Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Možnosti analýzy (mezi)produktů epoxidace esterů

Bc. Ondřej Bělava

Diplomová práce
2022

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Bc. Ondřej Bělava**
Osobní číslo:	**C20493**
Studijní program:	**N0531A130035 Fyzikální chemie**
Téma práce:	**Možnosti analýzy (mezi)produktů epoxidace esterů**
Téma práce anglicky:	**The possibilities of determination of intermediates and products of ester epoxidation**
Zadávající katedra:	**Katedra fyzikální chemie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši o možnostech analýzy esterů a epoxidů v různých směsích včetně popisu principu přístrojů nutných pro analýzu.
2. Proveďte epoxidace esterů s připravených z různých olejů.
3. Směsi esterů analyzujte pomocí GC-MS a HPLC, případně dalšími metodami.
4. Ze získaných výsledků se pokuste identifikovat jednotlivé látky se směsi.

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

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Martin Hájek, Ph.D.**
Katedra fyzikální chemie

Datum zadání diplomové práce: **28. února 2022**
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

doc. Ing. Alena Komersová, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Možnosti analýzy (mezi)produktů epoxidace esterů jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice

V Pardubicích dne:

Ondřej Bělava

Poděkování

Zde bych rád poděkoval vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Martinu Hájkovi, Ph.D. za cenné rady, četné konzultace a ochotu. Rovněž bych rád poděkoval Ing. Aleši Vávrovi, Ph.D. a Ing. Davidu Kociánovi za spolupráci a rady při práci v laboratoři a Ing. Tomáši Hájkovi, Ph.D a Ing. Karlu Frolichovi, Ph.D za jejich ochotu a pomoc s analytickými metodami. Rád bych poděkoval i Ing. Jaroslavu Kocíkovi Ph.D. za umožnění stáže v Orlen UniCRE.

Neposledně své rodině za umožnění studia a podporu během něj a přítelkyni za trpělivost a pomoc s finálními úpravami.

ANOTACE

Práce se zabývá možnostmi analýzy meziproduktů a produktů vzniklých epoxidací methylesterů vyšších mastných kyselin. V teoretické části jsou popsány charakteristické vlastnosti rostlinných olejů a jejich esterů, transesterifikace, epoxidace a hlavní část tvoří vybrané analytické metody. Experimentální část popisuje přípravu epoxidů z methylesterů vyšších mastných kyselin slunečnicového a lněného oleje, které byly vybrány z důvodu rozdílného zastoupení vyšších mastných kyselin. Při epoxidaci vzniká velké množství (mezi)produktů, které byly následně analyzovány pomocí infračervené spektrometrie, plynové chromatografie a kapalinové chromatografie. Dále bylo stanoveno jódové číslo, epoxidový ekvivalent, oxidační stabilita a kinematická viskozita. Produkty epoxidace methylesterů slunečnicového oleje byly stabilní, přičemž produkty epoxidace methylesterů lněného oleje reagovaly na další produkty (alkoholy), což bylo potvrzeno infračervenou spektrometrií. Byly identifikovány produkty epoxidace methylesterů kyseliny linolové a nepřímo identifikovány produkty epoxidace methylesterů kyseliny linolenové.

KLÍČOVÁ SLOVA

rostlinné oleje, epoxidace, methylestery, vyšší mastné kyseliny, HPLC, GC-MS, IČ

TITLE

The possibilities of determination of intermediates and products of ester epoxidation

ANNOTATION

The thesis deals with the possibilities of analysis of intermediates and products formed by epoxidation of methyl esters of higher fatty acids. The theoretical part describes the characteristic properties of vegetable oils and their esters, transesterification, epoxidation and the main part consists of selected analytical methods. The experimental part describes the preparation of epoxies from the methyl esters of the higher fatty acids of sunflower and linseed oil, which were selected due to the different representation of higher fatty acids. Epoxidation produces a large number of intermediates and products, which have been analyzed using infrared spectrometry, gas chromatography and liquid chromatography. In addition, the iodine number, epoxy equivalent, oxidation stability and kinematic viscosity were determined. The products of the epoxidation of the methyl esters of sunflower oil were stable, while the products of the epoxidation of the methyl esters of linseed oil reacted to other products (alcohols), which were confirmed by infrared spectrometry. The products of the epoxidation of linoleic acid methyl esters have been identified and the products of the epoxidation of linolenic acid methyl esters have been indirectly identified.

KEY WORDS

vegetable oils, epoxidation, methylesters, higher fatty acids, HPLC, GC-MS, IR

Obsah

1. Úvod 14

2. Teoretická část 15

2.1. Rostlinné oleje 15

2.1.1. Využití a vlastnosti rostlinných olejů 16

2.2. Transesterifikace 18

2.3. Epoxidace 20

2.4. Analytické metody 24

2.4.1. Infračervená spektrometrie 24

2.4.2. Plynová chromatografie 25

2.4.3. Kapalinová chromatografie 27

2.4.4. Hmotnostní spektrometrie 31

2.4.5. Titrační metody 33

2.5. Analýza produktů epoxidace 34

3. Experimentální část 37

3.1. Použité chemikálie 37

3.2. Příprava epoxidů 37

3.2.1. Transesterifikace 37

3.2.2. Epoxidace 38

3.3. Analytické metody 39

3.3.1. Infračervená spektrometrie 39

3.3.2. Plynová chromatografie 39

3.3.3. Kapalinová chromatografie 40

3.3.4. Titrační a další analytické metody 41

3.4. Stáž 43

4. Výsledky a diskuse 45
4.1. Infračervená spektrometrie 46
4.2. Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí 51
4.3. Kapalinová chromatografie 58
4.3.1. Optimalizace metody 58
4.3.2. Analýza vzorků 62
4.4. Titrační a další analytické metody 65
4.5. Stáž 66
5. Závěr 69
6. Seznam literárních zdrojů 71

Seznam ilustrací a tabulek

Ilustrace:

Obrázek 1: Chemická struktura VMK: kyselina stearová (A), olejová (B), linolová (C) a linolenová (D) [2] 15

Obrázek 2: Schéma cis a trans stereoizomerů....16

Obrázek 3: Schéma allylového a bis-allylového vodíku....18

Obrázek 4: Schéma transesterifikační reakce 19

Obrázek 5: Schéma vzniku mýdel z volných mastných kyselin....20

Obrázek 6: Schéma vzniku peroxokyseliny....21

Obrázek 7: Schéma vzniku epoxidu....21

Obrázek 8: Možné nežádoucí reakce na oxiranové funkční skupině [2] 22

Obrázek 9: Schéma epoxidace dvojné vazby pomocí wolframového katalyzátoru [26]....23

Obrázek 10: Schéma vzniku peroxokyseliny z kyseliny olejové [31]....24

Obrázek 11: Schéma nadstavce pro měření ATR spekter....25

Obrázek 12: Schéma plynového chromatografu [37] 26

Obrázek 13: Schéma kapalinového chromatografu [41]....28

Obrázek 14: Schéma interferenčního refraktometrického detektoru [41] 30

Obrázek 15: Schéma spektrofotometrického detektoru [34] 31

Obrázek 16: Schéma kvadrupólového hmotnostního analyzátoru [49]....33

Obrázek 17: Schéma reakcí při stanovení jódového čísla....34

Obrázek 18: Nicolet iS50 FT-IR s diamantovým ATR modulem 39

Obrázek 19: Plynový chromatograf Agilent 7890A 44

Obrázek 20: IČ spektra průběhu epoxidace ME_SL 47

Obrázek 21: Výřez IČ spekter průběhu epoxidace ME_SL (3100-2750 a 1800-1650 cm^{-1}) ...48

Obrázek 22: Výřez IČ spekter průběhu epoxidace ME_SL (1600-600 cm^{-1})....48

Obrázek 23: IČ spektra průběhu epoxidace ME_LN....49

Obrázek 24: Výřez IČ spekter průběhu epoxidace ME_LN (3100-2750 a 1800-1600 cm^{-1})...50

Obrázek 25: Výřez IČ spekter průběhu epoxidace ME_LN (1080-600 cm^{-1}).....50
Obrázek 26: Chromatogram (GC-MS) ME_SL_0 h.....52
Obrázek 27: Hmotnostní spektrum epoxidu ME kyseliny linolové s RT 33,2 minut.....52
Obrázek 28: Hmotnostní spektrum methyl 12,13-epoxy-oktadeca-9-enoatu [64] 52
Obrázek 29: Hmotnostní spektrum epoxidu ME kyseliny linolové s RT 33,4 minut.....53
Obrázek 30: Hmotnostní spektrum methyl 9,10-epoxy-oktadeca-12-enoatu [64] 53
Obrázek 31: Chromatogram (GC-MS) epoxidace ME_SL_ 4 h.....54
Obrázek 32: Zastoupení jednotlivých ME_SL v průběhu epoxidace 54
Obrázek 33: Zastoupení epoxidů ME_SL v průběhu epoxidace 55
Obrázek 34: Chromatogram (GC-MS) ME_LN_0 h 55
Obrázek 35: Chromatogram (GC-MS) epoxidace ME_LN_4 h.....56
Obrázek 36: Zastoupení píků jednotlivých ME_LN v průběhu epoxidace 57
Obrázek 37: Zastoupení epoxidů ME_LN v průběhu epoxidace.....58
Obrázek 38: Optimalizace HPLC – různé zapojení chromatografických kolon.....59
Obrázek 39: Optimalizace HPLC – porovnání metanolu, acetonitrilu a jejich směsí (epoxid ME řepky).....59
Obrázek 40: Optimalizace HPLC – porovnání různých poměru metanolu s acetonitrilem (epoxid ME_LN).....60
Obrázek 41: Optimalizace HPLC – vliv rychlosti průtoku mobilní fáze (metanol).....60
Obrázek 42: Optimalizace HPLC – reprodukovatelnost měření: vlevo – laboratorní teplota, vpravo – použiti termostatu 61
Obrázek 43: Optimalizace HPLC – vliv teploty termostatu kolon (acetonitril) 61
Obrázek 44: Chromatogramy (HPLC) průběhu epoxidace ME_SL.....63
Obrázek 45: Chromatogramy (HPLC) průběhu epoxidace ME_LN 64
Obrázek 46: Záznam SimDis epoxidovaného ME_LN po 24 hodinách.....66
Obrázek 47: Graf závislosti konverze methylesterů na čase E_AcN_W a E_AcN_TAP 67
Obrázek 48: Záznam SimDis vzorků E_AcN_W (vlevo) a E_TBA_TPA (vpravo) 68

Tabulky:

Tabulka 1: Zastoupení MK v rostlinných olejích [16].....18

Tabulka 2: Navážky vzorku pro stanovení jódového čísla 42

Tabulka 3: Hlavní možné produkty epoxidace methylesterů vyšších mastných kyselin.....46

Tabulka 4: Naměřené indexy lomu pro ATR korekci.....47

Tabulka 5: Počet dvojných vazeb a oxiranových kyslíku u jednotlivých epoxidů.....56

Tabulka 6: Kalibrační závislosti pro jednotlivé ME (y-suma ploch píků, x - hm.% ME ve vzorku).....62

Tabulka 7: Průběh konverze nenasycených ME v čase 65

Tabulka 8: Jódové číslo, epoxidový ekvivalent, kinematická viskozita a indukční perioda 65

Seznam zkratek a značek

ATR	zeslabená úplná reflektance
ELSD	odpařovací detektor rozptylu světla
ESI	elektrosprejová ionizace
FID	plamenově ionizační detektor
FTIR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysoko-účinná kapalinová chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
ME	methylester
MK	mastná kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
RI	refraktometrický detektor
SimDis	simulovaná destilace
TAP	titano-alumino-fosfát
VMK	vyšší mastné kyseliny

EE	epoxidový ekvivalent, mol/kg
IV	jodové číslo, g I_2/100 g
RT	retenční čas, min

1. Úvod

Rozvoj průmyslu, a tedy i vývoj a růst civilizace zapříčinil nárůst množství vytěžených a spotřebovaných fosilních paliv, jejichž zásoby nejsou nekonečné a dříve či později budou vyčerpány. Velkým problémem je i vliv přeměn fosilních paliv na užitečnější formy energie na životní prostředí. Právě tyto a další problémy vedou k hledání nových, obnovitelných a šetrnějších alternativ.

Jednou z alternativ je využití rostlinných olejů k výrobě biopaliv, biolubrikantů a dalších látek. Výhodou rostlinných olejů je jejich obnovitelnost, dostupnost a šetrnost k životnímu prostředí, což z nich činí ideální zdroj. Jejich transesterifikací s nízkomolekulárním alkoholem můžeme rostlinné oleje přeměnit na estery vyšších mastných kyselin neboli bionaftu, která má velmi podobné vlastnosti jako běžná nafta z fosilních paliv a může být přímo použitá jako palivo pro dieselové motory. Nevýhodou bionafty ve srovnání s fosilní naftou jsou vyšší nároky na její skladování vzhledem k nižší oxidační stabilitě způsobné přítomností nenasycenosti (dvojných vazeb) v řetězcích esterů vyšších mastných kyselin. Na druhou stranu mohou být zmíněné dvojné vazby přeměněny na epoxidy s uplatněním jako biolubrikanty, surfaktanty nebo vstupní suroviny pro výrobu cenných chemikálií.

Dle využití lze rostlinné oleje epoxidovat přímo nebo až jejich estery získané transesterifikací olejů. Při přímé epoxidaci rostlinných olejů jsou získaný produkty o vysoké kinematické viskozitě, které jsou tuhé při laboratorní teplotě (25 °C), což nemusí být vždy žádoucí. Proto se využívá epoxidace jejich esterů, jenž mají po epoxidaci nižší kinematickou viskozitu (ve srovnání s epoxidovanými oleji) a jsou při laboratorní teplotě kapalné.

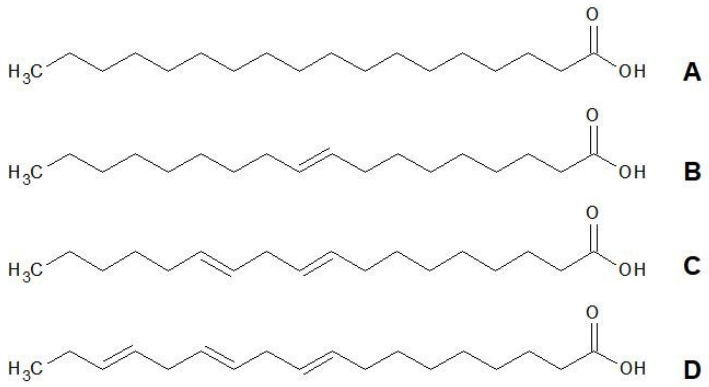
Cílem této diplomové práce bylo prozkoumat možnosti analýzy produktů a meziproduktů vznikajících při epoxidaci esterů vyšších mastných kyselin a pomocí vybraných analytických technik identifikovat jednotlivé produkty (meziprodukty) v reakční směsi.

2. Teoretická část

2.1. Rostlinné oleje

Rostlinné oleje jsou získávány z různorodých plodin a jedno z hledisek, na jehož základě jde oleje rozdělit, je jejich vhodnost pro konzumaci a využití v potravinářském průmyslu. Dělíme je tedy na rostlinné oleje jedlé, které jsou vhodné ke konzumaci a oleje nejedlé. Mezi jedlé rostlinné oleje patří řepkový, slunečnicový a palmový olej a příkladem nejedlého oleje může být olej z lničky seté (Camelina sativa) nebo lněný olej. Z rostlin jsou oleje získávány třemi způsoby, prvním a nejběžněji využívaným způsobem je mechanická extrakce neboli lisování. Dalšími možnostmi jsou extrakce rozpouštědlem a extrakce enzymatická [1].

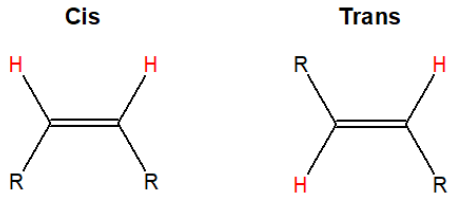
Z chemického hlediska jsou rostlinné oleje převážně složeny z triglyceridů, jejichž struktura se skládá z glycerolu a esterovou vazbou vázaných tří mastných kyselin (MK), které v rámci jedné molekuly triglyceridu mohou, ale také nemusí, být stejné. Od různého zastoupení MK v molekule triglyceridu se odvíjí i různé chemické a fyzické vlastnosti olejů. MK jsou tvořeny rozdílně dlouhými uhlovodíkovými řetězci (odkud pochází i jejich hydrofobní vlastnosti) s různou nasyceností a karboxylovou skupinou.



Obrázek 1: Chemická struktura VMK: kyselina stearová (A), olejová (B), linolová (C) a linolenová (D) [2]

Mastné kyseliny je možné roztřídit do několika skupin. Na základě délky uhlovodíkového řetězce dělíme MK na kyseliny s krátkým (C2-C4), středním (C6-C10) a dlouhým (C12-C26) řetězcem. MK s dlouhým řetězcem se také nazývající vyšší mastné kyseliny (VMK), přičemž nejrozšířenější v rostlinných olejích jsou VMK s osmnácti uhlíky v řetězci. V přírodě se vyskytují uhlovodíkové řetězce tvořeny pouze sudým počtem uhlíků. Podle výskytu dvojných vazeb v řetězci se dělí na nasycené a nenasycené MK. Nasycené MK nemají v řetězci žádnou dvojnou vazbu a při pokojové teplotě jsou tuhé, jako příklad lze uvést kyselinu

palmitovou (C16:0, kde číslo za dvojtečkou značí počet dvojných vazeb) či stearovou (C18:0). Naopak u nenasycených kyselin se v řetězci nachází jedna (mononenasycené MK) a více dvojných vazeb (polynenasycené MK), nejtypičtější jsou kyseliny olejová (C18:1), linolová (C18:2) a linolenová (C18:3), které mají jednu, dvě a tři dvojné vazby v uvedeném pořadí (obrázek 1) a při pokojové teplotě jsou kapalné. Dvojné vazby v uhlovodíkových řetězcích MK jsou izolované, tzn. že jsou odděleny uhlíkem (-C=C-C-C=C-). Přítomnost dvojných vazeb v řetězci dává vzniku cis a trans stereoizomerům MK lišících se pouze v prostorovém umístění substituentů. Cis izomery mají substituenty na stejné straně dvojné vazby, u trans izomerů je tomu naopak (obrázek 2). V přírodních olejích se vyskytují téměř výhradně cis stereoizomery [3, 4].



Obrázek 2: Schéma cis a trans stereoizomerů

2.1.1. Využití a vlastnosti rostlinných olejů

Rostlinné oleje jsou zajímavou vstupní surovinou pro chemický průmysl, kde obvykle nahrazují produkty pocházející z ropy a také působí jako důležitá vstupní surovina pro výrobu řady chemikálií. Důvodem je jejich udržitelnost, šetrnost k přírodě a dostupnost, která vychází z možnosti pěstovat odlišné plodiny (dle typu půdy, podnebných podmínek apod.) poskytující rostlinné oleje téměř po celém světě. Možnost pěstovat a zpracovat rostlinné oleje přímo v místě potřeby je velkou výhodu ve srovnání s ropným průmyslem, kde obvykle musí suroviny urazit značnou vzdálenost, než se dostanou ke spotřebiteli [5].

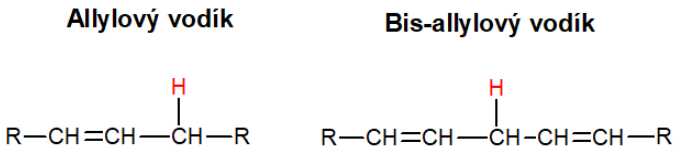
Využití rostlinných olejů by mohlo být rozděleno podle toho, jaká funkční skupina triglyceridu se účastní reakce. Nejvyužívanější je karboxylová skupina, která je získaná hydrolýzou triglyceridů na MK a glycerol. MK mohu být příslušnými reakcemi přeměněny na aminy, amidy, alkoholy a estery mastných kyselin, přičemž se estery MK získávají zejména přímou transesterifikací olejů. Například alkoholy mastných kyselin nacházejí uplatnění jako surfaktanty. Druhou využívanou funkční skupinou jsou dvojné vazby v uhlovodíkovém řetězci. Nejčastěji jsou využívány estery vyšších mastných nenasycených kyselin získány transesterifikací triglyceridů, jejichž dvojné vazby jsou epoxidovány (podrobněji o epoxidech

viz kapitola č.2.3). Epoxidy esterů VMK nachází uplatnění jako stabilizátory a plastifikátory v polymerním průmyslu, lubrikanty a díky reaktivitě oxiranové funkční skupiny jako vstupní surovina pro syntézu polyalkoholů, karbonylových sloučenin, polyuretanů, polyesterů a dalších látek. Kromě esterů MK mohou být epoxidaci podrobeny přímo i rostlinné oleje [6, 7].

V dnešní době je nejznámějším produktem z rostlinných olejů bionafta neboli methylestery (ME) vyšších mastných kyselin. Vyrábí se transesterifikací, při níž vzniká kromě bionafty vedlejší produkt glycerol. O samotné transesterifikaci bude blíže pojednáno v následující kapitole. Vedlejší produkt glycerol nachází po přečištění široké uplatnění v oblastech jako jsou potravinářství, farmacie a kosmetika, ale slouží i jako vstupní surovina pro výrobu polyuretanu, polyesteru nebo propylen glykolu [8].

Rostlinné oleje v podobě triglyceridů s velkou molekulovou hmotností (800–900 g/mol) se jako alternativní palivo nehodí z důvodu vysoké viskozity a nízké těkavosti. Zmíněné vlastnosti jsou příčinou nutnosti přeměny rostlinných olejů na příslušné estery VMK, které se svými vlastnostmi přibližují běžné naftě. Ovšem stále zde zůstává ve srovnaní s fosilními palivy jedna nevhodná vlastnost, a to špatná oxidační stabilita triglyceridů i jejich esterů [9].

Vlastnosti bionafty a obecně i rostlinných olejů závisí na zastoupení MK v olejích. Viskozita roste s rostoucí délkou uhlovodíkového řetězce a klesá s rostoucí nenasyceností, opačný trend lze vidět u esterů s rozvětvenými řetězci [10]. Vliv na viskozitu má také izomerie dvojných vazeb. Vazby v konfiguraci trans mají za následek vyšší viskozitu než v konfiguraci cis, vysvětlením by mohla být právě rozdílná prostorová orientace (obrázek 2). Tvar řetězce trans nenasycených MK je rovný, podobně jako u nasycených kyselin, důsledkem je bližší uspořádání molekul z čehož plyne vyšší viskozita [11]. Oxidační stabilita je rovněž závislá na stupni nenasycenosti/nasycenosti v řetězci vzhledem k faktu, že na dvojných vazbách probíhá oxidace. Proto nejlepší oxidační stabilitu vykazují MK s nasycenými řetězci, kde díky absenci dvojných vazeb nemůže dojit k oxidaci. Rostlinné oleje skládající se hlavně z nenasycených MK jako jsou linolová či linolenová (např. lněný a sójový olej, viz tabulka 1) vykazují větší tendenci k autooxidaci.



Obrázek 3: Schéma allylového a bis-allylového vodíku

Kromě počtu dvojných vazeb záleží i na jejich rozmístění v řetězci, konkrétně na přítomnosti allylových a obzvláště přítomnosti bis-allylových vodíků, které jsou velmi náchylné k autooxidaci vzhledem k poměrně slabé vazbě mezi uhlíkem a vodíkem. Allyl je tvořen metylenem vedle dvojné vazby, v případě bis-allylu se jedná o methylenovou skupinu mezi dvěma dvojnými vazbami (obrázek 3). Rozdíly mezi tendencemi nenasycených VMK, lišících se pouze počtem dvojných vazeb, k oxidaci, lze vyčíst z rychlostí oxidace nalezených v literatuře, kde byla rychlost oxidace pro kyselinu olejovou zvolena jako 1 (žádná bis-allylová skupina) a jedná se tedy o relativní rychlosti. Kyselina linolová měla relativní rychlost oxidace 41 (jedna bis-allylová skupina) a kyselina linolenová 98 (dvě bis-allylové skupiny) [12-14]. Posledním faktorem snižujícím oxidační stabilitu jsou samy estery MK, jenž mohou být v přítomnosti kyslíku hydrolyzovány na původní mastnou kyselinu a alkohol a tím zhoršovat vlastnosti paliva [15].

