänge festgestellt haben. *Horneffer et al*. [112] haben aber gezeigt, dass das Absorptionsverhalten von fünf Stellungsisomeren der Matrix Dihydroxybenzoesäure entscheidend für die Analyse von Peptiden ist. Dies erklärt, warum 2,5-Dihydroxybenzoesäure eine weite Verbreitung als MALDI-Matrix für die unterschiedlichsten Anwendungen erfahren hat, 2,4-Dihydroxybenzoesäure aber als Matrix nicht so gut geeignet ist.

Die „klassischen“ MALDI-Matrices wie z. B. DHB oder 4-CCA absorbieren aber generell alle recht gut im Bereich der Laserwellenlänge. Besonders

auffällig erscheinen hier *trans*-Retinolsäure und POPOP, die bevorzugt bei der Analyse unpolarerer Polymere wie Polystyrol oder Polybutadien eingesetzt werden [25, 28, 29, 31]. Aber gerade diese Matrices scheinen die Bildung von Matrix- und Silberclustern zu fördern [29]. Es wird daher vermutet, dass die Funktionalitäten, die eine Matrix besitzen kann wie z. B. aromatische Systeme, Cyanogruppen, Säuregruppen, Halogene und Hydroxygruppen, nicht nur für die UV-Absorption förderlich sind, sondern auch eine stärkere Interaktion mit den zugesetzten Silbersalzen ermöglichen. In der Tat ist Silber ein starker Komplexbildner, der in der Lage ist, mit den verschiedenartigsten Gruppen Komplexe zu bilden [113]. Eine derartige Komplexbildung des Silberkations mit der Probe könnte den Ionisierungsprozess unterstützen, indem es die Stabilisierung einer positiven Ladung an einem ansonsten unpolaren Analyten erleichtert. Bildet die Matrix aber aufgrund ihrer polareren Gruppen starke Komplexe mit dem Silberkation, so könnte dieses möglicherweise nicht mehr in ausreichender Menge zur Verfügung stehen, um mit dem Analyten zu reagieren. Damit stünde die Silber-Kationisierung der Probe in Konkurrenz zu der Silber-Komplexierung der Matrixmoleküle. Hinzu kommt, dass die Matrix-Silber-Cluster mit intensiven Peaks das Massenspektrum schnell unauswertbar machen.

Das UV-Absorptionsverhalten von Feststoffen kann sich stark von dem des gleichen Stoffes in Lösung unterscheiden. Die Abweichung kann dabei sowohl die Intensität als auch die Absorptionsmaxima der Spektren betreffen. Es hat sich für die verschiedenen DHB-Isomere herausgestellt, dass im Wesentlichen eine leichte Rotverschiebung und eine Verbreiterung der UV-Maxima auftritt [112]. Unter der Annahme, dass sich dies für die anderen Matrices ähnlich verhält, ist z. B. für die Matrix 3-AC eine leichte Verringerung der Absorption zu erwarten (siehe Abb. 72 in Anhang 8.1). Die Matrix besitzt demnach ein UV-Absorptionsmaximum bei ca. 350 nm. Eine Verschiebung zu größeren Wellenlängen bewirkt, dass auch bei 337 nm die Absorption abnimmt. Dagegen nähme die von CSA eher noch zu (vergl. Abb. 80 in Anhang 8.1), da diese Matrix ein Maximum bei ca. 317 nm aufweist und dieses bei einer Rotverschiebung dichter an die Laserwellenlänge von 337 nm heranrei-

chen würde. Da aber offensichtlich die Laserabsorption nur einen Teil des Ionisierungsvermögens einer Matrix ausmacht, erscheint es nur dann sinnvoll, die Laserabsorptionen von Matrices miteinander zu vergleichen, wenn diese chemisch sehr ähnlich sind. Zum Beispiel wäre hiermit die weite Verbreitung der 4-Hydroxy-$\alpha$-cyanozimtsäure als universell einsetzbare Matrix erklärbar, während die wesentlich weniger UV-aktive 3-Hydroxy-$\alpha$-cyanozimtsäure kaum Verwendung findet (siehe Abb. 70 und Abb. 71 in Anhang 8.1 sowie Tab. 3).

Eine besondere Stellung nimmt die Matrix NPO ein. Diese Matrix ist nicht kristallin, sondern flüssig. Die unpolaren Paraffine können direkt in ihr gelöst werden, bzw. sind direkt mit ihr mischbar. Infolgedessen bleibt nach Applikation der Lösung auf dem Probenteller und Abdampfen des Lösemittels ein hauchdünner, flüssiger Film der Matrix-Proben-Mischung zurück. Dadurch wird die Oberfläche verkleinert, so dass generell eine höhere Laserenergie verwendet werden muss. Ein Vorteil besteht darin, dass die Reproduzierbarkeit höher ist als bei kristallinen Matrices, da die Präparation gleichmäßiger über den Probenspot verteilt ist.

Da mit NPO recht gute Ergebnisse erzielt wurden, stellt sich die Frage, inwiefern die Matrix „aktiv“ an der Ionisierung der Probe beteiligt ist. Denkbar ist auch, dass die Substanz die Ionisierung „passiv“ unterstützt, indem sie die Alkan-Moleküle verdünnt und so eine Agglomeration verhindert. Die isolierten Alkan-Moleküle könnten sich besser ionisieren lassen, als im Verband angeordnete, kristalline Alkane. Dieser Effekt müsste sich mit der Matrix 2-Nitrophenyldodecylether noch verbessern lassen, da die Alkylkette länger ist und das Molekül damit einen noch unpolareren Charakter aufweist. Doch obwohl die Alkane in NPD besser löslich sein sollten, waren die Spektren mit dieser Matrix praktisch unbrauchbar. Die Alkan-Peaks wurden mit zunehmender Menge an Matrix unterdrückt und zusätzlich traten starke Matrix-Silber-Addukte im Spektrum auf. Die UV-Spektren von NPO und NPD gleichen sich qualitativ sehr stark, die Absorption bei 337 nm ist bei NPO aber etwa 25% größer als bei NPD. Daher besteht die Möglichkeit, dass die stärkere UV-Absorption für das bessere Ionisierungsvermögen der Matrix eine Rolle spielt.

Octylglucopyranosid war ebenfalls als Matrix geeignet. OG ist pastös und aufgrund seiner Struktur von tensidähnlichem Charakter. Es besitzt jedoch keine messbare UV-Absorption bei 337 nm, so dass hier der positive Effekt durch die „Verdünnung“ und die daraus folgende „Entzerrung“ der Alkan-Moleküle entstanden sein kann.

Insgesamt waren die Spektren bei ausschließlicher Zugabe des Silbersalzes und ohne Matrix von so guter Qualität, dass bei den nachfolgenden Versuchen ganz auf den Einsatz einer Matrix verzichtet, also eine LDI-TOF MS durchgeführt wurde. Die Präparation wird auf diese Weise vereinfacht und es treten in jedem Falle weniger störende Matrix-Silber Addukte im Spektrum auf.

**Optimierung der Silberpräparation**

Um eine möglichst hohe Spektrenqualität und Reproduzierbarkeit zu erhalten, wurden die Präparationsbedingungen optimiert und der Einfluss der verschiedenen Parameter auf die Spektrenqualität untersucht. Es ist bekannt, dass bei den meisten MALDI-TOF-Präparationen das Mengenverhältnis von Probe zu Matrix für die Spektrenqualität entscheidend ist [15, 37, 111]. Bei einer Präparation ohne Matrix kann das Verhältnis von Probe und Silbersalz ausschlaggebend sein. Es wurden daher verschiedene Konzentrationsverhältnisse präpariert und die resultierende Spektrenqualität beurteilt. Als Parameter für diese Beurteilung wurden die absolute Intensität (a.i.), das Signal/Rausch-Verhältnis (S/N) und auch das Auftreten störender Silbercluster im Massenbereich der Probe herangezogen. Um störende Peaks erfassen zu können, wurde das Verhältnis aus $\mathrm{S/St.} = \frac{a.i.(\max.Analytpeak)}{a.i.(\max.Störpeak)}$ gebildet. Die Versuchsdurchführung ist in Kap. 7.2.2 beschrieben. Die Konzentrationen von Silbersalz und Wachsprobe wurden anhand von Vorversuchen ausgewählt.

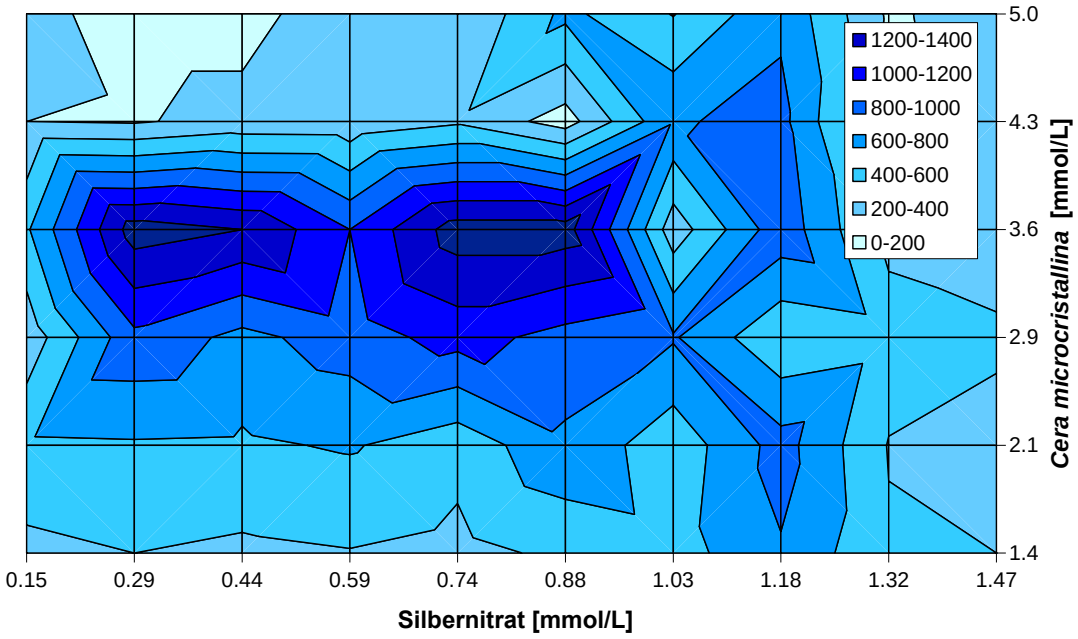



**Abb. 14. Absolute Intensitäten (a.i.) in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis *Cera microcristallina* und Silbernitrat.**

In Abb. 14 ist die absolute Intensität der *Cera microcristallina* Peaks in Abhängigkeit von den eingesetzten Konzentrationen an Silbernitrat und mikrokristallinem Wachs aufgetragen.

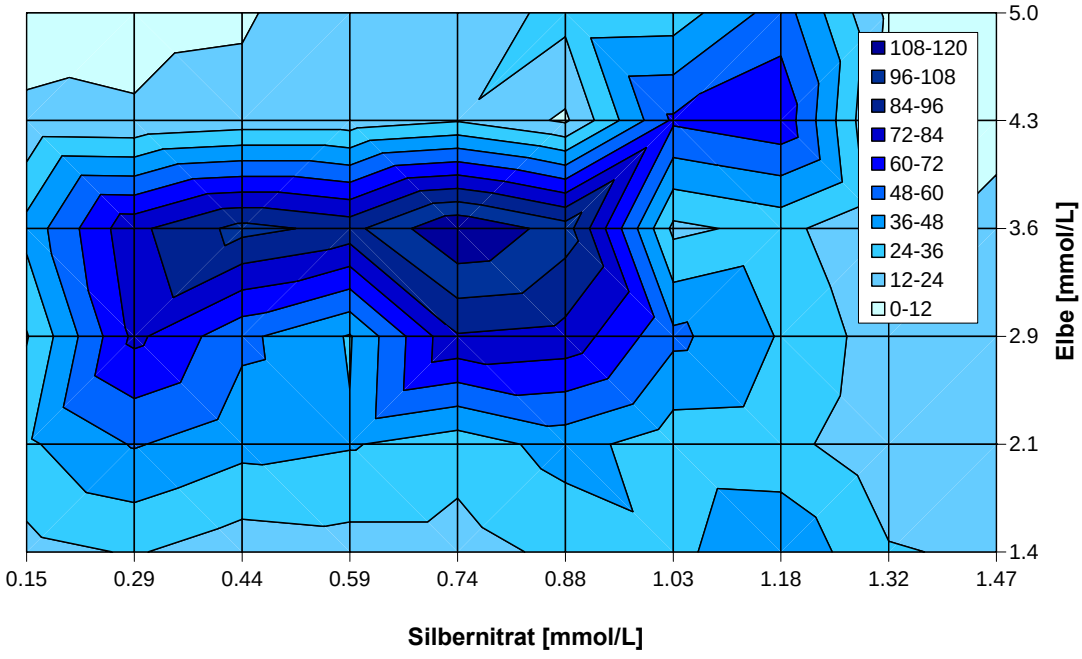



**Abb. 15. Signal/Rausch-Verhältnis (S/N) in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis *Cera microcristallina* und Silbernitrat.**

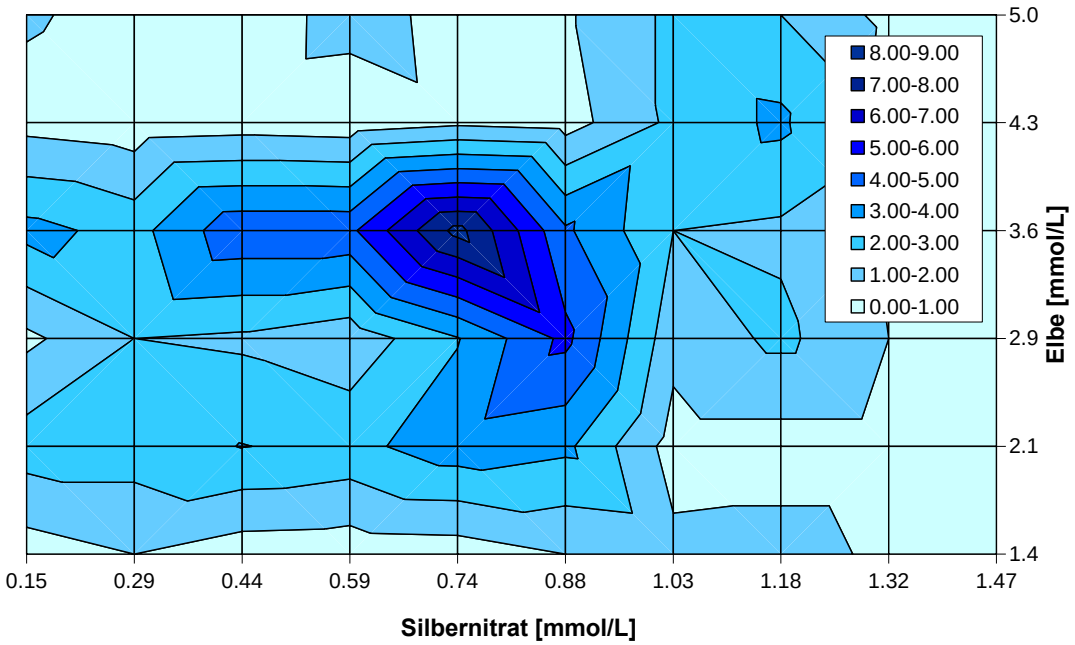



**Abb. 16. Signal/Störpeaks-Verhältnis (S/St.) in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis *Cera microcristallina* und Silbernitrat.**

Da die Intensität der Peaks auch von der Laserenergie abhängt, wurde diese während aller Messungen konstant gehalten. Es ist deutlich erkennbar, dass die Konzentrationen der eingesetzten Substanzen die Messung stark beeinflussen können. Insbesondere die Menge an Probe ist für die Präparation ausschlaggebend. Die Intensität der Signale erhöht sich mit der Menge an auf dem Probenteller aufgebrachtem Wachs, bis sie nach Überschreiten eines Optimums wieder abfällt.

Dies kann mehrere Gründe haben; zum einen, dass die Verteilung und Kristallisation des mikrokristallinen Wachses auf der Oberfläche des Probentellers sich ungünstig auf die Analyse auswirkt, zum anderen, dass die Laserenergie bei einer dickeren Schicht der Probe nicht mehr ausreicht, um die Probe zu desorbieren und zu ionisieren. Als dritte Möglichkeit kommt weiterhin in Betracht, dass die polareren Silberionen sich auf der Metalloberfläche des Probentellers anreichern sich und die unpolareren Kohlenwasserstoff-Moleküle darüber anordnen. Es ist natürlich denkbar, dass höhere Probenkonzentrationen sich mit einer höheren Laserenergie ebenfalls

analysieren lassen. Praktisch kann man dieses Problem umgehen, indem die Laserenergie bei jeder Analyse an die Probe angepasst wird.

Bei der Konzentration der Silberlösung ist die Abhängigkeit nicht so ausgeprägt. Ist die Konzentration an $Ag^+$-Ionen zu gering, ist die Ionisierung der Probe schwierig, ist zu viel vorhanden, stören vermehrt Silbercluster das Spektrum.

Analog zur absoluten Intensität der Spektren wurde auch das Signal-Rausch-Verhältnis und das Auftreten von Störsignalen dokumentiert (siehe Abb. 15 und Abb. 16). Hier zeigt sich ein ähnliches Bild: Durch Einstellen eines geeigneten Konzentrationsverhältnisses von Silbernitrat und Probe lassen sich geeignete Messbedingungen finden, die optimierte Spektren ergeben.

Dieser Test wurde mit Proben von *Paraffinum Liquidum* und *Petrolatum* wiederholt. Bei diesen waren die Maxima nicht so stark ausgeprägt und bezüglich der Konzentrationen auch leicht verschoben (Grafiken nicht dargestellt). Bei einer Konzentration von ca. 0.1 mg/mL Silbernitrat (entspricht 0.6 mmol/L) und 1.2-1.5 mg/mL Paraffin (ca. 3.0-4.5 mmol/L) konnte für alle Paraffinproben ein auswertbares Massenspektrum erhalten werden.

Weiterhin wurde dieser Test auch unter Verwendung einer anderen Präparationstechnik durchgeführt: Silbersalzlösung und Probenlösung wurden dabei nacheinander auf den Probenteller gegeben. Dabei zeigte sich, dass generell höhere Konzentrationen an Silber verwendet werden müssen, um ein ähnlich gutes Signal wie bei der zuerst vorgestellten Methode zu erreichen (Grafiken nicht dargestellt). Zudem zeigte sich eine schlechtere Reproduzierbarkeit.

Aus diesen Ergebnissen – vor allem der höheren benötigten Silbernitratmenge – kann geschlossen werden, dass das Silbernitrat bei der ersten Präparationstechnik zumindest zum Teil in dem Wachsfilm verteilt ist, der nach dem Verdunsten des Lösemittels zurückbleibt. Dies ist insofern erstaunlich, da sich die Polarität von Silberionen und Alkanen sehr stark unterscheiden und eine Trennung dieser Bestandteile auf dem Probenteller in kleine „Silbersalz- und Paraffininseln“ als wahrscheinlich erachtet wurde. Da die Verteilung von Silberionen und des Paraffin auf dem Probenteller als

ein wichtiger Einflussfaktor für die LDI-TOF MS von Paraffinen eingeschätzt wird, wird im Folgenden versucht, über eine neue Präparationstechnik Einfluss darauf zu nehmen.

**Präparation ohne Lösemittel**

Üblicherweise werden bei der MALDI-TOF MS Probenpräparation Matrix und Probe gelöst und anschließend gemischt [114]. Dies setzt jedoch voraus, dass Matrix, Probe und ggf. benötigte Kationenzusätze in dem gleichen Lösemittel bzw. Lösemittelgemisch löslich und mischbar sind. Daher gibt es seit einiger Zeit Bestrebungen, eine Probenpräparation ohne Lösemittel zu entwickeln. *Skelton et al*. [115] haben Matrix und Probe zu einem Pellet gepresst und dieses auf dem Probenteller fixiert. Bessere Ergebnisse konnten jedoch mit einer neuen Methode erzielt werden, bei der Probe und Matrix im Mörser oder in einer Kugelmühle vermahlen werden und das feine, homogene Pulver auf dem Probenteller ausgestrichen wird [71, 72, 116, 117]. Die Vorteile dieser Methode liegen vor allem in der homogeneren Verteilung der Bestandteile. Eine Art Umkristallisation und damit Trennung der Bestandteile beim Abdampfen des Lösemittels kann hier nicht stattfinden. Zudem ermöglicht die Methode die Analyse von schwerlöslichen Substanzen.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Paraffinen ist ein Mörsern oder Mahlen schwierig, da keine Matrix verwendet wurde. Um eine bessere Verteilung des Silbersalzes in der Probe zu ermöglichen, wurde feinkristallines Silbertrifluoroacetat mit dem Paraffin verrieben. Feste oder pastöse Produkte können präpariert werden, nachdem sie im Trockenschrank geschmolzen worden sind. Nach dem Verreiben wurde ein Aliquot der Mischung aus Probe und Silbertrifluoroacetat auf dem Probenteller mit Hilfe eines mit Teflon überzogenen Spatels zu einem dünnen Film (ca. 0.2-0.5 µm dick) ausgestrichen. Die genauen Präparationsbedingungen sind in Kap. 7.2.3 beschrieben.

Es zeigte sich, dass diese Präparation die beste Spektrenqualität lieferte. Zudem erleichterte die Präparation die Reproduzierbarkeit und Suche nach den Sweet Spots, da fast auf der gesamten Probenteller-Oberfläche qualitativ hochwertige Spektren aufgenommen werden können. Besonders positiv

äußerte sich die Methode bei der Analyse von *Petrolatum* bzw. Vaseline. Diese besitzen durch ihre Zusammensetzung häufig eine größere Verteilungsbreite und ließen sich aus diesem Grund mit keiner der zuvor getesteten (MA)LDI-TOF Methoden abbilden.

In dem LDI-TOF Massenspektrum der Vaselineprobe (siehe Abb. 17) sind deutlich mehrere Maxima bzw. Schultern zu erkennen, die auf die verschiedenen Komponenten hindeuten, aus denen die Vaseline zusammengesetzt ist. Aus diesem Grund sind bei der Untersuchung von Vaseline auch Signale über einen breiteren Massenbereich als bei den Paraffinölen zu erkennen.

Eine mögliche Erklärung für die besseren Ergebnisse mit der lösemittelfreien Probenpräparation kann in der Verteilung von Silbertrifluoroacetat und Paraffin liegen. Um dieses zu bestätigen, wurde eine Präparation von Silbertrifluoroacetat und Vaseline einmal fest, einmal mit Lösemittel durchgeführt. Die so entstandenen Präparationen wurden mittels Rasterelektronenmikroskopie (*Scanning Electron Microscopy*, SEM) und Detektion der elementspezifischen Röntgenstrahlung (*Energie-Dispersive-Röntgenfluoreszenz*, EDX) untersucht.

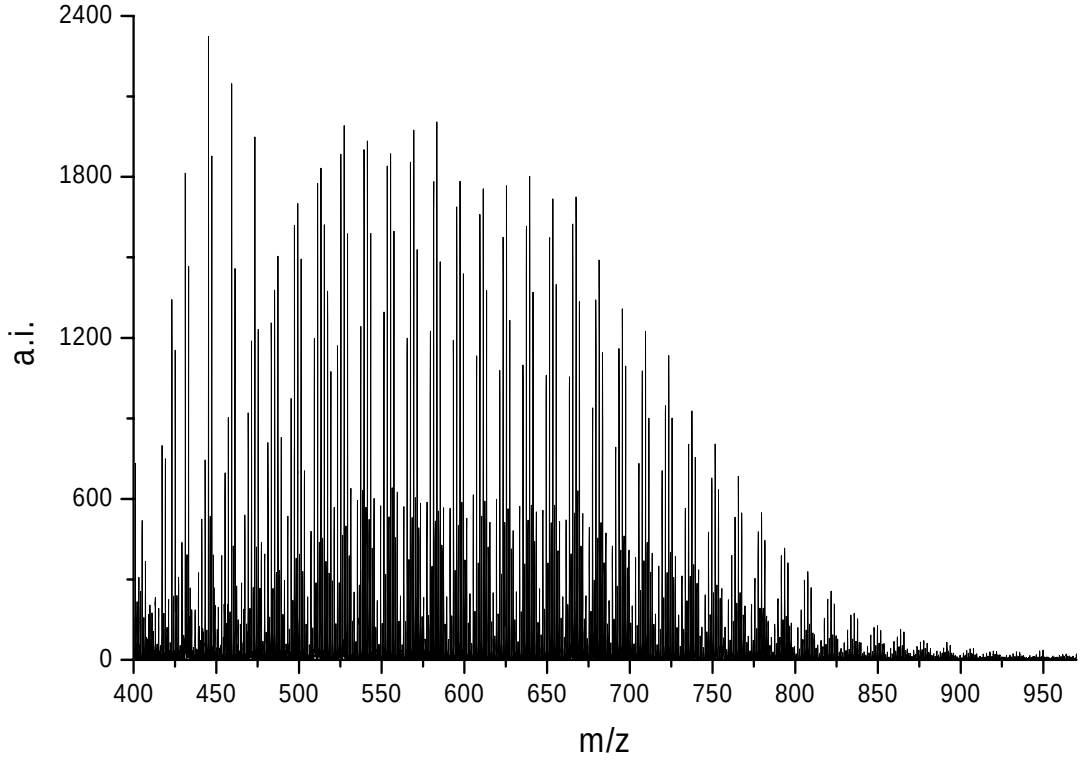



**Abb. 17. LDI-TOF Spektrum von *Petrolatum*, Vaseline 1, nach lösemittelfreier Präparation.**

In Abb. 18 sind die SEM-Aufnahmen der beiden Präparationen abgebildet. Da sich bei Vorversuchen die bei der LDI-TOF MS eingesetzte Silberkonzentration als zu gering erwiesen hatte, wurde für diesen Test eine Menge entsprechend etwa 2 % AgTFA in der fertigen Präparation gewählt, um die Silberverteilung überhaupt effektiv mittels EDX bestimmen zu können.

Im SEM sind helle, kristallartig aussehende Punkte/Strukturen erkennbar. Mit Hilfe des EDX-Detektors konnte ortsaufgelöst in den hellen Punkten Silber und Fluor nachgewiesen werden. Es zeigt sich, dass in der mit Lösemittel präparierten Probe die Silbersalzkristalle tendenziell um etwa Faktor 10 größer sind als in der lösemittelfrei präparierten Probe (lösemittelbasiert ca. 10-70 µm, lösemittelfrei ca. <3-15 µm). Bei der lösemittelfreien Präparation auf dem zur Mikroskopie verwendeten Beryllium-Plättchen bildeten sich Ansammlungen der feinen Silbersalzkristalle in der leicht gerillten Oberflächenstruktur.

Es wird aber angenommen, dass dieser Effekt bei der Präparation auf dem MALDI-Probenteller nicht so gravierend ausfällt, da hierfür ein Proben-

teller mit polierter Oberfläche verwendet wird und der Teflonspatel die Kristalle besser verteilen kann.

Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass das Silbersalz bei der lösemittel-basierten Präparation auf dem Probenteller zu größeren Kristallen auskristallisieren kann. Dies ist insofern plausibel, als dass man den Prozess des Trocknens und Auskristallisierens als Umkristallisation auffassen kann, bei der sich zwei Stoffe aufgrund ihrer unterschiedlichen Polarität bzw. ihrer Löslichkeit in dem Lösemittel ganz oder teilweise voneinander separieren. Dies kann auch erklären, warum mit der lösemittelfreien Präparation die Suche nach Sweet Spots erleichtert war. Durch die feinere Verteilung der Silbersalzkörnchen erscheint die Präparation insgesamt homogener als bei der lösemittelbasierten Technik. Dies wird auch von *Trimpin et al.* [72, 116] sowie *Przybilla et al.* [71] bestätigt, die unpolare und schwerlösliche Polymere mit MALDI-TOF MS analysiert haben.

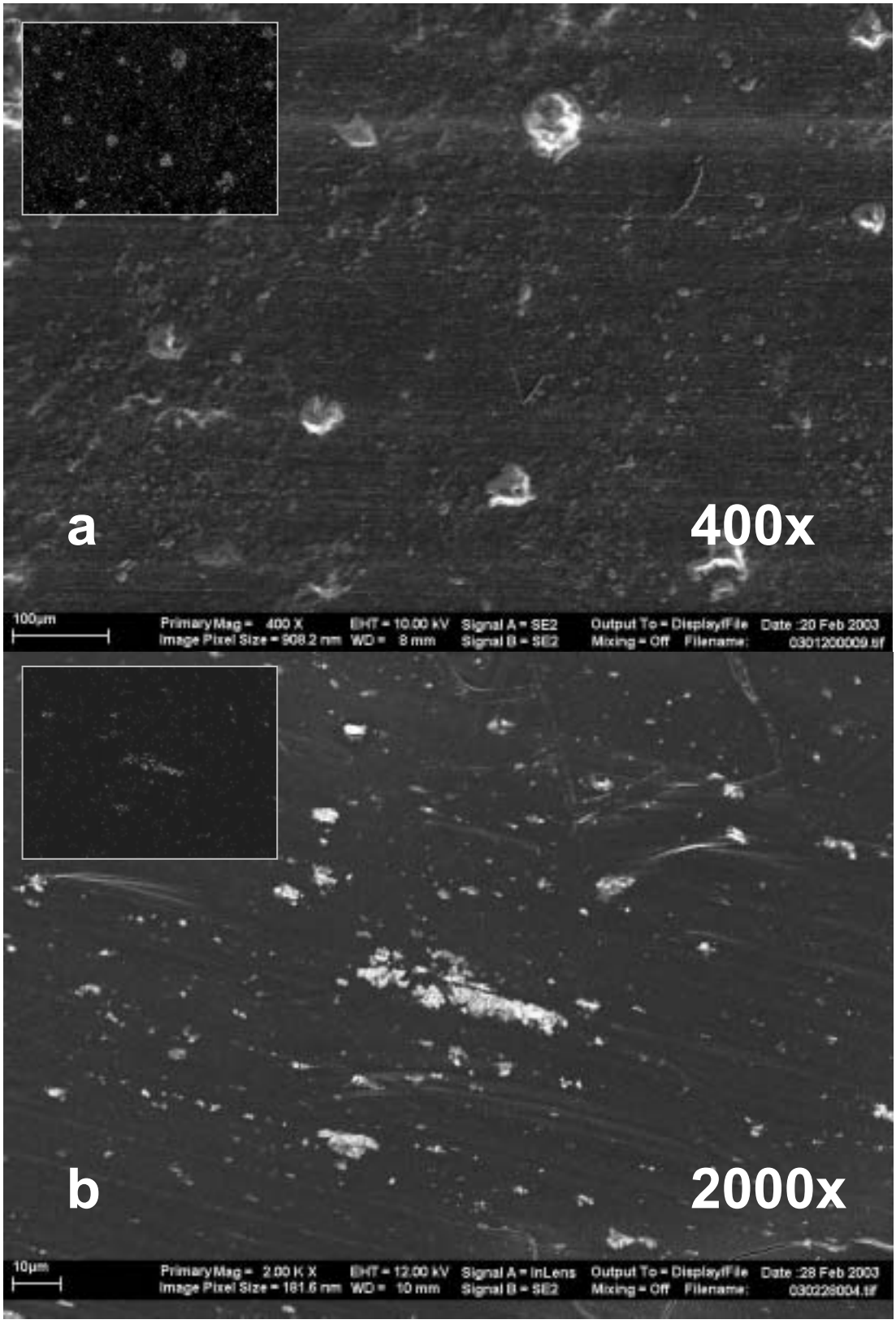



**Abb. 18. SEM von Vaseline mit AgTFA, a mit Lösemittel (400x Vergr.) und b lösemittelfrei (2000x Vergr.). Die hellen Punkte wurden mit Hilfe von EDX-Messungen als silberhaltig identifiziert (siehe kleine Abb. oben links).**

Ein weiteres Problem, das bei der lösemittelbasierten Präparationstechnik auftreten kann, ist die unterschiedlich starke Verteilung der Paraffine über den Probenspot, während das Lösemittel verdampft. *Amado et al.* haben festgestellt, dass Probensubstanzen sich bei einer klassischen „dried-droplet" Präparation im Randbereich des Probenspots angereichert haben [118]. Dieser Effekt – bekannt als „Marangonieffekt" – kann als ein Massentransport verstanden werden, der aus unterschiedlichen Oberflächenspannungen zweier Flüssigkeiten resultiert. Nach anfänglichen Versuchen bestand der Verdacht, dass dies auch bei der lösemittelbasierten Präparation der Paraffine auftreten kann und durch die unterschiedlichen Oberflächenspannungen des Lösemittels und des Paraffins hervorgerufen wird.

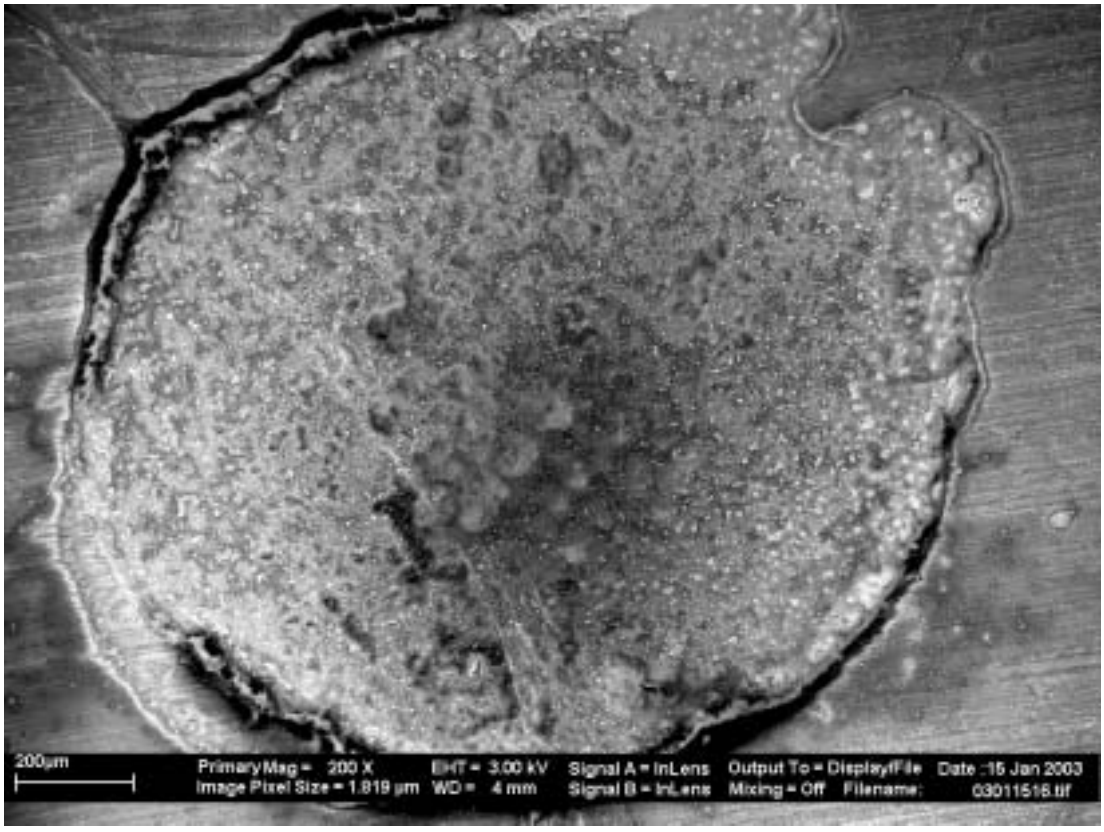



**Abb. 19. SEM von Vaseline-Probenspot nach lösemittelbasierter Präparation mit AgTFA (200x Vergr.). Spotdurchmesser ca. 16-18 mm. Am äußeren Rand des Spots ist eine Art „Wulst" zu erkennen, die auf den Marangonieffekt zurückgeführt wird.**

In Abb. 19 ist eine elektronrastermikroskopische Aufnahme eines Probenspots nach der lösemittelbasierten Präparation zu erkennen. Der Rand des Spots erscheint durch eine Anreicherung des Paraffins wulstartig. Dies ist ein starkes Indiz dafür, dass die Paraffinverteilung auf dem Probenteller bei lösemittelbasierter Präparation keineswegs homogen ist.

Vielmehr scheint ein Konzentrationsgefälle vom Spotrand zur Mitte zu bestehen. Dies kann die Suche auf dem Probenteller nach einem „Sweet Spot“ weiter erschweren, da an verschiedenen Stellen unterschiedliche Messbedingungen vorherrschen. Die bessere Verteilung der Probe zusammen mit der kleineren Korngröße der Silberkristalle sind wahrscheinlich die Hauptgründe dafür, dass bessere und reproduzierbare LDI-TOF Massenspektren bei lösemittelfreier Präparation aufgenommen werden können. Weiterhin gelang die Aufnahme von komplexeren Proben (z. B. Vaseline) in einer akzeptablen Qualität ausschließlich mit dieser Methode.

### 4.1.2 Ionisierungsverhalten von Paraffinen in der LDI-TOF MS

Auch wenn die MALDI-TOF MS mittlerweile für eine Vielzahl von Anwendungen eingesetzt wird, sind viele Prozesse, die bei der Ionisierung eine Rolle spielen, immer noch unklar. In der Literatur sind auch schon zahlreiche Versuche beschrieben worden, um den Ionisierungsprozess bei der MALDI-TOF Massenspektrometrie weiter aufzuklären. Diese beziehen sich aber größtenteils nur auf die Ionisierung von Peptiden und Proteinen und die Matrices, die hierfür eingesetzt werden können [49, 50, 55-59, 61, 62].

Dabei ist der Mechanismus bei der Ionisierung von Proteinen und Peptiden grundsätzlich verschieden von dem bei der Ionisierung von Polymeren. Bei Proteinen werden in der Regel $[M+H]^+$ Ionen erzeugt; Salze stören diesen Prozess, weswegen verschiedene Aufarbeitungsschritte zur Entsalzung von Proteinlösungen eingesetzt werden. Bei Polymeren wird die Ionisierung in der Regel durch Addition bestimmter Kationen erreicht [114, 119]. Der Mechanismus ist auch hier größtenteils ungeklärt. Dabei zeigen unterschiedliche Polymere auch verschiedene Affinitäten für Kationen. So lassen sich ethoxylierte oder propoxylierte Stoffe in der Regel mit Natrium- oder Kaliumsalzen

ionisieren [21-23, 120]. Dagegen sind unpolarere Polymere eher mit Silber, Kupfer oder auch Palladium ionisierbar [24, 29, 108, 121]. *Rashidezadeh et al*. haben sogar gezeigt, dass ein Polymer abhängig von der verwendeten Matrix verschiedene Affinitäten für ein Kation haben kann [31, 30].

Eine Möglichkeit für die bevorzugte Ionisierung der Polymere durch Anlagerung eines Kations könnte die Bildung eines Komplexes sein, bei dem sich mehrere Monomere um ein komplexierendes Zentralkation anordnen, und so die Ladung über das ganze Polymer stabilisiert wird. Diese Annahme wird von *Okada und Papke et al*. gestützt, die herausfanden, dass sich 4-6 Ethylenoxid-Einheiten helical um ein Natrium-Kation anordnen können [12, 122]. Es kann davon ausgegangen werden, dass unterschiedliche Monomere als Liganden für verschiedene Zentralatome dienen können. Dabei bietet ein Polymer den Vorteil, dass die Konformation der Polymerkette sich im Idealfalle so anpassen kann, dass die einzelnen Monomere Positionen annehmen können, von denen sie koordinative Bindungen zu dem Zentral-Kation ausbilden können. Infolgedessen ist dieses Verhalten der Polymere plausibel.

Silber ist als ausgezeichneter Komplexbildner bekannt [113]. Gerade auch unpolarere Substanzen wie Olefine oder Aromaten sind gut in der Lage, Komplexe mit Silber zu bilden. Trotzdem ist bisher nicht bekannt, wie die Bildung eines einfach positiv geladenen Alkan-Silber Komplexes abläuft. Da bei den Paraffinölen, mikrokristallinen Wachsen und Vaseline weitestgehend keine Doppelbindungen vorhanden sind (siehe auch Kap. 0), kann es sich hier nicht einfach um eine Komplexbindung zwischen einem $\pi$-Elektronensystem und dem d-Orbital eines Übergangsmetalles handeln. Dieser Mechanismus wurde von *Lehmann et al*. für die Silber-Kationisierung von Polystyrol vermutet [123]. Da die Alkane größtenteils keine starren Verbindungen sind, sondern frei drehbare $–CH_2\text{-}CH_2–$ Bindungen besitzen, wird angenommen, dass diese Kohlenwasserstoffe auch eine gekrümmte oder sogar helicale Konformation annehmen können. Auf diese Weise könnte ein in der Mitte befindliches Silberion seine positive Ladung über Ausbildung von van der Waals Bindungen in einer Art Komplex stabilisieren.

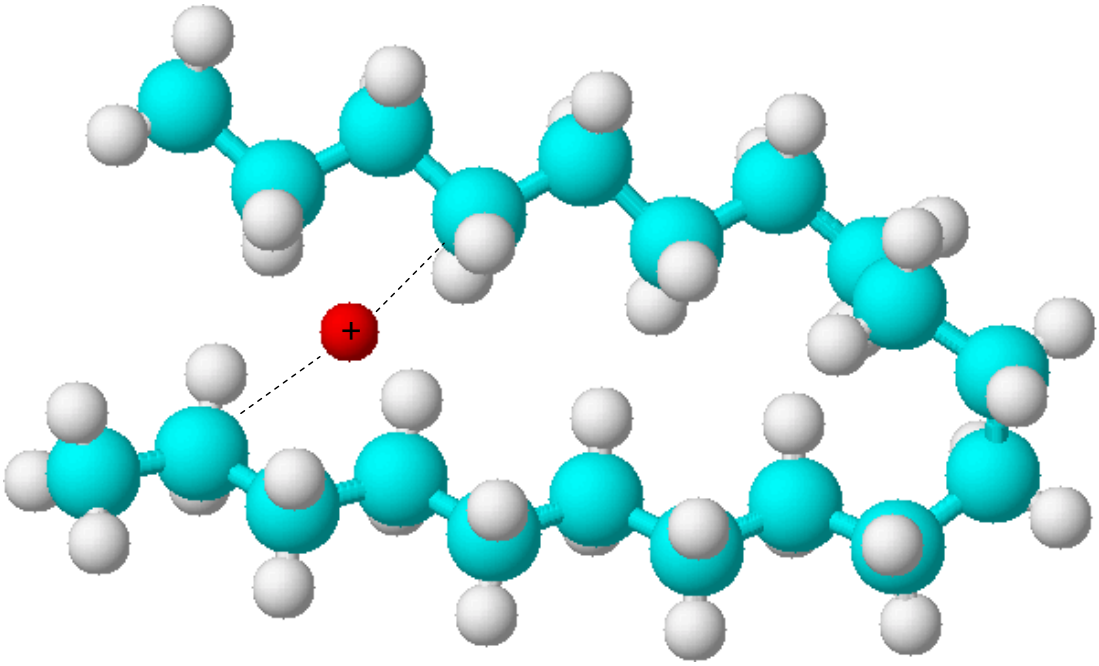


**Abb. 20. Mögliche Struktur eines Silber-Alkankomplexes. Das Silberkation (rot) stabilisiert seine Ladung über van der Waals Wechselwirkungen zu den es umgebenden Kohlenstoffatomen (Beispiel: gestrichelte Linien).**

Die in Wachsen und Paraffinölen enthaltenen Isomere und auch die Cycloalkane könnten diesen Prozess noch begünstigen, da sich leichter geeignete Strukturen vorfinden lassen, die eine solche Anlagerung des Silbers ermöglichen. Die Ringstrukturen in Cycloalkanen sind wahrscheinlich auch besser in der Lage, die positive Ladung des Silberkations zu stabilisieren, so dass diese überproportional stark abgebildet werden.

*Danis et al*. haben bei der Analyse von Polystyrol-Silber Addukten festgestellt, dass diese wieder auseinander brechen, wenn mit einer zu hohen Laserenergie gearbeitet wird. In diesem Fall konnten keine Silberadduktpeaks mehr detektiert werden [25]. Dies bestätigt ebenfalls die Annahme, dass die Kohlenwasserstoffe nur über die relativ schwachen van der Waals Kräfte mit dem Silber verbunden sind.

In jüngerer Zeit wird angenommen, dass Cluster aus Matrix, Kationen und den Probenmolekülen als Vorläufer für die „eigentlichen“ einfachgeladenen Ionen dienen [60, 124-126]. Diese Cluster entstehen möglicherweise unmittelbar nach dem Laserschuss beim Ausbreiten der „Teilchenwolke“ vom Probenteller. Dort finden wahrscheinlich viele Teilchenkollisionen statt, bei

denen sich durch Stoßreaktionen Cluster bilden und außerdem Ladungen übertragen werden können. Viele dieser Cluster sind nicht stabil und zerfallen, sobald die Beschleunigungsspannung angeschaltet wird [73]. Durch den Zerfall solcher Cluster *während* des Beschleunigungsprozesses werden die Bruchstücke unspezifisch beschleunigt und verursachen auf diese Weise einen Großteil des Rauschens im MALDI-TOF Massenspektrum.

Das Silber selbst bildet auch stabilere Cluster aus, die sich spektrometrisch nachweisen lassen. In den MALDI-TOF bzw. LDI-TOF Spektren der Paraffinöle, Wachse und Vaselineproben sind häufig Peaks von Silberclustern hoher Intensität zu beobachten (s. z. B. Abb. 10). Diese lassen sich nicht nur reinem Silber zuordnen, sondern es sind auch Silberchlorid-Cluster zu erkennen (s. Abb. 21 und Abb. 22). Bereits *Macha et al.* beschrieben, dass Silber sich kaum von einem üblichen MALDI-Probenteller aus Stahl wieder entfernen lässt [29]. Infolgedessen kann von dem gereinigten Probenteller ein Spektrum der Cluster aufgenommen werden. Offenbar gibt es auch bei diesen Clustern stabilere und weniger stabile Formen. Reine Silbercluster konnten bis zu $[Ag_9]^+$ nachgewiesen werden, $[Ag_4]^+$, $[Ag_6]^+$ und $[Ag_8]^+$ waren dagegen wenig bis gar nicht erkennbar. Die Silberchloridcluster besitzen ebenfalls eine hohe Intensität.

Trotz intensiver Reinigung und der Tatsache, dass kein Chlorid explizit auf den Probenteller appliziert wurde, ist dieses Element vermutlich dank seines ubiquitären Vorkommens in ausreichender Menge vorhanden.

Die Isotopenverteilungen für verschiedene Cluster wurden auf der Basis der natürlichen Häufigkeiten der Isotope simuliert und zeigen mit den tatsächlich gemessenen Massenspektren eine sehr gute Übereinstimmung (siehe Abb. 22). Neben den Silber- und Silberchloridclustern ist häufig eine Verunreinigung bei m/z 517 bzw. 519 zu sehen. Bei dieser Substanz (Masse ohne Silber: 410 g/mol) handelt es sich vermutlich um Squalen oder eine Squalen-ähnliche Verbindung, die u. a. per GC/MS aus einem Heptanextrakt des verwendeten Silbertrifluoroacetates nachgewiesen werden konnte (GC/MS Chromatogramm nicht dargestellt). Auf eine exakte Bestimmung der Struktur wurde an dieser Stelle verzichtet.

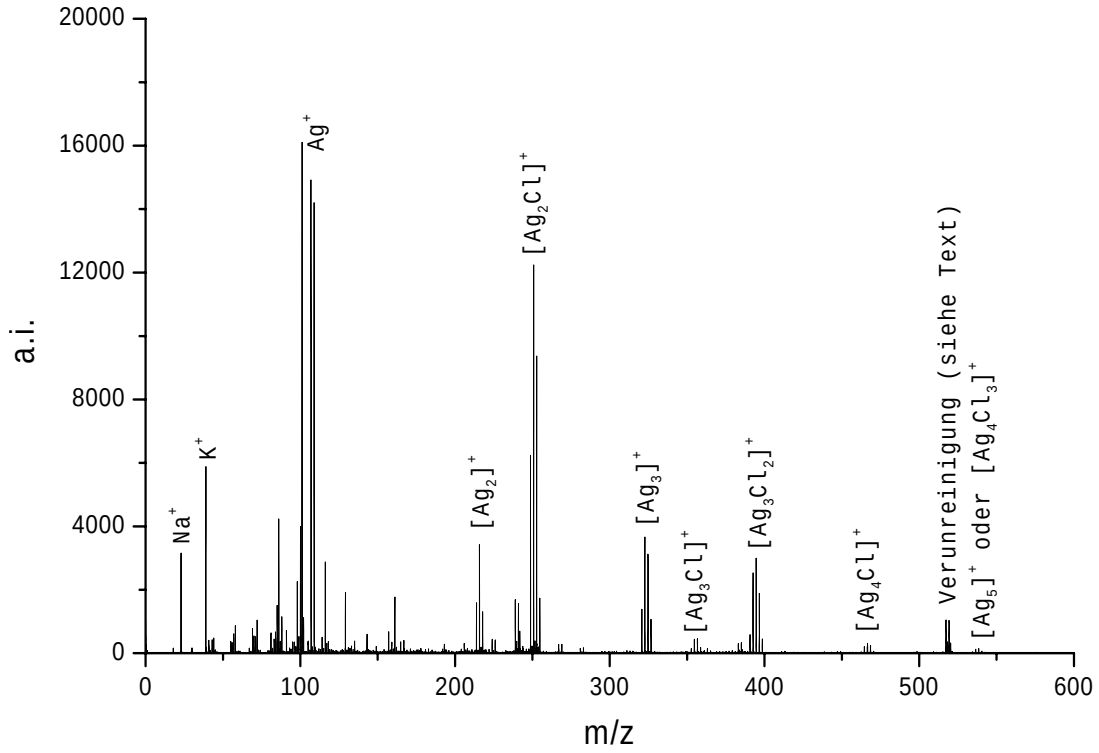



**Abb. 21. Aufnahme eines Massenspektrums von einem gereinigten MALDI-Probenteller. Es sind zahlreiche Silbercluster zu erkennen.**

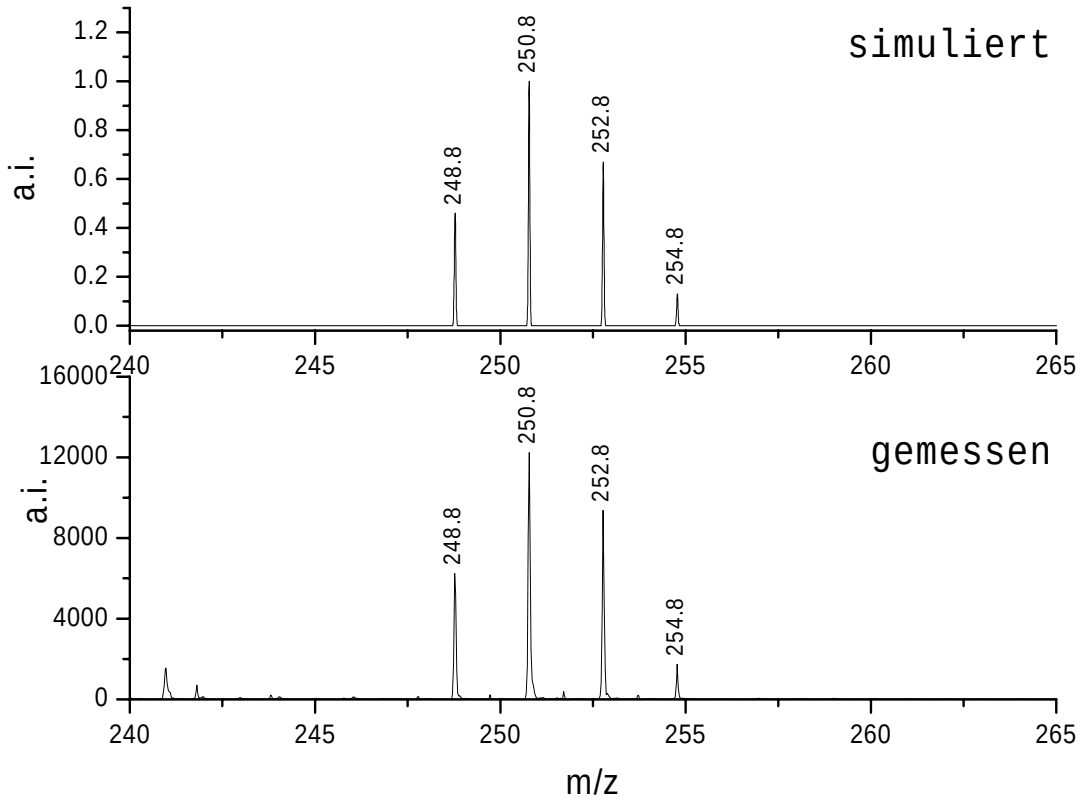



**Abb. 22. Simuliertes und gemessenes Isotopenmuster von $[Ag_2Cl]^+$.**

Die während der Ionisierung gebildeten $[M+Ag]^+$ Ionen (s. Abb. 20) der Kohlenwasserstoffe sind vermutlich aufgrund des Fehlens einer kovalenten Bindung nicht sehr stabil. Eine dauerhafte Stabilität ist auch nicht zwingend notwendig, da die Ionen lediglich den Zeitraum bis einschließlich der Passage des Reflektors intakt überstehen müssen. Diese Zeitspanne von der Erzeugung der Ionen bis zur Detektion beträgt bei dem verwendeten Gerät üblicherweise wenige Mikrosekunden. Zerfällt ein solches Ion nach der Passage des Reflektors, so schlagen die Fragmente dennoch zur „geplanten“ Zeit auf den Detektor auf und werden folglich mit der korrekten Masse detektiert. Derartige Zerfälle führen daher lediglich zu einer Peakverbreiterung durch geringe Flugzeitabweichungen, die durch kleine Impulsänderungen beim Zerfall entstehen.

*Chen und Li* haben *Post Source Decay* (PSD) MALDI Versuche mit Alkanen und deren Metallkation-Addukten gemacht. Für Silberaddukte von Alkanen konnten sie feststellen, dass diese als einziges positiv geladenes Fragment wieder das Silber abspalten. Daher wird angenommen, dass die Silber-Alkan Addukte tatsächlich nur auf van der Waals Wechselwirkungen beruhen und die Bindung sehr schwach ist [127].

**Dehydrierung, Signal/Rausch-Verhältnis und Auflösung**

In der FD- und FI/MS sind Dehydrierungseffekte bei gesättigten Kohlenwasserstoffen schon länger bekannt [128-131]. Bei der MALDI-TOF Massenspektrometrie sind sie dagegen bisher wenig beschrieben [127, 132]. Die Abspaltung von $H_2$ und die Ausbildung einer Doppelbindung wurde daher systematisch untersucht. Hierfür wurde Tetracontan als Mustersubstanz nach der lösemittelfreien Präparationstechnik präpariert und bei verschiedenen Laserenergien über dem Schwellenwert $\varepsilon$=1 gemessen, bei dem gerade Alkan-Silber Addukte beobachtet werden können. Neben dem Auftreten von Dehydrierungseffekten wurden auch das Signal/Rausch-Verhältnis und die Auflösung der Massenspektren beobachtet. Genaue Präparations- und Messbedingungen sind in Kap. 7.2.4 angegeben.

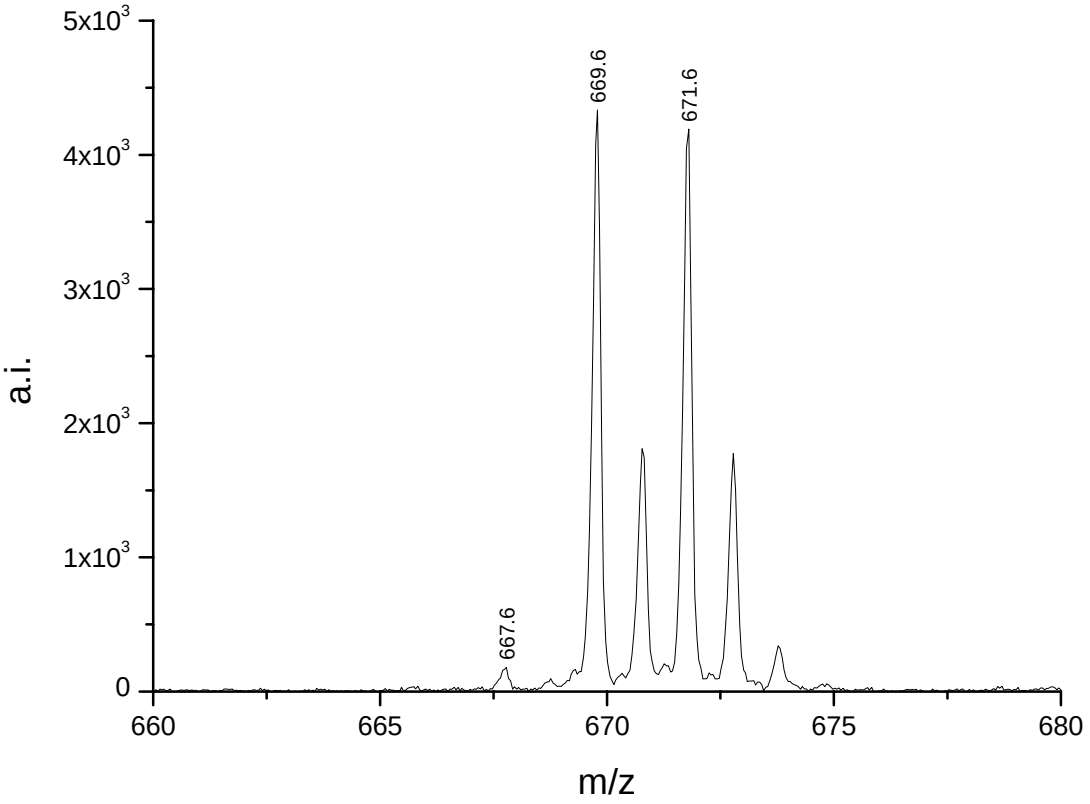



**Abb. 23. LDI-TOF Massenspektrum von Tetracontan, Silberaddukt. Der Peak bei m/z 667.6 resultiert aus der Dehydrierung des Tetracontanes.**

In Abb. 23 ist ein LDI-TOF Massenspektrum von Tetracontan zu sehen. Vor den beiden Peaks der Alkan-Silberaddukte ist deutlich ein Peak mit geringer Intensität zu erkennen, der aus der Dehydrierung des Alkans resultiert. Für die Bestimmung der Dehydrierung wurde das Verhältnis zwischen den Flächen der Peaks $[M\text{-}2H+^{107}Ag]^+$ bei m/z 667 und $[M+^{109}Ag]^+$ bei m/z 671 gebildet. Der Peak bei m/z 669 wurde in die Auswertung nicht mit einbezogen, da er aus der Überlagerung von $[M+^{107}Ag]^+$ und $[M\text{-}2H+^{109}Ag]^+$ resultiert, was zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen kann. Eine Verunreinigung des Standards mit Tetraconten (welches einen Peak mit identischer Masse verursacht hätte) ist aber auszuschließen, da für den Standard ein GC-Zertifikat über eine hohe Reinheit (99.5%) vorlag. Zudem wurde ein NMR Spektrum aufgenommen, wobei in dem Standard keine Olefine nachgewiesen werden konnten (Spektrum nicht dargestellt, Nachweisgrenze ca. 0.03%, siehe Kap. 4.1.4 ab Seite 78).

