

**UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2009

Libuše Samková

**UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**

**STANOVENÍ ESTEROVÉ ČÁSTI SMĚSNÉ
BIONAFY VE SLOŽKÁCH ŽIVOTNÍHO
PROSTŘEDÍ**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**AUTOR PRÁCE: Libuše Samková
VEDOUCÍ PRÁCE: Doc. Ing. Karel Komárek, CSc.**

2009

**UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF ANALYTICAL CHEMISTRY**

**DETERMINATION OF ESTERS
FRACTION OF MIXTURE OF OIL IN
PART OF ENVIRONMENT**

BACHELOR THESIS

**AUTHOR: Libuše Samková
SUPERVISOR: Doc. Ing. Karel Komárek, CSc.**

2009

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra analytické chemie
Akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Libuše SAMKOVÁ

Studijní program: B2802 Chemie a technická chemie

Studijní obor: Chemie a technická chemie

Název tématu: Stanovení esterové části směsné bionafy ve složkách
živočišného prostředí

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

- 1) V hierární řešitelské se zaměřte na stanovení jak klasické motorové nafy, tak i na zaváděné směsné motorové nafy ve vodě a zemině.
- 2) U extrakčních metod se zaměřte nejen na extrakci rozpouštědlem, ale i na další moderní metody.
- 3) Dále se zaměřte na metody používané k oddělování esterového podílu bionafy od uhlovodíkové složky.

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická
Seznam odborné literatury:
Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí bakalářské práce: doc. Ing. Karel Komárek, CSc.
Katedra analytické chemie
Konzultant bakalářské práce: Ing. Michaela Elcnerová
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: 23. února 2009
Termín odevzdání bakalářské práce: 26. června 2009


prof. Ing. Petr Lušák, DiSc.
děkan

L.S.


prof. Ing. Karel Výřvaš, DiSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2009

Prohlašuji:

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

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 22. 6. 2009

Libuše Samková

Ráda bych poděkovala Doc. Ing. Karlu Komárkovi, CSc. a Ing. Michaelae Elcnerové za cenné rady a připomínky během vypracování bakalářské práce.

Děkuji svým rodičům a celé rodině za trpělivost a podporu během mého dosavadního studia.

Souhrn

Literární rešerše je zaměřena na stanovení směsné motorové nafty a klasické motorové nafty ve složkách životního prostředí. V úvodní části jsou popsány vlastnosti a výroba směsné motorové nafty. Další část práce je zaměřena na extrakční techniky. Je zde nastíněna metoda extrakce magnetickou tuhou fází, která se v poslední době velice rozšířila a modernizovala. V poslední části práce jsou popsány separační techniky a konkrétní separační postupy, které lze použít k odstranění alifatických uhlovodíků a methylesterů mastných kyselin ze složek životního prostředí.

Klíčová slova: bionafta, methylestery mastných kyselin, methylestery řepkového oleje, alifatické uhlovodíky

Summary

The literal research is focused on determination of mixed diesel fuel and classic diesel fuel in parts of the environment. In the first part there are described features and production of mixed diesel. The next part is focused on extraction techniques. There is described the method of magnetic solid phase extraction, which has lately become more popular and has been modernized. At the end, there is described separative techniques and particular separative processes, which can be used to eliminate aliphatic hydrocarbons and fatty acid methyl esters from the environment.

Key words: biodiesel, fatty acid methyl esters, rapeseed oil of methyl esters, aliphatic hydrocarbons

Obsah

ÚVOD	10 -
BIONAFTA	11 -
ZKRATKY BIONAFTY	11 -
SMĚSNÁ BIONAFTA	11 -
VÝHODY BIONAFTY	11 -
NEVÝHODY BIONAFTY	12 -
EMISE MEŘO	12 -
REESTERIFIKACE	13 -
POPIS VÝROBY BIONAFTY	14 -
VOLNÉ MASTNÉ KYSELINY	16 -
REESTERIFIKACE BEZ KATALYZÁTORU	16 -
<i>Alkohol v superkritickém stavu</i>	16 -
<i>BIOX (cosolvent) proces</i>	16 -
TSE (TWO – PHASE SOLVENT EXTRACTION) METODA	17 -
EXTRAKČNÍ TECHNIKY	18 -
EXTRAKCE KAPALINA – KAPALINA (LLE)	18 -
MIKROEXTRAKCE NA PEVNÉ FÁZI (MSPE)	19 -
EXTRAKCE TUHOU FÁZÍ (SPE)	20 -
EXTRAKCE MAGNETICKOU TUHOU FÁZÍ (MSPE)	22 -
STANDARDNÍ TECHNIKY PRO STANOVENÍ FAME V NAFTOVÉM PALIVU	25 -
NUKLEÁRNÍ MAGNETICKÉ REZONANCE NMR (NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE)	25 -
INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE	25 -
SEPARAČNÍ TECHNIKY	26 -
PLYNOVÁ CHROMATOGRFIE (GC)	26 -
<i>Stanovení alifatických uhlovodíků plynovou chromatografií</i>	27 -
<i>Stanovení methylesterů mastných kyselin pomocí plynové chromatografie</i>	27 -
<i>Separace FAME kapilární plynovou chromatografií na slabě polární koloně</i>	28 -
KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE (LC)	31 -
<i>Stanovení aromatických uhlovodíků a FAME v naftovém palivu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC)</i>	31 -
<i>Separace FAME pomocí HPLC s Evaporative Light-scattering detektorem</i>	35 -
<i>Separace vzorku obsahujícího FAME metodou kapalinové chromatografie (LC) a následná analýza plynovou chromatografií (GC)</i>	37 -
SUPERKRITICKÁ FLUIDNÍ CHROMATOGRFIE (SFC)	39 -
VYSOKOÚČINNÁ VYLUČOVACÍ CHROMATOGRFIE (HPSEC)	40 -

SPALOVÁNÍ SMĚSNÉ NAFTY	- 41 -
ZÁVĚR.....	- 42 -
SEZNAM ZKRATEK	- 43 -
POUŽITÁ LITERATURA	- 45 -
SEZNAM TABULEK	- 48 -
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	- 49 -

Úvod

Žijeme v době, kdy je slovo ekologie skloňováno ve všech pádech. Doprava je jeden z mnoha zdrojů, který významně přispívá k znečištění životního prostředí. Pohonné hmoty vyráběné z ropy produkují škodlivé látky ve výfukových plynech. Ropné látky jsou nebezpečné pro životní prostředí z hlediska zamořování vod, půd a následně spodních vod. Ropné látky ve vodě mohou zanechat trvalé nepříznivé změny. S vodou se prakticky nemísí. Zůstávají na povrchu vody, kde vytvářejí souvislou vrstvu, a tím brání přístupu kyslíku do vody, čímž zapříčiňují úhyn vodních živočichů a rostlin. Proto je žádoucí snížit obsah škodlivých látek ve výfukových plynech a zvýšit odbouratelnost pohonných hmot získaných z ropy při úniku do vod a půd. V dnešní době se stále častěji setkáváme s pojmem alternativní paliva, mezi které patří zemní plyn, zkapalněný ropný plyn a bionafta.

Je tedy nezbytně nutné vyvíjet paliva nová, neropného původu včetně využití obnovitelných zdrojů energie. Zajímavou možností při řešení je využití řepkového oleje jako paliva dieselových motorů. Řepkový olej má totiž vysoký energetický obsah a patří mezi obnovitelné zdroje energie, což lze považovat za jeho nezanedbatelnou přednost. V této práci se zabývám bionaftou neboli směsnou motorovou naftou, která se vyrábí prostým smíšením methylesterů řepkového oleje s motorovou naftou podle ČSN EN 590.

Bionafta

Bionafta je alternativní, ekologické palivo pro vznětové motory, které je tvořeno z obnovitelných biologických zdrojů jako jsou rostlinné oleje nebo živočišné tuky. Nejčastěji používané oleje jsou sojový olej, který se využívá zejména ve Spojených státech amerických, řepkový olej, palmový olej a olej ze slunečnice. Čistá bionafta je biologicky odbouratelná a netoxická. Bionafta je na bázi methylesterů mastných kyselin rostlinného původu. Vyrábí se reesterifikací triacylglycerolů methyl alkoholem. ASTM D6751 nebo EN 14214 jsou normy, v nichž je stanoveno, že směsná motorová nafta může být používána jako motorové palivo [1].

Zkratky bionafty

V Evropě se bionafta nejčastěji vyrábí z řepky olejné a proto je tato směs methylesterů kyselin označována zkratkou MEŘO (methyl ester řepkového oleje), současně se setkáváme i s evropskou zkratkou FAME (fatty acid methylesters) [1].

Směsná bionafta

Úprava fyzikálně-chemických vlastností spočívá v přeměně rostlinného oleje na MEŘO, jenž je používán jako bionafta a nazývá se bionafta první generace. Protože je výroba methylesterů dražší než běžná motorová nafta, mísí se s některými ropnými produkty, aby jeho cena mohla konkurovat běžné motorové naftě. Tyto produkty jsou nazývány bionafty druhé generace. Musí obsahovat alespoň 30% methylesteru řepkového oleje, zachovávají si svou biologickou odbouratelnost a svými vlastnostmi (např. výhřevností) se více blíží motorové naftě [1].

Výhody bionafty

Bionafta při spalovacím procesu lépe shoří a tím výrazně snižuje kouřivost naftového motoru, množství polétavých částic, síry, oxidu uhličitého, aromatických látek a uhlovodíků vůbec. Bionafta má vysokou mazací schopnost (je mastnější než motorová nafta), a tím snižuje opotřebení motoru a prodlužuje životnost vstříkovacích jednotek. Mazací schopnost nafty je zvláště důležitá pro rotační vstříkovací čerpadla, kde jsou veškeré jeho pohyblivé části mazány naftou a ne mazacím olejem [2].

Bionafta nevyžaduje žádné zvláštní podmínky pro uskladnění. Lze ji skladovat ve stejných zásobnících jako motorovou naftu, kromě betonových zásobníků. Při vyšším poměru smíchání s motorovou naftou může bionafta poškodit přírodní kaučuk a materiály

z polyuretanové pěny. Bionafta nezpůsobuje ve vodě mikrobiologické zatížení až do koncentrace 10 000 mg.l⁻¹ a je pro ryby neškodná. Testy na Univerzitě v Idaho prokázaly, že ve vodním roztoku je po 28 dnech degradováno 95 % bionafty oproti pouhým 40 % motorové nafty [2].

Díky svému složení je bionafta odbouratelná do 21 dnů a je tudíž vhodná mimo jiné i do provozů, kde hrozí kontaminace půdy pohonnými látkami, tj. zejména do zemědělské a lesní výroby, při pracích ve vodohospodářských ochranných pásmech, apod. [2].

Zhang a kol. [3] zkoumali biodegradabilitu bionafty ve vodním systému. EPA 560/6-82-003 studium zahrnovalo methylestery řepkového a sojového oleje. Výsledky ukazují, že bionafta je mnohem snáze odbouratelná. Vznikající intermedie byly identifikovány pomocí plynové chromatografie [4].

Nevýhody bionafty

Hlavní nevýhodou bionafty je její vyšší viskozita, nižší energetický výkon, vyšší emise NO_x, vyšší cena díky ekonomické náročnosti výrobního procesu. Bionafta uvolňuje usazené nečistoty, a tím může zanechat palivový filtr. Bionafta, respektive její rostlinná část, je velmi náchylná na vodu, proto je nutné vyčistit palivový systém od vody. Při skladování bionafty je nutné zajistit čistotu skladovacího prostoru a chránit bionaftu proti styku s vodou [2].