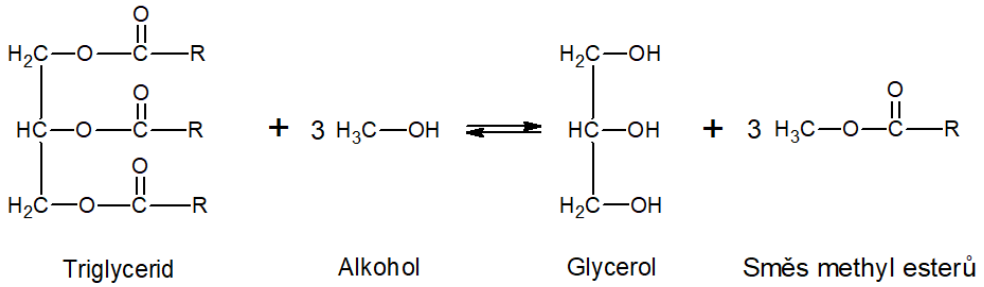
Tabulka 1: Zastoupení MK v rostlinných olejích [16]

Rostlinný olej	Jódové číslo [gI_2/100g]	Mastné kyseliny a jejich zastoupení [$_{hm.}$%]						
		Laurová 12:0	Myristová 14:0	Palmitová 16:0	Stearová 18:0	Olejová 18:1	Linolová 18:2	Linolenová 18:3
Kokosový	6–11	45,1–50,3	16,8–20,6	7,7–10,2	2,3–3,5	5,4–8,1	1,0–2,1	0–0,2
Kukuřičný	103–128	-	0–0,3	8,6–16,5	1,0–3,3	20,0–42,2	39,4–62,5	0,5–1,5
Bavlníkový	99–119	-	0,6–1,0	21,4–26,4	2,1–3,3	14,7–21,7	46,7–58,2	0–0,4
Lněný	177	-	-	4,3-6,7	2,2-3,4	15,8-17,2	13,9-14,6	58,7-64,1
Palmový	50–55	0–0,4	0,5–2,0	40,1–47,5	3,5–6,0	36–44	6,5–12	0–0,5
Arašídový	80–106	0–0,1	0–0,1	8,3–14,0	1,9–4,4	36,4–67,1	14–43	0–0,1
Řepkový	94–120	-	0-0,2	1,5–6,0	0,5–3,1	8–60	11–23	5–13
Sojový	120–143	-	0-0,2	8–13,3	2,4–5,4	17,7–26,1	49,8–57,1	5,5–9,5
Slunečnicový	110–143	0–0,1	0–0,2	5,6–7,6	2,7–6,5	14–39,4	48,3–74	0–0,2

2.2. Transesterifikace

Jak již bylo zmíněno estery vyšších mastných kyselin se připravují transesterifikací triglyceridů. Při transesterifikaci reagují triglyceridy s nižšími alkoholy za vzniku esterů VMK (dle alkoholu) a glycerolu (obrázek 4). Nejčastěji používaným nižším alkoholem je metanol

z důvodu jeho vyšší účinnosti v reakci a nižší ceně ve srovnání s etanolem [8]. Použitím metanolu jsou získávány methylestery VMK. Vzhledem k rovnovážné povaze reakce se používají alkoholy v přebytku pro posunutí rovnováhy směrem k produktům.



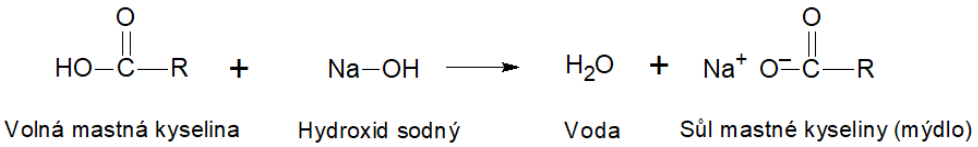
Obrázek 4: Schéma transesterifikační reakce

Pro dosažení vysokého výtěžku reakce (konverze vyšší než 95 %) v přijatelném čase (jednotky hodin) se používá v reakci katalyzátor, který může být bazicky, kyselý nebo enzymatický. Výjimkou je případ, kdy je reakce vedená s alkoholem v superkritickém stavu, jehož specifické vlastnosti (superkritický alkohol je neomezeně mísitelný s olejem) zajišťují dobré výsledky v krátkých časech (jednotky minut) i bez použití katalyzátoru. Nevýhodou reakce se superkritickým alkoholem je náročnost a nákladnost dosažení a udržení superkritických podmínek (350 °C a 20-50 MPa) a požadovaný vysoký poměr alkoholu k oleji (42:1) [8, 17].

Katalýzu transesterifikace lze dále rozdělit podle toho, v jaké fázi se nachází katalyzátor, a to na homogenní a heterogenní. Níže budou nejdříve popsaný bazické a kyselé homogenní katalyzátory nacházející se v kapalném skupenství, tedy ve stejné fázi jako reakční směs (metanol a olej). Homogenní katalýza je účinná, rychlá, levná a vyžaduje ve srovnání s heterogenní mírnější reakční podmínky, ale získaná bionafta a glycerol se musí separovat a promývat značným množstvím destilované vody pro přečištění a neutralizaci katalyzátoru. Nevýhodou je i nenávratná ztráta katalyzátoru vzhledem k nemožnosti jej separovat z reakční směsi.

Bazická katalýza je průmyslově využívaným způsobem pro výrobu bionafty. Jako bazické katalyzátory se používají hydroxidy a alkoholáty alkalických kovů, nejčastěji sodíku a draslíku. Při použití hydroxidů při jejich reakci s metanolem dochází ke vzniku vody, která by mohla v reakční směsi zapříčinit nežádoucí hydrolýzu za vzniku volných MK. Pro eliminaci vzniku vody je výhodné použít přímo alkoholáty alkalických kovů. Nevýhodu bazických katalyzátorů představuje reakce s volnými mastnými kyselinami za vzniku nežádoucích mýdel (obrázek 5).

Vzniklá mýdla je poté nutno náročně a nákladně separovat. Z tohoto důvodu jsou nekvalitní oleje s vysokým obsahem volných mastných kyselin (více jak 1 %) jako zdroj triglyceridů pro bazicky katalyzovanou transesterifikaci nevhodné. Možným řešením vysokého obsahu volných mastných kyselin je před samotnou transesterifikací provést kysele katalyzovanou esterifikaci volných mastných kyselin. Transesterifikace katalyzována bazickým katalyzátorem probíhá přibližně 4000krát rychleji, než je tomu u transesterifikace katalyzované stejným množstvím kyselého katalyzátoru. Velkou předností je i fakt, že bazické katalyzátory ve srovnání s kyselými vytváří méně korozivní prostředí, což snižuje nároky na materiál průmyslových aparatur [16, 18].



Obrázek 5: Schéma vzniku mýdel z volných mastných kyselin

Kyselá katalýza je, jak již bylo zmíněno, značně pomalejší a ve srovnání s bazickou katalýzou vyžaduje delší reakční čas, vyšší teplotu, tlak a poměr metanolu k oleji. Ovšem pro odpadní oleje a tuky (např. z potravinářství) s vysokým obsahem volných mastných kyselin (10-25 %) nabízí výhodu současné přeměny triglyceridů a volných MK na estery [9]. Příkladem kyselých katalyzátorů mohou být kyseliny sírová, fosforečná a chlorovodíková nebo organické sulfonové kyseliny [19].

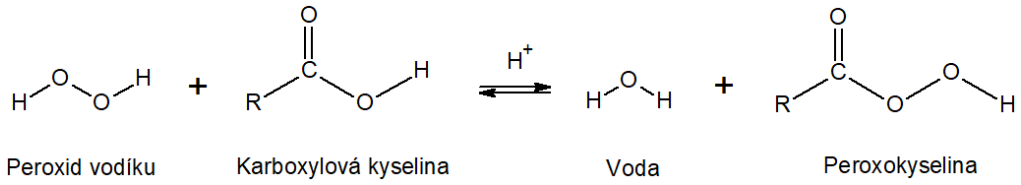
Opakem homogenní katalýzy je katalýza heterogenní, kde katalyzátorem je pevná látka, kterou lze po proběhnutí reakce poměrně snadno separovat filtrací. Možností jsou i průtokové reaktory s ložem pevného katalyzátoru, u kterých dokonce odpadá potřeba filtrace. Takto separované katalyzátory, pokud jejich katalytická aktivita neklesne pod ekonomicky přijatelnou mez, mohou být použity opakovaně. Na druhou stranu vykazují heterogenní katalyzátory nižší konverze, jejich syntéza je nákladnější a vyžadují vyšší reakční teplotu a tlak. Obdobně jako u homogenní katalýzy se dělí heterogenní katalyzátory na bazické a kyselé, které mají stejné výhody/nevýhody jako jejich homogenní protějšky. Mezi používané heterogenní katalyzátory patří oxidy kovů alkalických zemin (hořčíku, vápníku apod.), směsné oxidy a zeolity [20-22].

2.3. Epoxidace

Jedním ze způsobů, jak přeměnit rostlinné oleje a estery rostlinných olejů obsahující nenasycené mastné kyseliny na užitečné produkty je jejich epoxidace. Tato práce se zabývá

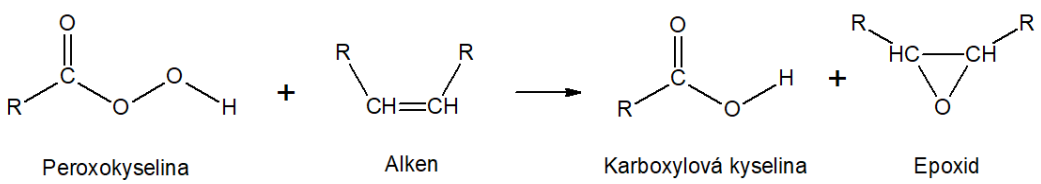
především epoxidací esterů VMK, proto bude rešerše zaměřena obdobně, přesto většina zmíněných informací níže může být aplikována i na přímou epoxidaci rostlinných olejů. Během epoxidace dochází k přeměně dvojných vazeb nacházejících se v uhlovodíkových řetězcích VMK na oxiranovou funkční skupinu.

Existují dvě hlavní možnosti epoxidace, které lze rozdělit podle toho, v jakém skupenství se vůči kapalné reakční směsi nachází katalyzátor na: (i) homogenní epoxidaci, využívající kapalných katalyzátorů a (ii) heterogenní epoxidaci s pevnými katalyzátory. Heterogenní epoxidaci lze dále rozdělit podle použitého katalyzátoru: (i) epoxidaci kovovými katalyzátory, (ii) epoxidaci iontovýměnnými pryskyřicemi a (iii) epoxidaci enzymy. Nejběžnějším způsobem homogenní epoxidace je Prileschajewova reakce, která využívá in-situ vzniklých peroxokyselin jako oxidačních činidel k oxidaci dvojných vazeb. Používány jsou zejména kyseliny permravenčí nebo peroctová vznikající ve vodné fázi reakcí kyseliny mravenčí (octové) s peroxidem vodíku přímo v reakční směsi neboli in-situ (obrázek 6). Užívanější je kyselina mravenčí z důvodu vyšší reaktivity a nízké ceny. Vznik peroxokyseliny je katalyzován silnými Brønstedovými kyselinami, jako jsou kyselina sírová nebo kyselina fosforečná [23].



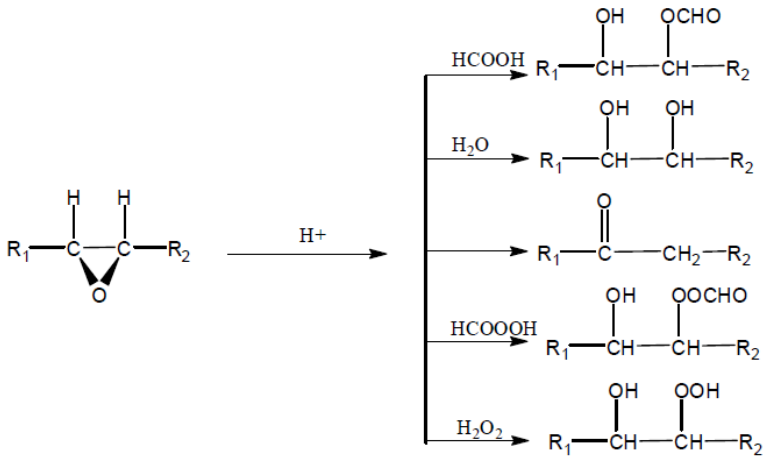
Obrázek 6: Schéma vzniku peroxokyseliny

Vzniklá peroxokyselina přestupuje do olejové fáze (epoxidace probíhá na fázovém rozhraní), kde atakuje dvojnou vazbu VMK za vzniku oxiranového kruhu (epoxidu) a karboxylové kyseliny (obrázek 7). Peroxokyseliny jsou nestálé a dochází k jejich nežádoucímu rozkladu na oxid uhličitý a vodu, čímž dochází ke ztrátě jak oxidačního činidla (peroxokyselina), tak nepřímo i peroxidu vodíku a karboxylové kyseliny. Pro kompenzaci zmíněné ztráty a zajištění průběhu epoxidace se do reakce obvykle přidává peroxid vodíku i karboxylová kyselina v nadbytku [23].



Obrázek 7: Schéma vzniku epoxidu

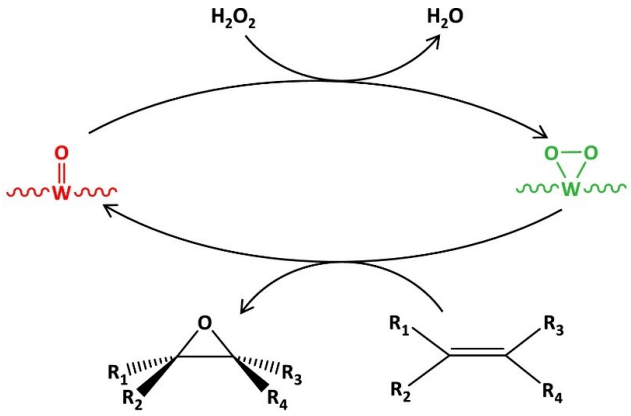
Takto vedená epoxidace je poměrně snadná a rychlá, ale právě z důvodu vysoké reaktivity peroxokyselin a oxiranového kruhu, navíc za přítomnosti kyselého katalyzátoru, dochází k častým bočným reakcím na vedlejší produkty a reakcím zapříčiňující zánik oxiranových funkčních skupin. Vzniklé vedlejší produkty snižují selektivitu reakce, tedy jsou nežádoucí a jejich eliminace ze získaného produktu může být nákladná. Oxiranový kruh se může za přítomnosti kyselého katalyzátoru účastnit reakcí s vodou, karboxylovou kyselinou, peroxokyselinou nebo peroxidem vodíku za vzniku příslušných nežádoucích produktů (obrázek 8). Případně může oxiranový kruh přecházet v kyselém prostředí na karbonylovou funkční skupinu. Z těchto důvodů musí být reakční směs po proběhnutí reakce zneutralizována např. promytím roztokem uhličitanu draselného. Nutnost neutralizace reakční směsi přináší nevýhodu v podobě tvorby odpadní vody obsahující soli z neutralizace. Na druhou stranu právě vysoká reaktivita oxiranové funkční skupiny dělá z epoxidů drahocennou vstupní surovinu pro syntézu různých organických látek, viz kapitola 2.1.1 [23-25].



Obrázek 8: Možné nežádoucí reakce na oxiranové funkční skupině [2]

K minimalizaci vedlejších reakcí a zvýšení selektivity mohou posloužit heterogenní způsoby katalýzy epoxidace využívající pevných iontovýměnných pryskyřic, kovových katalyzátorů či enzymů. Kyselé iontovýměnné pryskyřice obchází potřebu silné minerální kyseliny v reakční směsi, fungují totiž jako katalyzátor reakce karboxylové kyseliny s peroxidem vodíku za vzniku peroxokyselin. In-situ vzniklé peroxokyseliny následně atakují dvojné vazby za vzniku epoxidů, obdobně jak tomu bylo u Prileschajewovy reakce. Výhodou pevných a nerozpustných iontovýměnných pryskyřic je nejen potlačení vedlejších reakcí, ale také zjednodušení separace katalyzátoru od reakční směsi a eliminace potřeby neutralizace [25, 26].

Druhou možností heterogenní katalýzy je použití kovových katalyzátorů obsahující aktivní kyselá nebo redoxní centra schopná aktivovat peroxid vodíku pro epoxidační reakci. Z čehož vyplývá, že tento způsob epoxidace eliminuje potřebu tvorby nebezpečných peroxokyselin v reakční směsi. Existuje několik navržených mechanismů epoxidace pomocí kovových katalyzátorů, které zahrnují tvorbu rozdílných meziproduktů (kov-peroxo, kov-hydroperoxo nebo kov-oxo sloučeniny). Přičemž tvorba meziproduktů může být radikálové nebo neradikálové povahy, případně si mohou oba způsoby navzájem konkurovat. Mezi používané kovové katalyzátory patří například wolfram, molybden nebo titan [27].



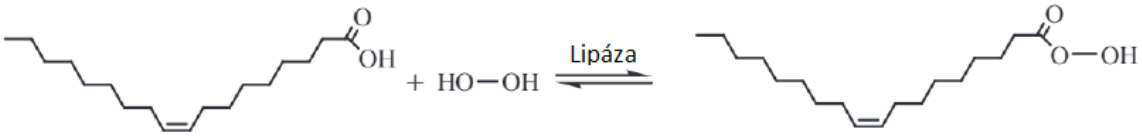
Obrázek 9: Schéma epoxidace dvojné vazby pomocí wolframového katalyzátoru [27]

Wolframové katalyzátory v heterogenní podobě jsou obvykle naneseny na nosiči (SiO_2, Al_2O_3) nebo ve formě oxidu wolframového (WO_3). Oxid wolframový je sice velmi aktivní a může být po separaci použit v dalších reakcích s nízkým poklesem aktivity, ale jeho nanočásticový charakter ztěžuje separaci z reakční směsi. Proto imobilizace wolframu na nosič s velkým specifickým povrchem je využívanější možností. Mechanismus epoxidace při použití wolframových katalyzátorů je neradikálové povahy. Aktivní wolframové centrum funguje jako Lewisova kyselina aktivující peroxid vodíku tvorbou wolfram-peroxo meziproduktu, který v dalším kroku přenáší atom kyslíku na dvojnou vazbu MK a dochází k epoxidaci (obrázek 9) [27-29].

Katalyzátory na bázi titanu jsou používány především v titanosilikátové formě, kde jsou zabudovány do struktury různých zeolitů. Dle velikosti pórů zeolitů se dělí na mezoporézní (Ti-β, Ti-MCM) a mikroporézní titanosilikátové katalyzátory (TS-1) a právě velikost pórů dává titanosilikátům prostorovou selektivitu vzhledem k reakční komponentě. Pro epoxidace esterů VMK jsou z důvodu velikosti pórů vhodné především mezoporézní

titanosilikáty. Mikroporézní titanosilikáty se hodí pro relativně malé a lineární substráty. Mezoporézní titanosilikátové katalyzátory vykazují větší aktivitu v přítomnosti organického oxidačního činidla (např. terc-butylhydroperoxid), než v přítomnosti peroxidu vodíku, a to z důvodu deaktivace aktivních center vodou vzniklou z peroxidu vodíku. Nicméně při úpravě hydrofobního charakteru jejich povrchu (zvýšení repulze vody) mohou vykazovat dobré aktivity i s peroxidem vodíku [27, 29-31].

Poslední možností je použití enzymatických katalyzátorů, jejichž výhodou je ve srovnání s ostatními katalyzátory větší šetrnost k životnímu prostředí a vysoká selektivita reakce. Využívaným enzymem k epoxidaci je například lipáza Candida Antarctica, jež je imobilizována na nosiči. Při použití enzymů jako katalyzátorů je potřeba pečlivě vybírat reakční podmínky, jelikož se nestabilní enzymy velice snadno deaktivují. Zejména důležitými parametry pro zachování aktivity a delší životnosti enzymů jsou teplota a koncentrace peroxidu vodíku (nižší koncentrace je vhodnější). V případě teploty se jako horní hranice pro stabilitu enzymů uvádí 50 °C. Mechanismus epoxidace je stejný jako u Prileschajewovy reakce s tím rozdílem, že peroxokyselina nevzniká z karboxylové kyseliny přidané do reakční směsi, ale z volných mastných kyselin nacházejících se v rostlinných olejích (obrázek 10) [26, 32, 33].



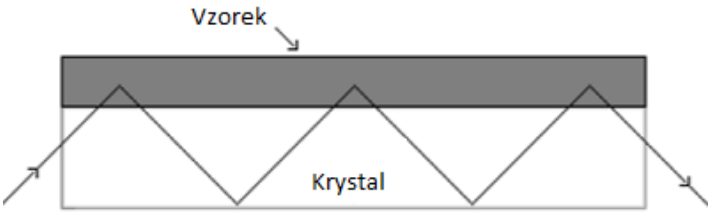
Obrázek 10: Schéma vzniku peroxokyseliny z kyseliny olejové [32]

2.4. Analytické metody

2.4.1. Infračervená spektrometrie

Infračervená spektrometrie (IČ) je nedestruktivní analytická metoda založena na absorpci infračerveného záření při průchodu analyzovanou látkou. Energie absorbovaného záření odpovídá změnám rotačních, vibračních nebo rotačně-vibračních stavů molekul, přičemž u kapalin a pevných látek se jedná pouze o změny vibračních stavů. Ovšem aby mohlo dojít k absorpci záření, tak musí dojít ke změně dipólového momentu molekuly se změnou jejího vibračního/rotačního pohybu. Infračervené záření je elektromagnetické záření v rozsahu vlnočtů 12500–10 cm^{-1} (0,8-100 μm). Infračervená oblast se dělí na oblast blízkou (12500-4000 cm^{-1}), střední (4000-500 cm^{-1}) a vzdálenou (500-10 cm^{-1}). Pro identifikaci

a analýzu chemické struktury látek se nejčastěji využívá střední oblast, kterou můžeme rozdělit na oblast charakteristických vibrací (4000-1500 cm^{-1}, vibrace funkčních skupin) a oblast spřažených vibrací neboli tzv. oblast otisku palce (1500-500 cm^{-1}, specifická pro danou molekulu) [34-36].



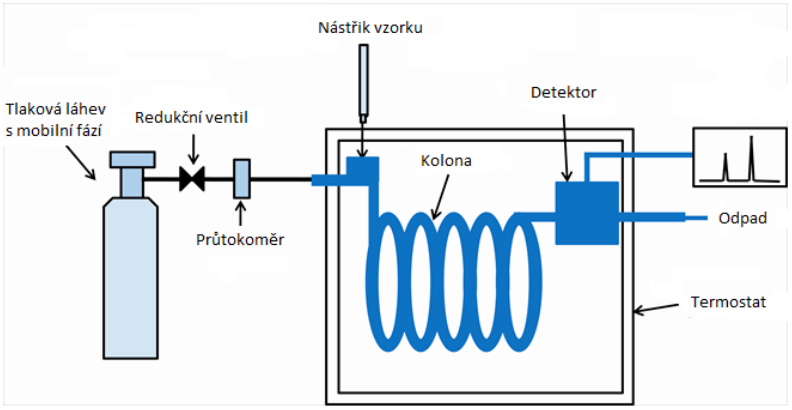
Obrázek 11: Schéma nadstavce pro měření ATR spekter

IČ spektrometrii lze rozdělit na transmisní a reflektanční, přičemž obě techniky využívají jednopaprskové infračervené spektrometry s Fourierovou transformací (FTIR) a poskytují stejné informace. V případě transmisní techniky je sledována změna intenzity (absorpce) IČ záření při průchodu vzorkem. Reflektanční technika je založena na sledování změny intenzity odraženého záření. Reflektanční technika není tak široce rozšířena, jako konvenční transmisní metoda, ale je s výhodou používána pro vzorky, které by bylo náročně připravit pro analýzu běžnou cestou. Jednou z reflektančních technik je metoda zeslabené úplné reflektance (ATR – Attenuated Total Reflectance). Pokud prochází záření z prostředí o větší hustotě do prostředí s hustotou menší a naopak, dochází k jeho lomu. Určité množství záření je na rozhraní těchto prostředí odraženo. S rostoucím úhlem dopadu roste i podíl záření, jenž je odraženo a při určitém kritickém úhlu dojde k úplnému odrazu. Princip ATR spočívá v tom, že při úplném odrazu záření dochází k jeho malému průniku do vzorku, než dojde k odrazu (obrázek 11). Při průniku záření je jeho část o určité vlnové délce absorbována a dochází k zeslabení záření, odsud pochází i název metody: zeslabená úplná reflektance. Hloubka průniku záření do vzorku záleží na vlnové délce, indexu lomu vzorku i odrazového krystalu (např. diamant nebo germanium) a úhlu dopadajícího záření na rozhraní krystal-vzorek, proto je nutné u naměřených spekter provést korekci [34, 35].

2.4.2. Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC – Gas Chromatography) je analytickou separační metodou sloužící k separaci tepelně stabilních těkavých látek. Hlavním rozdílem oproti kapalinové chromatografii (LC – Liquid Chromatography) je používaná mobilní fáze, kterou je plyn.

Stacionární fáze může být imobilizovaná kapalina na povrchu inertního pevného nosiče nebo na povrchu stěny kapilární chromatografické kolony. Separace je založena na distribuci vzorku mezi mobilní a stacionární fázi, kde dochází k opakovanému rozdělení analyzovaných látek mezi obě fáze s postupem kolonou obdobně jako u LC. Druhou možností je stacionární fáze v podobě pevné látky v uzavřené kapilární koloně, tento typ GC označujeme jako adsorpční plynovou chromatografii, která je využívána jen pro speciální aplikace. Důvodem je nelineární charakter adsorpce a semipermanentní retence aktivních a polárních molekul [35, 37].



Obrázek 12: Schéma plynového chromatografu [38]

Obrázek 12 znázorňuje schéma plynového chromatografu. Vzorek je nadávkován manuálně nebo automatickým dávkovačem do vyhřívaného nástřikového prostoru nacházejícího se na hlavě kolony. Nástřikový prostor je udržován při dostatečně vysoké teplotě, aby došlo k odpaření vzorku. Vzorky s omezenou těkavostí mohou být analyzovány po jejich přeměně na těkavější deriváty (tzv. derivatizace vzorku). Plynný vzorek je následně průtokem mobilní fáze vnesen na chromatografickou kolonu umístěnou v termostatu umožňujícím různé teplotní programy. Nejčastěji se používají kapilární kolony s malým vnitřním průměrem, které vyžadují menší množství vzorku. Aby nedošlo k jejich zahlcení je součástí nástřikového prostoru běžně i rozdělovač vzorku neboli „sample splitter“. Rozdělovač se používá při dávkování kapalných vzorků a způsobuje, že se do kolony dostane pouze část z dávkovaného vzorku. Rozdělení vzorku může být v poměru 1:1 až 1:500, přičemž menší podíl jde do kolony a zbytek je odveden pryč z dávkovacího prostoru. Druhým typem chromatografických kolon jsou kolony náplňové, které jsou ve srovnání s kapilárními používány zřídka. Mobilní fází jsou inertní plyny o vysoké čistotě jako helium, argon, dusík či vodík. Po průchodu kolonou je vzorek mobilní fází unášen na detektor poskytující informace (kvalitativní a kvantitativní informace) o látkách ve vzorku [35, 38, 39].