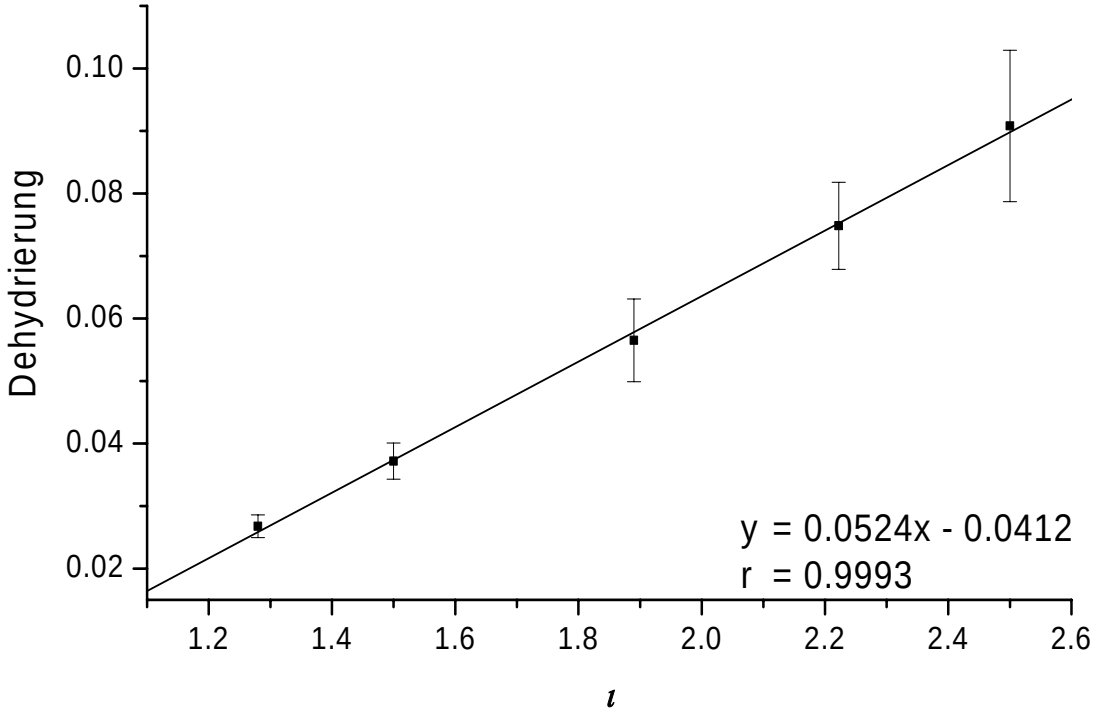



**Abb. 24. Abhängigkeit der Dehydrierung von der Laserenergie. Als „Dehydrierung“ wurde das Verhältnis der Flächen der Peaks von [M-2H+$^{107}$Ag]$^+$ und [M+$^{109}$Ag]$^+$ genommen. (n=5).**

Wie in Abb. 24 zu erkennen ist, besteht ein linearer Zusammenhang mit hohem Korrelationsfaktor zwischen der Laserenergie und der Dehydrierung. Je höher die eingestrahlte Laserenergie, desto stärker ist auch die Dehydrierung. Es kann angenommen werden, dass der Teil der Laserenergie, der nicht zu Desorption und Ionisierung der Probe verbraucht wird, für die Dehydrierung der Alkane zur Verfügung steht. Dies korreliert mit den Untersuchungen von *Gross und Weidner*, die bei der FD/MS eine Steigerung der Dehydrierung bei Steigerung der Feldstärke oder der Emittertemperatur feststellen konnten [128].

In Abb. 25 ist die Abhängigkeit des Signal/Rausch-Verhältnisses in Abhängigkeit von der eingestrahlten Laserenergie zu sehen. Hier zeigt sich ebenfalls ein linearer Zusammenhang.

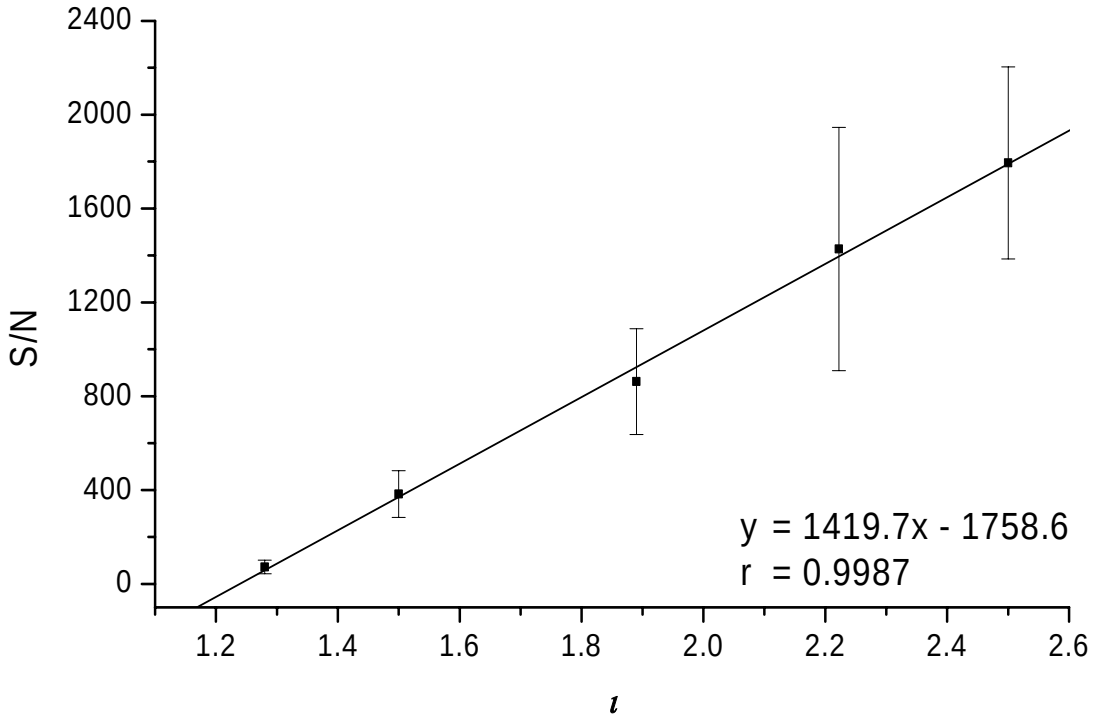



**Abb. 25. Abhängigkeit des Signal/Rausch-Verhältnisses (S/N) von der Laserenergie. (n=5).**

Im Bereich des Schwellenwertes ($t$=1) ist das S/N Verhältnis recht gering. Es kann auch damit gerechnet werden, dass Peaks, die sich am Rande einer Paraffinverteilung befinden, unterdrückt sein können. Mit steigender Laserenergie nimmt auch das S/N Verhältnis stetig zu. Dabei ist die Reproduzierbarkeit des S/N vor allem bei hohen Laserenergien ($t$>2) nicht sehr gut. Eine hohe Reproduzierbarkeit des Signal/Rausch Verhältnisses ist für die Aufnahme eines guten Spektrums nicht zwingend notwendig. Jedoch sollte die Laserenergie so hoch gewählt werden, dass Spektren mit einem angemessenen S/N (>200) aufgenommen werden können.

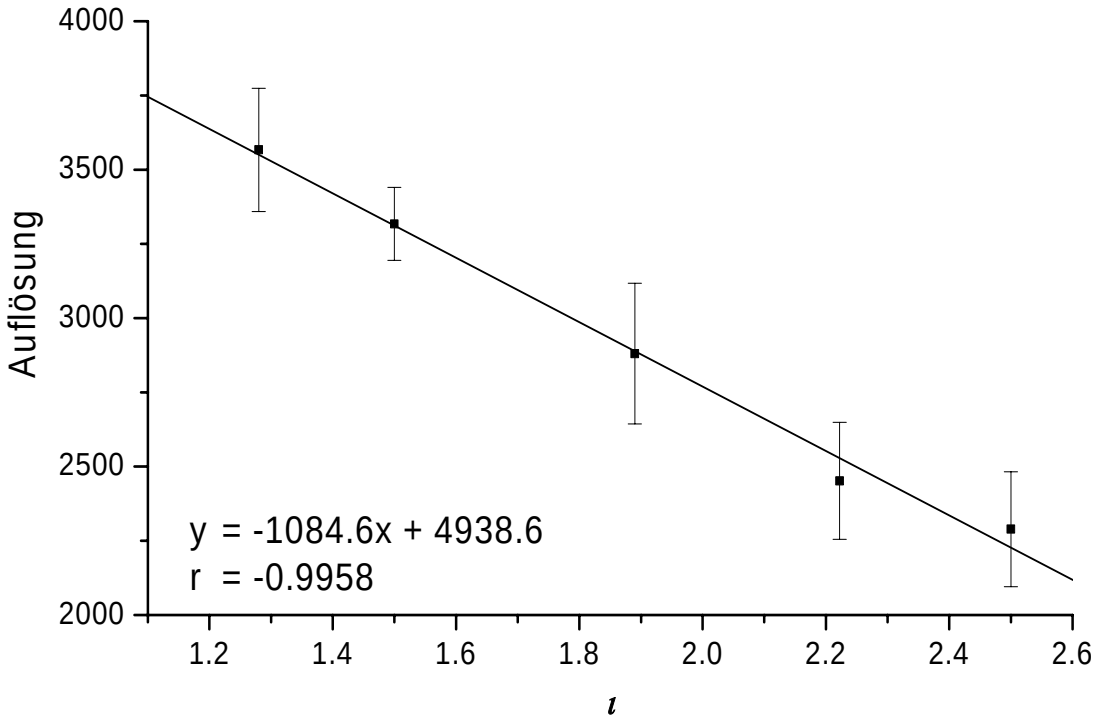



**Abb. 26. Abhängigkeit der Spektrenauflösung von der eingestrahlten Laserenergie (n=5).**

In Abb. 26 ist die spektrale Auflösung (berechnet mit der Software XMass 5.0, Bruker, Bremen) in Abhängigkeit von der Laserenergie aufgetragen. Die Auflösung sinkt mit steigender Laserenergie. Dabei ist ein linearer Zusammenhang mit einem hohen Korrelationsfaktor zu erkennen. Die Abnahme der Auflösung mit steigender Laserenergie ist plausibel. Durch die überschüssige Energie, die nicht zum Ionisieren und Desorbieren der Moleküle verbraucht wird, können Fragmente auftreten, die durch metastabile Zerfälle entstehen. Diese Fragmente erzeugen keine eigenen Peaks, da sie etwa zeitgleich mit den Ionen der ursprünglichen Masse am Detektor ankommen. Folglich verbreitern sie lediglich die Peaks mit der ursprünglichen Masse, was schließlich zu dem beobachteten Abnehmen der Auflösung führt.

Bei der LDI-TOF Massenspektrometrie von Kohlenwasserstoffen spielt die Auswahl der Laserenergie eine entscheidende Rolle für die Aufnahme von aussagekräftigen Spektren.

Zum einen muss sie hoch genug gewählt werden, um ein ausreichendes Signal/Rausch Verhältnis zu gewährleisten, welches ein Auswerten der Spektren überhaupt erst möglich macht. Zum anderen führt eine zu hohe La-

serenergie zu einer Verschlechterung des Auflösungsvermögens und dem Auftreten von Dehydrierung.

Um mehrere Proben oder Chargen miteinander vergleichen zu können, ist es aus diesem Grund erforderlich, bei einer vergleichbaren Laserenergie zu messen. Hierfür ist es unerlässlich, zu Beginn der Messung den Schwellenwert ($\iota$=1) zu ermitteln und die Laserenergie für die entscheidende Messung auf einen angemessenen Wert zu setzen. Für Paraffinöle haben sich Werte bei 1.6$\iota$ bewährt, bei Vaseline 1.5$\iota$.

Generell ist die Laserenergie immer als ein Kompromiss zwischen hoher Peak-Intensität und Signal/Rausch-Verhältnis auf der einen und verminderter Auflösung sowie Verzerrung des Spektrums durch Dehydrierung auf der anderen Seite zu betrachten. Insgesamt ermöglicht die Normierung der Analysenbedingungen den reproduzierbaren Vergleich mehrerer Chargen bei kurzer Analysenzeit und hoher Aussagekraft.

**Diskriminierungen**

Um Diskriminierungseffekte von Massenbereichen bei der LDI-TOF MS zu untersuchen, wurde die äquimolare Alkan-Standardlösung (siehe Kap. 7.2.1) mittels LDI-TOF MS vermessen. Zum Vergleich wurde die gleiche Alkan-Lösung mittels GC/FID analysiert. Da in dem Flammen-Ionisationsdetektor $CHO^+$-Teilchen gebildet und detektiert werden, korreliert die Intensität neben der Anzahl der Moleküle auch mit der Menge an CH-Einheiten in dem jeweiligen Molekül. Folglich muss die gemessene Menge auf Gewichtsanteile umgerechnet werden.

Für die Analyse der langkettigen Alkane wurde eine Hochtemperatur-Gaschromatographie durchgeführt (Bedingungen wie in Kap. 7.3) beschrieben).

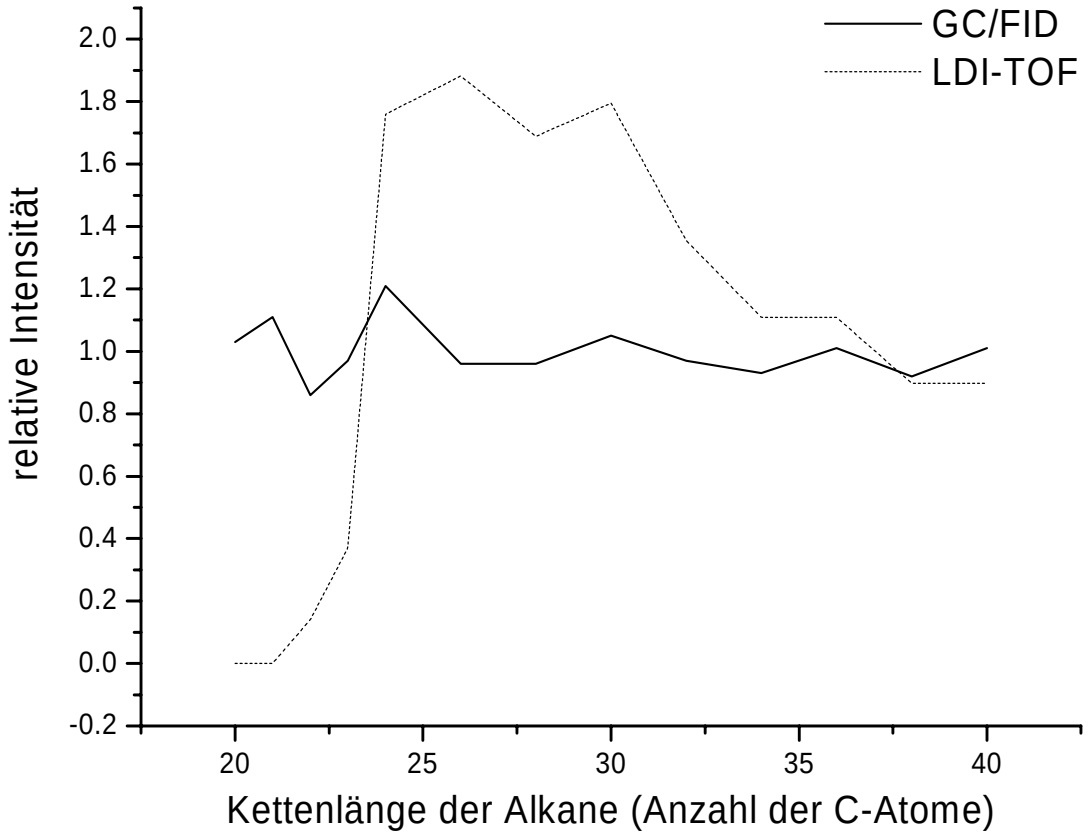



**Abb. 27. Vergleich der relativen Intensitäten bei der LDI-TOF MS und GC/FID einer equimolaren Alkan-Standardlösung.**

Wie in Abb. 27 zu erkennen, ist bei der GC/FID keine deutliche Diskriminierung einzelner Alkane oder ganzer Bereiche vorhanden. Im Gegensatz dazu werden die Alkane bei der LDI-TOF Massenspektrometrie deutlich sichtbar diskriminiert. Zum einen werden kleinere Alkane als Tetracosan wenig bis gar nicht detektiert. Dies liegt höchstwahrscheinlich daran, dass die Alkane im Hochvakuum (üblicherweise im Bereich $10^{-7}$ mbar) leicht von dem Probenteller verdampfen [81, 83]. Zum anderen werden auch die längerkettigen Alkane diskriminiert. Bei steigenden Kettenlängen über 30 C-Atomen nimmt die Intensität der Peaks ab. Dies kann vielfältige Ursachen haben.

Zum einen besteht die Möglichkeit, dass die Alkane unterschiedlich gut desorbiert werden. Diese lägen dann schon in nicht repräsentativen Mengen in der Gasphase vor. Weiterhin wird vermutet, dass die Alkane je nach Kettenlänge unterschiedlich gut ionisiert werden können. Schließlich kann es auch noch Unterschiede in der Stabilität der gebildeten Ionen geben, so dass abhängig von der Kettenlänge mehr oder weniger Ionen intakt beim Detektor

ankommen. Die beobachtete Diskriminierung ist die Summe der Diskriminierungen bei den einzelnen Schritten.

Bei dem Prozess der Beschleunigung wirkt das erzeugte Feld auf die Ionen. Bei den Silber-Kohlenwasserstoff Addukten wirkt dies hauptsächlich auf das Silber, da vor allem hier die positive Ladung lokalisiert ist. Dies könnte nun zur Folge haben, dass das Silberion einfach wieder aus dem Addukt „herausgerissen“ wird. Es wird daher angenommen, dass dies um so wahrscheinlicher wird, je schwerer das angehängte Kohlenwasserstoffmolekül bzw. je höher seine Trägheit ist. Dies würde eine Diskriminierung der längerkettigen Kohlenwasserstoffe plausibel erscheinen lassen.

Neben den chemischen und physikalischen Aspekten bei der Desorption und Ionisierung haben aber auch technische Parameter Einfluss auf die Diskriminierung von Massenbereichen. *Schriemer* und *Li* konnten zeigen, dass u. a. die Beschleunigungsspannung, die Ionenfokussierung und die Größe der Detektorfläche einen Einfluss auf die Diskriminierung haben können [133].

### 4.1.3 Interpretation der MALDI-TOF Massenspektren

Die Interpretation der MALDI-TOF Massenspektren der mikrokristallinen Wachse, Paraffinöle und Vaselineproben gestaltet sich zum Teil sehr komplex. Zum einen muss die Addition des Silbers berücksichtigt werden. Bei den dabei durch die zwei Silberisotope entstehenden Doppelpeaks kann es zu Überlagerungen von Signalen kommen. Zum anderen ist zu bedenken, dass die Peakgröße nicht allein von der Menge des jeweiligen Moleküls abhängt, sondern auch von dessen Ionisierbarkeit, bzw. wie gut das betreffende Ion eine Ladung stabilisieren kann. Die mittleren Molmassen $M_n$ und $M_W$ sowie die Verteilungsbreite *PD* lassen sich durch Integration der Peaks eines Polymers und anschließender Berechnung nach den Gleichungen 3-5 in Kap. 3.1.4 ermitteln.

**Mikrokristalline Wachse**

Diese Klasse der Paraffine zeichnet sich vor allem durch ihre feste bis knetbare Konsistenz aus. Sie bestehen überwiegend aus Alkanen und Isoalkanen, können aber auch weitere Stoffe enthalten. Aus dem LDI-TOF Spektrum eines solchen Wachses lassen sich die mittlere Molmasse und die Verteilungsbreite bestimmen. Ebenso können aus einem solchen Spektrum Hinweise auf enthaltene Olefine oder Aromaten erhalten werden.

Das mikrokristalline Wachs 1 in Abb. 10 und Abb. 11 (s. o.) enthält eine Verteilung von Alkanen bzw. Isoalkanen als Silberaddukte. Neben diesen Signalen sind wenig weitere Signale vorhanden. Neben den Silberaddukten der Alkane, sind Peaks geringerer Intensität mit einer um 2 Da kleineren Masse vorhanden. Diese lassen sich als Olefine erklären, die auch in geringen Mengen in solchen Wachsen vorkommen können. Prinzipiell kann es sich dabei auch um Monocycloalkane handeln, welche in mikrokristallinen Wachsen normalerweise nicht anzutreffen sind. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass diese Peaks aus einer Dehydrierung der Alkane durch das eingestrahlte Laserlicht entstehen. Dieser Effekt wird in den Kap. 4.1.2 und 4.1.4 näher behandelt. Demnach sind die durch Dehydrierung entstandenen Peaks reproduzierbar von relativ geringer Intensität, so dass ein deutliches Signal diesbezüglich als Indiz für eine Olefin bzw. ein Cycloalkan gewertet werden kann. Besteht ein Verdacht auf Olefine, so kann man diesen ggf. durch eine andere Methode (z. B. NMR-Spektroskopie, siehe Kap. 4.1.4) überprüfen.

In Abb. 28 ist das LDI-TOF Massenspektrum des Wachses 2 abgebildet. Dieses weist eine wesentlich höhere mittlere Molmasse auf und erstreckt sich auch über einen breiteren Massenbereich als Wachs 1. Zusätzlich sind weitere Peaks vorhanden, die auf die Anwesenheit von Aromaten und Olefinen hindeuten, was mittels NMR-Spektroskopie bestätigt werden konnte. Es kann an dieser Stelle angenommen werden, dass die Peakgrößen bzw. –flächen der Olefin- und Aromatensignale nicht proportional ihrer Menge im Wachs sind, da sie wahrscheinlich die Bildung und Stabilisierung eines Silberkomplexes und damit ihre massenspektrometrische Analyse begünstigen.

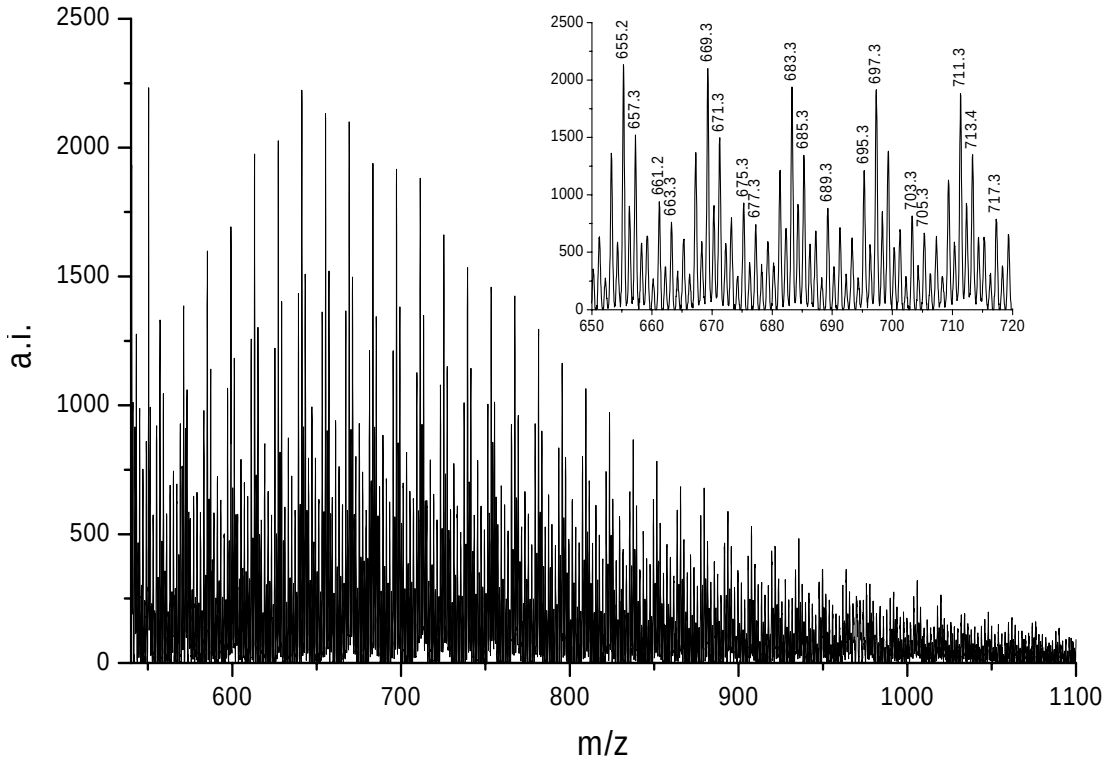



**Abb. 28. LDI-TOF Massenspektrum von Wachs 2, Silberaddukte. Neben den Alkanpeaks sind weitere Peaks zu erkennen, die auf die Anwesenheit von Olefinen und Aromaten hindeuten (siehe Ausschnitt).**

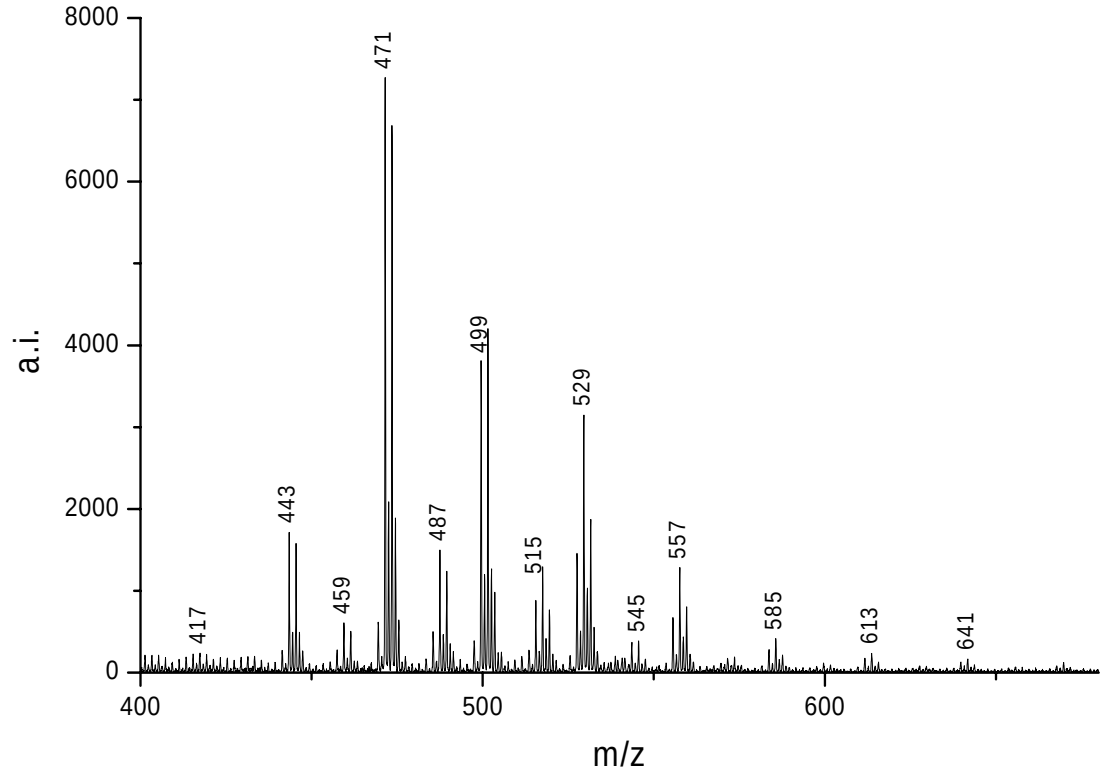



**Abb. 29. LDI-TOF Massenspektrum von Wachs 3, Silberaddukte. Die dominanten Peaks bei m/z 443, 471, 499 u.s.w. entsprechen Silberaddukten von Monoolefinen.**

Ein weiteres Wachs (Wachs 3) ist in Abb. 29 zu sehen. Hierbei handelt es sich vermutlich um ein synthetisches Wachs oder eine Mischung aus mikrokristallinem Wachs mit synthetischem Wachs, welches reich an Olefinen ist. Die Olefine weisen untereinander einen Massenabstand von 28 Da auf, sind geradkettig und daher wahrscheinlich nicht petrochemischer Natur. Weiterhin sind auch Alkan- bzw. Isoalkanpeaks vorhanden, die auch petrochemischer Natur sein können, da hier auch die ungeraden Kettenlängen auftreten.

Die Massenspektren von drei weiteren Wachsen (Wachse 5-7) sind in den Abb. 99 bis Abb. 101 auf den Seiten 161 und 162 zu sehen. Diese demonstrieren, wie vielfältig die Wachse aussehen können. Während Wachs 5 eher eine höhere mittlere Molmasse hat als die Wachse 6 und 7, haben letztere eine höhere Verteilungsbreite und erstrecken sich über einen größeren Massenbereich. Dafür sind bei dem Wachs 5 weitere Peaks vorhanden, die ähnlich wie bei Wachs 2 (s.o.) auf die Anwesenheit von Aromaten hindeuten.

Insgesamt zeigt sich, dass die LDI-TOF Methode zur Charakterisierung von mikrokristallinen Wachsen eingesetzt werden kann, um qualitative Unterschiede zwischen verschiedenen Mustern herauszuarbeiten.

**Paraffinöle**

Paraffinöle sind wesentlich komplexer zusammengesetzt als die mikrokristallinen Wachse – zu den Alkanen und Isoalkanen kommen noch eine Reihe von Cycloalkanen und deren Isomere. Mehrere Chargen von vier verschiedenen Klassen A, B, C und D von Paraffinölen wurden mittels LDI-TOF MS untersucht. In Abb. 30 ist ein LDI-TOF Massenspektrum eines Paraffinöls der Klasse B zu sehen. Dabei zeigt sich, dass sich das Spektrum vergleichsweise komplexer darstellt als die der mikrokristallinen Wachse. Neben den Silberaddukten von Alkanen und Isoalkanen sind eine Reihe weiterer Peaks der Cycloalkane vorhanden.

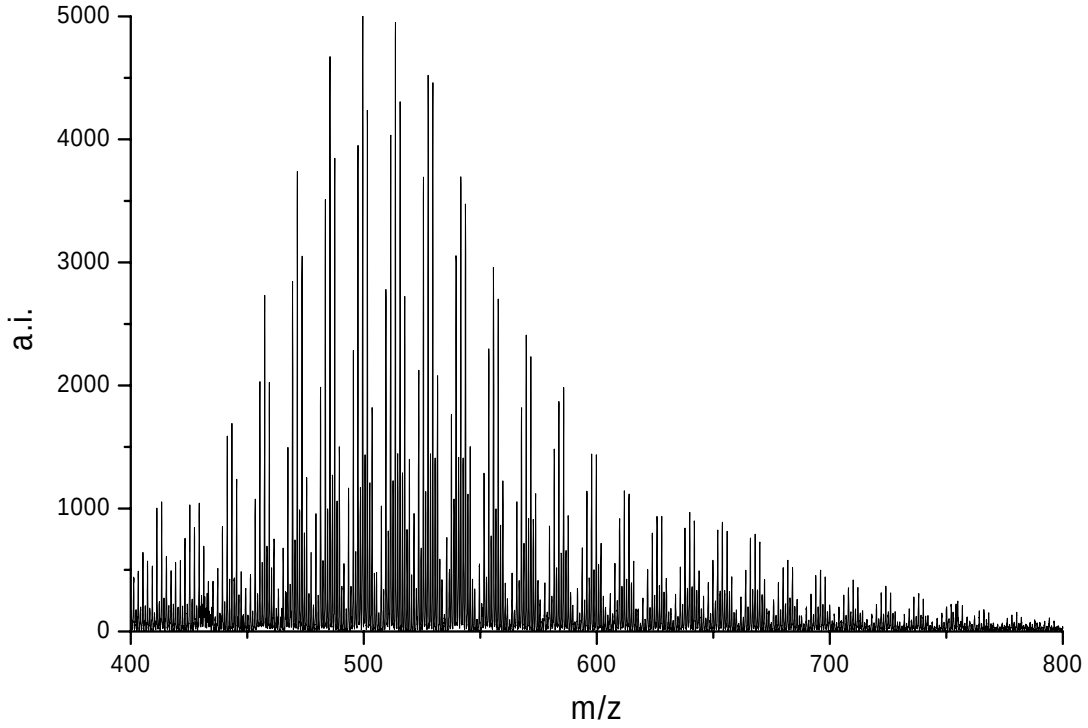



**Abb. 30. LDI-TOF Massenspektrum von *Paraffinum liquidum* der Klasse B, Öl 1**

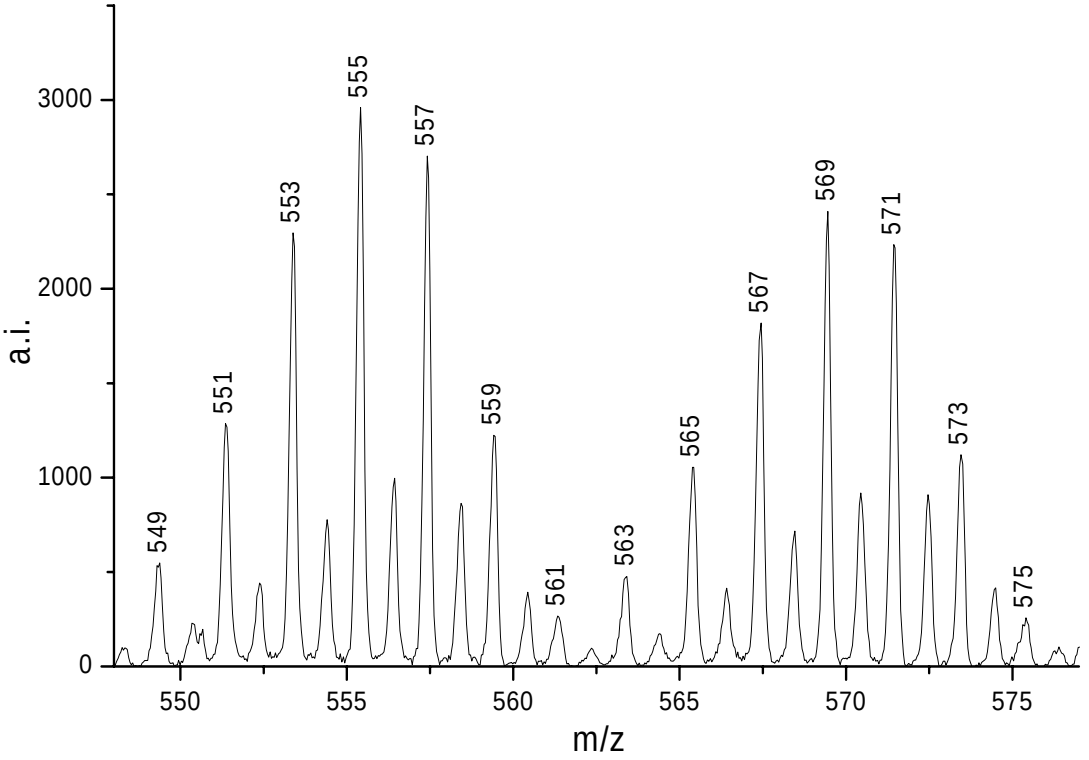



**Abb. 31. Ausschnitt aus Paraffinöl B aus Abb. 30**

Dies lässt sich anhand der Ausschnittsvergrößerung in Abb. 31 verdeutlichen: Der Peak bei m/z 557 lässt sich mit dem Addukt aus einem $C_{32}$-Alkan und dem $^{107}$Ag-Isotop erklären. Bei m/z 559 ist das entsprechende Addukt des gleichen Alkans mit dem $^{109}$Ag-Isotop zu sehen. Monocycloalkane der gleichen Kettenlänge ergeben ein $^{107}$Ag-Addukt bei m/z 555 bzw. bei m/z 557 für das $^{109}$Ag-Addukt. Bi-, Tri-, Tetra- und Pentacycloalkane zeigen wiederum um jeweils zwei Masseneinheiten kleinere Massen. Hier wird eine Problematik bei der Auswertung deutlich: Ein $^{107}$Ag-Addukt einer Molekülspezies wird durch das $^{109}$Ag-Addukt eines um 2 Masseneinheiten leichteren Moleküls überlagert. Dies wird auch dadurch belegt, dass der Peak bei m/z 559 deutlich kleiner ist als der bei m/z 557, obwohl das natürliche Isotopenverhältnis des $^{107}$Ag und $^{109}$Ag fast eins zu eins beträgt. Die Peakfläche bei m/z 557 resultiert somit zu einem Teil aus dem $^{107}$Ag-Addukt des Alkans, der etwa der Peakfläche des Peaks bei m/z 550 entspricht. Der Rest der Fläche ist auf das $^{109}$Ag-Addukt des Monocycloalkans zurückzuführen. Weitere Überlagerungen gibt es dann noch mit Alkanen und Cycloalkanen, die ein $^{13}$C-Isotop enthalten und im Spektrum an den ungeraden m/z zu erkennen sind (s. Abb. 31). Sie können aber auch zu geringen Anteilen Peaks mit geraden m/z überlagern, wenn zwei oder sogar vier $^{13}$C-Isotope in einem Ion enthalten sind.

Die Überlagerungen machen deutlich, dass eine quantitative Auswertung dieser Peakverhältnisse schwierig ist. Erschwerend kommt hinzu, dass über die Responsefaktoren der Alkane und Cycloalkane nichts bekannt ist und geeignete Kalibriersubstanzen in Reinform nicht zur Verfügung standen.

Bei der Analyse von verschiedenen Paraffinölen der Klassen A-D fielen aber deutliche Unterschiede auf. Zum einen konnten verschiedene Molmassen bzw. Molmassenbereiche detektiert werden. Zum anderen waren verschiedene Verhältnisse der Alkan- und Cycloalkanpeaks unterscheidbar (siehe Abb. 32). Öl A hat dabei tendenziell den höchsten Anteil an Alkanen, die keinen oder nur einen Ring enthalten, während die Öle B, C und D stärkere Signale bei Alkanen mit zwei oder mehr Ringen zeigen.

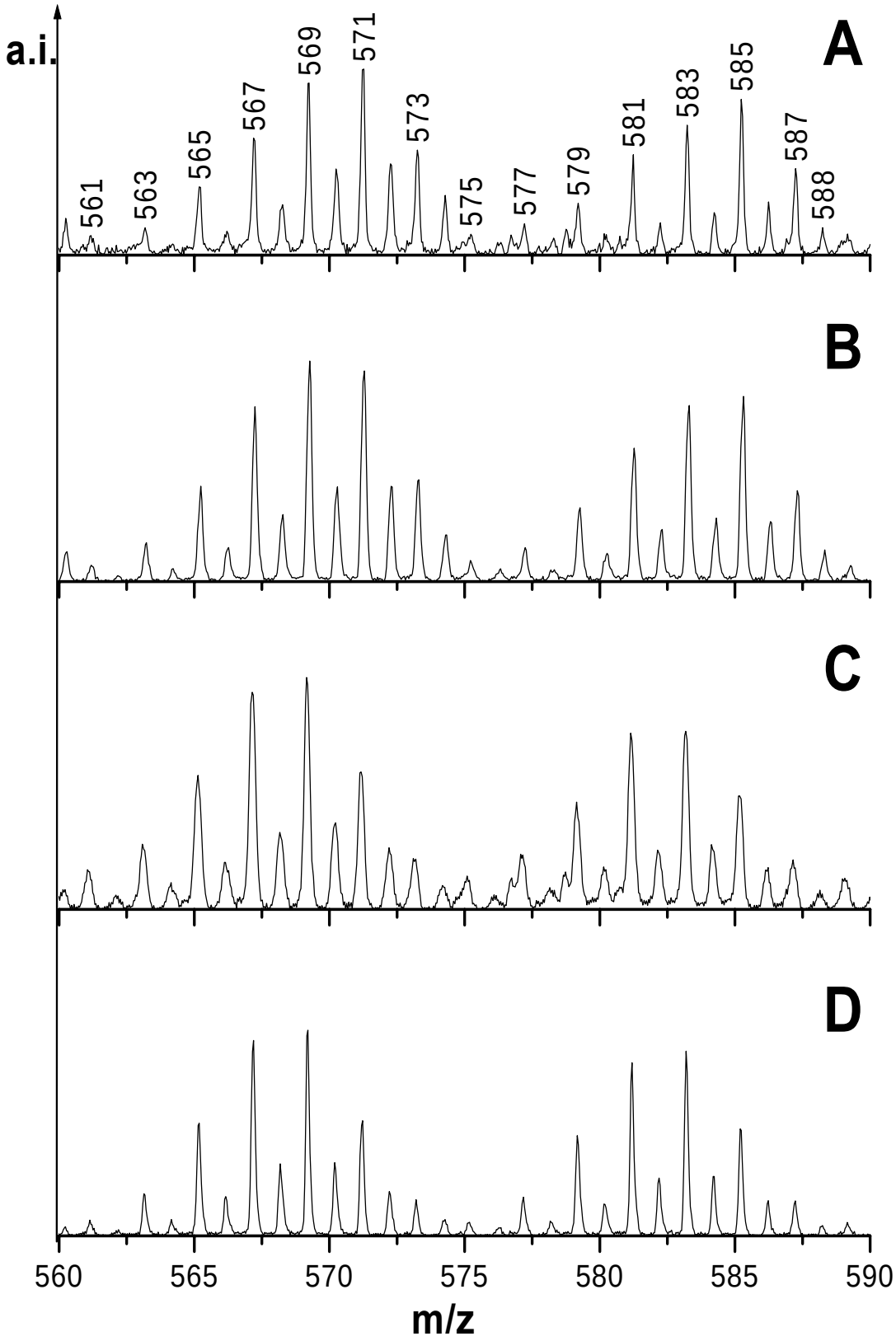



**Abb. 32. Ausschnitte aus LDI-TOF Massenspektren von vier Ölen der Klassen A, B, C und D; Silberaddukte. Das Verhältnis der verschiedenen Alkan- und Cycloalkanpeaks ist unterscheidbar.**

Es ist anzunehmen, dass die Cycloalkane insgesamt überproportional stark abgebildet werden, da diese wahrscheinlich die Adduktbildung mit dem Silber begünstigen. Um trotz der für LDI-TOF MS typischen schlechteren Reproduzierbarkeit der absoluten Peakflächen und der fehlenden Kalibriermöglichkeit eine aussagekräftigere Auswertung zu bekommen, wurden die Massenspektren chemometrisch ausgewertet (siehe Kap. 4.1.5). Aber auch ohne Chemometrie lassen sich qualitativ einige Merkmale der Öle feststellen und unterscheiden.

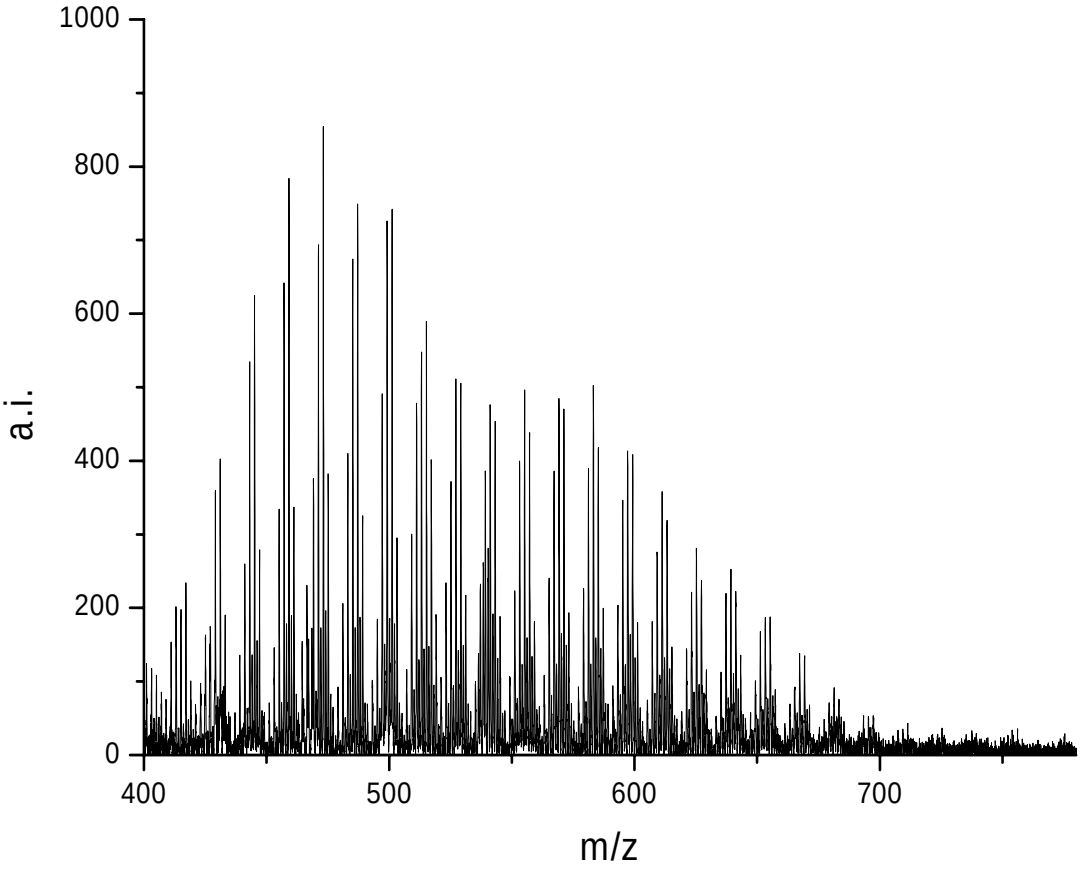



**Abb. 33. LDI-TOF Massenspektrum von einem Paraffinöl der Klasse B, Charge eines anderen Herstellers als in Abb. 30 (Öl 2), Silberaddukte**

Vergleicht man z. B. die LDI-TOF Massenspektren von Paraffinölen derselben Klasse miteinander, lassen sich manche Unterschiede in den Eigenschaften der Öle erklären (s. Abb. 30 und Abb. 33). Obwohl beide Hersteller das gleiche „Produkt“ liefern, gibt es deutliche Abweichungen. Zur Herstellung eines solchen Öls wird oftmals ein „Kernschnitt“ – also eine Destilla-

tionsfraktion – mit anderen verschnitten, um bestimmte Eigenschaften (geeignete Viskosität etc.) zu erreichen. Dies kann dazu führen, dass eine recht homogene Verteilung auftritt, wie in Abb. 30 zu sehen ist. Möglich ist aber auch das Auftreten weiterer Maxima oder einer Schulter wie in Abb. 33. Hinzu kommt, dass auch die Verteilung der Alkan- und Cycloalkanpeaks deutlich von der Charge in Abb. 30 abweicht. Für den Einsatz in komplexen kosmetischen Formulierungen können sich solche Abweichungen sehr deutlich negativ auswirken. Daher ist es von besonderem Interesse, vor dem Einsatz in einem Produkt testen zu können, ob eine Charge trotz eingehaltener Spezifikationen (Brechungsindex, Viskosität etc.) die gewünschte Zusammensetzung aufweist.

**Vaseline**

Vaseline ist als Mischprodukt aus mikrokristallinem Wachs und Paraffinöl per se komplex zusammengesetzt. Neben der Auswahl der Wachs- und Ölkomponente ist auch das Mengenverhältnis beider Substanzen für die Eigenschaften einer Vaseline entscheidend.

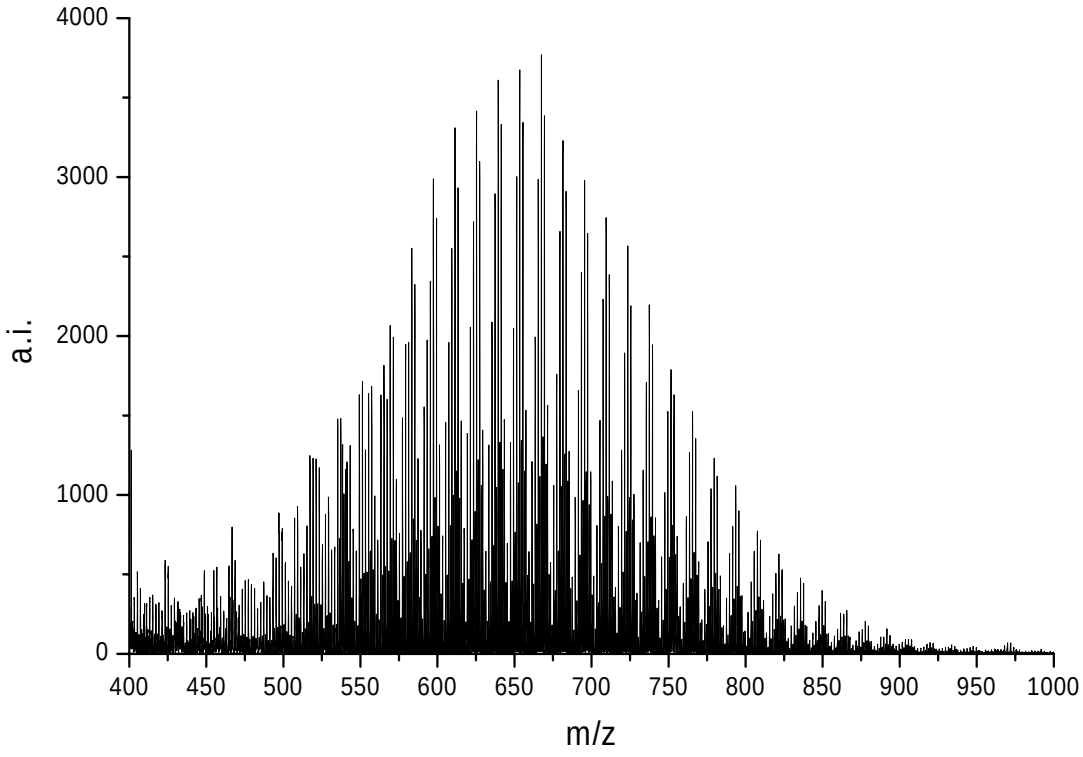



**Abb. 34. LDI-TOF Massenspektrum von Petrolatum, Vaseline 2, Silberaddukte.**

Die verschiedenen Vaselinequalitäten lassen sich über die LDI-TOF Massenspektren auch teilweise differenzieren. Bei der Vaseline 1 (s. Abb. 17) sind im vorderen Massenbereich zwischen m/z 400 und 500 intensive Signale von Alkanen bzw. Isoalkanen vorhanden. Im oberen Massenbereich zeigt sich dann eher das Bild eines typischen Paraffinöls. Bei dieser Vaseline ist vermutlich eine größere Menge an niedermolekularem mikrokristallinem Wachs mit einem höhermolekularen Paraffinöl vermischt worden.

Im Gegensatz dazu zeigt die Vaseline 2 (s. Abb. 34) nur ein Maximum – die Wachskomponente ist nicht von der Ölkomponente zu differenzieren. Vielmehr spiegelt sich das Wachs in dem Alkan/Cycloalkanmuster wieder. Um die feineren Unterschiede zwischen einzelnen Mustern besser herauszuarbeiten, wurde auch für die Vaseline eine Auswertung über chemometrische Methoden durchgeführt (s. Kap. 4.1.5).

### 4.1.4 Vergleich und Ergänzung der MALDI-TOF MS Methode mit GC, GPC, FD-MS, NMR und anderen Methoden

**Gaschromatographie von Paraffinen**

Die Gaschromatographie wurde zur Analyse der Paraffine und Wachse herangezogen, um ergänzende Informationen zu erlangen und die Stärken und Schwächen dieser Methode mit denen der LDI-TOF MS zu vergleichen. Mikrokristallines Wachs, Paraffinöl und Vaseline wurden analysiert, ebenso die äquimolare Alkan-Standardlösung aus Kap. 7.2.1, um die Retentionszeiten den entsprechenden Kettenlängen zuordnen zu können. Die Geräteparameter sind in Kap. 7.3 aufgeführt.

Anhand des Alkanstandards zeigt sich, dass LDI-TOF MS und Gaschromatographie vergleichbare Informationen liefern (siehe Abb. 35). Die einzelnen Alkane können mit beiden Methoden getrennt und nachgewiesen werden, die Gaschromatographie ermöglicht zusätzlich eine quantitative Auswertung der Peaks.

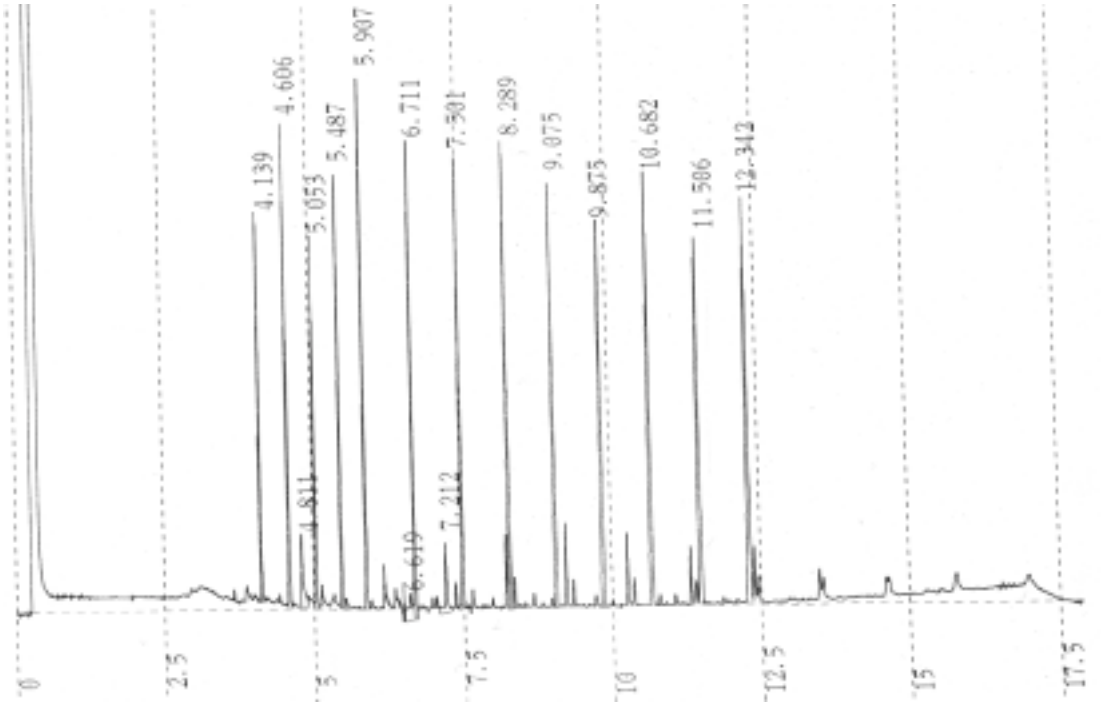



**Abb. 35. Gaschromatogramm des Alkan-Mischstandards mit Kettenlängen von $C_{20}$ bis $C_{40}$. (CPSIL 5CB, 15 m Länge, ID=0.2 mm, Filmdicke=0.12 µm, Trägergas $H_2$, 1 mL/min, Temperaturprogramm 100 °C (0 min.)-20 °C/min.-380 °C (3 min.)).**

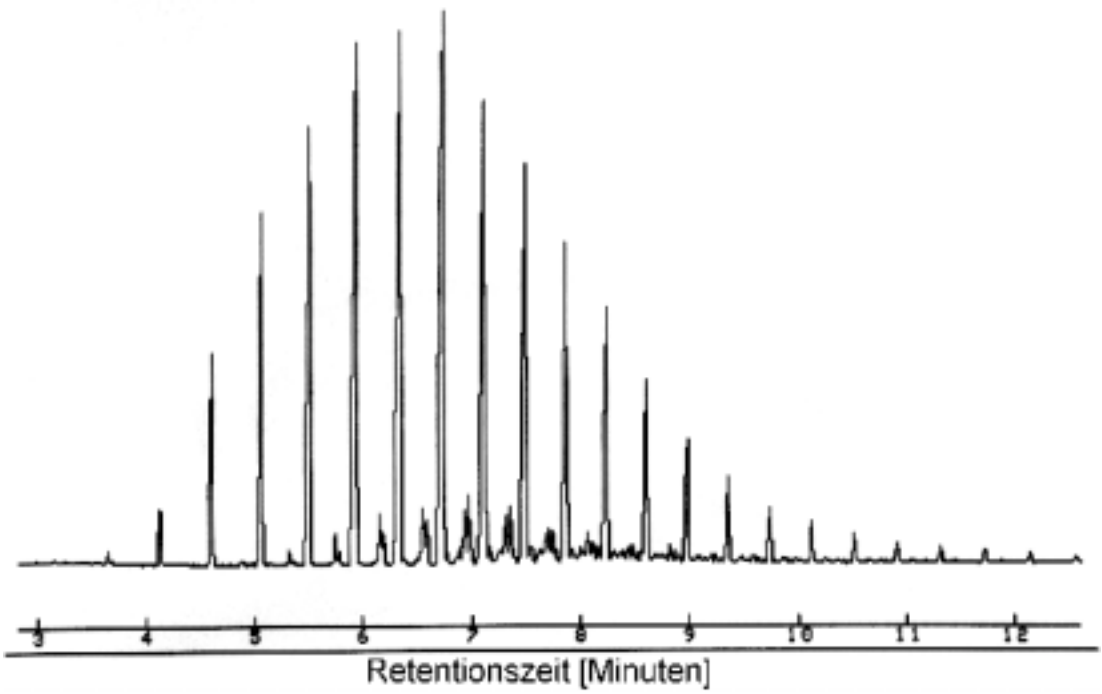



**Abb. 36. Gaschromatogramm des mikrokristallinen Wachses 1. Dieses Wachs erstreckt sich über einen Kettenlängenbereich von ca. $C_{19}$-$C_{40}$. GC-Bedingungen wie in Abb. 35.**

In Abb. 36 ist das Gaschromatogramm des mikrokristallinen Wachses 1 abgebildet. Die einzelnen Alkane sind vollständig voneinander getrennt. Über die Peakflächen kann die Zusammensetzung des Wachses ermittelt werden.