Emise MEŘO

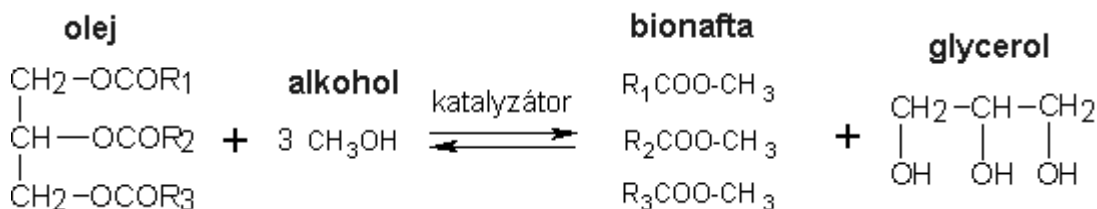
V tabulce č. I jsou ukázány hodnoty emise motorové nafty a bionafty. Motorové nafty jsou směsi kapalných uhlovodíků získávané z ropy destilací vroucích v rozmezí 150 až 370 °C. Mohou obsahovat aditiva na zlepšení užitečných vlastností, jako jsou depresanty, detergenty, mazivostní přísady a inhibitory koroze [2].

Tabulka č. I: Porovnání emisí motorové nafty a bionafty

Sledovaná hodnota	Motorová nafta	MEŘO
CO (g/hod)	62	56
CH_x (g/hod)	43	31
NO_x (g/hod)	223	241
SO₂(%)	0,15	0,002
kouřivost (stupnice BOSCH)	0,49	0,26

Reesterifikace

Reesterifikace je reakce tuků nebo olejů s alkoholem za vzniku esterů a glycerolu (obr.1).



Obrázek č. 1: Reesterifikace triglyceridu s methylalkoholem

kde R_1 , R_2 , R_3 jsou alkyly mastných kyselin.

Po reesterifikaci triglyceridu vzniká směs, ve které se nachází methylestery, glycerol, methylalkohol, katalyzátor a tri-, di- a monoglyceridy. Získání čistého esteru není snadné. V esteru jsou nečistoty jako jsou di- a monoglycerid. Monoglycerid způsobuje zákal ve směsi esteru. Tento problém se vyskytuje zvláště při použití výchozí suroviny živočišných tuků jako je hovězí lůj [5].

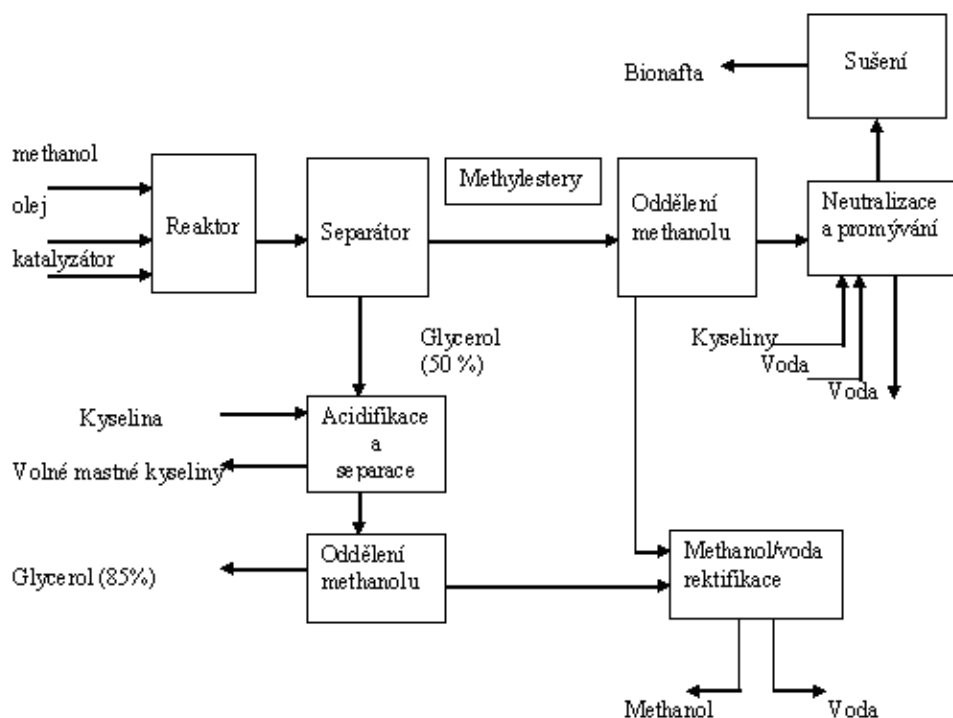
Alkohol

Protože reesterifikace je reverzibilní, je použit nadbytek alkoholu, aby se rovnováha reakce posunula směrem k produktu. Mezi alkoholy, které mohou být použity v reesterifikačním procesu patří methanol, ethanol, propanol, butanol a amyl alkohol. Nejvíce používán je methanol, protože jeho pořizovací cena je nejnižší a jeho chemické a fyzikální vlastnosti jsou nejvýhodnější (je polární a má krátký řetězec). Může tak rychle reagovat s triglyceridem a navíc hydroxid sodný je v něm dobře rozpustný. Molární poměr alkohol a triglycerid musí být 3:1. V praxi bývá tento poměr vyšší (6:1), aby se dosáhlo co nejvyššího výtěžku [5].

Katalyzátor

Katalyzátor je používán většinou na zvýšení reakční rychlosti a výtěžku. Jako katalyzátor může být použita zásada, kyselina nebo enzym. Jako alkalické katalyzátory se mohou použít: NaOH, KOH, uhličitany a nebo sodné a draselné alkoholáty. H_2SO_4 nebo HCl jsou nejčastěji použity jako kyselé katalyzátory. Lipáza může být použita jako biokatalyzátor. Alkalická katalýza je mnohem rychlejší než kyselá a je mnohem častěji používána. Je-li použita alkalická katalýza, musí být glycerol a alkohol bezvodý, protože

voda může způsobovat zmýdelnění a vytvářet mýdlo, které podstatně snižuje výtěžek esteru a stěžuje oddělení esteru od glycerolu [5].



Obrázek č. 2: Schéma výroby MEŘO [6]

Popis výroby MEŘO

Obrázek č. 2 ukazuje schéma výroby bionafty, které je tvořeno reaktorem, do něhož vstupuje alkohol, katalyzátor a olej. Tyto výchozí suroviny jsou zadržovány v reaktoru přibližně 1 hod při 60 °C. Pro menší množství výchozího produktu je často používán vsádkový reaktor. Pro větší množství (> 4 milionů litrů za rok) je používán kontinuální reaktor s míchadlem.

Reakce se někdy provádí ve dvou stupních. V prvním stupni je do reaktoru přidáno přibližně 80 % alkoholu a katalyzátoru k výchozímu produktu. Před vstupem do druhého stupně reaktoru je nejprve odstraněn glycerol. A po odstranění je do druhého stupně reaktoru přidáno zbývajících 20 % alkoholu a katalyzátoru. Tento systém zajišťuje úplnou přeměnu výchozího produktu s použitím menšího množství alkoholu, než v jedno stupňovém systému.

V následujícím stupni je glycerol odstraněn ze vzniklých MEŘO. Tato separace nastane poměrně rychle, a to pro malou rozpustnost glycerolu v MEŘO. Glycerol má

mnohem vyšší hustotu, proto je snadné ho odstranit sedimentací nebo odstředivkou. Po skončení reesterifikace může být přidána do reakční směsi voda, aby zlepšila separaci glycerolu. Po odseparování glycerolu, MEŘO jdou dále k neutralizaci a následuje promývání vodou. Glycerol se zahušťuje buď ve vakuu nebo filmovou odparkou.

Na neutralizaci případného zbytku katalyzátoru a pro rozštěpení mýdla, které může vzniknout během reakce, se používá kyselina. Mýdla reagují s kyselinou za vzniku rozpustných solí a volných mastných kyselin. Soli jsou odstraněny během promývání vodou a volné mastné kyseliny zůstanou v MEŘO. Vodní promývání je používáno pro odstranění případných zbytků katalyzátoru, mýdla, solí, methanolu nebo volného glycerolu v bionaftě. Zbytková voda je odstraněna z MEŘO pomocí vakua.

Frakce glycerolu odcházejícího ze separátoru obsahuje pouze 50 % glycerolu. Frakce obsahuje nadbytek methanolu a většinu katalyzátoru a mýdla. Nakládání s glycerolem v této formě může být obtížné. V prvním kroku čištění glycerolu je obvykle přidávána kyselina, aby rozštěpila mýdla na volné mastné kyseliny a soli. Volné mastné kyseliny nejsou rozpustné v glycerolu a stoupají na hladinu, kde jsou odstraněny a recyklovány. Soli většinou zůstávají s glycerolem, ačkoli to záleží na přítomnosti chemických sloučenin.

Jedna často nabízená možnost je použít hydroxid draselný jako reakční katalyzátor a kyselinu fosforečnou jako neutralizační činidlo za vzniku fosforečnanu draselného. Tato sůl se využívá jako hnojivo. Po okyselení a oddělení volných mastných kyselin je methanol v glycerolu odstraněn pomocí vakua nebo filmové odparky. V tomto případě by měl glycerol dosáhnout čistoty přibližně 85 %. V této čistotě je nejčastěji prodáván. Pro čištění glycerolu na 99,5-99,7 % je používána vakuová destilace nebo proces založený na iontové výměně.

Methanol, který je odstraněn z MEŘO, a glycerol obvykle obsahují vodu, která může vstoupit do reakce. Tato voda musí být odstraněna v destilační koloně, před tím než se methanol vrátí do reaktoru. Tento krok je více obtížný, je-li použit jako alkohol např. ethanol nebo isopropanol, protože s vodou tvoří azeotropní směs [6].

Volné mastné kyseliny

Obsahují – li oleje nebo tuky významné množství volných mastných kyselin je nutné použít speciální zpracování. Např.: kuchyňské oleje obsahují 2-7 % volných mastných kyselin, živočišné tuky obsahují zhruba 5-30 % volných mastných kyselin. Když je přidán k těmto výchozím produktům alkalický katalyzátor vzniká mýdlo a voda. Separace mýdla z methylesterů a glycerolu není možná, jestliže úroveň volných mastných kyselin přesahuje 5 %, a navíc to přispívá k vytváření emulze během promývání vodou. Proto je používána kyselá katalýza. Při tomto procesu se přemění volné mastné kyseliny na estery.

Keim [6] popsal použití tohoto procesu na přeměně palmového oleje obsahujícího 50,8 % volných mastných kyselin. Methanol a H_2SO_4 byly přidány k oleji a reagovaly spolu za stálého míchání a při teplotě 69 °C po dobu 1 hod. Po neutralizaci byl přidán 1,25 % methanolát sodný a směs byla míchána další hodinu při 50 °C. Analýzou byly zjištěny vysoké výtěžky asi 97 % esterů, ale hodnota zbytkové kyseliny byla okolo 5 % kyseliny palmitové. Neúplná reakce byla pravděpodobně způsobena vodou v reakční směsi.

Reesterifikace bez katalyzátoru

Alkohol v superkritickém stavu

Saka a Kusiana [6] tvrdili, že je možné vést reakci oleje a alkoholu bez katalyzátoru pomocí methanolu v superkritickém stavu. Avšak při těchto podmínkách je nutné udržovat teplotu při 300-350 °C, tlaky 35-60 MPa a molární poměr methanol-olej musí být 42:1.

BIOX (cosolvent) proces

Boocock [7] navrhoval přidat do reakce cosolvent k vytvoření jednofázového systému, a tím značně urychlit reakci (dokončení reakce v několika minutách). Byl použit atmosferický tlak a teplota blízká okolí. Cosolvent lze recyklovat a vrátit zpátky do reakce. Jako cosolvent může být použit tetrahydrofuran.

TSE (two – phase solvent extraction) metoda

Cena materiálu obsahující olej pro výrobu bionafty silně ovlivňuje náklady celé výroby, až 80 %. Především je to způsobeno tím, že je používán čistý rostlinný olej, ale stále častějším cílem je snížit cenu bionafty, a tím pádem náklady na její výrobu.