Ideální detektor pro GC by měl mít dostatečnou citlivost, dobrou stabilitu, robustnost a reprodukovatelnost, co nejširší oblast lineární závislosti odezvy detektoru vůči koncentraci, rychlou odezvu, jeho maximální provozní teplota by měla být dostatečně vysoká (alespoň 400 °C) a měl by být nedestruktivní a univerzální (schopen analyzovat různé látky). Nicméně v realitě neexistuje žádný detektor splňující všechny požadavky, a proto výběr detektoru záleží na oblasti použití. Mezi používané detektory patří plamenově ionizační detektor (FID z Flame Ionization Detector), tepelně vodivostní detektor, detektor elektronového záchytu a hmotnostní spektrometrický detektor (kapitola 2.4.4) [35].

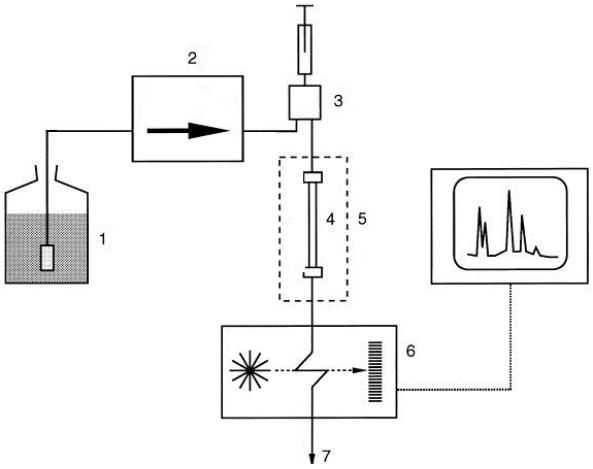
Plamenově ionizační detektor (FID) je nejpoužívanějším GC detektorem. Po výstupu z kolony jsou analyzované látky nasměrovány do vodíkového hořáku umístěného mezi dvěma měrnými elektrodami. Hořák produkuje dostatečně vysokou teplotu pro pyrolýzu většiny organických látek za vzniku iontů a elektronů. Vzniklé nabité částice jsou zaznamenány jako vzrůst proudu mezi dvěma měrnými elektrodami, přičemž vzrůst proudu je úměrný počtu částic látky. Výhodami FID detektoru jsou necitlivost vůči změnám v průtoku mobilní fáze, vysoká citlivost, široký rozsah lineární odezvy vůči koncentraci a nízký šum. Nevýhodou je destrukce analyzované látky a nutnost tlakového vzduchu a vodíku pro zajištění plamene FID. Výhodou i nevýhodou, záleží na okolnostech, je necitlivost vůči nehořlavým látkám jako jsou vzácné plyny, amoniak, sirovodík, oxidy kyslíku, síry a dusíku a voda [35, 40, 41].

2.4.3. Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je analytická separační technika poskytující kvalitativní a kvantitativní informace o analyzovaných látkách. Obvykle se jedná o vysoko-účinnou kapalinovou chromatografii (HPLC – High-Performance Liquid Chromatography), kde se využívá vysokých tlaků (do 50 MPa) pro účinnou a rychlou separaci. K separaci analyzovaných látek dochází na základě opakované distribuce látek mezi stacionární a kapalnou mobilní fázi. Stacionární fáze je buď neporézní, povrchově porézní, zcela porézní či povrchově aktivní v podobě malých částic nebo se jedná o tenký film kapaliny nanesený na pevný nosič či stěnu kolony [42, 43].

Molekuly vzorku jsou distribuovány mezi fázi stacionární a fázi mobilní, která je oproti stacionární fázi v neustálém pohybu. Z čehož plyne, že molekuly vzorku, které se nacházejí ve stacionární fázi jsou na koloně zadržovány, přičemž ty v mobilní fázi se kolonou pohybují.

Základem interakce vzorku se stacionární fází je obvykle adsorpce (adsorpční chromatografie) nebo extrakce (rozdělovací chromatografie). Během běžné chromatografické separace dochází k několika tisícům přechodů analyzované látky z mobilní fáze do stacionární a obráceně. Rozdílné skupiny látek mají odlišné afinity ke stacionární a mobilní fázi a jejich zádrž na koloně se liší. Látky se silnější afinitou ke stacionární fázi jsou eluovány z kolony později (mají delší retenční čas) a naopak látky se slabší afinitou vychází z kolony dříve (mají kratší retenční čas). Díky tak vysokému množství distribučních přechodů a rozdílné afinitě látek k oběma fázím má chromatografie (kapalinová i plynová) vysokou rozdělovací schopnost a může separovat látky s velmi podobnými vlastnostmi (fyzickými i chemickými), např. cis a trans stereoizomery jedné látky. Ovšem rozlišovací schopnost záleží na mnoha aspektech, například na selektivitě a účinnosti chromatografické kolony nebo na citlivosti detektoru [43].



Obrázek 13: Schéma kapalinového chromatografu [42]

HPLC instrument (obrázek 13) se skládá ze zásobníku mobilní fáze (1), která je vysokotlakým čerpadlem s odplyňovačem (2) vháněna na chromatografickou kolonu (4), která je obvykle v termostatu (5). Vzorek je na kolonu vstřikován buď manuálně nebo pomocí autosampleru přes speciální dávkovací ventil (3), obvykle se jedná o šesticestný ventil. Vzorek je po průchodu chromatografickou kolonou vháněn na detektor (6) a následně do zásobníku na odpad (7). Detektor poskytuje výsledný záznam nazývající se chromatogram, který je tvořen závislostí intenzity signálu z detektoru na retenčním čase. Jak již bylo řečeno, tak každá látka má svůj specificky retenční čas (kvalitativní informace) a na základě její koncentrace ve vzorku určitou plochu/výšku píku (kvantitativní informace). Popsané složení instrumentu je vhodné pro isokratické eluce bez změny složení mobilní fáze v rámci analýzy. Pro analýzy vyžadující změnu složení mobilní fáze v čase, tedy gradientovou eluci, by instrument obsahoval ještě

směšovací zařízení umístěné před (nízkotlaký systém) nebo po čerpadle (vysokotlaký systém) [42, 44].

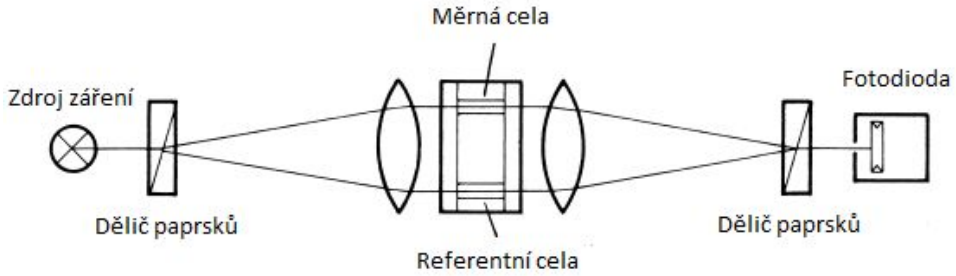
Čerpadla pro HPLC musí být schopna dosahovat vysokých tlaků s velkou přesností pro různé rychlosti průtoků mobilní fáze bez přítomnosti pulzace. Pozn.: vysoké tlaky nejsou samy o sobě nutné pro separaci, ale jejich potřeba vychází z viskózní povahy mobilních fází, které musí být „protlačeny“ přes lože chromatografické kolony obsahující velice malé částice (až 3 μm) kladoucí značný odpor. Čerpadla se dělí na dva typy, používanější jsou pístová čerpadla s jedním nebo dvěma písty poskytující dobrou stabilitu průtoku, vysoké tlaky a malý interní objem vhodný pro gradientovou eluci. Druhým typem jsou čerpadla fungující podobně jako injekční stříkačka, která poskytuje stabilnější průtok, ale vzhledem k neschopnosti dosáhnout tak vysokých tlaků a omezenému objemu „stříkačky“ jsou vhodná pouze pro speciální aplikace [35, 42].

Dle polarity mobilní a stacionární fáze se LC dělí na systémy s normálními a obrácenými (reversními) fázemi. Systém s normálními fázemi má stacionární fázi polárnější než mobilní, což znamená, že nejkratší retenční čas bude mít nejméně polární látka a s rostoucí polaritou látek roste i jejich retenční čas. Mobilní fází může být hexan, chloroform či diethyl ether a stacionární fází bývá modifikovaná silika s polárními funkčními skupinami (např. diolovou, aminovou nebo kyanovou). V případě používanějších systémů s reversními fázemi je mobilní fáze polárnější než stacionární a jako první jsou eluovány nejpolárnější látky a s rostoucím hydrofobním charakterem se retenční čas látky prodlužuje. Stacionární fází je obvykle hydrofobní uhlovodíkový řetězec o různé délce, jenž je chemicky vázán na nosič, např. oktadecylsilan (alkan s osmnácti uhlíky v řetězci). Polární mobilní fází může být acetonitril, metanol, isopropanol, voda a jejich roztoky o různých poměrech. Polarita mobilní fáze může být dále upravena přídavkem pufru [35, 42, 45].

Používaných detektorů v rámci LC je hned několik a jsou navzájem velmi odlišné. Patří mezi ně detektory: spektrofotometrické detektory, refraktometrické detektory (RI – Refractive Index), fluorescenční detektory, elektrochemické detektory a hmotností spektrometrické detektory (MS – Mass Spectometry). Nevýhodou ve srovnání s plynovou chromatografií je, že v případě GC byly nejpoužívanější detektory (plamenově ionizační a tepelně vodivostí detektor, viz kapitola 2.4.2) speciálně vyvinuty pro měření nízkých koncentrací látek v proudu

plynu, tedy pro podmínky GC. Ovšem detektory pro LC jsou obvykle tradiční analytické přístroje, které musely být přizpůsobeny pro detekci v rámci LC [35, 46].

Ideální detektor pro LC by měl mít všechny vlastnosti zmíněné v kapitole 2.4.2 a navíc malý interní objem, přičemž u LC není na rozdíl od GC důležitá maximální provozní teplota. Níže budou popsány vybrané detektory, přičemž MS bude zmíněná v samostatné kapitole (2.4.4) [35].

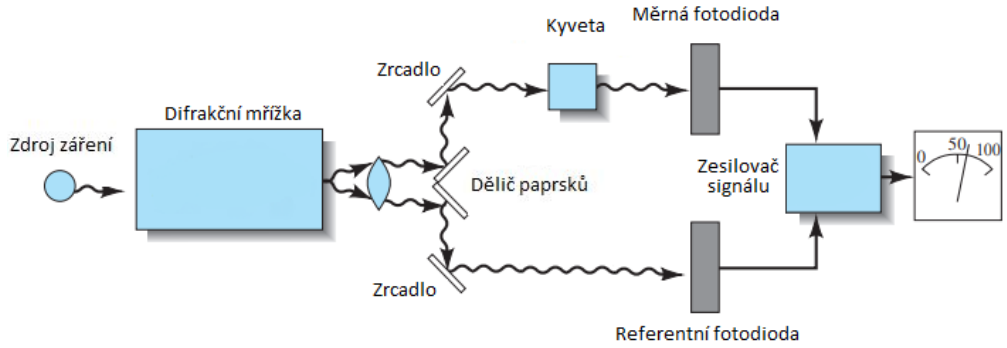


Obrázek 14: Schéma interferenčního refraktometrického detektoru [42]

Refraktometrický detektor se řadí mezi univerzální diferenční detektory sledující rozdíl určité vlastnosti mezi mobilní fází se vzorkem a bez vzorku. Typicky se jedná o vlastnost vykazovanou téměř všemi látkami, proto jsou diferenční detektory univerzální. V případě RI detektoru se sleduje rozdíl změny indexu lomu světelného paprsku. Princip RI detektoru, konkrétně interferenčního RI detektoru spočívá v rozdělení záření ze zdroje na dva paprsky o stejné intenzitě, které prochází měrnou a referentní celou (obrázek 14). Po průchodu celami dochází k superponování obou paprsků (interferují spolu) v druhém děliči paprsků a pokud se jejich indexy lomů odlišují, tak dochází k jejich částečnému zhašení. Jiným slovy je průchod vzorku měrnou celou detekován jako pokles intenzity záření. Vzhledem k velmi nízké selektivitě detektoru reagujícího na téměř všechny látky jsou kladeny větší nároky na selektivitu chromatografické kolony. Nevýhodou RI detektoru je nízká citlivost, závislost měřené veličiny na teplotě (je nutné uzavřít detektor v termostatu) a nevhodnost při gradientové eluci, jelikož se v průběhu analýzy mění složení mobilní fáze. Kromě zmíněné univerzálnosti je výhodou nedestruktivní povaha, cena a jednoduchost detektoru [35, 42, 46-48].

Nejpoužívanějším detektorem je spektrofotometrický detektor v ultrafialové a viditelné oblasti (cca 190-600 nm), jež je selektivní pro látky absorbující světelné záření v uvedené oblasti. Měřenou veličinou je absorbance, jenž je závislá na koncentraci látky, délce měrné kyvety a absorpčním koeficientu dané látky. Uvedenou závislost popisuje Lambert-Beerův zákon.

Mobilní fáze by měla být vhodně zvolena, aby při používané vlnové délce detekce neabsorbovala záření. Princip jednoduchého spektrofotometrického detektoru spočívá v dopadu záření ze zdroje na vhodně natočenou difrakční mřížku pro získání zvolené vlnové délky záření (obrázek 15). Získané záření o požadované vlnové délce dopadá na dělič paprsku, kde je část záření nasměrována na referentní fotodiodu a druhá část záření prochází přímo kyvetou se vzorkem a dopadá na měrnou fotodiodu. Referentní fotodioda zajišťuje eliminaci fluktuace intenzity záření. Výsledkem je závislost absorbance na retenčním čase. Detekce může proběhnout při jediné vlnové délce, při více vlnových délkách odpovídajících absorpčním maximům analyzovaných látek nebo může být v rámci analýzy skenováno celé absorpční spektrum. Výhodou spektrofotometrických detektorů je spolehlivost, citlivost, nedestruktivní charakter, vhodnost pro gradientovou eluci, jednoduchost a cena. Naopak problém představuje nutnost derivatizace látek bez chromoforů (části látek absorbující záření ve viditelné a ultrafialové oblasti), složitější výběr mobilní fáze a odlišná odezva detektoru pro látky s různým absorpčním koeficientem a stejnou koncentrací. Látky s větším absorpčním koeficientem vytváří větší píky než látky o stejné koncentraci s menším absorpčním koeficientem [35, 42, 47].



Obrázek 15: Schéma spektrofotometrického detektoru [35]

2.4.4. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometr (MS) je obvykle s velkou výhodou používán ve spojení se separační technikou (GC nebo HPLC), kdy během jedné analýzy dojde k separaci a simultánní identifikaci směsi látek ve vzorku. MS je velmi účinný analytický přístroj fungující na principu ionizace zkoumaných látek v iontovém zdroji (převedení látek na nabité částice) a následné separaci vzniklých iontů hmotnostním analyzátorem dle poměru hmotnosti k náboji (m/z) za vysokého vakua. Separované ionty jsou v posledním kroku zaznamenány detektorem. MS je v dnešní době poměrně rozšířená technika díky vysoké citlivosti, možnosti získat informace

o struktuře a molekulární hmotnosti analyzované látky z interpretace získaných spekter nebo jejich porovnáním s knihovnou spekter (výhradně GC-MS) a možností kvantitativní analýzy. Nevýhodou jsou vysoké pořizovací a provozní náklady a destruktivní charakter metody, který je ale pro malou spotřebu vzorku zanedbatelný [35, 38, 49].

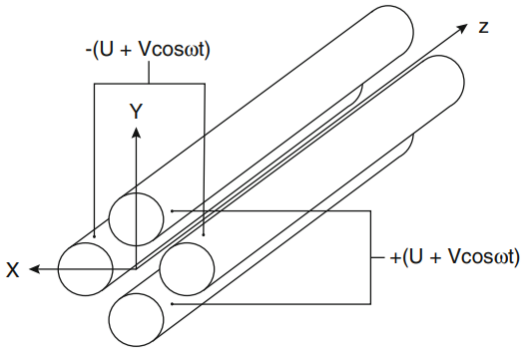
Iontové zdroje se dělí na měkké a tvrdé. Během ionizace tvrdým zdrojem, jako je elektronová ionizace, získává látka přebytek vnitřní energie a dochází k fragmentaci získaného iontu na další ionty. Elektronová ionizace se často využívá jako ionizační zdroj při spojení hmotnostního spektrometru s GC. Opakem jsou měkké zdroje produkující převážně protonované a deprotonované ionty. Mezi měkké zdroje patří ionizace elektrosprejem nebo fotoionizace a chemická ionizace za atmosférického tlaku, všechny tři metody jsou obvykle ve spojení s HPLC. Tvrdé zdroje jsou užitečné pro zisk informací o struktuře látky a měkké zdroje pro určení přesné molekulové hmotnosti látky [35, 36, 50].

Během elektronové ionizace jsou žhavenou katodou emitovány elektrony, kterým je mezi katodou a anodou dodána energie urychlujícím potenciálem. Urychlené elektrony se při cestě k anodě střetávají s molekulami vzorku za uvolnění jejich valenčního elektronu vlivem elektrostatické repulze a vzniku ionizovaných molekul. Vzniklé ionty jsou následně vytěsňovací elektrodou vypuzeny do hmotnostního analyzátoru. Celý proces probíhá při velmi nízkém tlaku (10^{-3} až 10^{-5} Pa). Velkou předností elektronové ionizace je, že při zvolení standardního urychlujícího potenciálu (70 eV) je možné naměřená spektra porovnávat s rozsáhlou knihovnou spekter. Na druhou stranu se díky rozsáhlé fragmentaci stává, že ve spektru chybí molekulární iont pro určení molekulové hmotnosti látky [35, 39, 50].

Hmotnostní analyzátory pracují za ještě nižšího vakua, než iontové zdroje (10^{-3} až 10^{-11} Pa) a slouží k rozdělení iontů podle jejich poměru hmotnosti k náboji (m/z). Hmotnostní analyzátory fungují na odlišných fyzikálních principech. Například magnetický sektorový analyzátor využívá magnetického pole pro zakřivení dráhy letu iontů, analyzátor doby letu dělí ionty na základě času potřebného pro uražení určité vzdálenosti nebo kvadrupólový analyzátor využívá stabilních oscilací iontů při kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí [39].

Kvadrupólový analyzátor se skládá ze čtveřice paralelně umístěných tyčí kruhového průřezu (obrázek 16), přičemž jsou protilehlé tyče vodivě spojeny. Na jednu dvojici protilehlých tyčí

je vloženo kladné stejnosměrné napětí (+U) a na druhou záporné stejnosměrné napětí (-U). Zároveň je na všechny čtyři tyče superponováno střídavé vysokofrekvenční napětí (Vcosωt, kde V je amplituda vysokofrekvenčního střídavého napětí, t je čas a ω je frekvence). Ionty vytvořené v iontovém zdroji jsou malým potenciálem urychleny mezi tyče kvadrupólu, kde oscilují. Zatímco ionty oscilují dochází k postupnému růstu střídavé a stejnosměrné složky napětí tak, že jejich poměr zůstává konstantní. Princip funkce kvadrupólu spočívá v tom, že pro daný poměr U/V jsou oscilace stabilní pouze pro iont s určitou m/z, který kvadrupólovým analyzátorem prochází k detektoru. Zbytek iontů s nestabilními oscilacemi je zachycen na tyčích kvadrupólu. Takto je proskenován zvolený rozsah U/V za postupného propuštění všech iontů na detektor. Kvadrupólový analyzátor je pro svou jednoduchost a nízkou cenu poměrně rozšířený, jeho nevýhodou je ovšem nižší rozlišovací schopnost [35, 38, 39, 49, 50].



Obrázek 16: Schéma kvadrupólového hmotnostního analyzátoru [50]

Poslední částí MS je detektor se zesilovačem zaznamenávající dopadající ionty. Může se jednat o elektronové násobiče se systémem dynod/zakřivenou dynodou, fotonásobiče nebo Faradayovu klec. Ve všech případech dochází k dopadu iontu na povrch dynody za vyražení elektronu. V případě elektronového násobiče vyražený elektron dopadá na další dynody za vyražení sekundárních elektronů. U fotonásobiče vyražený elektron dopadá na speciální destičku za uvolnění fotonu a u Faradayovy klece dochází k indukci elektrického proudu [36, 38, 39, 50].

2.4.5. Titrační metody

Jódové číslo

Jodové číslo (IV z Iodine Value) je měřítkem stupně nenasycenosti (počtu dvojných vazeb) a používá se hlavně u rostlinných olejů, tuků a v případě této práce i u esterů VMK a jejich epoxidů. Udává se v gramech jódu, jenž se naaduje na dvojné vazby ve 100 g vzorku

(g I_2/100 g). Z praktického hlediska se jedná o zpětnou jodometrickou titraci, kde se titruje přebytek nezreagovaného reakčního činidla, kterého bylo do reakční směsí přidáno známe množství [51].

$$-CH = CH- \ + IBr \ \rightarrow \ -CHBr - CHI -$$

$$IBr \ + KI \ \rightarrow KBr \ + \ I_2$$

$$I_2 + 2S_2O_3^{2-} \leftrightarrows 2I^- + S_4O_6^{2-}$$

Obrázek 17: Schéma reakcí při stanovení jódového čísla

IV je možné stanovit Wijsovou nebo Hanušovou metodou. Při použití Hanušovy metody se ke vzorku přidá v nadbytku Hanušovo činidlo obsahující bromid jodný, který se naaduje na dvojné vazby vzorku (obrázek 17). Následně je nezreagovaný přebytek činidla převeden roztokem jodidu draselného na bromid draselný a jód. Posledním krokem je titrace vzniklého jódu roztokem thiosíranu za použití škrobového mázu jako indikátoru. Bodu ekvivalence (konce titrace) je dosaženo při odbarvení roztoku. V případě Wijsovy metody je postup obdobný, rozdílem je použití chloridu jodného místo bromidu [51-53].

Epoxidový ekvivalent

Vzhledem k pravděpodobnosti možných vedlejších reakcí při epoxidaci je užitečné stanovit skutečný obsah oxiranových skupin ve vzorku. Jedním ze způsobů je právě epoxidový ekvivalent (EE) udávající počet molů epoxidových skupin (oxiranových kruhů) v jednom kile vzorku (mol/kg). EE se stanovuje titračně.

Titrační stanovení se provádí reakcí in-situ vzniklé kyseliny bromovodíkové s oxiranovou funkční skupinou. Bromovodíková kyselina vzniká reakcí kvartérní amoniové soli s chlorovodíkovou kyselinou. Při titraci se jako indikátor používá krystalová violeť a bod ekvivalence, tedy první přebytek bromovodíku, je dán přechodem z fialového do modrozeleného zabarvení roztoku [54, 55].

2.5. Analýza produktů epoxidace

V práci [56] byly epoxidovány kyseliny olejová, linolová a linolenová a jejich ME pomocí imobilizovaného enzymu Avena sativa a terc-butyl hydroperoxidu. Reakce byla po dvaceti čtyřech hodinách ukončena a produkty analyzovány pomocí ^{1}H NMR (nukleární magnetická rezonance), ^{13}C NMR, HPLC s ELSD detektorem (odpařovací detektor rozptylu

světla), hmotnostním detektorem s elektronovou ionizací (70 eV) a hmotnostním detektorem s chemickou ionizací za atmosférického tlaku. K separaci u HPLC docházelo na systému s reverzními fázemi: dvě kolony C18 (3,5µm, 15 cm x 2,1 mm a 5µm, 5 cm x 2,1 mm) zapojené v sérii a mobilní fázi byl acetonitril (A) a voda (B). Pro analýzu byl zvolen následující gradient (průtok 0,25 ml/min): 0-5 minuta 60/40 % A/B, 5-30 minuta lineární gradient k 100% A, 30-54 minuta 100 % A. Při analýze vzorků z epoxidace kyseliny linolové a jejího ME v 0., 2., 4., 6. a 24. hodině bylo zjištěno, že u obou látek prvně dochází ke vzniku monoepoxidů a následně jejich přechodu na diepoxidy kyseliny linolové, přičemž zastoupení obou monoepoxidů bylo téměř identické. U kyseliny olejové a jejího ME bylo dosaženo po 24 hodinách jejich úplné konverze. V případě epoxidace kyseliny linolenové a jejího ME nebylo rozlišení HPLC dostatečně vysoké k úspěšnému rozseparování na jednotlivé monoepoxidy. Hlavní produkt představovaly diepoxidy, kde bylo pomocí NMR potvrzeno, že by se mělo jednat o epoxidované „krajní“ dvojné vazby. Triepoxidované produkty byly nalezeny pouze ve stopovém množství a jejich zastoupení se nezvýšilo ani při vyšším poměru terc-butyl hydroperoxidu. Zastoupení jednotlivých produktů se mezi VMK a jejich ME příliš nelišilo.