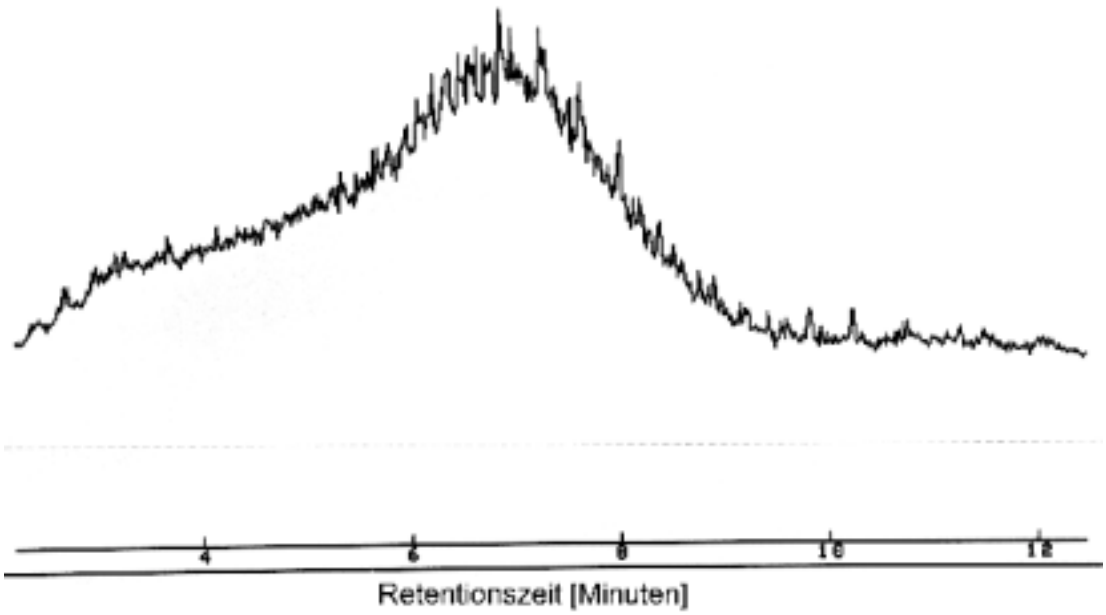



**Abb. 37. Gaschromatogramm von Paraffinöl. GC-Bedingungen wie in Abb. 35.**

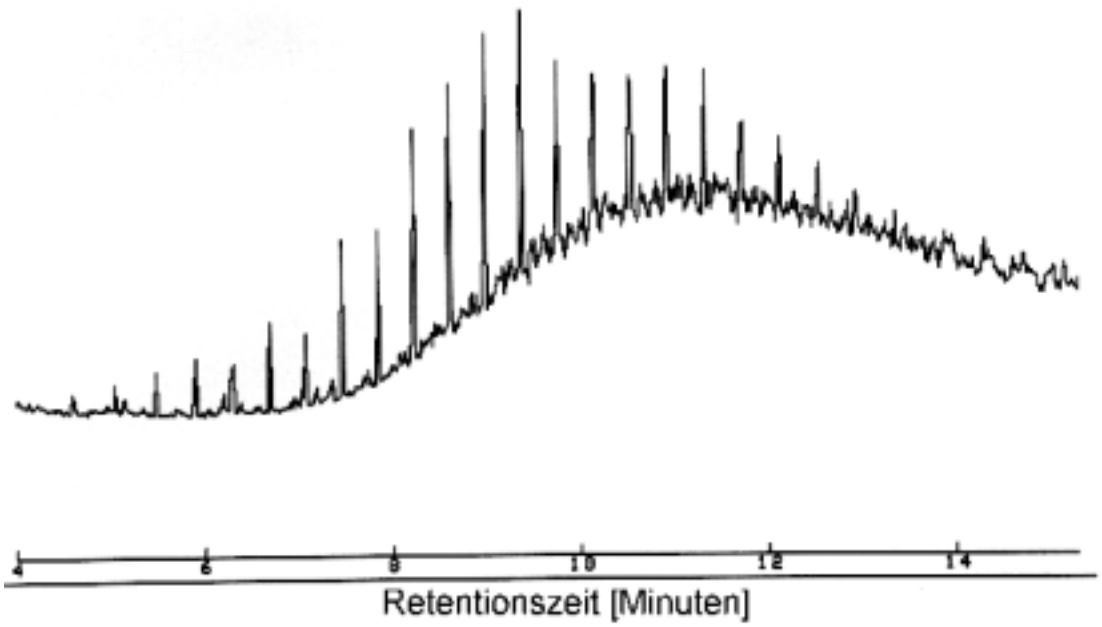



**Abb. 38. Gaschromatogramm von Vaseline. GC-Bedingungen wie in Abb. 35.**

Bei der Analyse des Alkan-Mischstandards wurde aber deutlich, dass unter den gewählten Bedingungen (Säule, Temperaturprogramm bis 380 °C etc.) Alkane der Kettenlängen $C_{54}$ oder größer nicht mehr von der Säule eluieren. Mit Hilfe der LDI-TOF MS konnten selbst Hexacontan ($C_{60}$-Alkan) sowie höhere Alkane und Naphthene in der Vaseline nachgewiesen werden.

Bei der Analyse von Paraffinölen und Vaselineproben konnten mit der Gaschromatographie keine guten Ergebnisse mehr erzielt werden. In Abb. 37 und Abb. 38 sind die Gaschromatogramme von Paraffinöl und Vaseline abgebildet. Die Komplexität des Paraffinöls aus Alkanen, Alkenen mit unterschiedlicher Ringzahl und einer Vielzahl von Isomeren zu jeder Summenformel führen dazu, dass eine Trennung der Paraffinöle in die Einzelbestandteile nicht mehr möglich ist. Dies wird auch von *Heath et al.* bestätigt, die Paraffinöle ebenfalls nur als Hüllkurve gaschromatographisch abbilden konnten [80]. *Wang und Fingas* stellten weiterhin fest, dass sich mittels Gaschromatographie weniger als 5% aller gesättigten Verbindungen des Erdöls aufklären lassen [82]. Bei dem Gaschromatogramm der Vaselineprobe ist ebenfalls eine Hüllkurve der Ölkomponente zu sehen. Zusätzlich zeichnen sich Peaks der Alkane aus der Wachskomponente ab. Dies zeigt, dass insgesamt die Gaschromatographie recht ungeeignet zur Analyse der Paraffinöle und Vaseline ist. Selbst mittels GC/MS ist eine Bestimmung der Komponenten schwierig, da eine Identifizierung über das Massenspektrum eine Trennung der Peaks voraussetzt. Auch eine Abschätzung der Molmassen über die Gaschromatographie stellt sich als schwierig dar, da die Cycloalkane in einem Paraffinöl zu einer Verschiebung der Retentionszeiten der Hüllkurve führen können.

Die LDI-TOF Massenspektrometrie ist in der Lage, die bestimmten Eigenschaften eines Paraffinöls oder einer Vaselineprobe näher zu beleuchten. So können einzelne Spezies des Paraffinöls im Massenspektrum aufgelöst werden, um die Eigenschaften des Öls zu beschreiben. Die Charakterisierung der Paraffinproben mittels LDI-TOF MS und Auswertung über Hauptkomponentenanalyse ermöglicht dabei eine feine Differenzierung verschiedener Öl- und Vaselinequalitäten und ist näher in Kap. 4.1.5 beschrieben.

**Gelpermeationschromatographie von Paraffinen**

Der Vergleich der LDI-TOF MS mit der Gelpermeationschromatographie (GPC) wurde durchgeführt, um eine Aussage über die Richtigkeit der mittels beider Methoden bestimmten Molmassen und Verteilungen zu machen. Es wurden je eine Charge *Cera microcristallina*, *Petrolatum* und *Paraffinum liquidum* (Öl B) sowohl mittels LDI-TOF MS als auch mit GPC untersucht. Zur Kalibrierung der GPC wurden zum einen Polystyrol- sowie Alkan-Standards verwendet. Die mittleren Molmassen $M_n$ und $M_w$ sowie die Verteilungsbreite $PD$ wurden nach den Gleichungen Gl. 10 bis Gl. 12 (siehe S. 16) berechnet:

**Tab. 4. Vergleich der Molmassenbestimmung von Paraffinen mittels LDI-TOF MS mit lösemittelfreier Präparation (n=5) und GPC**

| | LDI-TOF MS | | | GPC | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Substanz** | $M_n$ | $M_w$ | $PD$ | $M_n$ | $M_w$ | $PD$ |
| *Cera Microcristallina* | 395±5 | 400±6 | 1.014±0.002 | 379 | 393 | 1.037 |
| *Paraffinum liquidum* | 432±2 | 447±2 | 1.034±0.001 | 259 | 291 | 1.125 |
| *Petrolatum* | 532±4 | 551±4 | 1.034±0.001 | 472 | 508 | 1.077 |

In Tab. 4 ist eine Gegenüberstellung der ermittelten Molmassen und Verteilungsbreiten für jeweils eine Charge *Cera microcristallina, Paraffinum liquidum* und *Petrolatum* dargestellt. Die entsprechenden Gelpermeationschromatogramme sind in Abb. 39 gezeigt. Das mikrokristalline Wachs zeigt dabei eine recht gute Übereinstimmung mit der LDI-TOF Massenspektrometrie. Die Molmassen weichen wenig voneinander ab und die Probe zeigt bei beiden Methoden eine relativ kleine Verteilungsbreite. Bei *Paraffinum liquidum* und *Petrolatum* sieht verhält sich dies dagegen anders. Diese zeigen bei der GPC stärker abweichende Molmassen. Eine Hauptursache hierfür kann sein, dass unter den LDI-TOF Messbedingungen im Hochvakuum ein Teil der kurzkettigeren Moleküle entfernt wird. Dies wird auch durch *Kühn et al*. [83] sowie *Dutta und Harayama* [81] bestätigt. Ja nach Güte des Vakuums und der Dauer, die die Probe vor der Messung im Vakuum verbracht hat, sind Alkane und Cycloalkane bis zu Kettenlängen von $C_{24}$ betroffen.

Über die durchgeführte FI- und FD-Massenspektrometrie konnte eine Anwesenheit von Alkanen und Cycloalkanen mit Kettenlängen von $C_{14}$-$C_{24}$ in dem Paraffinöl bestätigt werden (s. Kap. 4.1.4 ab S. 74). Somit ist die Entfernung der kurzkettigen Alkane und Cycloalkane durch das Vakuum bei dieser Probe wahrscheinlich der Hauptgrund für die stark abweichenden Molmassen-Verteilungen. Ein anderer Faktor, der die GPC-Ergebnisse verfälschen kann, ist die Ungleichheit von Kalibriersubstanz und tatsächlich gemessener Probe. Zur Kalibrierung der GPC wurden ausschließlich n-Alkane mit unterschiedlichen Kettenlängen verwendet. Diese haben chemisch auch eine hohe Übereinstimmung mit dem mikrokristallinen Wachs, welches fast ausschließlich aus n-Alkanen besteht (Information des Herstellers).

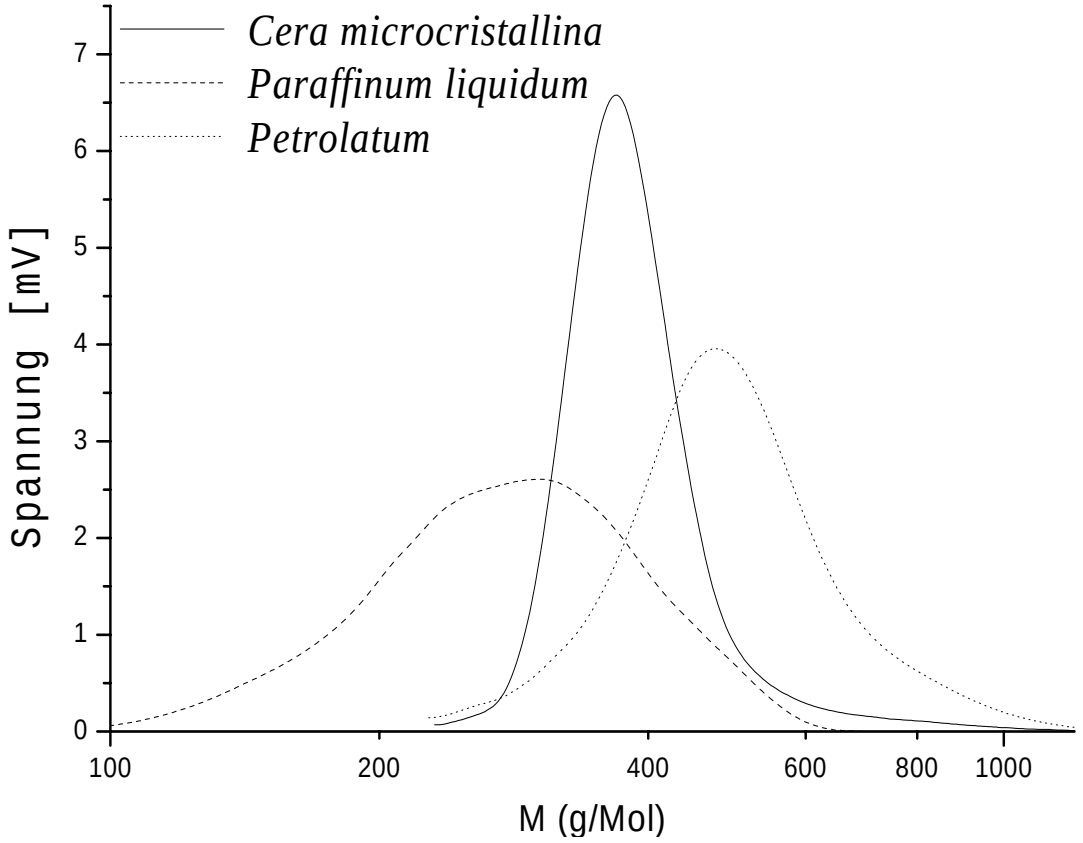



**Abb. 39. Gelpermeationschromatographie der drei Proben *Cera microcristallina*, *Paraffinum liquidum* und *Petrolatum*.**

Das Paraffinöl und auch die Vaseline als Mischprodukt bestehen jedoch auch aus einer großen Menge an Cycloalkanen. Diese sind, bedingt durch die Anzahl der Ringe im Molekül, nicht lang gestreckt, sondern wesentlich

kompakter in der Struktur und werden bei der GPC länger retardiert als n-Alkane der gleichen Molmasse. Folglich wird bei der GPC eine zu kleine Molmasse für die Cycloalkane ermittelt. Weiterhin kann durch die unterschiedlich starke Retention der Alkane und Cycloalkane gleicher Masse eine Peakverbreiterung auftreten. Hinzu kommt, dass nicht nur Cycloalkane das GPC-Ergebnis verfälschen können, sondern auch die Isoalkane, die insbesondere in Paraffinölen und Vaseline reichhaltig enthalten sind und – bedingt durch ihre Struktur – unterschiedlich stark retardiert werden können.

Es ist bekannt, dass bei der MALDI-TOF Massenspektrometrie Diskriminierungen auftreten können, insbesondere dann, wenn besonders breite Polymerverteilungen untersucht werden [133-136]. Daher wurde in der Literatur oft versucht, eine offline-Kopplung der GPC mit MALDI-TOF MS durchzuführen [137-142]. Es wird an dieser Stelle angenommen, dass dieser Effekt bei der LDI-TOF der Paraffine und Wachse ebenfalls auftreten kann. Petrolatum zeigt bei der GPC eine deutlich größere Verteilungsbreite als bei der LDI-TOF, obwohl hier im unteren Massenbereich (Kettenlänge < $C_{24}$) nur geringe Signalanteile vorhanden sind (gemäß GPC und FI-MS) und somit im Vakuum vermutlich nur wenig Substanz entfernt wurde.

Im LDI-TOF Spektrum der Probe (siehe Abb. 17) erstrecken sich die Alkane und Naphthene bis über m/z 960 bzw. abzüglich der Molmasse des Silbers über ca. 850 g/mol – in der GPC zeigt die gleiche Probe noch Signal bei über 1000 g/mol. Dies deutet darauf hin, dass auch die höheren molekularen Massen bei der LDI-TOF MS unterdrückt werden.

Insgesamt ist es fraglich, inwieweit die „richtige“ Molmasse der Paraffine bestimmt werden kann. Durch unterschiedliche Effekte (Diskriminierung, Vakuum) wird die Molmasse bei der LDI-TOF MS verfälscht, während bei der GPC eine genaue Kalibrierung schwierig ist, da die einzelnen Bestandteile der Paraffine wahrscheinlich unterschiedlich stark retardiert werden. Eine Kalibrierung kann der Komplexität der Proben nicht gerecht werden. Daher erscheint es sinnvoll, insbesondere die mittels LDI-TOF MS ermittelten mittleren Molmassen nicht als Absolutwerte, sondern als Relativwerte im Vergleich mehrerer Proben zu betrachten.

In Tab. 5 sind die wichtigsten Eigenschaften der GPC und der LDI-TOF MS als Vor- und Nachteile zusammengefasst.

**Tab. 5. Vergleich der wichtigsten Vor- und Nachteile der LDI-TOF MS und der GPC zur Analyse von Paraffinen und Wachsen**

| | LDI-TOF MS | | GPC |
|---|---|---|---|
| + | schnelle Durchführung | + | gute Reproduzierbarkeit |
| + | einfache Kalibrierung | + | quantitative Auswertung möglich |
| + | mehr Strukturinformationen durch Auflösung der Molmassen | - | keine Strukturinformationen |
| + | Kalibriersubstanz u. Analyt müssen chemisch nicht gleich sein | - | aufwändige Kalibrierung |
| - | Diskriminierungen möglich | - | Diskriminierungen möglich durch |
| - | nicht quantitativ | | komplexe Stoffgemische |

### FD/MS und FI/MS von Paraffinen

Die Feldionisations- und Felddesorptions-Massenspektrometrie wurden zur Analyse der Paraffinöle und Vaseline eingesetzt, um eine Korrelation mit den Ergebnissen der LDI-TOF Massenspektrometrie zu ermöglichen. Die Geräteparameter sind in Kap. 7.5 aufgeführt. Bedingt durch die Ionisierungstechnik entstehen vor allem $M^{\cdot +}$-Ionen.

In Abb. 40 sind FI- und FD-Spektren eines Paraffinöls abgebildet. Bedingt durch die Verschiedenheit der Methoden wird die Probe mit einem unterschiedlichen Massenbereich abgebildet. Dadurch, dass die Probe bei der FI/MS kontrolliert verdampft werden kann, ist besonders der untere Massenbereich dort deutlich stärker wiedergegeben. In dem FI-Massenspektrum zeigt sich, dass ein großer Teil der Probe im Bereich zwischen m/z 200 und 300 liegt. Dagegen wird dieser Bereich in der FD/MS stark diskriminiert. Im oberen Massenbereich zwischen m/z 500 und 700 wird die Probe in beiden Methoden ähnlich abgebildet.

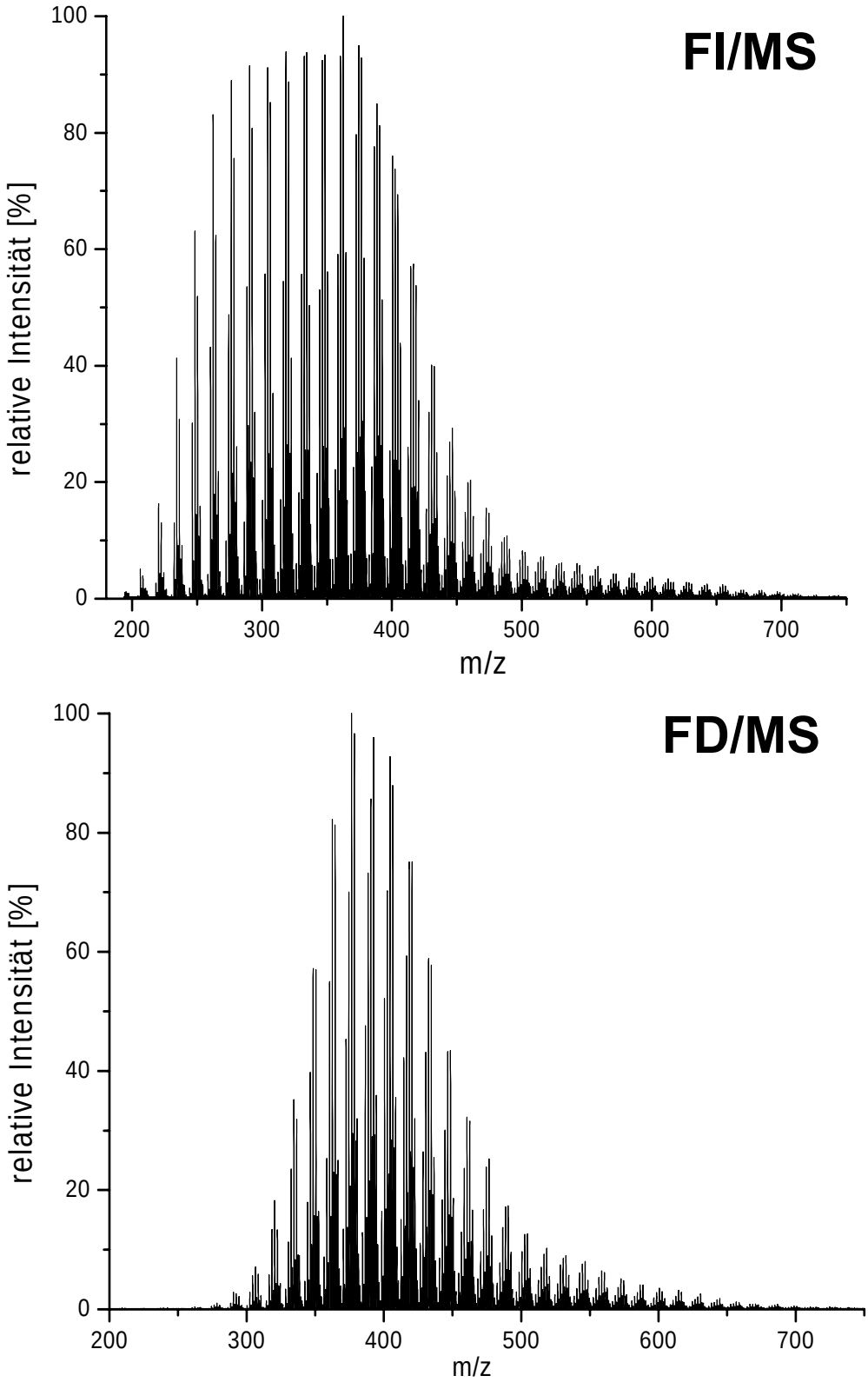



**Abb. 40. FI/MS Spektrum (oben) und FD/MS Spektrum (unten) von der gleichen Charge *Paraffinum liquidum*.**

Beide Methoden haben gemeinsam, dass sie sich durch ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis auszeichnen und nur ein geringes Untergrundsignal abbilden. Das LDI-TOF Spektrum der gleichen Probe zeigt (siehe Abb. 41) im unteren Massenbereich eine ähnliche Diskriminierung wie die FD/MS. Die kleinste, noch deutlich wahrnehmbare Alkan/Cycloalkan-Gruppierung ist bei m/z 409-417 zu erkennen – das entspricht einer Kettenlänge von 22 C-Atomen (entsprechend m/z 302-310 bei der FD/MS). Im oberen Massenbereich wird die Probe im LDI-TOF Spektrum ähnlich abgebildet, wie bei der FD- und FI/MS.

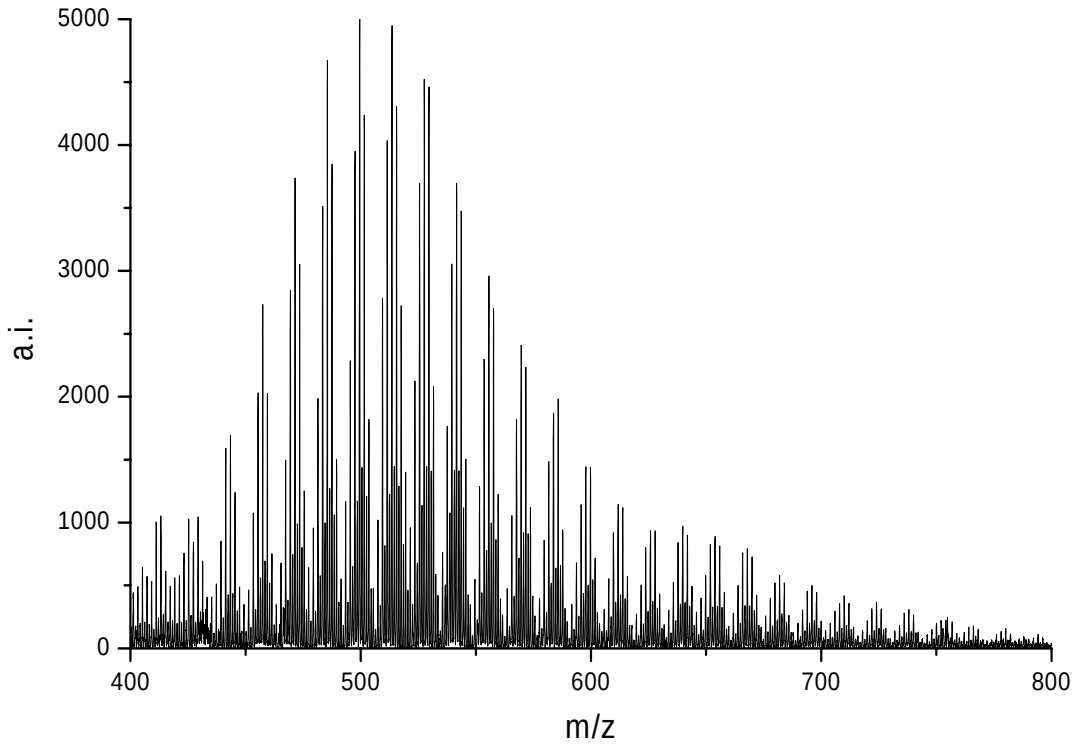



**Abb. 41. LDI-TOF Massenspektrum der gleichen Paraffinöl-Charge wie in Abb. 40. Die Peaks sind Silberaddukte ($[M+Ag]^+$)**

Diese Vergleiche machen deutlich, dass sowohl die LDI-TOF MS als auch die FD/MS insbesondere den unteren Massenbereich stark diskriminieren. Dies lässt sich vor allem mit der Flüchtigkeit der Alkane und Cycloalkane mit kürzeren Kettenlängen im Hochvakuum erklären. Die FI/MS ist hiervon methodenbedingt nicht so stark betroffen. Daher empfiehlt es sich, zusätzlich

zur LDI-TOF MS eine andere Methode wie GPC, Gaschromatographie – oder falls möglich – die FI/MS heranzuziehen, um die Probe im unteren Massenbereich zu charakterisieren.

Zusätzlich eignen sich die FD/MS und FI/MS dazu, die Interpretation der LDI-TOF Massenspektren zu überprüfen. Da bei der FD- und FI/MS vor allem $M^{\cdot +}$-Ionen erzeugt werden, entfällt hier die Überlagerung von $^{107}Ag$ und $^{109}Ag$ Addukten. Benachteiligend ist bei diesen Methoden das stärkere Auftreten von Dehydrierungseffekten [128, 131], welches für die LDI-TOF MS in Kap. 4.1.2 untersucht wurde.

Bei der LDI-TOF MS ist ein stärkeres Untergrundsignal als bei der FD/MS vorhanden; Silbercluster können zusätzlich die Spektrenqualität beeinflussen. Diese Nachteile können aber zum Teil dadurch wieder ausgeglichen werden, dass viele Spektren aufsummiert werden können, so dass insgesamt eine höhere Reproduzierbarkeit erreicht werden kann – reproduzierbare Präparationsbedingungen vorausgesetzt.

**Tab. 6. Übersicht der wesentlichen Vor- und Nachteile im Vergleich von MALDI-TOF MS und FD- bzw. FI/MS**

| | **LDI-TOF MS** | | **FD- und FI/MS** |
|---|---|---|---|
| **++** | einfache Durchführung | **+** | einfache Durchführung |
| **++** | schnelle Durchführung | **++** | wenig Untergrund u. Rauschen |
| **++** | bessere Reproduzierbarkeit durch Summieren vieler Spektren | **++** | fast nur $M^{\cdot +}$-Ionen – dadurch einfache Interpretation |
| **+** | gesamter Polaritätsbereich messbar | **+/-** | unpolares gut messbar, Organometallverb. zerstören FD-Emitter |
| **+** | Massenbereich theor. nicht eingeschränkt | **-** | Massenbereich bedingt durch Detektor eingeschränkt (< m/z 2000) |
| **-** | Diskriminierungen möglich | **-** | Diskriminierungen möglich |
| **-** | nicht quantitativ | **-** | nicht quantitativ |

Bedingt durch den Sektorfeld-Detektor ist der Massenbereich der FD- bzw. FI/MS eingeschränkt. Es lassen sich damit Ionen mit bis zu m/z 2000 detektieren. Eine Kopplung einer FD- oder FI-Quelle mit einem TOF Massen-

detektor ist kaum vorstellbar, da die TOF-Technik eine gepulste Quelle voraussetzt und in der FD- und FI/MS die Erzeugung der Ionen über einen langen Zeitraum erfolgt. In Tab. 6 sind die wichtigsten Merkmale von LDI-TOF MS und FD- bzw. FI-MS aufgeführt.

**NMR-Spektroskopie von Paraffinen**

Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie können Informationen über Art und Struktur der enthaltenen Stoffe gewonnen werden. Ein Vorteil ist dabei, dass die Proben im flüssigen Zustand (ggf. nach Schmelzen) in einer Konzentration von praktisch 100 % gemessen werden können, was die Empfindlichkeit erhöht. Es wurden Protonenspektren und $^{13}$C-Spektren aufgenommen.

Die Geräteparameter sind in Kap. 7.7 aufgeführt. Zum Vergleich aufgenommene LDI-TOF Spektren wurden nach der lösemittelfreien Probenpräparation angefertigt (siehe Kap. 4.1.1 ab S. 40). Weiterhin wurden zum Vergleich Naphthengehalte ($C_N$-Werte) nach DIN 51378 herangezogen. Diese rechnerische Methode beruht auf einem Zusammenhang zwischen dem Cycloalkangehalt, dem Brechungsindex, der Dichte und der Viskosität [78, 79]. Die $C_N$-Werte geben die prozentuale Menge an Kohlenstoff-Atomen an, die sich in einer Cycloalkan-Bindung befinden und wurden in die Rohstoff-Zertifikate der Hersteller übernommen. Die $^{13}$C-NMR-Spektroskopie ermöglicht es, $^{13}$C-Atome, die sich in einem aliphatischen Ring befinden, von denen, die sich in einer Alkylkette befinden, zu unterscheiden.

Durch die vielen möglichen Strukturen und Isomere gibt es aber viele unterschiedliche Zustände, die ein Kohlenstoffatom annehmen kann (vergl. auch Abb. 3 in Kap. 3.4.1). Und dies führt wiederum zu einer ganzen Bandbreite von Verschiebungen im NMR-Spektrum.

In Abb. 42 sind $^{13}$C-NMR-Spektren der vier verschiedenen Paraffinölklassen A-D zu sehen. In allen sind Peaks der typischen Verschiebungen für -$CH_3$ (z. B. bei 13.3 ppm) und –$CH_2$– (u. a. bei 22.0 und 29.1 ppm) Gruppen zu sehen.

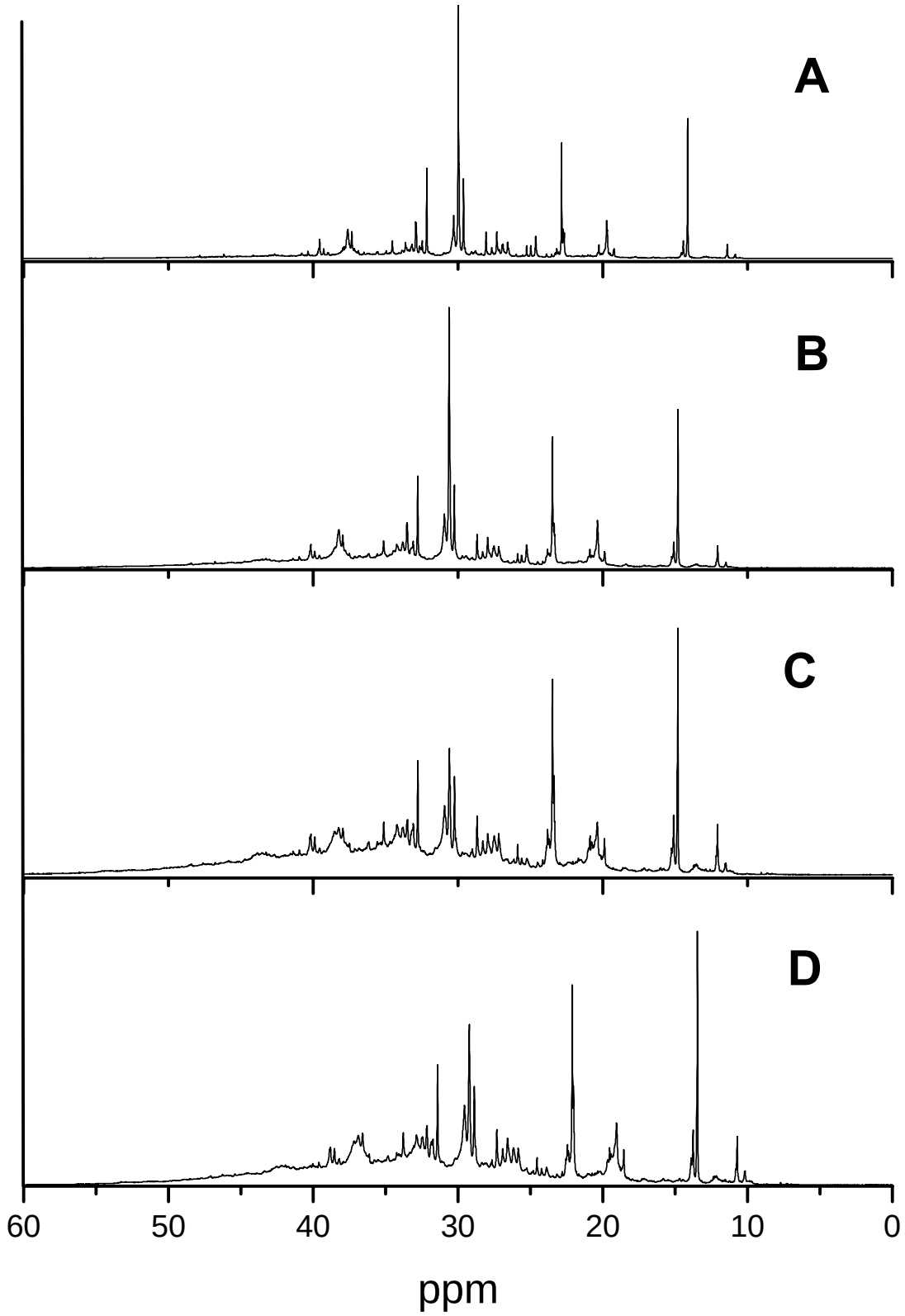



**Abb. 42. $^{13}$C-NMR Spektren der vier Paraffinöle A-D. Die diskreten Peaks stammen vor allem aus –CH3 und –CH2– Gruppen.**

Die Signale sind jeweils auf mehrere Peaks verteilt, je nachdem, ob sich z. B. eine –$CH_2$– Gruppe mitten in einer langen Alkylkette befindet oder fast endständig ist. Zusätzlich zu den diskreten Peaks ist bei allen vier Ölklassen eine Anhebung der Grundlinie feststellbar, die von Paraffinöl A zu Öl D zunimmt. Diese „Basislinienerhöhung“ spiegelt die bereits in den Proben vermutete Vielfalt an unterschiedlichen Strukturen – insbesondere der Cycloalkane – wieder.

Bei der LDI-TOF MS lassen sich je nach Anzahl der Ringe in einem Molekül Peaks mit unterschiedlichen Massen detektieren. Im Gegensatz dazu unterscheidet die NMR-Spektroskopie unterschiedliche Zustände von C-Atomen. Bei beiden Methoden ist eine quantitative Bestimmung aufgrund der Überlagerungen der Peaks schwierig, zudem auch keine repräsentativen Standards der verschiedenen Cycloalkane verfügbar sind. Um nun trotzdem eine Vergleichsmöglichkeit zwischen LDI-TOF, NMR-Spektroskopie und der Methode nach DIN 51378 zu haben, wurde aus den NMR-Spektren ein Verhältniswert für die Cycloalkane abgeschätzt. Erschwerend für eine halbquantitative Abschätzung ist die Tatsache, dass gerade die in Ringstrukturen befindlichen C-Atome aufgrund ihrer Vielfalt keine scharfen Peaks ergeben, sondern eben diese Anhebung der Grundlinie verursachen. Daher wurde für alle Proben das Integral über den gesamten ppm-Bereich der $^{13}$C-Atome in Ringstrukturen gebildet und die Integrale der sich in dem Bereich befindlichen diskreten Peaks davon abgezogen, die eindeutig nicht zu Ring-C-Atomen gehören. Dies sind vor allem Kohlenstoffatome, die sich in Alkylketten, an Methyl- und Ethylverzweigungen und ähnlichem befinden. Diese Methode ist vermutlich stark fehlerbehaftet, sollte aber einen Vergleich mit den anderen beiden Methoden ermöglichen.

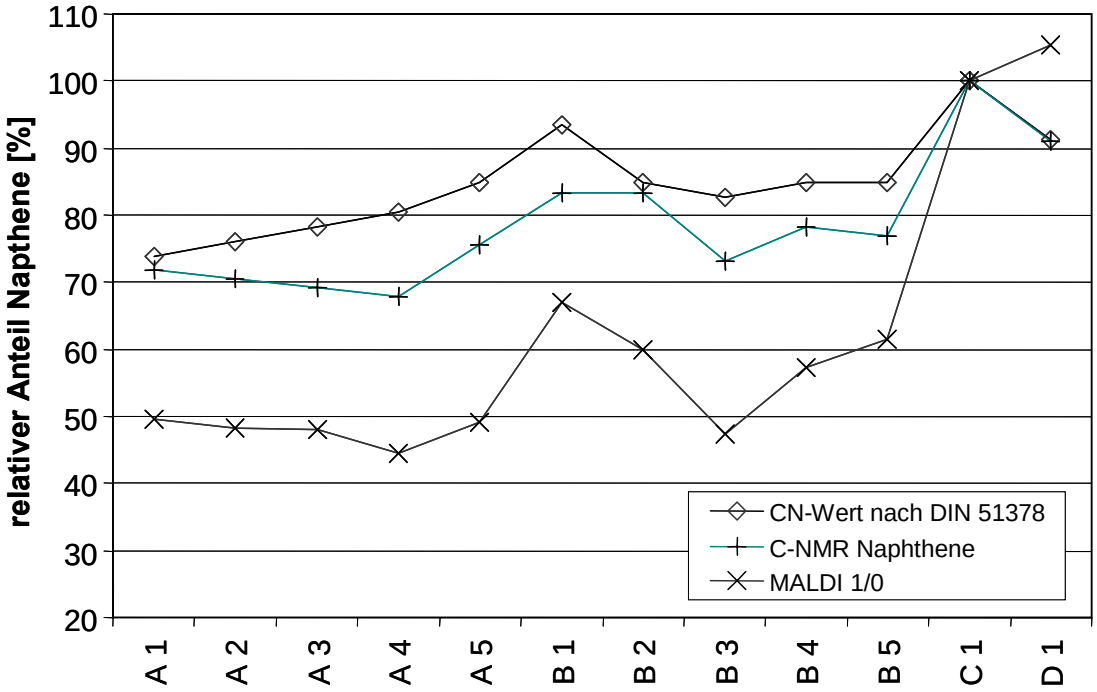



**Abb. 43. Vergleich der ermittelten bzw. abgeschätzten Anteile an Naphthenen. Innerhalb jeder Methode wurden die Werte für Öl C1 auf 100% gesetzt. Abschätzung der Naphthene über NMR siehe Text. Der MALDI 1/0 Wert entspricht dem Verhältnis aus der Fläche der Monocycloalkanpeaks zu den Alkanpeaks (jeweils $[M+^{107}Ag]^+$).**

In Abb. 43 ist der Vergleich der ermittelten relativen Anteile an Cycloalkanen in verschiedenen Ölen der Klassen A-D gegenübergestellt. Zum besseren Vergleich wurden die Werte auf 100 % normiert, die Originaldaten sind in Tab. 24 in Anhang 8.3.1 angegeben. Dem Tabellenanhang ist zunächst einmal zu entnehmen, dass absolut die Werte bei der NMR-Spektroskopie sehr viel höher ausfallen, als bei der DIN-Methode. Dies war zu erwarten, da bei der Subtraktion der nicht zu Ring-C-Atomen gehörenden Flächen von der Gesamtfläche höchstwahrscheinlich nicht alle Flächen aufgrund der Grundlinienerhöhung erfasst werden konnten. Vergleicht man aber die auf 100 % relativierten Resultate, so findet sich eine recht hohe Übereinstimmung in dem qualitativen Verlauf der Kurven. Die Methode nach DIN 51378 als Standard in der petrochemischen Industrie stellt dabei eine rechnerische Methode dar, die den Anteil an naphthenisch gebundenen C-Atomen angibt. Dies sollte insofern mit der NMR-Spektroskopie übereinstimmen, da diese ebenfalls C-Atome detektiert. Dagegen können bei der MALDI-TOF nur

ganze Molmassen bzw. m/z Werte gemessen werden. Durch diesen Unterschied der Methoden lässt sich wahrscheinlich auch die Abweichung zwischen den analysierten Ölen C und D erklären. Öl D enthält gemäß NMR und DIN-Methode weniger Naphthene als Öl C, nach LDI-TOF MS enthält es aber mehr. Durch die LDI-TOF Analysen der Öle (vergl. Kap. 4.1.3) steht aber fest, dass das Öl D eine signifikant höhere Kettenlänge besitzt als Öl C. Dadurch kann Öl D trotz geringerem $C_N$-Wert eine höhere durchschnittliche Anzahl an Ringen *pro Molekül* haben als Öl C. Und letzteres kann über die LDI-TOF Massenspektrometrie detektiert werden.

Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie kann auch der Verzweigungsgrad der Paraffin-Proben unterschieden werden. Dies ist bei der MALDI-TOF MS nicht möglich, da Isomere grundsätzlich die gleiche Molmasse besitzen. In einem $^1$H-NMR Spektrum ist es möglich, ein Verhältnis aus den Peakflächen von Protonen in $-CH_3$, $-\underset{|}{C}H_2$ und $-\underset{|}{\overset{|}{C}}H$ Gruppen zu bilden. Diese weisen jeweils unterschiedliche Verschiebungen auf. Der Anteil an Protonen in $CH_3$ Gruppen ist zum einen von der Kettenlänge der Ionen abhängig, gibt aber auch einen Hinweis auf die Menge an Methylverzweigungen in einem Öl.

In Abb. 44 sind die Flächenprozente der Protonen in Methylgruppen für verschiedene Öle aufgetragen. Es zeigt sich, dass der Anteil an Methylgruppen in Öl A am geringsten und tendenziell in den Ölen C und D am höchsten ist. Da in den Ölen C und D die mittlere Molmasse und damit auch die mittlere Kettenlänge höher ist als in den Ölen A oder B (vergl. Kap. 4.1.5), ist eigentlich zu erwarten, dass der Anteil an Protonen in Methylgruppen kleiner sein müsste als bei den Ölen A und B. Dies lässt den Schluss zu, dass die durchschnittliche *unverzweigte* Kettenlänge in den Ölen C und D aufgrund des höheren Verzweigungsgrades kleiner ist. Dies ist plausibel, da bei den Ölen C und D auch der Cycloalkangehalt höher ist. Eine größere Menge an Ringen in einem Molekül macht eine größere Menge an Verzweigungen wahrscheinlich. Vergleicht man Abb. 43 und Abb. 44 qualitativ miteinander, so zeigt sich, dass ein erhöhter Naphthengehalt (bestimmt per NMR oder DIN 51378) tendenziell einen erhöhten Verzweigungsgrad mit sich bringt. Dadurch wird obige Annahme bestätigt.

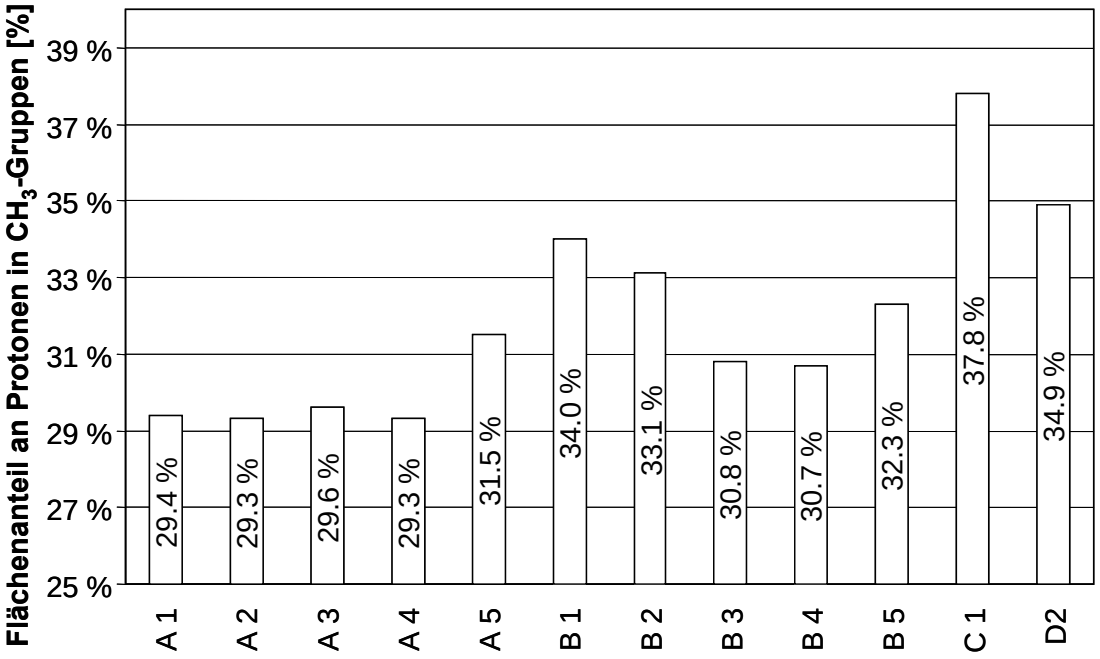



**Abb. 44. Anteil der Flächen von Protonen in $CH_3$-Gruppen berechnet aus $^1$H-NMR-Spektren der Paraffinöle.**

### Olefine

Dadurch, dass bei der LDI-TOF MS lediglich Molekülmassen unterschieden werden, kann anhand eines Peaks nicht immer eindeutig interpretiert werden, welches Ion diesen verursacht. Oftmals können auch mehrere Substanzen das gleiche Masse/Ladungsverhältnis aufweisen. Bei Kohlenwasserstoffen besteht prinzipiell die Möglichkeit, dass Olefine vorhanden sind, die gleiche molare Massen mit Cycloalkanen der gleichen C-Kettenlänge aufweisen können. Die Öle wurden laut Herstellerspezifikationen als olefinfrei ausgelobt, diese Tatsache wurde mit Hilfe der NMR-Spektroskopie überprüft.

In Abb. 45 sind die $^1$H-NMR Spektren von Paraffinöl A abgebildet. Das Öl wurde einmal mit und einmal ohne Zusatz von 0.1 mM Squalen gemessen. Nach Zusatz des Squalens zeigt sich bei einer Verschiebung von 5.1 ppm ein Peak der Protonen, die an den Kohlenstoffatomen mit den Doppelbindungen positioniert sind. In dem unveränderten Öl ist kein Peak bei dieser Verschiebung nachweisbar. Um nun eine Aussage über die Reinheit des Öls machen zu können, wurde die Nachweisgrenze abgeschätzt. Dabei muss bedacht werden, dass Squalen durch seine sechs Doppelbindungen ein sechsmal so starkes Olefin-Signal aufweist, wie eine vergleichbare

Substanz mit nur einer Doppelbindung. Die Größe des Peaks entspricht der Nachweisgrenze (ca. 3x über dem Grundrauschen). Somit lassen sich Doppelbindungen ab ca. 0.6 mM detektieren.

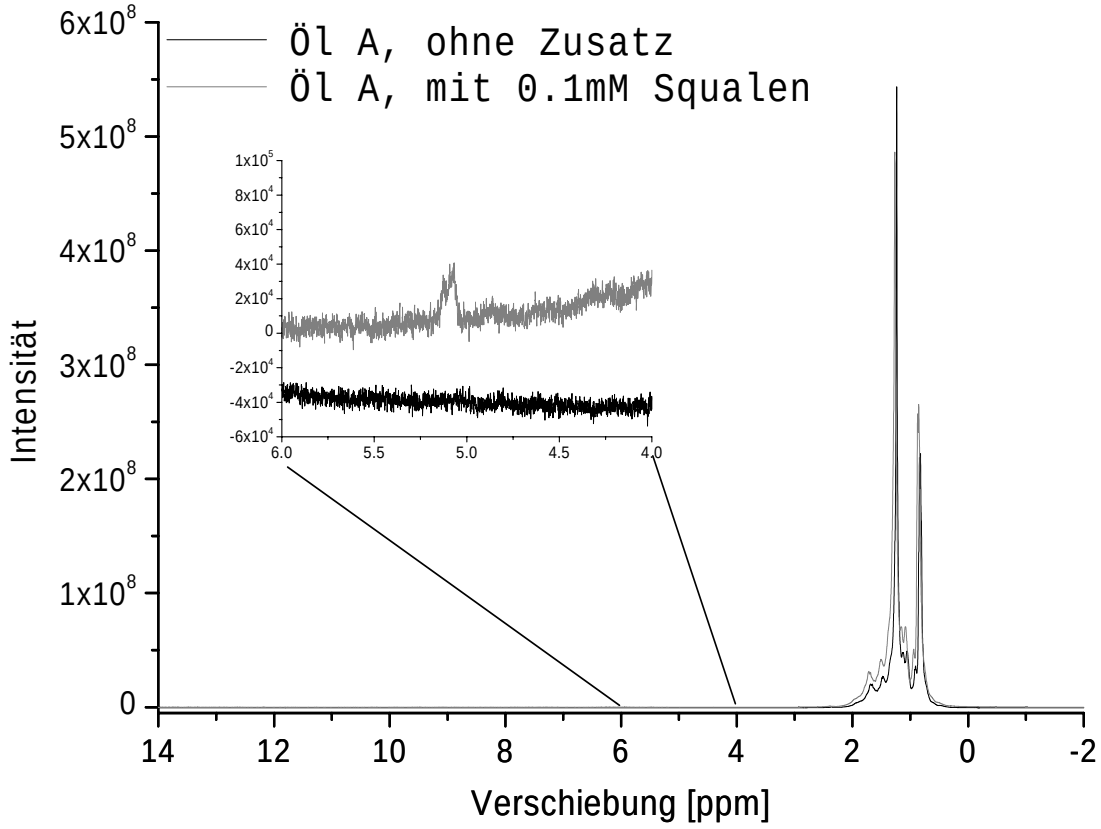



**Abb. 45. $^{1}$H-NMR Spektren von Öl A, mit und ohne Zusatz von 0.1 mM Squalen.**

Ist die Molmasse des oder der gesuchten Olefine bekannt, so kann die molare Nachweisgrenze in Gewichtsprozent ausgedrückt werden. Es kann angenommen werden, dass Olefine in Paraffinölen aufgrund des Herstellungsprozesses (Destillation) – wenn überhaupt – im Massenbereich der Paraffinöle selbst vorkommen (ca. 300-600 g/mol). Die Nachweisgrenze wurde nach Gleichung Gl. 14 berechnet (siehe Kap. 7.7.1).

Die Nachweisgrenze liegt je nach Molmasse des zu erwartenden Olefins zwischen 0.021 und 0.042% und kann im Mittel mit **0.03 %** angegeben werden. Es wurde je ein Muster der Paraffinöle A-D gemessen, in keinem der Öle war ein Olefinpeak nachweisbar.

Ebenso wie die Olefine lassen sich **Aromaten** mittels NMR-Spektroskopie nachweisen, wie am Beispiel einer Probe mikrokristallinen Wachses gezeigt wurde.

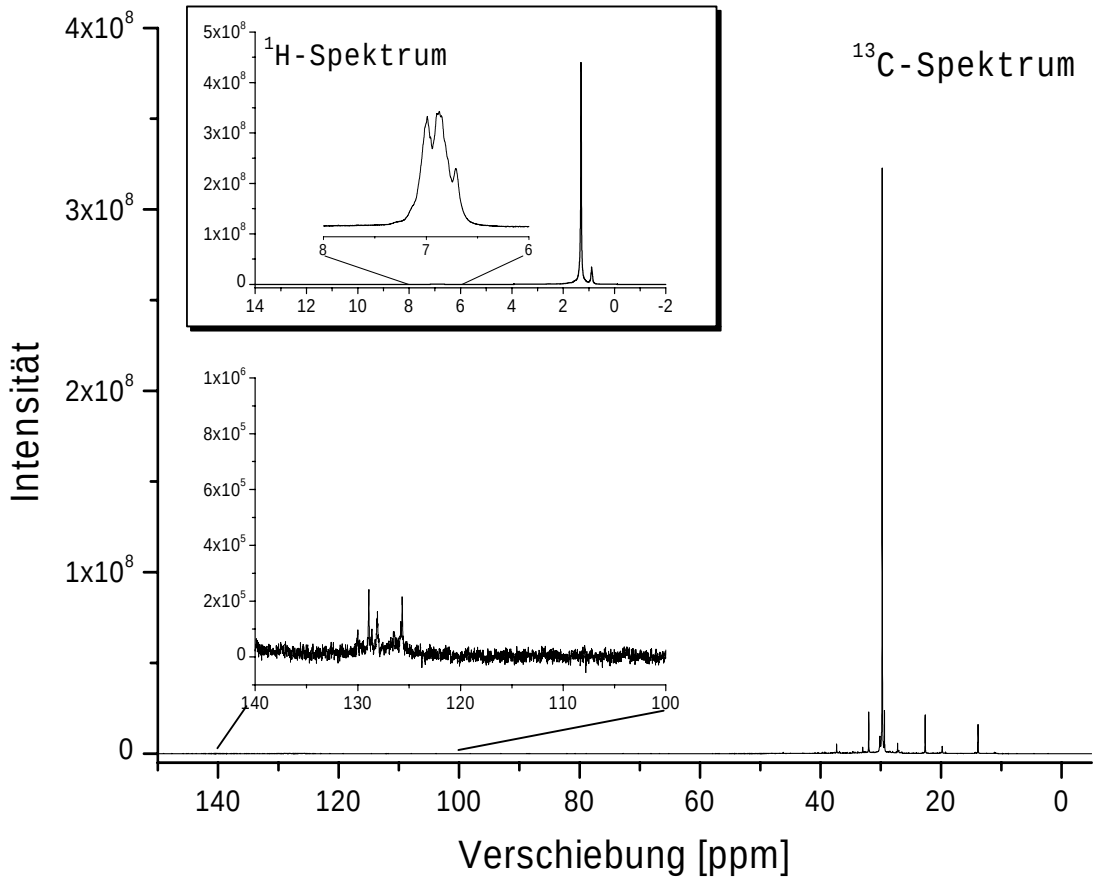



**Abb. 46. $^{1}$H- und $^{13}$C-NMR Spektren von mikrokristallinem Wachs 4.**

In Abb. 46 sind die $^{1}$H- und $^{13}$C-Spektren des mikrokristallinen Wachses 4 abgebildet. Neben den intensiven Signalen der Protonen bzw. Kohlenstoffatomen in -$CH_2$- und -$CH_3$ Gruppen sind weitere Signale mit geringer Intensität bei einer Verschiebung von ca. 7 ppm ($^{1}$H) bzw. 126-130 ppm ($^{13}$C) vorhanden. Diese deuten auf die Anwesenheit von aromatischen Strukturen hin. Mit der LDI-TOF Massenspektrometrie konnte diese Annahme bestätigt werden (siehe Abb. 47). Zusätzlich zu den Signalen der gesättigten, aliphatischen Kohlenwasserstoffe sind weitere Signale vorhanden. Diese lassen sich als aromatische Kohlenwasserstoffe mit ein bzw. zwei Ringen erklären. Die Molmasse eines mono-aromatischen Kohlenwasserstoffes ist um acht Mas-

seneinheiten kleiner als die des aliphatischen Kohlenwasserstoffes mit der gleichen C-Anzahl.