Rubin a kol. [8] navrhovali metodu TSE neboli dvoufázovou extrakci rozpouštědlem, kde olej z řepkového semene byl vyluhován hexanem. Glukosinolát a toxické látky byly z řepkového oleje vyluhovány polárním rozpouštědlem, které bylo složeno z methanolu, pomocné látky (NaOH) a vody (snižuje vzájemné rozpouštění methanolu a hexanu ve dvoufázovém roztoku). Glukosinolát, toxické látky, volné mastné kyseliny a jiné nečistoty byly rozpuštěny v polárním rozpouštědle, a proto kvalita oleje byla vyšší než kvalita surového oleje získaného lisováním semene. Hexanu může být použito také jako cosolventu při reesterifikaci, a tím je snížena reakční rychlost. Pokud je s procesem TSE spojená příprava bionafty, pak nemusí být provedena separace rozpouštědla od řepkového oleje, a tím se dosáhne nižší ceny bionafty.

Postup:

90 ml polárního rozpouštědla, 50 ml hexanu a 20 g řepkového semena reagovalo 10 min ve trojhrdlé baňce opatřené kondenzátorem, míchadlem a termostatem. Baňka byla umístěna ve vodní lázni (50 °C). Bylo vyluhováno 93,8 % oleje. Reakční směs byla roseparována. V horní nepolární vrstvě byl obsažen hexan a řepkový olej, v dolní polární vrstvě byl obsažen methanol, glukosinolát, rozpuštěné mastné kyseliny a jiné toxické látky.

Pak následovala samotná reesterifikace. Hexan v roztoku olej-hexan může působit jako cosolvent a tvořit směs olej/methanol, kdy je vytvořen jednofázový systém. Roztok olej-hexan byl nalit do trojhrdlé baňky opatřené kondenzátorem, míchadlem, termostatem a ponořen do vodní lázně. Bezvodý methanol a NaOH byly přidány do reaktoru. Po získání horní methylesterové fáze obsahující hexan a methylester, byla tato směs promývána vodou pro odstranění zbytkového mýdla, katalyzátoru, glycerolu a methanolu. Dolní vrstva byla glycerolová fáze obsahující glycerol, methanol, katalyzátor. Z methylesterové fáze byl hexan odstraněn pomocí odparky (95 °C) a potom byl sušen při teplotě 110 °C do konstantní hmotnosti.

Extrakční techniky

Dalším krokem po reesterifikaci je extrakce methylesterů. Většina lipidických vzorků obsahuje především dlouhé mastné kyseliny – jejich methylestery jsou nepolární tzn., že je extrahujeme uhlovodíkovými rozpouštědly jako jsou n-pentan, n-hexan nebo isooktan. Extrakce by měla být prováděna alespoň dvakrát a poměr mezi extrakčním rozpouštědlem a reesterifikačním činidlem musí být dostatečný.

Extrakce kapalina – kapalina (LLE)

Jednoduchá metoda, která patří k nejpoužívanějším izolačním metodám. Principem metody je rozdělení analytů a interferentů mezi dvě navzájem nemísitelné kapaliny, ve většině případů se jedná o vodný vzorek vs. organické rozpouštědlo. Analyty jsou rozděleny mezi tyto fáze na základě různé rozpustnosti (rozdílných rozdělovacích koeficientů). Čím větší je rozdíl mezi rozdělovacími koeficienty látek, tím dokonalejší je jejich oddělení. Nevýhodou této metody je, že se mohou tvořit emulze. Přidáním většího objemu rozpouštědla se tato nevýhoda eliminuje, ale zároveň vzniká nová nevýhoda – spotřeba velkého množství organických rozpouštědel. Proto byla snaha vyhnout se tomuto problému a v roce 1996 byla poprvé popsána mikroextrakce kapalina – kapalina [9]. Při miniaturizaci extrakce kapalina – kapalina jsou používány systémy využívající kapky rozpouštědla na konci teflonového vlákna, nebo nověji na špičce nástřikové jehly chromatografického systému. Jako příklad takového systému může posloužit tzv. extrakce na jedné kapce (jednokapková extrakce) neboli Single Drop Extraction (SDE).

Neves a kol. [10] navrhli metodu extrakce kapalina – kapalina k extrakci mastných kyselin z vodného a pevného vzorku a následnou analýzu pomocí kapilární plynové chromatografie. Nejdříve připravili do skleněné vialky 2 ml vodného vzorku. Přidali 1,5 ml vnitřního standardu (kyselina pentadekanolová C15:0) a 1,5 ml roztoku HCl:1-propanolu (25 % v/v). Následně přidali 2 ml rozpouštědla dichlormethanu (DCM). Definované množství pevného vzorku (anaerobní biomasa) také převedli do skleněné vialky a nechali ho vysušit při 85 °C po dobu 12 hod. Poté obsah vialky zvažili a přidali opět vnitřní standard (1,2 ml), roztok HCl:1-propanol (1,5 ml), 2 ml DCM a 2 ml deionizované vody. Připravené směsi nechali promíchávat, aby zvýšili vzájemný kontakt obou fází. Pak je nechali v klidu při 100 °C po dobu 3,5 hod. Poté přenesli obsah vialek s 2 ml deionizované vody do jiných vialek dobře utěsněných, protože tyto vialky dali do obrácené polohy po dobu 30 min. Nakonec odebrali 1 ml vzorku organické fáze a podrobili ho analýze.

Analýzu uskutečnili v systému GC s plamenovým ionizačním detektorem. Teplotu detektoru nastavili na 250 °C. Mastné kyseliny separovali na CP-Sil 52 CB koloně (30 m x 0,32 mm x 0,25µm). Teplota kolony byla programována. Počáteční teplotu kolony drželi 2 min na 50 °C a koncové teploty 225 °C dosáhli lineární rychlostí růstu 10 °C.min⁻¹. Jako nosný plyn použili helium a jeho průtokovou rychlost nastavili na 1,0 ml.min⁻¹. Výtěžnost metody LLE byla nad 90 % mastných kyselin a relativní směrodatná odchylka byla nižší než 15 %.

Morrisonem a kol. [11] popisují metodu LLE, která využívá k dvojnásobné extrakci 2 díly pentanu a 1 díl vody. Výtěžky methylesterů se pro tento případ pohybovaly mezi 97-99 %.

V literatuře [12] se uvádí extrakce methylesterů mastných kyselin obsažených v půdě n-hexanem, vzorek byl centrifugován po dobu 10 minut. Oddělená hexanová fáze byla přemístěna do čisté zkumavky a n-hexan byl odpařen. Methylestery byly resuspendovány 0,5 ml směsí hexan – methylterc-butylether (1:1). Separace a kvantifikace methylesterů proběhla na plynovém chromatografu Hewlett-Packard 5890 Series II Instrument s plamenově ionizačním detektorem.

Extrakce mastných kyselin z mořských řas [13] byla provedena směsí chloroform – methanol – voda (1:2:0,8). Jejich methylestery byly připraveny zahříváním ve směsi methanol:HCl (10:1) při 80 °C dvě hodiny a extrahovány do hexanu. Vzniklé methylestery byly čištěny elucí 10 ml diethylether:hexan (3:97, v/v) přes krátkou kolonu silikagel-albumin (0,2 a 0,1g).

Kvantitativní extrakce methylestrů nízkých mastných kyselin je z důvodu vysoké těkavosti a částečné rozpustnosti ve vodě velmi obtížná. Proto je doporučováno spíše připravovat butylestery těchto kyselin, které mají vyšší body varu a jsou méně rozpustné ve vodě než příslušné methylestery [14].

Mikroextrakce na tuhé fázi (SPME)

Je poměrně nová, ale standardně používaná extrakční metoda. Její základní princip je velmi jednoduchý. Těkavé i netěkavé sloučeniny z plynných, kapalných a pevných vzorků jsou sorbovány na SPME vlákne. Tato vlákna jsou ponořena do vzorku a analyt je extrahován na vlákno. Vlákno s koncentrovanými analyty je pak přemístěno do analytického přístroje, (většinou GC nebo HPLC), kde dojde k desorpci. Jsou dva typy

desorpce: termální (GC aplikace) a mobilní fázi (HPLC aplikace). Pro extrakci uhlovodíků je používáno vlákno nepolární povahy (např. polydimethylsiloxan).

Extrakce tuhou fází (SPE)

SPE metoda je používána pro úpravu vzorků – jejich zakoncentrování, extrakci žádané látky z kapalného vzorku či oddělení látky od rušivé matrice.

Principem SPE je selektivní zadržování skupiny látek, nejčastěji organických molekul na tuhé fázi (silikagel), která je umístěna ve formě sloupce nebo membrány v krátké kolonce.

Provedení SPE:

- Předúprava kolonky – příprava kolonky na reprodukovatelnou interakci složek vzorku s tuhou fází, která je umožněna solvatací tuhé fáze. Kolonka se propláchně předepsaným rozpouštědlem (aktivace tuhé fáze pro interakce se vzorkem) a následně se vymyje rozpouštědlem.
- Dávkování vzorku – podle druhu tuhé fáze a vzorku dochází ke specifickým reakcím látek s tuhou fází. Žádaná skupina látek se selektivně sorbuje a nesorbované látky (matrice) procházejí volně kolonou.
- Promývání – propláchnutí kolonky vhodným rozpouštědlem vede k vymytí zbytků matrice vzorku z kolony, žádané látky zůstávají sorbovány na tuhé fázi.
- Sušení – pokud se eluční rozpouštědlo výrazně liší od promývacího roztoku, kolonku je třeba vysušit proudem inertního plynu, nejčastěji dusíku.
- Eluce – kolonka se promývá elučním rozpouštědlem, dochází k selektivní desorpci žádaných látek z tuhé fáze a k jejich vymytí z kolony. Eluát se jímá a analyzuje zvolenou metodou.

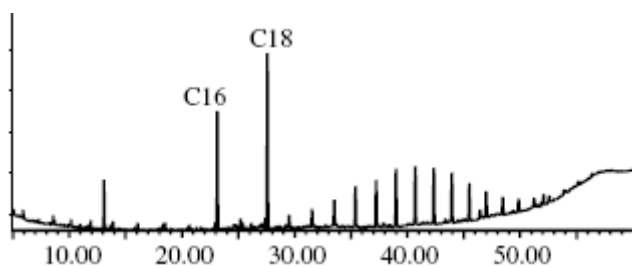
Postup stanovení obsahu FAME v naftovém palivu pomocí SPE je popsán metodou evropského standardu PN-EN-ISO 5508.

Russell a Werne [15] testovali SPE kolony složené ze třech různých materiálů: vysoko polymérního polyethylenu (HDPE), HDPE potažený polymerem fluoru – podobné teflonu (FP-HDPE) a skleněnou kolonu. Kolony byly opakovaně promývány 8 ml MeOH a následně 8 ml směsí dichlormethan:isopropanol (2:1). Poté izolovali mastné kyseliny z přírodních zdrojů. Následně promyli kolonu pro odstranění zbytků matrice roztokem

8 ml 4 % kyseliny octové a diethyletherem. Roztok 4 % kyseliny octové a diethylether obsahující mastné kyseliny byl jímán do skleněné nádoby a sušen pod proudem dusíku. Pak nechali vzorek reagovat s methanolem, výsledný roztok zředili nasyceným vodným roztokem NaCl. Methylestery byly extrahovány z vodného roztoku hexanem, nakonec byl vzorek s hexanem vysušen pomocí bezvodého síranu sodného.

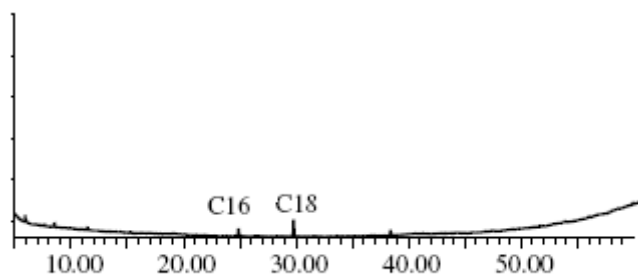
Identifikace byla provedena s použitím plynové chromatografie (GC) a hmotnostní spektroskopie (MS). Byla použita křemenná kapilární kolona a teplota termostatu byla programovaně zvyšována z 50 °C až na 130 °C. Methylestery C16 a C18 a *n*-alkany byly identifikovány pomocí hmotnostního spektra a z retenčních časů, které byly porovnány se standardem.