Při snaze připravit bio-lubrikanty z rostlinných olejů byly v práci [57] epoxidovány methylestery VMK ricinového oleje. Epoxidace byla vedena při 60 °C a množství ME ricinového oleje, peroxidu vodíku a kyseliny octové bylo zvoleno v molárním poměru: 1:1,5:0,5 (v uvedeném pořadí). Katalyzátorem byla iontovýměnná pryskyřice IR-120, které bylo vůči reakční směsi 15 hm.%. Reakce byla po 10 hodinách ukončena a produkty analyzovány metodami ^{1}H NMR, FTIR a bylo stanoveno jódové číslo (IV). Epoxidace byla potvrzena zmizením signálu dvojných vazeb v oblasti 5,3 a 5,6 ppm ve spektru NMR a ziskem signálu v poloze 2,9-3,2 ppm patřícímu oxiranové funkční skupině. FTIR spektra rovněž potvrdila úspěšnou epoxidaci objevením píků v poloze 823-843 cm^{-1} náležícím oxiranové funkční skupině a kompletním zmizením píku patřícímu dvojným vazbám. IV pokleslo z hodnoty 84,6 na 1,27 g I_2/100 g. Pro potvrzení zlepšení tepelně-oxidační stability methylesterů VMK jejich epoxidací byla provedena termogravimetrická analýza. Neepoxidované ME vykazovaly nižší tepelně-oxidační stabilitu (218 °C), než epoxidované (305 °C).

V práci [58] byly pomocí imobilizovaného enzymu Candida antarctica a peroxidu vodíku epoxidovány jednotlivé nenasycené VMK: kyseliny olejová, linolová a linolenová. Získané epoxidy byly poté analyzovány pomocí HPLC s ELSD detektorem. Byl použit systém

s reverzními fázemi, kolona C18 (5µm, 250 mm x 4 mm) s předkolonou C18 (5µm, 4 mm x 4 mm) a jako mobilní fáze metanol (A) a voda (B), přičemž v obou bylo 0,05 % kyseliny octové. Pro analýzu byl zvolen následující gradient (průtok 1 ml/min): 0-12 minuta 75/25 % A/B, 12-20 minuta lineární gradient k 90/10 % A/B, 20-35 minuta lineární gradient k 98/2 % A/B, 35-40 minuta lineární gradient k 75/25 % A/B. Použitá metoda poskytla simultánní stanovení VMK a jejich epoxidů, které byly rozděleny podle počtu a pozice oxiranových skupin a počtu a pozice dvojných vazeb. Produkty byly dále pro potvrzení struktury získaných epoxidů analyzovány na HPLC s hmotnostním detektorem (ESI, elekrosprejová ionizace) v uspořádání tandemové hmotnostní spektrometrie.

V práci [59] byly epoxidovány ME oleje Tilapia. Epoxidace proběhla při pokojové teplotě pomocí kyseliny mravenčí a peroxidu vodíku. Po 16 hodinách byla reakce ukončena a produkty analyzovány metodami FTIR, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR a GC-MS. Stanoveno bylo i IV před epoxidací (117 g I_2/100 g) a po epoxidaci (1,02 g I_2/100 g). Vymizení píků dvojných vazeb ve FTIR spektrech v oblasti 3009 cm^{-1} a 1654 cm^{-1} potvrdilo jejich zreagování. Dále nárůst píku v oblasti 829 cm^{-1} potvrdil úspěšný vznik epoxidů. Nebyl pozorován žádný pík v oblasti 3000-3500 cm^{-1}, který by naznačoval otevření oxiranového kruhu, což potvrdily výsledky z NMR. NMR analýza dále potvrdila zreagování dvojných vazeb vymizením signálu v oblasti 5,30-5,50 ppm (^{1}H NMR) a vznik epoxidů nárustem signálu v oblastech 2,89 a 3,1 ppm u ^{1}H NMR a 54,38 a 57,42 ppm u ^{13}C NMR.

3. Experimentální část

3.1. Použité chemikálie

- Hydroxid draselný – 85% (p.a.), (Penta, Česká republika)
- Methanol – 99,99% (p.a.), (Lach-Ner, Česká republika)
- Peroxid vodíku – 30% (p.a.), (Penta, Česká republika)
- Kyselina mravenčí – 98% (p.a.), (Lach-Ner, Česká republika)
- Uhličitan sodný bezvodý – 99,8% (čistý), (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina sírová – 96% (p.a.), (Lach-Ner, Česká republika)
- Acetonitril – HPLC, gradient grade, (Honeywell, Německo)
- Methanol – HPLC, gradient grade, (Honeywell, Německo)
- Řepkový olej – číslo kyselosti 0,23 mg KOH/g, jodové číslo 110 g I_2/100 g
- Slunečnicový olej – číslo kyselosti 0,29 mg KOH/g, jodové číslo 110 g I_2/100 g
- Lněný olej – číslo kyselosti 0,34 mg KOH/g, jodové číslo 181 g I_2/100 g
- Hanušovo činidlo – 0,1 mol IBr/I, (CarlRoth, Německo)
- Oxid uhličitý – 99,9%, (Linde, Česká republika)
- Chloroform – 99% (p.a.), (Penta, Česká republika)
- Hexadecyltrimethylamonium bromid - ≥ 98% (Sigma-Aldrich, U.S.A.)
- Diethylether – 99,7% (p.a.), (Penta, Česká republika)
- Cyklohexan – 99,5% (p.a.), (Penta, Česká republika)
- n-Hexan – 99% (p.a.), (Penta, Česká republika)
- N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid – 98%, J&K Scientific (Německo)

3.2. Příprava epoxidů

3.2.1. Transesterifikace

Prvním krokem byla příprava methylesterů (ME) vyšších mastných kyselin (VMK) z rostlinných olejů (slunečnicový a lněný olej) pomocí transesterifikace.

Transesterifikace byla provedena ve skleněném vsádkovém reaktoru o objemu 1000 ml. Pro dosažení vysokých konverzí triglyceridů byly zvoleny ověřené experimentální podmínky z dřívějšího výzkumu na katedře fyzikální chemie (Univerzita Pardubice) [60]. Do reaktoru byla převedena navážka 600 g rostlinného oleje a při míchání o rychlosti 300 rpm byl olej

vytemperován na 60 °C. Následně byl do reaktoru přidán rozpuštěný hydroxid draselný (katalyzátor) v metanolu. Metanol byl přidán v molárním poměru 6:1 (131 g) k oleji a hydroxidu draselného bylo přidáno 0,85 hm.% (5,25 g) vzhledem k hmotnosti oleje. Reakce probíhala 90 minut při uvedené teplotě a rychlosti míchání.

Po 90 minutách byla reakce zastavena neutralizací katalyzátoru oxidem uhličitým, který byl po dobu 15 minut vháněn do reakční směsi ze zásobní tlakové láhve. Po neutralizaci byl z reakční směsi při teplotě 80 °C a za sníženého tlaku oddestilován metanol. Poté byla reakční směs převedena do děličky, kde do 24 hodin došlo k jejímu rozdělní na horní esterovou a spodní glycerolovou fázi. Získané estery byly použity pro epoxidaci.

3.2.2. Epoxidace

Připravené ME rostlinných olejů byly epoxidovány ve stejném reaktoru použitém pro transesterifikaci. Jelikož každý rostlinný olej má jiné jodové číslo, tzn. jiný obsah nenasycených ME (navážky jsou vztaženy na počet dvojných vazeb), budou níže pro ukázku uvedeny navážky pro lněný olej. Do reaktoru bylo převedeno 300 g methylesterů, 0,358 ml 1% kyseliny sírové a 65 g kyseliny mravenčí v molárním poměru 0,7:1 vůči dvojným vazbám. Reakční směs byla ochlazena pod 10 °C a za stálého míchání (300 rpm) byl postupně přidán peroxid vodíku v molárním poměru 2:1 vzhledem ke dvojným vazbám (458 g 30% peroxidu vodíku). Po přidání veškerého peroxidu byla reakční směs zahřáta na 60 °C, při kterých reakce probíhala 24 hodin.

V průběhu reakce byl od jejího zahájení po dobu 8 hodin odebírán každou hodinu vzorek reakční směsi pro analýzu. Odebráno bylo 5 ml reakční směsi, která byla převedena do lékovky s 8 ml 4,5% roztoku uhličitanu draselného pro neutralizaci kyselin. Po rozdělení fází byla spodní vodná fáze odebrána a k esterové fázi přidáno 5 ml destilované vody. Připravený vzorek byl vložen do centrifugy na 20 minut při 4000 rpm pro účinnou separaci. Po centrifugaci byla odebrána horní esterová fáze obsahující směs epoxidovaných a neepoxidovaných ME.

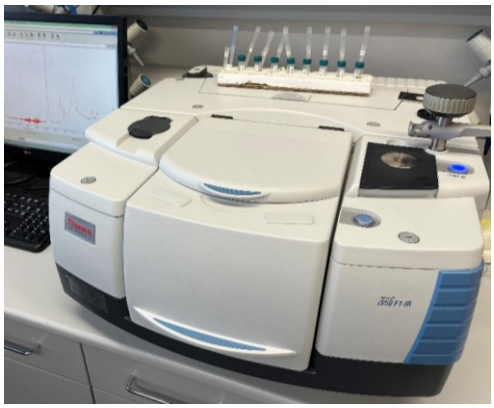
Reakce byla ukončena po 24 hodinách a reakční směs zneutralizována vytřepáním 200 ml 4,5% roztoku uhličitanu draselného (pro dosažení pH 7 bylo vytřepání provedeno dvakrát). Od zneutralizované reakční směsi byla v dělící nálevce oddělena spodní vodná fáze a horní

esterová fáze byla převedena společně s 20 ml metanolu na vodní lázeň, kde byl při 80 °C a sníženém tlaku oddestilován metanol s vodou [61].

3.3. Analytické metody

3.3.1. Infračervená spektrometrie

Za účelem určení funkčních skupin byl použit infračervený spektrometr s Fourierovou transformací Nicolet iS50 FTIR (USA) s jednoodrazovým diamantovým ATR modulem (obrázek 18). Vzorku bylo na ATR modul odpipetováno 150 µl a jeho měření provedeno při rozlišení 1 cm^{-1} s počtem skenů 32. Jako pozadí bylo měřeno spektrum vzduchu. Pro důvody uvedené v kapitole 2.4.1 bylo u naměřených spekter nutné provést softwarovou ATR korekci na materiál použitého krystalu (diamant) a index lomu vzorku. Indexy lomu jednotlivých vzorků byly naměřeny na Abbeho refraktometru v laboratořích základů fyzikální chemie (Univerzita Pardubice). Vyhodnocení spekter bylo provedeno v programu Omnic.



Obrázek 18: Nicolet iS50 FT-IR s diamantovým ATR modulem

3.3.2. Plynová chromatografie

Plynová chromatografie s hmotnostním detektorem

Ve spolupráci s katedrou analytické chemie (Univerzita Pardubice) byl pro kvalitativní analýzu vzorků použit plynový chromatograf Agilent 7890A (USA) s hmotnostním detektorem Agilent 5977A (elektronová ionizace a kvadrupólový analyzátor) a autosamplerem Agilent 7693. Pro separaci všech látek byla použita kapilární kolona TR-FAME (rozměry 60 m x 0,25 mm, tloušťka vrstvy stacionární fáze 0,25 µm) a teplotní gradient. Na kolonu bylo dávkováno 0,5 µl vzorku pomocí splitu vzorků v poměru 50:1 při 250 °C. Průtok nosného plynu (hélia) byl 1 ml/min a byl použit následující teplotní program termostatu: 70 °C po dobu 3,5 minut,

gradient 90 °C/min k 160 °C trvající 2 minuty, gradient 5 °C/min k 200 °C trvající 1 minutu, gradient 2 °C/min k 240 °C trvající 30 minut. Energie elektronů byla 70 eV, teplota zdroje 300 °C, teplota kvadrupólu 150 °C a teplota spojovací linky 300 °C. Hmotnostní data byla pořízena v hmotnostním rozmezí (m/z) 50-500 rychlostí 6 skenů/s. Příprava vzorků: na analytických váhách bylo naváženo 0,25 g vzorku, ke kterému byly přidány 3 g acetonitrilu a po homogenizaci bylo ze zředěného vzorku odpipetováno 100 µl do 400 µl acetonitrilu. Obdobným způsobem byly připraveny i vzorky v hexanu, cyklohexanu a diethyletheru pro ověření vlivu rozpouštědla na ionizaci látek ve vzorku.

Plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem

Pro zjištění čistoty ME řepkového, lněného a slunečnicového oleje pro výpočet přesné koncentrace kalibračních roztoků pro HPLC byly ME analyzovány na plynovém chromatografu (GC) Shimadzu GC2010 (Japonsko) s plamenově ionizačním detektorem (FID) a kapilární kolonou MET-Biodiesel (rozměry 15 m x 0,32 mm, tloušťka vrstvy stacionární fáze 0,1 µm). Vzorky byly připraveny navážením 45 mg ME daného oleje na analytických váhách, k vzorkům bylo přidáno 100 µl derivatizačního činidla (N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid) a po homogenizaci byl vzorek zředěn 8 ml hexanu, odpipetován do vialky a změřen na GC, dle normy ČSN EN 14105.

3.3.3. Kapalinová chromatografie

Pro kvalitativní a kvantitativní analýzu byl použit vysoko-účinný kapalinový chromatograf (HPLC) ECOM 2000 (Česká republika) s refraktometrickým detektorem Shodex RI-101 (Japonsko), autosamplerem Rigol L-3320 (Německo) a termostatem kolon ECOM LCO-101. Jednalo se o systém s reversními fázemi složený ze dvou chromatografických kolon zapojených v sérii: C30 (250 mm x 3 mm ID, velikosti částic 3µm) a C18 (150 mm x 4,6 mm ID, velikosti částic 7µm). Mobilní fází byl metanol o průtoku 0,5 ml/min. Před kolonami byla umístěna malá předkolona pro záchyt nečistot.

Vzorky pro HPLC byly připraveny navážením 0,3 g vzorku na analytických váhách (s přesností na 3 desetinná místa) a jeho zředěním 3 g mobilní fáze (metanol). Zředěný vzorek byl přes mikrofiltr na injekční stříkačce převeden do vialky a ta vložena do autosampleru. Na kolony bylo dávkováno 20 µl vzorku.

Optimalizace metody

Vzhledem ke koeluci píků ME kyseliny linolenové (C18:3) a epoxidovaného ME kyseliny olejové (C18:1) při použití původní analytické metody [62], bylo účelem této práce najít optimální podmínky metody pro jejich separaci. Úspěšná separace obou píků by umožnila kvantitativní stanovení úbytku všech ME při jejich epoxidaci. V rámci optimalizace byly vyzkoušeny: (i) dvě chromatografické kolony (C30 a C18) a jejich různé zapojení (i v sérii), (ii) různé mobilní fáze (acetonitril, metanol a jejich směsi), (iii) různé průtoky mobilní fáze a (iv) různé teploty termostatu kolon.

Analýza vzorků

Pomocí optimalizované metody byla provedena kalibrace na nenasycené methylestery VMK řepkového, slunečnicového a lněného oleje. Důvodem pro kalibraci na jednotlivé rostlinné oleje je velmi odlišné zastoupení jednotlivých VMK (tabulka 1). Kalibrační řady čistých ME příslušných olejů o 7 bodech: 0,1; 0,2; 0,6; 1; 3; 6 a 9 hm.% byly připraveny navážením 0,01; 0,01; 0,03; 0,05; 0,15; 0,3 a 0,45 g ME na analytických váhách a jejich doplněním do 5 g metanolem (pro 0,1 hm.% do 10 g).

Proměřením kalibračních řad a vyhodnocením píků ME kyseliny olejové, linolové a linolenové v chromatogramech byly získány sumy ploch, které byly vyneseny do grafu proti koncentraci příslušných kalibračních bodů a proloženy lineární regresní přímkou. Získaná kalibrační závislost byla použita pro vyhodnocení konverzí nenasycených methylesterů VMK na epoxidy.

3.3.4. Titrační a další analytické metody

Jódové číslo

Pro zjištění počtu dvojných vazeb bylo stanoveno jódové číslo (IV) vyjadřující hmotnost jódu ve 100 g vzorku (g I_2/100 g). Podle očekávaného IV (Tabulka 2) byl na analytických váhách navážen vzorek do titrační baňky. K vzorku bylo přidáno 5 ml chloroformu a 12,5 ml Hanušova činidla a po homogenizaci byl vzorek nechán 30 minut ve tmě zreagovat. Následně bylo přidáno 25 ml destilované vody, 7,5 ml 10% jodidu draselného a za neustálého míchání byl vzorek titrován 0,1 M roztokem thiosíranu do změny barvy z tmavě hnědé na načervenalou. Posledním krokem bylo přidání škrobového mazu a dotitrování vzorku do odbarvení. Pro správné stanovení IV byly stejným způsobem připravené i vzorky bez navážky analyzované látky, tj.

slepé vzorky. Z odečtených spotřeb thiosíranu potřebného na ztitrování stanovovaného vzorku a slepého vzorku bylo vypočteno IV podle vzorce:

$$Jódové\ číslo\ (IV) = \frac{(V_{sl} - V) \cdot f \cdot 0{,}1 \cdot 12{,}69}{m},$$

Kde V_{sl} je objem spotřeby thiosíranu pro slepý vzorek [ml], V je objem spotřeby thiosíranu pro stanovovaný vzorek [ml], f je korekční faktor roztoku thiosíranu a m je hmotnost navážky stanovovaného vzorku [g].

Tabulka 2: Navážky vzorku pro stanovení jódového čísla

Předpokládané IV [g I_2/100 g]	30	50	100	150
Navážka vzorku [g]	0,5	0,3	0,15	0,1

Epoxidový ekvivalent

Pro zjištění počtu oxiranových funkčních skupin byl stanoven epoxidový ekvivalent (EE) vyjadřující moly oxiranových skupin v 1 kg vzorku (mol/kg). Na analytických váhách bylo naváženo 0,2-0,4 g vzorku do titrační baňky a k němu přidáno 25 ml chloroformu a 1 g hexadecyltrimethylamonium bromidu (kvartérní amoniová sůl). Po homogenizaci byla přidána krystalová violeť a vzorek titrován roztokem 0,1 M kyseliny chloristé do přechodu z fialové do modrozelené barvy. Stejným způsobem byly stanoveny i slepé vzorky. Ze spotřeby kyseliny chloristé na ztitrování vzorku a slepého vzorku byl vypočten EE dle vzorce:

$$Epoxidový\ ekvivalent\ (EE) = \frac{(V - V_{sl}) \cdot f \cdot 0{,}1}{m},$$

kde V je objem spotřeby kyseliny chloristé pro stanovovaný vzorek [ml], V_{sl} je objem spotřeby kyseliny chloristé pro slepý vzorek [ml], f je korekční faktor roztoku kyseliny chloristé a m je hmotnost navážky stanovovaného vzorku [kg].

Kinematická viskozita

Pro stanovení kinematické viskozity byl použit Ubbelohdeho viskozimetr s konstantou 0,4996 mm^2/s^2. Do viskozimetru byl mezi vyznačené rysky doplněn vzorek a společně se vzorkem byl viskozimetr vytemperován ve vodní lázni na 40 °C. Pro stanovení viskozity byl

změřen potřebný čas na protečení vzorku stanoveným objemem, jenž byl vyznačen dvěma ryskami. Z odečteného času a konstanty viskozimetru byla vypočtena kinematická viskozita.

Oxidační stabilita

Ve spoluprací se společností Paramo a.s. byly přístrojem Rancimat stanoveny oxidační stability. Vzorek o hmotnosti 7,5 ± 0,1 g s přídavkem 0,1 hm.% BHT (butylhydroxytoluen) byl v reakční nádobě vytemperován na 110 °C a probubláván proudem vzduchu o průtoku 10 l/min. Plyn odcházející z reakční nádoby byl veden do měřící cely s destilovanou vodou. Vodivostní sonda detekovala změny vodivosti v měřící cele a pomocí programu RANCIMAT zaznamenávala zvýšení vodivosti způsobené narůstajícím množstvím oxidačních produktů (karboxylové kyseliny disociují na ionty). Vyhodnocován byl čas uběhlý od počátku oxidace do bodu zlomu, kdy vodivost prudce narůstala. Tato doba je označována jako indukční perioda a vyjadřuje se v hodinách [63].

Simulovaná destilace

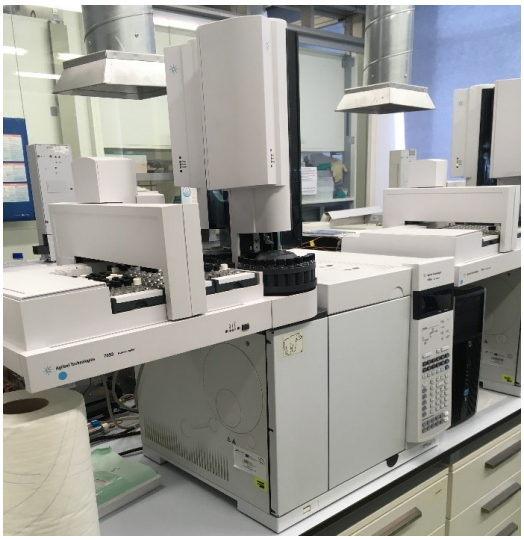
Ve spolupráci s Orlen UniCre byla u vzorků provedena vysokoteplotní simulovaná destilace (SimDis – Simulated Distillation). SimDis je analytická metoda sloužící k rozdělení látek ve vzorku podle bodu varu. Výsledným záznamem je závislost úbytku hmotnosti na teplotě (bodu varu).

3.4. Stáž

V rámci stáže ve výzkumné instituci Orlen UniCre bylo provedeno celkem šest epoxidačních reakcí s heterogenními katalyzátory: tři reakce byly katalyzovány wolframem naneseném na alumině (W/Al_2O_3) a tři reakce titano-alumino-fosfátem (TAP). V rámci tří reakcí na stejném katalyzátoru bylo v každé z nich použito jiné spolurozpouštědlo: acetonitril, terc-butylalkohol a ethylacetát.

Do reaktoru byl navážen ME řepkového oleje, peroxid vodíku (molární poměr 2:1 vůči dvojným vazbám) a dané spolurozpouštědlo. Spolurozpouštědlo bylo přidáno v takovém množství, aby byla reakční směs homogenní, přičemž se vycházelo z ternárních diagramů naměřených na katedře fyzikální chemie (Univerzita Pardubice). Následně byl reaktor umístěn do vodní lázně o teplotě 50 °C, bylo zapnuto míchání, nasazen chladič a po vytemperování reakční směsi byl přidán příslušný katalyzátor. Množství katalyzátoru (TAP i W/Al_2O_3)

přidaného do reakce bylo 3 g (naváženo na analytických váhách s přesností na 3 desetinná místa). Ve zvolených časových intervalech (1., 3., 6. a 11. hodina) byly odebrány vzorky reakční směsi pro zjištění konverze methylesterů VMK na epoxidy. Vzorky byly odebrány pipetou do injekční stříkačky s mikrofiltrem a přes ni byly vzorky zfiltrovány do vialek. Reakce byla po 23 hodinách ukončena odstraněním katalyzátoru z reakční směsi filtrací přes skládaný filtr.



Obrázek 19: Plynový chromatograf Agilent 7890A

Odebrané vzorky byly pro zjištění konverze methylesterů VMK na epoxidy analyzovány na GC Agilent 7890A (USA) s FID detektorem a autosamplerem Agilent 7693 (obrázek 19). Vzorky s acetontriliem byly analyzovány přímo a vzorky s terc-butylalkoholem a ethylacetátem zředěny acetonitrilem. Pro terc-butylalkohol bylo ředění: 0,05 g vzorku a 1 g acetonitrilu a pro ethylacetát: 0,15 g vzorku a 0,3 g acetonitrilu. Vzhledem k nízkým konverzím ve 23. hodině u reakcí s ethylacetátem a terc-butylalkoholem byly v celém časovém rozsahu analyzovány pouze vzorky s acetonitrilem.

Vzorky z 23. hodiny byly dále analyzovány vysokoteplotní simulovanou destilací.

4. Výsledky a diskuse

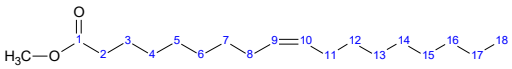
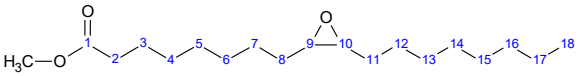
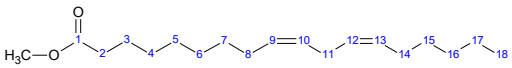
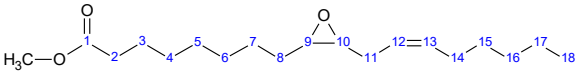
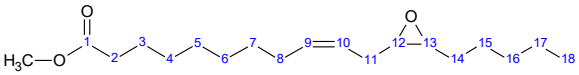
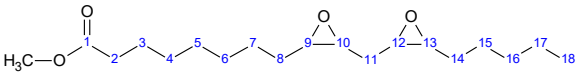
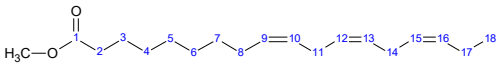
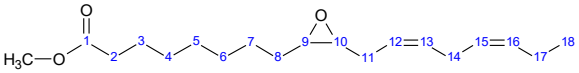
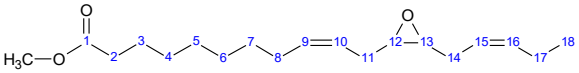
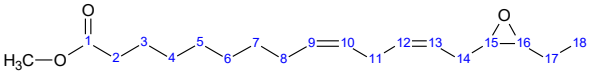
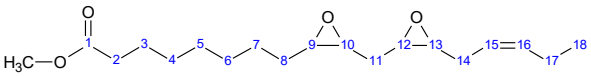
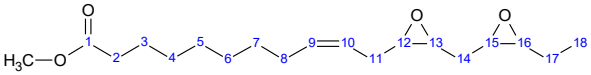
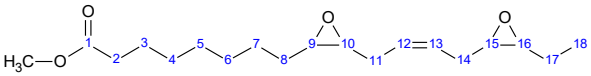
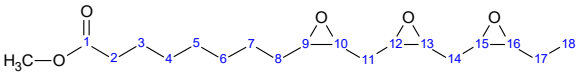
Rostlinné oleje mají různé zastoupení VMK (tabulka 1) s různým počtem dvojných vazeb, čímž při epoxidaci jejich ME vzniká mnoho produktů a meziproduktů (tabulka 3), které nemají CAS čísla a neexistují jejich standardy. Proto musel být zvolen nepřímý přístup jejich identifikace. Vycházelo se z předpokladu, že na základě průběhu vzniku epoxidů pouze z ME kyseliny linolové (při použití slunečnicového oleje) by mohly být určeny jednotlivé produkty, a to jednou a dvakrát epoxidovaný ME kyseliny linolové. Určení jednotlivých produktů epoxidace ME kyseliny linolenové je bohužel značně obtížnější, protože se její tři dvojné vazby mohou epoxidovat v různém pořadí a vzniká tedy mnoho meziproduktů. Třetí nejvýznamnější nenasycenou kyselinou je kyselina olejová (C18:1), která se také epoxiduje, ale epoxid jejího ME byl identifikován již v rámci dřívější diplomové práce [62] na katedře fyzikální chemie (Univerzita Pardubice). V malých množstvích (v závislosti na oleji) se mohou vyskytovat i jiné nenasycené mastné kyseliny. Identifikace může být navíc ztížena i konformací na cis a trans stereoizomery. Z těchto důvodů byly vybrány rostlinné oleje s různým zastoupením VMK.