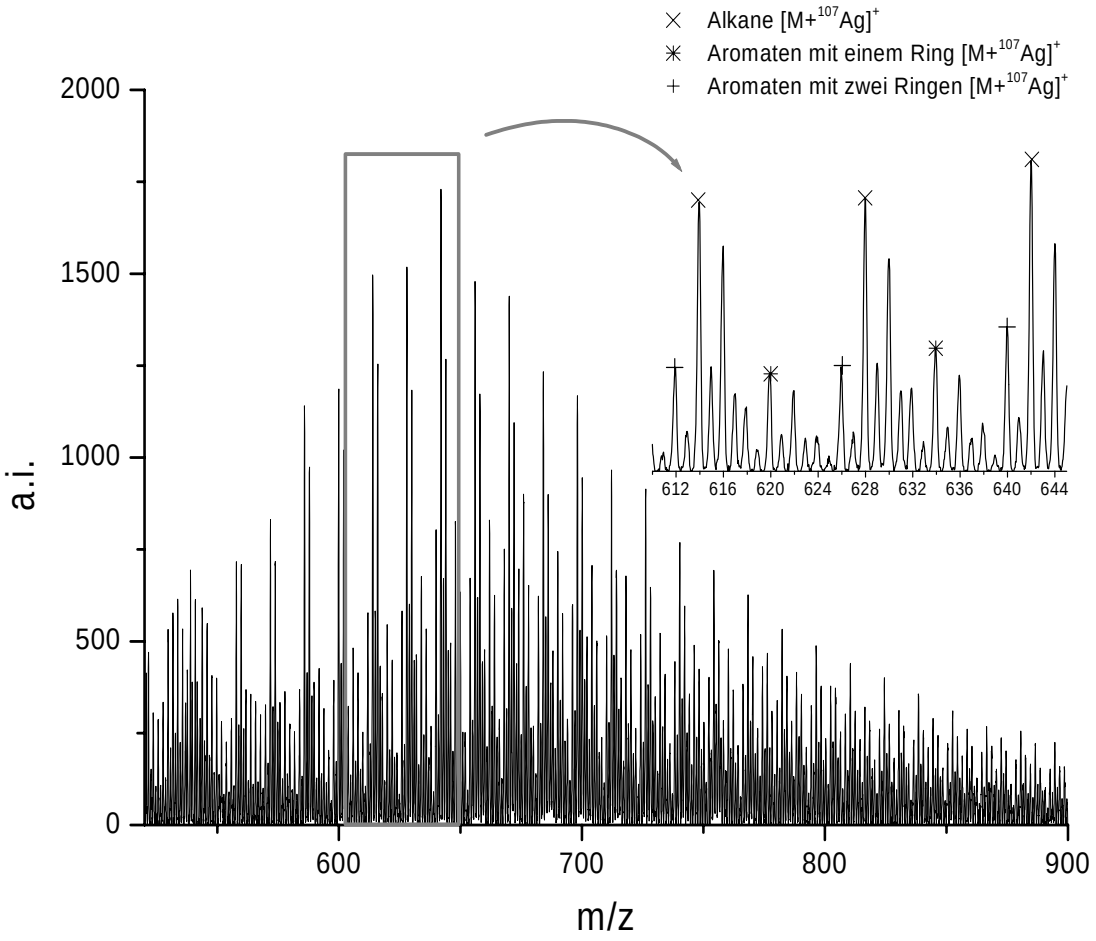



**Abb. 47. LDI-TOF Massenspektrum von Wachs 4 mit Ausschnittsvergrößerung. Im Vergleich mit aromatenfreien Wachs (z. B. aus Abb. 11) sind weitere Peaks vorhanden, die sich als aromatenhaltige Kohlenwasserstoffe interpretieren lassen. Alle Peaks sind $[M+Ag]^+$.**

In diesem Falle kann also durch die Analyse des Wachses mit LDI-TOF MS und der NMR-Spektroskopie mit relativ hoher Sicherheit die Anwesenheit von Aromaten in dem Wachs nachgewiesen werden. In Paraffinölen und Vaseline ist dies mit der LDI-TOF MS nicht mehr ohne weiteres möglich. Die enthaltenen Cycloalkane überlagern sich mit den Aromaten-Peaks. Infolgedessen lassen sich diese insbesondere bei geringen Gehalten in den Ölen oder Vaseline nicht mehr nachweisen. Dies zeigt, wie wichtig es ist, gerade bei einer relativ unspezifischen Methode wie der LDI-TOF Massenspektrometrie alternative Methoden zur Beurteilung der Proben heranzuziehen.

Neben dem beschriebenen Wachs 4 konnten mit Hilfe der NMR-Spektroskopie Aromaten noch in Spuren in den drei untersuchten Vaselinemustern nachgewiesen werden.

### 4.1.5 Charakterisierung der LDI-TOF Spektren mittels PCA

Die LDI-TOF Massenspektrometrie ermöglicht eine schnelle und vergleichende Messung von Paraffinölen, mikrokristallinen Wachsen und Vaselineproben. Die Auswertung und der Vergleich der Spektren dieser komplex zusammengesetzten Gemische gestaltet sich dagegen schwieriger. Im Folgenden wird beschrieben, wie die Auswertung mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis (PCA)*) vereinfacht wurde und der Vergleich mehrerer Paraffin-Chargen eine hohe Aussagekraft erhält.

Um verwertbare Daten für eine PCA aus den Spektren zu generieren, wurden jeweils die $[M+^{107}Ag]^+$ Peaks aller Alkane (=$\Sigma$0), Mono- (=$\Sigma$1), Bicycloalkane (=$\Sigma$2) sowie die gesamte Verteilung der Alkane, Mono-, Bi-, Tri- und Tetracycloalkane (=$\Sigma$G) integriert und die Summen der Areas notiert. Zusätzlich wurden die zahlen- und gewichtsgemittelten Molmassen ($M_n$ und $M_w$) sowie die Verteilungsbreite (PD) bestimmt (siehe Tab. 7). Diese Daten wurden auf der Basis von Vorversuchen ausgewählt. Die genaue Vorgehensweise ist in Kap. 7.2.6 beschrieben.

**Tab. 7: Erklärung der Werte, die aus den Spektren gewonnen werden. Berechnung von $M_n$, $M_w$ und PD siehe Gl. 3 bis Gl. 5 in Kap. 3.1.4**

| Nr. | Bez. | Beschreibung |
|---|---|---|
| **1** | $\Sigma$0 | Summe aller Integrale von Alkanpeaks $[M+^{107}Ag]^+$ |
| **2** | $\Sigma$1 | Summe aller Integrale von Monocycloalkanpeaks |
| **3** | $\Sigma$2 | Summe aller Integrale von Bicycloalkanpeaks |
| **4** | $\Sigma$G | Summe aller Integrale der gesamten Verteilung (s. Text) |
| **5** | $M_n$ | Zahlengemittelte Molmasse |
| **6** | $M_w$ | Gewichtsgemittelte Molmasse |
| **7** | Pd | Verteilungsbreite (=Mw/Mn) |

Diese Werte unterliegen den bei der LDI-TOF MS üblichen Schwankungen. Um eine reproduzierbare Auswertung möglich zu machen, werden nun verschiedene Verhältniszahlen gebildet, die unter den hier beschriebenen LDI-TOF Bedingungen relativ reproduzierbar sind. Die Bestimmung der Werte wurde je fünf Mal für jede Paraffinölklasse und Vaseline durchgeführt.

**Tab. 8: Erklärung der relativen Werte, die aus dem Spektrum gewonnen werden. Die Standardabweichungen (SD) geben die jeweils höchsten beobachten Werte wieder (n=5) .**

| Nr. | Bez. | SD [%] | Beschreibung |
|---|---|---|---|
| **1** | $\Sigma 0/\Sigma 1$ | < 6 | Maß für Alkane |
| **2** | $\Sigma 0/\Sigma 2$ | < 7 | Maß für Alkane |
| **3** | $\Sigma 1/\Sigma 2$ | < 4 | Maß für höhere Cycloalkane |
| **4** | $\Sigma 0/\Sigma G$ | < 6 | Maß für Alkane |
| **5** | $\Sigma 2/\Sigma G$ | < 3 | Maß für Cycloalkane |
| **6** | Mn | < 1.5 | Zahlengemittelte Molmasse (unverändert) |
| **7** | Mw | < 1.5 | Gewichtsgemittelte Molmasse (unverändert) |
| **8** | PD | < 0.3 | Verteilungsbreite (unverändert) |

Die Verhältniszahlen in Tab. 8 spiegeln verschiedene Eigenschaften der Paraffinöle und der Vaseline wieder. Diese unterliegen im Vergleich zu den absoluten Peakflächen geringen Schwankungen. Da davon ausgegangen wird, dass die relevanten Unterschiede der Rohstoffe stärker ausfallen als die Schwankungen der Parameter, reichen Einfachbestimmungen für Chargenvergleiche aus.

Die PCA soll es erleichtern, multivariate Datensätze auszuwerten. Bei mehr als zwei Dimensionen lassen sich Daten nicht mehr adäquat auf dem Papier oder dem Bildschirm darstellen. Um den maximalen Informationsgehalt in einer Dimension zu erfassen, wird die Achse im n-dimensionalen Raum gesucht, auf der die Daten die stärksten Unterschiede aufweisen. Ausgehend von dieser Achse wird die nächste Achse gesucht, die orthogonal zu der ersten steht und ebenfalls die größten Unterschiede der Daten abbildet.

Dieses Verfahren wird so lange angewendet, bis alle Achsen „aufgebraucht“ sind.

Vor der Berechnung werden die Daten vorbehandelt (s. Kap. 3.2). Jede Variable wird vor der Berechnung standardisiert, d. h. der Mittelwert wird abgezogen und durch die Standardabweichung geteilt. Die Standardisierung bewirkt, dass keiner der acht Parameter aufgrund seiner absoluten Größe überproportional in die Berechnung eingeht. Die Matrix, an der die PCA durchgeführt wurde, enthält nun acht Spalten (die Variablen entsprechend Tab. 8) und Reihen entsprechend der Anzahl der Proben.

**Paraffinöl**

Für diese Studie wurden insgesamt 131 Paraffinöle untersucht. Diese Öle sind parallel dazu mit weiteren Analysenmethoden charakterisiert worden (z. T. durch den Hersteller, z. T. durch die Qualitätssicherung der Beiersdorf AG), um festzustellen, ob das jeweilige Öl für den Einsatz seiner Zweckbestimmung entsprechend geeignet ist.

**Tab. 9: Hauptkomponenten (PC) der Paraffinöle mit den prozentualen und totalen akkumulativen Varianzen**

| PC | Varianz [%] | total [%] |
|---|---|---|
| 1 | 80.167 | 80.17 |
| 2 | 14.547 | 94.71 |
| 3 | 4.453 | 99.17 |
| 4 | 0.552 | 99.72 |
| 5 | 0.193 | 99.91 |
| 6 | 0.079 | 99.99 |
| 7 | 0.005 | 99.99 |
| 8 | 0.003 | 100.00 |

In Tab. 9 sind die Eigenwerte einer PCA der Paraffinöle zu sehen. In den ersten beiden Hauptkomponenten sind demnach bereits 94.71% der Varianzen enthalten. Dies bedeutet, dass 94.71% der Unterschiede zwischen den

Mustern mit den ersten beiden Hauptkomponenten abgebildet werden können. Diese beiden Komponenten können nun in einem 2D-Plot dargestellt werden. Abb. 48 zeigt eine solche PCA von den vier verschiedenen Paraffinöl-Klassen A-D. Diese Öle unterscheiden sich z. T. in Molmasse, Verteilungsbreite und Cycloalkangehalt. Die PCA stellt die verschiedenen Klassen als kleine „Wölkchen“, sog. Cluster dar. Die einwandfreien Chargen (basierend auf den Daten der NIR-, GC-, Viskositätsmessungen, Brechungsindizes, Dichte und der Kohlenstoffverteilung nach DIN 51378) sind eingekreist. Die auffälligen bzw. nicht einsetzbaren Chargen entfernen sich um so weiter von „ihrem“ Cluster, je stärker sich ihre Eigenschaften von den einwandfreien Chargen unterscheiden.

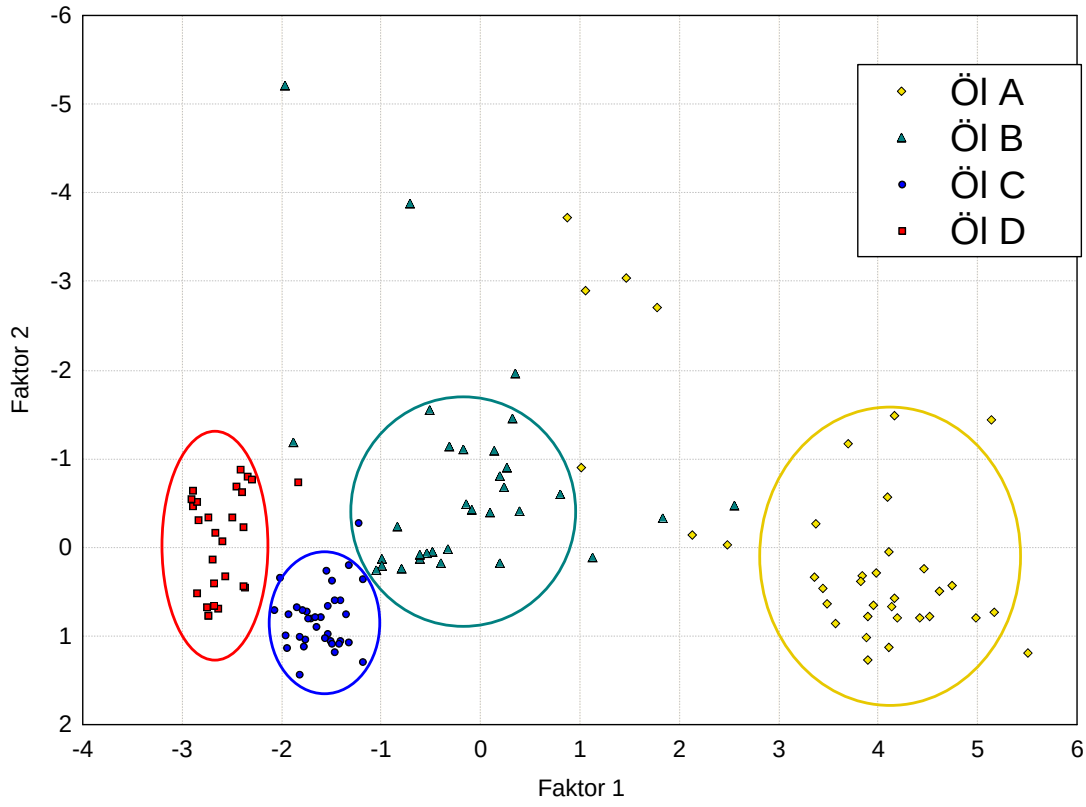



**Abb. 48. PCA von 131 Paraffinölen der vier Klassen A-D. Aufgetragen sind die ersten beiden Faktoren (Hauptkomponenten). Öle, die nicht den Spezifikationen entsprechen, sind entfernt von ihrem Cluster sichtbar.**

Die Ergebnisse der LDI-TOF MS stehen in recht guter Übereinstimmung mit den Daten der verschiedenen oben genannten Messverfahren. Da aber eine hohe Viskosität z. B. aus einer hohen mittleren Molmasse aber auch aus

einem hohem Cycloalkangehalt resultieren kann, braucht man viele Kennzahlen bzw. Messmethoden, um die Qualität eines Öls beurteilen zu können. Mit der LDI-TOF MS und der anschließenden Auswertung über die Hauptkomponentenanalyse ist es bei einer kurzen Messzeit (ca. 15 Minuten) möglich, zu beurteilen, ob eine Charge ihren Vergleichsmustern entspricht, bzw. ob auffällige Abweichungen auftreten. Zusätzlich ist man in der Lage, auftretende Abweichungen qualitativ zu beschreiben, wenn z. B. mehrere Maxima im Spektrum auftreten oder die Verteilung der Cycloalkane abweichend ist.

Mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse ist es möglich, kleinere Unterschiede zwischen Proben herauszuarbeiten, als es nur durch das bloße Betrachten der Spektren möglich ist. Wenn eine Probe im „Randbereich“ eines Clusters platziert ist, müssen weitere Tests (z. B. ein Einsatzversuch des Öls in einer definierten Rezeptur) durchgeführt werden, um die Eignung des Musters für seinen Zweck zu prüfen. Wird ein Muster jedoch entfernt vom Cluster platziert und zeigt somit starke Abweichungen, so können weitere, z. T. sehr aufwändige Tests vermieden werden.

**Vaseline**

Die Hauptkomponentenanalyse wurde auch zur Auswertung der Vaselineproben herangezogen. Die LDI-TOF Massenspektrometrie Methode wurde für eine Studie zur Qualifizierung eines Alternativlieferanten für eine bestimmte Qualität eingesetzt. Im Rahmen dieser Studie wurden 48 Vaselinemuster untersucht und die Proben miteinander verglichen. In Tab. 10 sind die prozentualen und totalen kumulativen Varianzen der Hauptkomponenten für die PCA der Vaselineproben aufgeführt. Hier sind mit den ersten beiden Hauptkomponenten bereits knapp 90% der total in den Proben enthaltenen Varianzen abgedeckt.

Auch bei der Vaseline ermöglicht die Auswertung über die Hauptkomponentenanalyse eine feinere Charakterisierung der Proben. Die Unterschiede zwischen den Proben fallen z. T. beträchtlicher aus, als bei den Paraffinölen (siehe Abb. 49). Dies ist plausibel, da Vaseline ein Mischprodukt ist und sowohl die Ausgangsstoffe variieren können, als auch deren Mischverhältnis.

Insbesondere bei der Art und Menge der eingesetzten Wachskomponente konnten starke Unterschiede zwischen den Mustern festgestellt werden.

**Tab. 10: Hauptkomponenten (PC) der Vaseline mit den prozentualen und totalen akkumulativen Varianzen**

| PC | Varianz [%] | total [%] |
|---|---|---|
| 1 | 79.421 | 79.421 |
| 2 | 9.506 | 88.926 |
| 3 | 7.692 | 96.618 |
| 4 | 2.039 | 98.658 |
| 5 | 1.320 | 99.978 |
| 6 | 0.018 | 99.996 |
| 7 | 0.003 | 99.999 |
| 8 | 0.001 | 100.000 |

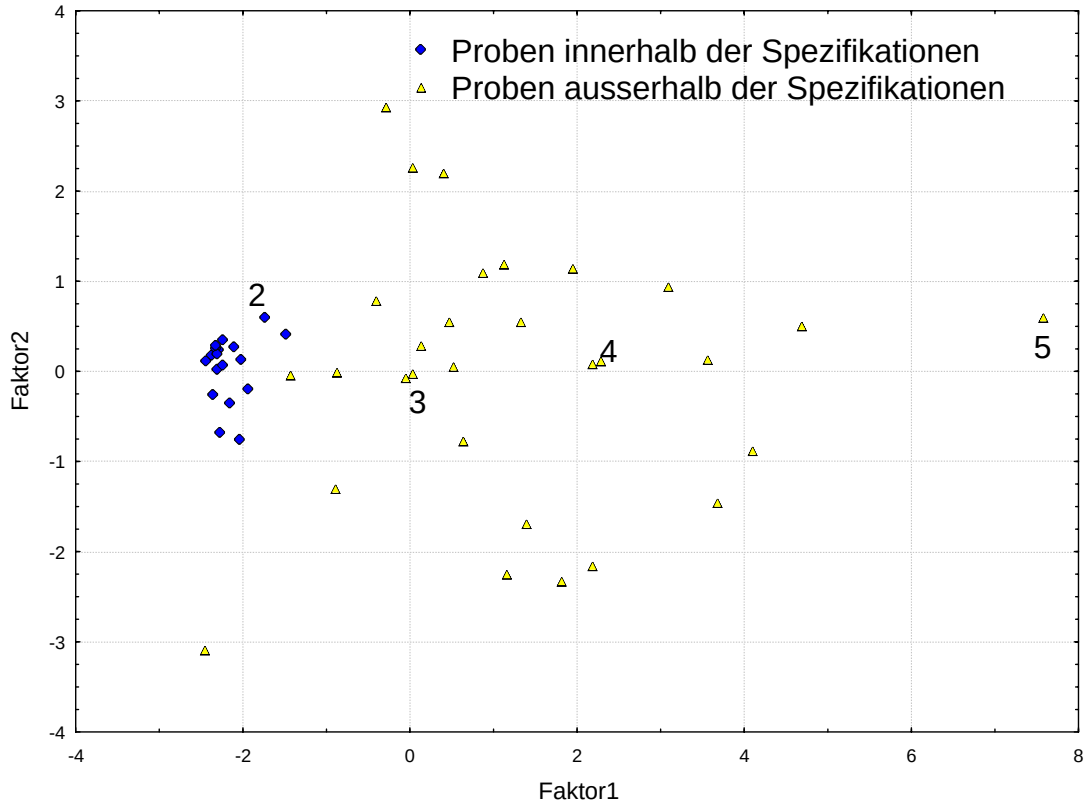



**Abb. 49 PCA von 48 Vaselineproben. Aufgetragen sind die ersten beiden Faktoren (Hauptkomponenten). Proben, die nicht den Spezifikationen entsprechen (gelb), sind entfernt von ihrem Cluster (blau) platziert. Markierte Proben (2-5): siehe Text.**

In Abb. 50 ist ein Vergleich von vier verschiedenen Vaselineproben abgebildet. Die Positionen der Proben sind in Abb. 49 markiert. Es ist klar zu erkennen, dass die am stärksten in ihren Eigenschaften abweichende Vaseline auch den größten Abstand in der Hauptkomponentenanalyse zu dem Cluster der akzeptierten Muster hat. Vaseline 5 besitzt einen sehr hohen Anteil an einem Wachs mit einer geringeren Molmasse als z. B. Vaseline 2 oder 3.

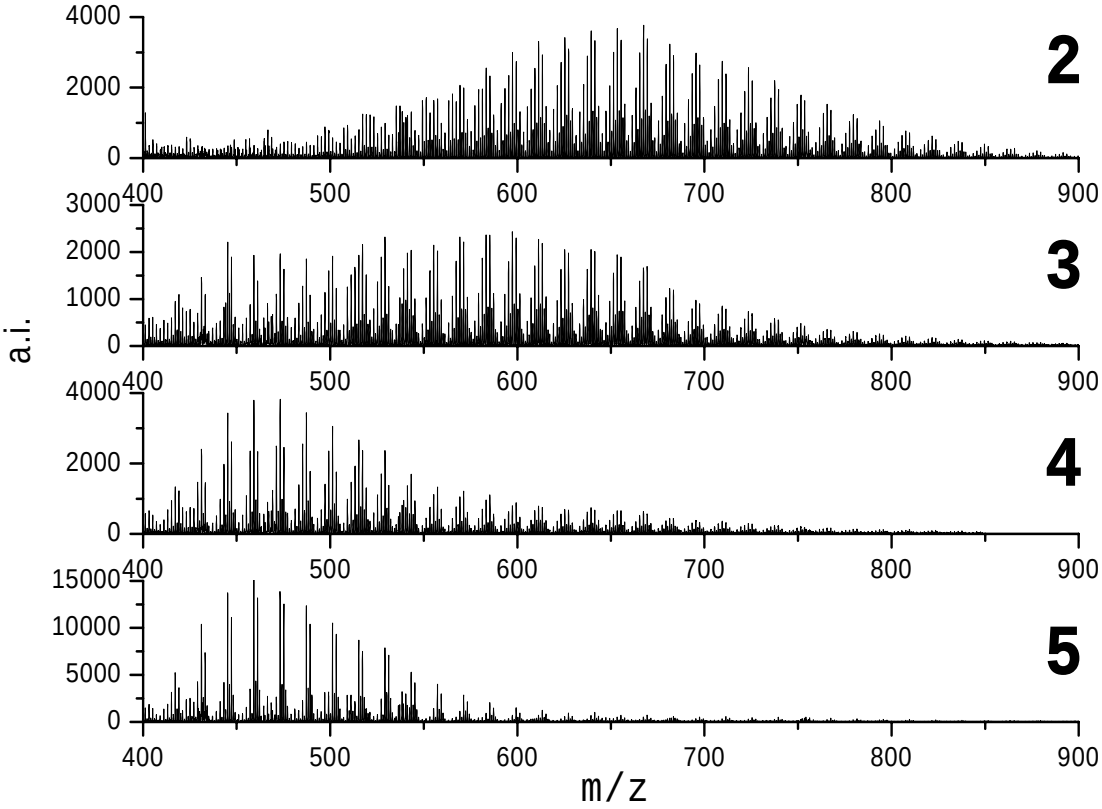



**Abb. 50. LDI-TOF Massenspektren von vier verschiedenen Arten Vaseline. Von oben nach unten sind hier Vaseline 2 (aus dem Cluster der „akzeptierten" Proben) und 3-5 abgebildet (diese Proben sind außerhalb des Clusters platziert). Die Platzierungen sind den Nummern in Abb. 49 zu entnehmen.**

In dieser Studie stellte sich heraus, dass für die benötigte Vaseline-Qualität sowohl das Wachs als auch das Paraffinöl eine hohe Molmasse ($M_n$ = ca. 550 g/mol) besitzen müssen. Viele der getesteten Proben stellten sich jedoch als eine Mischung aus einem Paraffinöl mit relativ hoher und einem Wachs mit geringer Molmasse heraus. So kann im Vorfeld bereits mit der LDI-TOF Methode geprüft werden, ob die Zusammensetzung einer Vaseline den Anforderungen entspricht.

## 4.2 MALDI-TOF MS von Wollwachs

Im Rahmen dieser Untersuchung sollte geprüft werden, ob sich komplexe Rohstoffe wie Wollwachs und Wollwachsprodukte mit der MALDI-TOF Massenspektrometrie darstellen und charakterisieren lassen.

Die Wollwachse wurden mit verschiedenen Kationen und ohne Verwendung einer Matrix gemessen, um dann bei Verwendung eines geeigneten Kations durch Testen verschiedener Matrices noch eine Verbesserung der Ergebnisse zu erreichen. Die so erzeugten Spektren wurden möglichst umfassend studiert und interpretiert.

### 4.2.1 Kationen

Es wurden die Kationen Natrium, Kalium, Lithium, Silber, Gold, Palladium, Blei und Cäsium getestet. Dafür wurden wässrige Lösungen folgender Salze angefertigt: NaCl, $K_2SO_4$, LiOH, AgTFA (in THF), $AuCl_4$, $Pd(acac)_2$, $PbCl_2$, CsCl. Die Lösungen wurden so angesetzt, dass sie 0.1% Kation enthielten. Die Probenvorbereitung wurde nach Technik 1 (siehe Kap. 7.8) durchgeführt.

Die Kationen Natrium, Silber und Lithium haben sich als geeignet erwiesen. Mit Natrium auf dem Probenteller konnten die Tenside, die zur Wollwäsche eingesetzt werden, nachgewiesen werden. Es waren Verteilungen von ethoxylierten Alkoholen zu sehen. Die Kettenlängen der Fettalkohole aber auch der Ethoxylierungsgrad sind charakteristisch für das eingesetzte Tensid. Mittels LC/MS können die Tenside qualitativ und quantitativ bestimmt werden [143, 144].

Mit Silber als Kation wurden Signale der Wachsester und auch der Alkohole/Säuren erhalten. Da die einzelnen Molmassen aber bereits mehrfach interpretierbar sind und dies durch die Überlagerung der Silberaddukte im Spektrum noch erschwert wird, wurde von einer weiteren Anwendung von Silber als Kation abgesehen.

**Tab. 11. Anwendung von versch. Kationen ohne Matrix zur LDI-TOF MS von Wollwachs**

| Kation | Beobachtung | |
|---|---|---|
| $Na^+$ | Wollwachstenside zu sehen, zum Tensidnachweis u. ev. Charakterisierung geeignet. | **(+)** |
| $K^+$ | Kaum Wachsester zu sehen, wahrscheinlich auch Na-Addukte dabei. | **+** |
| $Li^+$ | Wollwachsester, Diester, Alkohole und Säuren sichtbar | **++** |
| $Ag^+$ | Wollwachsester, Diester zu sehen, aber wegen der zwei Silberisotope kaum interpretierbar | **+** |
| $Au^+$ | Vor allem Goldcluster zu sehen, kaum Wachse | **-** |
| $Pd^+$ | Vor allem Palladiumcluster zu sehen, kaum Wachse. Isotopenverteilung ungeeignet zur Interpretation | **-** |
| $Cs^+$ | Vor allem Cäsiumcluster zu sehen, kaum Wachse | **-** |
| $Pb^+$ | Vor allem Bleicluster zu sehen, Isotopenverteilung ungeeignet zur Interpretation | **-** |

Lithiumionen ergaben das beste Ergebnis: Es waren Li-Addukte von Alkoholen und Säuren, Cholesterin sowie diversen Estern und Diestern erkennbar.

### 4.2.2 Matrices

Als nächstes wurde geprüft, ob das Ergebnis der LDI-TOF MS unter Zugabe einer Matrix noch verbessert werden kann. Die drei Kationen $Na^+$, $Li^+$ und $K^+$ wurden mit 10 verschiedenen Matrices kombiniert, um deren Einfluss auf die Qualität der Massenspektren zu prüfen.

Folgende Matrices wurden getestet: 4-Hydroxy-$\alpha$-cyanozimtsäure (CCA), 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB), Sinapinsäure (SA), Anthracen (ANT), 1,4-Bis(5-phenyl-2-oxazolyl)-benzen (POPOP), all-trans-Retinolsäure (RET), 2-Nitrophenyloctylether (NPO), Dithranol (DT), 2-(4'-Hydroxybenzolazo)-benzoesäure (HABA), 2-Brom-4,6-dinitroanilin (BDNA).

Es stellte sich heraus, dass keine Matrix geeignet war, die Qualität der LDI-TOF Spektren zu verbessern. Im Gegenteil, durch die Matrices traten vor allem im unteren Massenbereich häufig intensive Matrix- und Matrix-Kationen Peaks auf, die die Spektren unübersichtlich und somit schwerer interpretierbar machten.

Somit bleibt als optimale Methode die alleinige Verwendung von Lithium als Kationisierungsreagenz ohne Verwendung einer Matrix. Durch Verwendung von Natrium ohne Matrix besteht zusätzlich die Möglichkeit, die Tenside zu identifizieren, die bei der Wollwäsche eingesetzt wurden.

### 4.2.3 Charakterisierung von Wollwachs

Vier Wollwachse A, B, C, D und E wurden mit Lithium als Kationenzusatz unter identischen Bedingungen analysiert und anhand der m/z-Signale eine Zuordnung zu den verschiedenen Wollwachs-Spezies durchgeführt.

Anhand der Molmassen lässt sich eine Zuordnung zu den verschiedenen Spezies durchführen, jedoch sind hier Grenzen gesetzt, da sich einige Spezies nicht anhand der Molmasse unterscheiden lassen. So haben Ester aus einer Hydroxysäure und einem Alkohol die gleiche Masse wie Ester aus einer Fettsäure und einem Diol – gleiche Gesamtkettenlängen vorausgesetzt. Generell lässt sich auch nicht sagen, wie die Ketten verteilt sind – so haben Ester aus einer $C_{14}$-Säure und einem $C_{18}$-Alkohol die gleiche Masse wie z. B. ein Ester aus $C_{16}$-Säure und -Alkohol.

**Alkohole und Säuren**

Zwischen m/z 200 und 500 befinden sich vor allem Peaks, die sich freien Säuren, Hydroxysäuren, Alkoholen, Diolen und den Wollwaschmitteln (ethoxylierte Alkohole) zuordnen lassen (s. Abb. 51). Eine Unterscheidung der Alkohole und Säuren ist anhand der Masse mittels MALDI-TOF nicht trivial. Cetylalkohol hat z. B. ($[C_{16}H_{33}\text{-}OH+Li]^+$, exakte Masse = 249,2770 Da) fast die gleiche Masse wie Pentadecansäure ($[C_{14}H_{29}COOH+Li]^+$, exakte Masse = 249,2406 Da).

Die benötigte Auflösung zum diskreten Abbilden beider Peaks als Lithiumaddukte beträgt $R=M/\Delta M=6850$. Bedingt durch eine zur Ionisierung

benötigte hohe Laserenergie konnte in dem Massenbereich lediglich eine Auflösung von ca. R=2000 erreicht werden, die hierfür nicht ausreichend ist. Freie Alkohole sind zwischen 6.5% und 20% vorhanden, freie Säuren dagegen nur zu 0.5-1% [88, 90]. Daher spricht einiges dafür, dass es sich bei den Signalen vor allem um Alkohole und Diole handelt.

**Ester**

In dem Massenbereich zwischen 500 und 900 Da befinden sich vor allem Monoester. Diese bilden sich aus den enthaltenen Säuren und Hydroxysäuren mit Alkoholen, Diolen und Sterinen (z. B. Cholesterin). Ester, die durch Veresterung von Hydroxyfettsäuren mit Alkoholen oder Diolen entstanden sind, können daher eine oder mehrere unveresterte Hydroxygruppen enthalten. Eine der Monoesterverteilungen ist von besonders starker Intensität (siehe Abb. 52). Dabei handelt es sich wahrscheinlich vor allem um Hydroxy-Ester, die sich aus Alkoholen und Hydroxysäuren, aber auch aus Diolen und Säuren bilden lassen. Ester, die bei einer Veresterung von einer Säure und einer Hydroxysäure entstehen, ließen sich ebenfalls nicht von dieser Verteilung unterscheiden. Schließlich können auch durch Veresterung von Lanosterin und Fettsäuren Ester gebildet werden, die sich auch mit dieser Verteilung erklären lassen würden.

Im Massenbereich zwischen etwa 900 und 1200 Da sind noch weitere Peaks vorhanden, die sich möglicherweise als Diester der enthaltenen Komponenten interpretieren lassen. Wollwachs Diester wurden in der Literatur u. a. von *Downing et al.* [87] beschrieben. Ab m/z 800 sind Diester zu finden, die durch die Reaktion einer Fettsäure oder Hydroxyfettsäure mit einem Hydroxy-Ester entstanden sind.

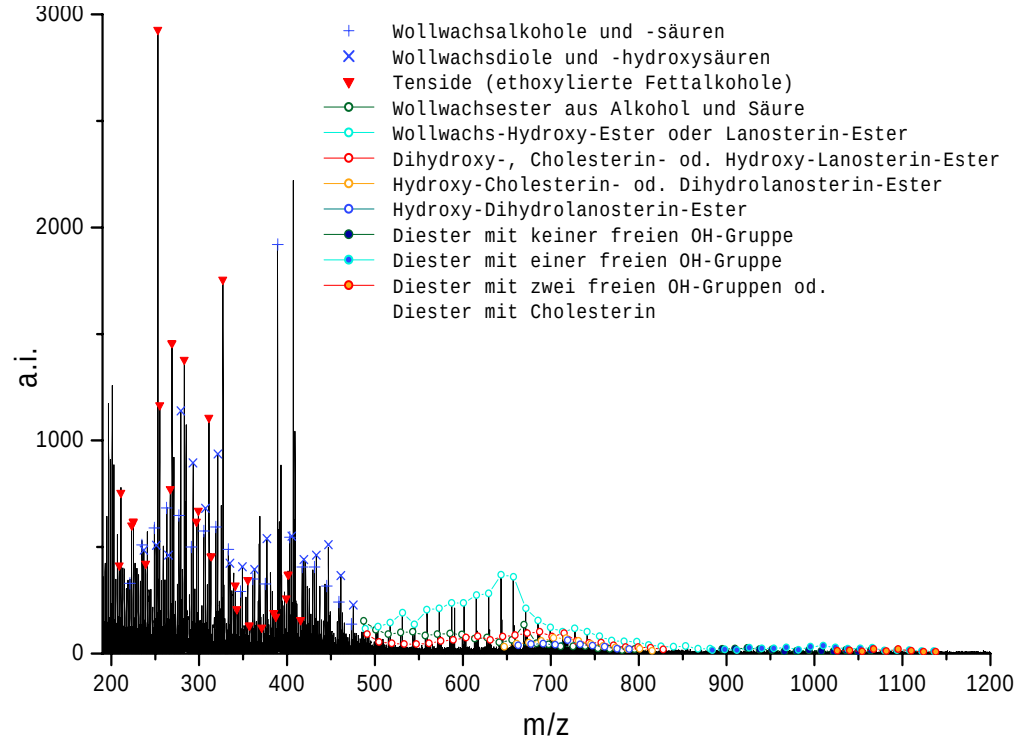



**Abb. 51. LDI-TOF Spektrum von Wollwachs A, Lithiumaddukte. Im unteren Massenbereich dominieren die Alkohole, Säuren und die Tenside.**

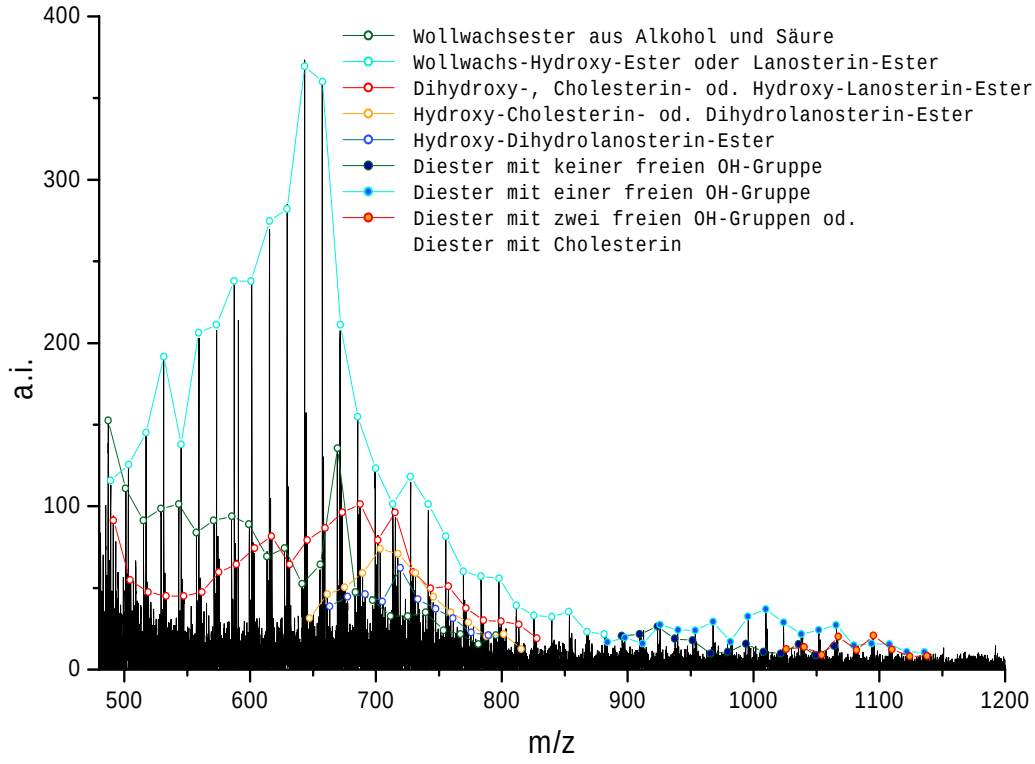



**Abb. 52. Ausschnitt aus Wollwachs A. In diesem Massenbereich zeigen sich die Mono- und Diester aus Alkoholen, Diolen oder Sterinen und Säuren bzw. Hydroxysäuren. Lithiumaddukte.**

Eine Schwierigkeit bei dieser Interpretation ist, dass die Diester im Prinzip die gleichen Molmassen wie die Monoester aufweisen plus ein Vielfaches von 14 Masseneinheiten. Dadurch könnte es sich also auch prinzipiell um die Monoester handeln. Jedoch bilden sich bei etwa 1000 Da neue Maxima aus und auch die angenommene Kettenlänge spricht dafür. Ein Monoester mit einer Molmasse von etwa 1000 g/mol müsste eine Gesamtkettenlänge von 64-66 aufweisen, d. h. die Kettenlängen von Alkohol und Säuren in dem Ester müssten jeweils 32-33 betragen. Die mittleren Kettenlängen bei den Alkoholen liegen bei ca. 18-26 und bei den Säuren zwischen 16 und 24 [2, 89]. Damit ist es unwahrscheinlich, dass Monoester aus diesen Komponenten ein Maximum bei einer Gesamtkettenlänge von 64-66 C-Atomen bilden. Es kann eher angenommen werden, dass es sich bei diesen Verteilungen um Diester handelt. Deren Intensität ist dabei relativ klein. Zum einen, weil die Konzentration der Diester im Wollwachs recht gering ist und zum anderen diese durch ihre unpolarere Natur noch schwerer zu ionisieren sind als die Monoester. Prinzipiell sind auch Triester aus den vorliegenden Hydroxysäuren und Alkoholen bzw. Diolen möglich [2], die aber aufgrund ihrer geringen Menge im Wollwachs im LDI-TOF Massenspektrum nicht abgebildet werden. Weiterhin sind in den Spektren immer wieder Peaks zu erkennen, die sich mit Cholesterin bzw. einem Spaltprodukt aus einem Cholesterylester erklären lassen. Cholesterin ist das am häufigsten vorkommende Sterin in Wollwachs und stellt zwischen 30 und 40 % des Unverseifbaren in Wollwachs dar [89, 90]. Das Lithiumaddukt von Cholesterin ist bei m/z 393 zu finden. Der Peak bei m/z 368 kann durch eine Spaltung eines Esters aus Cholesterin und einer Wollwachssäure entstanden sein. In diesem Falle handelt es sich dann nicht um ein Protonen- oder Kationen-Addukt, sondern vielmehr um ein Fragment, das vor oder während der Ionisation entstanden ist. Aufgrund der höheren Elektronegativität der Säure verbleibt das Cholesterin als ein $[M\text{-}H_2O]\cdot^+$ Ion.

**Tenside**

Tenside sind bis etwa 1 % im Wollwachs vertreten [144]; Die Signale der Tenside sind vermutlich überproportional im Spektrum vorhanden, da sie re-

lativ polar sind und sich somit unter MALDI-Bedingungen am leichtesten ionisieren lassen. Zwischen Wollwachsen unterschiedlicher Herkunft können mittels LDI-TOF MS einige Unterschiede aufgezeigt werden. In Abb. 53 ist der untere Massenbereich eines LDI-TOF Massenspektrums von Wollwachs B zu sehen. Die Lithiumaddukte der Tenside treten hier deutlich in den Vordergrund. Anhand der Molmassen können die Peaks Fettalkoholethoxylaten bestimmter Kettenlänge und Ethoxylierungsgrad zugeordnet werden.

In Wollwachs B und Wollwachs D waren besonders intensive Signale mit typischen Massen von ethoxylierten Alkoholen zu erkennen. In Wollwachs C waren diese schwächer und in Wollwachs A am geringsten ausgeprägt. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen aus den LC/MS Untersuchungen [144] recht gut überein (siehe Tab. 12).

**Tab. 12. Vergleich der Tensid-Peaks der Wollwachse A-D bei der LDI-TOF MS mit den Ergebnissen der LC/MS mit Angabe der Kohlenstoff-Kettenlänge**

| Wollwachs | LDI-TOF MS | LC/MS [144] |
|---|---|---|
| **A** | sehr wenig, C9-C13 | nicht bestimmbare Menge |
| **B** | mehr, C11-C13 | ca. 0.4%, C11-C12 |
| **C** | viel, C9-C11 | ca. 0.9%, C9-C11 |
| **D** | viel, C9-C11 | ca. 1.1%, C9-C11 |

Damit ist die LDI-TOF MS Methode durchaus geeignet, die Art der eingesetzten Tenside qualitativ zu beurteilen. Insbesondere ist die Methode auch geeignet, um Tenside wie z. B. Alkylphenol-ethoxylate (APEO) nachzuweisen. Diese werden in Europa in Wasch- und Reinigungsmitteln nicht mehr eingesetzt, da sie biologisch schlecht abbaubar sind und das daraus entstehende Nonylphenol ein hormonelle Wirkung auf den menschlichen und tierischen Organismus ausübt [145]. Dennoch werden APEO, deren wichtigster Vertreter Nonylphenylethoxylate (NPEO) sind (siehe Abb. 55) [146], immer noch in vielen Produkten aus anderen Regionen eingesetzt.

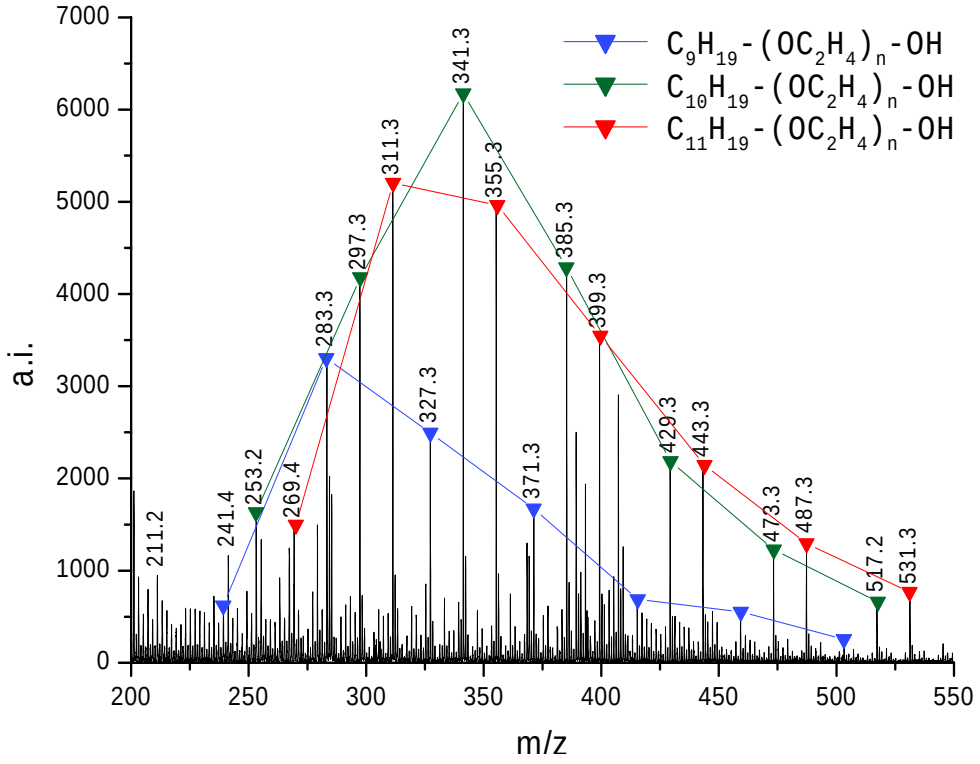



**Abb. 53. Ausschnitt aus Wollwachs B, Lithiumaddukte. Dieses Wollwachs enthält besonders viel Tenside.**

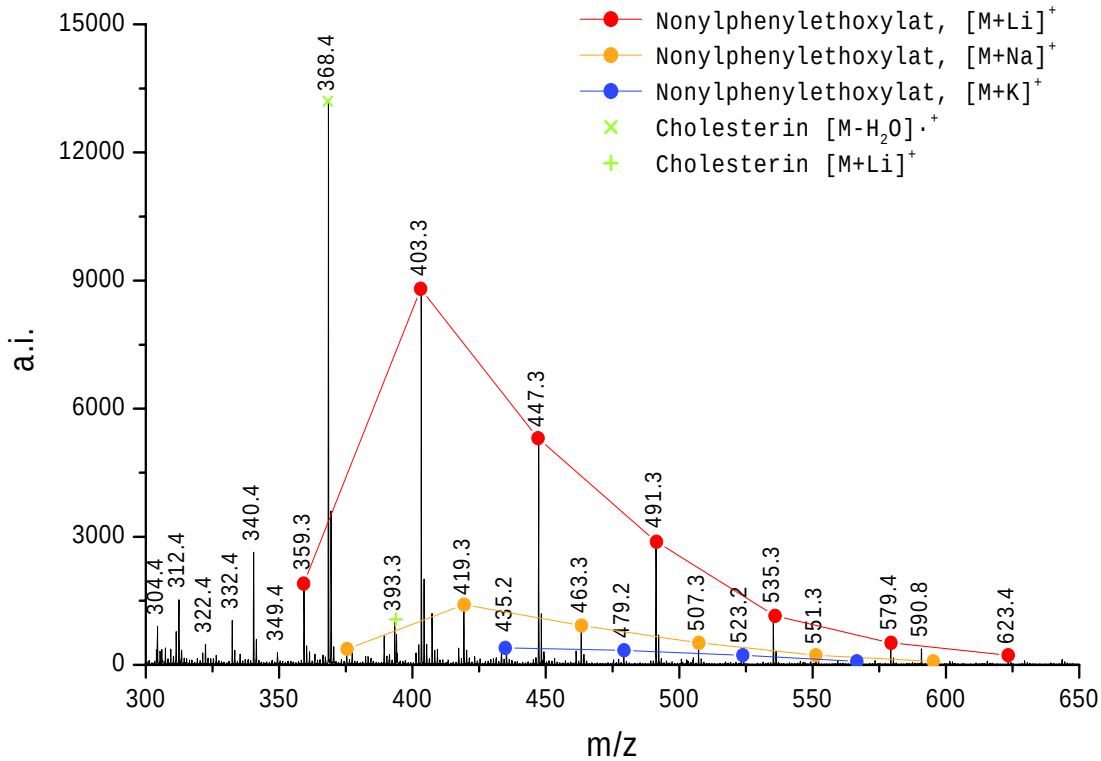



**Abb. 54. Ausschnitt aus dem LDI-TOF Spektrum von Wollwachs E, Lithium-addukte. Für die Wollwäsche wurde offensichtlich NPEO eingesetzt.**

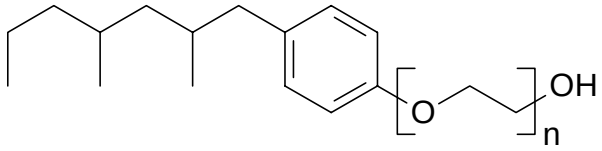



**Abb. 55. Strukturformel von Nonylphenylethoxylat**

In Abb. 54 ist ein Ausschnitt aus dem LDI-TOF Massenspektrum von Wollwachs E zu sehen. Es sind Peaks vorhanden, die auf eine Anwesenheit von Nonylphenylethoxylat hindeuten (Molmassen der Quasimolekülionen der Tenside siehe Tab. 25 in Kap. 8.3.2. Wenn also lediglich geklärt werden soll, ob APEO zur Wollwäsche verwendet wurden, ist ein qualitativer Nachweis mittels LDI-TOF MS möglich.

Insgesamt zeigt sich, dass die LDI-TOF MS angewendet werden kann, um einen Eindruck über die Zusammensetzung des Wollwachses zu gewinnen. Die Ester können als solche abgebildet werden und nicht nur deren Hydrolyseprodukte, wie dies vor allem in der Gaschromatographie der Fall ist. Durch Vergleich mit gaschromatographischen Ergebnissen bzw. aus der Literatur lässt sich die Interpretation der Spektren erleichtern und auf Plausibilität prüfen. Weiterhin lassen sich einfach und schnell die zur Wollwäsche verwendeten Tenside identifizieren.

### 4.2.4 Charakterisierung von Wollwachsalkoholen (Eucerit®)

Eucerit® besteht vor allem aus Wollwachsalkoholen, die bei der hydrolytischen Spaltung der Wollwachsester gewonnen werden. Das Eucerit wird destillativ abgetrennt und dadurch auch weitestgehend von geruchlich belastenden Stoffen befreit. Die LDI-TOF Präparation wurde wie beim Wollwachs mit Lithium als Kation durchgeführt, wodurch auch eine Abbildung der Wollwachs-Alkohole möglich war (siehe Abb. 56).

Zwischen m/z 200 und 400 zeigen sich vor allem Peaks der Alkohole und der Diole. Einer der Alkoholpeaks bei m/z 389 ist besonders intensiv. Dabei handelt es sich vermutlich hauptsächlich um (ω-2)-Monomethyl-pentaeicosanol ($C_{26}H_{54}O$), welches Literaturangaben zufolge den häufigst vorkommenden Alkohol darstellt [2]. Auch das in Eucerit enthaltene

Cholesterin, welches immerhin bis zu 35 % des Rohstoffes betragen kann, wird abgebildet. Bei m/z 393 ist ein intensives Signal des Lithiumadduktes vorhanden. Andere Sterine wie das Lanosterol sind ebenfalls zu erkennen. Durch ihre geringe Polarität werden die Sterine aber insgesamt mit einer relativ geringen Signal-Intensität abgebildet. Hinzu kommt, dass Agnosterin-, Lanosterin- und Dihydrolanosterinsignale sich miteinander oder mit Peaks der Alkohole überlagern können. Weiterhin waren Tensid-Peaks (ethoxylierte Alkohole) zu erkennen, die aber im Vergleich zu den Wollwachsproben eine geringere Intensität aufweisen.

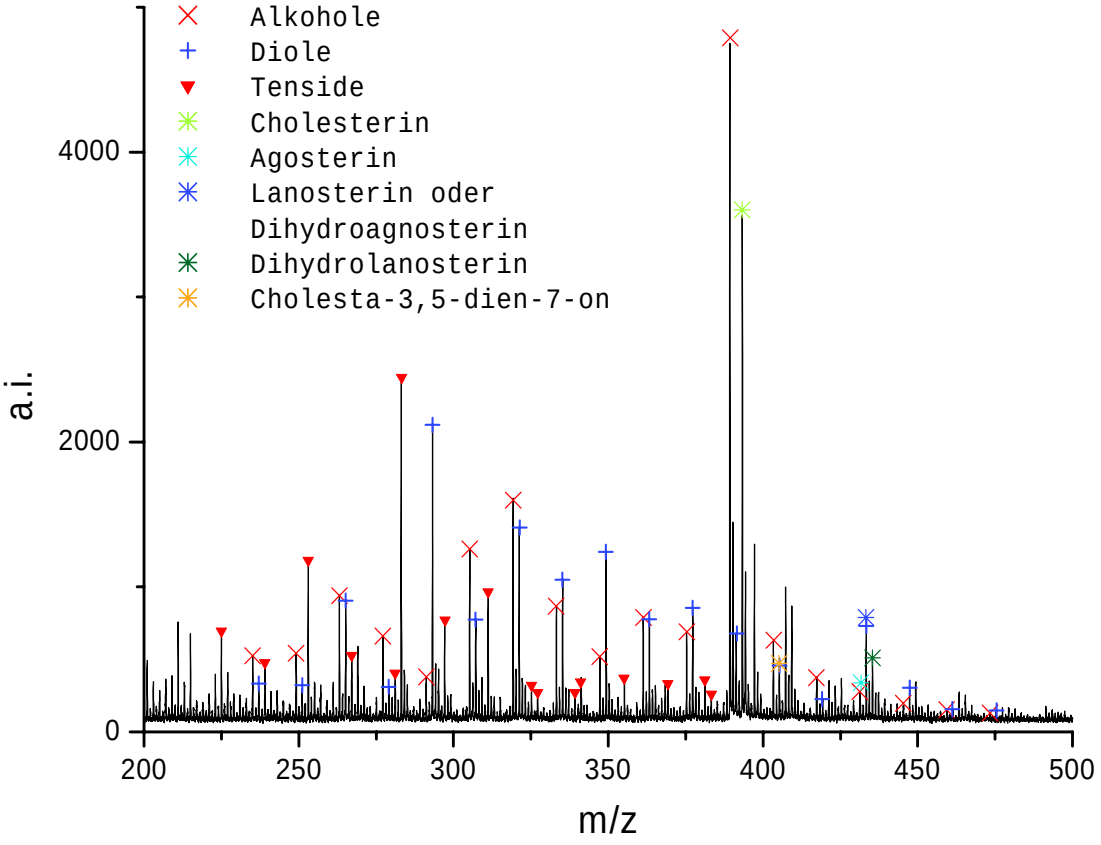



**Abb. 56. LDI-TOF Massenspektrum von Wollwachsalkoholen (Eucerit®), Lithiumaddukte.**

Die Alkohole zeigen im LDI-TOF Massenspektrum Kettenlängen von $C_{14}$ bis etwa $C_{31}$. Diole werden mit Kettenlängen von $C_{13}$ bis $C_{31}$ abgebildet. Dies stimmt grob mit der Literatur überein, wo die Alkohole mit Kettenlängen von $C_{14}$ bis $C_{36}$ und die Diole von $C_{12}$ bis $C_{30}$ angegeben werden [86] bzw. von $C_{16}$ bis $C_{32}$ (Alkohole) und $C_{14}$ bis $C_{25}$ (Diole) [89].

Das Eucerit kann mit der LDI-TOF MS in einem Analyseschritt schnell abgebildet werden. Dadurch kann man sich zügig einen Gesamteindruck von der Probe verschaffen. Zur quantitativen Bestimmung sei aber nach wie vor auf die gaschromatographische Methode hingewiesen [2, 89].

### 4.2.5 Charakterisierung von Wollwachssäuren

Wollwachssäuren können destillativ nach der Hydrolyse aus dem Wollwachs gewonnen werden. Sie dienen als Ausgangsstoff für weitere Produkte (z. B. Glyceryl Lanolate „Neocerit®“) und sollen ebenfalls mit der LDI-TOF MS charakterisiert werden.

Als Säuren kommen vor allem gesättigte aliphatische Fettsäuren und Hydroxyfettsäuren sowie Isomere dieser beiden vor. Zusätzlich treten offenbar auch geringere Mengen an Polyhydroxyfettsäuren und ungesättigten Fettsäuren auf [2]. Schließlich wird sogar vermutet, dass auch Ester von Hydroxyfettsäuren vorliegen könnten [147].

Die LDI-TOF Präparation wurde wie bei der Analyse von Wollwachs mit Lithium als Kation durchgeführt. Zusätzlich wurde eine LDI-TOF im negativen Ionenmodus durchgeführt, da die freien Säuren sich auf diese Art und Weise als $[M-H]^-$ Ionen abbilden lassen.