Jak je zřejmé z obr. 3, 4, 5 HDPE kolona vyextrahovala nejvýznamnější množství C16 a C18 esterů, zatímco kolona skleněná a FP-HDPE nevyextrahovala velké množství těchto kyselin. Na obr. 3 jsou také vidět stopy píků *n*-alkanů, které byly také přítomny ve vzorku, píky jsou v rozmezí 35-45 min. Tyto alkany mají rozsah uhlíku od C24 až C30. Z této práce vyplývá, že pro extrakci tuhou fází je možné použít pro izolaci methylesterů mastných kyselin kolonu vysoko polymérního polyethylenu.



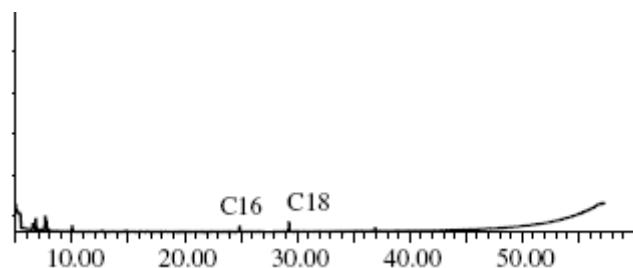
retenční čas (min)

Obrázek č. 3: Chromatogram methylesterů mastných kyselin C16 a C18 vyextrahované HDPE kolonou



retenční čas (min)

Obrázek č. 4: Chromatogram methylesterů mastných kyselin C16 a C18 vyextrahovaných FP-HDPE kolonou



retenční čas (min)

Obrázek č. 5: Chromatogram methylesterů mastných kyselin C16 a C18 vyextrahovaných skleněnou kolonou

Extrakce magnetickou tuhou fází (MSPE)

Extrakce magnetickou tuhou fází [16] je používána k izolaci motorové nafty [17, 18], MEŘO, alifatických uhlovodíků, ropných látek, organických barviv [19, 20, 21, 22, 23] a neionických tenzidů [24, 25, 26] z kontaminovaných vzorků vod. V současné době je MSPE využívána zejména v lékařství, biochemii, mikrobiologii a v ekologii.

Principem MSPE je adsorpce cílové sloučeniny nebo buňky na magnetické částice a následné odstranění vytvořeného komplexu ze systému pomocí vnějšího magnetického pole. Magnetické separace mohou být tzv. pozitivní, kdy jsou izolovány přímo žádané sloučeniny nebo tzv. negativní, kdy jsou naopak ze systému odstraněny nežádoucí složky. Selektivní magnetické separace je výhodné využít při práci v heterogenních suspenzních systémech.

Pro separace v magnetickém poli je potřebné základní vybavení, především vhodně zvolený magnetický sorbent nebo nosič s imobilizovanými afinitními ligandy a vhodný magnetický separátor. Nejpoužívanější materiály pro přípravu magnetických sorbentů a nosičů jsou práškové oxidy železa jako magnetit (Fe_3O_4) nebo maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), dále jsou používány oxid chromičitý CrO_2 , práškové železo, ferity a nikl. V některých případech lze také použít tzv. magnetické kapaliny (ferrofluids nebo magnetic fluids). Jde o suspenze velmi jemných pevných magnetických částic o průměru cca 2-20 nm ve vhodné nemagnetické kapalině.

Komárek a kol. [16] použili k izolaci methylesterů mastných kyselin extrakci magnetickou tuhou fází. Extrakci probíhala z modelových vodných vzorků. K extrakci magnetickou tuhou fází použili sorbenty CPP-39 o velikosti částic 40-120 μm a CARBOTRAP C o velikosti částic 20/40 Mesh. Sorbenty magneticky modifikovali v laboratoři následujícím postupem. K roztoku heptahydrátu hexanu železnatého přidali uhlíkový sorbent a za stálého míchání po kapkách hydroxid sodný. Vzniklou suspenzi po dobu 1 hod míchali a zahřívali na teplotu 100 °C. Po ochlazení magneticky modifikovaného sorbetu ho opakovaně dekantovali destilovanou vodou. Pro extrakci použili vždy stejné množství suspenze sorbentu (0,2 ml).

K připravenému modelovému vzorku vody v uzavíratelné kónické zkumavce přidali konstantní množství suspenze magneticky modifikovaného sorbetu. Suspenzi míchali pomocí laboratorní třepačky po zvolenou dobu při otáčkách 2400 min^{-1} . Po uplynutí doby sorpce (doba styku sorbetu s kontaminovaným vzorkem vody) magneticky modifikovaný sorbent odseparovali pomocí silného permanentního magnetu a vodnou fází odlili. Do zkumavky se sorbetem přidali zvolené množství elučního rozpouštědla (methanol) a suspenzi nechali míchat na laboratorní třepačce po zvolenou dobu eluce (doba styku sorbetu se zvoleným množstvím elučního činidla) při stejných otáčkách. Poté odseparovali magneticky modifikovaný sorbent. Výsledný extrakt analyzovali pomocí plynové chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem. Jako nosný plyn použili helium o střední rychlosti 36,5 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$. Vzorek do plynového chromatografu dávkovali manuálně pomocí mikrostříkačky Hamilton. K separaci použili křemennou kapilární kolonu DB – WAX, kolona byla dlouhá 30 m, vnitřní průměr kolony byl 0,5 mm a tloušťka filmu byla 1 μm . Teplotní program pro analýzu methylesterů mastných kyselin byl následující: teplotu nástřiku nastavili na 230 °C a teplotu detektoru na 240 °C, kolonu

na počátku analýzy nastavili na 120 °C, teplotu drželi po dobu 1min, poté rychlostí 15 °C.min⁻¹ ji zvýšili na 200 °C, kde ji drželi po dobu 5 min.

Optimalizaci extrakce magnetickou tuhou fází provedli na modelových vzorcích vod, které obsahovaly lauran methylnatý, myristan methylnatý, palmitan methylnatý a stearan methylnatý. K optimalizaci použili výše zmíněné magneticky modifikované sorbenty. V extrakčním procesu vybrali čtyři proměnné (na kterých zřejmě nejvíce závisí výtěžnost extrakce). První proměnnou byla doba styku modelového roztoku se sorbentem, jako druhá proměnná byla označena doba styku elučního rozpouštědla se sorbentem. Třetí proměnnou bylo množství rozpouštědla použitého pro eluci a poslední proměnnou byl počet opakovaných elucí. Provedli experimenty, při kterých byly vždy tři proměnné zafixovány a jedna měněna. Ze závislostí výtěžností na jednotlivých proměnných vybrali optimální podmínky pro extrakci zvoleným sorbentem.

Na základě získaných hodnot výtěžností pro jednotlivé sorbenty zjistili, že lepší extrakční vlastnosti jevil magneticky modifikovaný Carbotrap C pro modelovou směs FAME, ale pro vzorky MEŘO měl lepší sorpční vlastnosti magneticky modifikovaný CPP-39. Výtěžnosti extrakce pro vzorky vod kontaminované MEŘO stanovili pro magneticky modifikovaný Carbotrap C na 90,5 % a pro CPP-39 na 91,2 %.

Standardní techniky pro stanovení FAME v naftovém palivu

Nukleární magnetické rezonance NMR (nuclear magnetic resonance)

Technika ^1H NMR [27] je využívána ke stanovení obsahu bionafty ve směsi s motorovou naftou. NMR spektroskopie (nukleární magnetická rezonance) je fyzikálně – chemická metoda využívající interakce atomových jader s magnetickým polem.

Výsledky ukazují, že obsah bionafty v naftě stanovený ^1H NMR není ovlivněn typem buď bionafty nebo čisté nafty, a proto tato technika je zvláště cenná pro tato stanovení.

Infračervená spektroskopie

Záření vlnových délek v blízké infračervené oblasti 800-2500 nm je využíváno v blízké infračervené (NIR) spektroskopii. Této techniky je používáno na základě měření intenzity absorpce karbonylových vazeb. Jedná se o rychlou analytickou techniku, která je využívána pro stanovení obsahu esterů v bionaftě a také pro stanovení složení bionafty hlavně methylesterů. Toto složení je velmi důležité, protože ovlivňuje některé vlastnosti bionafty, jako je její stabilita a jodové číslo. Hlavní důraz je kladen na methylester linolenové kyseliny, protože pouze tento obsah je regulován EN 14214. V NIR spektroskopii k vyhodnocení získaných dat je využíváno multivariační kalibrační techniky (např. analýza hlavních komponent, metoda nejmenších čtverců) [28].

Separáční techniky

Plynov chromatografie (GC)

Jedná se o separační metodu, která je založen na dělení složek směsi mezi dvě heterogenní fáze – stacionární (pevn látka / kapalina) a mobilní (plyn). Stacionární fáze (SF) je v systému nepohybliv a mobilní fáze (MF) je pohybliv.

Princip:

SF působí na jednotliv separovan látky a na základě vzájemných interakcí mezi SF a těmito látkami dochází k dělení. Rozdělen složky jsou unášeny nosnm plynem (MF) z kolony do detektoru. Signál z detektoru se prenší na zapisovač a jako výsledek se získá záznam chromatografick separace – chromatogram. Plocha pod píkem je prmo úměrn obsahu látky ve vzorku. Složka vzorku je charakterizována vzdáleností maxima píku od startu, kterou lze vyjádřit jako retenční čas nebo objem. Mechanismy, které se uplatnj v GC jsou adsorpce – GSC, rozdělování – GLC a stov efekt – GSC.

Nejpoužívanější **detektory** v GC jsou hmotnostní spektrometr (MS), plamenov ionizační detektor (FID), tepelně vodivostní detektor (TCD), detektor elektronového záchytu (ECD).

Technika dávkování methylesterů mastných kyselin

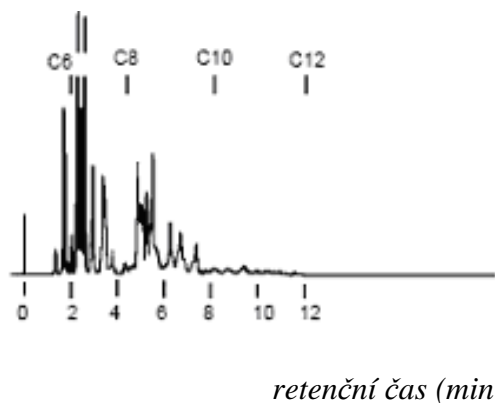
Nejvíce používanou technikou dávkování pro analýzu methylesterů mastných kyselin je split/splitless systém. Splitless režim bývá méně diskriminační mezi methylestery s vysokými a nízkými teplotami varu. Diskriminace u klasického split režimu může být však také zcela odstraněna a to pokud dojde k vhodné optimalizaci všech parametrů [29].

Kolony pro analýzu methylesterů mastných kyselin

Nejběžnější jsou používan kolony se středně polárními fázemi (CP-WAX 52, CP-WAX 58, Carbowax 20M, DB-225, DB-1701, DB-WAX, DB-FFAP, OV-225, SP-2300). Eluce na těchto fázích probíhá jednak podle počtu atomů uhlíku a potom také dle stupně nasycen. Methylester s počtem uhlíku X a se 4 nebo 5 dvojnými vazbami eluují před methylestery nasycených kyselin s počtem uhlíku X+2, tak např. kyselina stearolov (18:4n3) eluuje před kyselinou arachidovou (20:0).

Analýza alifatických uhlovodíků plynovou chromatografií

Alifatické uhlovodíky byly separovány na kapilární koloně SP-2100 plynovou chromatografií. Teplota kolony byla programována. Počáteční teplota kolony byla 75 °C a koncová teplota 200 °C byla dosažena lineární rychlostí růstu 8 °C.min⁻¹. Jako nosný plyn byl použit dusík a jeho průtoková rychlost byla 20 ml.min⁻¹. Byl použit plamenový ionizační detektor (FID) a obsah dávkovaného vzorku byl 0,1 µl [30]. Výsledný chromatogram je na obr. 6.