Pro zkoumání možností analýzy produktů a meziproduktů v průběhu epoxidace ME rostlinných olejů byl pro rozdílné zastoupení VMK vybrán slunečnicový a lněný olej. Slunečnicový olej má vysoký obsah kyseliny linolové (C18:2) a zároveň stopové množství kyseliny linolenové (C18:3). Lněný olej byl naopak zvolen pro jeho vysoký obsah kyseliny linolenové, ovšem lněný olej obsahuje také kyselinu linolovou, což ztěžuje analýzu produktů epoxidace ME linolenové kyseliny. Proto bylo důležité prvně určit produkty epoxidace ME kyseliny linolové, které by poté mohly být identifikovány i v případě analýzy produktů epoxidace ME lněného oleje, čímž by byly nepřímo určeny produkty epoxidace ME kyseliny linolenové.

Pro analýzu produktů epoxidace ME rostlinných olejů byla použita infračervená spektrometrie (IČ), vysoko-účinná kapalinová chromatografie s refraktometrickým detektorem (HPLC-RI), plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS) a simulovaná destilace (SimDis). U vzorků bylo dále stanoveno jódové číslo (IV), epoxidový ekvivalent (EE), kinematická viskozita a oxidační stabilita.

Pro přehlednost budou dále označovány methylestery lněného oleje jako ME_LN a methylestery slunečnicového oleje ME_SL. Za zkratkou může být uveden čas odběru vzorku, např.: E_ME_LN_3 h, je epoxidovaný ME lněného oleje odebraný ve třetí hodině.

Tabulka 3: Hlavní možné produkty epoxidace methylesterů vyšších mastných kyselin

Methylestery vyšších mastných kyselin		Epoxidy methylesterů vyšších mastných kyselin
cis-9-oktadecenová (olejová) kyselina ME 	*monoepoxid*	*cis*-9,10-epoxy oktadecanoat ME 
cis,cis-9,12-oktadecenová (linolová) kyselina ME 	*monoepoxid*	*cis*-9,10-epoxy oktadec-12-enoat ME  *cis-12,13-epoxy oktadec-9-enoat ME* 
	diepoxid	*cis,cis-9,10;12-13-diepoxy oktadecanoat ME* 
cis,cis,cis-9,12,15-oktadecenová (linolenová) kyselina ME 	*monoepoxid*	*cis*-9,10-epoxy oktadec-12,15-dienoat ME  *cis*-12,13-epoxy oktadec-9,15-dienoat ME  *cis*-15,16-epoxy oktadec-9,12-dienoat ME 
	diepoxid	*cis,cis*-9,10;12,13-diepoxy oktadec-12-enoat ME  *cis,cis*-12,13;15,16-diepoxy oktadec-9-enoat ME  *cis,cis*-9,10;15,16-diepoxy oktadec-12-enoat ME 
	triepoxid	*cis,cis,cis*-9,10;12,13;15,16-triepoxy oktadecanoat ME 

4.1. Infračervená spektrometrie

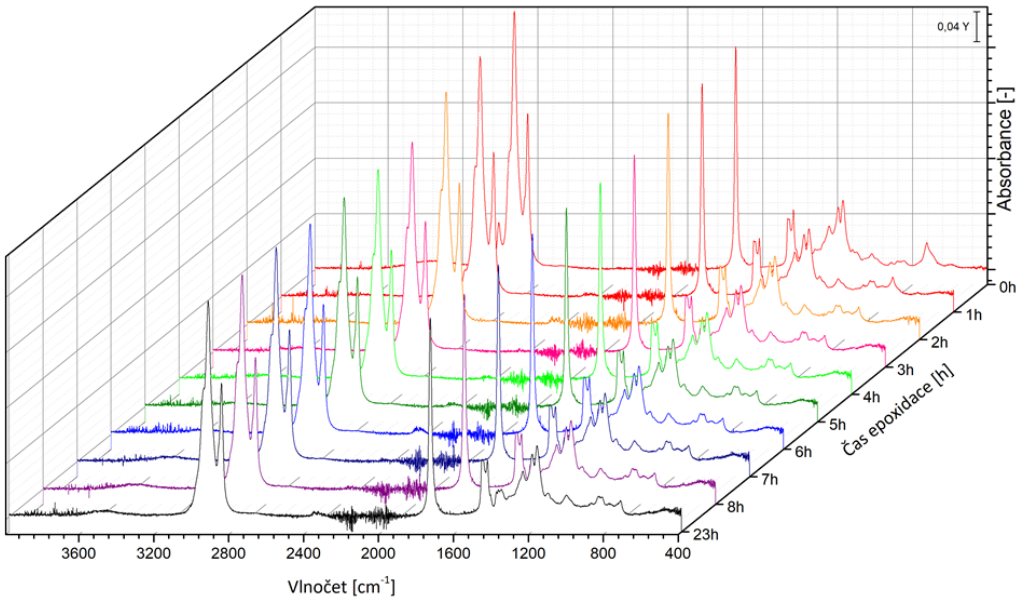
Pro identifikaci funkčních skupin nacházejících se ve vzorcích epoxidovaných methylesterů slunečnicového oleje (ME_SL) a methylesterů lněného oleje (ME_LN) byla použita infračervená spektrometrie (IČ). Nejprve bylo nutné provést softwarovou ATR korekci

naměřených spekter, pro její výpočet byly změřeny indexy lomu vybraných vzorku (tabulka 4). Pro korekci spekter byly zvoleny průměrné indexy lomu: 1,45 pro vzorky ME_SL a 1,46 pro vzorky ME_LN.

Tabulka 4: Naměřené indexy lomu pro ATR korekci

Vzorek	ME_LN	E_ME_LN_3	E_ME_LN_7	E_ME_LN_24	ME_SL	E_ME_SL_3	E_ME_SL_7	E_ME_SL_24
Index lomu	1,459	1,462	1,463	1,466	1,454	1,455	1,455	1,455
Průměr	1,46				1,45			

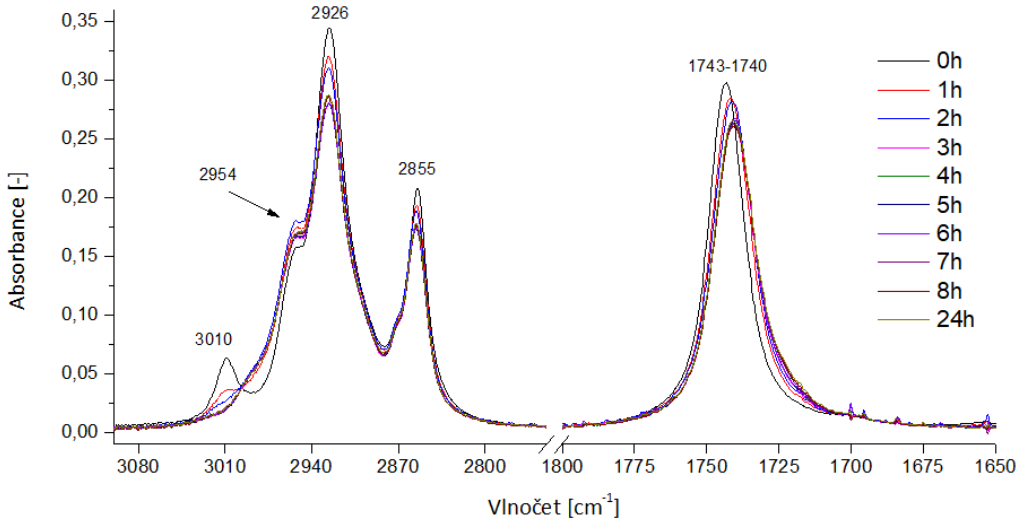
Obrázek 20 znázorňuje infračervená spektra průběhu epoxidace ME_SL. IČ spektra poukazují na úbytek dvojných vazeb v uhlovodíkovém řetězci, což bylo potvrzeno i poklesem IV ze 110 na 0,4 g I_2/100 g a jejich přeměna na epoxidy byla potvrzena vysokým EE (3,99 mol/kg). Epoxidy ME_SL se po vzniku jeví jako stabilní bez náchylnosti k vedlejším reakcím, což potvrzují i následující analýzy a jen relativně málo zvýšená kinematická viskozita (14 mm^2/s) ve srovnání se samotným ME (důsledkem epoxidace). Vybrané oblasti spekter budou blíže popsány v následujících odstavcích.



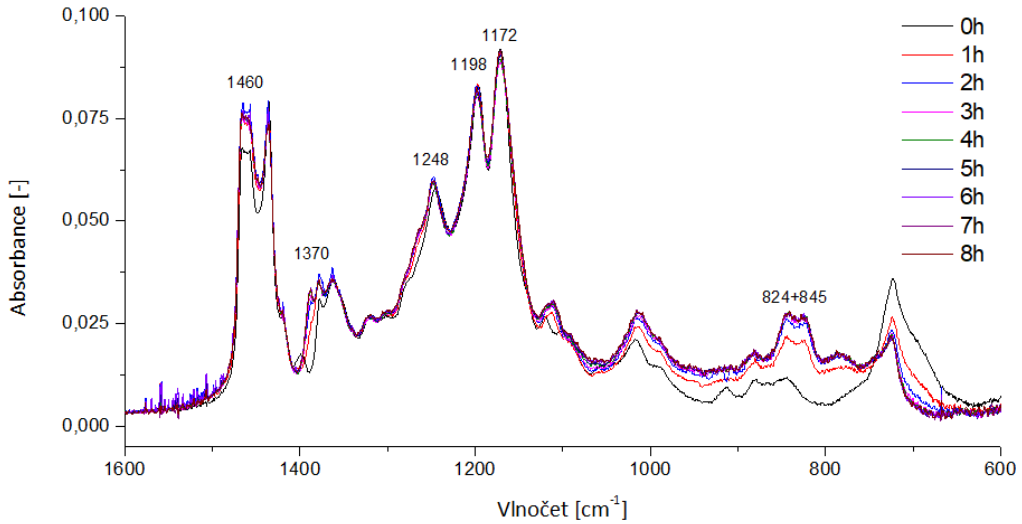
Obrázek 20: IČ spektra průběhu epoxidace ME_SL

Pro lepší názornost byly provedeny výřezy vybraných oblastí spekter. Na obrázku 21 ve výřezu 3100-2750 cm^{-1} lze pozorovat valenční vibrace C-H skupin alkanů a alkenů. V rámci prvních tří hodin epoxidace ME_SL došlo k vymizení signálu absorpce valenčních vibrací alkenů (dvojných vazeb) s maximem 3010 cm^{-1} potvrzující jejich zreagování. Alkeny velmi pravděpodobně přechází na alkany (jednoduchá vazba), jejichž nárůst je pozorován na 2954 cm^{-1}. Valenčním vibracím alkanů je přiřazena i absorpce s maximy na 2926

a 2855 cm^{-1}, přičemž v prvních dvou hodinách dochází k mírnému poklesu intenzity absorpce těchto pásů. Pravděpodobným důvodem poklesu intenzity absorpce je navázání kyslíku do blízkosti CH_2 skupin alkanového řetězce, kterým tyto oblasti náleží. Ve výřezu 1800-1650 cm^{-1} lze vidět absorpci s maximem na 1743-1740 cm^{-1} způsobenou valenčními vibracemi karbonylové skupiny ME a během prvních dvou hodin epoxidace dochází k mírnému posunu směrem k menším vlnočtům. Případné vysvětlení posunu může být ovlivnění síly vazby vznikem oxiranového kruhu v molekule. Konkrétně zde dochází k posunu k nižším vlnočtům, tzn. záření s menší energií z čehož plyne, že se síla vazby zmenšila [64].



Obrázek 21: Výřez IČ spekter průběhu epoxidace ME_SL (3100-2750 a 1800-1650 cm^{-1})

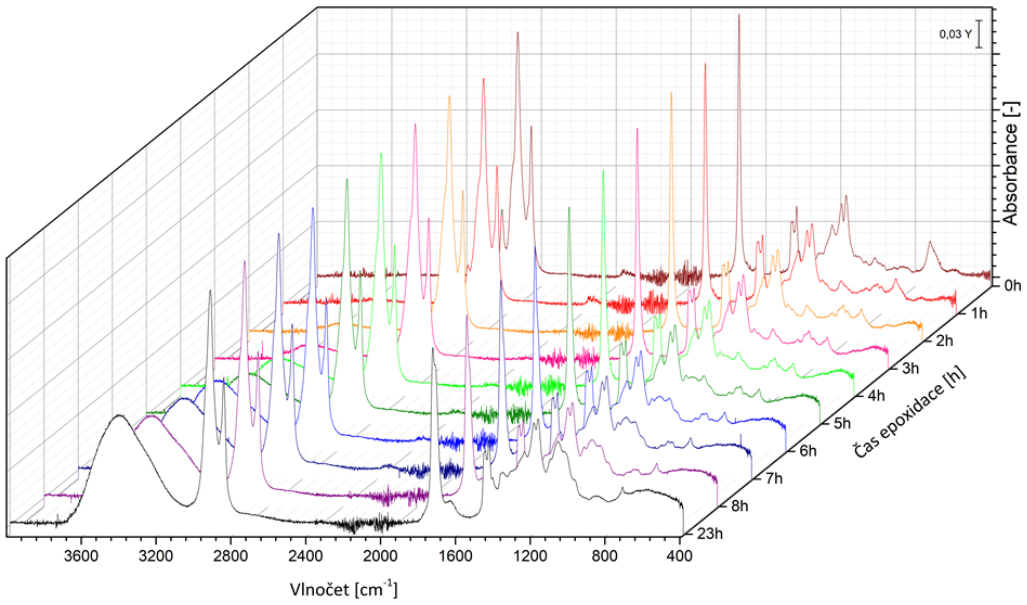


Obrázek 22: Výřez IČ spekter průběhu epoxidace ME_SL (1600-600 cm^{-1})

Na obrázku 22 jsou IČ spektra průběhu epoxidace ME_SL v oblasti otisku palce, kde lze v prvních dvou hodinách vidět nárůst deformačních vibrací alkanů (1460 a 1370 cm^{-1})

a valenčních vibrací oxiranového kruhu (824-845 cm^{-1}), poté již ve zmíněných oblastech ke změnám nedochází. Absorpční pásy s maximy na 1171, 1198 a 1248 cm^{-1} náleží valenčním vibracím C-O od esterové funkční skupiny, která se epoxidace neúčastní, a tedy se v průběhu reakce nemění.

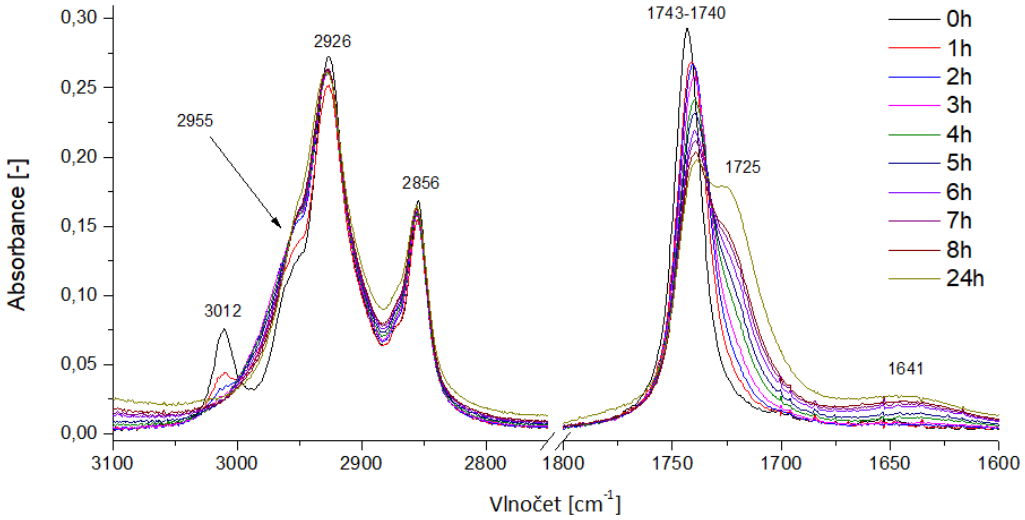
Obrázek 23 znázorňuje IČ spektra průběhu epoxidace ME_LN, kde v prvních dvou hodinách zmizel absorpční pás dvojných vazeb (obdobně jako u SL) a v průběhu reakce začal v oblasti od 3700 do 3050 cm^{-1} s maximem na 3415 cm^{-1} narůstat signál patřící valenčním vibracím OH skupin, který indikuje vznik alkoholů. Což poukazuje na následnou hydrolýzu vzniklých epoxidů na alkoholy, ke které v případě epoxidace ME_SL nedochází. Vzniku vedlejších produktů odpovídá i pokles IV ze 182 na 5,5 g I_2/100 g, prakticky nulový EE a vysoká kinematická viskozita (450 mm^2/s) na konci reakce. Bližší popis vybraných oblastí spekter bude následovat níže.



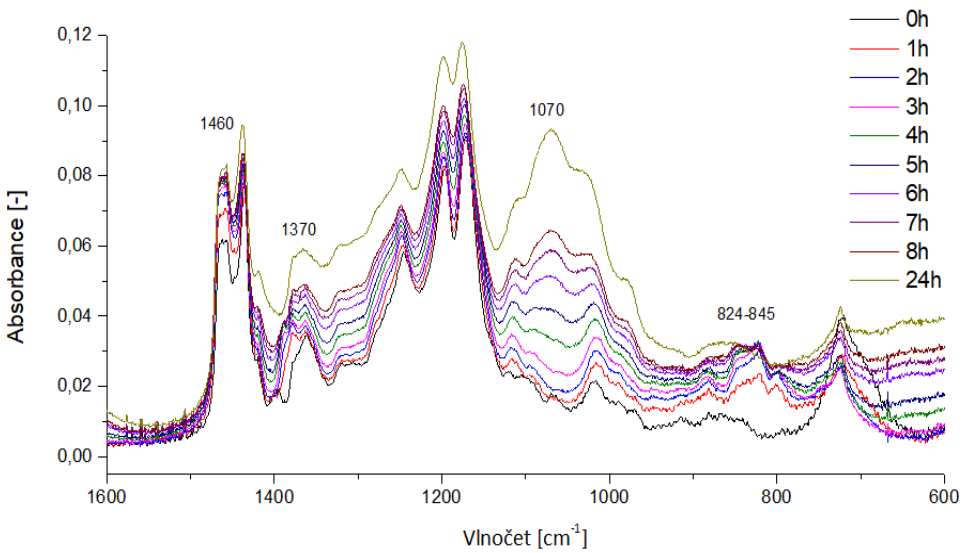
Obrázek 23: IČ spektra průběhu epoxidace ME_LN

Na obrázku 24 se nachází výřez IČ spekter epoxidace ME_LN. V prvních dvou hodinách dochází k vymizení signálu s maximem na 3012 cm^{-1} náležícímu valenčním vibracím dvojných vazeb alkenů, a naopak s maximem na 2955 cm^{-1} mírně narůstá signál vibrací nasycených uhlovodíků. Nasyceným uhlovodíkům patří i valenční vibrace s maximy absorpce na 2926 a 2856 cm^{-1}, kde jako v případě epoxidace ME_SL dochází k mírnému poklesu absorpce. V oblasti 1850-1600 cm^{-1} pozorujeme mírný posun (z 1743 na 1740 cm^{-1}) a pokles signálu absorpce valenčních vibrací esterové funkční skupiny (C=O), přičemž pokles signálu pravděpodobně způsobuje hydrolýza esteru na karboxylovou skupinu s maximem

na 1725 cm^{-1}. Tento jev lze pozorovat v celém průběhu epoxidace, zatímco k malému posunu signálu o 3 cm^{-1} k nižším vlnočtům došlo během prvních dvou hodin epoxidace. Možný je i vznik ketoesteru, jehož ketonický a esterický karbonyl by vysvětlil absorpci s maximy na 1740 a 1725 cm^{-1} a enol forma karbonylu by vysvětlila i signál s maximem na 1641 cm^{-1}. Absorpční pás s maximem na 1640 cm^{-1} může náležet deformačním vibracím H-O-H od vody, která se může ve vzorcích nacházet.



Obrázek 24: Výřez IČ spekter průběhu epoxidace ME_LN (3100-2750 a 1800-1600 cm^{-1})



Obrázek 25: Výřez IČ spekter průběhu epoxidace ME_LN (1080-600 cm^{-1})

Obrázek 25 znázorňuje oblast otisku palce (pod 1500 cm^{-1}) v průběhu epoxidace ME_LN. V oblastech s maximy absorpce okolo 1460 a 1370 cm^{-1} lze vidět nárust deformačních vibrací alkanů během prvních čtyř hodin, což potvrzuje zreagování alkenů (dvojných vazeb). Vznik oxiranového kruhu potvrzuje nárůst absorpce v oblasti 824-845 cm^{-1} patřící jeho valenčním

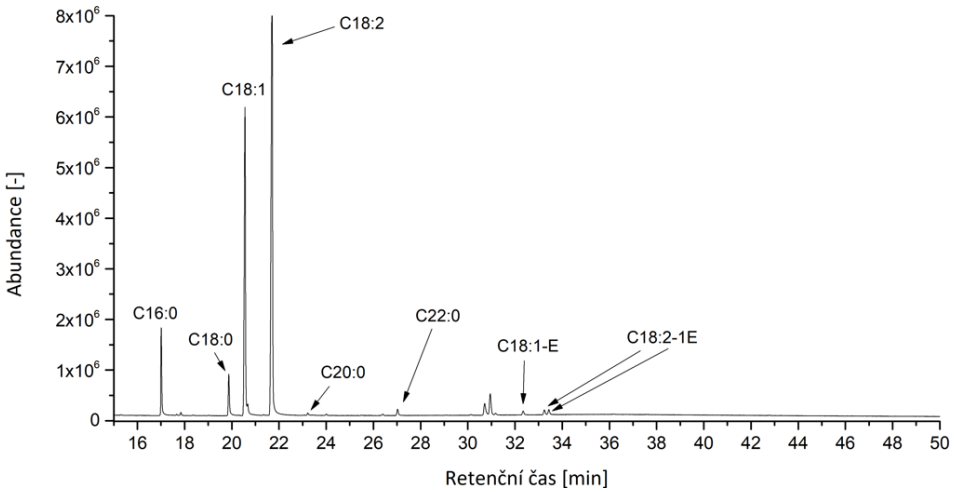
vibracím. Dále lze vidět nárůst absorpce s maximem na 1070 cm^{-1}, který by měl náležet vznikajícímu alkoholu (valenční vibrace C-O od alkoholu). Pro možný překryv absorpcí alkoholů a esterů nebude zbytek oblasti otisku palce interpretován.

4.2. Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Pro analýzu a identifikaci látek vznikajících v průběhu epoxidace ME_LN a ME_SL byla použita plynová chromatografie s hmotnostním detektorem (GC-MS). GC-MS s elektronovou ionizací poskytuje při identifikaci látek velkou výhodu v podobě obsáhlé knihovny hmotnostních spekter při použití standardního urychlovacího napětí (70 eV). Bohužel v knihovně nejsou obsaženy MS spektra epoxidovaných ME vyšších mastných kyselin, protože při jejich epoxidaci vzniká mnoho produktů a meziproduktů (viz úvod kapitoly č.4). Výchozím bodem při identifikaci jednotlivých epoxidů byl epoxid kyseliny olejové (18:1), který byl identifikován již v rámci předchozí diplomové práce zabývající se analýzou produktů epoxidace ME rostlinných olejů [62], kde byly rovněž identifikovány i jednotlivé ME.