In Abb. 57 und Abb. 58 sind die LDI-TOF Massenspektren der Wollwachssäuren zu sehen. Dabei fällt auf, dass im Positivionenmodus die Spektren sehr komplex zusammen gesetzt sind, wogegen im Negativionenmodus ein großer Teil der Peaks nicht dargestellt wird oder einer Diskriminierung unterliegt.

In beiden Modi sind die Säuren und Hydroxysäuren zu erkennen. Die Massenbereiche bzw. Kettenlängen der Säuren sind vergleichbar, jedoch sind die Signale der Hydroxysäuren im Negativionenmodus wesentlich schwächer ausgeprägt, als im Positivionenmodus.

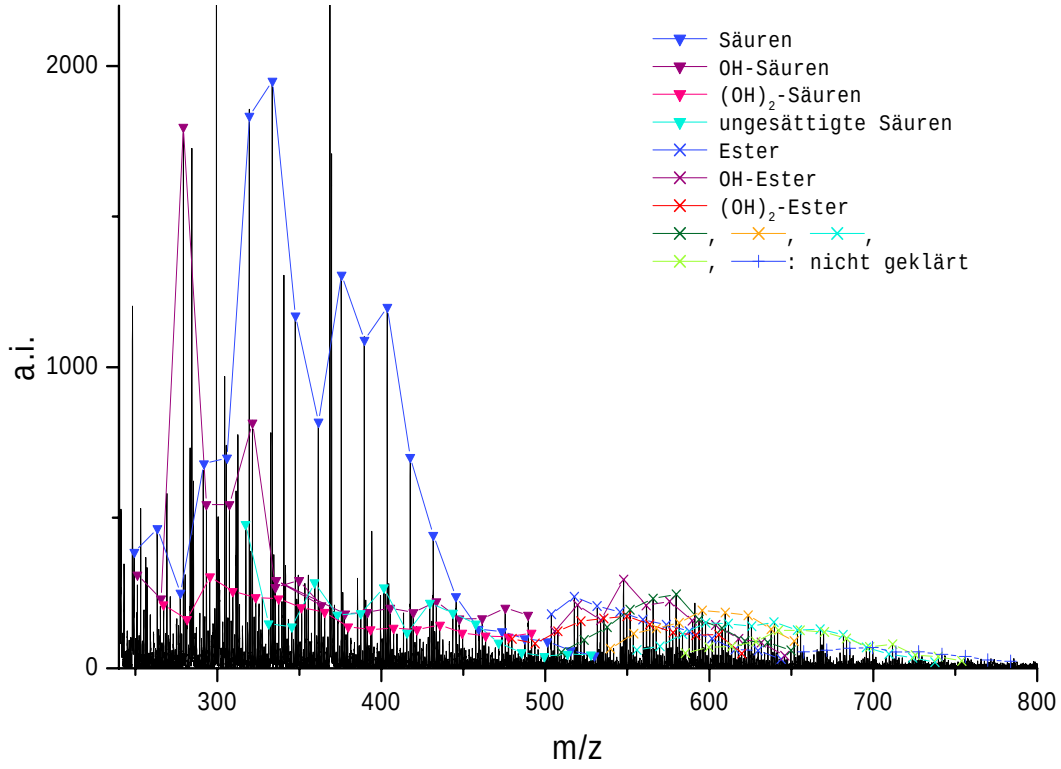



**Abb. 57. LDI-TOF MS von Wollwachssäuren, Lithiumaddukte. Neben den freien Säuren, Hydroxysäuren und Dihydroxysäuren lassen sich auch Ester aus Hydroxysäuren nachweisen.**

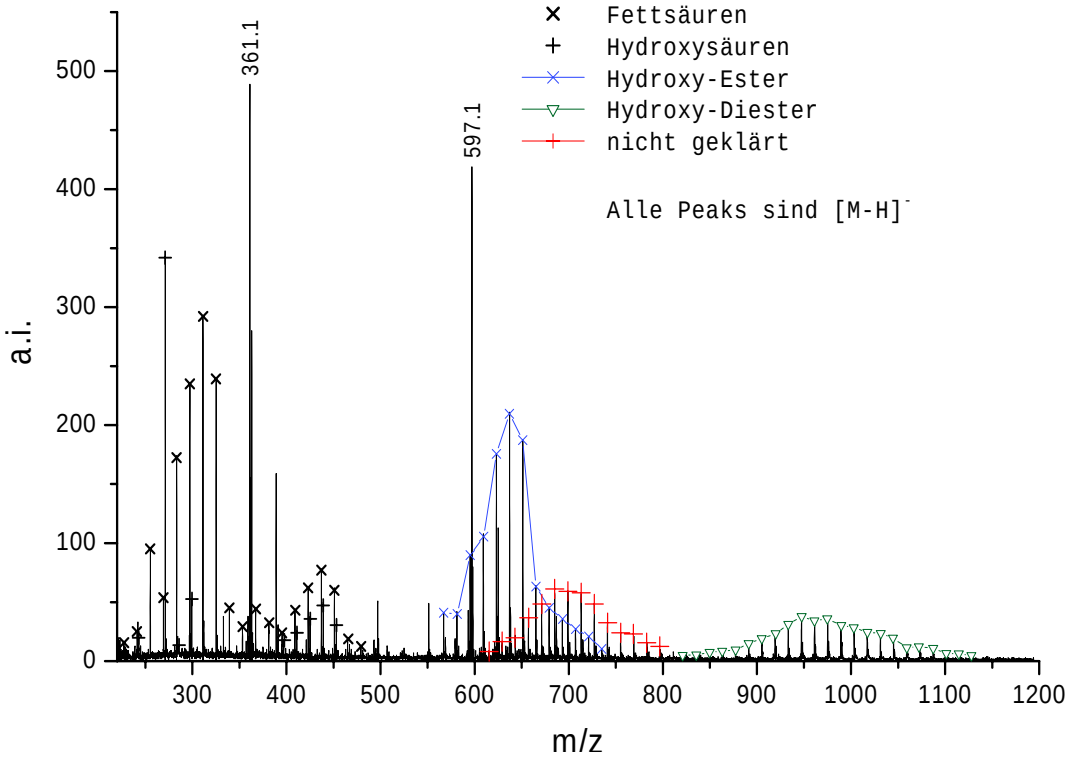



**Abb. 58. LDI-TOF MS von Wollwachssäuren, negativ Ionenmodus.**

Die Fettsäuren machen ca. 60 % der Gesamtmenge der Säuren aus, die Hydroxysäuren etwa 32-40 % [2, 89, 90, 148]. Auch Ester aus Hydroxysäuren und Säuren lassen sich nachweisen. Diese sind plausibel, da die freien Hydroxygruppen der Hydroxysäuren mit einer weiteren Säurefunktion reagieren können.

Unklar ist zu diesem Zeitpunkt allerdings, ob die Ester die Hydrolyse des Wollwachses unbeschadet überstehen oder sich nach der Hydrolyse neu bilden (z. B. während der Destillation). In dem Positiv-Ionen Spektrum sind aber noch weitere Verteilungen im Massenbereich zwischen m/z 500-800 erkennbar. Diese konnten aufgrund ihrer Masse keiner Komponente zugeordnet werden. Mit in Frage kommenden Reaktionsprodukten der unterschiedlichen Wollwachssäuren ließen sich diese Peaks nicht erklären. Laut Literatur sind etwa 6.5-7.3 % der Wollwachssäuren bis heute unaufgeklärt [89, 148]. Möglicherweise verursachen diese die nicht interpretierbaren Peaks.

### 4.2.6 Charakterisierung von Glyceryl Lanolate (Neocerit®)

Bei Neocerit handelt es sich um die mit Glycerin veresterten Wollwachssäuren. Den größten Anteil stellen – abhängig von der Herstellung – die Monoglyceride dar [2].

Alternativ zur Lithium-Präparation wurde zusätzlich mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure als Matrix und Natrium als Kation präpariert. Die Präparationsbedingungen sind in Kap. 7.8 beschrieben.

Im LDI-TOF Spektrum der Lithiumaddukte (siehe Abb. 59) sind Glyceride zu erkennen, die mit einer oder mehrerer Säuren oder auch Hydroxysäuren verestert sind. Ob es sich dabei um Mono-, Di- oder Triglyceride handelt, kann anhand der Molmasse nicht genau ermittelt werden, da eine weitere Säure ein Vielfaches von 14 Da zu der Molmasse addiert. So haben z. B. ein Monoglycerid mit einer Fettsäurenkettenlänge von 32 und das Diglycerid mit einer Gesamtkettenlänge (Kettenlängen aller beteiligten Säuren addiert) von insgesamt 31 die gleiche Molmasse.

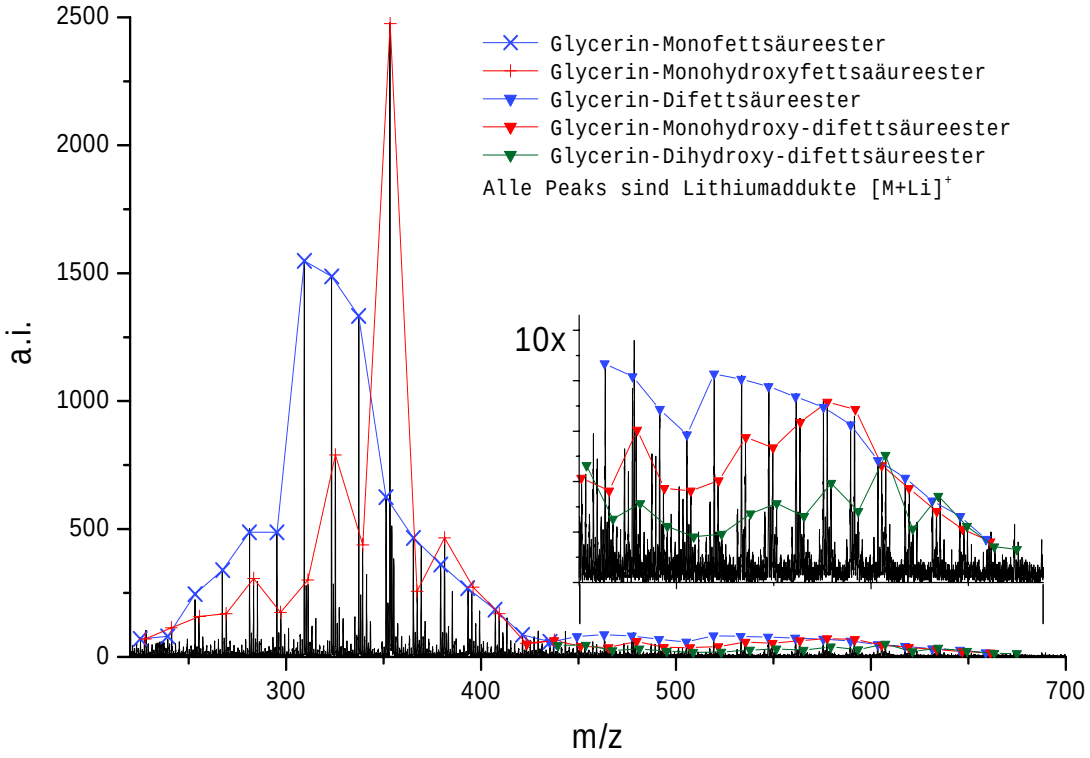



**Abb. 59. LDI-TOF Massenspektrum von Neocerit®, Lithiumaddukte. Es lassen sich Mono- und Diglyceride der Fettsäuren und Hydroxysäuren erkennen.**

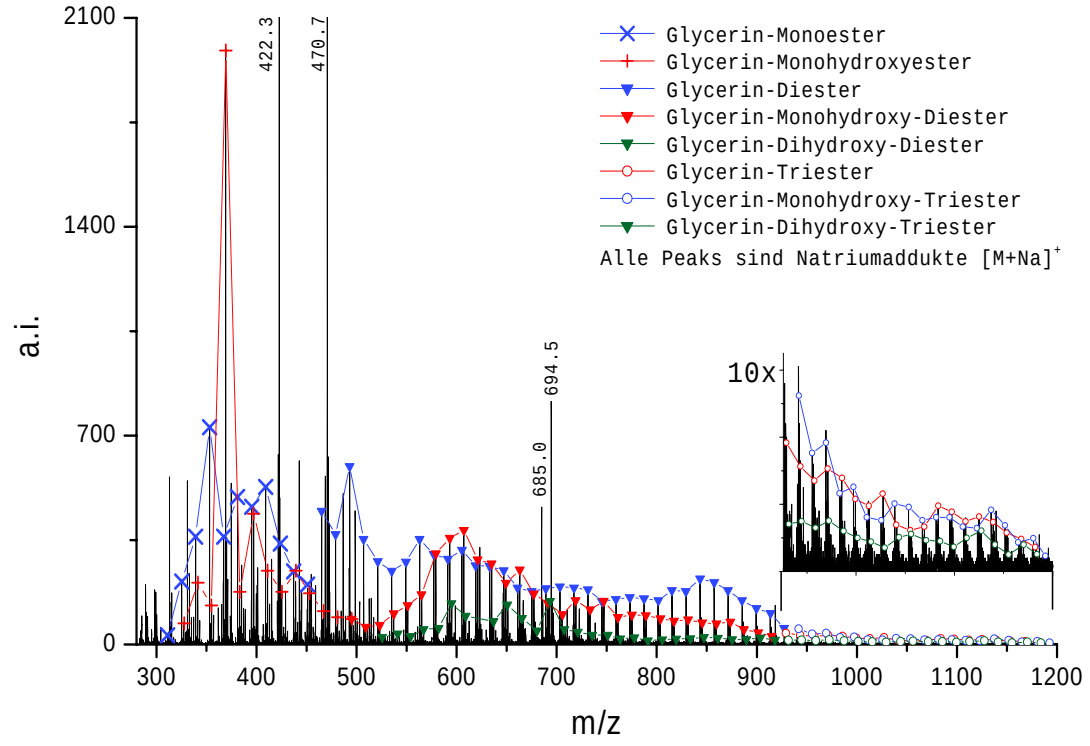



**Abb. 60. MALDI-TOF Massenspektrum von Neocerit®, Natriumaddukte, Präparation mit 2,5-DHB. Hier sind auch Triglyceride erkennbar.**

Anhand der Fettsäureverteilungen von Wollwachs (s. Kap. 4.2.5) erscheint es aber unwahrscheinlich, dass es sich bei Peaks mit einer m/z höher 550 ausschließlich um Monoglyceride handelt. Die längerkettigen Wollwachssäuren sind dort in geringer Menge vorhanden. Vielmehr kann angenommen werden, dass bereits ab m/z 450 zunehmend auch Diglyceride die Peaks der Monoglyceride überlagern. Bei etwa m/z 550 bis 600 ist daher auch ein zweites, kleineres Maximum zu erkennen, welches von den Diestern verursacht wird.

Während durch das Spektrum der Lithiumaddukte vor allem die Existenz der Mono- und Diglyceride bestätigt werden kann, sind im Spektrum der Natriumaddukte (siehe Abb. 60) noch weitere Signale im oberen Massenbereich (m/z 900-1200) zu erkennen. Diese deuten analog zu obigen Überlegungen darauf hin, dass auch Triglyceride der Wollwachssäuren im Neocerit® vorkommen. Die Empfindlichkeit für diese längerkettigen Ester ist offenbar bei der Präparation mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure und Natrium als Kation höher.

Bei beiden Präparationsmethoden ist der intensivste Peak im Massenspektrum identisch: Der Peak bei m/z 353 (Li-Präparation) bzw. bei m/z 369 (Na-Präparation) wird vermutlich vor allem von dem Monoglycerid der 2-Hydroxypalmitinsäure verursacht, die den größten Anteil der Fettsäuren im Wollwachs ausmacht [2]. Natürlich können auch andere Isomere der Hydroxypalmitinsäure ein Signal bei der gleichen Massenzahl erzeugen, diese sind jedoch eher in kleineren Mengen vertreten.

Anhand der Molmasse kann neben der Gesamtkettenlänge auch ermittelt werden, wie viele freie OH-Gruppen an den Fettsäuren vorhanden sind bzw. wie viele Hydroxyfettsäuren zur Bildung eines Glycerinesters beteiligt waren. Hier zeigt sich sowohl im Lithium- als auch im Natrium-Adduktspektrum, dass die Ester der Fettsäuren tendenziell intensiver abgebildet werden als die Glyceride der Hydroxyfettsäuren. Dies entspricht in etwa den Mengenverhältnissen der Wollwachssäuren, bei denen die Fettsäuren mit ca. 60 % den größten Teil stellen [89, 90].

Im Massenbereich der Triglyceride zeigt sich, dass die hydroxyfettsäurehaltigen Ester tendenziell stärker vertreten sind, als bei den Mono- oder Di-

glyceriden. Dies ist auch durchaus plausibel, da die Wahrscheinlichkeit, dass mindestens eine Hydroxyfettsäure in dem Ester enthalten ist, mit der Anzahl der Fettsäuren pro Glycerin steigt.

Insgesamt zeigt sich auch das Neocerit® als sehr komplex zusammengesetzter Rohstoff. Mit Hilfe der LDI-TOF und MALDI-TOF Massenspektrometrie kann die Anwesenheit der Mono-, Di- und Triglyceride bestätigt werden. Auch kann mit dieser Methode ein Überblick über die Kettenlängenverteilungen der Ester erhalten werden.

### 4.2.7 Zusammenfassung

Die MALDI-TOF Massenspektrometrie (bzw. die LDI-TOF Massenspektrometrie) ist ein leistungsfähiges Analysenverfahren, das es erlaubt, komplex zusammengesetzte Rohstoffe wie Wollwachs und Wollwachsprodukte ohne vorangehende Fraktionierung oder Chromatographie massenspektrometrisch zu untersuchen. Dabei ist die Interpretation der vielschichtigen Spektren die eigentliche Herausforderung.

Als Ergebnis der Methodenentwicklung konnte mit der Zugabe von Lithiumsalzen zur Probe eine Methode zur Analyse der Wollwachse, der Wollwachsalkohole, der Wollwachssäuren und Neocerit® etabliert werden. Neocerit®, die Glycerylester der Wollwachssäuren, ließen sich alternativ auch sehr gut mit der Matrix 2,5-Dihydroxybenzoesäure in Form der Natriumaddukte abbilden. Wollwachssäuren konnten zusätzlich auch im Negativionenmodus abgebildet werden. Die Interpretation der Spektren bestätigte größtenteils Literaturwerte über das Wollwachs, zeigte aber auch z. B. die Anwesenheit der Wollwachs-Diester, die in der Literatur recht wenig beschrieben sind.

# 4.3 Analytik von Chitosan, Guar-HPTMA und Polyquaternium-10 nach Hydrolyse

## 4.3.1 Methodenentwicklungen

Um die Polymere auf Saccharidbasis der MALDI-TOF Massenspektrometrie zugänglich zu machen, wurde eine Methodenentwicklung durchgeführt. Es wurden verschiedene Matrices und Kationenzusätze getestet, um geeignete Bedingungen zur Analyse zu finden. Die Präparationsbedingungen und Proben sind in Kap. 7.9 aufgeführt

### Matrices

Zum Screening der Matrices wurde Präparationstechnik 2 (siehe Kap. 7.9) angewendet und die Spektrenqualität verglichen. Dabei wurde untersucht, ob überhaupt Peaks der gesuchten Spezies auftraten, und falls ja, wurde die Spektrenqualität über das Signal/Rausch Verhältnis, Auflösung und die benötigte Laserenergie verglichen.

Es wurden folgende Matrix-Substanzen getestet: 2,4-Dihydroxybenzoesäure (2,4-DHB), 2,5-Dihydroxybenzoesäure (2,5-DHB), 3-Aminochinolin (3-AC), 3-Hydroxy-$\alpha$-cyanozimtsäure (3-CCA), 4-Hydroxy-$\alpha$-cyanozimtsäure (4-CCA), 9-Anthracencarbonsäure (9-ACA), 9-Chloranthracen (9-CA), 9-Nitroanthracen (9-NA), 2-Bromo-4,6-dinitroanilin (BDNA), 5-Bromnikotinsäure (BNA), 6-Chlornikotinsäure (CNA), 5-Chlorsalicylsäure, 2,4-Dihydroxyacetophenon (DHAP), 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (THAP), Dithranol (DT), Ferulasäure (FA), Fucose, Glycerin, 2-(4'-Hydroxybenzolazo)-benzoesäure (HABA), 3-Indolacrylsäure (IAA), 5-Methoxysalicylsäure (MSA), Nikotinsäure (NIC), 2-Nitrophenyloctylether (NPO), Octylglucose (OG), 3-Hydroxypicolinsäure (PIC), 4-Nitroanilin (*p*-NA), 1,4-Bis(5-phenyl-2-oxazolyl)-benzen (POPOP), *t*-Retinolsäure (RET) und Sinapinsäure (SA).

Wie in Tab. 13 zu sehen ist, zeigen die Matrices 2,5-DHB, 4-CCA und THAP gute Eigenschaften für die MALDI-TOF Analytik von „zuckerhaltigen" Polymeren. Auffällig an den Matrixuntersuchungen ist, dass ähnliche Matrices wie z. B. 2,4-DHB und 2,5-DHB, die sich nur durch die Stellung einer Hydroxygruppe unterscheiden, stark abweichende Ergebnisse erzielen. Mit

der Matrix 2,4-DHB war kaum ein auswertbares Spektrum einer der untersuchten Substanzen zu erhalten. Lediglich das niedermolekulare Oligochitosan ließ sich damit abbilden.

**Tab. 13: Eignung der verschiedenen Matrices zur Analyse von Oligo- und Polysacchariden**

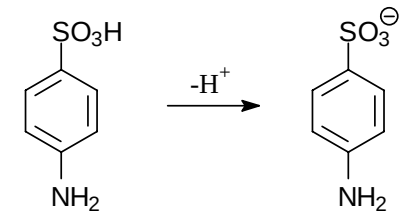
| Matrix | Chitosan Oligomer 2-6 | Chitosan 14 8 kDa | Pullulan 22 kDa | Dextran 6 kDa | Polyquat. 10 JR 120 |
|---|---|---|---|---|---|
| **2,4-DHB** | ++ | - | - | - | - |
| **2,5-DHB** | +++ | ++ | ++ | +++ | - |
| **3-AC** | - | - | - | - | - |
| **3-CCA** | ++ | + | - | ++ | - |
| **4-CCA** | ++ | + | - | +++ | - |
| **9-ACA** | - | - | - | + | - |
| **9-CA** | - | - | - | - | - |
| **9-NA** | - | - | - | - | - |
| **BDNA** | - | - | - | - | - |
| **BNA** | - | - | - | - | - |
| **CNA** | - | - | - | - | - |
| **CSA** | + | - | - | - | - |
| **DHAP** | - | - | - | + | - |
| **DT** | - | - | - | - | - |
| **FA** | + | - | - | + | - |
| **Fucose** | - | - | - | - | - |
| **Glycerin** | + | - | - | - | - |
| **HABA** | + | ++ | - | + | - |
| **IAA** | + | + | - | + | - |
| **MSA** | - | - | - | - | - |
| **NIC** | - | - | - | - | - |
| **NPO** | - | - | - | - | - |
| **OG** | - | - | - | - | - |
| **PIC** | - | - | - | - | - |
| ***p*-NA** | - | - | - | + | - |
| **POPOP** | - | - | - | - | - |
| **RET** | - | - | - | - | - |
| **SA** | - | - | - | + | - |
| **THAP** | +++ | ++ | + | + | - |

- kein Peak der gesuchten Substanz erhalten
+ schwache Peaks gerade erkennbar
++ Peaks deutlich erkennbar
+++ Peaks gut erkennbar – Matrix zur Analyse geeignet

Das Polyquaternium-10 war auf diese Weise mittels MALDI-TOF MS nicht zugänglich. Dies lässt sich wahrscheinlich mit der hohen Masse des Polymers begründen. Es ist anzunehmen, dass mit der hohen Masse auch verstärkt Quervernetzungen auftreten, die eine erfolgreiche Desorbierung und Ionisierung verhindern. Um solche Polymere wie Polyquaternium-10, Guar HPTMA oder auch hochpolymere Chitosane mit der MALDI-TOF Massenspektrometrie nachzuweisen oder zu charakterisieren, wurde eine Analyse eines salzsauren Hydrolysates durchgeführt (siehe Kapitel 4.3.2).

**Kationenzusätze und Sulfanilsäure**

Kationen können eine Ionisierung fördern, indem durch die Bildung von $[M+Kation]^+$ stabilere Ionen als z. B. $M^{\cdot+}$ gebildet werden. Umgekehrt kann ein Zusatz von Sulfanilsäure ein geeignetes Addukt für die negative ion-mode MALDI-TOF darstellen [149]. Als Ion wird hier $[M+Sulfanilsäureanion]^-$ gebildet. Zum Screening der Kationen und Sulfanilsäure wurde Präparationstechnik 2 (siehe Kap. 7.9) angewendet und die Spektrenqualität verglichen.




| Sulfanilsäure | Anion |
|---|---|
| $C_6H_7NO_3S$ | $C_6H_6NO_3S$ |
| 173.014664 | 172.006839 |

**Abb. 61. Sulfanilsäure.**

Bevor die Probe auf den Matrix-Kristallteppich pipettiert wurde, wurden 0.5 µL einer 0.1%igen Lösung des Kations (in Wasser) bzw. der Sulfanilsäure auf die Oberfläche pipettiert und trocknen gelassen. Dadurch war das gewünschte Kation bzw. Sulfanilsäure im Überschuss vorhanden. Es wurden nur noch die Matrices DHB, CCA und THAP getestet, da alle übrigen Matrices keine genügende Eignung aufwiesen.

**Tab. 14: Eignung der verschiedenen Kationen und Anionen**

| | Chitosan C14, 8.6 kDa Matrices: | | | Pullulan 22 kDa Matrices: | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Gegenion** | **DHB** | **4-CCA** | **THAP** | **DHB** | **4-CCA** | **THAP** |
| $Na^+$ | ++ | - | + | ++ | - | + |
| $K^+$ | + | + | + | ++ | - | + |
| $Li^+$ | + | - | - | ++ | - | + |
| $Cu^{2+}$ | - | - | - | - | - | - |
| $Ag^+$ | - | - | - | - | - | - |
| $Pd^+$ | - | - | - | - | - | - |
| $Pb^{2+}$ | - | - | - | - | - | - |
| $Zn^+$ | - | - | - | - | - | - |
| $Fe^{3+}$ | - | - | - | - | - | - |
| $Cs^+$ | - | - | - | - | - | - |
| $Au^+$ | - | - | - | - | - | - |
| Sulfanilsäure. | + | + | - | + | - | - |

- kein Peak der gesuchten Substanz erhalten
\+ schwache Peaks gerade erkennbar
++ Peaks deutlich erkennbar
+++ Peaks gut erkennbar – Bedingungen erlauben auswertbare Spektren

Die Kationen Natrium, Kalium und Lithium und das Anion der Sulfanilsäure zeigten als einzige ein positives Ergebnis. Nur hier waren Signale mit der Molmasse $[M+Kation]^+$ bzw. $[M+Sulfanilsäureanion]^-$ zu erkennen. Bei letzterer war das Signal jedoch – wenn überhaupt vorhanden – so schwach, dass diese Idee nicht mehr weiter verfolgt wurde. Im Folgenden wurde sich daher nur noch auf die Matrices THAP und DHB sowie die Kationen $Na^+$, $K^+$ und $Li^+$ konzentriert.

### Präparationstechnik

Um die am besten geeignete Präparationstechnik herauszufinden, wurde stellvertretend die Substanz Oligochitosan mit den unterschiedlichen Techniken präpariert. Als Matrix wurden THAP und DHB verwendet, als Kationen $Na^+$, $Li^+$ und $K^+$.

Insgesamt bestätigt sich hier, dass Natrium als Kationen-Zusatz die Ionisierung erleichtern kann. Mit Kalium und Lithium konnten zwar auch Oligochitosan-Peaks als $[M+K]^+$ bzw. $[M+Li]^+$ detektiert werden, jedoch war die Empfindlichkeit und die Reproduzierbarkeit nicht so gut wie bei Natrium.

**Tab. 15: Vergleich der versch. Präparationstechniken**

| | | Oligochitosan | |
|---|---|---|---|
| | **Kation** | **DHB** | **THAP** |
| Präp. 1 | Na: | +++[1] | +++ |
| | K: | + | + |
| | Li: | + | + |
| Präp. 2 | Na: | +++[2] | +++ |
| | K: | - | + |
| | Li: | +[2] | + |
| Präp. 3 | Na: | + | ++ |
| | K: | - | + |
| | Li: | + | + |

[1] Matrixpeaks von DHB Addukten treten verstärkt im Spektrum auf
[2] Suche nach Sweet Spots schwierig
\- kein Peak der gesuchten Substanz erhalten
\+ schwache Peaks gerade erkennbar
++ Peaks deutlich erkennbar
+++ Peaks gut erkennbar – Bedingungen erlauben auswertbare Spektren

Die „klassische“ Präparationstechnik Nr. 3, also das Mischen von Matrix- und Probenlösung vor der Aufgabe auf den Probenteller, hat sich für diese Proben als weniger geeignet erwiesen. Obwohl man hier eigentlich eine homogene Verteilung von Matrix und Analyt erwarten würde, führt die Präparation nicht zu dem gewünschten Ergebnis. Dagegen konnten mit Technik 1 und 2 gute Ergebnisse erzielt werden. Wie schon in Kap. 4.1.1 vermutet, kann das gemeinsame Auskristallisieren von Matrix und Probe (bzw. von zwei Stoffen mit unterschiedlichen Löslichkeiten in dem Lösemittel) unter Umständen zu einer Art Umkristallisation und somit eher zu einer inhomogeneren Verteilung der Bestandteile führen.

Überraschenderweise brachte auch ein Rekristallisieren von unregelmäßig kristallisierten Präparationen auf dem Probenteller nicht immer eine Verbesserung der Spektren, obwohl der dadurch gebildete Kristallteppich meist sehr viel gleichmäßiger war. Dies kann daran liegen, dass die Bestandteile von Matrix und Probe unterschiedlich gut wieder angelöst und somit inhomogener verteilt wurden.

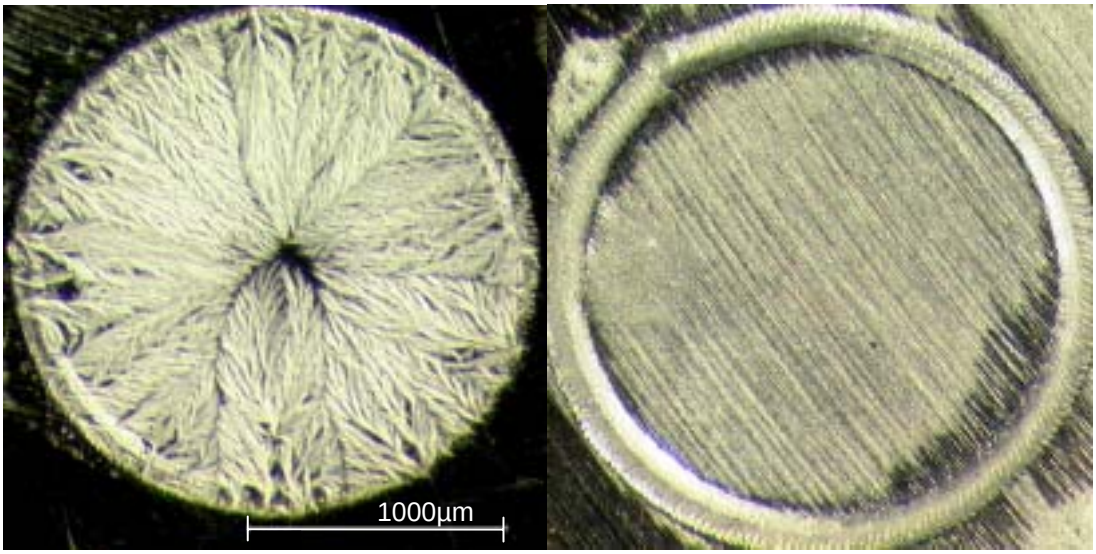



**Abb. 62: Chitosan-Präparation mit Matrix TMAH auf dem MALDI Probenteller. Links ohne Rekristallisation, rechts nach Rekristallisation in Methanol.**

Häufig lassen sich auf der dicken Kristallschicht, die sich nach Probenpräparation 1 bildet (siehe Abb. 62 links), besser Spektren aufnehmen. In jedem Falle (Technik 1 oder 2) sollten mehrere Probenspots präpariert und gemessen werden, um einen repräsentativen Eindruck von der Probe zu bekommen.

Das vollständig deacetylierte Oligochitosan 2-6 (siehe Abb. 63) ist in hoher Reinheit kommerziell erhältlich. Es lässt sich unter den hier beschriebenen Analysenbedingungen mit einem guten Signal-zu-Rauschen Verhältnis und hoher Intensität abbilden. Die quantitative Zusammensetzung der einzelnen Oligomere in der Probe ist nicht bekannt. Die Reproduzierbarkeit der Spektren lässt auch keine quantitative Beschreibung der Verteilung zu. Je nach verwendeter Technik und Matrix (THAP oder DHB) ist das Verhältnis der Peaks zueinander leicht abweichend. Dies lässt auch eine Diskriminierung von Massenbereichen bei der MALDI-TOF Analyse von Chitosanen vermuten.

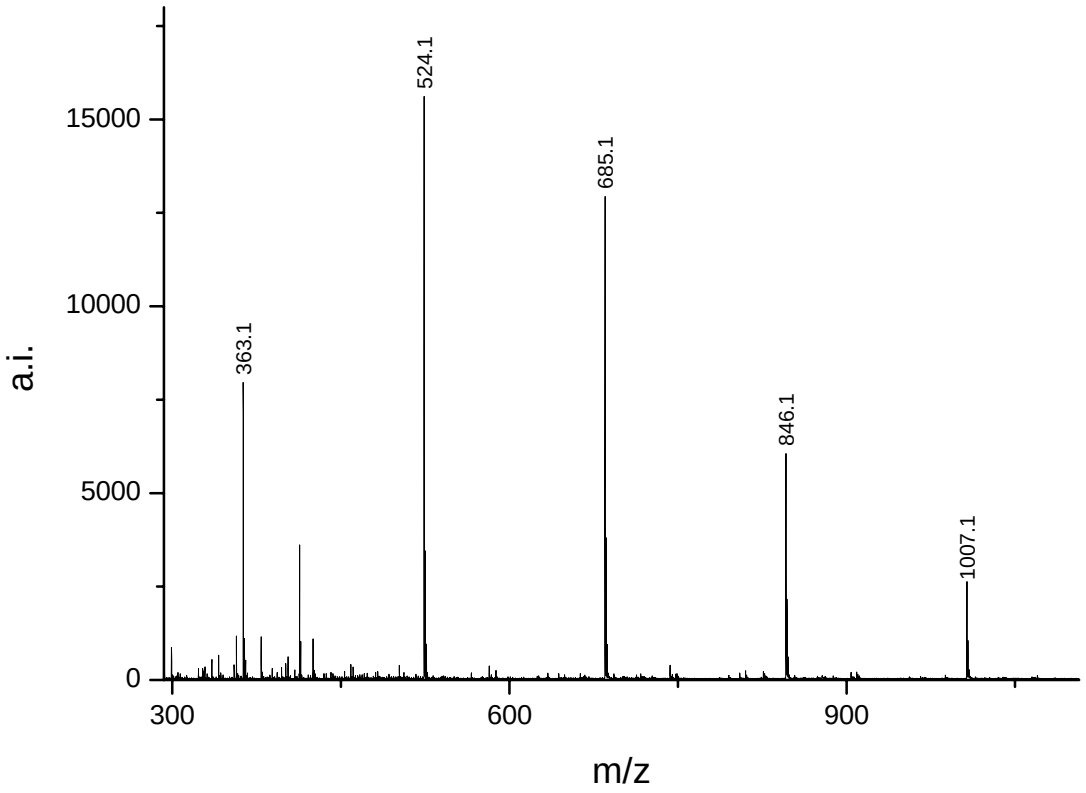



**Abb. 63: Oligochitosan 2-6 mit THAP als Matrix und Präparationstechnik 1. Alle Peaks sind $[M+Na]^+$.**

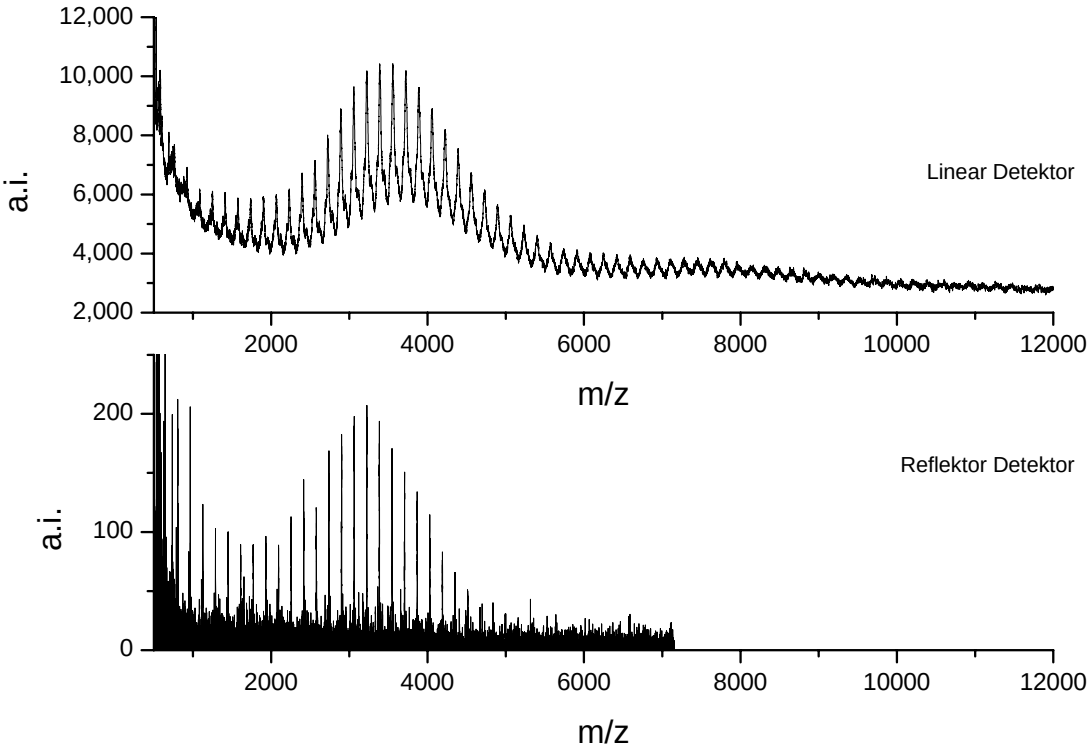



**Abb. 64: MALDI-TOF Spektrum von Chitosan A mit 8.6 kDa (GPC).**

Chitosan A (Referenzmasse über GPC = 8.6 kDa [150]) wurde im Linear- und im Reflektormodus gemessen (siehe Abb. 64). Vergleicht man beide Spektren miteinander, so werden Unterschiede deutlich: Im Linearmodus lassen sich zwei Verteilungen erkennen, von denen im Reflektormodus nur die niedermolekulare zu sehen ist. Dies mag daran liegen, dass größere Molmassen bedingt durch das bauliche Prinzip des Reflektormodus stärker unterdrückt werden als im Linearmodus. Bei der gelpermationschromatographischen Untersuchung zeigte sich ebenfalls eine Schulter bei 9700 Da am 5000 Da Hauptpeak, die darauf hindeutet, dass es sich dabei um zwei Verteilungen handelt [150]. Beide Maxima weisen bei der MALDI-TOF MS eine zu kleine Masse auf. Dies stimmt auch mit der Literatur überein, nach der vor allem bei breiten Verteilungen (PD größer als 1.2) starke Massendiskriminierungen auftreten können [133-136, 139, 151]. Insgesamt wird durch diese Untersuchung deutlich, dass die mittels MALDI-TOF MS ermittelten Massen der Chitosane je nach Analysenbedingung einer mehr oder minder starken Diskriminierung unterliegen und die ermittelten Molmassen keinesfalls die Realität widerspiegeln müssen.

In Abb. 65 ist ein MALDI-TOF Massenspektrum von Pullulan mit der Referenzmasse 2,9 kDa zu sehen.

Diese Substanz bringt aufgrund der großen Monomermasse (Maltotriose, 486 g/mol) gute Eigenschaften als Kalibriersubstanz mit. Ein großer Massenbereich wird abgedeckt und im Gegensatz zu Polyethylenglycol (PEG) ist beim Kalibriervorgang die Gefahr einer "Verwechselung" der einzelnen Oligomere nicht so leicht gegeben, falls das MALDI-TOF Massenspektrometer vollständig neu kalibriert werden muss.

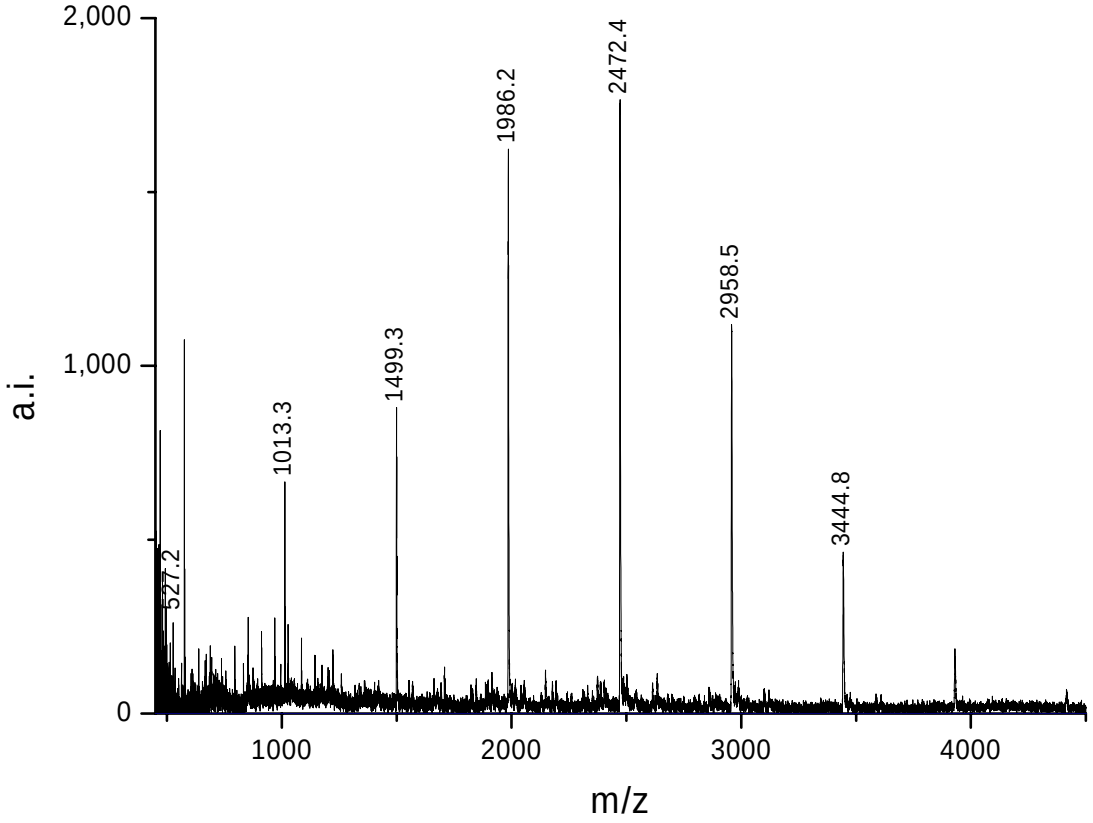



**Abb. 65: Pullulan 2,9 kDa, alle Peaks sind $[M+Na]^+$.**

### 4.3.2 Analyse von Chitosan, Guar-HPTMA und Polyquaternium-10 nach Hydrolyse

Um hochmolekulare Substanzen wie Polyquaternium-10 oder Guar-HPTMA sowie Chitosan für die MALDI-TOF MS und die HPLC-ESI/MS zugänglich zu machen, wurden die Standards einer sauren Hydrolyse unterworfen. Dadurch entstehen Oligomere, die mit der MALDI-TOF MS erfasst werden können. Die Hydrolyse und Untersuchung von Guar-HPTMA und Polyquaternium-10 wurde zusammen mit Jan Ungewiß durchgeführt, der die Hydrolysate mittels LC-MS untersucht hat [152].

Um die optimalen MALDI-TOF Bedingungen zur Analyse der Hydrolysate zu ermitteln, wurden nun die für Kohlenhydrate geeigneten Matrices CCA, DHB und THAP und mit den Kationen $H^+$, $Na^+$, $K^+$, $Cu^{2+}$, $Li^+$ und $Cs^+$ getestet. Die genauen Hydrolyse- und Präparationsbedingungen sind in Kap. 7.10 aufgeführt.

**Tab. 16: Vergleich der versch. Präparationstechniken. Die Matrices 4-Hydroxy-α-cyanozimtsäure (CCA) und 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) haben sich als geeignet gezeigt. Durch einen Zusatz von $H^+$-Ionentauscher ist es möglich, die quartären Ammoniumverbindungen verbessert abzubilden**

| Kation | Matrix | Polyquat 10 Lymer 12 | Polyquat 10 Lymer 40R | Guar, Jaguar 250 kDa | Guar, Cosmedia 1300 kDa |
|---|---|---|---|---|---|
| $H^+$ | CCA | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | DHB | ++ | ++ | + | + |
| | THAP | - | - | - | - |
| $Na^+$ | CCA | ++[1] | ++[1] | ++[1] | ++[1] |
| | DHB | ++[1] | ++[1] | ++[1] | ++[1] |
| | THAP | - | - | - | - |
| $K^+$ | CCA | + | + | + | + |
| | DHB | + | + | + | + |
| | THAP | - | - | - | - |
| $Li^+$ | CCA | + | + | + | + |
| | DHB | + | + | + | + |
| | THAP | - | - | - | - |
| $Cu^+$ | CCA | + | + | + | + |
| | DHB | + | + | + | + |
| | THAP | - | - | - | - |
| $Cs^+$ | CCA | +++[1] | +++[1] | ++[1] | ++[1] |
| | DHB | ++[1] | ++[1] | ++[1] | ++[1] |
| | THAP | - | - | - | - |

[1] auch verstärkt Matrix-Peaks vorhanden
\- kein Peak der gesuchten Substanz erhalten
\+ schwache Peaks gerade erkennbar
++ Peaks deutlich erkennbar
+++ Peaks gut erkennbar – Bedingungen erlauben auswertbare Spektren des Hydrolysates

Als optimale Bedingungen für die Hydrolysate hat sich die Kombination von CCA in Verbindung mit $H^+$-Ionentauscher ergeben. Durch die Reduzierung anwesender $Na^+$ oder $K^+$-Ionen sind die quartären Ammoniumverbindungen optimal erkennbar. Ethoxylierte Glucose-Moleküle (ohne quartäre Ammoniumgruppe) werden dabei allerdings unterdrückt. Dies ist in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von *H. Bartsch*, der festgestellt hatte, dass quartäre Ammoniumverbindungen PEG und andere Bestandteile bei der MALDI-TOF Massenspektrometrie unterdrücken können [100]. Will man diese besser erkennen oder herausstellen, so ist ein Zusatz von $Na^+$ oder $Cs^+$ Ionen zu empfehlen, um Kationen-Addukte der ethoxylierten Glucose-Moleküle zu fördern. Der Einfachheit halber kann in diesem Falle auch ein Natrium-Ionentauscher verwendet werden. Durch die

Verwendung von Natrium- oder anderen Kationen können aber auch Matrix-Peaks vermehrt auftreten, die ebenfalls bevorzugt als Natriumaddukte ionisiert werden.

Überraschenderweise war die Matrix THAP nicht in der Lage, hier auswertbare und reproduzierbare Spektren zu liefern, obwohl sich diese zur Analyse von z. B. niedermolekulareren Chitosanen und anderen Oligosacchariden als geeignet erwiesen hat (s. Kap. 4.3.1). Mit den gängigen Matrices DHB und CCA konnten aber gute Ergebnisse erzielt werden (siehe Tab. 16).

In Abb. 66 sind MALDI-Spektren der Hydrolysate von Polyquaternium-10 mit einer Masse von ca. 400 kDa (Angabe des Herstellers) zu sehen. Nach zwei Stunden Hydrolyse sind bereits Oligomere nachweisbar. Diese bestehen aus ein bis fünf Glucose-Einheiten, einer HPTMA-Seitenkette und sind ethoxyliert. Die einzelnen Peaks der Oligomer-Verteilungen besitzen einen Massenabstand von 44 Da zueinander, was einer Ethylenoxid-Gruppe entspricht ($-C_2H_4O-$). Mit fortschreitender Hydrolysedauer werden auch die Oligomere gespalten, bis nur noch ethoxylierte Monoglucose-HPTMA zu erkennen ist.

Es sind auch Peaks vorhanden, die auf eine Anwesenheit des Hydroxypropyl-trimethylammoniumions ($M^+$ bei 118 m/z sowie $[M-H_2O]^+$ bei 100 m/z) schließen lassen. Damit kann eine weitere Spaltung der Oligomere in reine Zuckeroligomere und HPTMA nicht ausgeschlossen werden. Die Zuckeroligomere sind dann aber aufgrund der Unterdrückung neben den quartären Ammoniumverbindungen mit der MALDI-TOF MS nicht oder nur sehr schwierig nachweisbar.

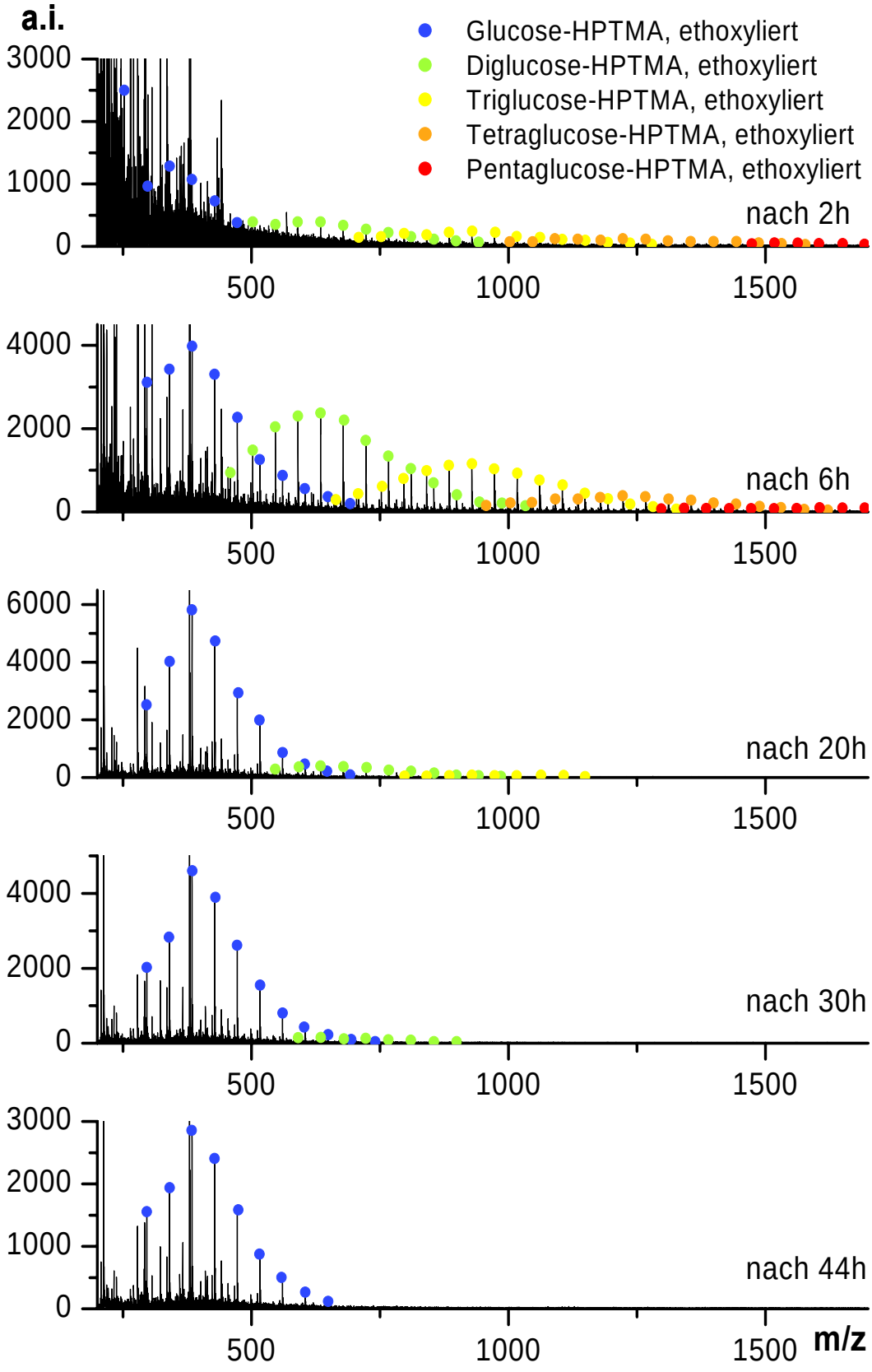



**Abb. 66: MALDI-TOF Massenspektren von Polyquaternium-10 (M=400 kDa) nach Hydrolyse. Abhängig von der Reaktionsdauer wird das Polymer bis hin zum Glucose-HPTMA Monomer hydrolysiert.**

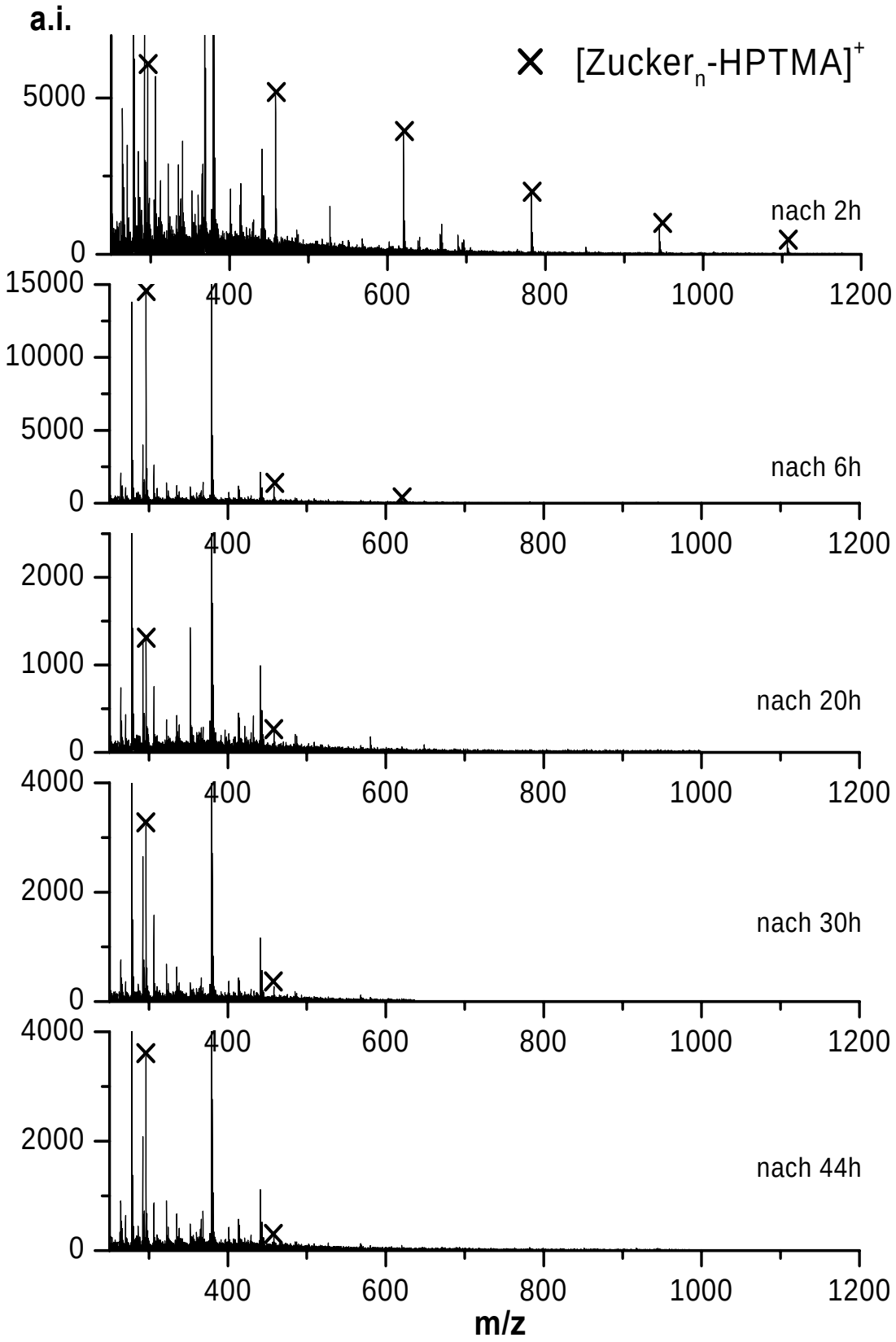



**Abb. 67: MALDI-TOF Massenspektren Guar-HPTMA (M= 1300 kDa) nach Hydrolyse. Bereits nach sechs Stunden Hydrolysedauer ist fast nur noch das Monomer (m/z 296) vorhanden.**

**Guar-HPTMA** besteht aus einem Galactose-Mannose-Grundkörper, der mit Propylenoxid-trimethylammoniumchlorid verethert ist. In Abb. 67 sind die MALDI-TOF Spektren der Hydrolyse von Guar-HPTMA mit einer Molmasse von 1300 kDa abgebildet. Im Gegensatz zum Polyquaternium-10 ist dieses nicht ethoxyliert, so dass lediglich die Oligohexose-HPTMA Verteilung zu erkennen ist. Es kann dabei nicht angegeben werden, ob es sich bei den Zuckern um die massengleichen Isomere Galactose oder Mannose handelt.