Obrázek č. 6: Chromatogram vzorku motorové nafty

Stanovení methylesterů mastných kyselin pomocí plynové chromatografie

Uzančně stanovená metoda plynové chromatografie [31], která slouží ke stanovení obsahu esterů a methylesterů kyseliny linolové, je popsána v normě EN 14103. Metoda je vhodná pro stanovení FAME, které mají rozsah uhlíků methylesterů mezi C14 až C24.

Stanovení bylo provedeno pomocí plynového chromatografu Agilent 6850 s plamenovým ionizačním detektorem. Byl použit nástříkový systém split/splitless. Estery byly separovány na HP-INNOWax koloně (délka 30 m, průměr 320 µm, tloušťka filmu 0,25 µm). Teplota kolony byla programována. Počáteční teplota byla 210 °C a koncová teplota 230 °C byla dosažena lineární rychlostí růstu 20 °C.min⁻¹. Estery mezi C14-C20 byly separovány při teplotě 200 °C a estery mezi C22-C24 byly separovány při teplotě 230 °C. Jako kalibrační roztok byl použit vnitřní standard methyl heptadekan. Analyzovány byly vzorky methylesterů mastných kyselin získaných z řepkového oleje, sojového oleje a oleje získaného z drůbežího a vepřového tuku. V tabulce č. II je ukázáno kvantitativní vyjádření kyselin methylesterů obsažených ve výše zmíněných olejích.

Tabulka č. II: Složení FAME vyjádřené v % (m/m) v různých typech olejů.

Kyseliny FAME	řepkový olej (%)	sojový olej (%)	drůbeží olej (%)	vepřový olej (%)
myristová	0,04	0,07	1,12	0,43
palmitová	4,12	9,90	17,63	15,62
palmitoolejová	0,05	0,02	2,15	5,28
stearová	1,57	4,27	9,91	3,93
olejová	55,68	22,54	34,32	28,48
linolová	17,82	48,66	7,38	11,87
linolenová	7,61	7,27	0,37	0,48
arachová	0,556	0,32	0,14	0,05
gadolejová	1,31	0,18	0,73	0,29
behenová	0,32	0,32	-	-
eruková	0,51	-	-	-
lignocerová	0,15	-	0,08	-
nervonová	0,16	0,16	0,15	0,15

Z tabulky č. II je zřejmé, že řepkový olej obsahuje vyšší koncentraci kyseliny olejové C18:1 (55,68 %), a sojový olej obsahuje vyšší koncentraci kyseliny linolové C18:2 (48,66 %). Živočišné tuky (drůbeží a vepřové) obsahují vyšší obsah kyseliny olejové, avšak v porovnání s rostlinnými oleji, živočišné tuky obsahují vyšší koncentraci kyseliny palmitové. EN 14103 specifikuje metodu, která vykazuje výbornou opakovatelnost a její relativní standardní odchylka je menší než 1 % většinou pro všechny methylestery.

Separace FAME kapilární plynovou chromatografií na slabě polární koloně

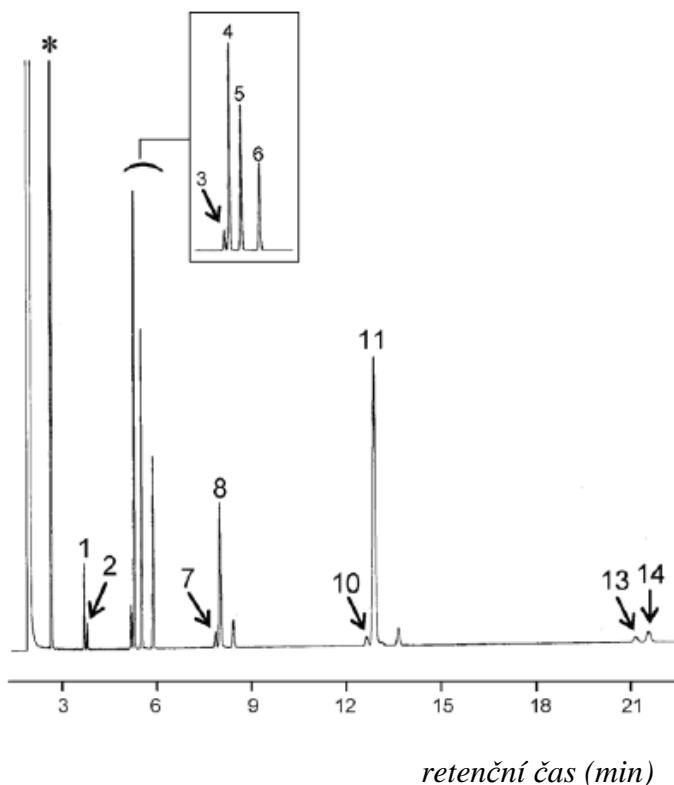
Kapilární GC se slabě polární kolonou je nejčastěji používána k analýze sterolů a potravinových přísad. Středně polární nebo polární kolony jsou používány k separaci methylesterů mastných kyselin (FAME). Avšak tým z Japonské univerzity Osaka Prefecture [32] zkusil nadávkovat FAME do slabě polární kolony. Výsledky separace byly podobné s výsledky, které byly získané na středně polární koloně.

Pro analýzu vzorku obsahujícího FAME byl použit kapilární plynový chromatograf Shimadzu GC-17A s nástřikovým split/splitless systémem s plamenovým ionizačním detektorem a automatickým dávkovačem vzorku. Byla použita slabě polární SPB-5 kolona (délka 30 m, průměr 0,25 mm). Hmotnostní spektrometr byl použit jako detektor. Hmotnostní spektra byla měřena pomocí ionizační energie (70 eV) a chemická ionizace (CI) byla prováděna s použitím isobutanu jako reakčního plynu.

Podmínky analýzy methylesterů mastných kyselin připravených ze sojového oleje byly následující. Teplota kolony byla 235 °C, jako nosný plyn bylo použito helium (průtoková rychlost plynu 30 cm.s⁻¹). BHT byl přidán k vzorku jako antioxidant.

Píky byly identifikovány porovnáním retenčních časů standardů FAME (obr. 7) a měřeného vzorku FAME (obr. 8) a také měřením EI/CI hmotnostního spektra na stejné koloně připojené k GC/MS systému. V tabulce č. III jsou názvy kyselin, které byly identifikovány z chromatogramu.

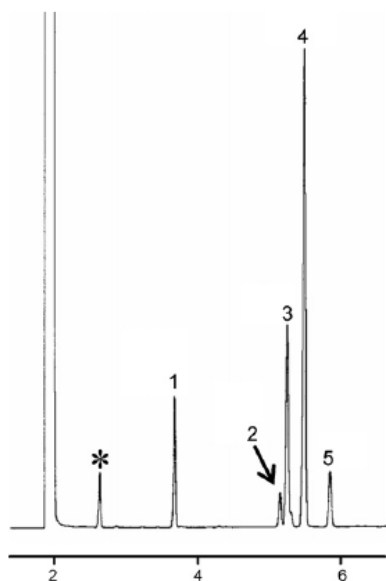
odezva detektoru



Obrázek č. 7: Chromatogram standardní směsi FAME

1=16:0, 2=16:1, 3=18:0, 4=18:1, 5=18:2, 6=18:3, 7=20:0, 8=20:1, 10=22:0, 11=22:1, 13=24:0, 14=24:1, (*)= BHT

odezva detektoru



retenční čas (min)

Obrázek č. 8: Chromatogram analyzovaného vzorku FAME

1=16:0, 2=18:0, 3=18:1, 4=18:2, 5=18:3, (*)=BHT

Tabulka č. III: Seznam kyselin

Název kyseliny	Značení kyseliny
myristová	14:0
palmitová	16:0
palmitoolejová	16:1
stearová	18:0
olejová	18:1
linolová	18:2
linolenová	18:3
arachová	20:0
gadolejová	20:1
behenová	22:0
eruková	22:1
lignocerová	24:0
nervonová	24:1

Kapalinová chromatografie (LC)

Jedná se o separační metodu, která je založená na dělení složek směsi mezi dvě heterogenní fáze – stacionární (tuhá látka / kapalina) a mobilní (kapalina).

Princip:

Kolonou naplněnou sorbentem (SF) postupuje určitou rychlostí MF. Na začátek kolony je nadávkován vzorek, který obsahuje složky A a B. Mobilní fáze unáší vzorek ke konci kolony, přičemž obě složky postupují pomaleji než MF – např. z toho složka B pomaleji než složka A, říkáme, že obě složky jsou retardovány (zadržovány) a z toho více složka B než A. Rozdělené složky jsou unášeny kapalnou MF z kolony do detektoru.

Při detekci je využíváno vlastností látek vycházejících z kolony. Detektory používané v LC jsou nejčastěji optické. Nejrozšířenější je detektor *fotometrický*. Tímto detektorem je měřena kontinuálně absorpance analyzovaných látek, která je závislá na jejich koncentraci v UV a VIS oblasti. Rozdíly v indexech lomu mezi analyzovanou látkou a mobilní fází je měřeno *refraktometrickým* detektorem. *Fluorescenční* detektor je velice citlivý, ale jeho použití je omezeno pouze na látky, které fluoreskují. Méně častěji používané jsou elektrochemické detektory.

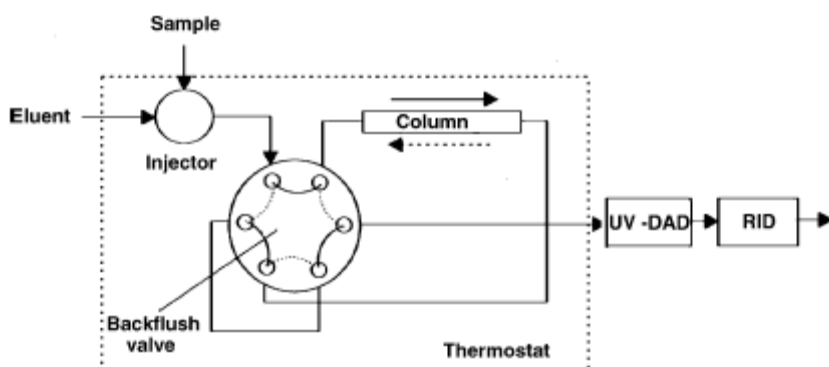
Jednou z nejvýznamnějších moderních analytických metod, která je zařazena mezi kapalinové chromatografie je vysokoúčinná (vysokotlaká) kapalinová chromatografie – **HPLC** (high performance liquid chromatography). Je to vysoce instrumentálně pokročilá technika kapalinové chromatografie. U této metody je potřeba pro dosažení dostatečného průtoku aplikovat tlak jednotek až desítek MPa. Vedle tradičních analytických aplikací může být vysokoúčinná kapalinová chromatografie použita rovněž k čištění a preparaci složek ve směsích. Separace vzorku pomocí HPLC je obvykle spojena s elektrochemickou nebo spektrometrickou detekcí jednotlivých složek.

Stanovení aromatických uhlovodíků a FAME v bionaftě pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC)

V mnoha zemích je v bionaftě obsaženo až 30 % methylesterů mastných kyselin, ale zároveň je obsažen přístupný obsah polycyklických aromatických uhlovodíků, kde jejich limitní obsah je 11 %. Snížení obsahu těchto rizikových sloučenin je očekáváno.

Úplný obsah methylesterů mastných kyselin může být stanoven rychlým a jednoduchým způsobem a to pomocí HPLC. Stanovení aromatických uhlovodíků v bionaftě je především uskutečněno pomocí normální fáze vysokoúčinné kapalinové chromatografie (NP-HPLC) s použitím refraktometrického detektoru (RID), kde jako kolona se může použít NH₂ kolona a n-heptan může být použit jako mobilní fáze. Tato technika umožňuje stanovit skupinu aromatických uhlovodíků a obsah FAME v bionaftě, v kterém je obsaženo až 30 % methylesterů mastných kyselin.

Kamiński a kol. [33] použili k analýze bionafty dva detektory zapojené za sebou. Jeden byl již zmíněný RID a druhý byl použit fotometrický detektor nejlépe UV-DAD (detektor s diodovým polem). UV detektor zde hraje dvojí roli: určuje bod, kdy se změní směr toku mobilní fáze v koloně a detekuje přítomnost FAME v testovaném vzorku. Tento detektor je obzvlášť vhodný pro stanovení velmi nízkého obsahu aromatických uhlovodíků a také může být použit ke stanovení obsahu olefinů.



Obrázek č. 9: Schéma aparatury pro HPLC s dávkovací smyčkou se šesticestným ventilem

Na obrázku č. 9 jsou detektory UV-DAD a RID zapojeny za sebou. Separace byla uskutečněna při teplotě 20 °C s použitím mobilní fáze n-heptanu, jeho průtoková rychlost byla 0,8 ml.min⁻¹. Transportní doba mezi detektory byla přibližně 0,26 min. Retenční čas polycyklických aromatických uhlovodíků byl stanoven s použitím UV detektoru, rozsah vlnových délek byl 200-400 nm. Po vymytí poslední skupiny PAU byl změněn tok mobilní fáze v koloně a po této změně se začal analyzovat obsah sumy FAME.

Stanovení všech skupin aromatických uhlovodíků a FAME bylo uskutečněno pomocí kalibrační křivky. Jako kalibrační standardy byly použity následující roztoky: o-xylen (monoaromát MA), 1-methylnaftalen (diaromát DA), fenantren (tri- a poly- aromát

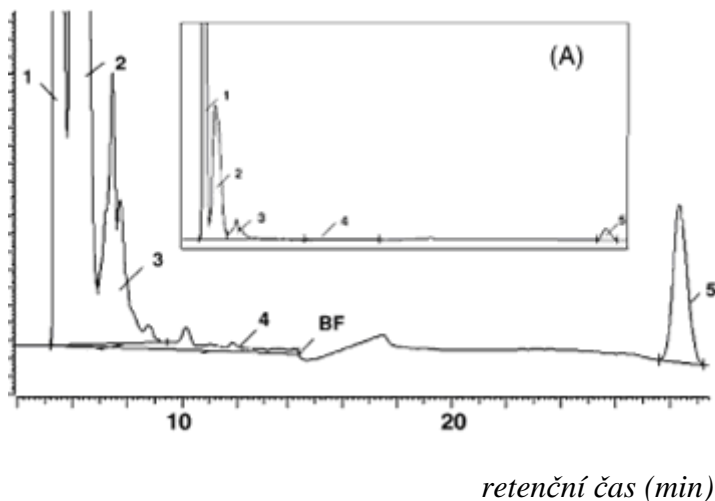
PA) a FAME. Data byla získána s použitím RID pro: o-xylen, 1-methylnaftalen, fenantren a FAME. Kalibrační data s použitím UV detektoru byla pro polycyklické aromáty (260 nm) a FAME (210 nm). Tyto hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. IV.

Tabulka č. IV: Kalibrační data stanovených aromatických uhlovodíků a FAME

Skupina sloučeniny	Odezvový faktor pro RID detektor	Korelační faktor	Odezvový faktor pro UV-DAD detektor	Korelační faktor
Alifatický uhlovodíky	$7,269e^{-6}$	0,9999	-	-
MA uhlovodíky	$2,752e^{-6}$	1,0000	-	-
DA uhlovodíky	$1,503e^{-6}$	0,9999	-	-
PA uhlovodíky	$11,39e^{-6}$	0,9986	$1,525e^{-8}$	0,9999
FAME	$3,742e^{-6}$	0,9995	$1,976e^{-7}$	0,9981

Po zavedení vzorku bionafty do kolony byly všechny uhlovodíkové sloučeniny vymývány přímo, zatímco methylestery mastných kyselin byly silně zadržovány na stacionární fázi. Bylo vyžadováno změnit směr mobilní fáze v koloně, aby eluát vycházel z kolony jako jediný pík. Retenční čas píku methylesterů mastných kyselin byl dvakrát větší.

odezva detektoru



Obrázek č. 10: Chromatogram vzorku bionafty s obsahem 7 % FAME.

Obrázek č. 10 ukazuje typický chromatogram získaný kapalinovou chromatografií na koloně LiChrospher NH₂ (zrnění: 5 μm, 250 mm x 4 mm i.d.), průtok mobilní fáze (n-heptan) byl 0,8 ml.min⁻¹, teplota 20°C a použitá koncentrace vzorku byla 0,05 g.ml⁻¹.

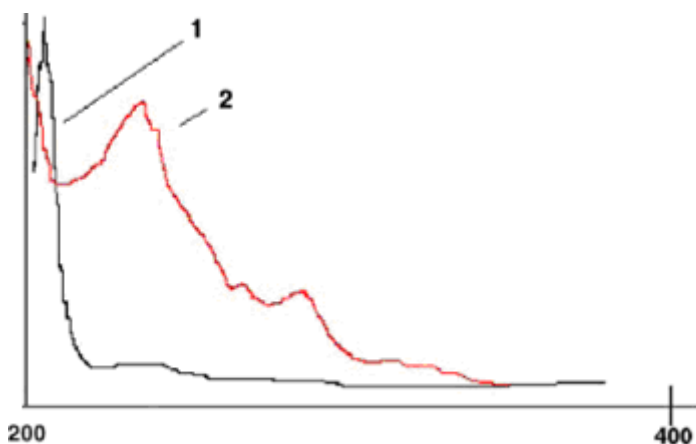
Jako detektor byl použit RID. BF (backflush) je bod, při kterém se změnil směr průtoku mobilní fáze, tento děj nastal po 14 min. 1= parafíny + nafteny + olefiny, 2= MA uhlovodíky, 3= DA uhlovodíky, 4= PA uhlovodíky, 5= methylestery mastných kyselin.

Stanovení tri- a polycyklických aromatických uhlovodíků je s použitím UV detektoru mnohem přesnější a preciznější než s použitím RID detektoru. Při použití UV detektoru limitní obsah PAU musí být alespoň 0,01 % a při použití RID detektoru tento obsah musí být min. 3 %. Pro stanovení mono- a diaromatických uhlovodíků není UV detektor příliš vhodný. Odezvový faktor pro tyto sloučeniny je silně závislý na výrobní technologii bionafty a na zdroji surového oleje.

Použitím UV-DAD a RID detektoru zapojené v sérii pro stanovení obsahu FAME a aromatických uhlovodíků v bionaftě je nejvýhodnější, protože poskytnou přesné a precizní stanovení změny toku v koloně, což umožní stanovit přítomnost methylesterů mastných kyselin a dokáží detekovat přítomnost pryskyřic.

V testované bionaftě mohou být obsaženy deriváty pyrenu zvláště, když jeho výroba probíhala hydrokrakováním. UV-DAD detektor je schopen detekovat koncentrace těchto látek. Bionafta, která byla uložena dlouhou dobu, může obsahovat pryskyřice, jejíž pík se může překrývat s píkem FAME. V praxi většinou obsah FAME v naftě přesahuje přes 10 % a potom příspěvek pryskyřice v píku FAME je malý.

Pokud identifikujeme FAME a pryskyřice v naftovém oleji může to být provedeno s použitím UV-DAD detektoru. Různé vlnové délky dovolují stanovit FAME a pryskyřice jednotlivě. Jak je zřejmé z obr. 11 u FAME dochází k silné absorpci UV záření pod 215 nm, zatímco pryskyřice mají v tomto rozsahu zanedbatelně malou absorbanci.



vlnová délka (nm)

Obrázek č. 11: UV spektra odpovídající maximu píku 1 – FAME a 2 – pryskyřice.

Separace FAME pomocí HPLC s Evaporative Light-scattering detektorem

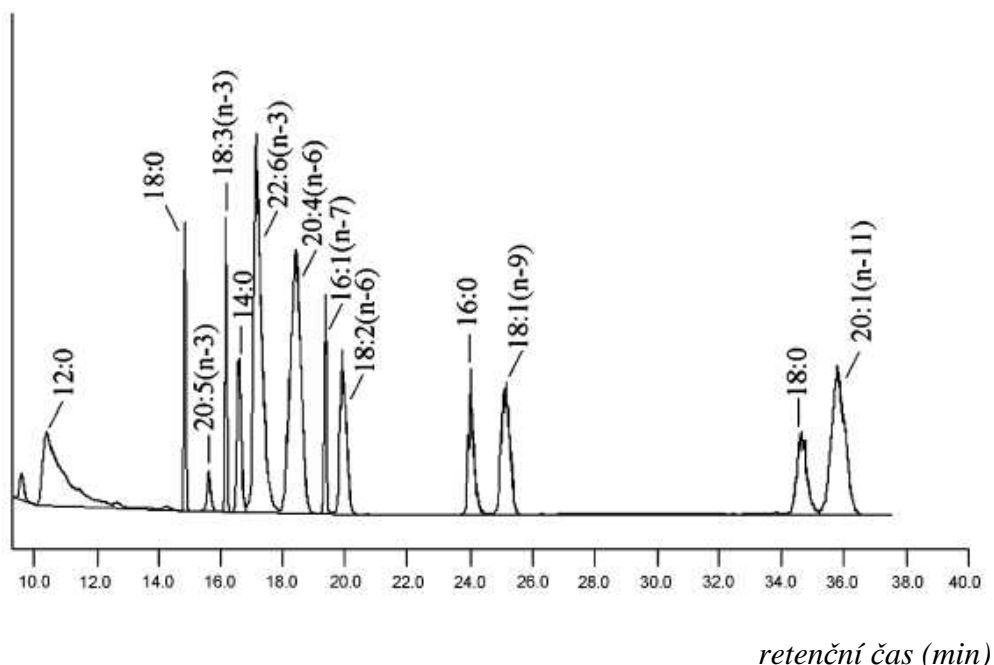
Separace a kvantifikace methylesterů mastných kyselin byla provedena pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie s „evaporative light-scattering“ detektorem (ELSD) [34]. Ke kvalitativnímu a kvantitativnímu vyhodnocení 13 mastných kyselin přítomných hlavně v přírodních složkách jako rostlinách, rybách a řasách byla použita metoda HPLC s obrácenou reversní fází (RP) C_{18} . RP-HPLC je více flexibilní než GC a to z toho důvodu, že se může volit různý poměr mobilní fáze (voda/bezvodá sloučenina) a tím ovlivňovat dobu retence a rozlišení. Nejčastěji je používán fotometrický detektor. Avšak v této práci byl navrhnut detektor ELSD, který pracuje na principu měření množství rozptylu světla roztoku obsahujícího částičky, kterým prochází světelný paprsek. Detekovat mastné kyseliny pomocí UV detektoru není příliš výhodné, protože tento detektor není dostatečně citlivý ani selektivní pro toto stanovení z toho důvodu, že mastné kyseliny neobsahují vhodné chromofory, které dokážou absorbovat ultrafialové záření.

Lin a kol. [35] separovali FAME pomocí RP C_{18} HPLC. Detekci provedli pomocí ELSD. Methylestery mastných kyselin měly rozmezí uhlíků mezi C_{12} až C_{22} . Separaci dokončili během 37 min. V této práci provedli reesterifikaci a výsledný roztok FAME odpařili do sucha a následně ho rozpustili pomocí methanolu. Takto připravený roztok vstříkovali do kolony. Rozdílné odezvy methylesterů mastných kyselin vycházejících z detektoru byly způsobeny buď délkou řetězce a nebo stupněm nasycenosti FAME. Delší

řetězec a menší nenasycenost přispívá ke snadnější detekci než kratší řetězec a větší nasyčenost FAME. Záleží také na koncentraci FAME. Například kyseliny palmitová, olejová a linolová jsou lépe detekovány, když mají nižší koncentrace v porovnání s ostatními kyselinami. Naproti tomu kyseliny s kratším řetězcem methylesterů mastných kyselin (např. myristová) jsou lépe detekovány při vyšších koncentracích, protože jejich molekulová hmotnost je nízká. Analýza byla uskutečněna za následujících podmínek. Systém vysokotlaké kapalinové chromatografie byl sestaven z čerpadla Jasco PU-1580 a Alltech ELSD 500 MKIII Evaporative Light-scattering detektoru. Sériově byly zapojeny dvě kolony reversní fáze C₁₈ ODS-3 (250 mm x 4,6 mm i.d.). Jako dávkovací ventil byl použit Rheodyne model 7725. Průtoková rychlost byla 1 ml.min⁻¹ a jako mobilní fáze byla použita směs methanol:voda (97:3). Podíl methanolu v mobilní fázi ovlivňoval správnou separaci FAME. Vyšší koncentrace methanolu snížila dobu retence. Doba retence závisela na dvojných vazbách a délce řetězce methylesterů mastných kyselin. Kratší řetězce FAME byly vymývány dříve než delší řetězce. FAME obsahující více dvojných vazeb byly vymývány dříve než FAME bez dvojných vazeb.

Na obrázku č. 12 je ukázána separace 13 standardních methylesterů mastných kyselin.

odezva detektoru



Obrázek č. 12: Separace standardní směsi FAME pomocí reversní fáze HPLC

Separace vzorku obsahujícího FAME metodou kapalinové chromatografie (LC) a následná analýza plynovou chromatografií (GC)

Evropský standard (EN 14331:2004) [36] specifikuje metodu pro separaci methylesterů mastných kyselin ze středních frakcí destilace kapalinovou chromatografií a pro stanovení jednotlivých esterů plynovou chromatografií. Tuto metodu lze použít pro FAME rostlinného nebo živočišného původu, které obsahují methylestery mezi C_{14} – C_{24} . Tyto FAME jsou hlavně složené z mastných kyselin C_{16} – C_{18} . Metoda může být využita pro separaci a charakterizaci FAME, když jejich obsah ve střední frakci je max. 5 %.

Metoda zahrnuje dva stupně:

1. separaci methylesterů mastných kyselin ze střední frakce kapalinovou chromatografií při atmosférickém tlaku na křemenné mikrokoloně
2. charakterizace separovaných FAME pomocí plynové chromatografie

V prvním stupni byla použita mikrokolona (25 mm x 10 mm i.d.) obsahující přibližně 700 mg silikagelu (velikost částic 55 μm – 105 μm). Separace byla provedena tak, že na kolonu bylo přiváděno 0,100 ml vzorku a vzorek byl nechán procházet kolonou zhruba 2 min. Eluce střední frakce s 10 ml hexanu, musela probíhat pomalu, rychlost eluce byla asi 3 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Jestliže obsah FAME ve střední frakci byl větší jak 5 %, byl zředěn se vzorkem paliva bez FAME, aby byl snížen obsah FAME.

V dalším stupni byla pro analýzu plynovou chromatografií použita kapilární kolona se stacionární fází polyethylenglykolovou, délka kolony byla 30 m, vnitřní průměr kolony byl 0,32 mm a tloušťka filmu byla 0,25 μm . Jako nosný plyn byl použit vodík nebo helium (tlak 30 kPa až 80 kPa). Vstřikovací blok měl teplotu 250 °C. Teplota termostatu byla 200 °C a jako detektor byl použit plamenový ionizační detektor.

Podmínky pro analýzu (např. velikost nástříku, split stupeň) musí být přizpůsobeny detekci i nejméně přítomných složek, např. nejmenší píky esterů $C_{24:0}$ a $C_{24:1}$ kyselin. K vyhodnocení přítomnosti jednotlivých esterů mastných kyselin je používáno porovnání retenčních časů získaných ze známého složení FAME a ze vzorku o neznámém složení. Obě analýzy musí být provedeny za stejných podmínek.

Stanovení složení směsi methylesterů:

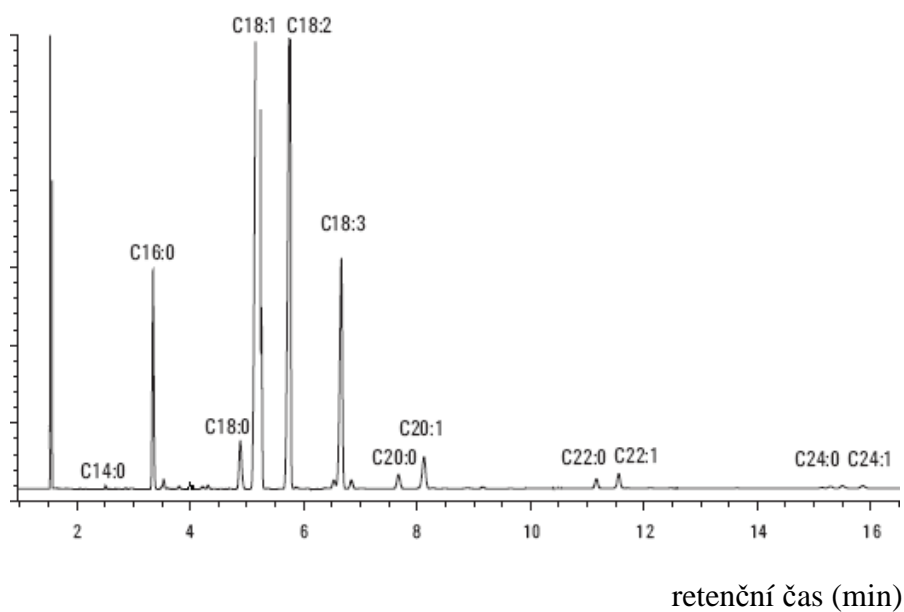
Množství složky x je vypočítáno podle rovnice (1)

$$x = 100 \cdot A_i / \Sigma A_i \quad (1)$$

kde: A_i je plocha píku odpovídající jediné složce

ΣA_i je suma ploch všech píků (estery C_{14} – C_{24})

Jako příklad je ukázán chromatogram (obr. 13) vzorku MEŘO.



Obrázek č. 13: Chromatogram vzorku MEŘO

Tabulka č. V udává složení methylesterů mastných kyselin získaných vyextrahováním z palmového, řepkového a slunečnicového oleje.

Tabulka č. V: Obsah mastných kyselin v % v rostlinných olejích

Mastné kyseliny / typ oleje		Palmový olej	Řepkový olej	Slunečnicový olej
Palmitová	C16:0	39,3-47,5	2,5-7,0	5,0-7,6
Palmitolejová	C16:1	≤0,05-0,6	≤0,05-0,6	≤0,05-0,3
Stearová	C18:0	3,5-6,0	0,8-3,0	2,7-6,5
Olejová	C18:1	36,0-44,0	51,0-70,0	14,0-39,4
Linolová	C18:2	9,0-12,0	15,0-30,0	48,3-74,0
Linolenová	C18:3	≤0,05-0,5	5,0-14,0	≤0,05-0,3
Arachová	C20:0	≤0,05-1,0	0,2-1,2	0,1-0,5
Gadolejová	C20:1	≤0,05-0,4	0,1-4,3	0,05-0,3
Behenová	C22:0	≤0,05-0,2	≤0,05-0,6	0,3-1,5
Eruková	C22:1	≤0,05	≤0,05-2,0	≤0,05-0,3
Lignocerová	C24:0	≤0,05	≤0,05-0,3	≤0,05-0,6

Superkritická fluidní chromatografie (SFC)

Superkritická fluidní chromatografie je metoda, která vhodně kombinuje výhody plynové i kapalinové chromatografie, nalézá se na rozhraní mezi GC a HPLC. U této metody je rychlost analýzy větší než v metodě kapalinové chromatografie a zároveň dosahované hodnoty separační účinnosti jsou srovnatelné s metodou GC. Avšak většímu rozšíření této metody brání vyšší cenová náročnost ve srovnání s GC a HPLC a rovněž složitější instrumentace. Jako mobilní fázi je zde používán plyn při nadkritické teplotě, který nemůže být zkapalněn žádným tlakem (stává se superkritickou kapalinou). Tímto plynem může být CO₂ v nadkritickém stavu, použít lze rovněž N₂O, SF₆, NH₃ či xenon. Jako detektory jsou využívány detekční systémy známé z plynové chromatografie i z HPLC. Metoda SFC je uplatňována při analýze polymerů, vosků, dehtů, fosilních paliv, léčiv i potravinářských produktů [37].

Sakaki [37] využil k separaci methylesterů mastných kyselin superkritickou fluidní chromatografií, kde jako stacionární fáze je použita aminopropyl- skupina vázána na silikagel. Místo aminopropyl- skupiny může být navázána octadecylsilyl- skupina (ODS). S použitím ODS na silikagelu je kapacitní faktor menší, než kapacitní faktor samotného silikagelu, při stejné teplotě a tlaku. Tím je dokázáno, že polarita těchto funkčních skupin přispívá k intenzitě zadržení látky rozpuštěné v roztoku. Skupina aminopropyl- je méně polární než hydroxyl- skupina na povrchu silikagelu. Tzn., že když bude vzrůstat vazebná hustota v aminopropyl- skupině, bude se snižovat polarita, a tím pádem se bude snižovat i kapacitní faktor. Na ODS koloně byly navzájem separovány estery mastných kyselin v závislosti na různé délce řetězce a na stupni nenasycenosti. Na této koloně byly estery

s dlouhým uhlovodíkovým řetězcem a nízkým stupněm nenasyčenosti silně zadržovány. Estery s více dvojnými vazbami byly silně zadržovány na aminopropyl vázaném na silikagelu, zatímco na ODS byly zadržovány slabě. Se vzrůstající vazebnou hustotou aminopropyl- skupin selektivita podle délky řetězce vzrůstá, na druhé straně selektivita podle stupně nenasyčenosti esterů se snižuje.

Vysokoúčinná vylučovací chromatografie (HPSEC)

Mezi chromatografické metody patří také vysokoúčinná vylučovací chromatografie **HPSEC** (high – performance size – exclusion chromatography). Tato metoda je využívána k separaci molekul podle jejich velikosti a k určení molekulové hmotnosti. Vylučovací chromatografie využívá silikagelové stacionární fáze nebo stacionární fáze na bázi organických polymerů (kopolymer styrenu a divinylbenzenu).

Vysokoúčinná vylučovací chromatografie [38] je vhodná metoda pro stanovení množství kyslíkatých skupin v oxidačních sloučeninách, které vznikly působením kyslíku na bionaftu, lišící se molekulovou hmotností nebo velikostí. HPSEC metoda je používána také ke stanovení primárních a sekundárních kyslíkatých oxosloučenin v methylesterech mastných kyselin.

Spalování bionafty

Spalování je neodmyslitelně oxidativní proces, který by měl přeměnit organické látky na CO_2 a H_2O . Při spalování motorové nafty dochází k přeměně alkanů na alkoholy, pak na karbonylové sloučeniny, kyselinu karboxylovou, pak na ester a nakonec na oxid uhličitý. Při nedokonalém spalování dochází k produkci toxických látek do ovzduší, jako jsou karbonylové sloučeniny. Smícháním MEŘO a motorové nafty je dosaženo snížení podílu karbonylových sloučenin. U směsí obsahující 2 – 10 % MEŘO není pozorováno snížení karbonylových sloučenin, avšak ve směsi obsahující 20 – 50 % MEŘO je obsah těchto sloučenin nejmenší. [38]

Při spalování MEŘO je větší předpoklad pro dokonalé spálení esterů na CO_2 . Oxidační reakce ovlivňují kvalitu MEŘO především v průběhu dlouhodobého skladování. Tímto problémem se zabýval G. Knothe [39], dle něho tento sklon souvisí s obsahem nenasycených mastných kyselin, především methylenovaných. Spalováním MEŘO s kyslíkem může vzniknout několik typů sloučenin a to oxidací a polymerací. Vzniká v podstatě směs esterů nasycených nebo nenasycených mastných kyselin. V těchto produktech jsou zahrnuty sekundární oxidativní produkty, jako jsou těkavé a netěkavé karbonylové sloučeniny, cyklické mastné kyseliny. Kromě přítomnosti vzdušného kyslíku oxidační stabilitu ovlivňují další faktory včetně přítomnosti světla, vyšších teplot, vnějších materiálů např. kovů, jež mohou obsahovat zásobní kontejnery, peroxidů a antioxidantů. Ke stanovení oxidační stability MEŘO se dle evropské normy pro biodiesel (EN 14214) používá Rancimatova metoda, která je velmi podobná metodě OSI (Oil Stability Index), AOCS (American Oil Chemistry Society). Dále se ke studii oxidační stability využívají numerické metody, čísla kyselosti a peroxidová čísla.

Pro zachycení karbonylových sloučenin [40] z výfukových plynů je použito dvou způsobů vzorkování. První je tzv. mokré vzorkování pomocí promývačky plynů a druhý je tzv. suché vzorkování pomocí *cartridge* naplněné silikagelem C18. V obojím případě se přidává kyselý roztok 2,4-dinitrofenylhydrazinu, který reaguje s karbonylovými sloučeninami. Získané karbonylové sloučeniny jsou pak separovány a kvantifikovány pomocí HPLC spojené s UV-VIS detektorem.

Závěr

V této práci byly diskutovány metody pro stanovení směsné motorové nafty a klasické motorové nafty ve složkách životního prostředí.

Jedna z nejstarších a stále oblíbených extrakčních technik je extrakce kapalina – kapalina, která může být použita k extrakci methylesterů mastných kyselin obsažených ve vodných nebo půdních vzorkách. Poměrně nová metoda je extrakce tuhou fází. Tato metoda se zdá být výhodnější než metoda LLE díky tomu, že odpadá manipulace s rozpouštědly. Avšak u metody SPE se musí dávat pozor na vhodně zvolený materiál, ze kterého je vyrobena kolona. Další navrhovaná metoda extrakce magnetickou tuhou fází může být použita k izolaci motorové nafty nebo bionafty z kontaminovaných vod. Tato metoda je jednoduchá, rychlá, instrumentálně nenáročná a tudíž i relativně levná. Její velkou výhodou při stanovení obsahu bionafty ve vodě je, že odpadá při rozpouštědlové extrakci vznik emulze mezi dvěma nemísitelnými kapalinami.

Ke stanovení motorové nafty může být použita plynová chromatografie. Touto metodou můžeme stanovit obsah motorové nafty. Bylo zjištěno že motorová nafta je hlavně složena z alifatických nasycených uhlovodíků s počtem uhlíku C₆ až C₂₀. Obecně tetradekan, pentadekan a hexadekan jsou dominantními složky v motorové naftě. Rozvětvené alkany a aromatické látky jsou přítomny v menším množství.

Dále byla navrhována separace methylesterů mastných kyselin. Methylestery ze sojového oleje mohou být separovány pomocí kapilární plynové chromatografie na slabě polární koloně. Bionafta ze sojového oleje představuje jako hlavní složky methylester linolové kyseliny, methylester olejové kyseliny, methylester kyseliny palmitové a v menší míře methylester kyseliny linolenové a stearové.

Methylestery z řepkového oleje mohou být separovány pomocí kapalinové chromatografie. V bionaftě vyrobené z řepkového oleje jsou dominantními kyselinami: kyselina olejová, linolová, linolenová a v menší míře také kyselina palmitová.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je metoda, která může být využita k odseparování alifatických uhlovodíků od methylesterů mastných kyselin, vyjádřených jako suma, ze vzorku bionafty. Vysokoučinná kapalinová chromatografie s reverzní fází C₁₈ může být také využita k separaci jednotlivých mastných kyselin methylesterů.

Seznam zkratek

BHT	butyl hydroxy toluen
DA	diaromát
DAD	detektor s diodovým polem
ELSD	evaporative light-scattering detektor
FAME	methylestery mastných kyselin
FID	plamenový ionizační detektor
FP – HDPE	vysoko polymérní polyethylen potažený polymerem fluoru
GC	plynová chromatografie
HDPE	vysoko polymérní polyethylen
HPLC	vysokoučinná (vysokotlaká) kapalinová chromatografie
HPSEC	vysokoučinná vylučovací chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
LLE	extrakce kapalina – kapalina
MA	monoaromát
MEŘO	methyl ester řepkového oleje
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometr
MSPE	extrakce magnetickou tuhou fází
NIR	blízká infračervená spektroskopie
NMR	nukleární magnetické rezonance
ODS	octadecylsilyl-skupina
PA	tri- a poly- aromát
RID	refraktometrický detektor
SF	stacionární fáze
SFC	superkritická fluidní chromatografie

SPE	extrakce tuhou fází
SPME	mikroextrakce na tuhé fázi
TSE	dvoufázová extrakce rozpouštědlem
UV	ultrafialové záření
VIS	záření ve viditelné oblasti

Použitá literatura

- [1] Databáze fytomasy [online]
Dostupné z <<http://www.fytomasa.cz/cz/page/196/mero-bionafta.html>>,
[cit.12.3.2009]
- [2] Bionafta [online] Dostupné z: <<http://max.af.czu.cz/~miki/biodiesel.htm>>, [cit. 2.4.2009]
- [3] Zhang X., Peterson Ch. L., Reece D., Miller G., Haws R.: Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment
- [4] EPA-560/6-82-003, PB82-233008: Test guidelines: chemical fate-aerobic aquatic biodegradation
- [5] Fangrui Ma., Milford A.: Bioresour. Technol. **70** (1999) 1
- [6] Gerpen J.V.: Fuel Process. Technol. **86** (2005) 1097
- [7] Demirbas A.: Energy Convers Manage **50** (2009) 14
- [8] Shi H., Bao Z.: Bioresour. Technol. **99** (2008) 9025
- [9] [online] Dostupné z: <<http://analyt.wz.cz/Priprava/1.%20Priprava%20vzorku.pdf>>
[cit. 15.6.2009]
- [10] Neves L., Pereira M.A., Mota M., Alves M.M.: Bioresour. Technol. **100** (2009) 91
- [11] Morrison W.R., Smith L.M.: J.Lipid Res. **5** (1964) 600
- [12] N.J.Ritchie, Schutter M.E., Dich R.P., Myrold D.D.: Applied and Environmental Microbiology **66:4**, 1668 (2000)
- [13] Maged P. Mansour: J. Chromatogr. **1097** (2005) 54
- [14] Christie W.W.: Lipid Analysis, Pergamon Press, Oxford 1982
- [15] Russell J.M., Werne J.P.: Organic Geochemistry **38** (2007) 48
- [16] Odpadové fórum 2008 [online]
Dostupné z : <<http://www.odpadoveforum.cz/symposium/TextyOF/627.pdf>>,
[cit.22.5.2009]
- [17] Šafařík I., Šafaříková M., Vrtochová N.: Collect. Czech. Chem. Commun. **60** (1995) 34

- [18] Šafařík I., Šafaříková M., Weyda F., Mosiniewicz-Szablewska E., Slawska-Waniewska A.: *J. Magn. Magn. Mat.* **293** (2005) 371
- [19] Šafaříková M., Kibriková I., Ptáčková L., Hubka T., Komárek K., Šafařík I.: *J. Magn. Magn. Mat.* **293** (2005) 377
- [20] Hubka T., Kandelová M., Komárek K., Šafaříková M., Šafařík I.: *Chem. listy* **100** (2006) 711
- [21] Šafaříková M., Luňáčková P., Komárek K., Hubka T., Šafařík I.: *J. Magn. Magn. Mat.* **311** (2007) 405
- [22] Komárek K., Šafaříková M., Šafařík I., Kandelová M.: *Chem. listy* **100** (2006) 71
- [23] Komárek K., Šafaříková M., Kandelová M., Šafařík I.: *ChemZi* **1** (2005) 267
- [24] Šafaříková M., Ptáčková L., Kibriková I., Šafařík I.: *Chemosphere* **59** (2005) 831
- [25] Šafařík I., Nymburská N., Šafaříková M.: *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **69** (1997) 1
- [26] Šafařík I., Šafaříková M.: *Wat. Res.* **36** (2002) 196
- [27] Monteiro M.R., Ambrozín A.R.P., Liao L.M., Ferreira A.G.: *Fuel* **88** (2009) 691
- [28] Oliveira J. S., Montalvão R., Daher L., Suarez P.A.Z., Rubim J.C.: *Talanta* **69** (2006) 1278
- [29] Bannon C.D., Craske J.D., Felder D.L., Garland I.J., Noman L.M.: *J. Chromatogr.* **407** (1987) 231
- [30] SIGMA – ALDRICH [online] Dostupné z:
<<http://www.sigmaaldrich.com/graphics/supelco/objects/4500/4484.pdf>>,
[cit.18.4.2009]
- [31] McCurry J., Ch. X. Wang: Agilent Technologies, Inc. 2006, Determining the Ester and Linoleic Acid Methyl Ester Content to Comply with EN14103
- [32] Yamamoto K., Kinoshita A., Shibahara A.: *J. Chromatogr. A* **1182** (2008) 132
- [33] Kamiński M., Gilgenast E., Przyjazny A., Romanik G.: *J. Chromatogr. A* **1122** (2006) 153
- [34] Bravi E., Perretti G., Montanari L.: *J. Chromatogr. A* **1134** (2006) 210
- [35] Lin J.T., McKeon T.A., Stafford A.E.: *J. Chromatogr. A* **699** (1995) 85

- [36] ČSN EN 14 331 Kapalné ropné výrobky – charakterizace a oddělení methylesterů mastných kyselin (FAME) ze středních destilátů – Metoda kapalinové chromatografie (LC) / plynové chromatografie (GC), říjen 2004
- [37] Sakaki K.: J. Chromatogr. **648** (1993) 451
- [38] Holgado F., Márquez-Ruiz G., García-Martínez M.C, Dobarganes M.C.,: J. Chromatogr. A **1165** (2007) 122
- [39] Knot G.: Fuel Process. Technol. **xx** (2007) xxx, article in press
- [40] Torres E.A., Guarieiro L.L.N., Pereira P.A.P., Rocha G.O., Andrade J.B.: Atmospheric Environment **42** (2008) 8211

Seznam tabulek

	strana
Tabulka č. I: Porovnání emisí motorové nafty a bionafty	12
Tabulka č. II: Složení FAME vyjádřené v % (m/m) v různých typech olejů	28
Tabulka č. III: Seznam kyselin	30
Tabulka č. IV: Kalibrační data stanovených aromatických uhlovodíků a FAME	33
Tabulka č. V: Obsah mastných kyselin v % v rostlinných olejích	39

Seznam obrázků

	strana
Obrázek č. 1: Reesterifikace triglyceridu s alkoholem	13
Obrázek č. 2: Schéma výroby MEŘO	14
Obrázek č. 3: Chromatogram methylesterů mastných kyselin C16 a C18 vyextrahované HDPE kolonou	21
Obrázek č. 4: Chromatogram methylesterů mastných kyselin C16 a C18 vyextrahovaných FP-HDPE kolonou	22
Obrázek č. 5: Chromatogram methylesterů mastných kyselin C16 a C18 vyextrahovaných skleněnou kolonou	22
Obrázek č. 6: Chromatogram vzorku motorové nafty	27
Obrázek č. 7: Chromatogram standardní směsi FAME	29
Obrázek č. 8: Chromatogram analyzovaného vzorku FAME	30
Obrázek č. 9: Schéma aparatury pro HPLC s dávkovací smyčkou se šesticestným ventilem	32
Obrázek č. 10: Chromatogram vzorku bionafty s obsahem 7 % FAME	33
Obrázek č. 11: UV spektra odpovídající maximu píku 1-FAME a 2-pryskyřice	35
Obrázek č. 12: Separace standardní směsi FAME pomocí reverzní fáze HPLC	36
Obrázek č. 13: Chromatogram vzorku MEŘO	38