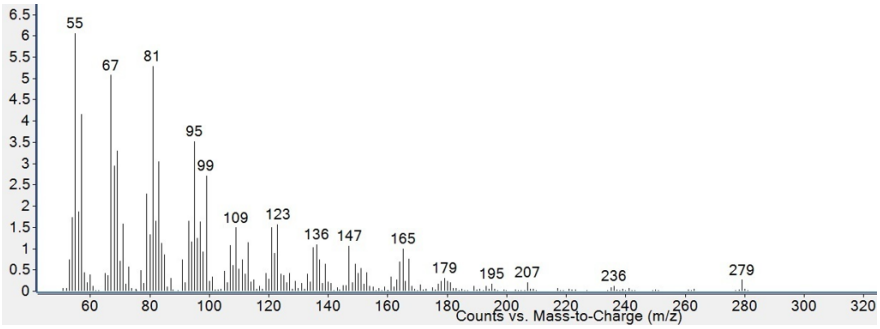
Před samotnou analýzou všech vzorků byla vyzkoušeny čtyři rozpouštědla: cyklohexan, diethylether, n-hexan a acetonitril a jejich vliv na ionizaci látek. Na základě analýzy byl jako nejvhodnější rozpouštědlo vybrán acetonitril, jenž byl dále používán pro přípravu vzorků.

Na obrázku 26 se nachází chromatogram reakční směsi epoxidace ME slunečnicového oleje. Vzorek měl být odebrán po přidání peroxidu vodíku a před začátkem ohřevu směsi na reakční teplotu 60 °C, ale v případě ME_SL byl vzorek odebrán až v průběhu ohřevu a na chromatogramu se již objevují píky prvních vzniklých epoxidů. Výchozí ME jednotlivých VMK mají retenční časy (RT): ME kyseliny palmitové (C16:0) 17,0 minut, ME kyseliny stearové (C18:0) 19,9 minut, ME kyseliny olejové (C18:1) 20,6 minut a ME kyseliny linolové (C18:2) 21,7 minut. V nízkém zastoupení se objevují ME kyseliny arachidové (C20:0) a behenové (C22:0) s RT 23,3 a 27,1 minut.

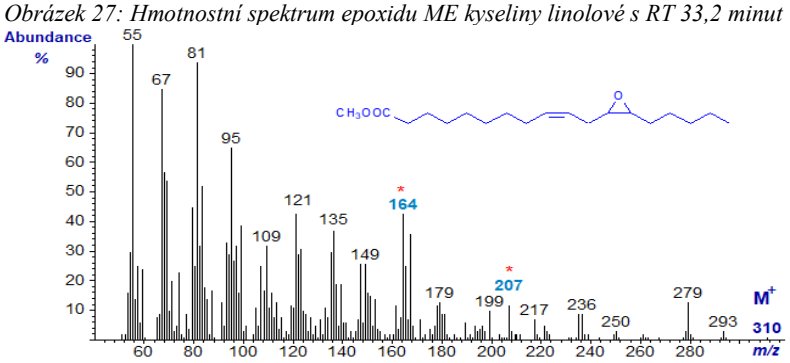


Obrázek 26: Chromatogram (GC-MS) ME_SL_0 h

Vzniklé epoxidy (obrázek 26) se eluují: epoxid ME kyseliny olejové (C18:1-E) v čase 32,4 minut a ME kyseliny linolové s jedním oxiranovým kruhem na první a druhé dvojné vazbě (C18:2-E) v časech 33,2 a 33,4 minut. Tyto dva epoxidy (C18:2-E) byly identifikovány na základě vygenerovaných hmotnostních spekter, která byla porovnána se spektry nalezenými v publikaci [65]. MS spektrum epoxidu s RT 33,2 minut (obrázek 27) se poměrně dobře shoduje s MS spektrem epoxidu ME kyseliny linolové epoxidované na dvojné vazbě vzdálenější od esterové funkční skupiny, viz obrázek 28. Důkazem polohy dvojné vazby jsou píky iontů s poměrem hmotnosti k náboji (m/z) 164 a 207 vzniklých rozštěpením řetězce za a před oxiranovou funkční skupinou.

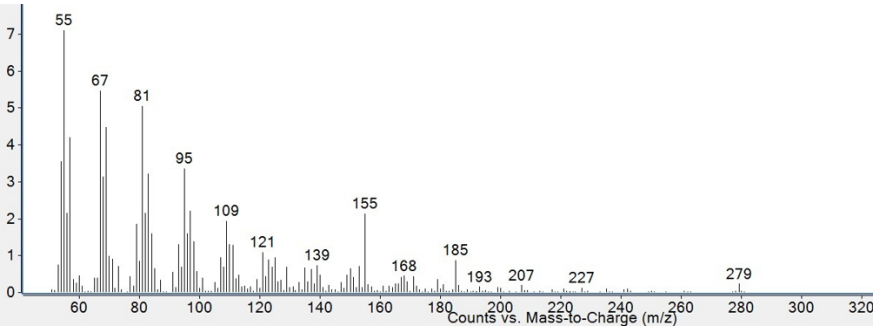


Obrázek 27: Hmotnostní spektrum epoxidu ME kyseliny linolové s RT 33,2 minut

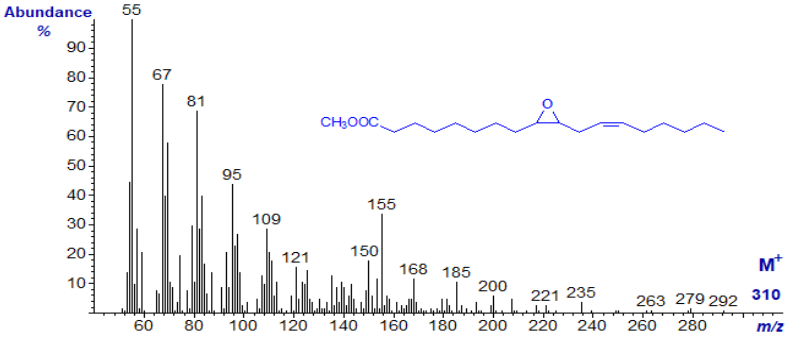


Obrázek 28: Hmotnostní spektrum methyl 12,13-epoxy-oktadeca-9-enoatu [65]

Hmotnostní spektrum epoxidu s RT 33,4 minut (obrázek 29) se naopak dobře shoduje s MS spektrem ME kyseliny linolové epoxidované na dvojné vazbě bližší esterové funkční skupině, (obrázek 30). Důkazem by mělo být štěpení v místě oxiranového kruhu za vzniku iontu s m/z 155. Tímto by měly být identifikovány jednou epoxidované (monoepoxidy) ME kyseliny linolové, které budou dále označovány jako epoxid A s oxiranovým kruhem v pozici 12,13 a epoxid B s oxiranovým kruhem v pozici 9,10.

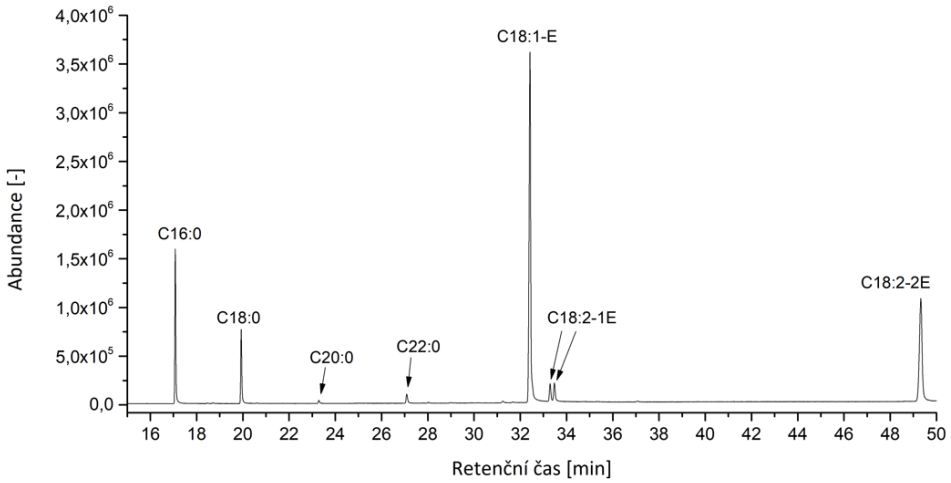


Obrázek 29: Hmotnostní spektrum epoxidu ME kyseliny linolové s RT 33,4 minut



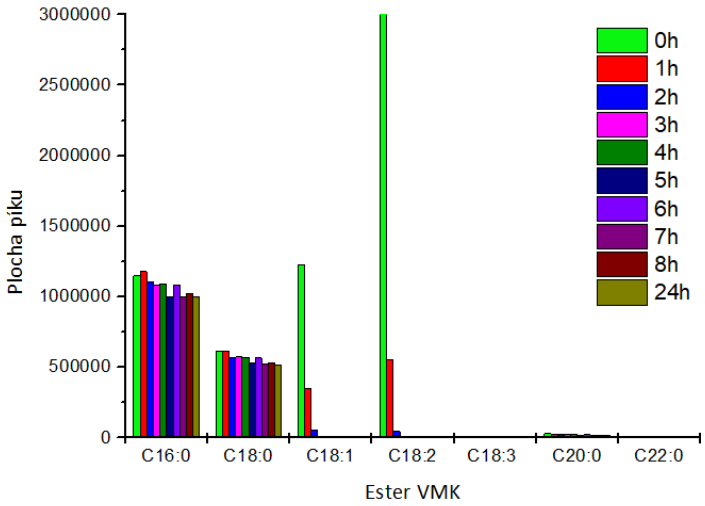
Obrázek 30: Hmotnostní spektrum methyl 9,10-epoxy-oktadeca-12-enoatu [65]

Chromatogram epoxidace ME_SL po čtyřech hodinách se nachází na obrázku 31 a je možné vidět, tak do čtvrté hodiny oba nenasycené ME zreagovaly na epoxidy. V chromatogramu zůstávají pouze píky nasycených ME kyseliny v časech: palmitové (C16:0) v 17,0 minut, stearové (C18:0) ve 19,9 minut, arachidové (C20:0) v 23,3 minut a behenové (C22:0) v čase 27,1 minut. ME kyseliny olejové plně zreagoval na její epoxid (C18:1-E) s RT 32,4 minut. Z ME kyseliny linolové vznikly dva monoepoxidy (C18:2-E) s časy 33,2 (epoxid A) a 33,4 minut (epoxid B), které dále reagovaly na plně epoxidovaný ME kyseliny linolové (C18:2-2E) s časem 49,3 minut. Plně epoxidovanou C18:2 nebylo bohužel možné identifikovat přímo, ale vzhledem k určení všech ostatních píků v chromatogramu je toto přiřazení pravděpodobné.



Obrázek 31: Chromatogram (GC-MS) epoxidace ME_SL_ 4 h

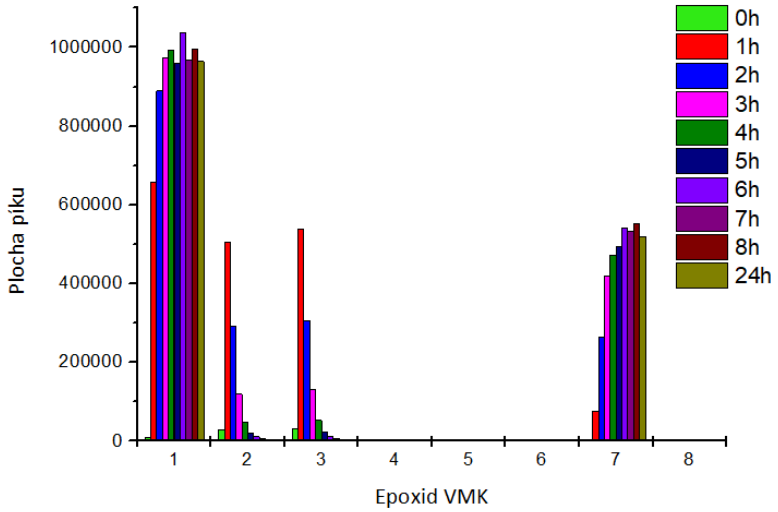
Zastoupení jednotlivých ME v průběhu reakce je možné pozorovat na obrázku 32. Během reakce došlo k úplnému zreagování nenasycených MK na epoxidy, což je potvrzeno poklesem IV na 0,4 g I_2/100 g (pokles o 99,6 %). Obsah nasycených ME zůstává po celou dobu reakce téměř stejný, až na malý pokles pravděpodobně způsoben hydrolýzou esterové funkční skupiny. Pozorován je, ač ve stopovém množství, ME kyseliny linolenové a jeho přítomnost odpovídá zastoupení MK u slunečnicového oleje dle literatury: 0-0,2 hm.% [16].



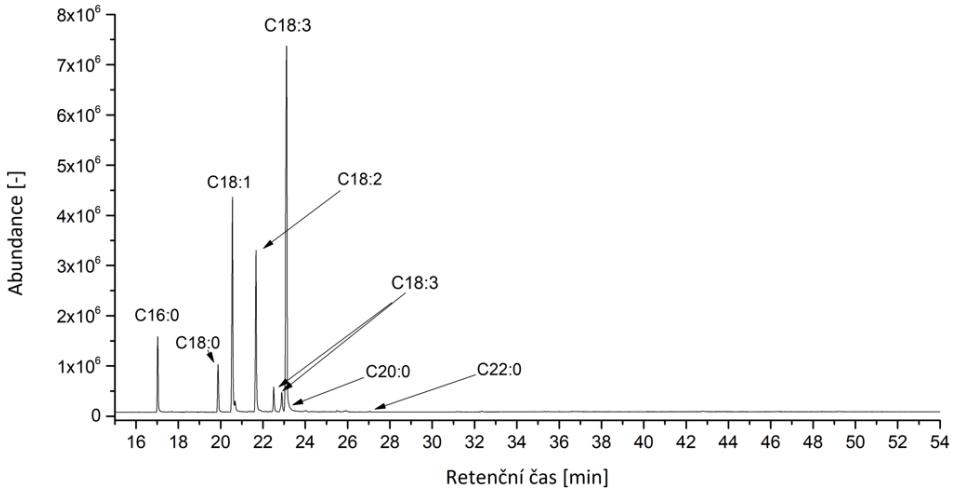
Obrázek 32: Zastoupení jednotlivých ME_SL v průběhu epoxidace

Obrázek 33 znázorňuje nárůst jednotlivých epoxidů během reakce a je vidět, že vzorek z nulté hodiny byl opravdu odebrán až v průběhu zahřívání na reakční teplotu, jelikož již v nulté hodině je pozorován epoxid ME kyseliny olejové (v grafu epoxid 1) a monoepoxidy A a B ME kyseliny linolové (epoxidy 2 a 3). Plně epoxidovaný ME kyseliny linolové, tj. epoxid se dvěma oxiránovými kruhy je označen jako epoxid 7. V prvních třech hodinách dochází k nárůstu epoxidu 1 a jeho zastoupení se dále nemění, protože se jedná o konečný produkt epoxidace ME

kyseliny olejové. Naopak epoxidy 2 a 3 jsou pouze meziprodukty následné reakce a jejich zastoupení je největší v první hodině, poté dále reagují za vzniku epoxidu 7. V šesté hodině dosahuje epoxid 7 svého maxima a do konce reakce se jeho zastoupení nemění. Jak epoxid 1, tak epoxid 7 jsou stabilní produkty epoxidace a nepodléhají dalším nechtěným reakcím, jak již bylo potvrzeno IČ spektrometrii, vysokým EE (3,99 mol/kg) a nízkou viskozitou (14 mm^2/s).



Obrázek 33: Zastoupení epoxidů ME_SL v průběhu epoxidace

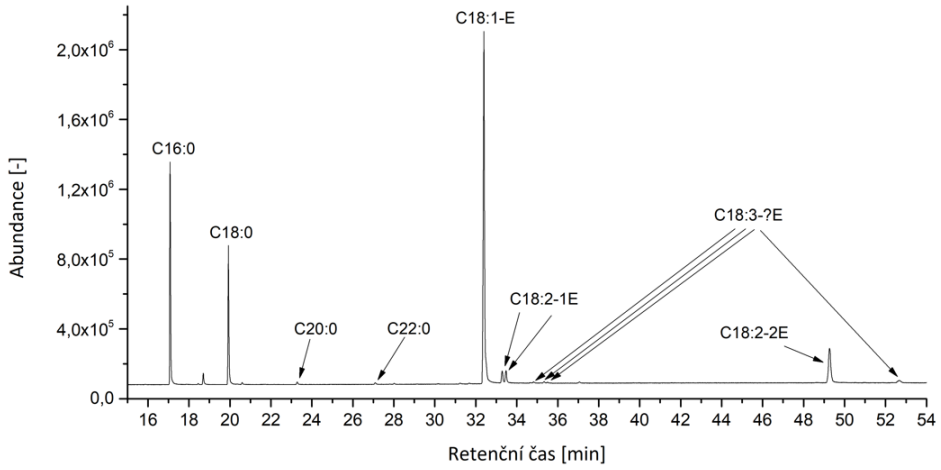


Obrázek 34: Chromatogram (GC-MS) ME_LN_0 h

Na obrázku 34 se nachází chromatogram reakční směsi epoxidace ME_LN na počátku reakce. Chromatogram obsahuje píky jednotlivých methylesterů VMK obsažených v lněném oleji. Výchozí ME jednotlivých VMK mají retenční časy (RT): ME kyseliny palmitové (C16:0) 17,0 minut, ME kyseliny stearové (C18:0) 19,9 minut, ME kyseliny olejové (C18:1) 20,6 minut, ME kyseliny linolové (C18:2) 21,7 minut a k eluci ME kyseliny linolenové (C18:3) dochází v časech v 22,5; 22,8 a 23,1 minut, přičemž se nejspíše jedná o její stereoizomery.

V lněném oleji jsou v malém množství obsaženy i nasycené mastné kyseliny arachidová (C20:0) a behenová (C22:0) a jejich ME mají RT 23,3 a 27,1 minut.

Obrázek 35 prezentuje chromatogram epoxidace ME_LN po čtyřech hodinách, kde se objevují pouze nasycené ME kyseliny: palmitové (17,0 minut), stearové (20,5 minut), arachidové (23,3 minut) a behenové (27,1 minut). Epoxid ME kyseliny olejové má RT 32,4 minut, epoxidy A a B ME kyseliny linolové mají RT 33,2 a 33,4 minut a plně epoxidovaný ME kyseliny linolové eluuje v čase 49,3 minut.



Obrázek 35: Chromatogram (GC-MS) epoxidace ME_LN_4 h

Tabulka 5: Počet dvojných vazeb a oxiranových kyslíku u jednotlivých epoxidů

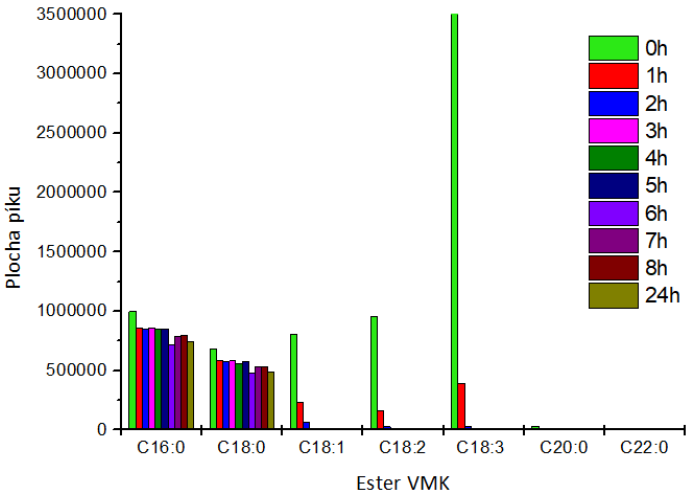
Epoxid	C18:1-E	C18:2-1E	C18:3-1E	C18:2-2E	C18:3-2E
Počet oxiranových kyslíků	1	1	1	2	2
Počet dvojných vazeb	0	1	2	0	1

Epoxidy ME kyseliny linolenové nebyly identifikovány přímo, ale v časech 34,8; 35,3 a 35,5 minut se zřejmě nacházejí její epoxidy s jedním oxiranovým kruhem (a dvěma dvojnými vazbami). Přiřazení vychází ze závislosti retenčního času u GC na teplotě varu a polaritě látek. S rostoucí molekulovou hmotností a polaritou roste teplota varu a s ní i retenční čas. Při použití polární stacionární fáze má na zadržování vliv i samotná polarita, kdy jsou polárnější látky při průchodu kolonou více zadržovány. Epoxidy se separují na základě počtu oxiranových kyslíků a dvojných vazeb v molekule (tabulka 5), neboť při epoxidaci dochází navázáním kyslíku ke zvýšení molekulové hmotnosti a polarity látek, čímž se zvyšuje jejich teplota varu a následně i RT. Vliv dvojných vazeb na polaritu, a tedy i retenci látek, lze pozorovat již u samotných methylesterů VMK (obrázek 34), kdy ME s větším počtem dvojných vazeb mají delší RT. Proto

by měly monoepoxidy ME kyseliny linolenové (C18:3-1E) eluovat později než monoepoxidy ME kyseliny linolové (C18:2-1E).

V čase 52,4 minut (obrázek 35) by měl eluovat epoxid ME linolenové kyseliny se dvěma oxiranovými funkčními skupinami, a to vzhledem k větší polaritě způsobené přítomností zbývající dvojné vazby na rozdíl od C18:2-2E, který má stejný počet oxiranový kyslíků a žádnou dvojnou vazbu. Další píky nebyly v chromatogramu pozorovány.

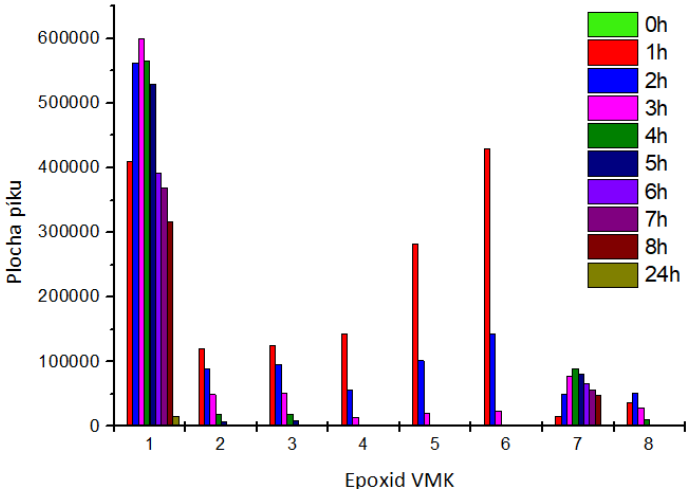
Na obrázku 36 se zastoupením ME v průběhu epoxidace ME_LN je obdobně jako v případě ME_SL pozorováno úplné zreagování nenasycených ME v prvních třech hodinách. Zastoupení nenasycených ME zůstává v průběhu epoxidace téměř stejné s malým poklesem (může docházet k hydrolýze). Proběhnutí reakce bylo potvrzeno IČ spektrometrií a poklesem hodnoty IV na 5,5 g I_2/100 g na konci reakce (pokles o 96,9 %).



Obrázek 36: Zastoupení píků jednotlivých ME_LN v průběhu epoxidace

Obrázek 37 zachycuje průběh vzniku produktů při epoxidaci ME_LN. Epoxidy 1, 2, 3 a 7 jsou stejné epoxidy identických VMK jako v případě ME_SL. Epoxidy 4, 5 a 6 jsou pravděpodobně monoepoxidy ME kyseliny linolenové s maximem v první hodině a jejich průběh se značně podobá monoepoxidům ME kyseliny linolové. U posledního pozorovaného epoxidu (epoxid 8) se přepokládá, že se jedná o diepoxid ME kyseliny linolenové. Epoxid ME kyseliny olejové (epoxid 1) sice dosahuje maxima ve třetí hodině, ale následně začne odreagovávat a po dvaceti čtyřech hodinách téměř vymizí. Podobný průběh nastal i u plně epoxidovaného ME kyseliny linolové, který dosahuje maxima ve čtvrté hodině a následně téměř celý zmizí. Pravděpodobně dochází pro oba epoxidy k hydrolýze oxiranového kruhu, což bylo potvrzeno téměř nulovou

hodnotou EE (0,04 mol/kg). Důvodem jsou následné reakce epoxidů na alkoholy (jak již naznačila IČ spektrometrie). Tyto alkoholy by měly být pozorovatelné na příslušných chromatogramech, avšak vysoká teplota varu nově vzniklých produktů pravděpodobně neumožnila jejich zplynění v nástřikovém prostoru a tím i nadávkování na kolonu. Nicméně jejich existenci potvrzuje i vysoká viskozita (452,9 mm^2/s) a výskyt složek s vysokým bodem varu ve výsledcích ze SimDis analýzy (kapitola 4.4).



Obrázek 37: Zastoupení epoxidů ME_LN v průběhu epoxidace

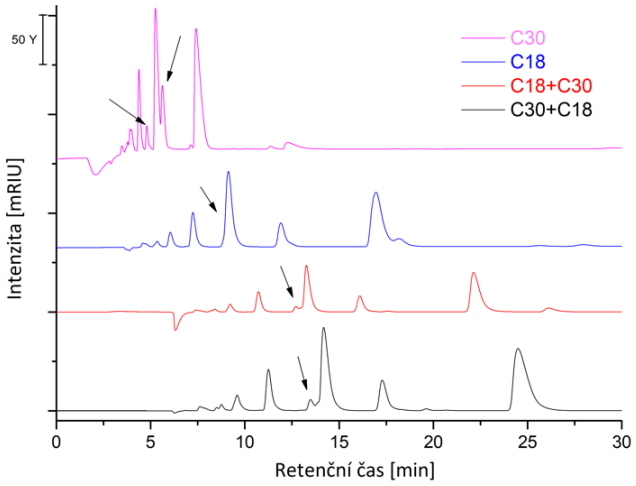
4.3. Kapalinová chromatografie

Vzhledem k náročnosti kvantitativní analýzy pomocí GC-MS a jeho pořizovací ceně byla pro tyto účely vybrána vysoko-účinná kapalinová chromatografie (HPLC) s refraktometrickým detektorem. Prvně bylo ale nutné optimalizovat metodu, zejména kvůli nedostatečné separaci epoxidu ME kyseliny olejové a ME kyseliny linolenové, které se při použití stávající metody vytvořené převážně pro separaci neepoxidovaných ME separovat nedaří [62].