Bereits nach zwei Stunden sind eine Reihe von Oligomeren nachweisbar, die sich im weiteren Verlauf der Hydrolyse fast vollständig in Mono-Hexose-HPTMA (mit $M^+$=296 m/z) spalten. Auch hier ist wieder das Hydroxypropyltrimethylammoniumion nachweisbar.

**Oligochitosan B und Chitosan C (40 kDa):**

Abb. 68 zeigt die MALDI-TOF Spektren nach Hydrolyse von Chitosan C mit einer angegebenen Molmasse von 40 kDa. Bei Beginn der Hydrolyse (Zeitpunkt 0 Stunden) konnten keine Oligomere detektiert werden. Erst nach vier Stunden Hydrolysedauer waren Chitosan-Oligomere detektierbar. Durch die charakteristische Monomermasse von 161 Da lassen sich diese leicht identifizieren.

Die Intensität der Chitosanpeaks ist noch gering, erst im weiteren Verlauf der Hydrolyse nahm sie im Vergleich zu der Intensität der Matrixsignale zu, die das Spektrum bis dahin dominieren. Dies zeigt, das die Hydrolyse das hochmolekulare Chitosan in kleinere Oligomere spalten kann, die sich anschließend mittels MALDI-TOF MS darstellen lassen.

Weiterhin ist zu erkennen, dass der Acetylierungsgrad sich auch mit der Hydrolyse verändert. Nach vier Stunden Hydrolysedauer sind noch Oligomere mit drei N-Acetylgruppen gut zu detektieren. Diese nehmen immer weiter ab, so dass nach 32 Stunden Hydrolyse nur noch das vollständig deacetylierte Oligochitosan vorliegt. Schließlich fällt noch auf, dass das Hexamer mit m/z 1007 (als $[M+Na]^+$) anscheinend bevorzugt bei der Hydrolyse anfällt. Dies ist bei den Spektren von Oligochitosan B (siehe Abb. 69) nicht der Fall. Hier scheint eher das Trimer mit m/z 524 bevorzugt.

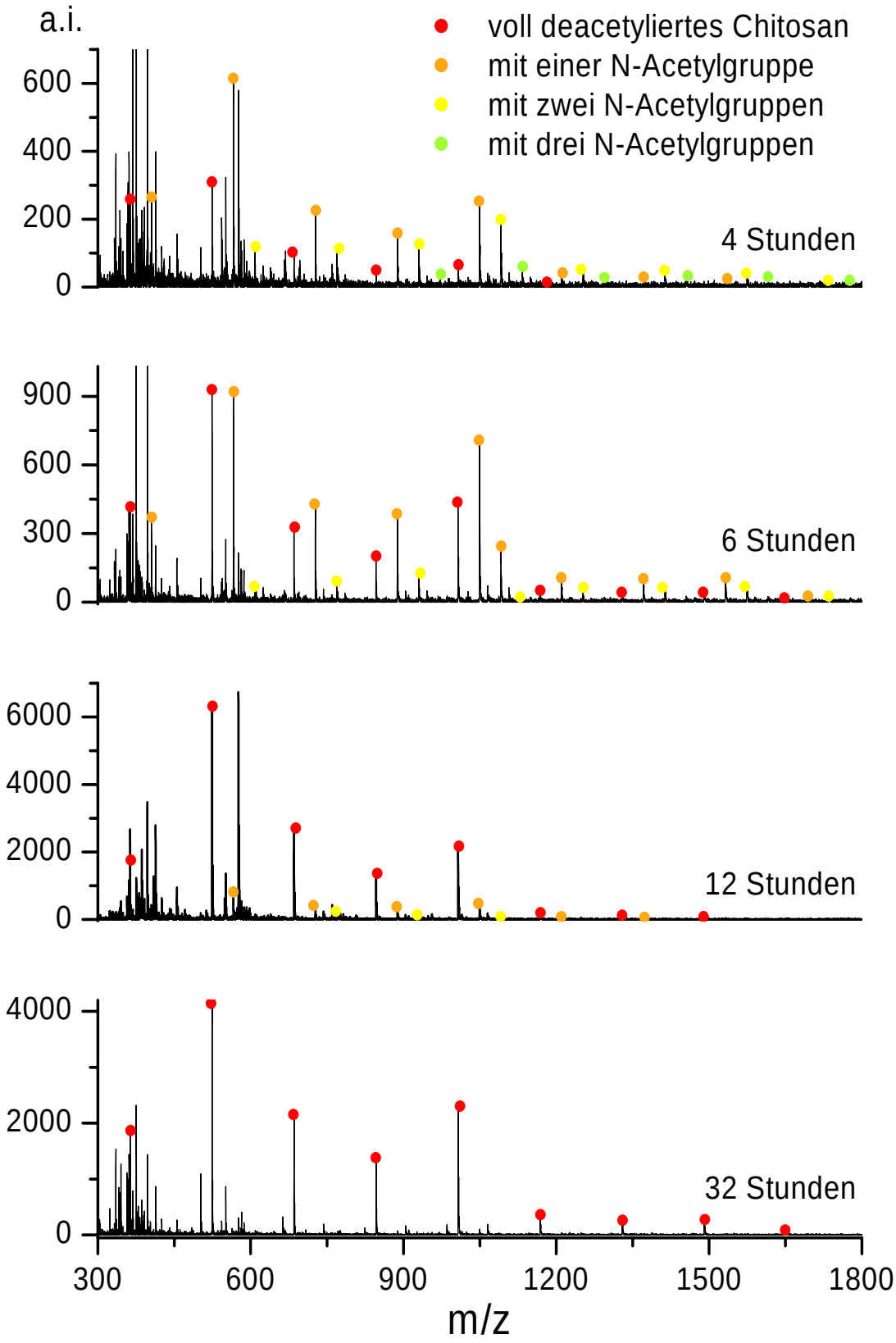



**Abb. 68: Hydrolyse von Chitosan C (40 kDa). Durch die Hydrolyse wird auch der Deacetylierungsgrad beeinflusst. Nach 32 Stunden Hydrolyse ist ausschließlich vollständig deacetyliertes Chitosan nachweisbar.**

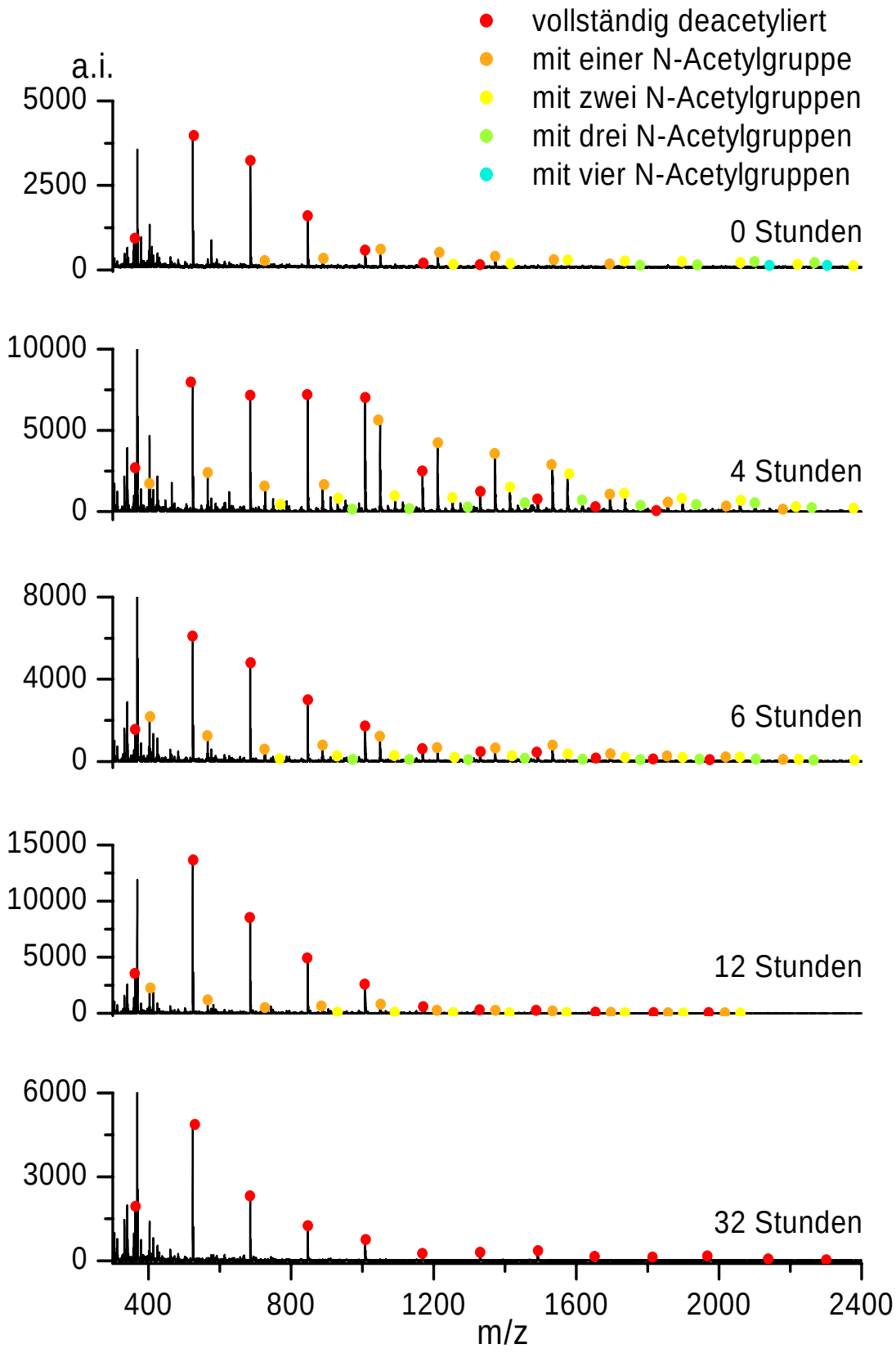



**Abb. 69: Hydrolyse von Oligochitosan B.**

Weiterhin sind bei dem niedermolekularen Oligochitosan B schon vor Beginn der Hydrolyse (Zeitpunkt 0 Stunden) Chitosanpeaks zu erkennen. Es lassen sich Peaks des vollständig deacetylierten Chitosans identifizieren sowie die von Chitosanmolekülen mit einer, zwei, drei oder sogar vier N-Acetylgruppen. Außerdem wird angenommen, dass die höhermolekularen Chitosan-Moleküle, deren Hydrolyse eine Zunahme der niedermolekularen Moleküle verursachen, in der MALDI-TOF Analyse unterdrückt werden. Dieser Diskriminierungseffekt ist bereits bei dem Chitosan A mit 8 kDa aufgefallen (s. o.).

Auch bei dieser Probe nimmt der Anteil an N-Aceetylgruppen mit steigender Hydrolysedauer ab. Nach 32 Stunden ist nur noch vollständig deacetyliertes Chitosan zu erkennen.

### 4.3.3 Zusammenfassung

Insgesamt hat sich gezeigt, dass verschiedene Oligosaccharide mit der MALDI-TOF Massenspektrometrie abgebildet werden können. Die Präparationsbedingungen müssen dabei genau eingehalten werden. Die Reproduzierbarkeit der Spektren ist – verglichen mit anderen MALDI-TOF Methoden – nicht sehr gut.

Einfache Oligosaccharide wie Dextrane und Pullulane sind recht gut und mit einem Massenbereich bis über 20 kDa darstellbar. Bei Chitosanen hingegen konnten keine Proben mit Molmassen höher 10 kDa abgebildet werden. Solche Proben konnten nur nach vorhergehender Hydrolyse mittels MALDI-TOF untersucht werden. Gleiches gilt auch für Polyquaternium-10 und Guar-HPTMA, die Molmassen bis über 1.000 kDa aufweisen können. Durch die Hydrolyse konnten die verschiedenen Abbauprodukte im Verlauf des Hydrolyseprozesses abgebildet und der Hydrolyseverlauf somit „verfolgt“ werden. Dies ermöglicht z. B. die Auswahl geeigneter Hydrolysebedingungen für weitere analytische Schritte (z. B. LC/MS).

Die beiden charakteristischen Merkmale des Chitosans sind vor allem die Molmasse und der Deacetylierungsgrad. Die Molmasse hat einen wesentlichen Einfluss auf die Viskosität der hergestellten Lösungen und ist damit ausschlaggebend für den Anwendungszweck. Als Referenzmethode wird im

Allgemeinen die Gelpermeationschromatographie (GPC) verwendet. Mit der MALDI-TOF Massenspektrometrie war es leider nicht möglich Chitosane mit einer Molmasse von mehr als 10 kDa spektrometrisch zu erfassen. Damit kommt die Methode für viele Chitosane nicht in Frage, deren Molmasse häufig größer als 250 kDa ist. Berücksichtigt man nun noch das mögliche Auftreten von Diskriminierungseffekten, so ist eine Bestimmung der mittleren Molmasse auch für Chitosane mit Massen kleiner 10 kDa nur mit Vorsicht durchzuführen. In diesem Fall ist die GPC aufgrund ihrer höheren Reproduzierbarkeit – geeignete Säulen und Kalibriersubstanzen vorausgesetzt – besser zu Massenbestimmung geeignet.

Der Deacetylierungsgrad lässt sich titrimetrisch erfassen [96]. Damit wird der Gesamtgehalt an nicht deacetylierten Gruppen erfasst. Im Gegensatz dazu kann bei der MALDI-TOF Massenspektrometrie auch noch zwischen den einzelnen Graden der Deacetylierung unterschieden werden. Jedoch hat die Untersuchung der Hydrolyseprodukte des Chitosans gezeigt, dass die Hydrolyse den Deacetylierungsgrad verändert und somit verfälscht. Eine Bewertung des Deacetylierungsgrades von hydrolysierten Chitosanen ist daher schwierig. Eine vergleichende Untersuchung nach identischen Hydrolysebedingen scheint aber möglich. Bei Oligochitosanen mit einer Molmasse bis etwa 10 kDa ist eine Analyse ohne vorangehende Hydrolyse möglich. In diesem Falle sollte die vergleichende Analyse von Chitosanen in Bezug auf den Deacetylierungsgrad möglich sein.

# 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine LDI-TOF Massenspektrometrie Methode entwickelt, um unpolare kosmetische Rohstoffe wie Paraffinöle, mikrokristalline Wachse und Vaseline zu charakterisieren. Durch systematische Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Qualität der Massenspektren durch keine von 29 geprüften Matrixsubstanzen verbessert werden konnte und ausschließlich LDI-TOF mit einem Silbersalz als kationischer Zusatz qualitativ hochwertige Massenspektren der Rohstoffe ermöglicht. Die ermittelten Ergebnisse legen zudem nahe, dass Probenmolekül-Silber-Cluster als Vorläufer der gemessenen Ionen wahrscheinlich sind.

Für die Probenvorbereitung wurde eine lösemittelfreie Präparationstechnik entwickelt, die qualitativ hochwertige Massenspektren der Paraffine ermöglicht. Sie vermeidet das Auftreten des Marangoni-Effektes, der für die klassische, lösemittelbasierte Präparationstechnik nachgewiesen werden konnte. Die Massenspektren erlauben nicht nur einen Vergleich von Molmassenbereichen der Proben, sondern bieten auch einen Eindruck über die Verteilung der verschiedenen Cycloalkane, die in Paraffinölen und Vaseline enthalten sind.

Es wurde ein Auswerteverfahren mit Hilfe einer Hauptkomponentenanalyse entwickelt, welches einen reproduzierbaren Vergleich der Massenspektren von Paraffinölen und Vaselineproben ermöglicht. Damit ist es möglich, auch feine Unterschiede zwischen einzelnen Mustern von Paraffinölen zu erfassen und abzubilden. Für Chargen- oder Lieferantenvergleiche, die in einem kommerziellen Umfeld häufig benötigt werden, steht somit eine schnell durchführbare Methode zur Verfügung, die einen umfassenden Eindruck über die Art der Proben vermitteln kann.

Der Vergleich der LDI-TOF Methode mit anderen Analysenverfahren wie der NMR-Spektroskopie und FD- und FI-MS ermöglichte eine Überprüfung der Ergebnisse und ein weiteres Vertiefen des Kenntnisstandes über Paraffinöle, mikrokristalline Wachse und Vaselineproben.

Mit weiteren systematischen Methodenentwicklungen war es möglich, Wollwachs, Wollwachsalkohole, Wollwachssäuren und Glycerin Lanolate mit-

tels MALDI-TOF Massenspektrometrie abzubilden. Dadurch war die simultane Abbildung von Substanzklassen wie der Ester, Alkohole, Diole, Säuren, Hydroxysäuren und Glycerinester möglich, ohne vorher eine chromatographische Trennung vornehmen zu müssen. Aufgrund der z. T. auftretenden Überlagerungen von Substanzen mit gleicher Molmasse kann sich die Interpretation der Spektren schwierig darstellen. Tenside, die von der Wollwäsche im Wollwachs verblieben sind, lassen sich sehr gut nachweisen. Die Methode ermöglicht somit z. B. ein Prüfen auf unerwünschte Tenside wie z. B. Nonylphenol Ethoxylate.

Weiterhin wurde die MALDI-TOF Massenspektrometrie eingesetzt um niedermolekulare Chitosane abzubilden. Höhermolekulare Chitosane, Polyquaternium-10 und Guar Hydroxypropyl-trimethylammonium Chlorid ließen sich trotz systematischer Methodenentwicklung nicht mittels MALDI-TOF MS abbilden. Dies liegt wahrscheinlich an dem hohen Verzweigungsgrad sowie den extrem großen molaren Massen, die über 1000 kDa betragen können. Es wurde aber eine salzsaure, hydrolytische Spaltung dieser Proben mit der MALDI-TOF Massenspektrometrie verfolgt, wodurch der Verlauf der Hydrolyse abgebildet werden konnte.

# 6 Summary

In the current study a new laser-*desorption ionization time-of*-flight mass spectrometry (LDI-TOF MS) method for the analysis of non-polar raw materials like mineral oils, microcrystalline waxes and Vaseline was developed. Systematic investigations revealed that none of 29 matrix substances tested enhanced spectral quality. Only LDI-TOF MS using silver as a cationization reagent was able to produce high quality mass spectra of the samples. However, the results suggest that analyte-silver clusters are probably precursors of the observed ions.

A solvent-free sample preparation was developed which enables the acquisition of high quality mass spectra of paraffin raw materials. The technique also prevents the occurrence of the Marangoni effect, which could be demonstrated for the “classical” solvent-based sample preparation. The mass spectra not only give an overview of the average molecular mass of a sample but also show distributions of cycloalkanes often contained in mineral oil samples.

Additionally, an evaluation procedure using *principal component analysis* (PCA) was developed. This allows reproducible comparison of mineral oil and Vaseline mass spectra. Slight differences between samples could be detected and depicted. Hence, the new method provides a fast and versatile tool for the comparison of many batches or samples from different supplier companies. It can help avoid time-consuming and expensive batch tests, which would otherwise be required.

*Nuclear magnetic resonance* (NMR) spectroscopy, *field-desorption-mass spectrometry* (FD-MS) and *field-ionization-mass spectrometry* (FI-MS) of the mineral oil, microcrystalline wax and Vaseline samples were carried out for comparison with and affirmation of the LDI-TOF MS results and to deepen the knowledge of these raw materials.

Furthermore, systematic development of methods for wool wax, wool wax acids, wool wax alcohols and glyceryl lanolate made it possible to obtain MALDI-TOF mass spectra of these complex samples. Thus, they could be analyzed without a prior separation step for instance by gas chromatography.

Esters, alcohols, diols, acids, hydroxy-acids and glycerol esters of the wool wax acids could be distinguished by mass, although superimposition of peaks from different substances with the same molecular mass can make the interpretation of spectra difficult. The MALDI-TOF method allows sensitive detection of surfactants remaining in the wool wax from the wool washing process. This is especially useful for checking for unwanted or prohibited surfactants like alkyl phenol ethoxylates (APEO).

In addition the analysis of polyquaternium-10, guar hydroxypropyl-trimethylammonium chloride and chitosane by means of MALDI-TOF mass spectrometry is described. Despite extensive method development it was not possible to obtain MALDI-TOF mass spectra of the untreated samples due to their extremely high molecular masses, which can be over 1000 kDa, and the fact that these raw materials are usually highly branched.

After treating these samples with hydrochloric acid, their hydrolysis can be followed with MALDI-TOF, making it possible to monitor the characteristics of the hydrolysis process.

# 7 Experimenteller Teil

## 7.1 MALDI-TOF Massenspektrometer

Im Folgenden werden die einzelnen Elemente des Bruker Biflex MALDI-TOF Massenspektrometers aufgeführt.

**Tab. 17. Geräteparameter MALDI-TOF Massenspektrometrie**

| | |
|---|---|
| **Laser** | **OEM VSL 337i, Laser Science Inc., MA, USA** |
| Wellenlänge | 337 nm ($N_2$ Laser) |
| Puls | 3 ns Länge, max. 200 µJ Pulsenergie |
| | |
| **Ionenquelle** | ***Scout 26*, Bruker Daltonics, Bremen** |
| Delayed Extraction | *Pulsed Ion Extraction* (PIE) [153] |
| Aufbau | Probenteller für 26 Proben, mittels x,y-Motorik bewegbar, Beobachtungsoptik mittels CCD-Kamera und Monitor |
| | |
| **Flugrohr** | polierter VA-Stahl, eff. Fluglänge 1.70 m (Reflektormodus) |
| **Turbopumpe** | TPU 240, Pfeiffer-Balzers, Aßlar |
| **Drehschieberpumpen** | EZM 1.5, Edwards, Marburg |
| | |
| **Reflektor** | Reflektor Biflex, Bruker, Bremen |
| Aufbau | zweistufig, gitterlos, max. Spannung 20 kV |
| | |
| **Detektor (Reflektor)** | AF820, ETP LTD., Australien, SEV, max. 2 kV |
| **Detektor (Linear)** | HiMass, Bruker, Bremen, Konversionsdynode, Channel Plate mit anschl. Photomultiplier; max. 1 kV (Photomult.) bzw. 10 kV (high-mass Betrieb) |
| | |
| **Digitizer** | Bruker, 1 GHz max. Samplefrequenz |

## 7.2 LDI-TOF MS von Paraffinen und Wachsen

### 7.2.1 Testen von 29 Matrices

Für den Matrix-Test in Kap. 4.1.1 wurden unter folgenden Analysenbedingungen gearbeitet:

Sämtliche Matrixsubstanzen wurden, soweit möglich, zu 10.0 mg/mL in THF gelöst. Glycerin wurde zu 5.0 mg/mL in 2-Propanol/THF (50/50; v/v), Anthracen und POPOP wurden zu 10.0 mg/mL bzw. 5.0 mg/mL in Chloroform gelöst. 3-Hydroxypicolinsäure und Fucose wurden zu 10.0 mg/mL bzw. 5.0 mg/mL in Methanol/THF (50/50; v/v) gelöst.

**Herstellung des Alkan-Mischstandards**

Alkanstandards der Kettenlängen $C_{20}$, $C_{22}$, $C_{24}$, $C_{26}$, $C_{28}$, $C_{30}$, $C_{32}$, $C_{34}$ und $C_{36}$ wurden zu 10 mmol/L, $C_{38}$ zu 5 mmol/L und $C_{40}$ zu 3 mmol/L in Chloroform gelöst. Von diesen Lösungen wurden entsprechende Volumina zusammen pipettiert, so dass eine äquimolare Standardlösung mit 0.61 mmol/L je Standard erhalten wurde.

Für die Präparation wurden 10 µL der Probenlösung mit 10 µL der AgTFA-Lösung (1 mg/mL in THF) und 50 µL einer Matrixlösung in einem Eppendorf-Vial gemischt. Um den Einfluss der Matrix besser abschätzen zu können, wurden die Matrix-Lösungen durch das Zusammenpipettieren der 10.0 mg/mL (bzw. 5 mg/mL) Matrixlösungen und THF im Eppendorf-Vial verdünnt. Die auf diese Art erzeugten Matrix-Lösungen wiesen Konzentrationen von 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 und 10 mg/mL auf (bei der höchsten Konzentration handelt es sich um die unverdünnte Matrix-Lösung. Bei Glycerin, POPOP und Fucose wurde 5.0 mg/mL als höchste Konzentration getestet. Nach gutem Durchmischen der Lösungen auf dem Schüttler wurden 0.5-1.0 µL auf den Probenteller aufgetragen.

### 7.2.2 Optimierung des Silber/Proben-Verhältnisses:

Für die Präparation wurden 2.5- 25.0 µL einer $AgNO_3$-Lösung (1.0 mg/mL in $H_2O$/MeOH/THF; 20/20/60, v/v/v) mit 5.0-17.5 µL einer *Cera microcristallina* (mittlere Molmasse ca. 350 g/mol (Herstellerangabe)) bzw. *Paraffinum liqui-*

*dum* oder *Petrolatum* Lösung (10 mg/mL in THF) zusammen pipettiert und mit THF ad 100 µL ergänzt. Die so erhaltenen 60 Präparationen enthielten dadurch zwischen 0.15 mmol/L und 1.47 mmol/L Silber und zwischen 1.4 mmol/L und 5.0 mmol/L *Cera microcristallina*. Von diesen Lösungen wurden 0.5-1.0 µL auf den Probenteller pipettiert und dieser nach Verdunsten des Lösemittels in das MALDI-TOF Massenspektrometer eingeschleust. Von jeder Lösung wurden bei gleicher Laserenergie (Attenuation = 83) MALDI-TOF Massenspektren aufgenommen. Es wurden 100 Einzelspektren aufsummiert und Signalintensität, Signal/Rausch-Verhältnis und Intensität ggf. auftretender störender Silbercluster notiert. Alle Versuche wurden als Doppelbestimmung durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt.

Der Test wurde anschließend mit einer anderen Präparationstechnik wiederholt: Es wurden eine Reihe von Silberlösungen mit Konzentrationen zwischen 0.4 und 2.5 mg/mL $AgNO_3$ und *Cera microcristallina-, Paraffinum liquidum*- und *Petrolatum*-Lösungen mit Konzentrationen zwischen 0.5 und 2.5 mg/mL hergestellt. Diese Lösungen wurden nacheinander auf den Probenteller pipettiert, indem zuerst 0.5-1.0 mL der Silbersalzlösung und nach deren Trocknen 0.5-1.0 mL der Probenlösung appliziert wurden.

### 7.2.3 Lösemittelfreie Präparation

Für die lösemittelfreie Präparation wurden ca. 100 mg Paraffinöl in einen Achatmörser gegeben. Bei der Präparation von mikrokristallinem Wachs oder Vaseline wurden diese im Trockenschrank bei 70-100 °C geschmolzen.

Silbertrifluoroacetat (AgTFA) wurde im Achatmörser zu einem sehr feinen Puder vermahlen. Etwa 0.5 mg wurden zu der Probe gegeben und mit einem Achat-Pistill gründlich verrieben. Aufgrund seiner feineren, puderartigen Struktur und seinem etwas unpolareren Charakter als Silbernitrat lässt sich das AgTFA fein in dem Paraffin verteilen.

0.2-0.5 µL der Paraffin-Silbermischung wurden nun mit einer Eppendorf-Pipette auf den Probenteller appliziert und mit Hilfe eines mit Teflon überzogenen Spatels auf dem ganzen Probenteller ausgestrichen. Auf diese Weise entsteht ein Film mit einer Schichtdicke von ca. 0.3-0.5 µm. Der Probenteller wird eingeschleust und die Probe gemessen.

Muss die Probe geschmolzen werden, so müssen Pistill, Spatel, Pipettenspitzen und der Probenteller ebenfalls im Trockenschrank erwärmt werden, um ein sofortiges Erstarren der Probe während der Verarbeitung zu vermeiden. Bei der Präparation sind geeignete Textilhandschuhe zu tragen, um die Hände vor Verbrennungen zu schützen!

### 7.2.4 Abhängigkeit der Dehydrierung, des Signal/Rausch-Verhältnisses und der Auflösung von der Laserenergie

Die Probenpräparation wurde mittels der lösemittelfreien Präparation durchgeführt. 50 mg Tetracontan (Fluka, GC-Referenzsubstanz, Gehalt mind. 99.5 %) wurden im Achatmörser bei ca. 100 °C eingeschmolzen. Nach Zugabe von 0.2 mg AgTFA wurde die Mischung mit dem ebenfalls vorgewärmten Pistill gemörsert (Schutzhandschuhe!). 0.2 µL der Mischung wurden mit Hilfe eines Teflonspatels auf dem Probenteller ausgestrichen, so dass ein gleichmäßiger Film entsteht. Es wurden 300 Einzelspektren an verschiedenen Spots und Positionen des Probentellers aufgenommen und summiert. Dabei wurde jeweils das Signal/Rausch-Verhältnis (S/N, berechnet mit Hilfe der Software XMass 5.0, Bruker, Bremen), die Auflösung und das Verhältnis zwischen den Areas der Peaks $[M\text{-}2H+^{107}Ag]^+$ bei m/z 667.6 und $[M+^{109}Ag]^+$ bei m/z 671.6 notiert. Es wurden 5-fach Messungen durchgeführt.

Es wurde der Schwellenwert bestimmt, bei dem gerade eben Peaks der $[M+Ag]^+$ Ionen beobachtet werden konnten ($\iota$=1). Dieser lag für Tetracontan bei einer Attenuation von 82. Dann wurde die Laserenergie auf 1.3$\iota$, 1.5$\iota$, 1.9$\iota$, 2.2$\iota$ und 2.5$\iota$ gesteigert. Unter der Annahme, dass die winkelabhängige Laserenergie Regulierung weitestgehend linear verläuft (mündliche Information von Bruker Daltonics), wurden die Attenuation-Werte auf $\iota$-Werte umgerechnet.

### 7.2.5 Charakterisierung von Paraffinen

Es wurden folgende Proben mit der lösemittelfreien Präparationstechnik untersucht:

*Cera microcristallina*: Paraffin L52/54 (Schümann Sasol GmbH, Hamburg), und Paracera S (Paramelt B.V., Heerhugowaard, Niederlande), Spezialwachs 7050 (Kahl und Co., Trittau).

*Paraffinum liquidum*: Öle A, B, C und D: Weißöl Pharma 40 B (Merkur Vaseline GmbH, Hamburg), Weißöl DAB 10, (Hansen & Rosenthal, Hamburg), White Mineral Oil (Citgo, Tulsa (OK), USA), Shell Ondina 917, 927, 933 und 4222 (Shell & DEA Oil, Hamburg)

*Petrolatum*: (Crompton B.V., Amsterdam, Niederlande)

### 7.2.6 Hauptkomponentenanalyse der Paraffinöle und Vaseline

Die Probenpräparation wurde mittels lösemittelfreier Probenpräparation durchgeführt. Etwa 50 mg Paraffinöl wurden im Achatmörser mit 0.2 mg AgTFA versetzt und durch Verreiben mit dem Pistill homogenisiert. 0.2 µL der Mischung wurden mit Hilfe eines Teflonspatels auf dem Probenteller ausgestrichen, so dass ein gleichmäßiger Film entsteht. Um die Reproduzierbarkeit zu erhöhen wurden für jede Probe je 50 Einzelspektren von sechs der Probenspots auf dem Probenteller aufsummiert. Zuerst wurde der Laserenergie Schwellenwert ermittelt, bei dem die Energie gerade ausreicht, um Paraffin-Silber Addukt-Ionen zu erzeugen ($\iota$=1). Nun wurde mit Hilfe des Attenuation-Reglers die Laserenergie auf 1.6$\iota$ erhöht und die Messung durchgeführt.

Die Spektren wurden über die Software XMass™ 5.0 der Firma Bruker Daltonics durchgeführt. Dabei wurden folgende Schritte durchlaufen:

1. Automatische Baseline Korrektur (Button „Sub-base.“ im Menü „Proc“)
2. Nun werden alle Alkanpeaks $[M+^{107}Ag]^+$ gelabelt und integriert:
   a) 2 Peaks aus der Mitte der Verteilung werden gelabelt (Menü „Peaks1d“) Der Abstand der Peaks zueinander muss 14 Da betragen.
   b) Die ganze Verteilung wird gelabelt (Button „Polylabel“ im Menü „Polymer“). Der Massenbereich muss in einem Pop-up Fenster eingegeben

werden und sollte die gesamte Verteilung einschließen (ca. 400-750 m/z – je nach Probenart).

c) Die gelabelten Peaks werden integriert (Button „Polyint“ im Menü „Polymer“). Aus dem auftauchenden Fenster „Finalfile“ wird nun die Summe der Areas abgelesen und als Σ0 notiert (Zeile „Calculated sum (Areas) is ...“). Durch Drücken des Buttons „Delete I“ werden anschließend die Integrale wieder entfernt.

3. Mit den Monocycloalkanen und Bicycloalkanen wird analog zu Punkt 2 verfahren, die Summe der Areas als Σ1 bzw. Σ2 notiert.
4. Zum Schluss wird die gesamte Verteilung integriert, und zwar die Alkanpeaks sowie die Monocyclo-, Bicyclo-, Tricyclo- und Tetracycloalkan Peaks. Dadurch wird ein hoher Prozentsatz der gesamten Verteilung integriert, aber Silbercluster und andere Peaks, die das Ergebnis verfälschen könnten, ausgelassen. Es wird wieder die Summe der Areas notiert (ΣG) und zusätzlich die zahlengemittelte Molmasse (Mn), die gewichts-gemittelte Molmasse (Mw) und die Verteilungsbreite (Pd).

Für diese Studie wurden insgesamt 131 Paraffinöle und 48 Vaselinemuster analysiert. Die Proben wurden allesamt von den in Anhang 0 beschriebenen Herstellern bezogen.

## 7.3 Gaschromatographie

Die Gaschromatographie der Paraffine wurde für den Vergleich mit der MALDI-TOF MS durchgeführt. Die Paraffine wurden zu 10 mg/mL in Hexan gelöst. Zudem wurde die Alkan-Standardlösung (siehe Kap. 7.2.1) analysiert. Die Geräteparameter sind in Tab. 18 aufgeführt.

**Tab. 18. Geräteparameter der gaschromatographischen Bestimmung**

| Gaschromatograph | Dani 6500 Gas Chromatograph |
|---|---|
| Injektor | PTV, 70 °C (0 min.)-350 °C (3 min.) |
| Split | 30 mL/min. |
| Detektor | FID, 300 °C |
| Temperaturprogramm | 100 °C (0 min.)-20 °C/min.-380 °C (3 min.) |
| Integrator | Shimadzu C-R4A |
| Säule | Chrompack CPSil-5 CB, fused silica, WCOT, Varian, Palo Alto, CA (USA) |
| Abmessungen | Länge: 15 m, ID: 0.22 mm, Filmdicke: 0.12 µm |
| Mobile Phase | $H_2$, Flow 1.0 mL/min. |

## 7.4 UV-Spektrophotometrie

Die Geräteparameter sind in Tab. 19 aufgeführt.

**Tab. 19. Geräteparameter der photometrischen Bestimmung**

| Hersteller | Hewlett Packard |
|---|---|
| Modell | Diode Array Spectrophotometer HP8452A |
| Wellenlänge | 337 nm |
| Scanbereich | 450-190 nm |
| Küvetten | Quarz, 1 cm Durchmesser |

### 7.4.1 Photometrie der Matrices

Alle Matrixstandards wurden zu 1 mg/mL in Methanol gelöst und – falls erforderlich – verdünnt. Die Geräteparameter sind unter Kap. 7.4 aufgeführt. Die Lösungen wurden gegen Methanol als Blindwert gemessen. Es wurde die Absorption der Substanzen bei der Wellenlänge 337 nm bestimmt. Die Absorptionen wurden anschließend für jede Substanz auf $\frac{AU}{cm*mmol/L}$ umgerechnet.

**Tab. 20. Messdaten und Berechung der relativen Absorption der Matrices**

| Matrix | Konz. [mg/mL] | Abs. bei 337 nm [A.U.] | Molmasse [mg/mmol] | $\varepsilon_{rel}$ [ $\frac{AU}{cm*mmol/L}$ ] |
|---|---|---|---|---|
| **NPO** | 0.05 | 0.4894 | 251.3 | 2.5 |
| **NIC** | 0.05 | 0.000 | 123.1 | <0.1 |
| **OG** | 0.05 | 0.0025 | 292.4 | <0.1 |
| **ANT** | 0.05 | 1.2950 | 177.0 | 4.6 |
| **9-BA** | 0.025 | 0.2569 | 257.1 | 2.6 |
| **CSA** | 0.05 | 0.2886 | 172.6 | 1.0 |
| **9-NA** | 0.05 | 0.5612 | 223.2 | 2.5 |
| **9-ACA** | 0.05 | 0.7496 | 222.2 | 3.3 |
| **DT** | 0.05 | 1.5981 | 226.2 | 7.2 |
| **9-CA** | 0.025 | 0.3357 | 212.7 | 2.9 |
| **GLY** | 1.00 | 0.0000 | 92.1 | <0.1 |
| **BDNA** | 0.05 | 2.2570 | 262.0 | 11.8 |
| **FUC** | 1.00 | 0.000 | 164.2 | <0.1 |
| **MSA** | 0.05 | 1.1546 | 168.2 | 3.9 |
| **EGS** | 1.000 | 0.0210 | 182.1 | <0.1 |
| **DHB** | 0.05 | 1.3896 | 154.1 | 4.3 |
| **HABA** | 0.005 | 0.4379 | 242.2 | 21.2 |
| **SA** | 0.005 | 0.3579 | 224.2 | 16.1 |
| **NPD** | 0.05 | 0.3280 | 307.4 | 2.0 |
| **OD** | 0.05 | 0.0000 | 265.4 | <0.1 |
| **THA** | 0.01 | 0.2378 | 168.2 | 4.0 |
| **PIC** | 0.05 | 0.1747 | 139.1 | 0.5 |
| **FA** | 0.005 | 0.2131 | 194.0 | 8.3 |
| **RET** | 0.005 | 1.7418 | 300.4 | 104.7 |
| **IAA** | 0.01 | 1.1257 | 187.2 | 21.1 |
| **3-AC** | 0.05 | 1.1637 | 144.2 | 3.4 |
| **3-CCA** | 0.025 | 0.6798 | 189.2 | 5.2 |
| **4-CCA** | 0.01 | 1.9300 | 189.2 | 36.5 |
| **POPOP** | 0.001 | 0.3961 | 364.4 | 144.3 |

Die Berechnung erfolgte nach der Gleichung:

$$\varepsilon_{rel}\left[\frac{AU}{cm*mmol/L}\right] = \frac{A*M}{d*c*1000} \qquad \text{Gl. 13}$$

mit $\varepsilon_{rel}$ = rel. Abs. bei 337 nm

$A$ = Absorption der gemessenen Lösung in A.U.

$M$ = Masse der untersuchten Substanz in g/mol

$c$ = Konzentration der gemessenen Lösung in mg/mL

$d$ = Küvettendurchmesser in cm

## 7.5 Felddesorptions- und Feldionisations-MS

Die Geräteparameter sind in Tab. 21 aufgeführt.

**Tab. 21. Geräteparameter der FD- und FI/MS**

| **Gerät** | **JMS-700 FD/FI Massenspektrometer** |
|---|---|
| Hersteller | Jeol, Tokio, Japan |
| Detektor | Doppelt fokussierendes Sektorfeld |
| Quelle | 80 °C (FD-Quelle) bzw. 220 °C (FI-Quelle) |
| | Abstand vom Emitter zur Gegenelektrode: 2.2 mm |
| Probenmenge | 0.1-1.0 mg (FI/MS) bzw. 1-2 µL einer Lösung des Analyten in Toluol (1 mg/mL) |
| Beschleunigungssp. | 5 kV bis 12 kV (einstellbar). |

## 7.6 GPC

Die Geräteparameter sind in Tab. 22 aufgeführt. Die GPC wurde von PSS, Mainz, durchgeführt.

**Tab. 22. Geräteparameter der Gelpermeationschromatographie**

| Gerät | Modell |
|---|---|
| Vorsäule | PSS-SDV, 10 µm, ID 8.0 x 50 mm |
| Säulen | PSS-SDV, 5 µm, $10^3$ Å, ID 8.0 x 300 mm |
| | PSS-SDV, 5 µm, $10^2$ Å, ID 8.0 x 300 mm |
| Pumpe | TSP P100 |
| Fluss | 1.0 mL/min, Tetrahydrofuran (THF) |
| Probenkonz. | 2.0 g/L |
| Injektionssyst. | TSP AS3000 mit 50 µL Injektionsvolumen |
| Detektor | Shodex Differentialrefraktometer RI 71 |
| Standards | $C_{20}$, $C_{24}$, $C_{28}$, $C_{32}$, $C_{36}$ und $C_{40}$ n-Alkane |

## 7.7 NMR-Spektroskopie

Die Proben wurden zu 100% im flüssigen Zustand gemessen. Ist die Probe fest (Wachse, Vaseline), so wurde die geschmolzene Probe bei 60-100 °C gemessen. Es wurde ein Bruker DRX500 (B0=11.75 T) mit 5 mm Dual und 10 mm Multikern Probenköpfen verwendet.

**Tab. 23. Geräteparameter der gaschromatographischen Bestimmung**

| Hersteller | Bruker, Bremen |
|---|---|
| Modell | DRX500 |
| Feldstärke | $B_0$ = 11.75 T |
| Probenköpfe | 5 mm (für $^{13}C$, $^{1}H$ und $^{2}H$ Kanal) |
| | 10 mm (für X-, $^{1}H$ und $^{2}H$ Kanal) |
| Präparation | Probe wurde zu 100% gemessen |
| Temperatur | 25 °C (Paraffinöle) |
| | 60-100 °C (Vaseline und Wachsproben) |

Es wurden folgende Proben mittels NMR untersucht:

- *Paraffinum Liquidum* in vier verschiedenen Qualitäten "**A**" (von Shell & DEA Oil, Hamburg, Merkur Vaseline GmbH, Hamburg, Quosmocimica, Sao Paolo, Brasilien), "**B**" (von Hansen & Rosenthal, Hamburg, RAM Oil, Casalnuovo di Napoli, Italien, Quimicos y Derivados S.A. de C.V., Salamanca, Mexico, Ipiranga Petroquimica, Porto Alegre, Brasilien), "**C**" (hochnaphthenische Ware, von Shell & DEA Oil, Hamburg), "**D**" (von Shell & DEA Oil, Hamburg).
- *Petrolatum* (3 verschiedene Partien von Crompton B.V., Amsterdam, Niederlande)
- *Cera microcristallina* (Kahlwachs 2843 und Spezialwachs 7050, Kahl, Trittau)
- Standards: Hexatriacontan (Larodan Fine Chemicals, Malmö, Schweden), Tetracontan (Fluka, Buchs, Schweiz), Squalen (Sigma, Steinheim)

### 7.7.1 Nachweisgrenzenbestimmung von Olefinen

Für die Nachweisgrenzenbestimmung von olefinischen Substanzen wurde folgende Probe präpariert: Squalen wurde zu 0.1 mM in Paraffinöl „A“ (Shell & DEA Oil, Hamburg) eingewogen (4.1 mg Squalen in 10 mL Öl). Es wurden $^{1}$H-NMR Spektren des Öls sowohl mit als auch ohne Squalen aufgenommen.

$$\mathrm{NWG}\,[\%] = \frac{\text{molare NWG}\,[\mathrm{mM}] * \mathrm{M}_{\mathrm{Olefin}}\,[\mathrm{g/Mol}]}{\rho * 10000} \qquad \text{Gl. 14}$$

$\rho$ = Dichte des Paraffinöls bei 20 °C = 0.850 kg/L (Herstellerangabe)

10000 = Umrechnungsfaktor von mg/kg auf Gewichtsprozent

## 7.8 Methodenentwicklung für Wollwachs

Die Methodenentwicklung wurde mit zwei verschiedenen Techniken durchgeführt:

1. **Technik 1**: Es wurde eine 0.1-0.2%ige Lösung der Probe angefertigt und direkt auf den Probenteller appliziert, nachdem dort bereits eine 0.1%ige Kationenlösung aufgebracht wurde.
2. **Technik 2**: 10 µL einer 1-2%igen Lösung der Probe wurden mit 50 µL einer Matrixlösung gemischt. Diese Mischung wurde auf den Probenteller aufgebracht und getrocknet. 10 µL einer Kationensalz-Lösung können bei Bedarf noch hinzudosiert werden.

**Proben**

Es wurden folgende Proben untersucht:

*Wollwachse*: Lanolin PAS (Lanolines Stella SA, Mouscron, Belgien), Wollwachs PAP (Lanolines de la Tosser, Tourcoing, Frankreich), Wollwachs SP (Lanolin Trading Company, Christchurch, Neuseeland) und Wollwachs NZ (Bremer Woll-Kämmerei, Bremen), Neutralwollfett AHB, Imperial-Oel-Import, Hamburg

*Eucerit*: Eucerit PA (Beiersdorf AG, Hamburg)

*Neocerit*: Neocerit (Beiersdorf AG, Hamburg)

*Wollwachssäuren*, destilliert (Beiersdorf AG, Hamburg)

**Methode für Wollwachs, Wollwachsalkohole, Wollwachssäuren und Glyceryl Lanolate:**

Es wurde nach Technik 1 präpariert. Als Kationen-Zusatz wurde eine 0.1%ige Lösung von Lithiumchlorid in Wasser verwendet. Ca. 1 µL dieser Lösung wurde auf den Probenteller aufgetropft und nach deren Trocknen etwa 1 µL einer 0.1-0.2%igen Lösung der Probe in THF appliziert.

**Alternativmethode für Wollwachssäuren:**

Es wurde nach Technik 1 präpariert. Es wurden keine Zusätze (Matrix, Salze etc.) verwendet. Die Messung wurde im Negativ-Ionenmodus durchgeführt.

**Alternativmethode für Glyceryl Lanolate:**

Es wurde nach Technik 2 mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure als Matrix präpariert. Anschließend wurde eine Spatelspitze eines stark sauren Kationentauschers ($Na^+$-Form, Dowex 50 WX8, Fluka, Buchs (Schweiz)) hinzugegeben. Nach ca. 15 Minuten wurde 1 µL des Überstandes auf den Probenteller pipettiert.

## 7.9 Methodenentwicklung für Chitosan, Guar-HPTMA und Polyquaternium-10

Die Methodenentwicklung wurde mit drei verschiedenen Präparationstechniken durchgeführt. Oligochitosan und alle weiteren Polymere wurden zu 1 mg/mL in Wasser gelöst. Die Matrixsubstanzen wurden, soweit nicht anders angegeben, zu 1% in Aceton gelöst.

**Technik 1**: Von der Probenlösung wurde 0.5 µL auf den Probenteller pipettiert und dort mit 1 µL der Matrixlösung gemischt. Falls notwendig, wurde nach dem Trocknen die – bedingt durch die langsame Trocknung – grobe Kristalloberfläche durch Rekristallisation mit 1 µL Methanol in einen feinen Kristallteppich umgewandelt.

**Technik 2**: 0.5 µL der Matrixlösung in Aceton wurden auf den Probenteller pipettiert und 0.5 µL der Polymerlösung anschließend auf die getrocknete Matrix pipettiert. Durch das Wasser wird nur wenig der Kristalloberfläche wieder angelöst, so dass ein feiner Kristallteppich erhalten wird.

**Technik 3:** 10 µL Probenlösung wurden mit 50 µL Matrixlösung gemischt und 0.5 µL der Mixtur auf den Probenteller appliziert.

Gemessen wurde im Reflektor- und Linearmodus. Zur Kalibrierung wurde PEG bzw. Trypsin und Rinderserum-Albumin (BSA) verwendet.

**Proben:** Es wurden folgende Proben untersucht:

*Chitosane:* *„Chitosan 14“* und „*Chitosan 18“*, niedermolekularere Chitosane, hergestellt durch Hydrolyse von hochmolekularen Chitosanen durch Sven Krohn, Pharmazeutisches Institut, Universität Kiel, der diese Proben auch mittels GPC charakterisiert hat. *Chitosan Oligomer 2-6* (Seikagaku America, East Falmouth, MA (USA)), *Chitosan 3880* (Dalwoo chitoSan, Korea), *ChitoClear$^{TM}$ TM 615*, *Chitosan LVCG* Batch TD 124, TD 127 und TM 888 (Primex, Siglufjordur (Island)) und Chitosan (150 kDa, Fluka, Buchs (Schweiz))

*Pullulane*: Pullulan 22 kDa und Pullulan 2,9 kDa, Fluka, Buchs (Schweiz)

*Dextrane*: Dextran from Leuconostoc spp. 6 kDa, Fluka, Buchs (Schweiz)

*Polyquaternium*: Polyquaternium-10 (UCARE JR125 und JR400, Amerchol, NJ, (USA)

*Guar-HPTMA*: Jaguar Excel (Rhodia, NJ (USA)), Cosmedia (Cognis, Düsseldorf)

## 7.10 Saure Hydrolyse von Chitosan, Polyquaternium-10 und Guar-HPTMA

**Hydrolysebedingungen:**

30 mg der Probe werden im Pyrexglas mit 2 mL 0.05 M HCl versetzt und bei 95 °C erhitzt. Es wurden nach verschiedenen Zeiten zwischen 0-40 Stunden 100 µL aus dem Pyrexglas entnommen, 1:10 verdünnt und analysiert.

**Präparationsbedingungen:**

Polyquaternium-10 und Guar HPTMS: 10 µL des Hydrolysates wurden in ein Eppendorf Vial pipettiert und mit 35 µL Matrix-lsg. (ges. in Methanol) versetzt. Es wurde eine Spatelspitze Kationentauscher, (Amberlyst 15, stark

saure Form, $H^+$-beladen, Fluka, Buchs (Schweiz)) zugegeben, um vorhandene Kationen zu entfernen bzw. durch Protonen zu ersetzen.
Der Probenspot wurde mit 0.5 µL einer 0.1%igen Lösung der Salze NaCl, $K_2NO_2$, $CuNO_2 \cdot 3H_2O$, LiCl, und $CsOH \cdot H_2O$ behandelt, anschließend wurde die Proben/Matrix-Lösung auf den Spot pipettiert.

Oligochitosan B und Chitosan C (40 kDa):

Die Chitosanhydrolysate wurden gemäß der durchgeführten Methodenentwicklung für Oligochitosane nach Präparationstechnik 1 mit der Matrix THAP untersucht. Beim Verdünnen der Hydrolysate wurde mit NaOH abgepuffert. Hierfür wurden 10 µL Hydrolysat mit 80 µL Wasser und 10 µL 0.4 M NaOH gemischt. Wichtig ist dabei, dass der pH Wert nicht ins alkalische umschlägt, da die Chitosane bei pH > 6.5 schlecht löslich sind. Durch die Zugabe von NaOH wird zum einen die Säurestärke herabgesetzt, was die Bildung von Protonenaddukten hindert, zum anderen wird ein Überschuss an Natrium-Ionen geschaffen, der eine Bildung der Natriumaddukte fördert.

# 8 Anhang

## 8.1 UV-Spektren der Matrices

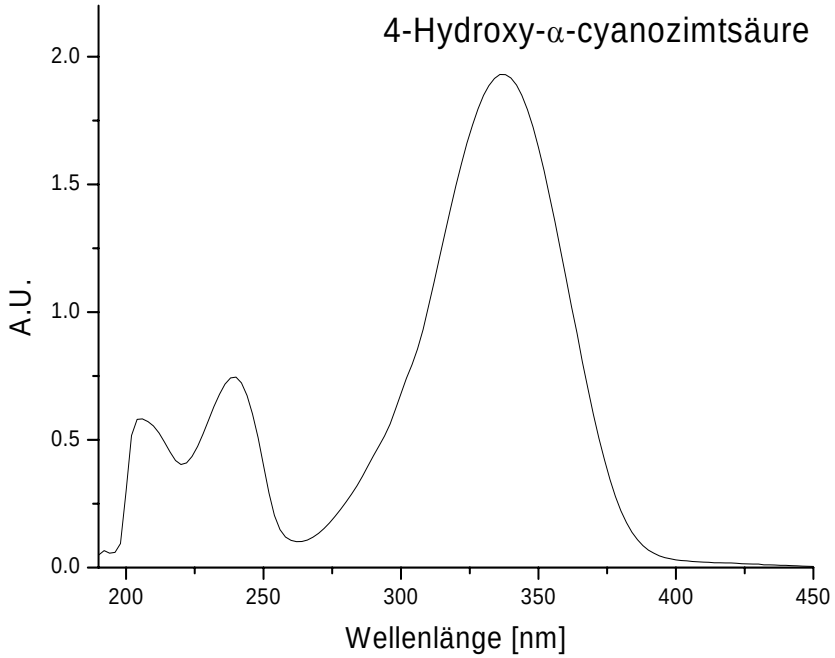



**Abb. 70. UV-Spektrum von 4-Hydroxy-α-cyanozimtsäure, 0.01 mg/mL**

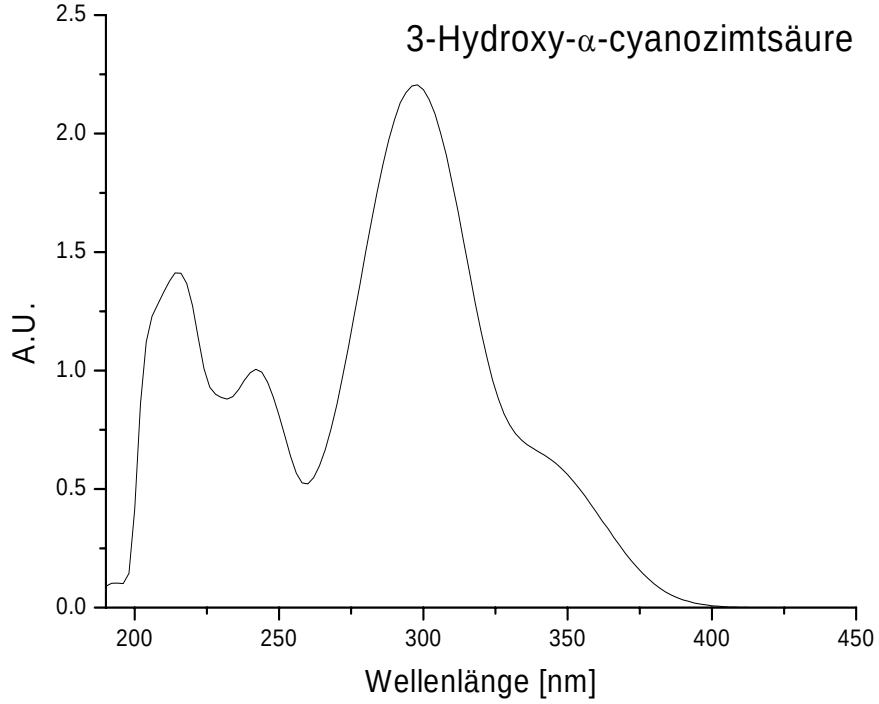



**Abb. 71. UV-Spektrum von 3-Hydroxy-α-cyanozimtsäure, 0.025 mg/mL**

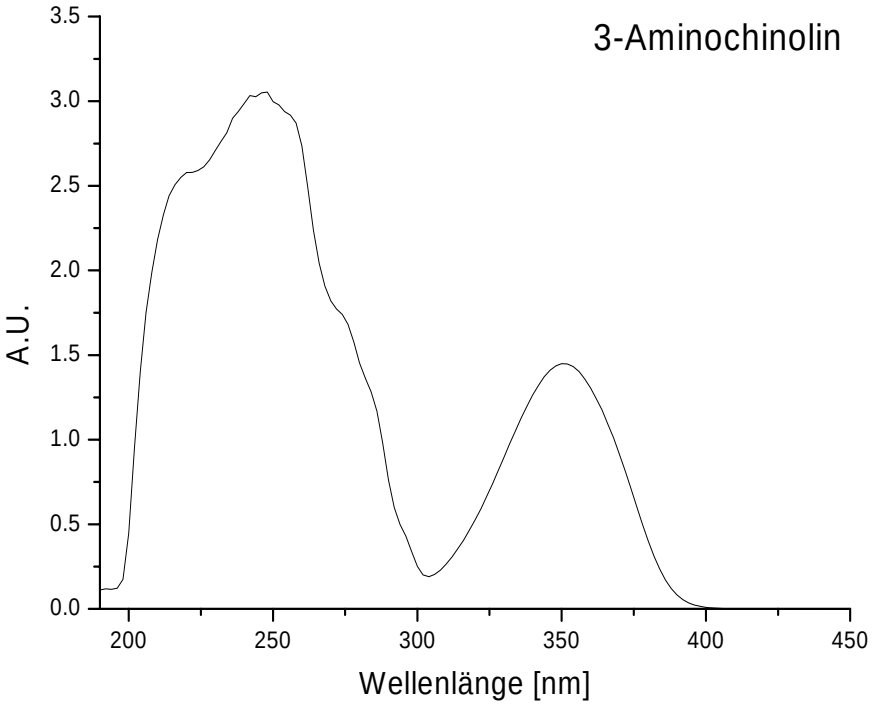



**Abb. 72. UV-Spektrum von 3-Aminochinolin, 0.05 mg/mL**

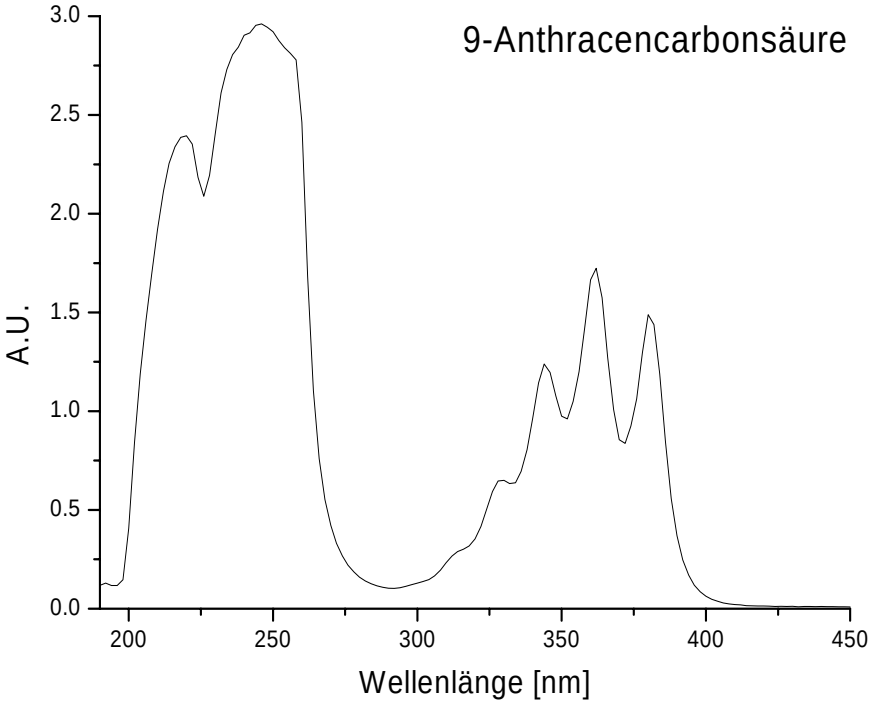



**Abb. 73. UV-Spektrum 9-Anthracencarbonsäure, 0.05 mg/mL**

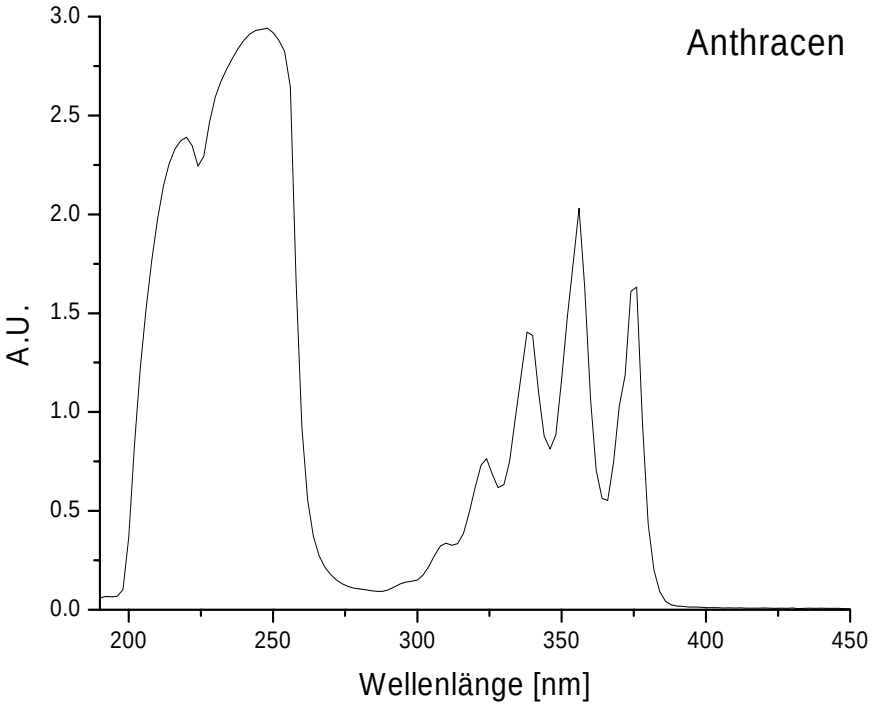



**Abb. 74. UV-Spektrum von Anthracen, 0.05 mg/mL**

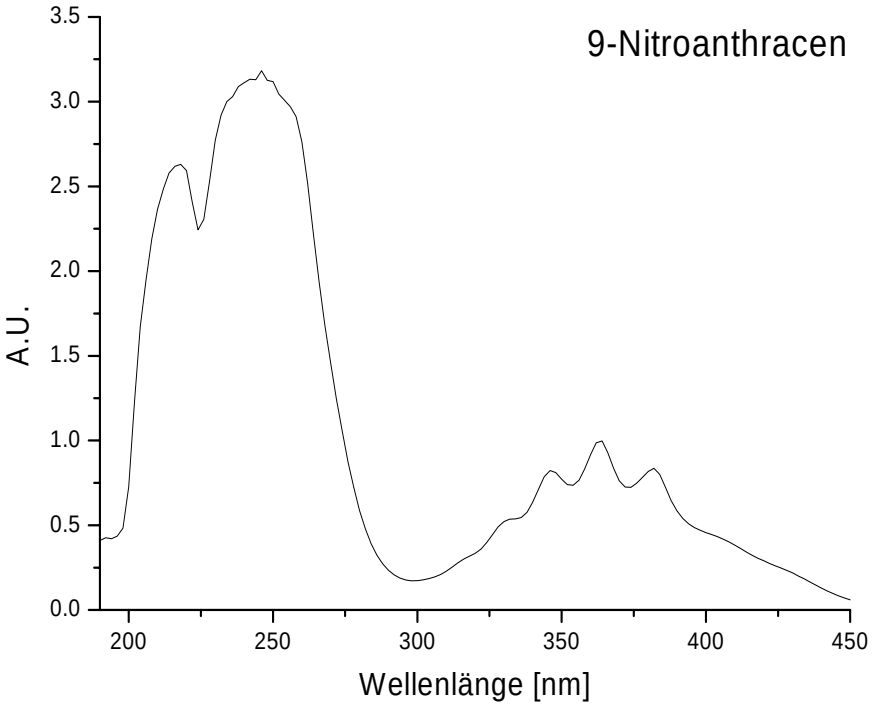



**Abb. 75. UV-Spektrum von 9-Nitroanthracen, 0.05 mg/mL**

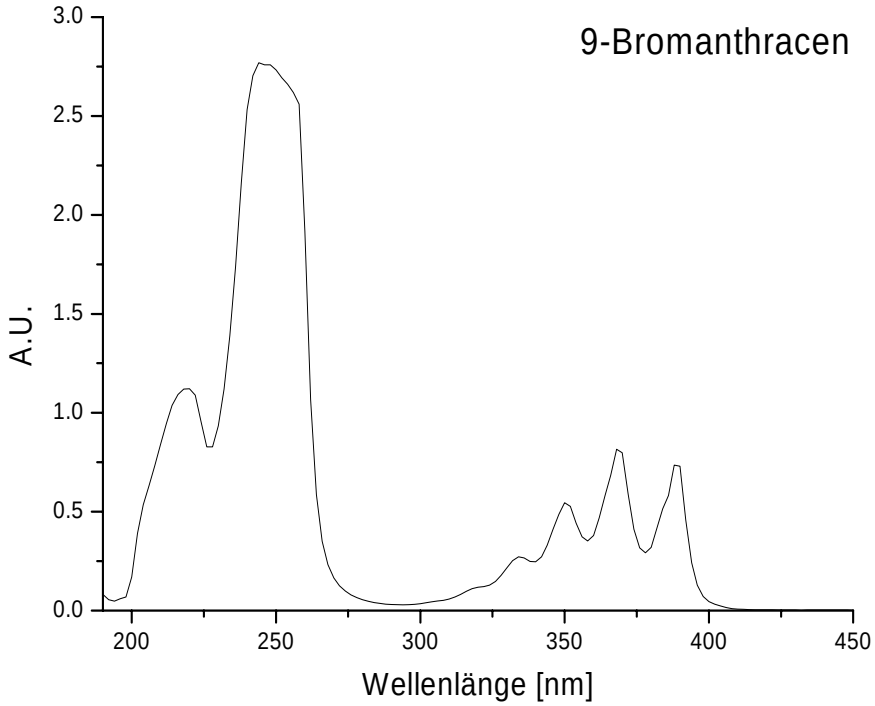



**Abb. 76. UV-Spektrum von 9-Bromanthracen, 0.025 mg/mL**

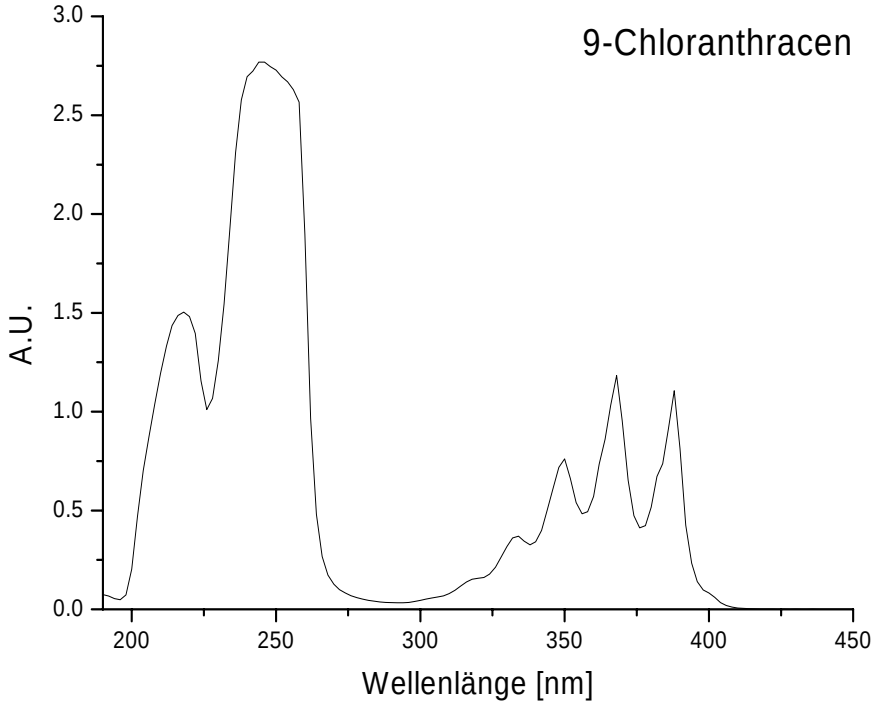



**Abb. 77. UV-Spektrum von 9-Chloranthracen, 0.025 mg/mL**

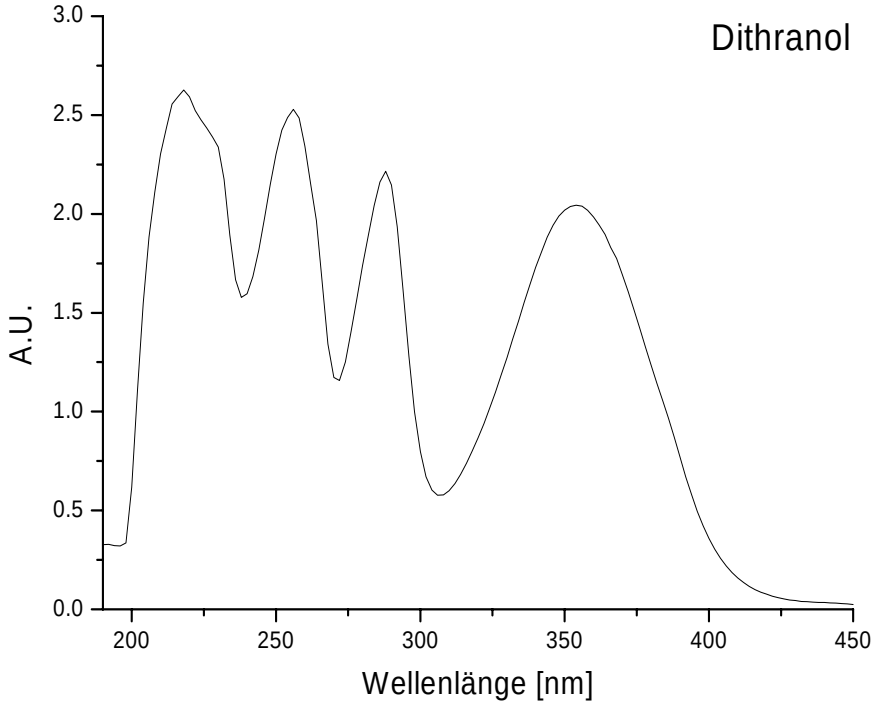



**Abb. 78. UV-Spektrum Dithranol, 0.05 mg/mL**

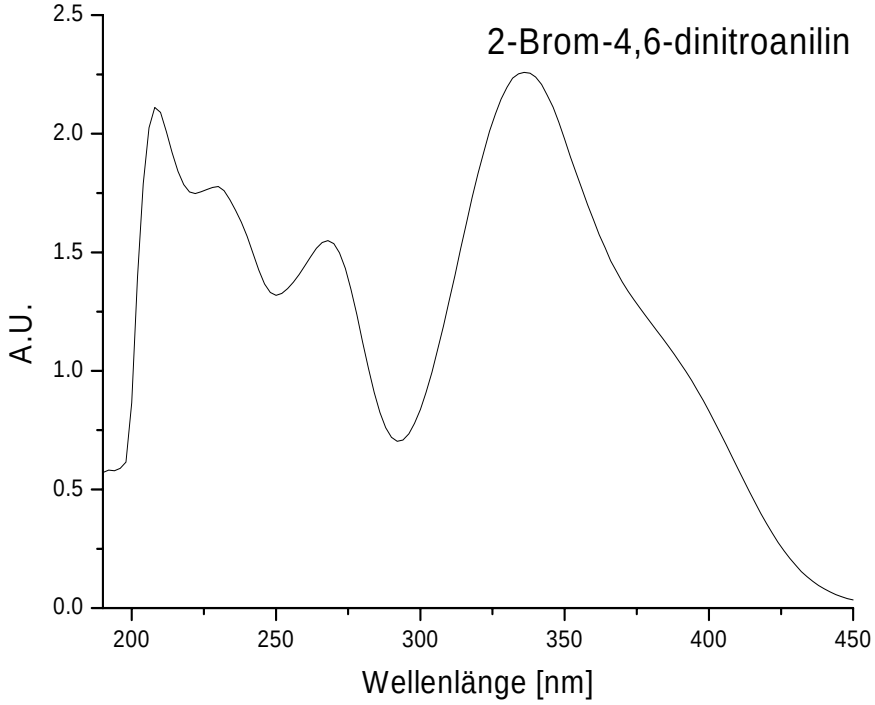



**Abb. 79. UV-Spektrum von 2-Brom-4,6-dinitroanilin, 0.05 mg/mL**

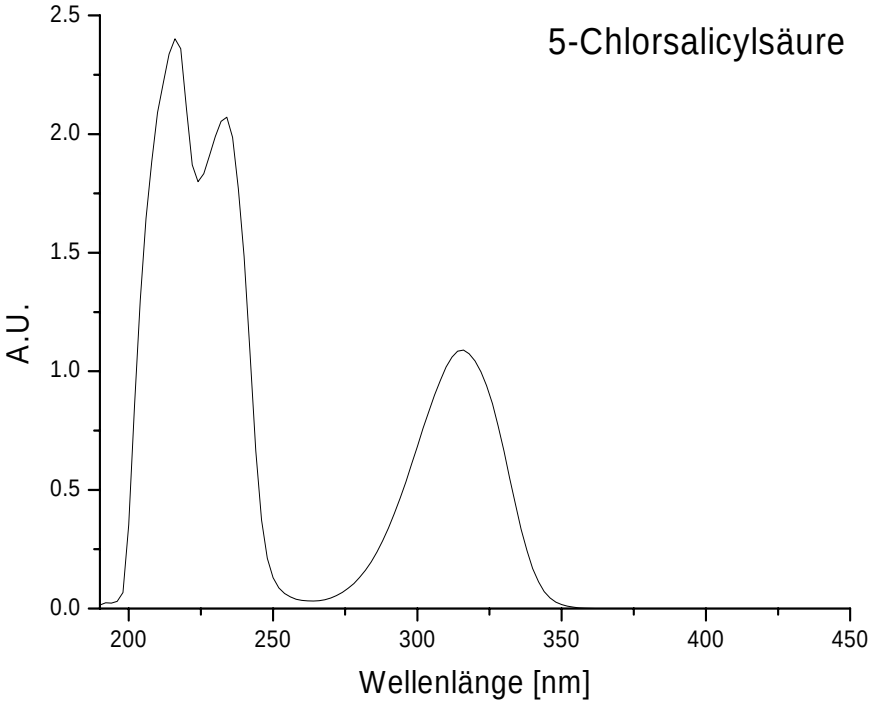



**Abb. 80. UV-Spektrum von 5-Chlorsalicylsäure, 0.05 mg/mL**

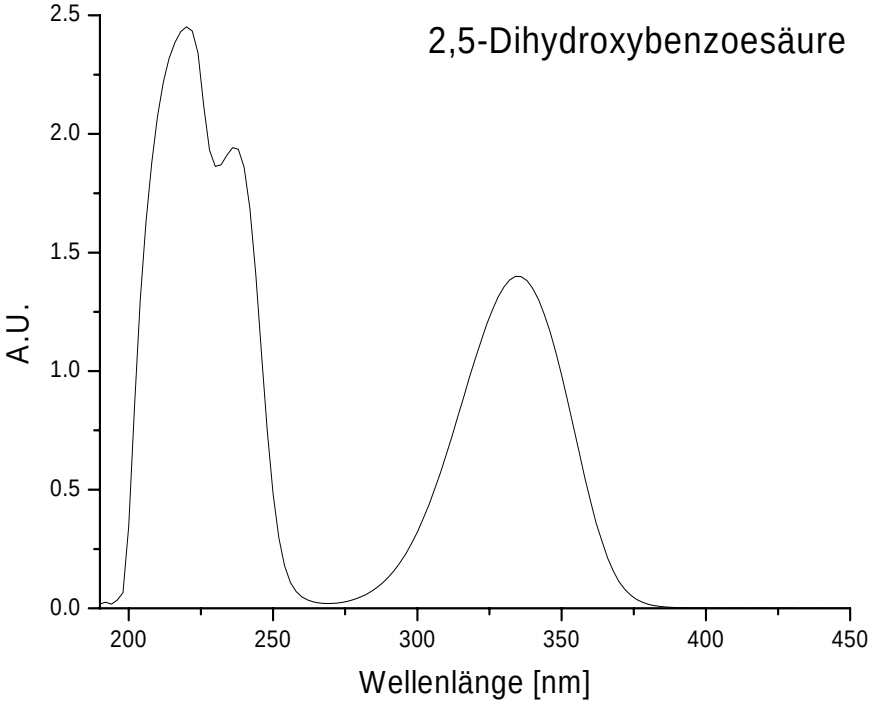



**Abb. 81. UV-Spektrum von 2,5-Dihydroxybenzoesäure, 0.05 mg/mL**

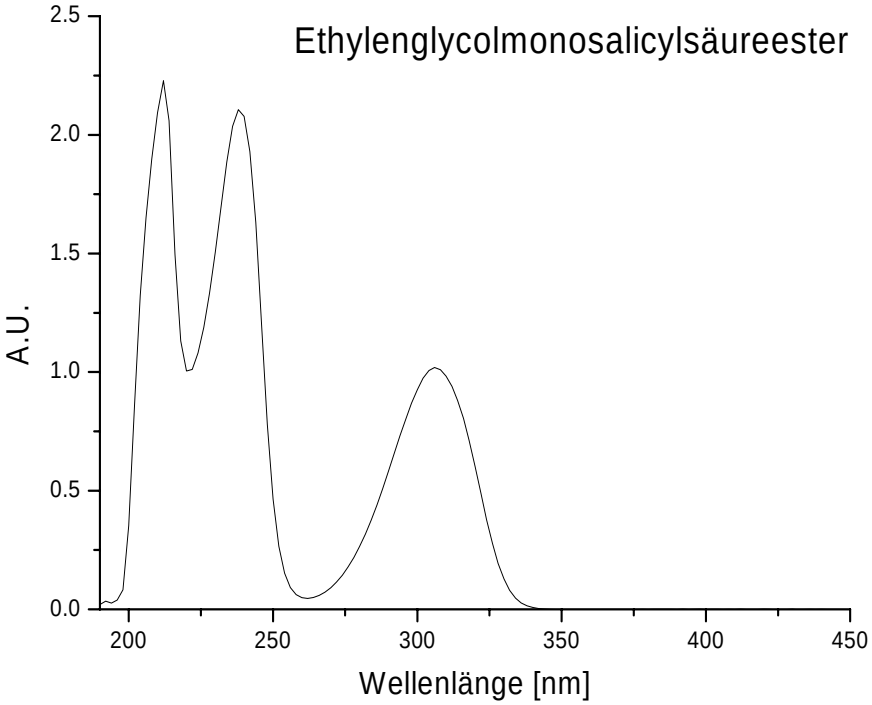



**Abb. 82. UV-Spektrum von Ethylenglycolmonosalicylsäureester, 1.0 mg/mL**

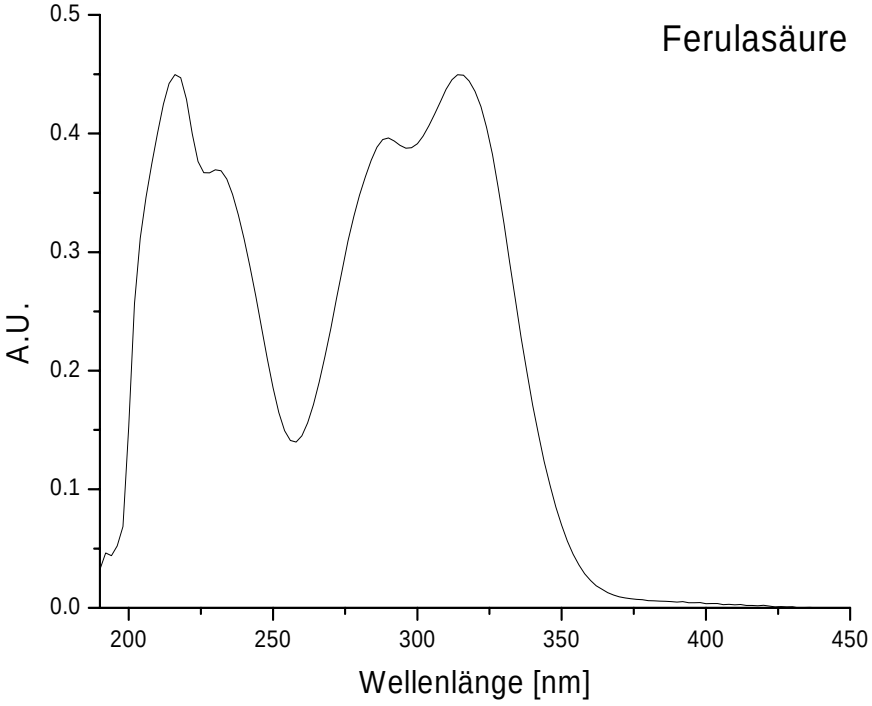



**Abb. 83. UV-Spektrum von Ferulasäure**

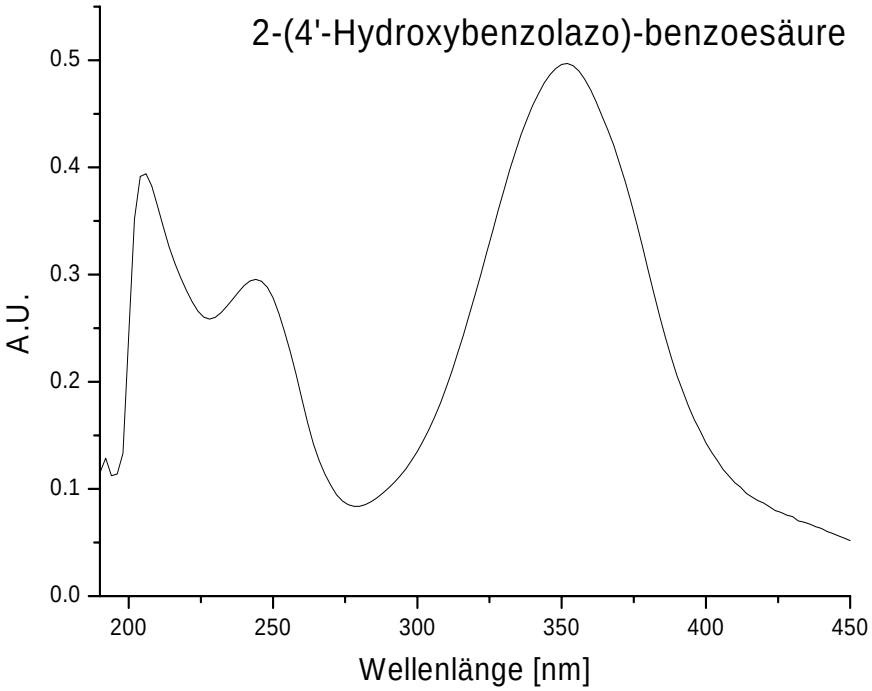



**Abb. 84. UV-Spektrum von 2-(4'-Hydroxybenzolazo)-benzoesäure, 0.005 mg/mL**

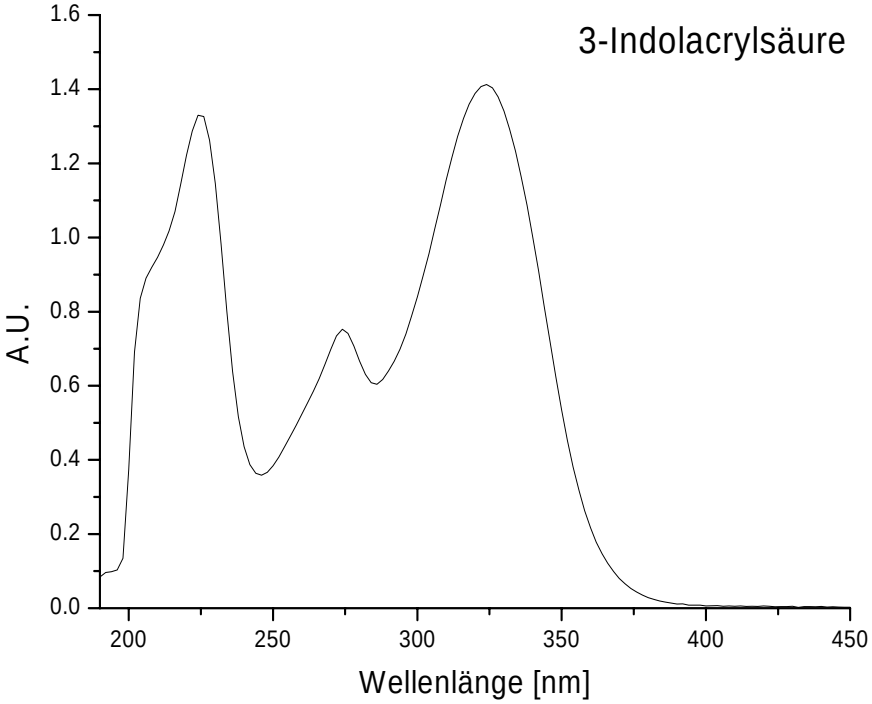



**Abb. 85. UV-Spektrum von 3-Indolacrylsäure, 0.01 mg/mL**

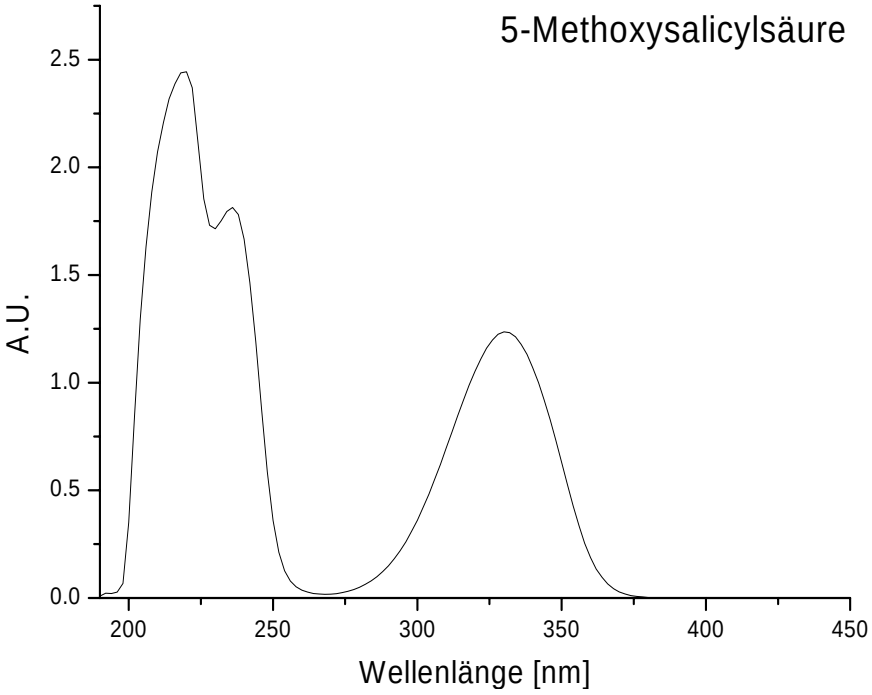



**Abb. 86. UV-Spektrum von 5-Methoxysalicylsäure, 0.05 mg/mL**

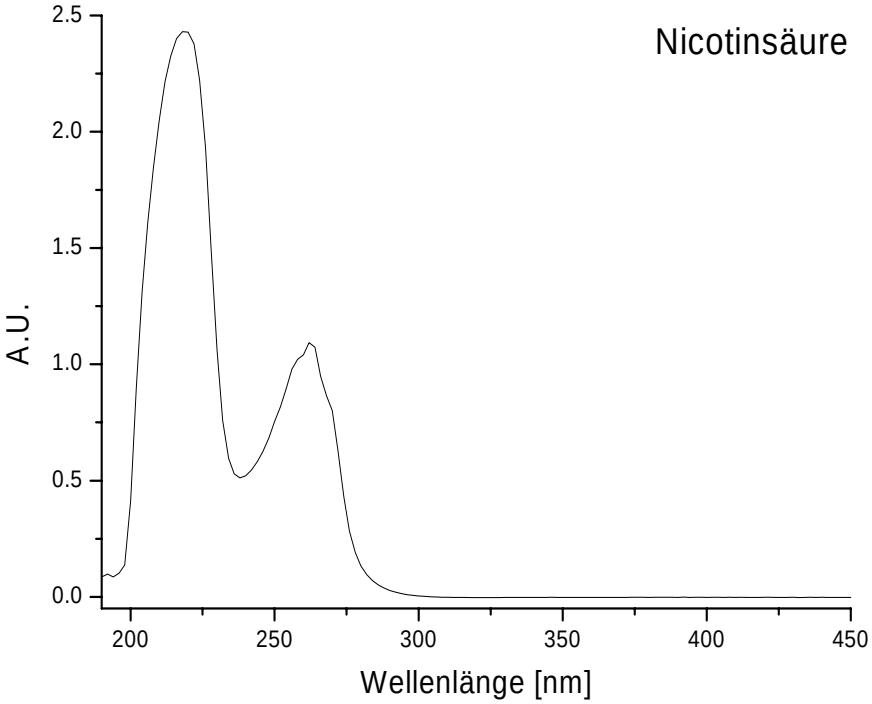



**Abb. 87. UV-Spektrum von Nicotinsäure, 0.05 mg/mL**

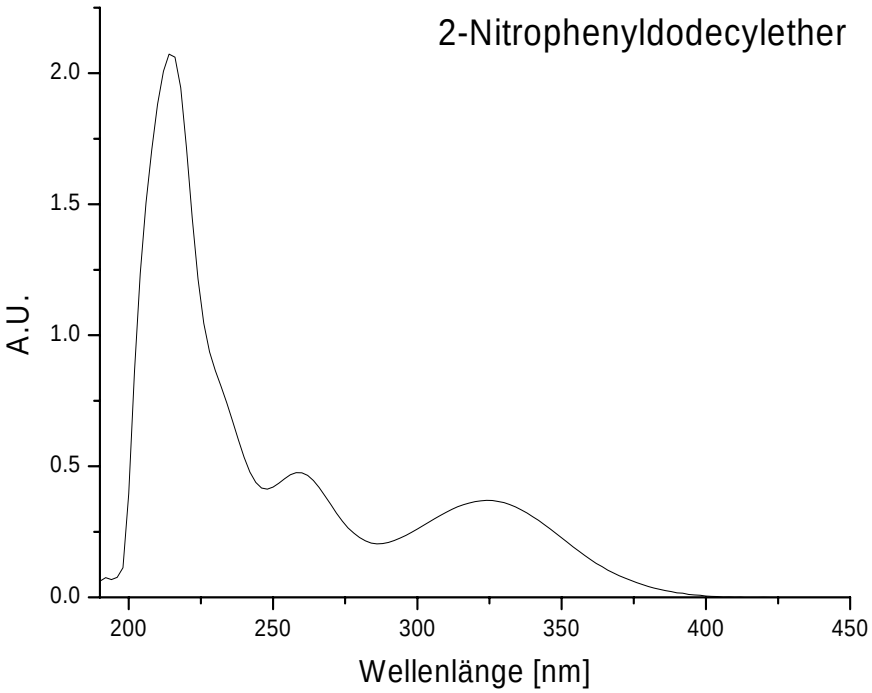



**Abb. 88. UV-Spektrum von 2-Nitrophenyldodecylether, 0.05 mg/mL**

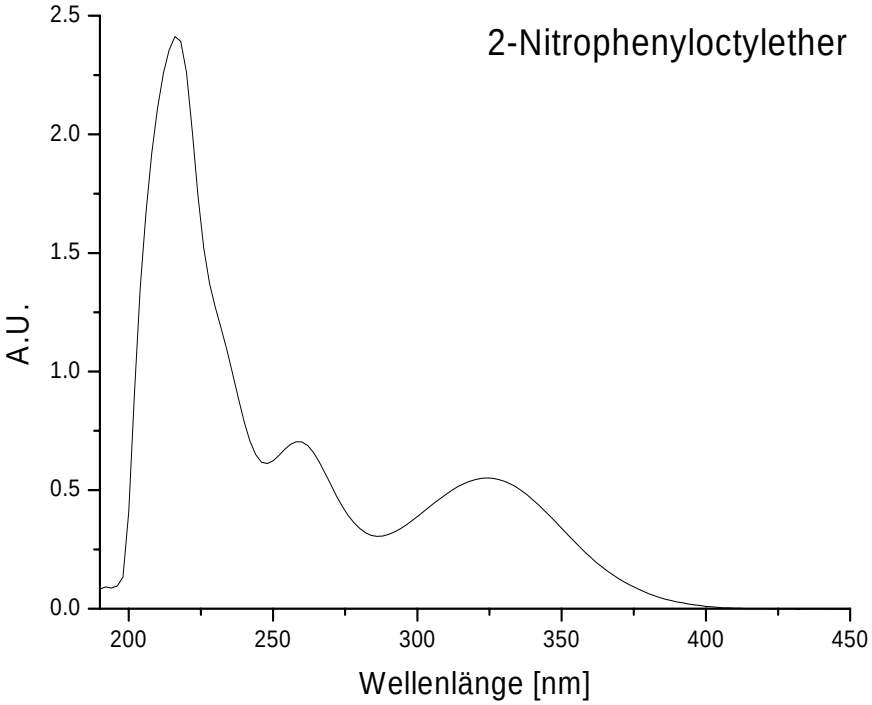



**Abb. 89. UV-Spektrum von 2-Nitrophenyloctylether, 0.05 mg/mL**

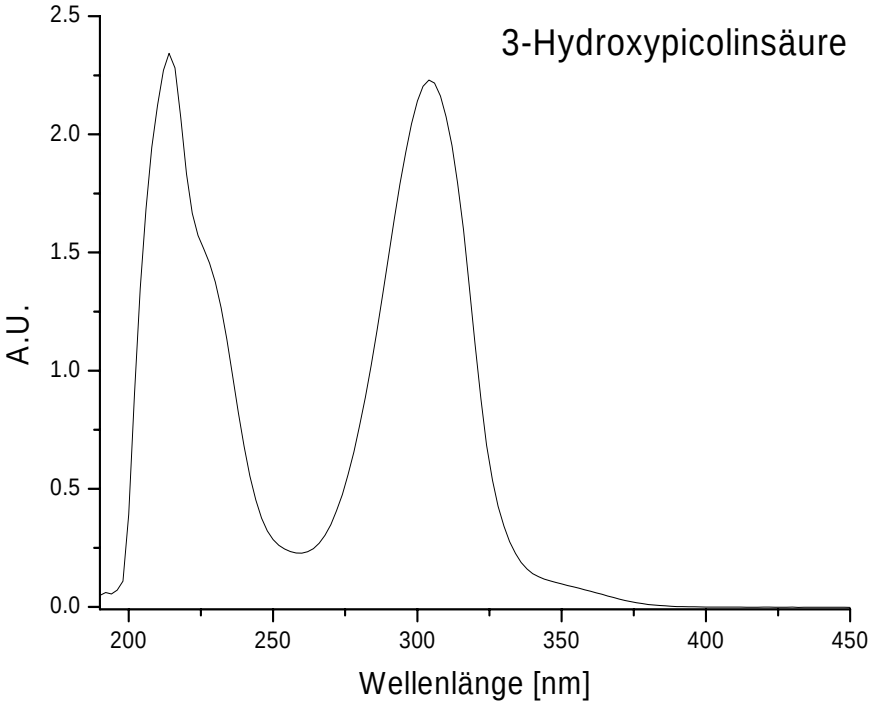



**Abb. 90. UV-Spektrum von 3-Hydroxypicolinsäure**

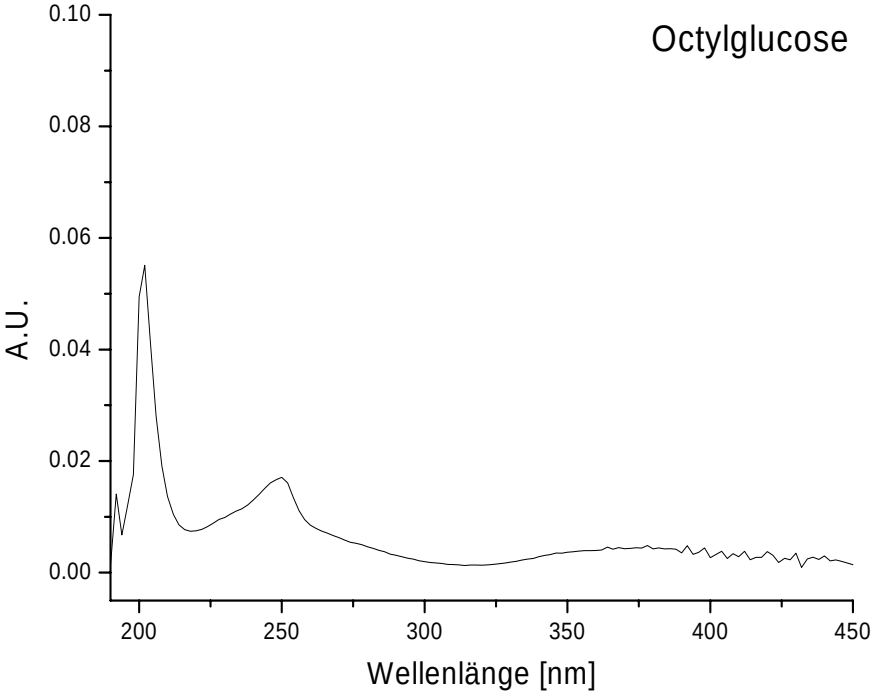



**Abb. 91. UV-Spektrum von Octylglucose, 0.05 mg/mL**

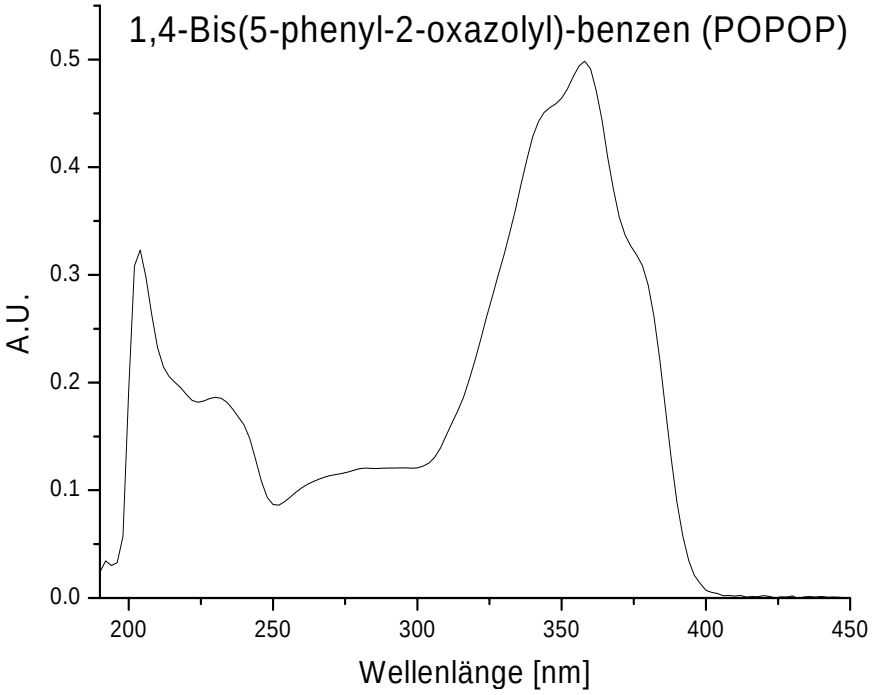



**Abb. 92. UV-Spektrum von 1,4-Bis(5-phenyl-2-oxyzolyl)-benzen, 0.001 mg/mL**

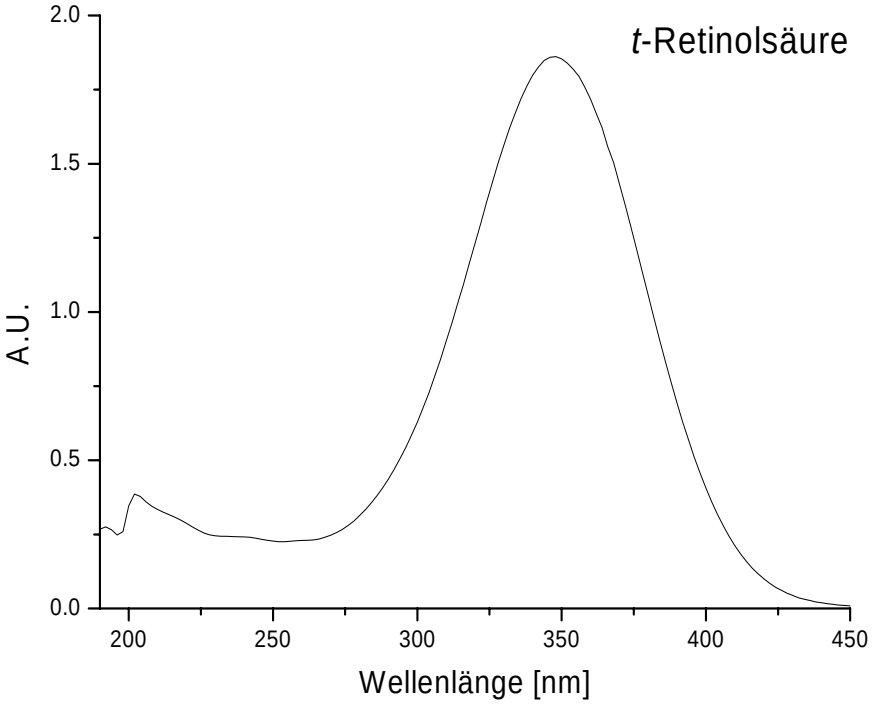



**Abb. 93. UV-Spektrum von *t*-Retinolsäure, 0.005 mg/mL**

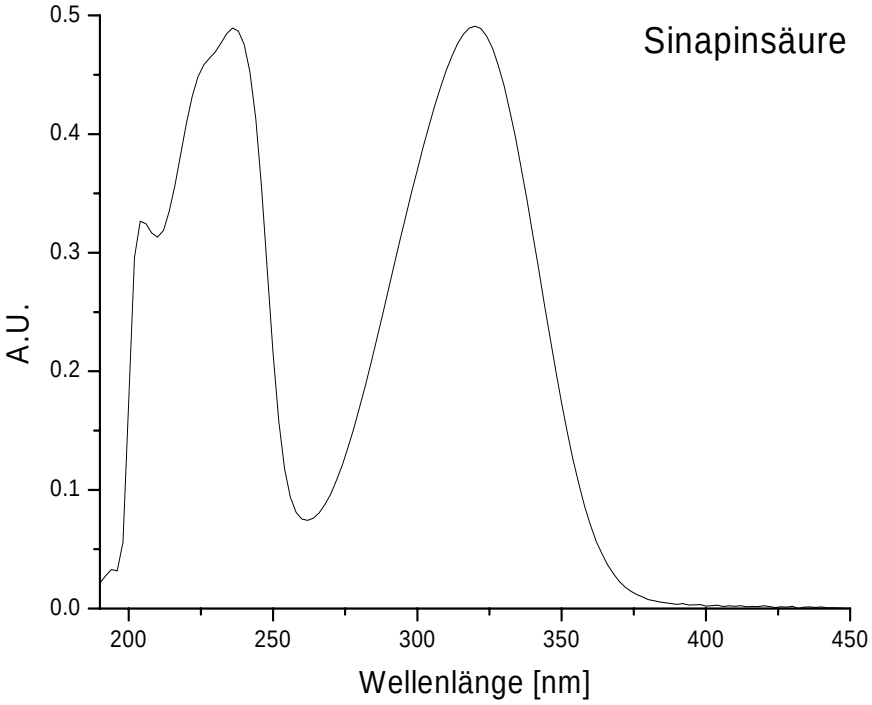



**Abb. 94. UV-Spektrum von Sinapinsäure, 0.005 mg/mL**

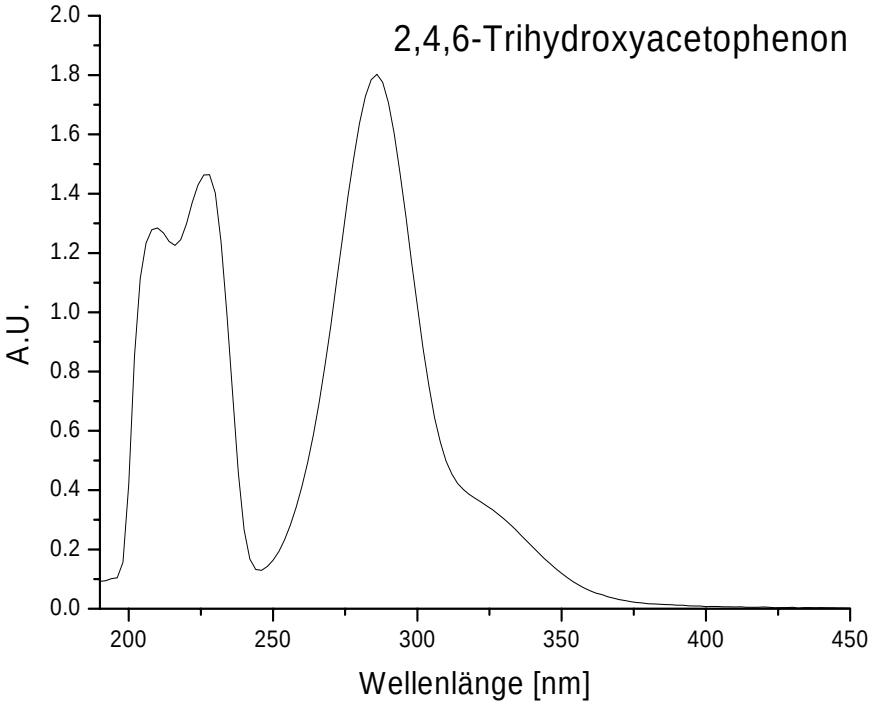



**Abb. 95. UV-Spektrum von 2,4,6-Trihydroxyacetpophenon, 0.01 mg/mL**

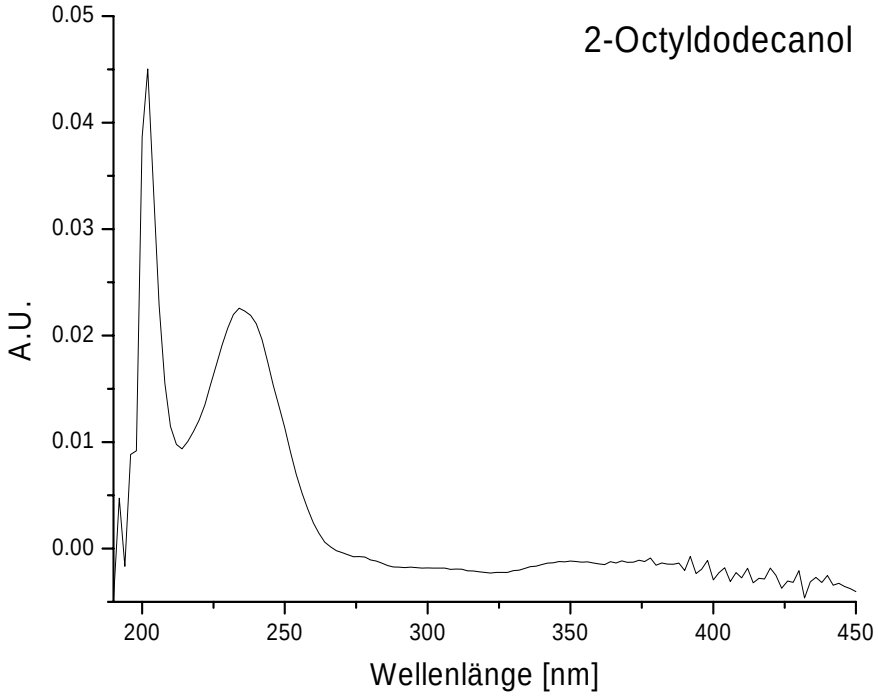



**Abb. 96. UV-Spektrum von 2-Octyldodecanol, 0.05 mg/mL**

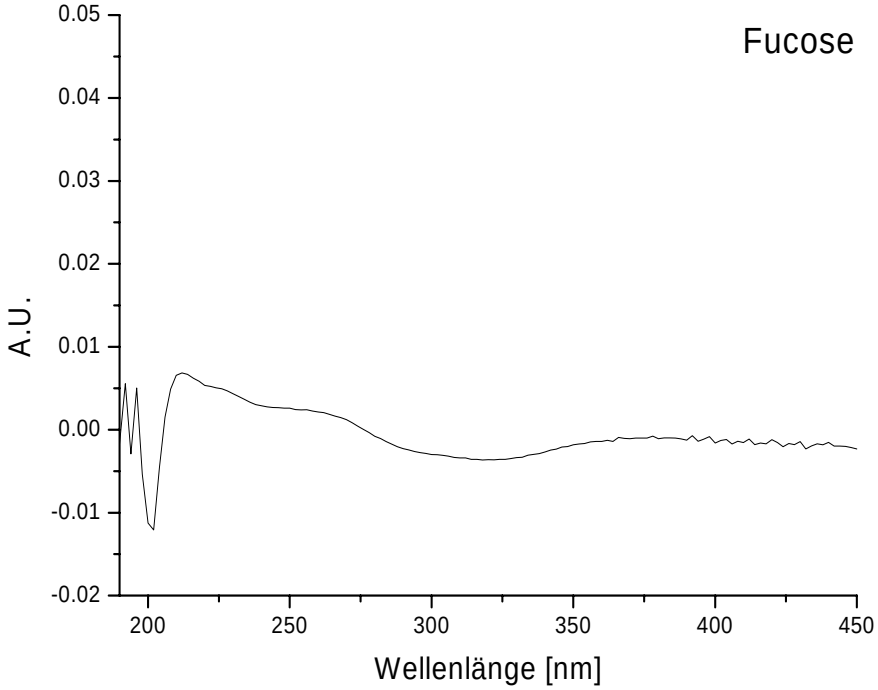



**Abb. 97. UV-Spektrum von Fucose, 1.0 mg/mL**

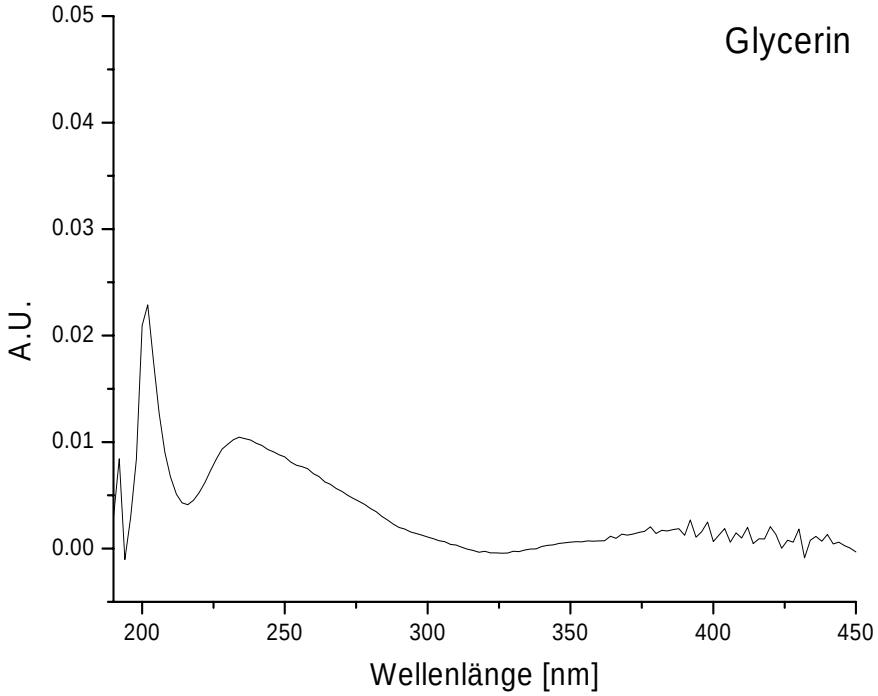



**Abb. 98. UV-Spektrum von Glycerin, 1.0 mg/mL**

## 8.2 MALDI-TOF Massenspektren von Wachsen

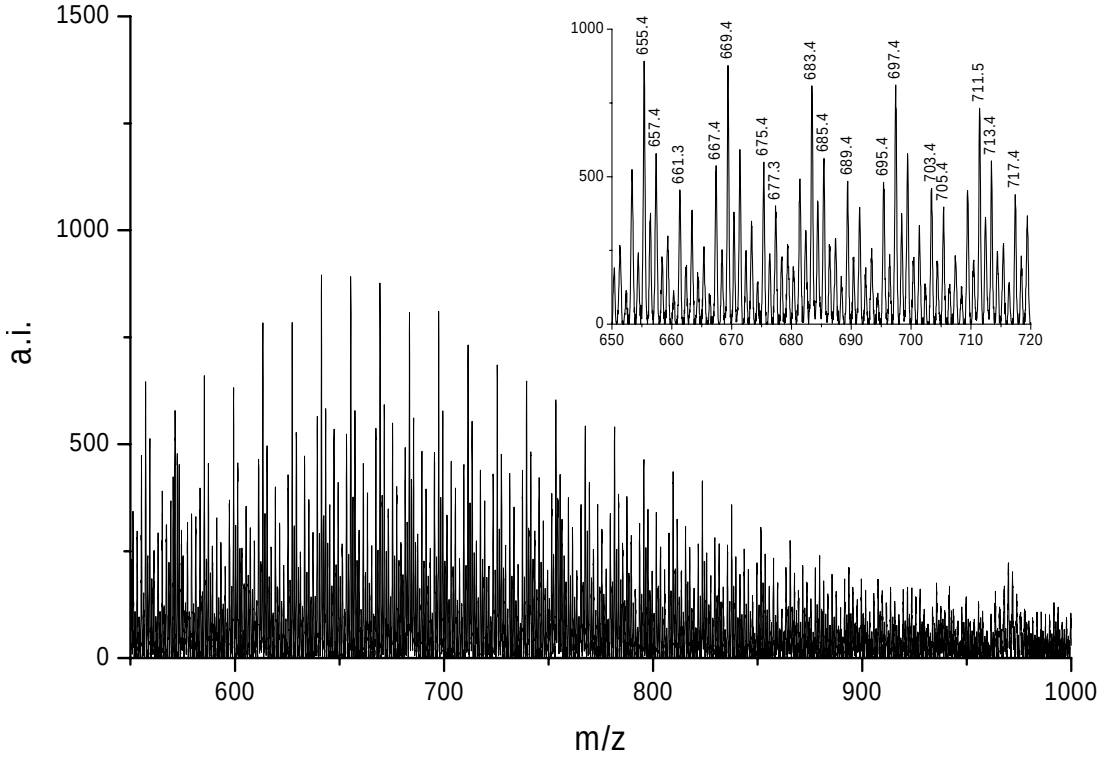



**Abb. 99. MALDI-TOF Spektrum von Wachs 5.**

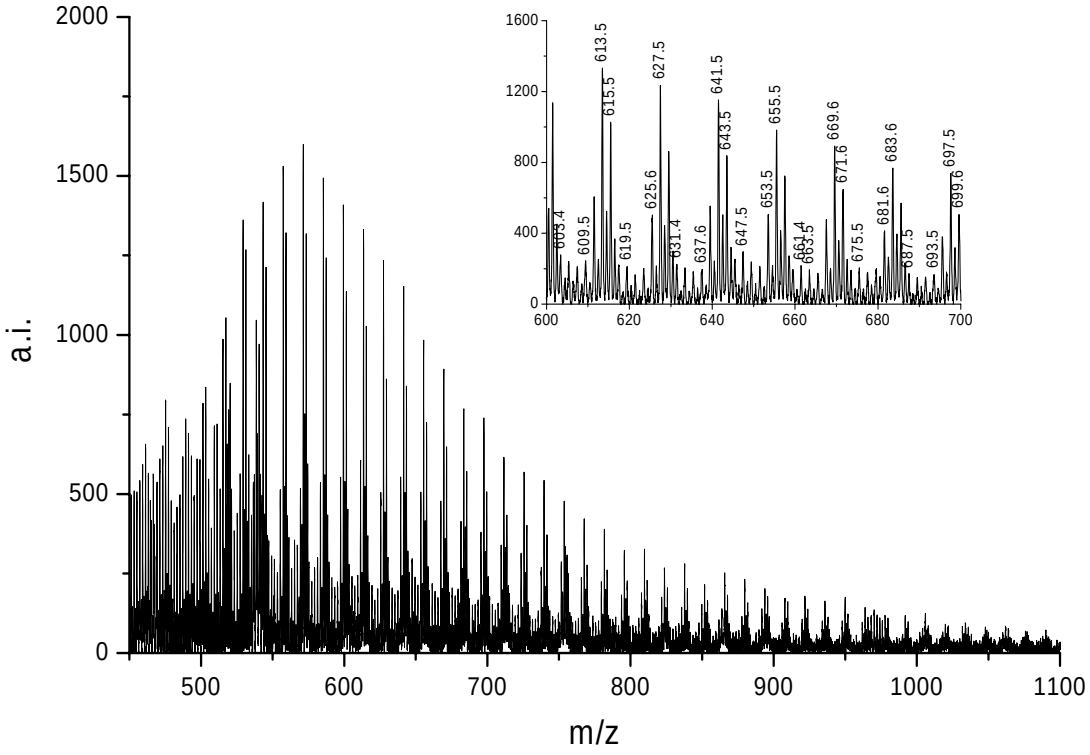



**Abb. 100. MALDI-TOF Spektrum von Wachs 6.**

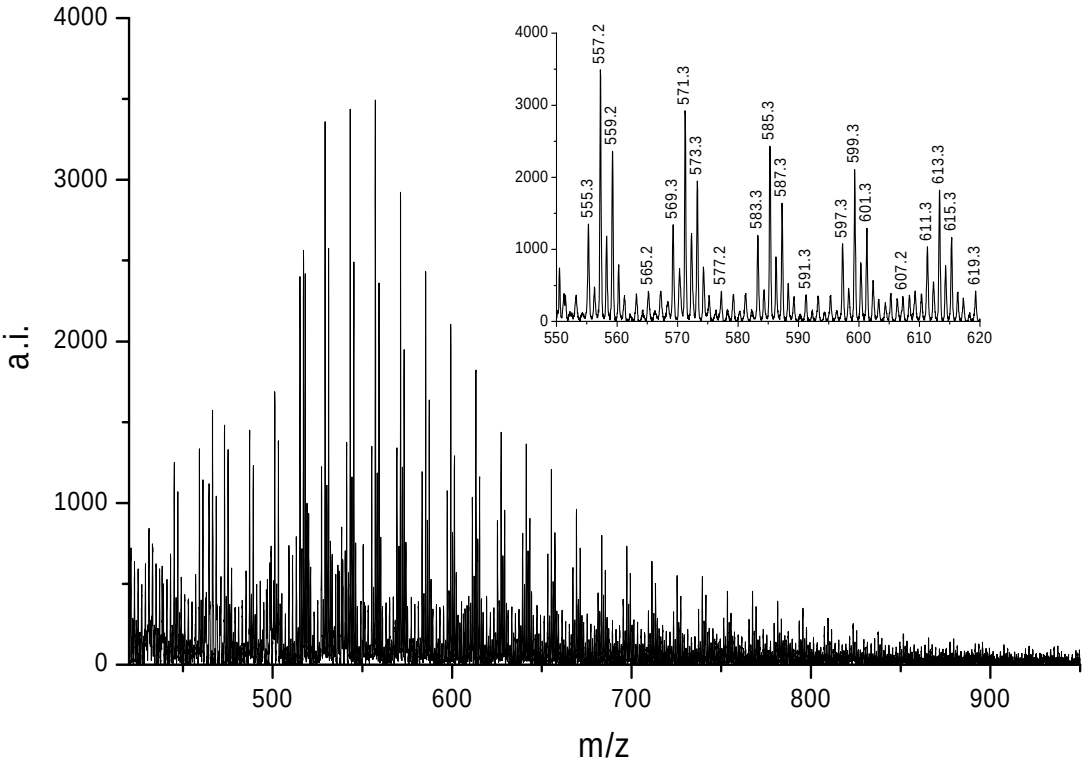



**Abb. 101. MALDI-TOF Spektrum von Wachs 7.**

# 8.3 Tabellenanhang

## 8.3.1 Ergebnistabelle der NMR-Versuche

**Tab. 24. Messwerte der NMR-Abschätzung des Anteils an $^{1}$H-Atomen in Methylverzweigungen, $^{13}$C-Atomen in aliphatischen Ringstrukturen, CN-Werte nach DIN 51378 sowie das Verhältnis aus Monocycloalkanen zu Alkanen (jeweils [M+$^{107}$Ag]$^{+}$) bei der MALDI-TOF MS**

| Probe | NMR: $^{1}$H in $CH_3$-Verzw. | NMR: $^{13}$C in Ringstruktur | $C_N$ nach DIN 51378 | MALDI 1/0 Verhältnis |
|---|---|---|---|---|
| **A** 1 | 29.4 % | 56.0 % | 34 % | 0.90 |
| **A** 2 | 29.3 % | 55.0 % | 35 % | 0.87 |
| **A** 3 | 29.6 % | 54.0 % | 36 % | 0.87 |
| **A** 4 | 29.3 % | 53.0 % | 37 % | 0.81 |
| **A** 5 | 31.5 % | 59.0 % | 39 % | 0.89 |
| **B** 1 | 34.0 % | 65.0 % | 43 % | 1.21 |
| **B** 2 | 33.1 % | 65.0 % | 39 % | 1.09 |
| **B** 3 | 30.8 % | 57.0 % | 38 % | 0.86 |
| **B** 4 | 30.7 % | 61.0 % | 39 % | 1.04 |
| **B** 5 | 32.3 % | 60.0 % | 39 % | 1.11 |
| **C** 1 | 37.8 % | 78.0 % | 46 % | 1.81 |
| **D** 2 | 34.9 % | 71.0 % | 42 % | 1.91 |

## 8.3.2 Tabellen zu Wollwachs und Wollwachsprodukten

Molmassen der üblicherweise bei Wollwäschen eingesetzten Tenside (Lithiumaddukte) siehe Tab. 25. Die Massen wurden entsprechend der Formel $C_nH_{(2n+2)}O(C_2H_4O)_mLi$ berechnet, wobei n die Kettenlänge des Fettalkohols und m den Ethoxylierungsgrad beschreibt. In Tab. 26 finden sich die Molmassen der Lithiumaddukte der Alkohole, Diole, Säuren und OH-Säuren. Die Molmassen sind nur für einige der möglichen Kettenlängen angegeben. Die Massen der Ionen mit anderen Kettenlängen lassen sich durch Hinzufügen oder Subtrahieren einer -$CH_2$-Gruppe berechnen.