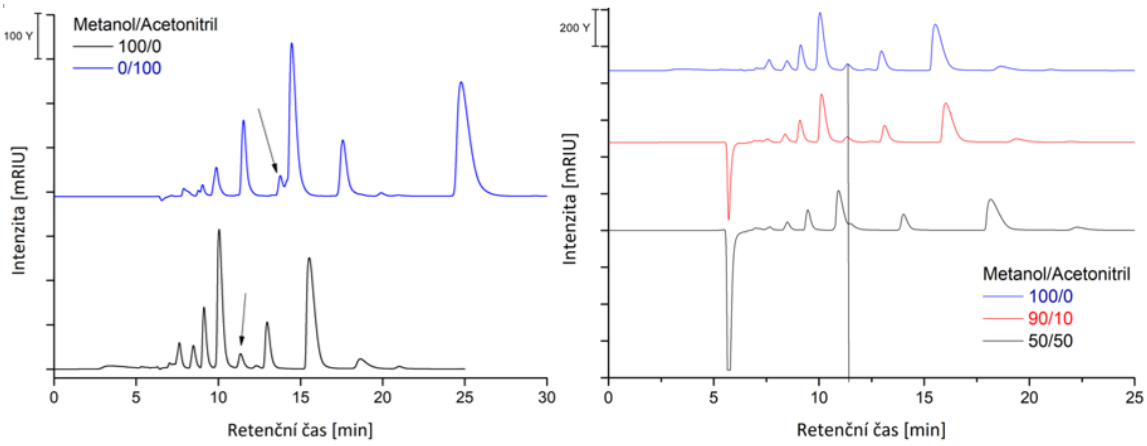
4.3.1. Optimalizace metody

Prvním parametrem k optimalizaci byly chromatografické kolony a jejich uspořádání. Byly vyzkoušeny dvě kolony: C18 s velikostí částic 7 µm a délkou 150 mm a C30 s velikostí částic 3 µm a délkou 250 mm. Při zkoušení kolon se částečně vycházelo z původní metody a jako mobilní fáze byl použit acetontril, nicméně až později se ukázalo, že vhodnější mobilní fází je metanol. Jak jde vidět na obrázku 38, tak při použití samostatné kolony C30 docházelo ke koeluci epoxidu ME kyseliny olejové a ME kyseliny linolové a v případě samostatné kolony C18 měl epoxid ME kyseliny olejové identický RT jako ME kyseliny linolenové. Pro

nedostatečnou separaci jednotlivých kolon bylo vyzkoušeno zapojení obou kolon v sérii. Při sériovém zapojení v uspořádání C18, C30 bylo dosaženo částečné separace epoxidu ME kyselin olejové od ME kyseliny linolenové, nicméně ještě lepší separaci vykazovalo sériové zapojení v opačném pořadí (C30, C18), které bylo zvoleno pro následující optimalizaci.



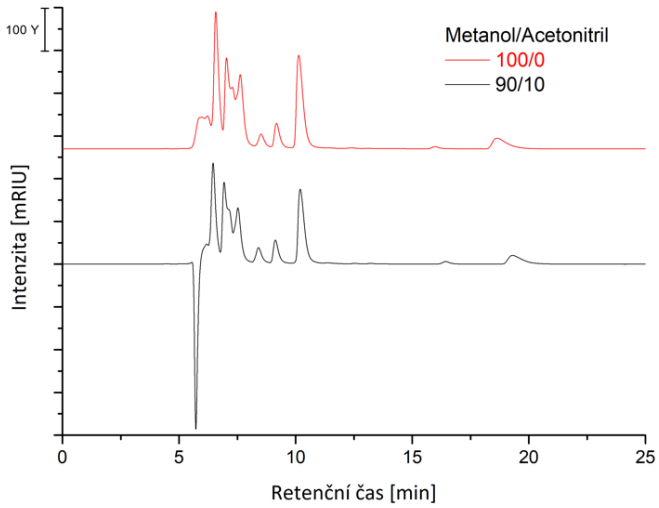
Obrázek 38: Optimalizace HPLC – různé zapojení chromatografických kolon



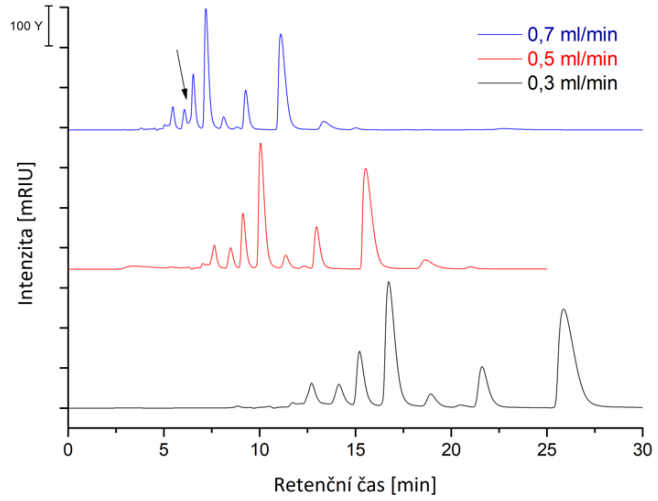
Obrázek 39: Optimalizace HPLC – porovnání metanolu, acetonitrilu a jejich směsí (epoxid ME řepky)

Druhým parametrem pro optimalizaci byla mobilní fáze. Na obrázku 39 vlevo je možné vidět rozdíl v separaci píku ME kyseliny linolenové (označen šipkou) od epoxidu ME kyseliny olejové při použití rozdílných mobilní fází. Při použití acetonitrilu docházelo k nežádoucí koeluci výše zmíněných látek, proto byl vyzkoušen metanol. Použitím metanolu se mírně změnila selektivita separace a bylo dosaženo uspokojivého rozdělení látek. Dále byly vyzkoušeny různé poměry metanolu s acetonitrilem (obrázek 39, vpravo). Při použití směsi s metanolem v poměru 90/10 a 50/50 (metanol/acetonitril, obj.%) bylo dosaženo mírného zlepšení separace epoxidů, avšak při použití směsi 50/50 obj.% došlo opět ke koeluci píků ME linolenové kyseliny a epoxidu ME kyseliny olejové. Pro mírné zlepšení by bylo možné použít

mobilní fázi ve složení 90/10 obj.% metanolu s acetonitrilem, ale i tak by nebyly epoxidy v případě epoxidace ME_LN uspokojivě separovány (obrázek 40), a proto byl pro jednoduchost a stabilnější tlak zvolen mobilní fází čistý metanol.



Obrázek 40: Optimalizace HPLC – porovnání různých poměru metanolu s acetonitrilem (epoxid ME_LN)

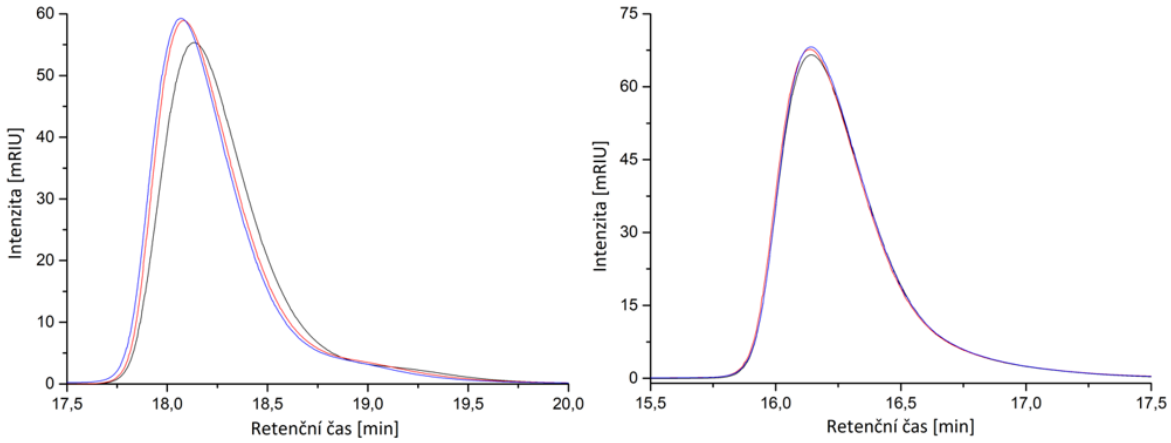


Obrázek 41: Optimalizace HPLC – vliv rychlosti průtoku mobilní fáze (metanol)

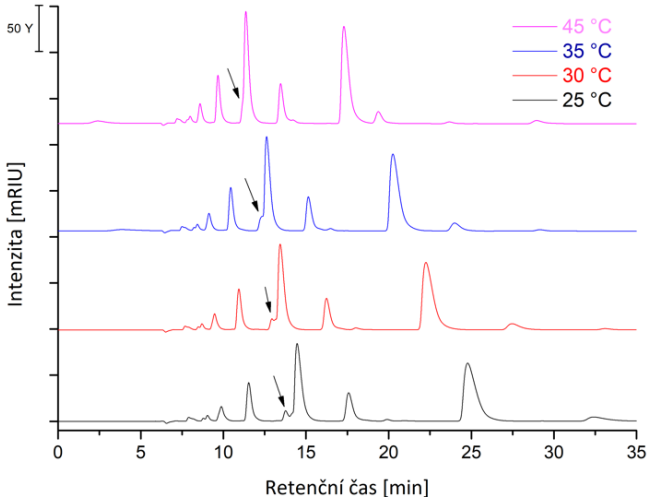
Dalším parametrem k optimalizaci byla rychlost průtoku mobilní fáze (obrázek 41). Použitím rychlosti 0,3 ml/min docházelo k většímu rozmývání píků a také by bylo nutné prodloužit délku metody, neboť 30 minut nestačilo pro eluci nasycených ME. Opakem je rychlost průtoku 0,7 ml/min, kde sice nedochází k rozmývání píků, ale dochází ke koeluci dvou epoxidů. Při rychlosti 0,5 ml/min nedocházelo ke koeluci a rozmývání píků nebylo tak význačné, proto byla zvolena tato rychlost průtoku mobilní fáze.

Při zkoušení reprodukovatelnosti měření bylo zjištěno, že bez použití termostatu kolon, tedy při aktuální laboratorní teplotě dochází k mírnému posunu RT v rámci následujících měření

stejného vzorku vlivem malých změn teploty v průběhu analýzy, jak lze vidět na obrázku 42 vlevo. Z tohoto důvodu byl vyzkoušen termostat na chromatografické kolony a jeho vliv na reprodukci měření. Jak je možné pozorovat na obrázku 42 vpravo, tak použitím termostatu (27 °C) opravdu nedocházelo k posunům RT a došlo ke zlepšení reprodukovatelnosti měření.



Obrázek 42: Optimalizace HPLC – reprodukovatelnost měření: vlevo – laboratorní teplota, vpravo – použiti termostatu



Obrázek 43: Optimalizace HPLC – vliv teploty termostatu kolon (acetonitril)

Posledním optimalizovaným faktorem byl vliv teploty termostatu na separaci (obrázek 43), který byl testován ještě předtím, než bylo zjištěno, že lepší mobilní fází je metanol. Z tohoto důvodu byl při testování mobilní fází acetonitril. Jak je možné pozorovat, tak při zvyšující se teplotě docházelo k větší koeluci píku ME kyseliny linolenové a epoxidu ME kyseliny olejové (šipka v grafu), proto byla zvolena nejnižší udržitelná teplota, kterou bylo 27 °C. Při 25 °C docházelo k mírnému kolísání teploty vlivem vyšší teploty laboratoře. Pro zopakování experimentu s metanolem nebyl dostatek časového prostoru, nicméně se předpokládá, že by vliv teploty byl velmi podobný jako s acetonitrilem.

Výsledná metoda používá v sérii zapojené obě kolony: první kolona C30 a druhá C18. Mobilní fází je čistý metanol o rychlosti průtoku 0,5 ml/min a teplota termostatu kolon byla nastavena 27 °C. Metoda trvala 25 minut. Tato metoda je dostačující pro separaci neepoxidovaných ME od epoxidovaných a byla použita pro zjištění konverze ME na jejich epoxidy. Avšak nestačí na separaci jednotlivých epoxidovaných ME, zde by bylo nejspíše nutné vyvinout novou gradientovou metodu.

4.3.2. Analýza vzorků

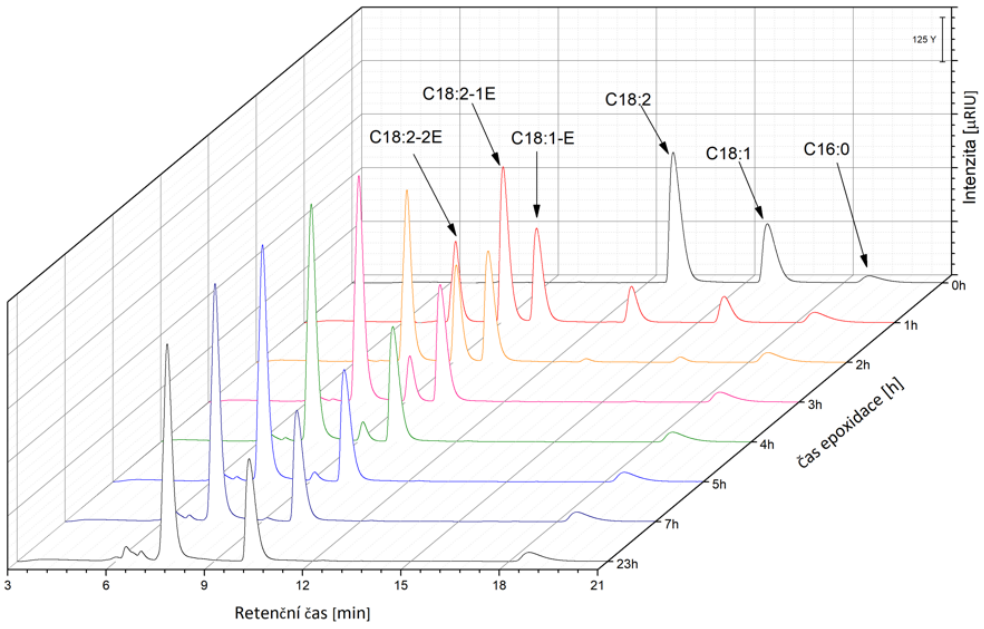
Po optimalizaci metody bylo nutné pro vyhodnocení konverze ME na epoxidy provést kalibraci. Ta byla provedena pro ME řepkového, slunečnicového a lněného oleje z důvodu odlišného zastoupení VMK u jednotlivých ME. Po proměření kalibračních řad složených z 0,1; 0,2; 0,6; 1; 3; 6 a 9 hm.% roztoků čistých ME byly integrovány plochy nenasycených ME, které byly vyneseny proti přesným koncentracím jednotlivých bodů. Pro zjištění přesných koncentrací byly ME analyzovány na GC s plamenově ionizačním detektorem a obsah ME byl následující: 99,27 hm.% pro ME řepkového oleje, 99,66 hm.% pro ME slunečnicového oleje a 99,84 hm.% pro ME lněného oleje. Z vynesených závislostí byly získány kalibrační závislosti (tabulka 6) pro výpočet konverzí nenasycených ME na epoxidy.

Tabulka 6: Kalibrační závislosti pro jednotlivé ME (y-suma ploch píků, x - hm.% ME ve vzorku)

	Kalibrační závilost	R^2
ME řepkového oleje	y = 2219,1x + 6,2343	0,99999
ME slunečnicového oleje	y = 2273,7x + 3,6215	0,99999
ME lněného oleje	y = 2392,4x - 30,2958	0,99991

Následně byly analyzovány odebrané vzorky z průběhu epoxidace ME_SL a ME_LN. V chromatogramech z HPLC nejsou pozorovány například jednotlivé monoepoxidy ME kyseliny linolové, oba jsou totiž zahrnuty do jednoho píku. Příčinou je refraktometrický detektor, který ve srovnání s hmotnostním detektorem používaným u GC není tak citlivý. Roli hraje i malý rozdíl v polaritách různě epoxidovaných ME kyseliny linolové a linolenové, jenž není dostatečně velký pro dobrou separaci za stávajících experimentálních podmínek. Naopak velkou výhodou HPLC je poměrně snadné kvantitativní stanovení látek, kterého bylo využito pro stanovení konverzí nenasycených ME na epoxidy.

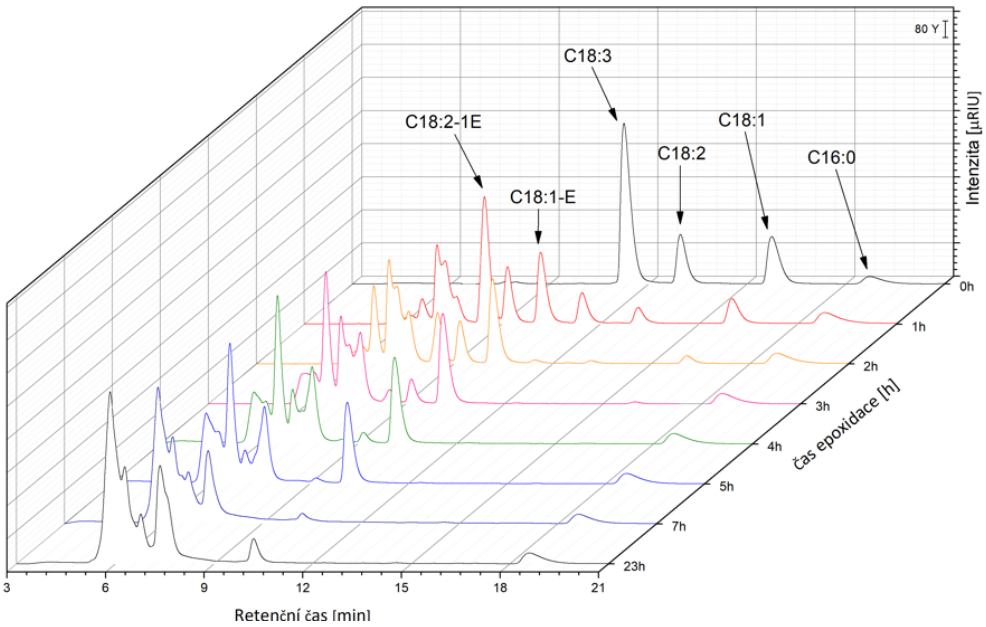
Na obrázku 44 je možné pozorovat průběh epoxidace ME_SL, bohužel zde chybí šestá a osmá hodina reakce, protože byly veškeré vzorky použity k ostatním analýzám, nicméně je možné vidět, že by se v těchto hodinách neměly odehrávat žádné zásadní změny. V průběhu reakce dochází během tří hodin ke zreagování nenasycených ME kyseliny olejové (RT 15,8 minut) a kyseliny linolové (RT 13 minut). Nenasycený ME kyseliny palmitové (RT 18,8 minut) se reakce neúčastní a jeho obsah zůstává stejný. Před ME eluují jejich epoxidy, které nemohly být určeny přímo a jejich identifikace je založena na výsledcích analýzy vzorků na GC-MS (kapitola 4.2), kde se podařilo identifikovat jednotlivé epoxidy vznikající z ME kyseliny linolové. Epoxid ME kyseliny olejové eluuje v čase 10,1 minut a svého maxima dosáhne ve třetí hodině reakce, poté již k jeho změnám nedochází. Monoepoxidy ME kyseliny linolové eluují oba v čase 9,1 minut s maximálním zastoupením v první hodině, poté dochází k postupnému a úplnému zreagování na plně epoxidovaný ME s RT 7,6 minut. Výsledky se dobře shodují s výsledky z GC-MS s tím rozdílem, že zde nebyl pozorován nasycený ME kyseliny stearové. Důvodem bude pravděpodobně nedostatečná doba trvání metody. Ta bude pro budoucí analýzy upravena.



Obrázek 44: Chromatogramy (HPLC) průběhu epoxidace ME_SL

Obrázek 45 znázorňuje chromatogramy průběhu epoxidace ME_LN a rovněž zde chybí data ze šesté a osmé hodiny. Během prvních tří hodin jsou plně přeměněny nenasycené ME kyselin olejové (RT 15,8), linolové (RT 13 minut) a linolenové (RT 11,5 minut) na epoxidy. Zastoupení nasyceného ME kyseliny palmitové zůstává konstantní. I v případě ME_LN lze pozorovat pík epoxidovaného ME kyseliny olejové v čase 10,1 minut a pík monoepoxidů ME kyseliny linolové v čase 9,1 minut. Pík v čase 8,5 minut by mohl patřit monoepoxidům ME kyseliny

linolenové, důvodem je jak RT odpovídající očekáváné polaritě, tak velmi podobný průběh vzniku a zániku jako v případě monoepoxidů ME linolové kyseliny (obojí jsou meziprodukty). Ve zbytku chromatogramu (5,7 až 8,1 minut) dochází k silné koeluci dále vznikajících epoxidů z monoepoxidovaných ME kyseliny linolové a linolenové. Přibližně od páté hodiny by se v oblasti 5,7 až 8,1 minut měly začít objevovat vedlejší produkty vznikající z epoxidů, naznačuje to EE o hodnotě 0,04 mol/kg na konci reakce (téměř žádné epoxidy ve vzorku). Vznik vedlejších produktů je dále potvrzen IČ, vysokou kinematickou viskozitou a zmizením píků všech pozorovaných epoxidů v chromatogramech z GC-MS.



Obrázek 45: Chromatogramy (HPLC) průběhu epoxidace ME_LN

Z naměřených chromatogramů byly dále odečteny plochy nenasycených ME pro výpočet jejich konverze na epoxidy pomocí získaných kalibračních závislostí. Bylo by vhodné podotknout, že se jedná pouze o konverzi nenasycených ME neobsahující oxiranovou skupinu a nelze z ní získat informace o celkovém průběhu epoxidace. Jak je možné vidět v tabulce 7, tak v případě epoxidace ME_SL byla dosažena konverze větší než 99,8 % až ve čtvrté hodině a při epoxidaci ME_LN bylo dosaženo této konverze již v hodině třetí.

Tabulka 7: Průběh konverze nenasycených ME v čase

Čas epoxidace [h]	Konverze nenasycených methylesterů [%]	
	Lněný olej	Slunečnicový olej
1	84,75	82,44
2	97,32	82,30
3	>99,8	98,23
4	>99,8	>99,8
5	>99,8	>99,8
7	>99,8	>99,8
24	>99,8	>99,8

4.4. Titrační a další analytické metody

Pro vzorky ME slunečnicového a lněného oleje bylo před a po epoxidaci stanoveno jodové číslo (IV) pro zjištění skutečného počtu dvojných vazeb (tabulka 8). Úspěšnost epoxidace ME slunečnicového oleje byla potvrzena poklesem IV ze 109,8 na 0,4 g I_2/100 g a vzrůstem kinematické viskozity z 4,3 na 13,9 mm^2/s. Pro zjištění obsahu epoxidů byl stanoven epoxidový ekvivalent (EE) vyjadřující počet molů oxiranových funkčních skupin ve vzorku. Vysoký EE (3,99 mol/kg) epoxidovaného ME_SL potvrzuje přítomnost získaných epoxidů i na konci reakce. I z předchozích analýz (IČ, HPLC a GC-MS) je zřejmé, že u ME_SL epoxidace proběhla a získané epoxidy nepodlehly vedlejším reakcím. V případě epoxidace ME lněného oleje pokleslo IV ze 181 na 5,5 g I_2/100 g, což by potvrzovalo úspěšnou epoxidaci. Ovšem vysoká kinematická viskozita 452,9 mm^2/s a již zmíněné analytické metody naznačují, že vzniklé epoxidy byly přeměněny na vedlejší produkty. EE o hodnotě 0,05 mol/kg potvrdil, že se ve vzorku epoxidovaného ME_LN na konci reakce opravdu nenacházejí téměř žádné epoxidy.

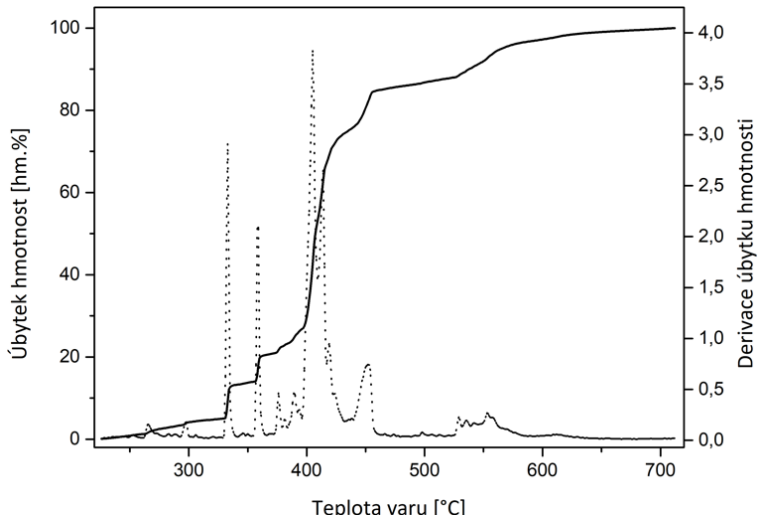
Tabulka 8: Jódové číslo, epoxidový ekvivalent, kinematická viskozita a indukční perioda

Vzorek	IV [g I_2/100 g]	EE [mol/kg]	Kinematická viskozita [mm^2/s]	Indukční perioda [h]
ME_LN	181,8	-	4,2	-
Epoxid ME_LN_24 h	5,5	0,04	452,91	0,21
ME_SL	109,8	-	4,3	3,45
Epoxid ME_SL_24 h	0,4	3,99	13,95	16,66

U obou vzorků byla ve spolupráci se společností Paramo a.s. stanovena i oxidační stabilita ve formě indukční periody (tabulka 8). Indukční perioda u ME_SL vzrostla epoxidací z 3,45 na 16,66 hodin, čímž se potvrzuje, že epoxidací dochází ke zlepšení oxidační stability. Naopak

velmi krátká indukční perioda u epoxidovaného ME_LN (0,21 hodin) potvrzuje, že z epoxidů vznikly další produkty (alkoholy), které se v přítomnosti kyslíku rychle oxidují na těkavé látky.

Poslední provedenou analýzou byla simultánní destilace (SimDis), která byla provedena ve spolupráci s výzkumnou institucí Orlen UniCre. Analyzován byl pouze epoxidovaný vzorek ME_LN po dvaceti čtyřech hodinách pro potvrzení vzniku vedlejších produktů (obrázek 46). Při teplotách 332 a 359 °C se destilují nasycené ME kyseliny palmitové a stearové (v uvedeném pořadí). Vzniklé epoxidy mají vyšší body varu 375 a 389 °C a tvoří velmi malý podíl. Vznik dalších produktů s vyšším bodem varu, velmi pravděpodobně alkoholů (jejich vodíkové vazby ovlivňují bod varu), byl potvrzen píky při teplotách 405, 415, 419, 451 a 530-555 °C. Takto vysoké body varu vysvětlují, proč se vzniklé vedlejší produkty nenadávkují na kolonu při analýze na GC-MS.



Obrázek 46: Záznam SimDis epoxidovaného ME_LN po 24 hodinách

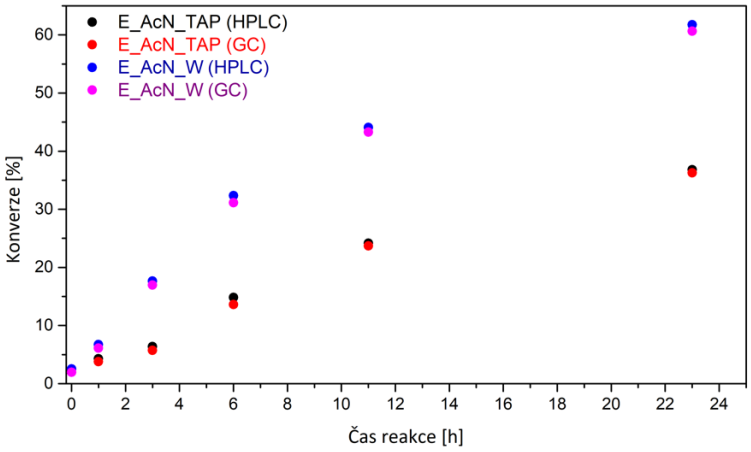
4.5. Stáž

Pro otestování vlivu spolurozpouštědla na epoxidaci ME řepkového oleje katalyzovanou heterogenním katalyzátorem byly vyzkoušeny tři rozpouštědla: acetonitril, ethylacetát a terc-butyl alkohol. Rovněž byly se všemi rozpouštědly otestovány dva heterogenní katalyzátory, a to wolfram nanesený na alumině (W/Al_2O_3) a titano-alumino-fosfát (TAP), celkem tedy bylo provedeno šest reakcí. Pro stanovení vlivu katalyzátoru a spolurozpouštědla na výtěžek epoxidů byly v průběhu reakce odebrány vzorky, které byly následně pro stanovení konverze ME (všech, včetně nasycených) na epoxidy analyzovány pomocí plynového chromatografu s plamenově ionizačním detektorem (GC-FID). Pro ověření funkčnosti

optimalizované metody byly vzorky analyzovány i na HPLC s refraktometrickým detektorem (kapitola 4.3), kde byla pouze upravena kalibrace pro zahrnutí i nasycených ME.

Ve výsledcích ze stáže v Orlen UniCre budou reakce označovány podle použitého spolurozpouštědla a katalyzátoru, např.: epoxidace ME řepkového oleje s acetonitrilem a jako katalyzátor byl použit wolfram nanesený na alumině – E_AcN_W. Terc-butylalkohol bude TBA, ethylacetát EA a katalyzátor titano-alumino-fosfát bude TAP.

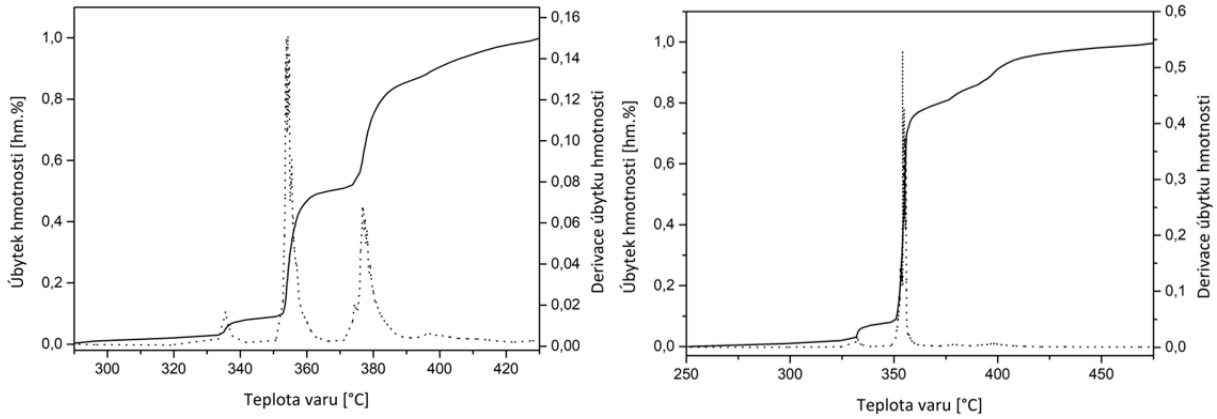
Na obrázku 47 je znázorněn průběh konverze ME řepkového oleje pro obě reakce s acetonitrilem. Jak lze vidět, tak byly získány podobné konverze z analýzy na GC i HPLC, malý rozdíl bude zřejmě způsoben nezahrnutím nasyceného ME kyseliny stearové do kalibrace HPLC, což by mohlo zapříčinit mírně vyšší konverzi, proto budou dále použity výsledky z GC. Reakce E_AcN_W měla po dvaceti třech hodinách konverzi ME 60,6 %, zatímco reakce se stejným rozpouštědlem a TAP pouze 36,3 %. Ve třetí hodině reakce s TAP je pozorováno malé odchýlení od jinak konstantního nárůstu, příčinou je selhání termostatu a jeho nutná výměna, jež zapříčinila patnácti minutovou prodlevu, kdy reakce nebyla zahřívána ani míchána.



Obrázek 47: Graf závislosti konverze methylesterů na čase E_AcN_W a E_AcN_TAP

U zbylých reakcí byly vzhledem k nízkým konverzím analyzovány pouze konečné produkty epoxidace. Reakce E_EA_W měla konverzi 9,12 % a reakce E_EA_TAP 1,21 %. Pro terc-butylalkohol to bylo s katalyzátorem W/Al_2O_3 32,5 % a s katalyzátorem TAP 5,8 %. Nejvhodnějším spolurozpouštědlem, vzhledem ke konverzi, byl acetonitril, který vykázal nejvyšší konverzi u obou katalyzátorů. V případě katalyzátorů měl W/Al_2O_3 ve všech třech reakcích lepší konverzi než TAP.

U konečných produktů byla stanovena teplotní stabilita pomocí SimDis a pro porovnání byly vybrány dva záznamy reprezentující reakci s vyšší (E_AcN_W) a nízkou (E_TBA_TAP) konverzí. Na obrázku 48 vlevo je záznam SimDis analýzy konečného produktu reakce E_AcN_W, kde je možné pozorovat pík nasyceného ME kyseliny palmitové při teplotě 335 °C a zbytek nezreagovaných ME (nasycených i nenasycených) při teplotě 354 °C. Vzniklé epoxidy se vyskytují okolo teploty 377 °C. Záznam analýzy produktu reakce E_TBA_TAP je na obrázku 48 vpravo, a jak naznačuje významný pík nenasyceného ME při teplotě 354 °C, tak epoxidace téměř neproběhla. Malému procentu epoxidů patří náznak píku v oblasti 377 °C. Nasycený ME kyseliny palmitové má pík při teplotě 333 °C.



Obrázek 48: Záznam SimDis vzorků E_AcN_W (vlevo) a E_TBA_TPA (vpravo)

5. Závěr

Práce se zabývá možnostmi analýzy (mezi)produktů vzniklých epoxidací methylesterů vyšších mastných kyselin. V teoretické části byly popsány charakteristické vlastnosti rostlinných olejů a jejich esterů a vliv parametrů jako obsah dvojných vazeb na tyto vlastnosti. Následně byla popsána příprava methylesterů vyšších mastných kyselin, a zejména jejich epoxidace. Největší část byla věnována popisu vybraných analytických metod pro analýzu produktů epoxidace (IČ, GC, HPLC, MS). Popsáno bylo i stanovení IV a EE a přístup k analýze produktů epoxidace vyšších mastných kyselin a jejich methylesterů ve vybraných publikacích.

V experimentální části byly připraveny epoxidy methylesterů ze slunečnicového a lněného oleje, přičemž byly v průběhu reakce odebrány vzorky ve stanovených intervalech, které byly analyzovány pomocí IČ, GC-MS a HPLC-RI. Dále bylo u výchozích a konečných produktů stanoveno IV, oxidační stabilita a kinematická viskozita. Pouze u konečných produktů byl stanoven EE a v případě methylesterů lněného oleje byla provedena i SimDis analýza.

Pro identifikaci a pozorování změn funkčních skupin v průběhu epoxidace byla použitá IČ, která potvrdila, že u obou olejů dochází k úspěšné přeměně dvojných vazeb na epoxidy. Vzniklé epoxidy z methylesterů slunečnicového oleje jsou stabilní a ve spektrech se neobjevují pásy dalších produktů. V případě epoxidace methylesterů lněného oleje dochází k dalším reakcím epoxidů na alkoholy a pravděpodobně i hydrolýze esterové funkční skupiny.

Pro kvalitativní analýzu směsí epoxidů v průběhu reakce byla zvolena GC-MS. U epoxidace methylesterů slunečnicového oleje byly na základě shody hmotnostních spekter identifikovány meziprodukty epoxidace methylesteru kyseliny linolové a nepřímo byl určen i její diepoxid. Píky odpovídající produktům epoxidace methylesterů slunečnicového oleje nepodléhaly dalším reakcím. U epoxidace methylesterů lněného oleje byly identifikovány rovněž všechny produkty epoxidace methylesteru kyseliny linolové. Píky odpovídající produktům methylesteru kyseliny linolenové byly nepřímo přiřazeny jejím monoepoxidům a diepoxidu. Na konci epoxidace methylesterů lněného oleje nebyly v chromatogramu pozorovány téměř žádné epoxidy.

Pro kvantitativní analýzu byly vzorky analyzovány na HPLC-RI, kde byla nejprve optimalizována metoda, zejména: (i) volba chromatografických kolon a jejich uspořádání, (ii) volba mobilní fáze, (iii) rychlost průtoku mobilní fáze a (iv) vliv teploty termostatu kolon

na reprodukovatelnost měření a separaci. Pro optimalizovanou metodu byla provedena kalibrace pro výpočet konverze nenasycených methylesterů na epoxidy. V případě methylesterů slunečnicového oleje byla konverze vyšší než 99,8 % až ve čtvrté hodině a v chromatogramech byly identifikovány epoxidy methylesteru kyseliny olejové a linolové, přičemž monoepoxidy kyseliny linolové byly zahrnuty do jednoho píku. Konverze u methylesterů lněného oleje dosáhla 99,8 % již ve třetí hodině a v chromatogramech byl identifikován pouze epoxid methylesteru kyseliny olejové a monoepoxidy methylesteru kyseliny linolové. Další epoxidy vzhledem k silné koeluci identifikovány nebyly a píky pozorovány na konci reakce nejspíše patřily produktům dalších reakcí epoxidů.

Vznik epoxidů z methylesterů slunečnicového oleje a jejich stabilitu potvrdil pokles IV o 99,6 %, zvýšení oxidační stability z 3,45 na 16,66 hodin, vysoký EE (3,99 mol/kg) a relativně mírně zvýšená kinematická viskozita (13,9 mm^2/s) na konci reakce. Vznik epoxidů z methylesterů lněného oleje potvrdil pokles IV o 96,9 % a jejich zreagování na další produkty (alkoholy) potvrdila nízká oxidační stabilita (0,21 h), téměř nulový EE, vysoká kinematická viskozita (452,9 mm^2/s) a výskyt vysokovroucích složek na záznamu ze SimDis analýzy.

V rámci stáže v Orlen UniCre bylo provedeno šest epoxidačních reakcí s heterogenními katalyzátory a spolurozpouštědly. Produkty byly analyzovány pomocí GC-FID a HPLC-RI pro zjištění konverze všech methylesterů na epoxidy. Nejvhodnějším spolurozpouštědlem (vzhledem ke konverzi) byl acetonitril, který měl nejvyšší konverzi u obou katalyzátorů (60,6 % pro wolfram nanesený na alumině a 36,3 % pro titano-alumino-fosfát). V případě volby katalyzátoru vykázal ve všech třech reakcích nejvyšší konverze wolfram nanesený na alumině (60,6 % s acetonitrilem, 32,5 % s terc-butylalkoholem a 9,12 % s ethylacetátem). Nakonec byly produkty analyzovány pomocí SimDis, přičemž se výsledky ze SimDis shodují s výsledky ze separačních technik (HPLC a GC).

Výzkum v oblasti analýzy produktů epoxidace methylesterů rostlinných olejů bude na katedře fyzikální chemie (Univerzita Pardubice) dále probíhat, přičemž bude výzkum zaměřen i na využití epoxidů pro přípravu dalších produktů.

6. Seznam literárních zdrojů

1. Atabani, A.E., et al., *A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics.* Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2012. **16**(4): p. 2070-2093.
2. Gamage, P., M. O'Brien, and L. Karunanayake, *Epoxidation of some vegetable oils and their hydrolysed products with peroxyformic acid - Optimised to industrial scale.* Journal of The National Science Foundation of Sri Lanka, 2009. **37**.
3. Siram, K., et al., *Chapter 4 - Pharmaceutical nanotechnology: Brief perspective on lipid drug delivery and its current scenario*, in *Biomedical Applications of Nanoparticles*, A.M. Grumezescu, Editor. 2019, William Andrew Publishing. p. 91-115.
4. Folayan, A.J., et al., *Experimental investigation of the effect of fatty acids configuration, chain length, branching and degree of unsaturation on biodiesel fuel properties obtained from lauric oils, high-oleic and high-linoleic vegetable oil biomass.* Energy Reports, 2019. **5**: p. 793-806.
5. Atabani, A.E., et al., *Non-edible vegetable oils: A critical evaluation of oil extraction, fatty acid compositions, biodiesel production, characteristics, engine performance and emissions production.* Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2013. **18**: p. 211-245.
6. Noor Armylisas, A.H., et al., *Modification of olefinic double bonds of unsaturated fatty acids and other vegetable oil derivatives via epoxidation: A review.* Grasas y Aceites, 2017. **68**(1): p. e174.
7. Oyekola, O., A. Rabiu, and S. Elias, *Oleochemicals from palm oil for the petroleum industry*. 2018. p. 91-116.
8. Moser, B.R., *Biodiesel production, properties, and feedstocks.* In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 2009. **45**(3): p. 229-266.
9. Singh, S.P. and D. Singh, *Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review.* Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2010. **14**(1): p. 200-216.
10. Harrington, K.J., *Chemical and physical properties of vegetable oil esters and their effect on diesel fuel performance.* Biomass, 1986. **9**(1): p. 1-17.
11. Knothe, G. and K.R. Steidley, *Kinematic viscosity of biodiesel fuel components and related compounds. Influence of compound structure and comparison to petrodiesel fuel components.* Fuel, 2005. **84**(9): p. 1059-1065.
12. Giakoumis, E.G., *Analysis of 22 vegetable oils' physico-chemical properties and fatty acid composition on a statistical basis, and correlation with the degree of unsaturation.* Renewable Energy, 2018. **126**: p. 403-419.
13. Knothe, G., *Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters.* Fuel Processing Technology, 2005. **86**(10): p. 1059-1070.
14. Fernandes, F.C., et al., *Epoxy resin blends and composites from waste vegetable oil.* European Polymer Journal, 2017. **89**: p. 449-460.
15. Sarin, R., et al., *Jatropha–Palm biodiesel blends: An optimum mix for Asia.* Fuel, 2007. **86**(10): p. 1365-1371.
16. Jain, S. and M.P. Sharma, *Prospects of biodiesel from Jatropha in India: A review.* Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2010. **14**(2): p. 763-771.
17. Imahara, H., et al., *Thermal stability of biodiesel in supercritical methanol.* Fuel, 2008. **87**(1): p. 1-6.
18. Srivastava, A. and R. Prasad, *Triglycerides-based diesel fuels.* Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2000. **4**(2): p. 111-133.
19. Fukuda, H., A. Kondo, and H. Noda, *Biodiesel fuel production by transesterification of oils.* J Biosci Bioeng, 2001. **92**(5): p. 405-16.

20. Sharma, Y.C., B. Singh, and S.N. Upadhyay, *Advancements in development and characterization of biodiesel: A review.* Fuel, 2008. **87**(12): p. 2355-2373.
21. Granados, M.L., et al., *Biodiesel from sunflower oil by using activated calcium oxide.* Applied Catalysis B: Environmental, 2007. **73**(3): p. 317-326.
22. Dossin, T.F., et al., *Simulation of heterogeneously MgO-catalyzed transesterification for fine-chemical and biodiesel industrial production.* Applied Catalysis B: Environmental, 2006. **67**(1): p. 136-148.
23. Turco, R., et al., *Epoxidation of Linseed Oil by Performic Acid Produced In Situ.* Industrial & Engineering Chemistry Research, 2021. **60**(46): p. 16607-16618.
24. Gamage, P., M. O'Brien, and L. Karunanayake, *Epoxidation of some vegetable oils and their hydrolysed products with peroxyformic acid - Optimised to industrial scale.* Journal of The National Science Foundation of Sri Lanka - J NATL SCI FOUND SRI LANKA, 2009. **37**.
25. Tan, S.G., *Biobased Epoxidized Vegetable Oils and Its Greener Epoxy Blends: A Review.* Polymer-Plastics Technology and Engineering, 2010. **49**(15): p. 1581-1590.
26. Abbasov, V., et al., *EPOXIDATED VEGETABLE OILS: PREPARATION, PROPERTIES AND APPLICATION.* 2018: p. 427-449.
27. Tao, Y., et al., *WO3–SiO2 nanomaterials synthesized using a novel template-free method in supercritical CO2 as heterogeneous catalysts for epoxidation with H2O2.* Materials Today Chemistry, 2020. **18**: p. 100373.
28. Hammond, C., et al., *Nanoparticulate Tungsten Oxide for Catalytic Epoxidations.* ACS Catalysis, 2013. **3**(3): p. 321-327.
29. Bisio, C., et al., *Tungstenocene-grafted silica catalysts for the selective epoxidation of alkenes.* Applied Catalysis A: General, 2019. **581**: p. 133-142.
30. Lin, K., et al., *Direct room-temperature synthesis of methyl-functionalized Ti-MCM-41 nanoparticles and their catalytic performance in epoxidation.* Journal of Catalysis, 2009. **263**(1): p. 75-82.
31. A. Camblor, M., et al., *Epoxidation of unsaturated fatty esters over large-pore Ti-containing molecular sieves as catalysts: important role of the hydrophobic–hydrophilic properties of the molecular sieve.* Chemical Communications, 1997(8): p. 795-796.
32. Chua, S.-C., X. Xu, and Z. Guo, *Emerging sustainable technology for epoxidation directed toward plant oil-based plasticizers.* Process Biochemistry, 2012. **47**(10): p. 1439-1451.
33. Saurabh, T. *EPOXIDATION OF VEGETABLE OILS : A REVIEW*. 2011.
34. Stuart, B.H., *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. 2004: Wiley.
35. Skoog, D.A., F.J. Holler, and S.R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*. 2017: Cengage Learning.
36. Holčapek, M., *Molekulová spektrometrie.* FCHT, Pardubice, 2021.
37. Ismail, B. and S. Nielsen, *Basic Principles of Chromatography*. 2010. p. 473-498.
38. Evers, R., *Development of a Liquid Chromatography Ion Trap Mass Spectrometer Method for Clinical Drugs of Abuse Testing with Automated On-Line Extraction Using Turbulent Flow Chromatography*. 2014.
39. Churáček, J., *Analytická separace látek*. 1990: SNTL.
40. Tranchida, P.Q. and L. Mondello, *Chapter 6 - Detectors and basic data analysis*, in *Separation Science and Technology*. 2020, Academic Press. p. 205-227.
41. Houck, M.M. and J.A. Siegel, *Chapter 6 - Separation Methods*, in *Fundamentals of Forensic Science (Second Edition)*, M.M. Houck and J.A. Siegel, Editors. 2010, Academic Press: San Diego. p. 123-153.
42. Meyer, V.R., *Practical high-performance liquid chromatography*. 2013: John Wiley.
43. Fornstedt, T., P. Forssén, and D. Westerlund, *Basic HPLC Theory and Definitions*. 2015.

44. Flanagan, R.J., *W. J. Lough and I. W. Wainer (Eds.). High performance liquid chromatography-fundamental principles and practice London: Blaclue Academic and Professional, 1995, Softback, 276 pp., £22.50. ISBN 0751400769.* Biomedical Chromatography, 1996. **10**(4): p. 191-191.
45. Dorsey, J.G., et al., *Liquid Chromatography: Theory and Methodology.* Analytical Chemistry, 1996. **68**(12): p. 515-568.
46. Swadesh, J.K., *HPLC: practical and industrial applications*. 2000: CRC press.
47. Swartz, M., *HPLC DETECTORS: A BRIEF REVIEW.* Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2010. **33**(9-12): p. 1130-1150.
48. Al-Sanea, M.M. and M. Gamal, *Critical analytical review: Rare and recent applications of refractive index detector in HPLC chromatographic drug analysis.* Microchemical Journal, 2022. **178**: p. 107339.
49. Hübschmann, H.J., *Handbook of GC-MS: Fundamentals and Applications*. 2015: Wiley.
50. Gross, J.H., *Mass Spectrometry: A Textbook*. 2006: Springer Berlin Heidelberg.
51. Yildiz, Y., M. Alfeen, and B. Yildiz, *Determination of Iodine Value in Triisocetyl Citrate (Citmol-316) by United Satates Pharmacopeia Hanus Method.* 2019: p. 38-41.
52. Kruatian, T. and K. Jitmanee, *Greener Analytical Method for Determination of Iodine Number of Edible Oils.* Journal of Food Research, 2020. **9**: p. 36.
53. Dijkstra, A.J., *Vegetable Oils: Composition and Analysis*, in *Encyclopedia of Food and Health*, B. Caballero, P.M. Finglas, and F. Toldrá, Editors. 2016, Academic Press: Oxford. p. 357-364.
54. Swern, D., et al., *Determination of Oxirane Oxygen.* Analytical Chemistry, 1947. **19**(6): p. 414-415.
55. Soukupová, N., *Studium vlivu různých kompozitních systémů vyrobených ruční laminací na mechanické vlastnosti.* Diplomová práce, FCHT, Pardubice, 2019.
56. Piazza, G.J., A. Nuñez, and T.A. Foglia, *Epoxidation of fatty acids, fatty methyl esters, and alkenes by immobilized oat seed peroxygenase.* Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2003. **21**(3): p. 143-151.
57. Borugadda, V.B. and V.V. Goud, *Epoxidation of Castor Oil Fatty Acid Methyl Esters (COFAME) as a Lubricant base Stock Using Heterogeneous Ion-exchange Resin (IR-120) as a Catalyst.* Energy Procedia, 2014. **54**: p. 75-84.
58. Orellana-Coca, C., et al., *Analysis of fatty acid epoxidation by high performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection and mass spectrometry.* Chem Phys Lipids, 2005. **135**(2): p. 189-99.
59. Mungroo, R., et al., *Epoxidation of Canola Oil with Hydrogen Peroxide Catalyzed by Acidic Ion Exchange Resin.* Journal of the American Oil Chemists' Society, 2008. **85**(9): p. 887-896.
60. Kwiecien, J., M. Hájek, and F. Skopal, *The effect of the acidity of rapeseed oil on its transesterification.* Bioresource Technology, 2009. **100**(23): p. 5555-5559.
61. Musil, M., et al., *Improved method of water removal from vegetable oil.* Chemical Papers, 2019. **73**(3): p. 767-769.
62. Straková, A., *Epoxidace olejů a produktů vzniklých z olejů – vyšších mastných kyselin a jejich esterů.* Diplomová práce, FCHT, Pardubice, 2021.
63. Rajamohan, S., et al., *Evaluation of oxidation stability and engine behaviors operated by Prosopis juliflora biodiesel/diesel fuel blends with presence of synthetic antioxidant.* Sustainable Energy Technologies and Assessments, 2022. **52**: p. 102086.
64. Jandera, P., *Atomová a molekulová spektroskopie se zaměřením na stopovou analýzu kontaminantů - díl B.* FCHT, Pardubice, 2011.
65. Christie, W.W., *Epoxy, Furanoid and Alkoxy Fatty Acids.* The LipidWeb, 2021.