**Tab. 25. Übersicht über die exakten Massen [Da] der Quasimolekülionen $[M+Li]^+$ der zur Wollwäsche eingesetzten nichtionischen Tenside. Die linke Spalte beschreibt den Ethoxylierungsgrad. $C_n$-EO: Massen der Lithiumaddukte des Fettalkohols der Kettenlänge x, NPEO: Exakte Molmassen der Lithiumaddukte von Nonylphenol Ethoxylat**

| EO | $C_9$-EO | $C_{10}$-EO | $C_{11}$-EO | $C_{12}$-EO | $C_{13}$-EO | NPEO |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **2** | 239.22 | 253.24 | 267.25 | 281.27 | 295.28 | 315.25 |
| **3** | 283.25 | 297.26 | 311.28 | 325.29 | 339.31 | 359.28 |
| **4** | 327.27 | 341.29 | 355.30 | 369.32 | 383.33 | 403.30 |
| **5** | 371.30 | 385.31 | 399.33 | 413.35 | 427.36 | 447.33 |
| **6** | 415.32 | 429.34 | 443.36 | 457.37 | 471.39 | 491.36 |
| **7** | 459.35 | 473.37 | 487.38 | 501.40 | 515.41 | 535.38 |
| **8** | 503.38 | 517.39 | 531.41 | 545.42 | 559.44 | 579.41 |
| **9** | 547.40 | 561.42 | 575.43 | 589.45 | 603.47 | 623.43 |
| **10** | 591.43 | 605.45 | 619.46 | 633.48 | 647.49 | 667.46 |

**Tab. 26. Übersicht über die exakten Massen [Da] der Quasimolekülionen $[M+Li]^+$ der Alkohole, Diole, Säuren und OH-Säuren, die in Wollwachs und Wollwachsprodukten auftreten können (Auswahl)**

| C-Zahl | Alkohol | Diol | Säure | OH-Säure |
|---|---|---|---|---|
| **12** | 193.21 | 209.21 | 207.19 | 223.19 |
| **16** | 249.28 | 265.27 | 263.26 | 279.25 |
| **20** | 305.34 | 321.33 | 319.32 | 335.31 |
| **22** | 333.37 | 349.37 | 347.35 | 363.35 |
| **24** | 361.40 | 377.40 | 375.38 | 391.38 |
| **26** | 389.43 | 405.43 | 403.41 | 419.41 |
| **28** | 417.46 | 433.45 | 431.44 | 447.44 |
| **30** | 445.40 | 461.49 | 459.48 | 475.47 |
| **32** | 473.52 | 489.52 | 487.51 | 503.50 |
| **34** | 501.56 | 517.55 | 515.54 | 531.53 |

Die Ester wurden nach der Formel M(Säure)+M(Alkohol)-M(Wasser)+M($Li^+$) berechnet. In Tab. 27 sind die Massen für einige der Kettenlängen angegeben. Die Kettenlänge gibt in diesem Falle die „Gesamtkette“ an, die durch Addieren der Kettenlängen von Säure und Alkohol entstehen. Fehlende Kettenlängen können durch Hinzufügen oder Subtrahieren einer oder mehrerer $CH_2$-Gruppen berechnet werden.

**Tab. 27. Übersicht über die exakten Massen [Da] der Quasimolekülionen $[M+Li]^+$ der Ester, OH-Ester und $(OH)_2$-Ester, die in Wollwachs und Wollwachsprodukten auftreten können (Auswahl)**

| C-Zahl | Ester | OH-Ester | $(OH)_2$-Ester |
|---|---|---|---|
| **26** | 403.56 | 419.41 | 435.40 |
| **30** | 459.48 | 475.47 | 491.47 |
| **34** | 515.54 | 531.53 | 547.53 |
| **38** | 571.60 | 587.60 | 603.59 |
| **42** | 627.66 | 643.66 | 659.65 |
| **46** | 683.72 | 699.72 | 715.72 |
| **50** | 739.79 | 755.78 | 771.78 |
| **54** | 795.85 | 811.85 | 827.84 |
| **58** | 851.91 | 867.91 | 883.90 |

Die Glyceride der Wollwachssäuren (Neocerit®) wurden nach der Formel M(Säure)+M(Glycerin)-M(Wasser)+M($Li^+$) berechnet. In Tab. 28 sind die Molmassen für einige der Kettenlängen angegeben. Die Kettenlänge gibt in diesem Falle die „Gesamtkette“ an, die durch Addieren der Kettenlängen der Säuren entstehen (Glycerin nicht mit einbezogen). Fehlende Kettenlängen können durch Hinzufügen oder Subtrahieren einer oder mehrerer -$CH_2$-Gruppen berechnet werden. Di- oder Triglyceride können durch die Addition der Molmasse einer weiteren Fettsäure oder Hydroxyfettsäure berechnet werden.

**Tab. 28. Übersicht über die exakten Massen [Da] der Quasimolekülionen $[M+Li]^+$ der Monoglyceride der in Wollwachs enthaltenen Fettsäuren und Hydroxyfettsäuren (Auswahl)**

| Kettenlänge | Glycerin-Monoester | | Glycerin-Monohydroxyester | |
|---|---|---|---|---|
| | $[M+Li]^+$ | $[M+Na]^+$ | $[M+Li]^+$ | $[M+Na]^+$ |
| **12** | 281.23 | 297.20 | 297.23 | 313.20 |
| **16** | 337.29 | 353.27 | 353.29 | 369.26 |
| **20** | 393.36 | 409.33 | 409.35 | 425.32 |
| **24** | 449.42 | 465.39 | 465.41 | 481.39 |
| **28** | 505.48 | 521.46 | 521.48 | 537.45 |
| **32** | 561.54 | 577.52 | 577.54 | 593.51 |
| **36** | 617.61 | 633.48 | 633.60 | 649.58 |
| **40** | 673.67 | 689.64 | 689.66 | 705.64 |
| **44** | 729.73 | 745.71 | 745.73 | 761.70 |

### 8.3.3 Tabellen zu Polyquaternium-10

In Tab. 29 sind die exakten Molmassen der Oligomere von Polyquaternium-10 aufgeführt. Die Berechnung wurde mit Hilfe der Summenformel:

$$C_6H_{16}NO_2\text{-}(C_6H_{10}O_5)_x\text{-}(C_2H_4O)_y$$

durchgeführt, wobei x die Anzahl der Glucose-Einheiten und y die der Ethylenoxidgruppen darstellt. Weitere Molekülmassen können durch das Hinzuaddieren der Molmassen von weiteren Glucose- oder Ethylenoxideinheiten berechnet werden.

**Tab. 29. Übersicht über die exakten Massen [Da] der Molekülionen $M^+$ der Hydrolysate von Polyquaternium-10 (Auswahl)**

| EO | 1 Glucose | 2 Glucosen | 3 Glucosen | 4 Glucosen |
|---|---|---|---|---|
| **0** | 296.17 | 458.22 | 620.28 | 782.33 |
| **1** | 340.20 | 502.25 | 664.30 | 826.36 |
| **2** | 384.22 | 546.28 | 708.33 | 870.39 |
| **3** | 428.25 | 590.30 | 752.36 | 914.41 |
| **4** | 472.28 | 634.33 | 796.38 | 958.43 |
| **5** | 516.30 | 678.36 | 840.41 | 1002.46 |
| **6** | 560.33 | 722.39 | 884.43 | 1046.49 |
| **7** | 604.35 | 766.41 | 928.46 | 1090.51 |
| **8** | 648.38 | 810.44 | 972.49 | 1134.54 |

## 8.3.4 Tabellen zu Guar-HPTMA

In Tab. 30 sind die exakten Molmassen der Oligomere von Guar-HPTMA aufgeführt. Die Berechnung wurde mit Hilfe der Summenformel:

$$C_6H_{16}NO_2\text{-}(C_6H_{10}O_5)_x$$

durchgeführt, wobei x die Anzahl der Hexose-Einheiten darstellt. Weitere Massen können durch das Hinzuaddieren der Masse von weiteren Hexose-Einheiten berechnet werden.

**Tab. 30. Übersicht über die exakten Massen [Da] der Molekülionen $M^+$ der Hydrolysate von Guar-HPTMA (Auswahl)**

| Hexosen | Masse [Da] | Hexosen | Masse [Da] |
|---|---|---|---|
| **1** | 296.17 | **5** | 944.38 |
| **2** | 458.22 | **6** | 1106.43 |
| **3** | 620.28 | **7** | 1268.49 |
| **4** | 782.33 | **8** | 1430.54 |

### 8.3.5 Tabellen zu Chitosan

In Tab. 31 sind die exakten Molmassen der Oligomere von Chitosan aufgeführt. Die Berechnung wurde mit Hilfe der Summenformel:

$$[H\text{-}(C_6H_{11}O_4N)_x\text{-}(C_2H_2O)_y\text{-}OH + Na]^+$$

durchgeführt, wobei x die Anzahl der Chito-Monomere und y die Menge der noch vorhandenen N-Acetylgruppen am Chitooligomer darstellt. Weitere Molekülmassen können durch das Hinzuaddieren der Masse von weiteren Chitosan-Einheiten bzw. N-Acetylgruppen berechnet werden.

**Tab. 31. Übersicht über die exakten Massen [Da] der Ionen $[M+Na]^+$ der Hydrolysate von Chitosan (Auswahl)**

| n | deacetyliert | 1 N-Acetylgr. | 2 N-Acetylgr. | 3 N-Acetylgr. |
|---|---|---|---|---|
| **1** | 202.07 | 244.08 | 286.09 | 328.10 |
| **2** | 363.14 | 405.15 | 447.16 | 489.17 |
| **3** | 524.21 | 566.22 | 608.23 | 650.24 |
| **4** | 574.28 | 727.29 | 769.30 | 811.31 |
| **5** | 846.34 | 888.35 | 930.37 | 972.38 |
| **6** | 1007.41 | 1049.42 | 1091.43 | 1133.44 |
| **7** | 1168.48 | 1210.49 | 1252.50 | 1294.51 |
| **8** | 1329.55 | 1371.56 | 1413.57 | 1455.58 |
| **9** | 1490.62 | 1532.63 | 1574.64 | 1616.65 |
| **10** | 1651.69 | 1693.70 | 1735.71 | 1777.72 |

## 8.4 Chemikalien- und Gefahrstoffanhang

**Tab. 32. Verwendete Chemikalien mit Gefahrstoffdaten. Merck = Merck, Darmstadt, Fluka = Fluka Chemika, Buchs (Schweiz), Larodan = Larodan Fine Chemicals AB, Malmö, Schweden, Sigma = Sigma, Steinheim, Aldrich = Aldrich, Steinheim**

| Substanz | Hersteller | R- und S-Sätze | Gef.-sym. |
|---|---|---|---|
| Aceton, p. A. | Merck | R: 11, S: 9-16-23.2-33 | F |
| Alkanstandards $C_{20}$, $C_{21}$, $C_{22}$, $C_{23}$, $C_{24}$, $C_{26}$, $C_{28}$, $C_{30}$, $C_{32}$, $C_{34}$, $C_{36}$, $C_{38}$ | Larodan | | |
| 3-Aminochinolin | Aldrich | R: 36/38, S: 26-36 | Xi |
| Anthracen | Fluka | R: 36/37/38-50/53 | Xi, N |
| | | S: 26-60-61 | |
| 9-Anthracencarbonsäure | Fluka | R: 36/38, S: 26-36 | Xi |
| 1,4-Bis(5-phenyl-2-oxazolyl)-benzol | Fluka | S: 22-24/25 | |
| tert-Butylmethylether, p. A. | Merck | R: 11, S: 9-16-29-43.3 | F |
| 9-Bromanthracen | Fluka | S: 22-24/25 | |
| 2-Brom-4,6-dinitroanilin | Aldrich | R: 20/21/22-36/37/38 | Xn |
| | | S: 26-37/39 | |
| Cäsiumhydroxid-hydrat | Aldrich | R: 22-35, S: 26-36/37/39-45 | C |
| 9-Chloranthracen | Fluka | S: 22-24/25 | |
| Chloroform, p. A. | Merck | R: 47-20/22-38-40-48 | F |
| | | S: 35-36/37 | |
| 5-Chlorsalicylsäure | Sigma | R: 22-36/38, S: 26-36 | Xn |
| 2,5-Dihydroxybenzoesäure | Aldrich | R: 22-36/37/38, S: 26-36 | Xn |
| Dithranol, >97% | Sigma | R: 36/37/38, S: 26 | Xi |
| Eisen(III)-chlorid-hexahydrat | Merck | R: 22-38-41, S: 26-39 | Xn |
| Ethanol, p. A. | Merck | R: 11, S: 7-16 | F |
| Ferulasäure, 99% | Aldrich | R: 36/37/38, S: 26-36 | Xi |
| L-Fucose | Aldrich | | |
| Glycerin, wasserfrei | Merck | | |
| Hexacontan | Fluka | | |
| n-Hexan, p. A. | Merck | R: 11-38-48/20-51/53-62-65-67 | F, Xn, N |
| | | S: 9-16-19-33-36/37-61-62 | |
| 2-(4'-Hydroxybenzolazo)benzoesäure | Aldrich | R: 36/37/38, S: 26-36 | Xi |
| 3-Hydroxy-$\alpha$-cyanozimtsäure | Sigma | R: 20/21/22-36/37/38 | Xn |
| | | S: 26-36 | |

| Substanz | Hersteller | R- und S-Sätze | Gef.-sym. |
|---|---|---|---|
| 4-Hydroxy-α-cyanozimtsäure | Sigma | R: 36/37/38, S: 26-36 | Xi |
| 3-Hydroxypicolinsäure | Aldrich | R: 36/37/38, S: 26-28 | Xi |
| 3-Indolylacrylsäure | Fluka | R: 36/37/38, S: 26-36 | Xi |
| Kaliumsulfat | Merck | | |
| Kationentauscher, Amberlyst 15, $H^+$ | Fluka | R: 36, S: 26-36 | Xi |
| Kationentauscher, Dowex 50 XV8, $Na^+$ | Fluka | R: 22-24/25 | Xi |
| Kupfer(II)-nitrat-trihydrat | Merck | R: 22-36/38-50/53, S: 61 | Xn, N |
| Lithiumchlorid | Merck | R: 22-36/38, S: 26 | Xn |
| Methanol, p. A. | Merck | R: 11-23/24/25-39/23/24/25 | F, T |
| | | S: 7-16-36/37-45 | |
| 5-Methoxysalicylsäure | Aldrich | R: 36/37/38, S: 26-36 | Xi |
| Nicotinsäure, 98% | Aldrich | R: 36/37/38, S: 26-36 | Xi |
| 9-Nitroanthracene | Aldrich | S: 23-24/25 | |
| 2-Nitrophenyl-dodecylether | Fluka | S: 23-24/25 | |
| 2-Nitrophenyl-octylether | Fluka | S: 23-24/25 | |
| Octyl-D-glucopyranosid | Fluka | | |
| Palladium(II)-acetylacetonat | Fluka | R: 36/37/38 | Xn |
| | | S: 26-36 | |
| trans-Retinolsäure | Fluka | R: 22-36/37/38-63, | Xn |
| | | S: 36/37/39 | |
| Silbernitrat | Merck | R: 34, S: 26-45 | C |
| Silbertrifluoroacetat | Aldrich | R: 36/38, S: 26-36 | Xi |
| Sinapinsäure, p. A. | Fluka | R: 36/37/38, S: 26-36 | Xi |
| Squalen, > 98% Reinheit | Sigma | | |
| Sulfanilsäure, p. A. | Fluka | R: 36/38-43, S: 24-37 | Xi |
| Tetrachlorgold(III)-säure | Merck | R: 22-34, S: 26-36/37/39-45 | C |
| Tetracontan | Fluka | | |
| Tetrahydrofuran, p. A. | Merck | R: 11-19-36/37, S: 16-29-33 | F, Xi |
| Tetrapentacontan | Fluka | | |
| 2,4,6-Trihydroxyacetophenon | Fluka | R: 36/37/38, S: 26-36 | Xi |
| Zinkchlorid, p. A. | Merck | R: 34-50/53 | C, N |
| | | S: 7/8-28.1-45-60-61 | |

**Tab. 33. Übersicht der untersuchten Rohstoffe**

| ***Rohstoff*** | **Hersteller** |
|---|---|
| *Cera microcristallina* | Schümann Sasol, Hamburg; Kahl und Co., Trittau; Paramelt B.V., Heerhugowaard, Niederlande; Koster Keunen Holland BV, Bladel, Niederlande |
| *Petrolatum* | Crompton B.V., Amsterdam, Niederlande |
| *Paraffinum liquidum* | Shell & DEA Oil AG, Hamburg; Merkur Vaseline GmbH, Hamburg; Quosmocimica, Sao Paolo, Brasilien; Hansen & Rosenthal, Hamburg; (RAM Oil, Casalnuovo di Napoli, Italien; Quimicos y Derivados S.A. de C.V., Salamanca, Mexico; Citgo, Tulsa, OK, USA. |
| *Wollwachs* | Lanolin PAS: (Lanolines Stella SA, Mouscron, Belgien), Wollwachs PAP (Lanolines de la Tosser, Tourcoing, Frankreich), Wollwachs SP (Lanolin Trading Company, Christchurch, Neuseeland) und Wollwachs NZ (Bremer Woll-Kämmerei, Bremen, Deutschland), Neutralwollfett AHB, Imperial-Oel-Import, Hamburg |
| *Wollwachsalkohole (Eucerit®)* | Eucerit PA (Beiersdorf, Hamburg) |
| *Wollwachssäuren* | Wollwachssäuren, destilliert (Beiersdorf, Hamburg) |
| *Glyceryl Lanolate (Neocerit®)* | Neocerit (Beiersdorf, Hamburg) |
| *Chitosane* | *Chitosane:* *„Chitosan 14“* und *„Chitosan 18“*, niedermolekularere Chitosane, Sven Krohn, Pharmazeutisches Institut, Universität Kiel. *Chitosan Oligomer 2-6* (Seikagaku America, East Falmouth, MA (USA)), *Chitosan 3880* (Dalwoo chitoSan, Korea), *ChitoClear™ TM 615*, *Chitosan LVCG* Batch TD 124, TD 127 und TM 888 (Primex, Siglufjordur (Island)) und Chitosan (150 kDa, Fluka, Buchs (Schweiz)) |
| *Pullulane* | Pullulan 22 kDa und Pullulan 2,9 kDa, Fluka, Buchs |
| *Dextran* | Dextran from Leuconostoc spp. 6 kDa, Fluka, Buchs (Schweiz) |
| *Polyquaternium-10* | Polyquaternium-10 (UCARE JR125 und JR400, Amerchol, NJ, (USA)) |
| *Guar-HPTMA* | Jaguar Excel (Rhodia, NJ (USA)), Cosmedia (Cognis, Düsseldorf) |

# 9 Literaturverzeichnis

[1] Umbach, W. [Hrsg.]: *Kosmetik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1995)

[2] *The Lanolin Book*, 1., *Edition Beiersdorf*, Beiersdorf AG, 286, Hamburg (1999)

[3] Karas, M., Hillenkamp, F.: *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons*. Anal. Chem. **60** (1988) 2299-2301

[4] Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T.: *Protein and polymer analysis up to m/z 100000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **2** (1988) 151-153

[5] Karas, M., Bahr, U., Ingendoh, A., Hillenkamp, F.: *Laserdesorptions-Massenspektrometrie von Proteinen mit Molmassen zwischen 100000 und 250000 Dalton*. Angew. Chem. **6** (1989) 805-806

[6] Zhang, Q., Zou, H., Guo, Z., Zhang, Q., Chen, X., Ni, J.: *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using porous silicon and silica gel as matrix*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **15** (2001) 217-223

[7] Guo, Z., Zhang, Q., Zou, H., Guo, B., Ni, J.: *A method for the analysis of low-mass molecules by MALDI-TOF mass spectrometry*. Anal. Chem. **74** (2002) 1637-1641

[8] Kaufmann, R., Kirsch, D., Spengler, B.: *Sequencing of peptides in a time-of-flight mass spectrometer: Evaluation of postsource decay following matrix-assisted laser desorption ionisation (MALDI)*. Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. **131** (1994) 355-385

[9] Cohen, S. L., Chait, B. T.: *Influence of matrix solution conditions on the MALDI-MS analysis of peptides and proteins*. Anal. Chem. **68** (1996) 31-37

[10] Green-Church, K. B., Limbach, P. A.: *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of hydrophobic peptides*. Anal. Chem. **70** (1998) 5322-5325

[11] Danis, P. O., Karr, D. E., Mayer, F., Holle, A., Watson, C. H.: *The analysis of water-soluble polymers by matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry*. Org. Mass Spectrom. **27** (1992) 843-846

[12] Okada, T.: *Complexation of poly(oxyethylene) in analytical chemistry - A review*. Analyst **118** (1993) 959-969

[13] Bahr, U., Deppe, A., Karas, M., Hillenkamp, F., Giessmann, U.: *Mass spectrometry of synthetic polymers by UV-matrix-assisted laser desorption/ionization*. Anal. Chem. **64** (1992) 2866-2869

[14] Weidner, S. M., Kühn, G., Just, U.: *Characterization of oligomers in poly(ethyleneterephthalate) by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **9** (1995) 697-702

[15] Pasch, H., Resch, M.: *Polymeranalytik mit MALDI-MS*. GIT Fachz. Lab **2/96** (1996) 90-95

[16] Latourte, L., Blais, J.-C., Tabet, J.-C., Cole, R. B.: *Desorption behavior and distributions of fluorinated polymers in MALDI and electrospray ionization mass spectrometry*. Anal. Chem. **69** (1997) 2742-2750

[17] Tang, X., Dreifuss, P. A., Vertes, A.: *New matrices and accelerating voltage effects in matrix-assisted laser desorption/ionization of synthetic polymers*. Rapid Commun. Mass spectrom. **9** (1995) 1141-1147

[18] Wu, K. J., Odom, R. W.: *Characterizing synthetic polymers by MALDI MS*. Anal. Chem. **70** (1998) 456 A

[19] Macha, S. F., Limbach, P. A., Savickas, P. J.: *Application of nonpolar matrices for the analysis of low molecular weight nonpolar synthetic polymers by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **11** (2000) 731-737

[20] McEwen, C. N., Peacock, P. M.: *Mass spectrometry of chemical polymers*. Anal. Chem. **74** (2002) 2743-2748

[21] Przybilla, L., Francke, V., Räder, H. J., Müllen, K.: *Block lenght determination of a poly(ethylene oxide)-b-poly(p-phenylene ethynylene) diblock copolymer by means of MALDI-TOF mass spectrometry combined with fragment-ion analysis*. Macromolecules **34** (2001) 4401-4405

[22] Benomar, S. H., Clench, M. R., Allen, D. W.: *The analysis of alkylphenol ethoxysulphonate surfactants by high-performance liquid chromatography, liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption ionisation-mass spectrometry*. Anal. Chim. Acta **445** (2001) 255-267

[23] Bartsch, H., Straßner, M., Hintze, U.: *Characterization and identification of ethoxylated surfactants by matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Tenside Surf. Det. **35** (1998) 94-102

[24] Burgers, P. C., Terlouw, J. K.: *Monoisotopic $^{65}Cu^{+}$ attachments to polystyrene*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **12** (1998) 801-804

[25] Danis, P. O., Karr, D. E., Xiong, Y., Owens, K. G.: *Methods for the analysis of hydrocarbon polymers by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **10** (1996) 862-868

[26] Deery, M. J., Jennings, K. R., Jasieczek, C. B., Haddleton, D. M., Jackson, A. T., Yates, H. T., Scrivens, J. H.: *A study of cation attachment to polystyrene by means of matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **11** (1997) 57-62

[27] Guo, B., Rashidezadeh, H., Wang, Y.: *MALDI-TOF analysis of polystyrenes*. Proceedings 29th ACS National meeting in San Francisco, Ca (2000)

[28] Guttman, C. M., Wetzel, S. J., Blair, W. R., Fanconi, B. M., Girard, J. E., Goldschmidt, R. J., Wallace, W. E., VanderHart, D. L.: *NIST-sponsored interlaboratory comparison of polystyrene molecular mass distribution obtained by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: Statistical analysis*. Anal. Chem. **73** (2001) 1252-1262

[29] Macha, S. F., Limbach, P. A., Hanton, S. D., Owens, K. G.: *Silver cluster interferences in matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry of nonpolar polymers*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **12** (2001) 732-743

[30] Rashidezadeh, H., Guo, B.: *Investigation of metal attachment to polystyrenes in matrix-assisted laser desorption ionization*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **9** (1998) 724-730

[31] Rashidezadeh, H., Hung, K., Guo, B.: *Probing polystyrene cationization in matrix-assisted laser desorption/ionization*. Eur. Mass Spectrom. **4** (1998) 492-433

[32] Thomson, J. J.: *On the Masses of the Ions in Gases at Low Pressures*. Philosophical Magazine **48** (1899) 547-567

[33] Aston, F. W.: *Isotopes and Atomic Weights*. Nature **105** (1920) 617

[34] Aston, F. W.: *A Positive Ray Spectrograph (Plate IX)*. London, Edinburgh and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science **6** (1919) 709

[35] Dempster, A. J.: *A new method of positive ray analysis*. Phys. Rev. **11** (1918) 316-324

[36] Ewald, H., Hinterberger, H.: *Methoden und Anwendungen der Massenspektrometrie*, Verlag Chemie, Weinheim (1953)

[37] Lehmann, W. D.: *Massenspektrometrie in der Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg (1996)

[38] Dole, M., Mack, L. L., Hines, R. L., Mobley, R. C., Ferguson, L. D., Alice, M. B.: *Molecular beams of macroions.* J. Chem. Phys. **49** (1968) 2240-2249

[39] Clegg, G. A., Dole, M.: *Molecular beams of macroions. III. Zein and polyvinyl-pyrrolidone*. Biopolymers **10** (1971) 821-826

[40] Severin, D.: *Molekülionenmassenspektrometrie zur Analyse hoch- und niedrig siedender Kohlenwasserstoffgemische*. Erdöl und Kohle **1** (1976) 13-18

[41] Severin, D., Oelert, H. H., Bergmann, G.: *Ein neues Verfahren der massenspektrometrischen Analyse von hochsiedenden Mineralölfraktionen*. Erdöl und Kohle **25** (1972) 514-521

[42] *Principles of field ionization and field desorption mass spectrometry*, Pergamon Press, (1977)

[43] Cameron, A. E., Eggers, D. E.: Rev. Sci. Instrum. **19** (1948) 605-607

[44] Ionov, N. I., Mamyrin, M. A.: J. Tech. Phys. **23** (1953) 2101

[45] Wiley, W. C., McLaren, I. H.: Rev. Sci. Instrum. **26** (1955) 1150

[46] Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U.: *Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of nonvolatile compounds*. Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. **78** (1987) 53-68

[47] Karas, M., Bahr, U., Gießmann, U.: *Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry*. Mass Spectrom. Rev. **10** (1991) 335-357

[48] Mamyrin, M. A.: *Laser assisted reflectron time-of-flight mass spectrometry*. Int. J. Mass Spectrom. **131** (1994) 1-19

[49] Ehring, H., Karas, M., Hillenkamp, F.: *Role of photoionization and photochemistry in ionization processes of matrix-assisted laser*

*desorption ionization mass spectrometry*. Org. Mass Spectrom. **27** (1992) 472-480

[50] Macha, S. F., McCarley, T. D., Limbach, P. A.: *Influence of ionization energy on charge-transfer ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Ananlytica chimica acta **397** (1999) 235-245

[51] Spengler, B., Kirsch, D., Kaufmann, R.: *Fundamental aspects of postsource decay in Matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. 1. Residual gas effects*. J. Phys. Chem. **96** (1992) 9678-9684

[52] Standing, K. G., Ens, W.: *Methods and mechanisms for producing ions from large molecules*, Plenum Press, New York (1991)

[53] Zenobi, R., Knochenmuss, R.: *Ion formation in maldi mass spectrometry*. Mass Spectrom. Rev. **17** (1998) 337-366

[54] Lin, Q., Knochenmuss, R.: *Two-photon ionization thresholds of matrix-assisted laser desorption/ionization matrix clusters*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **15** (2001) 1422-1426

[55] Ogawa, T., Mizutani, M., Inoue, T.: *Dependence of the laser two-photon ionization process in solution on the laser pulse width*. Anal. Chem. **73** (2001) 2066-2069

[56] Krüger, R., Pfenninger, A., Fournier, I., Glückmann, M., Karas, M.: *Analyte incorporation and ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization visualized by pH indicator molecular probes*. Anal. Chem. **73** (2001) 5812-5821

[57] Westmacott, G., Ens, W., Hillenkamp, F., Dreisewerd, K., Schürenberg, M.: *The influence of laser fluence on ion yield in matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry*. Int. J. Mass Spectrom. **221** (2002) 67-81

[58] Krüger, R., Karas, M.: *Formation of fate ion pairs during MALDI analysis: Anion adduct generation as an indicative tool to determine ionization processes*. J. Am. Chem. Soc. Mass Spectrom. **13** (2002) 1218-1226

[59] Berkenkamp, S., Menzel, C., Hillenkamp, F., Dreisewerd, K.: *Measurements of mean initial velocities of analyte and matrix ions in infrared matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry*. J. Am. Chem. Soc. Mass Spectrom. **13** (2002) 209-220

[60] Fournier, I., Brunot, A., Tabet, J. C., Bolbach, G.: *Delayed extraction experiments using a repulsive potential before ion extraction: Evidence of clusters as ion precursers in UV-MALDI. Part I: Dynamical effects with the matrix 2,5-dihydroxybenzoic acid*. Int. J. Mass Spectrom. **213** (2002) 203-215

[61] Fournier, I., Tabet, J. C., Bolbach, G.: *Irradiation effects in MALDI and surface modifications. Part I: Sinapinic acid monocrystals*. Int. J. Mass Spectrom. **219** (2002) 515-523

[62] Bourcier, S., Bouchonnet, S., Hoppilliard, Y.: *Ionization of 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) matrix-assisted laser desorption/ionization experiments and theoretical study*. Int. J. Mass Spectrom. **210/211** (2001) 59-69

[63] Knochenmuss, R.: *A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization*. J. Mass Spectrom. **37** (2002) 867-877

[64] Ohanessian, G.: *Interaction of MALDI matrix molecules with $Na^+$ in the gas phase*. Int. J. Mass Spectrom. **219** (2002) 577-592

[65] Nielen, M. W. F.: *MALDI time-of-flight mass spectrometry of synthetic polymers*. Mass Spectrom. Rev. **18** (1999) 309-344

[66] Williams, J. B., Gusev, A. I., Hercules, D. M.: *Use of liquid matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization of polyglycols and poly(dimethylsiloxanes)*. Macromolecules **29** (1996) 8144-8150

[67] Bruker: *Ionisierung hochmolekularer Substanzen durch Laserdesorption aus flüssigen Matrices*, Deutsches Patent, DE 198 34 070 A1 (2000)

[68] Armstrong, D. W., Zhang, L.-K., He, L., Gross, M. L.: *Ionic liquids as matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Anal. Chem. **73** (2001) 3679-3686

[69] Williams, T. L., Fenselau, C.: *p-Nitroaniline/glycerol: a binary liquid matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization analysis*. Eur. J. Mass Spectrom. **4** (1998) 379-383

[70] Beavis, R. C.: *Matrix-assisted ultraviolet laser desorption: Evolution and principles*. Org. Mass Spectrom. **27** (1992) 653-659

[71] Przybilla, L., Brand, J.-D., Yoshimura, K., Räder, H.-J., Müllen, K.: *MALDI-TOF mass spectrometry of insoluble giant polycyclic aromatic hydrocarbons by a new method of sample preparation*. Anal. Chem. **72** (2000) 4591-4597

[72] Trimpin, S., Rouhanipour, A., Az, R., Räder, H. J., Müllen, K.: *New aspects in MALDI-TOF MS - an universal solvent-free sample preparation*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **15** (2001) 1364-1373

[73] Krutchinsky, A. N., Chait, B. T.: *On the nature of the chemical noise in MALDI mass spectra*. J. Am. Chem. Soc. Mass. Spectrom. **13** (2002) 129-134

[74] Günther, H.: *NMR Spectroscopy*, 2., John Wiley & Sons, New York (1994)

[75] Herzog, W.-D., Messerschmidt, M.: *NMR-Spektrometrie für Anwender*, 1., Gruber, U. and Klein, W.: *Die Praxis der instrumentellen Analytik*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, 194, Weinheim (1995)

[76] Griesbaum, K., Behr, A., Biedenkapp, D., Voges, H.-W., Garbe, D., Paetz, C., Collin, G., Mayer, D., Höke, H.: *Hydrocarbons* In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Eds. Gerhartz, W. and Elvers, B., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1989), pp. 1-21

[77] CTFA: *International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook*, 9. Auflage (Online Edition), Wenninger, J. A. and McEwen, G. N.: The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, Washington, DC (2003)

[78] *DIN 51378*, Deutsches Institut für Normung e.V., (1994)

[79] Kurtz, S. S., Jr., King, R. W., Stout, W. J., Partikian, D. G., Skrabek, E. A.: *Relationship between carbon-type composition, viscosity-gravity constant, and refractivity intercept of viscous fractions of petroleum*. Anal. Chem. **28** (1956) 1928-1936

[80] Heath, D. J., Lewis, C. A., Rowland, S. J.: *The use of high temperature gas chromatography to study the biodegradation of high molecular weight hydrocarbons*. Org. Geochem. **26** (1997) 769-785

[81] Dutta, T. K., Harayama, S.: *Time-of-flight mass spectrometric analysis of high-molecular-weight alkanes in crude oil by silver nitrate chemical ionization after laser desorption*. Anal. Chem. **73** (2001) 864-869

[82] Wang, Z., Fingas, M.: *Developments in the analysis of petroleum hydrocarbons in oils, petroleum products and oil-spill-related environmental samples by gas chromatography*. J. Chromatogr. **774** (1997) 51-78

[83] Kühn, G., Weidner, S., Just, U., Hohner, G.: *Characterization of technical waxes - Comparison of chromatographic techniques and*

*matrix-assisted laser-desorption/ionization mass spectrometry*. J. Chromatogr. **732** (1996) 111-117

[84] Braun, O.: *Verfahren zur Abscheidung und Reinigung von Wollfett in Form einer Lanolin genannten Verbindung desselben mit Wasser*, Deutsches Patent, (1882)

[85] Husemann, T.: *Zur Vorgeschichte des Lanolins.*, Janus: *Arch. Internat. pour l'histoire de la medicine et pour la geographie medicale*, 42-47, 132-142, 219-226, 313-324, 414-428, (1896-1897)

[86] Barnett, G.: *Lanolin and Derivates*. Cosm. Toilet. **101** (1986) 21-44

[87] Downing, D. T., Strauss, J. S., Ramasastry, P., Abel, M., Lees, C. E., Pochi, P. E.: *Measurement of the time between synthesis and surface excreation of sebaceous lipids in sheep and man*. J. Invest. Dermatol. **64** (1975) 215-219

[88] Chemtob, C., Fawaz, F., Puisieux, F.: *Analyse des pommades, des huiles et des cires XIX. Étude de la composition chimique d'un échantillon de lanoline cireuse. I. Fractionnement et étude des acides.* Ann. Pharm. Franc. **33** (1975) 109-118

[89] Downing, D. T., Kranz, Z. H., Murray, K. E.: *Studies in Waxes. XIV. An investigation of the aliphatic constituents of hydrolysed wool wax by gas chromatography*. Austr. J. Chem. **13** (1960) 80-94

[90] Fawaz, F., Miet, C., Puisieux, F.: *Analyse des pommades, huiles et des cires. XII. Étude de la composition chimique de la lanoline. I. Examen préliminaire et fractionement de l'échantillon étudié.* Ann. Pharm. Franc. **31** (1973) 63-73

[91] Moldovan, Z., Jover, E., Bayona, J. M.: *Gas chromatographic and mass spectrometric methods for the characterisation of long-chain fatty acids: Application to wool wax extracts*. Analytica Chimica Acta **465** (2002) 359-378

[92] Challinor, J. M.: *A rapid simple pyrolysis derivatisation gas chromatography-mass spectrometry method for profiling of fatty acids in trace quantities of lipids*. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis **37** (1996) 185-197

[93] Hudson, S. M., Jenkins, D. W.: *Chitin and Chitosan* In: *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. Eds. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (2001), pp.

[94] Letzel, M. C., Synstad, B., Eijsink, V. G. H., Peter-Katalinic, J., Peter, M. G.: *Libraries of chito-oligosaccharides of mixed acetylation patterns*

*and their interactions with chitinases*. Advan. Chitin Sci. **4** (2000) 545-551

[95] Wilke, O., Mischnick, P.: *Analysis of cationic starches: determination of the substitution pattern of O-(2-hydroxy-3-trimethylammonium)propyl ethers*. Carbohydr. Res. **275** (1995) 309-318

[96] Bodek, K. H.: In: *Chitin World*. Eds. Karnicki, Z. S., Bzeeski, M. M., Bykowski, P. J. and Wojtasz-Pajak, A., Verlag für neue Wissenschaft GmbH, Bremerhaven (1994), pp. 456-461

[97] Mowat, I. A., Donovan, R. J.: *Metal-Ion attachment to non-polar polymers during laser desorption/ionization at 337 nm*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **9** (1995) 82-90

[98] Holden, N. E.: *Table of the Isotopes* In: *Handbook of Chemistry and Physics*. Eds. Lide, D. R., CRC Press, Boca Raton, New York, London, Tokyo (1995), pp. 11-38ff

[99] Ayorinde, F. O., Gelain, S. V., Johnson, J. H., Wan, J., Wan, L. W.: *Analysis of some commercial polysorbate formulations using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **14** (2000) 2116-2124

[100] Bartsch, H.: *MALDI-TOF-Massenspektrometrie*, Dissertation, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg (1998)

[101] Mele, A., Malpezzi, L.: *Noncovalent association phenomena of 2,5-dihydroxybenzoic acid with cyclic and linear oligosaccharides. A matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric and x-ray crystallographic study*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **11** (2000) 228-236

[102] Ayorinde, F. O.: *Determination of the molecular distribution of triacylglycerol oils using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.* Lipid Technology **3** (2000) 41-44

[103] Ayorinde, F. O., Elhilo, E., Hlongwane, C., Saeed, K. A.: *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of vernonia galamensis oil*. JAOCS **76** (1999) 1217-1221

[104] Asbury, G. R., Al-Saad, K., Siems, W. F., Hannan, R. M., Hill, J. H. H.: *Analysis of trialcylglycerols and whole oils by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **10** (1999) 983-991

[105] Pastor, S. J., Wilkins, C. L.: *Analysis of hydrocarbon polymers by matrix-assisted laser desorption/ionization-fourier transform mass spectrometry*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **8** (1997) 225-233

[106] Ji, H., Sato, N., Nakamura, Y., Wan, Y., Howell, A., Thomas, Q. A., Storey, R. F., Nonidez, W. K., Mays, J. W.: *Characterization of polyisobutylene by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*. Macromolecules **35** (2002) 1196-1199

[107] Spickermann, J., Räder, H.-J., Müllen, K., Müller, B., Gerle, M., Fischer, K., Schmidt, M.: *MALDI-TOF characterization of macromonomers*. Macromol. Rapid Commun. **17** (1996) 885-896

[108] Kéki, S., Deák, G., Zsuga, M.: *Copper(I) chloride: a simple salt for enhancement of polystyrene cationization in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **15** (2001) 675-678

[109] McCarly, T. D., McCarly, R. L., Limbach, P. A.: *Electron-transfer ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Anal. Chem. **70** (1998) 4376-4379

[110] Mahon, A., Kemp, T. J., Varney, J. E., Derrick, P. J.: *Ions derived from linear polysulfide oligomers using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Polymer **39** (1998) 6213-6217

[111] Preston-Schaffter, L. M., Kinsel, G. R., Russel, D.: *Effects of heavy-atom substituents on matrices used for matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry*. Am. soc. mass spectrom. **5** (1994) 800-806

[112] Horneffer, V., Dreisewerd, K., Ludemann, H.-C., Hillenkamp, F., Lage, M., Strupat, K.: *Is the incorporation of analytes into matrix crystals a prerequisite for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry? A study of five positional isomers of dihydroxybenzoic acid*. International Journal of Mass Spectrometry **185-187** (1999) 859-870

[113] Gmelin: *Handbuch der anorganischen Chemie*, *Silber*, Springer Verlag, Berlin (1975)

[114] Pasch, H., Schrepp, W.: *MALDI-TOF mass spectrometry of synthetic polymers*, 1., Springer Verlag, 297, Berlin, Heidelberg, New York (2003)

[115] Skelton, R., Dubois, F., Zenobi, R.: *A MALDI sample preparation method suitable for insoluble polymers*. Anal. Chem. **72** (2000) 1707-1710

[116] Trimpin, S., Grimsdale, A. C., Räder, H. J., Müllen, K.: *Characterization of an insoluble poly(9,9-diphenyl-2,7-fluorene) by solvent-free sample preparation for MALDI-TOF mass spectrometry*. Anal. Chem. **74** (2002) 3777-3782

[117] Felton, M. J., Harris, C. M.: *Quantitative synthetic polymer mass spectrometry workshop at the National Institute of Standards and Technology*. Anal. Chem. (2003) 54A

[118] Amado, F. M. L., Domingues, P., Santana-Marques, M. G., Ferrer-Correira, A. J., Tomer, K. B.: *Discrimination effects and sensitivity variations in Matrix-assisted laser desorption/Ionization*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **11** (1997) 1347-1352

[119] Murgasova, R., Hercules, D. M.: *MALDI of synthetic polymers - an update*. Int. J. Mass Spectrom. **226** (2003) 151-162

[120] Chen, R., Zhang, N., Tseng, A. M., Li, L.: *Effects of matrix-assisted laser desorption/ionization experimental conditions on quantitative compositional analysis of ethylene oxide/propylene oxide copolymers*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **14** (2000) 2175-2181

[121] Chen, R., Yalcin, T., Wallace, W. E., Guttman, C. M., Li, L.: *Laser desorption ionization and MALDI time-of-flight mass spectrometry for low molecular mass polyethylene analysis*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **12** (2001) 1186-1192

[122] Papke, B. L., Ratner, M. A., Shriver, D. F.: *Vibrational spectroscopy and structure of polymer electrolytes, poly(ethylene oxide) complexes of alkali metal salts*. J. Phys. Chem. Solids **42** (1981) 493-500

[123] Lehmann, E., Knochenmuss, R., Zenobi, R.: *Ionization mechanisms in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: contribution of pre-formed ions*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **11** (1997) 1483-1492

[124] Knochenmuss, R., Zenobi, R.: *MALDI ionization: The role of in-plume processes*. Chem. Rev. **103** (2003) 441-452

[125] Karas, M., Krüger, R.: *Ion formation in MALDI: The cluster ionization mechanism*. Chem. Rev. **103** (2003) 427-439

[126] Karas, M., Glückmann, M., Schäfer, J.: *Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors*. J. Mass Spectrom. **35** (2000) 1-12

[127] Chen, R., Li, L.: *Reactions of atomic transition-metal ions with long chain alkanes*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **12** (2001) 367-375

[128] Gross, J. H., Weidner, S. M.: *Influence of electric field strength and emitter temperature on dehydrogenation and C-C cleavage in field desorption mass spectrometry of polyethylene oligomers*. Eur. J. Mass Spectrom. **6** (2000) 11-17

[129] Klesper, G., Röllgen, F. W.: *Field-Induced Ion Chemistry Leading to the Formation of (M-2nH)(+) and (2M-2mH)(+) Ions in Field Desorption Mass Spectrometry of Saturated Hydrocarbons*. J. Mass Spectrom. **31** (1996) 383-388

[130] Heine, C. E., Geddes, M. M.: *Field-dependent $[M-2H]^+$ formation in the field desorption mass spectrometric analysis of hydrocarbon samples*. Org. Mass Spectrom. **29** (1994) 277-282

[131] Gross, J. H., Vékey, K., Dallos, A.: *Field desorption mass spectrometry of large multiply branched saturated hydrocarbons*. J. Mass Spectrom. **36** (2001) 522-528

[132] Pruns, J. K., Vietzke, J.-P., Strassner, M., Rapp, C., Hintze, U., König, W. A.: *Characterization of low molecular weight hydrocarbon oligomers by laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using a solvent-free sample preparation method*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **16** (2002) 208-211

[133] Schriemer, D. C., Li, L.: *Mass discrimination in the analysis of polydisperse polymers by MALDI time-of-flight mass spectrometry. 1. Sample preparation and desorption/ionization issues*. Anal. Chem. **69** (1997) 4169-4175

[134] Schriemer, D. C., Li, L.: *Mass discrimination in the analysis of polydisperse polymers by MALDI time of-flight mass spectrometry. 2. Instrumental issues*. Anal. Chem. **69** (1997) 4176-4183

[135] Martin, K., Spickermann, J., Räder, H. J., Müllen, K.: *Why does matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry give incorrect results for broad polymer distributions?* Rapid Commun. Mass Spectrom. **10** (1996) 1471-1474

[136] Byrd, H. C. M., McEwen, C.: *The limitations of MALDI-TOF mass spectrometry in the analysis of wide polydisperse polymers*. Anal. Chem. **72** (2000) 4568-4576

[137] Hanton, S. D., Liu, X. M.: *GPC separation of polymer samples for MALDI analysis*. Anal. Chem. **72** (2000) 4550-4554

[138] Nielen, M. W. F.: *Polymer analysis by micro-scale size-exclusion chromatography/MALDI time-of-flight mass spectrometry with a robotic interface*. Anal. Chem. **70** (1998) 1563-1568

[139] Spickermann, J., Martin, K., Räder, H., Müllen, K., Schlaad, H., Müller, A., Krüger, R.-P.: *Quantitative analysis of broad molecular weight distributions obtained by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry*. Eur. Mass Spectrom. **2** (1996) 161-165

[140] Laine, O., Österholm, H., Seläntaus, M., Järvinen, H., Vainiotalo, P.: *Determination of cyclic polyester oligomers by gel permeation chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **15** (2001) 1931-1935

[141] Pasch, H.: *Hyphenated techniques in liquid chromatography of polymers*. Advan. Polym. Sci. **150** (2000) 1-66

[142] Murgasova, R., Hercules, D. M.: *Polymer characterization by combining liquid chromatography with MALDI and ESI mass spectrometry*. Anal. Bioanal Chem. **373** (2002) 481-489

[143] Ungewiß, J., Vietzke, J.-P., Strassner, M., Rapp, C., Feuerstein, B.: *Quantitative determination of non-ionic surfactants by high-performance liquid-chromatography-ion trap mass-spectrometry*. Chromatographia **57 Suppl.** (2003) S73-S76

[144] Ungewiß, J.: *Methodenentwicklung zur quantitativen Analyse von Tensiden in kosmetischen Rohstoffen mittels HPLC-MS*, Diplomarbeit, Hochschule Magdeburg-Stendal (2001)

[145] Guenther, K., Heinke, V., Thiele, B., Kleist, E., Prast, H., Raecker, T.: *Endocrine Disrupting Nonylphenols Are Ubiquitous in Food*. Environ. Sci. Technol. **36** (2002) 1676-1680

[146] Möhle, H. L., Ohlerich, U.: *Effective alternatives to nonylphenol ethoxylates and isotridecyl alkohol ethoxylates*. SÖFW **127** (2001) 24-29

[147] Clark, E. W., Steel, I.: *Investigations into biomechanisms of the moisturising function of lanolin*. J. Soc. Cosmet. Chem. **44** (1993) 181-195

[148] *H. Erhard Wagner GmbH, http://www.wagnerlanolin.de/*. (2003)

[149] Wong, A. W., Wang, H., Lebrilla, C. B.: *Selection of anionic dopant for quantifying desialylation reactions with MALDI-FTMS*. Anal. Chem. **72** (2000) 1419-1425

[150] *Mündliche Mitteilung von Sven Krohn, Universität Kiel*. (2002)

[151] Shimada, K., Lusenkova, M. A., Sato, K., Saito, T., Matsuyama, S., Nakahara, H., Kinugasa, S.: *Evaluation of mass discrimination effects in the quantitative analysis of polydisperse polymers by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using uniform oligostyrenes*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **15** (2001) 277-282

[152] Ungewiß, J.: *Nachweis und Bestimmung von Polyquaternium 10 und Guar Hydroxypropyltrimethylammoniumchloride auf Haaren*. bisher unveröffentlicht (2003)

[153] Brown, R. S., Lennon, J. D.: *Mass resolution improvement by incorporation of pulsed ion extraction in a matrix-assisted laser desorption/ionization linear time-of-flight mass spectrometer*. Anal. Chem. **67** (1995) 1998-2003

# Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. K.-P. Wittern für die Möglichkeit, dass die vorliegende Arbeit im Bereich der Produktanalytik der Beiersdorf AG, Hamburg, durchgeführt werden konnte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. U. Hintze, Herrn Dr. C. Rapp, Herrn Dipl.-Ing. M. Straßner und Herrn Dr. J.-P. Vietzke für die hervorragende wissenschaftliche und technische Betreuung und die guten Arbeitsbedingungen. Herrn Dipl.-Ing. M. Straßner möchte ich darüber hinaus für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft und Geduld sowie seine stetige Diskussionsbereitschaft danken.

Herrn Dipl.-Ing. Jan Ungewiß danke ich für die Zusammenarbeit bei den Hydrolyse-Tests und die vielen aufschlussreichen Diskussionen.

Für die Unterstützung bei der NMR-Spektroskopie bedanke ich mich bei Herrn Dr. D. Emeis und Herrn Dr. T. Sokolowski.

Für die mikroskopischen Aufnahmen danke Herrn M. Sattler und Frau S. Pagel.

Herrn Dr. J. Gross, Universität Heidelberg möchte ich für die FD- und FI-MS Untersuchungen danken.

Dem Arbeitskreis von Prof. Dr. W. A. König danke für die angenehme Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit. Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern der Analytischen Forschung der Beiersdorf AG für die herzliche Aufnahme und Hilfsbereitschaft.

Für das sorgfältige Korrekturlesen und konstruktive Kritiken möchte ich mich bei Herrn Dr. C. Rapp, Herrn Dr. J.-P. Vietzke und Herrn Dipl.-Ing. Jan Ungewiß bedanken. Frau Dr. M. Franzen-Hintze danke ich für das Korrekturlesen von Texten in englischer Sprache.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, für die liebevolle Unterstützung während meines gesamten Studiums.

# Lebenslauf

**Persönliche Daten:**

| | |
|---|---|
| Name | Julia K. Pruns<br>Helene-Lange-Strasse 10<br>20144 Hamburg |
| Geburtsdatum und –ort | 29.03.1975 in Hamburg |
| Familienstand | ledig |

**Ausbildungsdaten:**

| | |
|---|---|
| 1981 – 1984 | Grundschule Hegholt, Hamburg |
| 1985 – 1994 | Gelehrtenschule des Johanneums, Hamburg |
| Juni 1994 | Abitur |
| | |
| Okt. 1994 – Apr. 1999 | Studium der Lebensmittelchemie an der Universität in Hamburg |
| März 1998 – Dez. 1998 | Diplomarbeit |
| April 1999 | Erstes Staatsexamen |
| | |
| Mai 1999 – Okt. 1999 | 1. Teil des Praktischen Jahres bei der NATEC, Gesellschaft für Naturwissenschaftliche und Technische Dienste mbH, Hamburg |
| Nov. 1999 – Apr. 2000 | 2. Teil des Praktischen Jahres im Hygiene Institut, Hamburg |
| August 2000 | Zweites Staatsexamen |
| | |
| Seit September 2000 | Promotion an der Universität Hamburg, Fachbereich Organische Chemie, Arbeitskreis Prof. Dr. W. A. König in Kooperation mit der Beiersdorf AG, Hamburg |
| Thema | Methodenentwicklungen zur Analyse und Charakterisierung komplexer kosmetischer Rohstoffe mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie |