

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení mastných kyselin v papírových obalech
Diplomová práce

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

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika Vališová**
Osobní číslo: **C20532**
Studijní program: **N0531A130028 Analytická chemie**
Téma práce: **Stanovení mastných kyselin v papírových obalech**
Téma práce anglicky: **Determination of fatty acids in paper packaging**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Provedte literární rešerši zaměřenou na mastné kyseliny používané jako lubrikanty při výrobě papírových obalů.
2. V experimentální části vyvíňte a zvalidujte metodu pro izolaci a stanovení kyseliny stearové a kyseliny palmitové ve vzorcích papírových obalů.
3. Dosažené výsledky zhodnotte.

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

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Tomáš Bajer, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **doc. Ing. Petra Bajerová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2022**
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

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

L.S.

prof. Ing. Karel Ventura, CSc. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 21. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem **Stanovení mastných kyselin v papírových obalech** jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na 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 6. 5. 2022

Bc. Veronika Vališová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce za cenné rady při zpracovávání tématu mé diplomové práce, také za jeho ochotu a vlídný přístup. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, přátelům a mému přítelovi, kteří mě po celou dobu studia a při psaní diplomové práce podporovali.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá stanovením mastných kyselin v papírových obalech. Teoretická část je zaměřena na vlastnosti a využití mastných kyselin, zejm. kyseliny palmitové a stearové, jejich využití jakožto lubrikantů v průmyslu a dále také na možnosti jejich stanovení. V práci je přiblížena i technologie výroby papírových obalů. V experimentální části je vyvinuta a zvalidována metoda pro extrakci a stanovení kyseliny palmitové a stearové v papírových obalech.

KLÍČOVÁ SLOVA

mastné kyseliny, lubrikanty, extrakce pevná látka-kapalina, plynová chromatografie

TITLE

Determination of fatty acids in paper packaging

ANNOTATION

This diploma thesis deals with determination of fatty acids in paper packaging. The theoretical part is focused on properties and use of fatty acids, especially palmitic and stearic acid, their use as lubricants in the industry, as well as the options of their determination. Paper packaging technology is also described. In the experimental part, a method for the extraction and determination of palmitic and stearic acid in paper packaging is developed and validated.

KEYWORDS

fatty acids, lubricants, solid-liquid extraction, gas chromatography

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ	10
SEZNAM TABULEK	10
SEZNAM GRAFŮ	11
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	14
ÚVOD	15
1 TEORETICKÁ ČÁST	16
1.1 Technologie výroby papírových obalů na vejce	16
1.2 Použití lubrikantů ve výrobním a zpracovatelském průmyslu	18
1.3 Mastné kyseliny	18
1.3.1 Důležité reakce mastných kyselin	19
1.3.2 Využití mastných kyselin v průmyslu	20
1.3.3 Fyzikální a chemické vlastnosti kyseliny stearové a palmitové	20
1.3.3.2 Vlastnosti a využití kyseliny palmitové	24
1.3.3.3 Vlastnosti a využití kyseliny stearové	25
1.3.3.4 Vlastnosti a využití solí kyseliny stearové a palmitové	25
1.4 Možnosti analýzy mastných kyselin	26
1.4.1 Úprava vzorku	26
1.4.1 Extrakce pevná látka-kapalina	27
1.4.1.1 Macerace	27
1.4.1.2 Extrakce za asistence ultrazvuku	28
1.4.1.3 Účinnost extrakce pevná látka–kapalina	28
1.4.2 Stanovení mastných kyselin	29
1.4.2.1 Plynová chromatografie	29
1.4.2.1 Hmotnostní spektrometrie ve spojení s GC	30
1.4.2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	31
1.4.2.3 Kolorimetrické stanovení	31

1.4.2.4	Elektrochemické stanovení.....	32
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	33
2.1	Použité chemikálie, přístroje a pomůcky.....	33
2.1.1	Chemikálie	33
2.1.2	Pomůcky.....	33
2.1.3	Přístroje	34
2.2	Použité vzorky	34
2.3	Optimalizace GC-MS	35
2.3.1	Příprava standardů kyseliny stearové a palmitové	35
2.3.2	Tvorba optimálních podmínek pro analýzu SA a PA na GC-MS.....	35
2.4	Obecný postup analýzy mastných kyselin.....	36
2.5	Postup optimalizace extrakce mastných kyselin	36
2.5.1	Extrakce na třepačce	37
2.5.2	Extrakce ultrazvukem.....	38
2.6	Příprava kalibračních roztoků.....	39
2.6.1	Příprava kalibračních roztoků pro stanovení MK ve formě volných kyselin ...	39
2.6.2	Příprava kalibračních roztoků pro stanovení MK ve formě methylesterů	39
2.7	Příprava vzorků.....	40
2.7.1	Extrakce mastných kyselin z reálných vzorků	40
2.7.2	Příprava methylesterů mastných kyselin.....	40
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	42
3.1	Optimalizace metody extrakce mastných kyselin	42
3.2	Validace metody	55
3.2.1	Validace metody pro přímé stanovení mastných kyselin.....	55
3.2.2	Validace metody pro stanovení MK jako methylesterů	57
3.3	Analýza reálných vzorků	59
3.3.1	Porovnání metody stanovení MK a MEMK	61

ZÁVĚR	62
POUŽITÁ LITERATURA	63
PŘÍLOHY	74

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Stroj na zpracování recyklátu. Převzato z [4].	16
Obrázek 2: Stroj na lisování obalů na vejce. Převzato a upraveno z [4].	16
Obrázek 3: Schéma procesu výroby papírových obalů na vejce. Převzato a upraveno z [2].	17
Obrázek 4: Strukturní vzorec k. palmitové	24
Obrázek 5: Vzhled k. palmitové	24
Obrázek 6: Strukturní vzorec k. stearové	25
Obrázek 7: Vzhled k. stearové	25
Obrázek 8: Schéma plynového chromatografu. Převzato z [59].	29
Obrázek 9: Vzorek od výrobce používající separátory na bázi solí PA a SA – tmavý.	34
Obrázek 10: Vzorek od výrobce používající separátory na bázi solí PA a SA – světlý.	34
Obrázek 11: Vzorek neznámého původu – tmavší.	35
Obrázek 12: Vzorek neznámého původu – matrice.	35
Obrázek 13: Třepačka Vibramax 100, Heildolph	37
Obrázek 14: Ultrazvuková lázeň Sonorex, Bandelin electronic	38
Obrázek 15: Schéma postupu analýzy mastných kyselin v papírových obalech.	41

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Přehled mastných kyselin. Převzato z [12].	19
Tabulka 2: Fyzikální a chemické vlastnosti kyseliny palmitové a stearové. Převzato z [21] [22] [23] [24].	21
Tabulka 3: Rozpustnosti PA a SA ve vybraných organických rozpouštědlech.	22
Tabulka 4: Výtěžnost extrakčních kroků vztažené k prvnímu extrakčnímu kroku: ethanol, třepačka.	43
Tabulka 5: Výtěžnost extrakčních kroků vztažené k prvnímu extrakčnímu kroku: aceton, třepačka.	44
Tabulka 6: Výtěžnost extrakčních kroků vztažené k prvnímu extrakčnímu kroku: ethylacetát, třepačka.	45
Tabulka 7: Výtěžnost extrakčních kroků vztažené k prvnímu extrakčnímu kroku: ethanol, ultrazvuk.	47
Tabulka 8: Výtěžnost extrakčních kroků vztažené k prvnímu extrakčnímu kroku: aceton, ultrazvuk.	48

Tabulka 9: Výtěžnost extrakčních kroků vztažené k prvnímu extrakčnímu kroku: ethylacetát, ultrazvuk.	49
Tabulka 10: Validace metody pro stanovení mastných kyselin ve formě MK: validační kritéria dle Horwitze [76].	56
Tabulka 11: Parametry regrese, LOD a LOQ kyseliny palmitové a stearové.	57
Tabulka 12: Validace metody pro stanovení mastných kyselin ve formě methylesterů: validační kritéria dle Horwitze [76].	58
Tabulka 13: Parametry regrese a LOQ methylpalmitátu a methylstearátu.	59
Tabulka 14: Výsledky analýzy vzorků bez derivatizace a s derivatizací.	60

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethanol, třepačka, 10 min.	43
Graf 2: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethanol, třepačka, 20 min.	43
Graf 3: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethanol, třepačka, 30 min.	43
Graf 4: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethanol, třepačka, 40 min.	43
Graf 5: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: aceton, třepačka, 10 min.	44
Graf 6: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: aceton, třepačka, 20 min.	44
Graf 7: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: aceton, třepačka, 30 min.	44
Graf 8: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: aceton, třepačka, 40 min.	44
Graf 9: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethylacetát, třepačka, 10 min.	45
Graf 10: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethylacetát, třepačka, 20 min.	45
Graf 11: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethylacetát, třepačka, 30 min.	45

Graf 12: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethylacetát, třepačka, 40 min.	45
Graf 13: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethanol, ultrazvuk, 5 min.	47
Graf 14: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethanol, ultrazvuk, 15 min.	47
Graf 15: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethanol, ultrazvuk, 25 min.	47
Graf 16: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethanol, ultrazvuk, 35 min.	47
Graf 17: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: aceton, ultrazvuk, 5 min.	48
Graf 18: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: aceton, ultrazvuk, 15 min.	48
Graf 19: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: aceton, ultrazvuk, 25 min.	48
Graf 20: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: aceton, ultrazvuk, 35 min.	48
Graf 21: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethylacetát, ultrazvuk, 5 min.	49
Graf 22: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethylacetát, ultrazvuk, 15 min.	49
Graf 23: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethylacetát, ultrazvuk, 25 min.	49
Graf 24: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethylacetát, ultrazvuk, 35 min.	49
Graf 25: Celkové množství vyextrahovaných kyselin na třepačce do jednotlivých rozpouštědel (délka extrakčního kroku: 10 min).	51
Graf 26: Celkové množství vyextrahovaných kyselin na třepačce do jednotlivých rozpouštědel (délka extrakčního kroku: 20 min).	51
Graf 27: Celkové množství vyextrahovaných kyselin na třepačce do jednotlivých rozpouštědel (délka extrakčního kroku: 30 min).	51
Graf 28: Celkové množství vyextrahovaných kyselin na třepačce do jednotlivých rozpouštědel (délka extrakčního kroku: 40 min).	51

Graf 29: Celkové množství vyextrahovaných kyselin na ultrazvuku do jednotlivých rozpouštědel (délka extrakčního kroku: 5 min).	52
Graf 30: Celkové množství vyextrahovaných kyselin na ultrazvuku do jednotlivých rozpouštědel (délka extrakčního kroku: 15 min).	52
Graf 31: Celkové množství vyextrahovaných kyselin na ultrazvuku do jednotlivých rozpouštědel (délka extrakčního kroku: 25 min).	52
Graf 32: Celkové množství vyextrahovaných kyselin na ultrazvuku do jednotlivých rozpouštědel (délka extrakčního kroku: 35 min).	52
Graf 33: Porovnání výtěžností extrakce pro KYSELINU PALMITOVOU: 5 min na ultrazvuku vs. 10 min na třepačce.	53
Graf 34: Porovnání výtěžností extrakce pro KYSELINU PALMITOVOU: 15 min na ultrazvuku vs. 20 min na třepačce.	53
Graf 35: Porovnání výtěžností extrakce pro KYSELINU STEAROVOU: 5 min na ultrazvuku vs. 10 min na třepačce.	53
Graf 36: Porovnání výtěžností extrakce pro KYSELINU STEAROVOU: 15 min na ultrazvuku vs. 20 min na třepačce.	53
Graf 38: Závislost tvorby esteru/úbytku kyseliny stearové na čase.	54
Graf 37: Závislost tvorby esteru/úbytku kyseliny palmitové na čase.	54

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AOAC	Asociace oficiálních analytických chemiků (Association of Official Analytical Chemists)
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
DAF	flotace rozpuštěným vzduchem (Dissolved Air Flotation)
ELSD	detektor rozptylu světla (Evaporative Light Scattering Detector)
FIA	průtoková injekční analýza (Flow Injection Analysis)
GC	plynová chromatografie
GC-FID	plynová chromatografie s plamenově-ionizačním detektorem
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IS	vnitřní standard
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
LSV	lineární voltametrie (Linear Sweep Voltammetry)
MEMK	methylestery mastných kyselin
MK	mastné kyseliny
NIST	Národní institut standardů a technologie (National Institute of Standards and Technology)
PA	kyselina palmitová (Palmitic Acid)
RP	obrácená (reverzní) fáze
SA	kyselina stearová (Stearic Acid)

ÚVOD

Mastné kyseliny jsou látky skloňované nejen v biochemii a v potravinářství, ale i v různých odvětvích průmyslu. Konkrétně soli kyseliny palmitové a stearové nacházejí uplatnění jako mýdla, detergenty a rovněž i jako lubrikanty či separátory při výrobě kovových, plastových a papírových výrobků. Lubrikanty v průmyslu zefektivňují výrobu a zvyšují životnost strojů. Při výrobě je důležité zkoumat jakékoli ztráty a existuje určitá možnost, že se lubrikanty mohou mj. nasorbovat do papírových výrobků. Z tohoto důvodu je potřeba vyvinout vhodnou metodu pro kvantitativní analýzu mastných kyselin v papírových výrobcích, aby byly případné ztráty zjištěny a v budoucnu mohly být eliminovány.

Cílem této práce je provést literární rešerši zaměřenou na mastné kyseliny používané jako lubrikanty při výrobě papírových obalů a v experimentální části vyvinout a zvalidovat metodu pro izolaci a stanovení mastných kyselin v papírových obalech.

V teoretické části je popsána výroba papírových obalů, využití lubrikantů v průmyslu a dále také vlastnosti a stanovení mastných kyselin. Důraz je kladen zejména na kyselinu palmitovou a stearovou. V experimentální části jsou optimalizovány podmínky pro extrakci kyseliny palmitové a stearové ze vzorků a podmínky pro měření na GC-MS. Optimalizované podmínky jsou poté aplikovány na reálné vzorky a mastné kyseliny jsou ve vzorcích kvantifikovány.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Technologie výroby papírových obalů na vejce

Proces výroby obalů na vejce zahrnuje 3 hlavní kroky, mezi které patří tvorba vlákniny ze sběrového papíru, zpracování do formy, což je klíčový krok při výrobě, a závěrečný krok, tj. sušení výrobku [1].

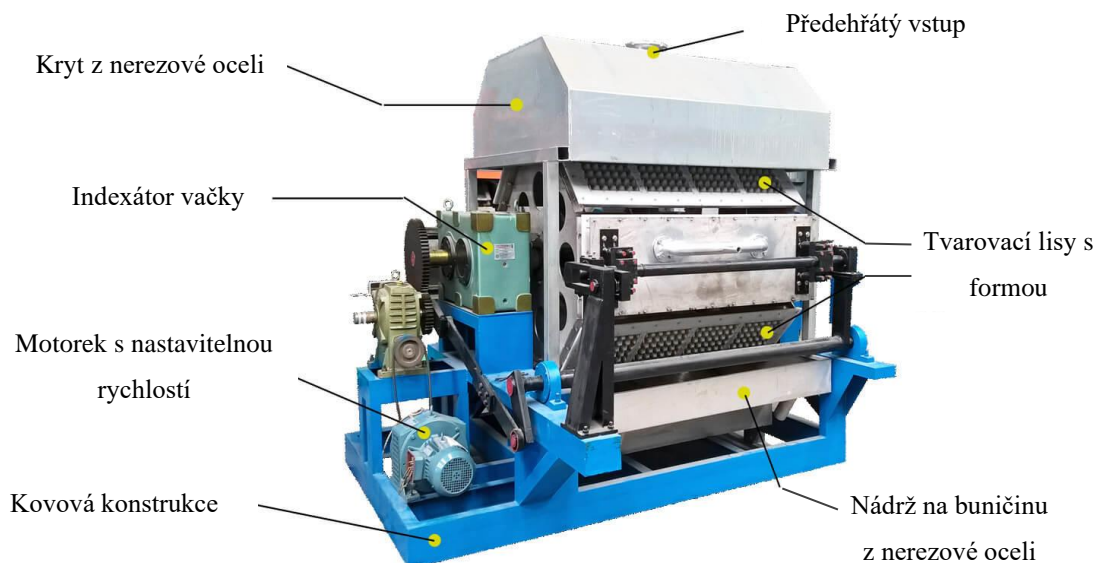
V prvním kroku dojde k smíšení papírového, novinového a kartonového materiálu s vodou ve speciálním stroji na zpracování recyklátu, který může vypadat např. jako na **Obrázku 1**.



Obrázek 1: Stroj na zpracování recyklátu. Převzato z [4].

Proces funguje tak, že papír je rozmělněn a rozložen na jednotlivá vlákna, která se dispergují ve vodě. Následně jsou celulózová vlákna mechanicky očištěna a zbavena větších částic pomocí speciální jemné mřížky [2].

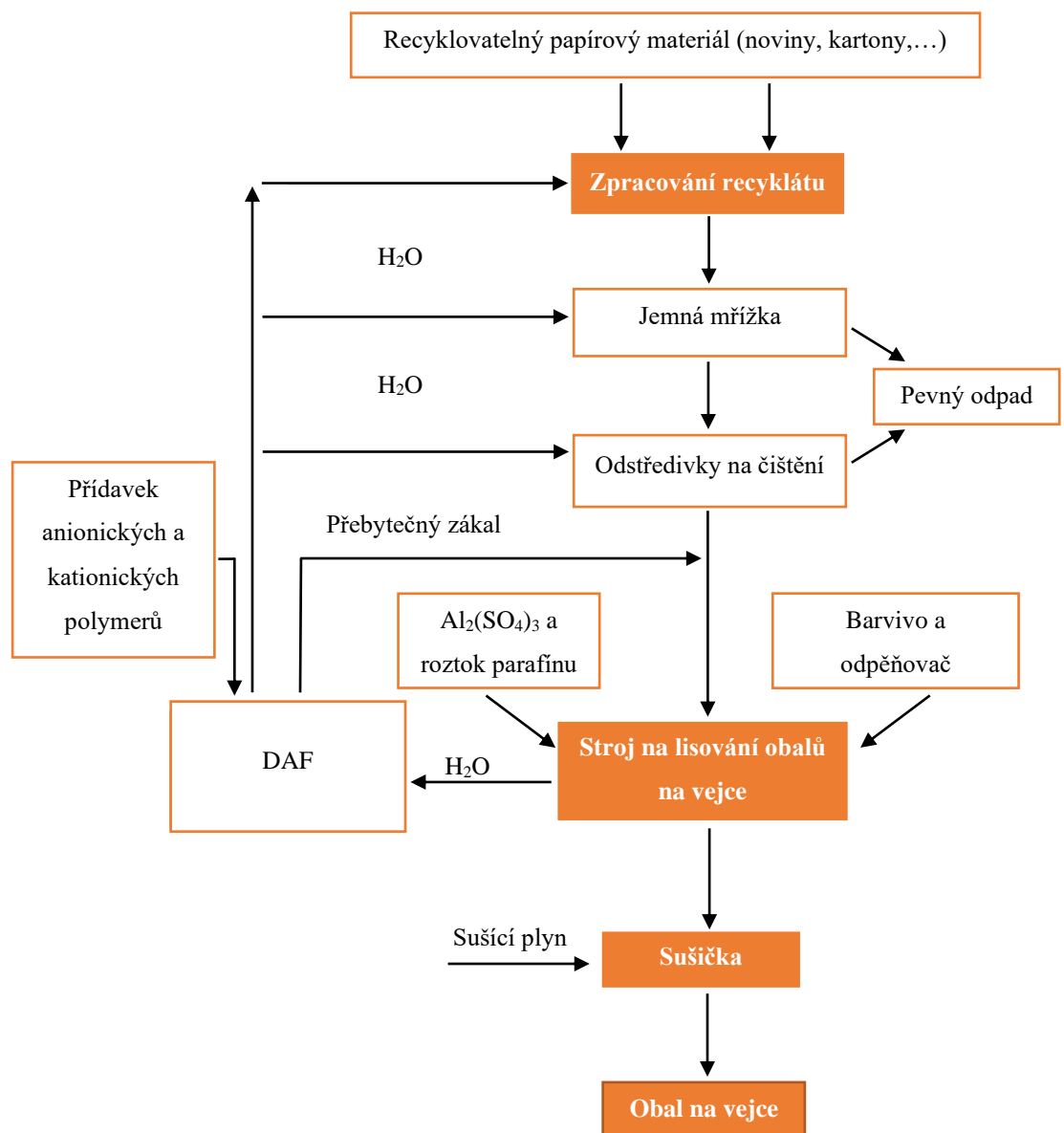
Následně dojde k transportu recyklátu do forem a za pomoci vakuových pump se recyklát formuje do tvaru obalů na vejce. Na **Obrázku 2** je zobrazen jeden z typů lisů na obaly od firmy Salam Machinery Equipment, Co. (Čeng-čou, Čína). Do recyklátu mohou být během procesu přidávány barviva, parafín, odpěňovače a také síran hlinitý jakožto agregační činidlo [2; 3].



Obrázek 2: Stroj na lisování obalů na vejce. Převzato a upraveno z [4].

Pomocí proudu vzduchu se obaly oddělí od formy a dále se suší za vysoké teploty v nepřímé tepelné rotační sušičce, protože obsahují mnoho přebytečné vody. Voda je znovu přečištěna pomocí DAF flotace, neboli vyvločkování (Dissolved Air Flotation). Během tohoto procesu je voda zbavena pevných nečistot pomocí koagulantu a vzniklé vločky jsou vyneseny mikrobublínkami vzduchu na hladinu. Kal se následně odstraní stíráním [2; 5]. Na závěr se výrobky balí na automatické lince [6; 7]. Celý proces je shrnut na schématu níže (**Obrázek 3**).

V současnosti lze přistoupit rovněž k různým modifikacím, např. antimikrobiální ochrana vnitřku obalu pomocí nanovrstvy TiO_2 , která zabraňuje růstu bakterií a chrání tak vejce před kontaminací. Je poté nutné přidat k výrobní lince i sprejovací komoru, ve které bude modifikace probíhat [8].



Obrázek 3: Schéma procesu výroby papírových obalů na vejce. Převzato a upraveno z [2].

1.2 Použití lubrikantů ve výrobním a zpracovatelském průmyslu

Lubrikanty jsou látky hojně využívané v průmyslu, které zlepšují a zjednodušují výrobní proces. Napomáhají snižovat tření mezi povrchy a tím snížit míru opotřebení součástí stroje, tím pádem zvyšují jeho životnost. Třením se rovněž ztrácí hodně energie, proto vhodně zvolené mazání umožňuje ušetřit energii a snížit ekonomické náklady [9].

Při zpracování plastových či papírových výrobků se často využívají lisu. Nedílnou součástí výrobního procesu jsou právě lubrikační média, která napomáhají odlepit výrobek od lisu, jinými slovy, aby nedocházelo k nežádoucí adhezi výrobku na povrch lisu a případnému poškození výrobku a lisu. Proto se povrch pokrývá vrstvou lubrikantu, který může být syntetického i přírodního původu. Jako příklady lze uvést oleje, jako jsou silikonový či minerální, dále vosky, glykoly, případně mastek či slída. Hojně jsou využívány i soli mastných kyselin, tedy svou chemickou podstatou mýdla. Dnes je velmi kladen důraz na využití netoxických lubrikantů odbouratelných v přírodě, které mají dlouhou životnost a jsou rozpustné ve vodě. Tyto faktory jsou těžko splnitelné dohromady a je tedy nutné hledat určitý kompromis [9; 10; 11].

1.3 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (MK) jsou látky často zmiňované v biochemii, kde je můžeme definovat jako karboxylové kyseliny s nerozvětveným alifatickým řetězcem od 3 do 24 uhlíků, s dvojnými vazbami nenasycené nebo bez dvojných vazeb nasycené. Hovoříme-li o přirozeně se vyskytujících mastných kyselinách, mají většinou sudý počet uhlíků (vzhledem k jejich syntéze z dvouuhlíkatých molekul). V esterifikované formě se nacházejí v živých organismech jako součást lipidů. Mastné kyseliny mají díky hydrofilní -COOH skupině a hydrofobnímu alifatickému řetězci amfipatický charakter.

Můžeme je rozdělit do 4 skupin: mastné kyseliny s krátkým řetězcem (do 6 uhlíků), se středně dlouhým řetězcem (do 10 uhlíků), s dlouhým řetězcem (do 18 uhlíků) a velmi dlouhým řetězcem (nad 18 uhlíků) [12; 13].

Přehled nejvýznamnějších mastných kyselin s počty uhlíků je uveden v **Tabulce 1**.

Tabulka 1: Přehled mastných kyselin. Převzato z [12].

Název kyseliny	Počet uhlíků	Počet dvojných vazeb	Poloha dvojně vazby (pořadí uhlíku)	Délka řetězce
Máselná	4			Krátký řetězec
Valerová	5			
Kapronová	6			
Kaprylová	8			Středně dlouhý řetězec
Kaprinová	10			
Laurová	12			Dlouhý řetězec
Myristová	14			
Palmitová	16			
Stearová	18			
Olejová	18	1	9	
Linolová	18	2	9; 12	
Linolenová	18	3	9; 12; 15	
Arachidová	20			Velmi dlouhý řetězec
Arachidonová	20	4	5; 8; 11; 14	
Behenová	22			
Eruková	22	1	13	
Lignocerová	24			
Nervonová	24	1	15	

1.3.1 Důležité reakce mastných kyselin

Reakční místo mastných kyselin se nachází na karboxylové skupině a dvojných vazbách. Jednou z nejvýznamnějších reakcí mastných kyselin je esterifikace, která nachází průmyslové využití např. při výrobě bionafty. Kyseliny reagují s nadbytkem alkoholu za kyselé katalýzy, případně enzymu lipázy. Alkoholová část, případně část od kyseliny, které se nachází v esteru, může být nahrazena jinou mastnou kyselinou, alkoholem nebo částmi jiného esteru (interesterifikace). Tyto reakce často probíhají s triacylglyceroly, ve kterých jsou MK obsaženy [14].

Další významnou reakcí, které podléhají mastné kyseliny, je oxidace, kterou známe hlavně jako žluknutí tuků, kdy dochází k oxidaci dvojně vazby nenasycených kyselin vlivem vzdušného kyslíku (autooxidace) a rovněž je reakce podpořena i UV zářením (fotooxidace).

Vznikají peroxidy, které se rozkládají na aldehydy či ketony. Oxidace se však používá i záměrně v průmyslu, hlavně oleochemickém, k rozštěpování alkylových řetězců či k připojení funkční skupiny k řetězci. Existuje i enzymaticky katalyzovaná oxidace, která slouží jako první krok k farmaceutické výrobě eikosanoidů, což je skupina signálních molekul podílejících se na biochemických procesech v lidském organismu [14].

Dvojná vazba MK může reagovat s peroxykyselinami. Tuto reakci nazýváme epoxidace a je využívána v průmyslu, kdy jsou z olejů vytvářeny epoxidy používané jako stabilizátory a plastifikátory pro PVC [14].

Redukce MK může probíhat jak na dvojně vazbě, tak na karboxylové skupině. Nejvýznamnější je hydrogenace dvojných vazeb za katalýzy Pt, Co nebo Pd, kdy dochází ke vzniku nasycených kyselin, čili ke ztužování tuků. Katalytická hydrogenace se využívá rovněž k výrobě alkoholů s dlouhým řetězcem [15; 16].

V neposlední řadě je důležité zmínit i tvorbu povrchově aktivních látek. Mastná kyselina je nejprve redukována na alkohol, který reaguje s oxidem sírovým a poté s hydroxidem sodným za vzniku sodných solí organosulfátů využívaných jako pěnidla a detergenty. Za zmínku stojí přímá příprava sulfátových surfaktantů z tri(di)acylglycerolů bez nutnosti tvorby alkoholu [14]. Důležité je i zmýdelňování tuků, jakožto alkalická hydrolyza esterů mastných kyselin, obvykle triacylglycerolů za vzniku glycerolu a soli mastné kyseliny (sodné či draselné) [17].

1.3.2 Využití mastných kyselin v průmyslu

Využití mastných kyselin je velmi široké, od potravinářského průmyslu, např. jako potravinové doplňky (omega-3 mastné kyseliny), po výrobu mýdel, kosmetiky či detergentů a čistících prostředků [18]. Velmi významnou funkci plní mastné kyseliny i v jiných odvětvích průmyslu, např. při zpracování kovů, plastů a papíru. Konkrétně v papírenském průmyslu slouží ve formě solí jako lubrikanty strojů a separátory [19; 20].

Pro účely této diplomové práce bude v následujících kapitolách věnována pozornost kyselině stearové (SA) a palmitové (PA) a jejich vlastnostem a konkrétnímu využití.

1.3.3 Fyzikální a chemické vlastnosti kyseliny stearové a palmitové

Pro pochopení funkce mastných kyselin, respektive kyseliny palmitové a stearové, a možností jejich analýzy je nutné uvést jejich chemické a fyzikální vlastnosti. V **Tabulce 2** jsou uvedeny základní vlastnosti zmiňovaných kyselin, jako je molekulová hmotnost, pKa, teplota tání, hustota a jiné.

Tabulka 2: Fyzikální a chemické vlastnosti kyseliny palmitové a stearové. Převzato z [21; 22; 23; 24]

	Kyselina palmitová	Kyselina stearová
Sumární vzorec	$C_{16}H_{32}O_2$	$C_{18}H_{36}O_2$
Molekulová hmotnost ($g \cdot mol^{-1}$)	256,42	284,50
pKa	4,75	4,75
Hustota ($g \cdot cm^{-3}$)	0.852 (při 25 °C)	0.9408 (při 20 °C)
Teplota tání (°C)	61,8	68,8
Teplota varu (°C)	351,5	383

Obecně jsou tyto kyseliny za laboratorní teploty (20 °C) pevné bílé látky s vysokými teplotami varu, prakticky nerozpustné ve vodě. Velmi dobře se rozpouštějí v etheru či chloroformu, ale je možné je rozpustit i v jiných organických rozpouštědlech, např. v ethanolu, acetonu, ethylacetátu nebo propanolu [21; 22].

V **Tabulce 3** jsou pro přehlednost uvedeny experimentálně získané rozpustnosti kyseliny palmitové a stearové ve vybraných rozpouštědlech (95% ethanol, isopropanol, aceton, hexan, ethylacetát) uvedeny v gramech rozpuštěné kyseliny na 100 g rozpouštědla. Hodnoty jsou přepočítány a zprůměrovány z experimentálně získaných hodnot molárních zlomků. Mezi některými experimenty se hodnoty rozpustnosti pro určité teploty a rozpouštědla poněkud lišily, proto nejsou zprůměrovány a je uvedena jejich přesná hodnota za dané teploty.

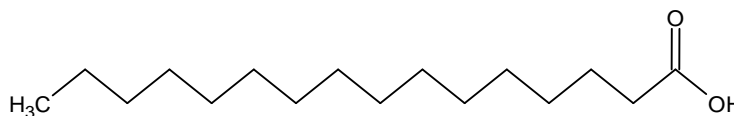
Tabulka 3: Rozpustnosti PA a SA ve vybraných organických rozpouštědlech.

Rozpouštědlo	Teplota (°C)	Rozpustnost (g/100 g)		Zdroje
		Kyselina palmitová	Kyselina stearová	
95% ethanol	20	8,43	1,36 (24,1 °C) 1,73 (20 °C) 1,92 (21,8 °C)	[23] [24] [25] [26]
	30	26,47	6,43 (31,7 °C) 5,74 (30 °C)	
	40	92,50	22,93 (40 °C) 26,13 (41,6 °C)	
	50	363,41	92,68 (50 °C) 112,92 (50,5 °C) 106,84 (49,4 °C)	
Isopropanol	20	18,69	5,94 (22,6 °C) 2,46 (24,8 °C)	[23] [24]
	30	54,31	13,74 (30,6 °C) 4,82 (30,8 °C)	
	40	148,23	41,94	
	50	341,29	125,90	
Aceton	20	6,70	2,71	[23] [24] [26]
	30	24,95	7,56 (31,7 °C) 2,76 (31,6 °C)	
	40	109,91	23,40	
	50	336,54	84,75	

Hexan	20	8,71	1,13	[23] [24]
	30	39,52	5,40	
	40	156,99	25,23	
	50	434,50	104,07	
Ethylacetát	20	10,7	6,76	[23] [25] [26]
	30	Chybí data	21,49 (30 °C) 16,74 (28,2 °C)	
	40	Chybí data	61,75 (40 °C) 79,50 (38 °C)	
	50	Chybí data	159,89	

1.3.3.2 Vlastnosti a využití kyseliny palmitové

Kyselina palmitová je nasycená bílá krystalická kyselina o šestnácti uhlících. Její strukturní vzorec a vzhled krystalů jsou na **Obrázcích 4 a 5**.



Obrázek 4: Strukturní vzorec k. palmitové



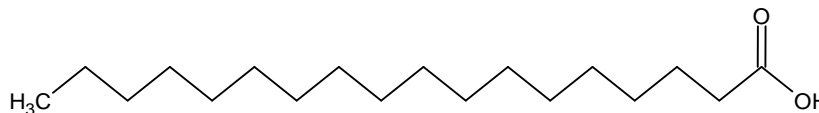
Obrázek 5: Vzhled k. palmitové

Tvoří estery s glycerolem jako součást tuků a získává se z palmového oleje [22; 27]. V lidském organismu se dokáže tvořit sama a zastává důležité biologické funkce na buněčné a tkáňové úrovni. Její nadměrná konzumace, resp. špatný poměr příjmu palmitové kyseliny s polynenasycenými kyselinami může vést k nadměrné akumulaci v organismu a způsobovat dyslipidémii, zánětlivé reakce nebo rozvoj hyperglykémie [28].

Co se týče využití mimo biologickou sféru, nachází své uplatnění v mnoha různých odvětvích. Díky jejímu amfipatickému charakteru zlepšuje disperzi uhlíkových nanotrubiček v epoxidových pryskyřicích, protože pomocí elektrické repulze zabraňuje tvoření svazků z nanočástic a tím zlepšuje elektrickou vodivost kompozitů a zvyšuje antistatický efekt [29]. Sodná sůl kyseliny palmitové, vznikající procesem zmýdelňování tuků pomocí hydroxidu sodného, je známá pro využití v mýdlech a detergentech a jako polymerizační katalyzátor při tvorbě syntetických gum [30]. Jiné než sodné, příp. draselné soli, jsou využívány jako lubrikanty v průmyslu [31]. Zajímavostí je, že kyselina palmitová byla využívána k výrobě zápalné látky napalmu [32].

1.3.3.3 Vlastnosti a využití kyseliny stearové

Kyselina stearová má podobné vlastnosti a využití jako kyselina palmitová. Je rovněž nasycená a na rozdíl od palmitové má 18 uhlíků. Má bílou, někdy až nažloutlou krystalicko-práškovou strukturu. Její strukturní vzorec a vzhled jsou zobrazeny na **Obrázcích 6 a 7**.



Obrázek 6: Strukturní vzorec k. stearové



Obrázek 7: Vzhled k. stearové

Získává se z živočišných tuků a nachází se v některých rostlinných olejích [21; 33]. Zastupuje mnoho funkcí, ať už v lidském organismu a potravě (podobně jako palmitová kyselina), nebo v průmyslu jako disperzant, změkčovadlo gum a ve formě solí jako mýdlo či lubrikant [34]. Existuje i využití SA v modifikaci elektrody (kombinace se stříbrnými nanočásticemi) pro elektrochemické stanovení aktivního metabolitu insekticidu parathion, tedy paraoxonu [35]. Ve spojení s jinými látkami je rovněž využívána k vytvoření superhydrofobního povrchu materiálů, např. ve spojení se silikonem (pro tkaniny) nebo mikrosférami z oxidu zinečnatého [36; 37]. V kombinaci s polyvinylalkoholem a polydimethylsiloxanem může kyselina stearová sloužit jako pojivo těchto dvou polymerů (pomocí Van der Waalsových sil). Nanomateriál vytvořený z těchto látek poté může sloužit např. jako selektivní membrána k filtraci olejů z vody, jelikož je pro oleje propustný [38].

1.3.3.4 Vlastnosti a využití solí kyseliny stearové a palmitové

Častou součástí lubrikantů používaných nejen v papírenském průmyslu jsou vápenaté či hořečnaté soli kyseliny stearové a palmitové. Vápenaté soli mastných kyselin vznikají reakcí MK s chloridem vápenatým, hydroxidem vápenatým či vápnem.

Stearan vápenatý patří k nejvýznamnějším složkám lubrikantů a separátorů a uplatňuje se rovněž jako pohlcovač kyselin – jakožto slabá báze neutralizuje kyseliny vznikající při syntézách. Uplatnění nachází v průmyslu zpracujícím plasty, papír nebo ve farmaceutickém průmyslu k uvolňování tablet z formy. Slouží také jako voděodolné aditivum k ochraně povrchů plastů či papírových výrobků [39; 40].

Palmitan vápenatý je látka ve formě prášku, která je nerozpustná ve vodě, ethanolu, acetonu či éteru a jen slabě se rozpouští v chloroformu či benzenu. Uplatní se jako výborný lubrikant a díky své hydrofobní povaze se používá rovněž k impregnaci tkanin proti vodě a jakožto inhibitor koroze [31; 41].

Podobné vlastnosti jako vápenaté soli zmíněných mastných kyselin má i stearát hořečnatý, který tvoří složku dětských pudrů a rovněž není rozpustný ve vodě, alkoholu či éteru, stejně tak i palmitan hořečnatý, který se mj. přidává jako protispékavá látka do kosmetických výrobků [42; 43].

1.4 Možnosti analýzy mastných kyselin

Analýza mastných kyselin začíná, jako každá analýza, úpravou vzorku, případně volbou extrakční techniky a na závěr zvolením vhodné instrumentální techniky.

1.4.1 Úprava vzorku

Úprava vzorku tvoří nejdůležitější část analýzy. Záleží na tom, v jaké formě se mastné kyseliny ve vzorku nachází a rovněž v jakém je vzorek skupenství a jakou povahu má matrice.

Nejčastěji se mastné kyseliny nacházejí vázané v lipidech. Prvním krokem je tedy extrakce lipidů ze vzorku, zejména pomocí organických rozpouštědel, nicméně existují možnosti jako dvoukroková centrifugace nebo přímá transesterifikace tuků ve vzorku, kdy pomocí methanolu či ethanolu a za přítomnosti katalyzátoru vzniká glycerol a methyl či ethyl ester mastné kyseliny [44; 45]. K tradičnímu způsobu extrakce lipidů se používá metoda dle Folche pomocí chloroformu, příp. chloroformu-methanolu v poměru 1:2. Dále např. s využitím dichlormethanu s methanolem (2:1) nebo isopropanolu s cyklohexanem (1:1,25) [46; 47]. V této době se klade důraz na zelenou chemii a omezení toxických organických rozpouštědel, a proto se přistupuje k používání jiných látek k extrakci, např. methyl-terc-butyleter, extrakci superkritickým oxidem uhličitým, případně s využitím běžných a relativně málo nebezpečných rozpouštědel jako je ethanol nebo ethylacetát [46; 47; 48].

Dalším krokem je získání volných mastných kyselin, které jsou navázány v lipidech, a to procesem hydrolýzy. Kyselou hydrolýzou vznikají volné kyseliny a glycerol, přičemž

je možné tento způsob spojit i s derivatizací vzorku pro analýzu na plynovém chromatografu. Pro tyto účely je vhodná např. reakce s methanolem a kyselinou sírovou za současného zahřátí reakční směsi [49; 50]. Zásaditou hydrolyzou (zmýdelněním) vznikají soli MK a glycerol.

Chceme-li získat volnou mastnou kyselinu ze soli mastné kyseliny, tedy mýdla, je nutné použít silnou kyselinu, která vytěsňuje slabší mastnou kyselinu z molekuly [51]. Extrahujeme-li mastnou kyselinu z pevné matrice, je vhodné zvolit jednu z možností extrakce pevná látka-kapalina, které jsou uvedeny v **Kapitole 1.4.1**.

Pro zakoncentrování vzorku a případné očištění od matrice slouží (mikro)extrakce tuhou fází, dále se pro přečištění nabízí filtrace, destilace nebo iontově-výměnná chromatografie [13; 52].

1.4.1 Extrakce pevná látka-kapalina

Mechanismus extrakce pevné látky kapalinou zahrnuje několik kroků. Nejprve dojde k obalení povrchu pevné matrice rozpouštědlem. Poté se rozpouštědlo difúzí, příp. penetrací, dostane do pórů matrice a v nich se rozprostře. Tímto se analyt obsažený v matrici dostane nejdříve na povrch pevné matrice a poté do celkového objemu rozpouštědla, ve kterém se rozpustí. Celý proces se opakuje [53].

Tento typ extrakce zahrnuje různé metody jako jsou macerace, Soxhletova extrakce, superkritická fluidní extrakce, hydrodestilace nebo extrakce za asistence ultrazvuku či mikrovln. Je snahou zvolit metodu, která spotřebuje co nejméně rozpouštědla a energie, splňuje principy zelené analytické chemie a zároveň zabere co nejméně času. Kupříkladu nevýhodou macerace je dlouhá doba extrakce, u Soxhletovy extrakce je to nejen doba, ale i množství organického rozpouštědla [54; 55; 56].

1.4.1.1 Macerace

Nejjednodušším způsobem extrakce pevná látka–kapalina je macerace, kdy je pevný vzorek ponořen do rozpouštědla. Macerace může probíhat za laboratorní teploty a je tedy vhodná pro termolabilní látky, zároveň je velmi jednoduchá na provedení. Nevýhodou je dlouhá doba trvání a nízká extrakční účinnost, kterou lze ale zvýšit zahřátím rozpouštědla nebo intenzivním mícháním, např. za použití třepačky, což zabrání saturaci rozpouštědla kolem pevného analytu a k analytu se lépe dostává čerstvé rozpouštědlo [56; 57].

1.4.1.2 Extrakce za asistence ultrazvuku

Další možností je využití ultrazvukových vln, nejčastěji o frekvenci od 20 do 50 kHz. Ultrazvuk způsobuje kmitání molekul, dochází k zahřívání rozpouštědla a vzniku tzv. kavitačních center, kdy dochází ke vzniku malých bublinek, které expandují a smršťují se. Během toho narůstá v místě vzniku bublinek teplota a vznikají tlakové vlny – střídá se tlak akustických vln s podtlakem a dochází k procesu zvaném kavitace. Rozrušuje se tak např. vazba mezi povrchem materiálu a nečistotami na něm obsaženými, proto je ultrazvuk využíván mimo jiné i k čištění (známe např. z optik při čištění brýlí v ultrazvukové lázni). Ultrazvuk napomáhá k rozrušení materiálu a tím pádem lepšímu uvolnění extrahované látky, rovněž i zlepšuje proniknutí rozpouštědla do materiálu, resp. matrice. Ultrazvukové vlny vzorek ohřívají, což také významně zlepšuje účinnost extrakce, jelikož rozpustnost některých rozpouštědel se zvyšuje s rostoucí teplotou [54; 56; 58].

1.4.1.3 Účinnost extrakce pevná látka–kapalina

Účinnost extrakce z pevné látky do kapaliny je ovlivněna mnoha faktory. Jeden z faktorů je velikost částic vzorku. Čím menší budou částice vzorku, tím bude extrakce účinnější, protože se celkový povrch částic zvětší. Je tedy výhodné pevné vzorky nakrájet, nastříhat, nadrtit nebo rozetřít ve třecí misce. Je rovněž nutné zajistit, aby byl vzorek suchý, neboť případná vlhkost může ovlivňovat přenos hmoty mezi pevnou maticí a rozpouštědlem [53; 56].

Dostatečný přenos hmoty mezi fázemi je dán Fickovým zákonem a souvisí s difúzním koeficientem. Přenos hmoty můžeme zlepšit třepáním, zahřátím nebo pomocí ultrazvuku. U zvýšené teploty je důležité dát si pozor na nežádoucí tepelnou degradaci analytu a ztrátu rozpouštědla při zahřátí na teplotu varu. S tímto souvisí např. použití extrakce kapalinou za zvýšeného tlaku a teploty, kdy vyšší tlak udržuje rozpouštědlo kapalné a díky vyšší teplotě probíhá extrakce rychleji [53; 56].

Důležitým faktorem je také počet kroků extrakce. Platí, že je lepší extrakční kroky opakovat s menším množstvím rozpouštědla, než extrahovat jedenkrát celým množstvím [53; 56].

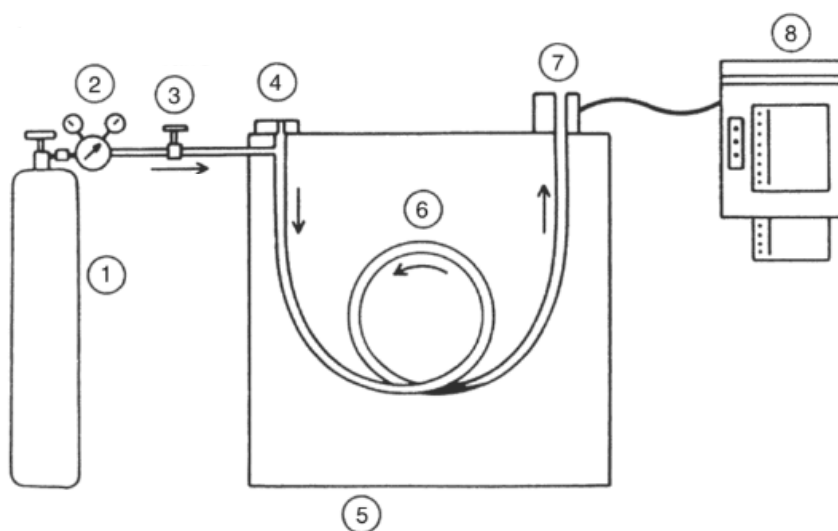
A posledním, ale snad i nejdůležitějším faktorem, je výběr vhodného rozpouštědla. Je dobré znát povahu analytu a dle toho vybrat rozpouštědlo, ve kterém je analyt nejvíce rozpustný, případně si vyzkoušet různá rozpouštědla s různou polaritou a vybrat to, do kterého se vyextrahovalo nejvíce látky/látek. Extrakci ovlivňuje také viskozita a povrchové napětí rozpouštědla, stejně tak je rozhodující i cena rozpouštědla a bezpečnost [53; 56].

1.4.2 Stanovení mastných kyselin

1.4.2.1 Plynová chromatografie

Jednou z nejčastěji používaných metod ke stanovení mastných kyselin je plynová chromatografie (GC) s plamenově-ionizačním detektorem (GC-FID) či hmotnostním spektrometrem (GC-MS). Pro účely této diplomové práce bude v následujícím odstavci popsán její princip a používané detektory.

Plynová chromatografie je separační technika, která je schopna dělit směsi těkavých látek. Jako mobilní fáze se používá inertní plyn, např. argon, dusík, vodík či helium. Tento plyn nereaguje se vzorkem, slouží pouze jako nosný plyn. Schéma plynového chromatografu můžeme vidět na **Obrázku 8**.



Obrázek 8: Schéma plynového chromatografu. Převzato z [59].

1) tlaková lahev; 2) regulátor tlaku; 3) regulátor toku plynu; 4) nástřik vzorku; 5) termostat; 6) kolona; 7) detektor; 8) záznam dat (PC)

Vzorek se dávkuje mikrostříkačkou přes průpichové septum, často pomocí autosampleru, do vyhřívaného prostoru, kde je zplyněn (pokud je kapalný, dávkovat je však možné rovnou i plynou fází). Proud nosného plynu unáší vzorek na kapilární kolonu (umístěnou v termostatovaném prostoru), kde se látky sorbují na stacionární fázi a následně jsou desorbovány stále proudícím tokem nosného plynu z kolony na detektor [60].

Nejčastěji používané detektory v plynové chromatografii jsou plamenově-ionizační detektor, tepelně vodivostní detektor, detektor elektronového záchytu a hmotnostní detektor [60; 61].

Velmi často využívaným detektorem je FID, který je univerzální pro většinu organických látek. Princip tohoto detektoru spočívá ve spálení a následné ionizaci analytů plamenem vodík-vzduch. Vznikající ionty a elektrony zvyšují proud mezi dvěma elektrodami a výsledný signál je přímo úměrný koncentraci organické látky, kterou lze ionizovat [62].

Jedním z dalších detektorů, který se běžně spojuje s plynovým chromatografem je hmotnostní spektrometr, kterému bude věnována menší **Kapitola 1.4.2.1**.

Co se týče stanovení mastných kyselin pomocí GC, je jednou z možností jejich přímá analýza. Výhodou je ušetření času a chemikálií, na druhou stranu je nutno použít vyšší teploty kolony (do 300 °C), což může přispět k opotřebení kolony, resp. k jejímu krvácení [64]. Výběr vhodné kolony záleží na tom, zda je pro nás důležitá dobrá separace geometrických izomerů kyselin. Pro tento účel je vhodné použít polární kolony s kyanopropylovými vázanými fázemi, případně kolonu na bázi PEG, nebo na bázi iontových kapalin. V opačném případě je možné použít nepolární kolonu typu SLB-5MS [65].

Vzhledem k vysokým teplotám varů mastných kyselin je výhodné vzorky derivatizovat. Obecně derivatizace zvyšuje citlivost detektorů ke stanovovaným látkám a konkrétně v GC analýze činí látky více těkavé a jsou tedy poté lépe zplynitelné. Možností derivatizace je mnoho, nejčastější způsob je tvorba esterů, zejm. methylesterů [66]. K methanolu se přidává HCl, acetylchlorid, kyselina sírová či fluorid boritý. Vzorek je obvykle zahřán na max. 100 °C po dobu 60 minut. Tímto způsobem se často derivatizují lipidové extrakty [65; 67]. Další možností je derivatizace pomocí methoxidu sodného v bezvodém methanolu, kdy se směs nechá zahřát na 45 °C po dobu 5 min. Po této době se přidá NaHSO₄ kvůli neutralizaci kyselin a organickým rozpouštědlem se vyextrahují vzniklé methylestery. Lze také využít KOH v methanolu. Reakce probíhá za laboratorní teploty, nebo je možno vzorek zahřát na 50 °C po dobu několika minut. Poté se přidá bisulfát sodný a odebraný supernatant se analyzuje na GC [65]. Popsány byly i derivatizace pomocí trimethylsulfonium hydroxidu, což je rychlá jedнокroková derivatizační reakce, nicméně nevhodná pro derivatizaci polynenasycených MK. Dále je možno využít pentafluorobenzyl bromid, který převede MK na halogenované deriváty a ty se poté detekují v negativním módu na GC-MS [65]. Další možností je tvorba silylderivátů, např. pomocí methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamidu [67].

1.4.2.1 Hmotnostní spektrometrie ve spojení s GC

Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie nabízí zároveň separaci a následnou identifikaci látek. V dnešní době je spojení GC-MS standardní záležitostí. Problém v rozdílu tlaků mezi GC a hmotnostním spektrometrem a v přebytku nosného plynu je odstraněn

vakuovými pumpami. K ionizaci analytů se využívá elektronová či chemická ionizace. Výhodou elektronové ionizace při 70 eV je možnost přímého porovnání s knihovnou spekter [63].

Jako hmotností analyzátoři se nejčastěji používají kvadrupól (případně spojení tří kvadrupólů, kde prostřední slouží jako kolizní cela), iontová past nebo analyzátoři doby letu [63].

Kvadrupól tvoří 4 kovové tyče, kdy na dvě protilehlé je vloženo kladné stejnosměrné napětí a na další dvě je vloženo napětí záporné. K tomu je na všechny 4 tyče superponováno střídavé napětí. Když se iont dostane do kvadrupólu, začne oscilovat a pro určitý poměr stejnosměrného napětí (U) a amplitudy střídavého napětí (V) je stabilní pouze iont s určitou hodnotou m/z – ten projde kvadrupólem a ostatní ionty se zachytí na tyčích. Změnou hodnot U a V (nikoliv poměru) jsou postupně propuštěny vybrané ionty [63].

1.4.2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Další z běžně používaných metod je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s UV/Vis či fluorescenční detekcí, popřípadě HPLC-MS, nejčastěji s reverzní fází (RP) a gradientovou elucí. MK špatně absorbují v UV/Vis oblasti a je tedy pro spektrofotometrickou detekci nutné do molekuly vložit chromofor [68]. Chemikálií vhodných pro derivatizaci MK je mnoho, patří mezi ně amidy, estery, látky s fenacyl-, benzyl-, p-nitrobenzyl-, 1-naftylamin a 2-naftacyl skupinami, dále také diazo deriváty (jsou však nestálé), příp. 5-(4-(difenylamin)fenylthiofen-2-yl)methanol [69].

Byly popsány i možnosti analýzy MK s dlouhým řetězcem (extrahované z olejů do methanolu) pomocí RP-HPLC bez derivatizace pomocí detektoru rozptylu světla (ELSD), jejichž výhodou je přesnější kvantifikace nenasycených MK oproti GC-FID [70]. Další možnosti analýzy bez derivatizace je HPLC-MS analýza s APCI ionizací pro stanovení MK ve vodě z výroby papírových produktů [71].

1.4.2.3 Kolorimetrické stanovení

Spektrofotometrické, resp. kolorimetrické stanovení MK je založeno na tvorbě měďnatých mýdel MK. Octan měďnatý reaguje s mastnou kyselinou rozpuštěnou v benzenu a následně je proměřena absorbance vzniklé měďnaté soli v benzenové vrstvě při 640 nm. Konkrétně tato metoda je vhodná pro stanovení nenasycených MK v olejích. Benzen je vhodné nahradit toluenem, izooktanem nebo cyklohexanem a měďnaté mýdlo lze stabilizovat přidávkou pyridinu [72]. Ke stanovení polynenasycených MK spektrofotometricky lze též použít enzym

lipoxygenázu, kdy se při 234 nm proměří vzniklé hydroperoxy mastné kyseliny [73]. Byla rovněž vyzkoušena i metoda stanovení MK v olejích, využívající pH citlivé fluorescenční činidlo pyranin při fotometrické mikrotitraci mastných kyselin pomocí NaOH, kdy byl bod ekvivalence určen pomocí měření fluorescence při excitační vlnové délce 390 nm a emisní vlnové délce 400–600 nm [74].

Popsané spektrofotometrické metody jsou však vhodné pouze pro stanovení celkového množství volných MK ve vzorku (např. k určení kyselosti oleje). Pro identifikaci jednotlivých složek je třeba využít jiných metod [73; 74].

1.4.2.4 Elektrochemické stanovení

V neposlední řadě existuje i voltametrické stanovení MK, resp. ve spojení s HPLC nebo FIA (průtokovou injekční analýzou) jakožto voltametrický detektor, kdy je ke vzorku přidán chinon. Ten v přítomnosti MK dává vysoký signál a metoda je citlivá. Další z možností je využití elektrody modifikované polypyrolem. Do vzorku s MK je přidán naftochinon, ethanol-1,2-dichlorethan a LiClO₄. Měření probíhá v režimu LSV a je velmi citlivé a přesné.

Nicméně, samostatně použité voltametrické stanovení je stejně jako u spektrofotometrických metod vhodné pouze k určení celkové kyselosti vzorku, tedy celkové koncentraci MK ve vzorku [72; 75].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité chemikálie, přístroje a pomůcky

2.1.1 Chemikálie

- Aceton, $\geq 99,5$ %; Honeywell (Seelze, Německo)
- Ethanol, 96 %; Lach-Ner, s.r.o. (Neratovice, Česká republika)
- Ethylacetát, $\geq 99,5$ %; Merck (Darmstadt, Německo)
- Hexan, 99 %; Fluka Chemie GmbH (Buchs, Švýcarsko)
- Hydrogenuhličitan sodný, 99,7–100,3 %; Merck (Darmstadt, Německo)
- Kyselina fosforečná, 85 %; Lachema (Brno, Česká republika)
- Kyselina chlorovodíková, 36 %; PENTA (Chrudim, Česká republika)
- Kyselina sírová, 96 %; PENTA (Chrudim, Česká republika)
- Methanol, $\geq 99,9$ % pro gradientovou eluci; Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
- Standard kyseliny laurové, čistá; Lach-Ner, s.r.o. (Neratovice, Česká republika)
- Standard kyseliny palmitové, ≥ 99 %; Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
- Standard kyseliny stearové, $\geq 98,5$ % pro kapilární GC; Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
- Standard uhlovodíků C₈-C₄₀, CPAchem (Stara Zagora, Bulharsko)
- Standard uhlovodíků C₁₁-C₁₆, CPAchem (Stara Zagora, Bulharsko)

2.1.2 Pomůcky

- Erlenmayerovy baňky
- Filtrační papíry
- Kádinky různých velikostí
- Mikropipety 10–100 μ l a 100–1000 μ l
- Mikrostríkačka 10 μ l pro dávkování kapaliny do GC
- Nálevka
- Odměrné baňky 25 ml, 50 ml a 100 ml
- Odměrný válec 50 ml
- pH papírky
- Skleněné pipety 1 ml a 2 ml
- Vialky 3 ml a 20 ml pro uchovávání extraktů, víčka se septem

- Vialky 1,5 ml s víčky se septem, pro analýzu na GC-MS
- Zkumavky

2.1.3 Přístroje

- Analytické váhy HR-120; ADInstruments Ltd (Dunedin, Nový Zéland)
- Autosampler COMBI PAL; CTC ANALYTICS GmbH (Zwingen, Švýcarsko)
- Plynový chromatograf GC-2010 s hmotnostním detektorem MS-QP2010; Shimadzu (Kjóto, Japonsko)
- Plynový chromatograf GC-2010 s plamenově ionizačním detektorem; Shimadzu (Kjóto, Japonsko)
- Termoblok Evaterm; Labicom (Olomouc, Česká republika)
- Třepačka Vibramax 100; Heidolph (Schwabach, Německo)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex; Bandelin Electronic GmbH & Co. (Berlín, Německo)

2.2 Použité vzorky

Pro extrakci mastných kyselin a následnou analýzu byly použity 4 vzorky obalů od vajec. Dva typy vzorků pocházely přímo od jednoho z výrobců, který používá separátory na bázi solí kyseliny palmitové a stearové (**Obrázky 9 a 10**) a dva vzorky měly neznámý původ (**Obrázky 11 a 12**)



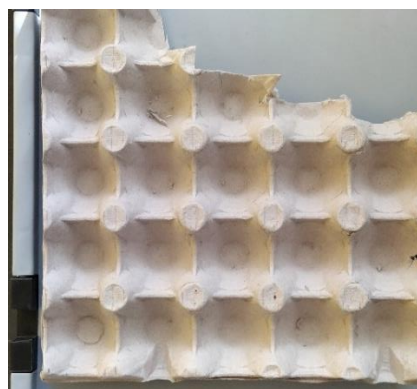
Obrázek 9: Vzorek od výrobce používající separátory na bázi solí PA a SA – tmavý.



Obrázek 10: Vzorek od výrobce používající separátory na bázi solí PA a SA – světlý.



Obrázek 11: Vzorek neznámého původu – tmavší.



Obrázek 12: Vzorek neznámého původu – světlejší.

2.3 Optimalizace GC-MS

Před samotnou optimalizací extrakce byly vytvořeny optimální podmínky pro měření na plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí. Pro tento účel byly připraveny zásobní roztoky standardů kyselin v ethanolu, jejichž příprava je popsána v následující kapitole.

2.3.1 Příprava standardů kyseliny stearové a palmitové

Pro optimalizaci podmínek na plynovém chromatografu byly připraveny oddělené zásobní roztoky standardů kyseliny stearové a kyseliny palmitové v ethanolu jako základním běžným rozpouštědlem. Nejprve byl připraven zásobní roztok o koncentraci 10 mg/ml do 100ml odměrné baňky navážením standardů kyselin na analytických vahách, kdy bylo naváženo 0,9982 g kyseliny stearové a 1,0166 g kyseliny palmitové. Tento zásobní roztok byl poté zředěn do 10ml odměrné baňky tak, aby byla koncentrace každé kyseliny 500 µg/ml.

2.3.2 Tvorba optimálních podmínek pro analýzu SA a PA na GC-MS

Optimalizace a následná analýza proběhla na plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí. Chromatograf byl opatřen kapilární kolonou SLB-5MS (Supelco; Bellefonte, PA, USA), která obsahovala zpolymerovanou stacionární fázi o složení 5 % difenyl a 95 % dimethyl siloxan. Kolona byla dlouhá 30 m, s vnitřním průměrem 0,25 mm a tloušťkou vnitřního filmu 0,25 µm. Nosným plynem bylo helium, jehož lineární rychlost průtoku byla konstantní, a sice 30 cm/s. V hmotnostním spektrometru byly analyty ionizovány pomocí elektronové ionizace s ionizační energií 70 eV a analyzovány kvadrupólovým analyzátozem.

K separaci mastných kyselin s dlouhým řetězcem byl zvolen teplotní gradient dle modifikované metody **M. R. Oveisi** *et al.* [64] v rozsahu od počáteční teploty 100 °C, která

byla udržována po dobu 2 min, do konečné teploty 300 °C, která se udržovala 5 min. Teplota se měnila rychlostí 15 °C/min.

Teplota nástřiku byla 230 °C, splitovací poměr 1:15 a teplota převodníku a iontového zdroje v hmotnostním spektrometru byla 200 °C. Měření bylo provedeno v režimu SCAN a byly snímány všechny ionty v rozmezí 41–300 m/z. “Solvent cut time“ byl nastaven na 6. minutu a detekce iontů započala od 6,6. minuty. Dávkované množství vzorku bylo 1 µl.

Následně byla měněna počáteční teplota kolony na hodnoty 120 °C, 140 °C a 160 °C. Byla stanovena optimální počáteční teplota kolony a sice 140 °C, kdy měly kyselina palmitová a stearová dostatečně odlišné a zároveň nejkratší retenční časy. Celkový čas analýzy pak činil 17,67 min.

2.4 Obecný postup analýzy mastných kyselin

Postup analýzy mastných kyselin v papírových obalech měl obecně tři hlavní části:

- I. Optimalizace extrakce: testování vybraných rozpouštědel, počtu extrakčních kroků, času extrakčního kroku a techniky extrakce (**Kapitola 2.5**).
- II. Aplikování optimalizované metody na extrakci mastných kyselin ze vzorků (**Kapitola 2.7**).
- III. Stanovení vyextrahovaných kyselin dvěma metodami (**Kapitola 3.3**), a sice:
 - a. Ve formě volných mastných kyselin (MK)
 - b. Ve formě methylesterů mastných kyselin (MEMK), které byly připraveny z extraktů získaných v bodě II.

2.5 Postup optimalizace extrakce mastných kyselin

Pro extrakci mastných kyselin ze vzorků byla testována 3 rozpouštědla: ethanol, aceton a ethylacetát. Tato rozpouštědla byla zvolena s ohledem na běžnou dostupnost, bezpečnost, toxicitu a dle schopnosti rozpouštět kyselinu stearovou a palmitovou. Rozpustnosti v jednotlivých rozpouštědlech jsou uvedeny v **Tabulka 3**. Extrakce byly provedeny na třepačce a pomocí ultrazvuku.

2.5.1 Extrakce na třepačce

Nejprve byly nastříhány vzorky obalů od vajec na čtverečky o velikosti 1x1 cm, kdy celková hmotnost nastříhaných kousků jednoho vzorku činila 1 g, což odpovídalo ploše obalu asi 25 cm². Vzorky byly zváženy na analytických vahách a převedeny do Erlenmayerových baněk.

Ke vzorku bylo následně přidáno odměrným válcem 30 ml rozpouštědla. Objem rozpouštědla byl zvolen s ohledem na spotřebu, zároveň však tak, aby byl dostačující pro extrakci. Poté bylo přidáno mikropipetou 100 µl 96% kyseliny sírové a kyselost roztoku byla zkontrolována pH papírkem (červené zbarvení). Vzorek byl okyselen aby došlo k uvolnění mastných kyselin ze solí.

Takto byly připraveny 4 vzorky, které byly umístěny na třepačku (**Obrázek 13**) po dobu 10; 20; 30 a 40 min při 900 ot/min. Po uplynutí jednotlivých dob byly extrakty přefiltrovány a převedeny do skleněných vialek s víčkem se septem a dále byly uchovávány v ledničce při teplotě 4 °C, do následné analýzy na GC-MS.



Obrázek 13: Třepačka Vibramax 100, Heildolph

2.5.2 Extrakce ultrazvukem

Postup přípravy vzorku byl obdobný jako u extrakce na třepačce. Ultrazvuková lázeň (**Obrázek 14**) byla naplněna vodou tak, aby dosahovala výšky rozpouštědla v Erlenmayerově baňce. Následně byly do lázně vloženy 4 vzorky a po dobu 5; 15; 25 a 35 minut byly sonifikovány. Postup po extrakci byl stejný jako u extrakce na třepačce.



Obrázek 14: Ultrazvuková lázeň Sonorex, Bandelin electronic

Takto připravené extrakty vzorků (připravených na třepačce a ultrazvuku) využívané pro zjištění optimálních podmínek extrakce byly proměřeny za podmínek uvedených v **Kapitole 2.3.2** na GC-MS pomocí autosampleru. Nutno podotknout, že tyto vzorky nebyly analyzovány ihned po přípravě, ale až po uplynutí 4–5 dnů.

Mastné kyseliny byly identifikovány pomocí knihovny spekter a pomocí vypočtených retenčních indexů dle Van den Doola a Kratze. Vzorec pro výpočet je uveden v následující rovnici:

$$RI_x = 100 \cdot n + 100(t_x - t_n)/(t_{n+1} - t_n)$$

n ... počet uhlíků v nejbližším alkanu před analyzovanou látkou

t_x ... retenční čas analyzované látky

t_n ... retenční čas nejbližšího alkanu před analyzovanou látkou

t_{n+1} ... retenční čas nejbližšího alkanu po analyzované látce

Pro určení retenčních časů alkanů byla zanalyzována za stejných podmínek jako analyty směs alkanů C₈–C₄₀ a vypočtené retenční indexy byly porovnány s publikovanými daty.

2.6 Příprava kalibračních roztoků

2.6.1 Příprava kalibračních roztoků pro stanovení MK ve formě volných kyselin

Do 6 Erlenmayerových baněk byl navážen 1 g nastříhaných obalů na vejce (kousky o velikosti 1x1 cm), u kterých předběžnými testy nebyly detekovány PA a SA (vzorky na **Obrázek 11** a **Obrázek 12**). Do šesti 25ml odměrných baněk byly připraveny kalibrační roztoky odpipetováním požadovaných objemů ze zásobního roztoku SA a PA v acetonu (5 mg/ml) o koncentracích 1,8 mg/ml, 0,9 mg/ml, 0,45 mg/ml, 0,225 mg/ml, 0,168 mg/ml a 0,12 mg/ml. Baňky byly acetonem doplněny po rysku, řádně promíchány a roztoky byly převedeny

do Erlenmayerových baněk. Do každé baňky pak bylo přidáno skleněnou pipetou 5 ml acetonu, čímž se koncentrace naředily na koncentrace 1,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,375 mg/ml, 0,1875 mg/ml, 0,140 mg/ml a 0,100 mg/ml a objem rozpouštědla byl 30 ml. Tímto byl nasimulován postup používaný pro extrakci mastných kyselin ze vzorků.

Do každé Erlenmayerovy baňky bylo přidáno 100 μ l H_3PO_4 , opatřily se zátkou a roztoky byly třepány po dobu 30 min na třepačce. Aceton a kyselina fosforečná, stejně jako doba extrakce byly zvoleny z důvodů uvedených v **Kapitole 3.1** pojednávající o výsledcích optimalizace extrakce mastných kyselin.

Po uplynutí 30 min byly roztoky přefiltrovány a převedeny do 20ml vialek opatřených víčkem se septem. K analýze na GC-MS bylo do 1,5 ml vialek odebráno 1 ml standardu a přidáno 40 μ l ze zásobního roztoku standardu kyseliny laurové o konc. 12 mg/ml, jako vnitřní standard (IS). Standardní roztoky byly proměřeny v režimu SIM, kdy byla vybrány ionty 43; 129; 256 a 284 a iont 129 byl poté použit jako kvantifikátor k odečtení ploch píků. Split poměr byl 1:50 a ostatní podmínky měření zůstaly stejné jako v **Kapitole 2.3.2**. Každý standardní roztok byl proměřen 6x.

2.6.2 Příprava kalibračních roztoků pro stanovení MK ve formě methylesterů

Kalibrační roztoky methylesterů byly připraveny z kalibračních roztoků připravených postupem v **Kapitole 2.6.1**. Derivatizace byla provedena modifikovaným postupem dle **N. Aldai et al.** [76].

Do zkumavky s víčkem byl nadávkován 1 ml kyselého methanolu (10 ml HCl na 100 ml methanolu) a poté bylo přidáno 200 μ l extraktu standardu. Roztok byl poté temperován

na 80 °C po dobu 40 min. Po uplynutí této doby byl roztok zneutralizován 1 ml nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a nakonec byly přidány 2 ml hexanu, do kterého byly vytřepány vzniklé methylestery. Hexanová vrstva byla odebrána skleněnou 2ml pipetou do 3ml vialek a roztoky byly uchovány pro další analýzu. Vytřepání do hexanu bylo opakováno ještě 2x pro zvýšení extrakční účinnosti. Takto bylo připraveno 6 kalibračních roztoků o koncentračních rozmezích 0,05–0,75 mg/ml.

K analýze na GC-MS bylo do 1,5ml vialky odebráno 1 ml kalibračního roztoku a přidáno 40 µl vnitřního standardu uhlovodíků C₁₁–C₁₆. Kalibrační roztoky byly proměřeny za podmínek v **Kapitole 2.3.2** v režimu SCAN, kdy solvent cut time byl nastaven na 8. minutu a měření iontů začalo od 8,5. minuty. Každý roztok byl proměřen 6x.

2.7 Příprava vzorků

K analýze byly připraveny 2 typy obalů na vejce: světlý a tmavý (viz **Obrázek 9** a **Obrázek 10**) od každého 3 kusy.

2.7.1 Extrakce mastných kyselin z reálných vzorků

Z každého kusu vzorku byl nastříhán dohromady 1 g kousků o velikosti 1x1 cm a to tak, že kousky byly odebrány a nastříhány z bočních i středních částí obalu.

Vzorky byly převedeny do 6 Erlenmayerových baněk a do každé z nich bylo přidáno přesně 30 ml acetonu a poté 100 µl kyseliny trihydrogenfosforečné. Baňky byly opatřeny zátkou a byly třepány 30 min při 900 ot./min. Po uplynutí této doby byly extrakty přefiltrovány a extrakce byla stejným způsobem opakována podruhé (z důvodů uvedených v **Kapitole 3.1**). Extrakty z obou kroků byly následně smíchány. Extrakty bylo nutné 5x zakoncentrovat pod dusíkem, protože se jejich koncentrace nacházely pod nejnižším bodem kalibrační závislosti.

K analýze na GC-MS bylo do 1,5 ml vialek odebráno 1 ml směšného extraktu a přidáno 40 µl ze zásobního roztoku standardu kyseliny laurové o konc. 12 mg/ml, jako vnitřní standard (IS). Každý vzorek byl proměřen 3x.

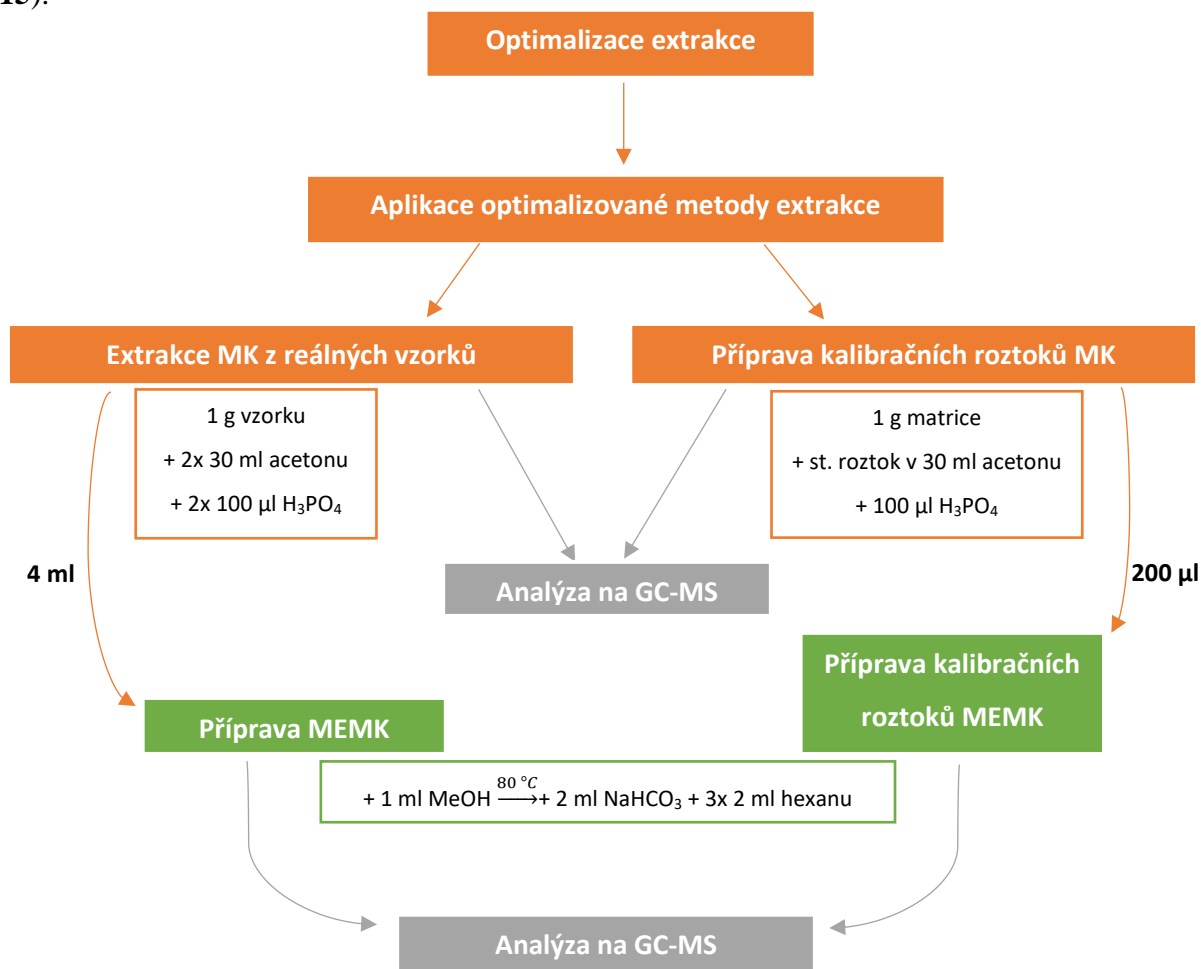
2.7.2 Příprava methylesterů mastných kyselin

Mastné kyseliny vyextrahované v roztocích připravených v **Kapitole 2.7.1** byly stejně jako kalibrační roztoky derivatizovány modifikovaným postupem dle N. Aldai *et al.* [76] s tím rozdílem, že místo 200 µl extraktu standardu byly odebrány 4 ml směšného extraktu vzorku.

Vzorky methylesterů byly proměřeny za podmínek v **Kapitole 2.3.2**, v režimu SCAN, kdy solvent cut time byl nastaven na 8. minutu a měření iontů začalo od 8,5. minuty. K analýze

na GC-MS bylo do 1,5ml vialky odebráno 1 ml vzorku a přidáno 40 μl vnitřního standardu uhlovodíků $\text{C}_{11}\text{--}\text{C}_{16}$. Každý vzorek byl proměřen 3x.

Celý postup analýzy mastných kyselin, od úpravy vzorků až po analýzu, zahrnující i rozdíly v přípravách standardů a reálných vzorků je pro přehlednost shrnut ve schématu níže (**Obrázek 15**).



Obrázek 15: Schéma postupu analýzy mastných kyselin v papírových obalech.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Optimalizace metody extrakce mastných kyselin

Byly optimalizovány 4 parametry pro extrakci mastných kyselin ze vzorků papírových obalů na vejce, tj. počet stupňů extrakce, čas extrakčního kroku, výběr vhodného rozpouštědla a výběr extrakční techniky, tedy třepačky nebo ultrazvuku.

Optimální počet stupňů, resp. kroků opakování extrakce, byl stanoven pomocí grafů, ve kterých je znázorněna závislost celkové plochy píků vyextrahovaných kyselin na počtu extrakčních kroků za použití různých časů jednoho extrakčního kroku. Sledováno je zmírnění nebo zastavení nárůstu ploch píků.

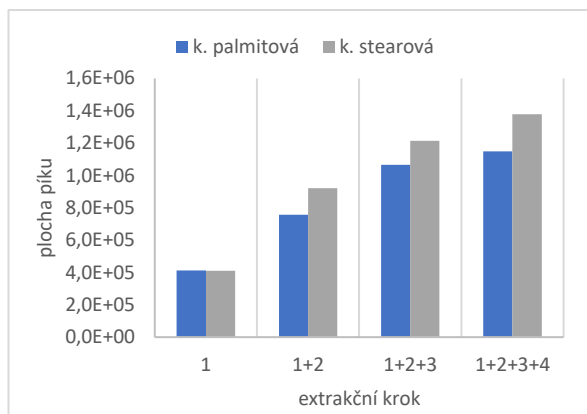
U extrakcí v **ethanolu na třepačce** je zřejmé, že se nárůst plochy píků, tedy koncentrace kyselin, mírně zastavuje při použití 3 extrakčních kroků u extrakce kyseliny palmitové. U extrakce kyseliny stearové není nárůst zastaven ani u 4. kroku s výjimkou delších dob extrakčních kroků, tj. 30 min a 40 min, kde je vidět mírné zmenšení růstu u 3. kroku. Tyto skutečnosti vyplývají z **Grafů 1–4**. Výtěžnosti jednotlivých extrakčních kroků vztahených k prvnímu kroku jsou uvedeny v **Tabulce 4**. Výtěžnost druhého extrakčního kroku je 61,3–86,0 % pro kyselinu palmitovou a 86,0–124,9 % pro kyselinu stearovou, u třetího kroku je výtěžnost 17,3–40,7 % pro PA a 21,0–40,6 % pro SA a čtvrtého kroku 5,4–13,3 % pro PA a 6,9–16,7 % pro SA.

Křivky u extrakce **acetonem na třepačce**, viz **Grafy 5–8**, už vykazují jasný trend, a sice výrazné zpomalení až úplné zastavení nárůstu koncentrace mezi 2. a 3. krokem, stejně tak 3. a 4. krokem. Výtěžnost druhého extrakčního kroku vzhledem k prvnímu je 5,8–29,3 % pro PA a 4,8–31,1 % pro SA. Co se týče použití 3 extrakčních kroků, nejvyšší výtěžnost je 4,3 % pro PA a 2 % pro SA za použití desetiminutové doby tohoto kroku. U delších časů již výtěžnost klesá až k nule. Použití čtvrtého extrakčního kroku již není třeba, protože výtěžnost jednotlivých kyselin je nulová (viz **Tabulka 5**).

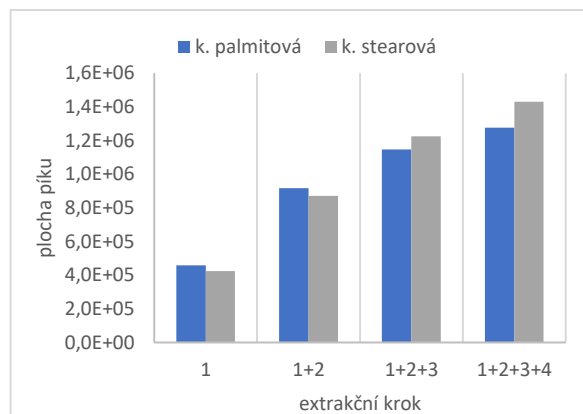
Stejný případ je i u extrakce **ethylacetátem na třepačce (grafy 9–12)**, kde se i výtěžnosti jednotlivých extrakčních kroků pohybují v podobných hodnotách jako u extrakce na třepačce v acetonu, viz **Tabulka 6**.

Celkové množství vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků:

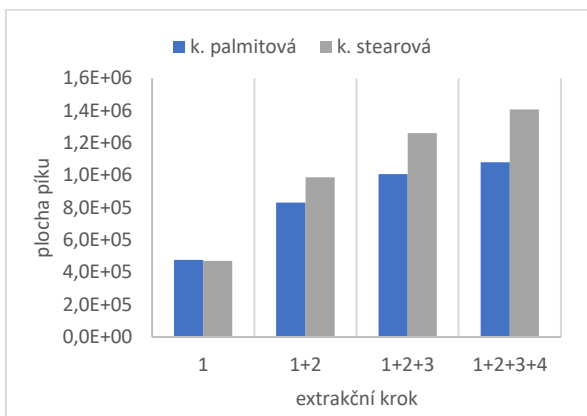
ETHANOL, TŘEPAČKA



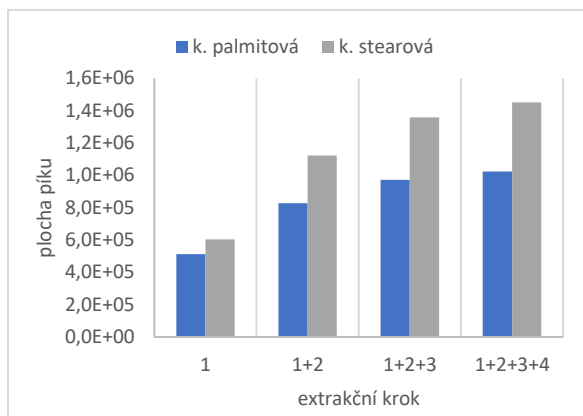
Graf 1: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethanol, třepačka, 10 min.



Graf 2: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethanol, třepačka, 20 min



Graf 3: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethanol, třepačka, 30 min.



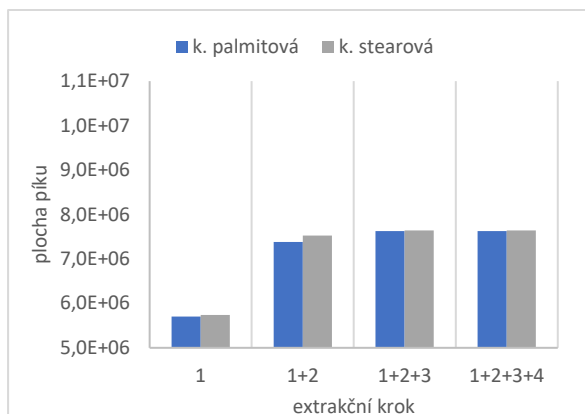
Graf 4: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethanol, třepačka, 40 min.

Tabulka 4: Výtěžnost extrakčních kroků vztažené k prvnímu extrakčnímu kroku: ethanol, třepačka.

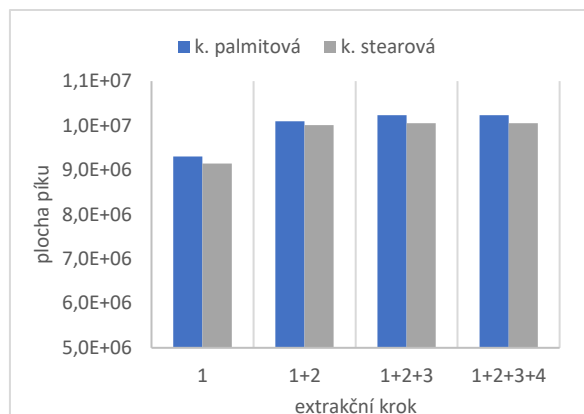
Čas extrakce	10 min		20 min		30 min		40 min	
	PA	SA	PA	SA	PA	SA	PA	SA
Extrakční krok	Výtěžnost extrakčního kroku (%)							
2	83,4	124,9	61,3	105,4	74,5	109,4	61,3	86,0
3	40,7	31,9	31,1	40,6	21,3	27,8	17,3	21,0
4	7,8	13,4	13,3	16,7	7,3	11,5	5,4	6,9

Celkové množství vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků:

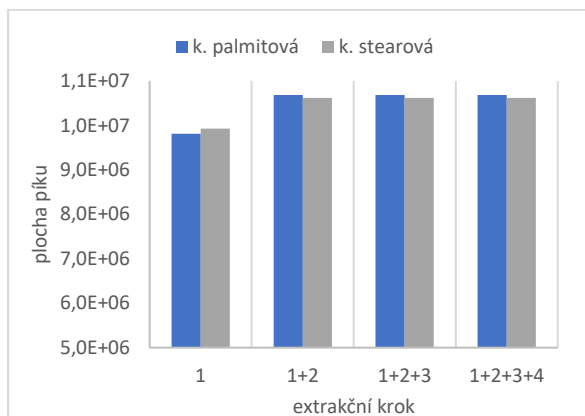
ACETON, TŘEPAČKA



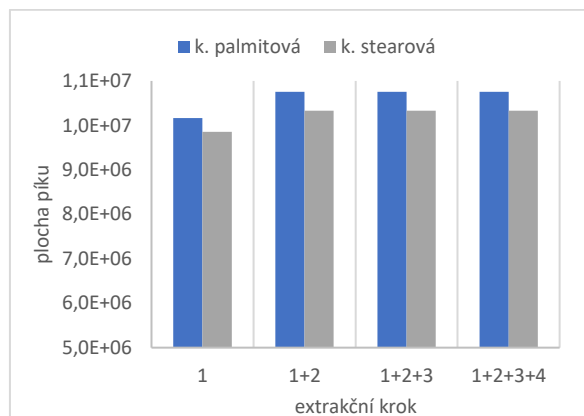
Graf 5: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: aceton, třepačka, 10 min



Graf 6: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: aceton, třepačka, 20 min



Graf 7: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: aceton, třepačka, 30 min



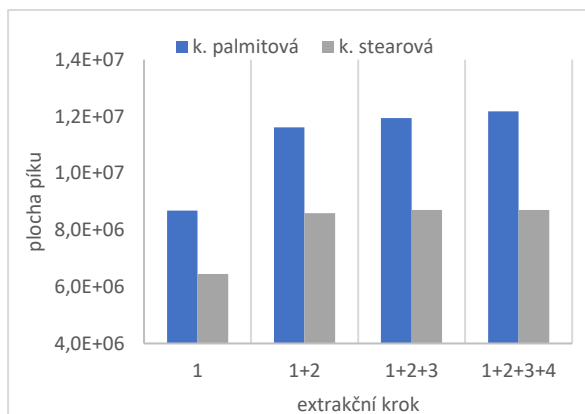
Graf 8: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: aceton, třepačka, 40 min

Tabulka 5: Výtěžnost extrakčních kroků vztažené k prvnímu extrakčnímu kroku: aceton, třepačka.

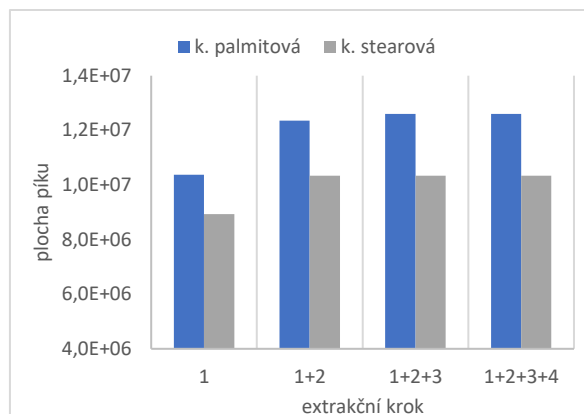
Čas extrakce	10 min		20 min		30 min		40 min	
	PA	SA	PA	SA	PA	SA	PA	SA
Extrakční krok	Výtěžnost extrakčního kroku (%)							
2	29,3	31,1	8,5	9,4	8,9	6,9	5,8	4,8
3	4,3	2,0	1,5	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Celkové množství vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků:

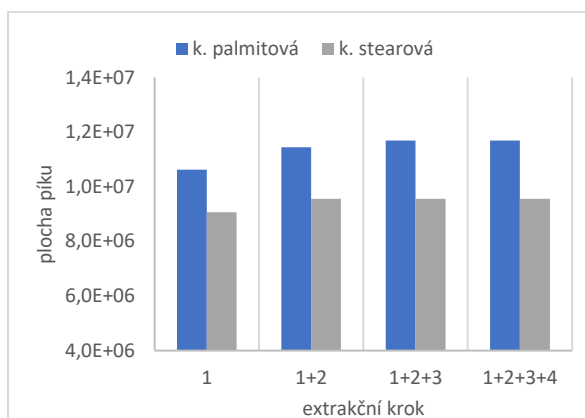
ETHYLACETÁT, TŘEPAČKA



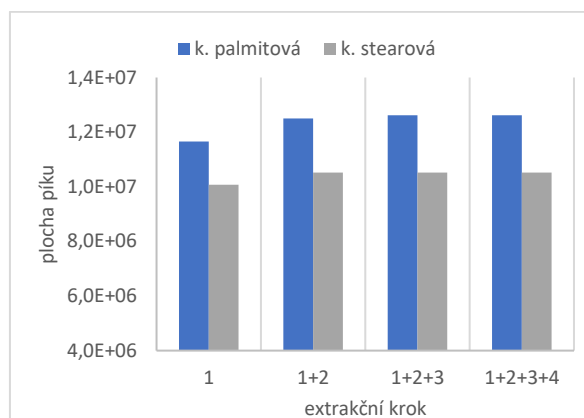
Graf 9: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethylacetát, třepačka, 10 min.



Graf 10: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethylacetát, třepačka, 20 min.



Graf 11: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethylacetát, třepačka, 30 min.



Graf 12: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethylacetát, třepačka, 40 min.

Tabulka 6: Výtěžnost extrakčních kroků vztažené k prvnímu extrakčnímu kroku: ethylacetát, třepačka.

Čas extrakce	10 min		20 min		30 min		40 min	
	PA	SA	PA	SA	PA	SA	PA	SA
Extrakční krok	Výtěžnost extrakčního kroku (%)							
2	33,7	33,3	19,1	15,7	7,7	5,4	7,2	4,4
3	3,8	1,7	2,4	0,0	2,3	0,0	1,0	0,0
4	2,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

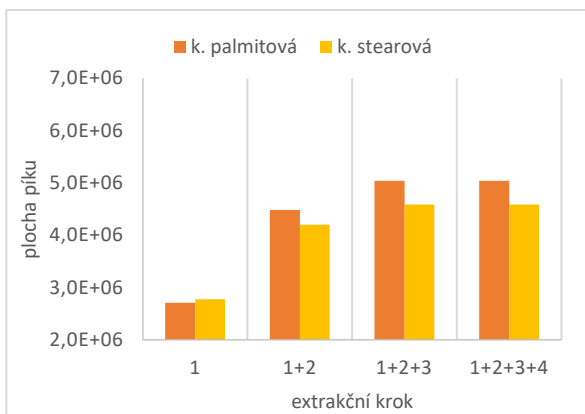
Co se týče extrakcí s pomocí **ultrazvuku**, většina křivek vykazuje obdobný trend jako u extrakcí na třepačce, s výjimkou extrakce v **ethanolu** při pětiminutovém extrakčním kroku, kdy mezi 2. a 3. extrakčním krokem křivka ještě mírně roste a výtěžnost třetího kroku činí 20,6 % pro kyselinu palmitovou a 13,8 % pro kyselinu stearovou, viz **Grafy 13–16** a **Tabulka 7**.

Při použití **acetonu** jako rozpouštědla je výtěžnost kyseliny palmitové v druhém extrakčním kroku 6,3–26,9 % a výtěžnost kyseliny stearové 1,8–14,4 %, viz **Tabulka 8**. Mezi 2.–3. a 3.–4. krokem nenarůstá koncentrace vůbec (výjimkou je 5,3% výtěžnost u třetího 5min kroku) viz **Grafy 17–20**. Koncentrace kyseliny stearové při použití 15min extrakčního kroku mezi 1. a 2. krokem téměř vůbec nenarostla (výtěžnost druhého kroku 2,9 %), stejně jako u 25 min a 35 min (výtěžnosti 2,6 % a 1,8 %).

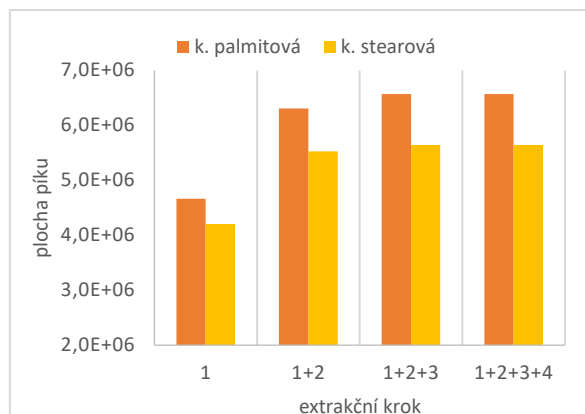
U extrakce v **ethylacetátu** činí výtěžnost druhého extrakčního kroku 8,2–22,4 % pro kyselinu palmitovou a 6,1–17,1 % pro kyselinu stearovou, třetího extrakčního kroku max. 4,5 % a čtvrtého max 0,8 % (**Tabulka 9**). **Grafy 21–24** vykazují zastavení růstu velikostí ploch píků po druhém extrakčním kroku.

Celkové množství vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků:

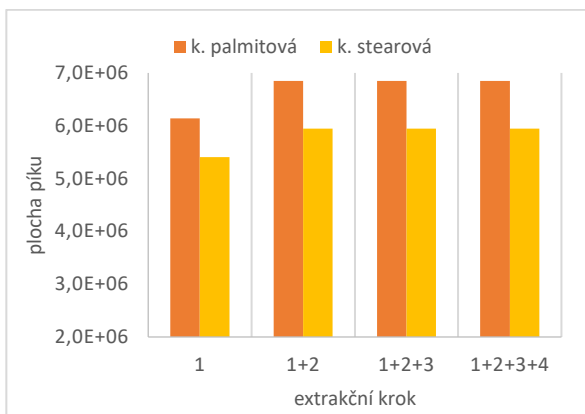
ETHANOL, ULTRAZVUK



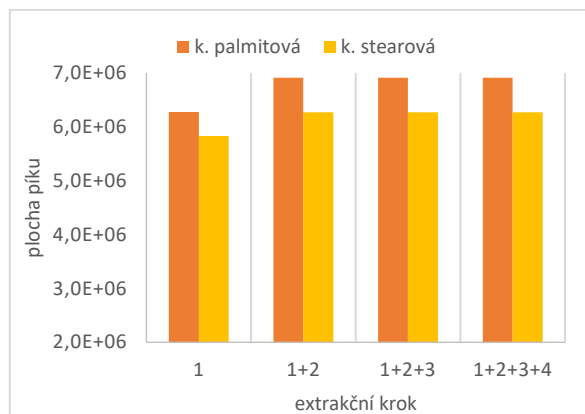
Graf 13: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethanol, ultrazvuk, 5 min.



Graf 14: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethanol, ultrazvuk, 15 min.



Graf 15: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethanol, ultrazvuk, 25 min.



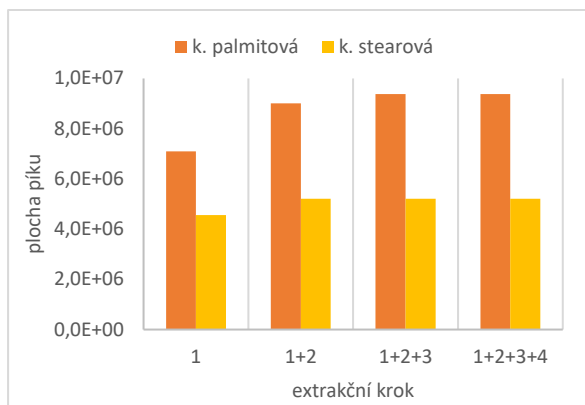
Graf 16: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethanol, ultrazvuk, 35 min.

Tabulka 7: Výtěžnost extrakčních kroků vztažené k prvnímu extrakčnímu kroku: ethanol, ultrazvuk.

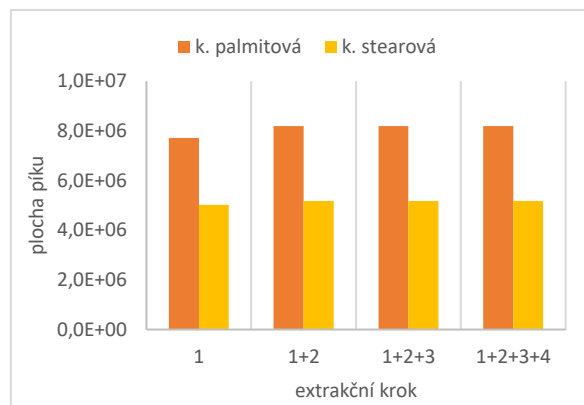
Čas extrakce	5 min		15 min		25 min		35 min	
	PA	SA	PA	SA	PA	SA	PA	SA
Extrakční krok	Výtěžnost extrakčního kroku (%)							
2	65,7	51,5	35,3	31,34	11,5	9,9	10,2	7,6
3	20,6	13,8	5,7	2,8	0,0	0,0	0,0	0,0
4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Celkové množství vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků:

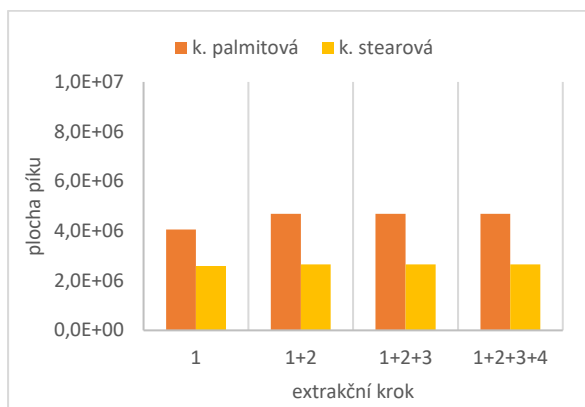
ACETON, ULTRAZVUK



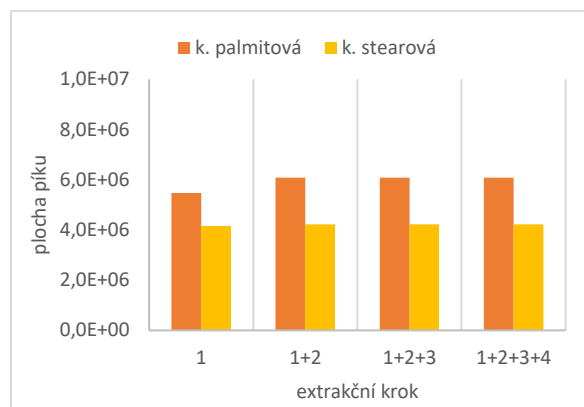
Graf 17: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: aceton, ultrazvuk, 5 min.



Graf 18: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: aceton, ultrazvuk, 15 min.



Graf 19: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: aceton, ultrazvuk, 25 min.



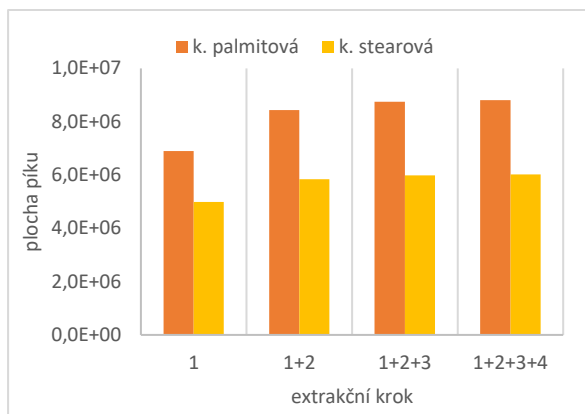
Graf 20: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: aceton, ultrazvuk, 35 min.

Tabulka 8: Výtěžnost extrakčních kroků vztažené k prvnímu extrakčnímu kroku: aceton, ultrazvuk.

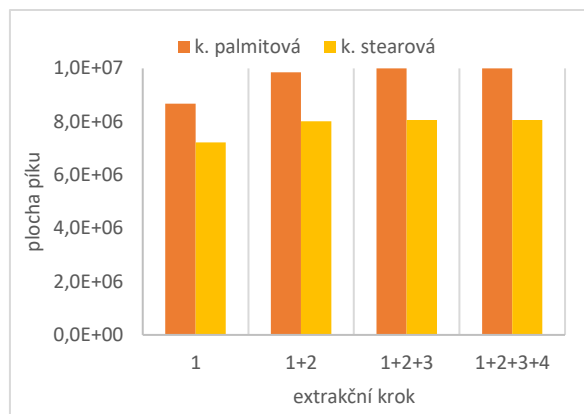
Čas extrakce	5 min		15 min		25 min		35 min	
	PA	SA	PA	SA	PA	SA	PA	SA
Extrakční krok	Výtěžnost extrakčního kroku (%)							
2	26,9	14,4	6,3	2,9	15,8	2,6	11,4	1,8
3	5,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Celkové množství vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků:

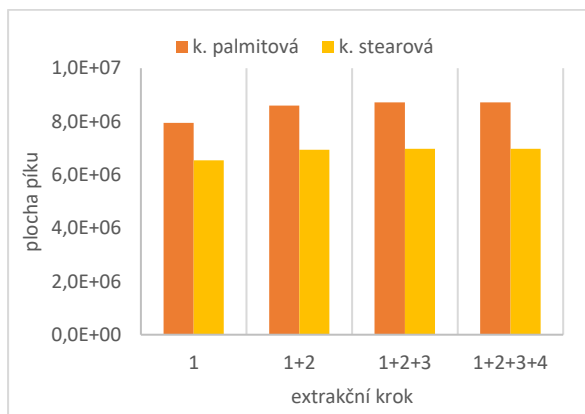
ETHYLACETÁT, ULTRAZVUK



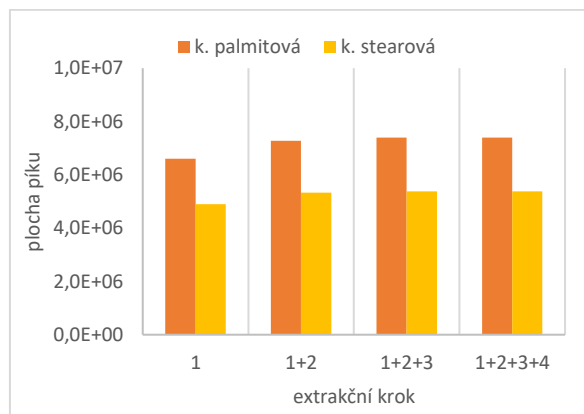
Graf 21: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethylacetát, ultrazvuk, 5 min.



Graf 22: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethylacetát, ultrazvuk, 15 min.



Graf 23: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethylacetát, ultrazvuk, 25 min.



Graf 24: Plocha píku vyextrahovaných kyselin v závislosti na počtu extrakčních kroků: ethylacetát, ultrazvuk, 35 min.

Tabulka 9: Výtěžnost extrakčních kroků vztažené k prvnímu extrakčnímu kroku: ethylacetát, ultrazvuk.

Čas extrakce	5 min		15 min		25 min		35 min	
	PA	SA	PA	SA	PA	SA	PA	SA
Extrakční krok	Výtěžnost extrakčního kroku (%)							
2	22,4	17,1	13,6	10,8	8,2	6,1	10,3	8,8
3	4,5	2,9	1,8	0,8	1,5	0,6	1,7	0,8
4	0,8	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Z experimentálních dat tedy plyne, že optimální počet extrakcí je dva, kde mezi druhým a třetím, resp. třetím a čtvrtým extrakčním krokem plocha narůstala již minimálně nebo vůbec. Výjimkou je extrakce pomocí ethanolu na třepačce, kde jsou minimálně 3 extrakční kroky nutné. Je patrné, že při použití delších časů extrakčního kroku klesá výtěžnost jednotlivých opakovaných kroků.

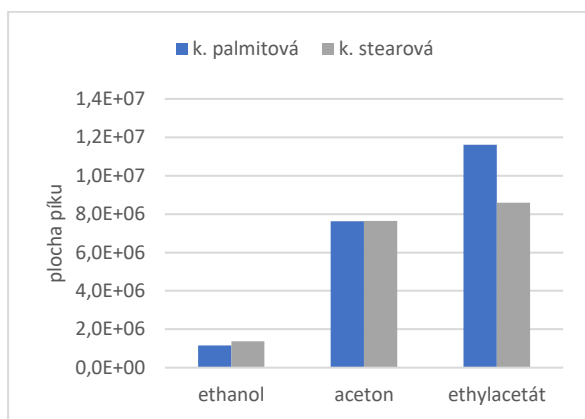
Dále bylo zvoleno vhodné rozpouštědlo, doba extrakčního kroku a extrakční technika pomocí porovnání ploch píků kyselin v jednotlivých rozpouštědlech a za použití různých technik. Porovnání je vyjádřeno pomocí sloupcových grafů.

V **Grafech 25–28** jsou znázorněny plochy píků kyselin v jednotlivých rozpouštědlech za použití různých časů na **třepačce**. Mezi 10. a 20. minutou byl pozorován významný přírůstek, po 20. minutě již ne. Rozdíl ve vyextrahovaných množstvích mezi 20min a 40min extrakcí je 1,2 % ve prospěch kyseliny palmitové a 1,8 % ve prospěch kyseliny stearové. Tento rozdíl je v tomto případě zanedbatelný a navíc zde hraje roli i časová úspora. Optimální čas extrakčního kroku tedy činí 20 minut. Druhou největší výtěžnost měla extrakce v acetonu při délce extrakčního kroku 30 min (po 30. minutě byl nárůst koncentrací zanedbatelný), přičemž kyseliny stearové se vyextrahovalo o 9,93 % více než v ethylacetátu při stejné době. Nejmenší výtěžnost kyselin byla v ethanolu.

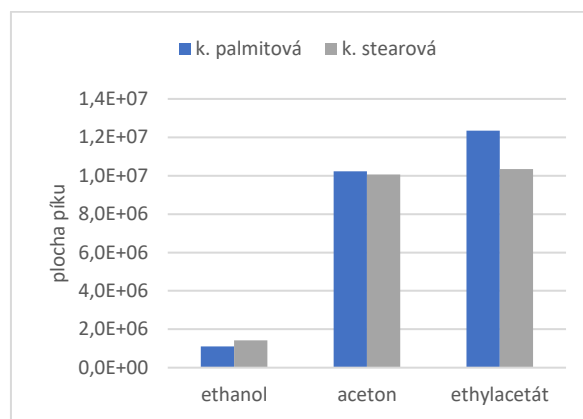
Při **ultrazvukově asistované** extrakci se nejvíce PA a SA vyextrahovalo opět v ethylacetátu při 15min extrakčním kroku, viz **Grafy 29–32**. Hodnoty v grafech vykazují zvláštní trend, kdy u acetonu s rostoucí délkou extrakčního kroku klesá výtěžnost kyselin, stejně tak od 25. minuty u ethylacetátu. Tato skutečnost může být způsobena tvorbou esterů, na kterou se přišlo posléze při proměňování těchto vzorků, což bude blíže objasněno později v textu.

Největší extrakční schopnost pro obě kyseliny (ať už při použití třepačky nebo ultrazvuku) měl tedy ethylacetát, což odpovídá i největší rozpustnosti kyselin právě v tomto rozpouštědle (oproti acetonu a ethanolu) uvedené v dostupné literatuře [23] [25] [26]. Z grafů vyplývá i optimální doba extrakčního kroku, a sice 20 min v ethylacetátu na třepačce nebo 15 min na ultrazvuku ve stejném rozpouštědle.

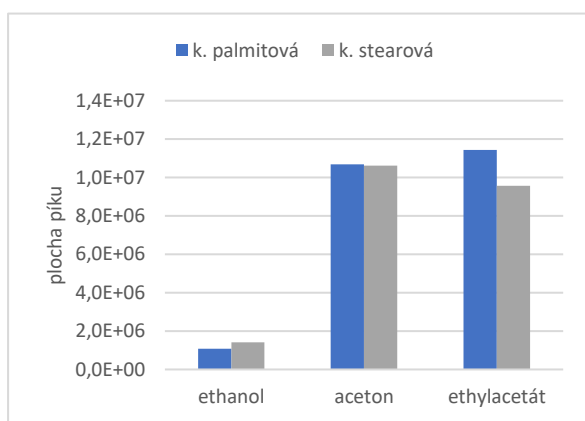
TŘEPAČKA



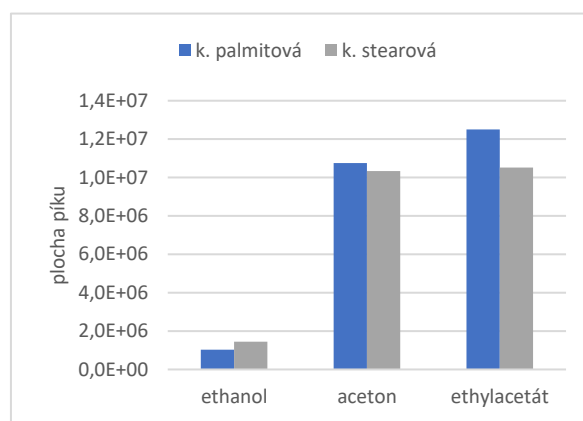
Graf 25: Celkové množství vyextrahovaných kyselin na **třepečce** do jednotlivých rozpouštědel (délka extrakčního kroku: **10 min**).



Graf 26: Celkové množství vyextrahovaných kyselin na **třepečce** do jednotlivých rozpouštědel (délka extrakčního kroku: **20 min**).

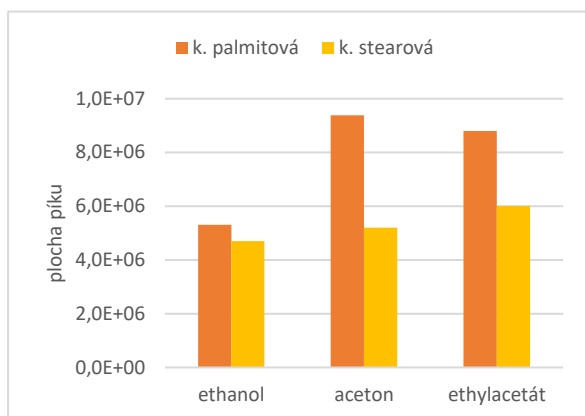


Graf 27: Celkové množství vyextrahovaných kyselin na **třepečce** do jednotlivých rozpouštědel (délka extrakčního kroku: **30 min**).

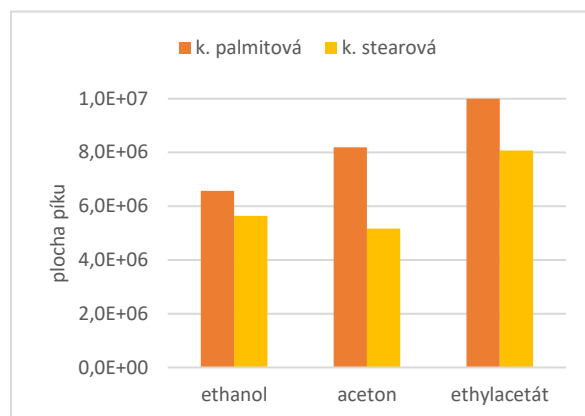


Graf 28: Celkové množství vyextrahovaných kyselin na **třepečce** do jednotlivých rozpouštědel (délka extrakčního kroku: **40 min**).

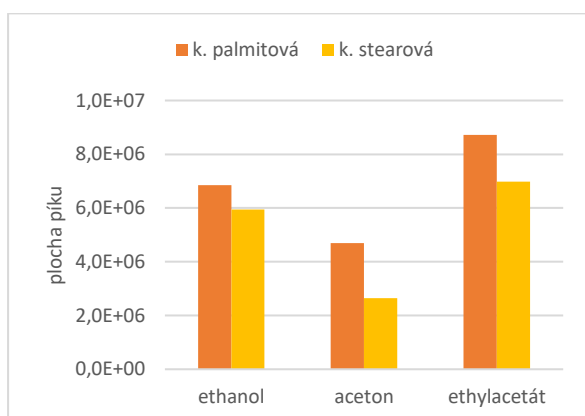
ULTRAZVUK



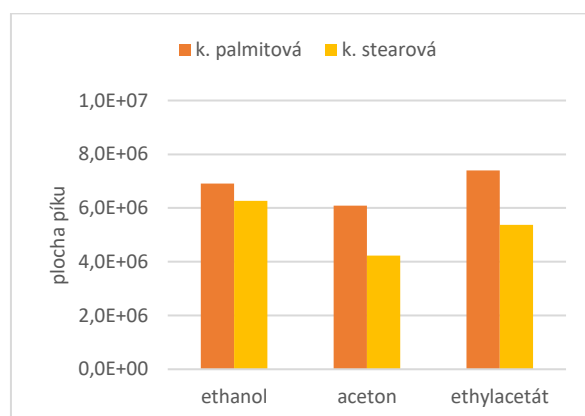
Graf 29: Celkové množství vyextrahovaných kyselin na **ultrazvuku** do jednotlivých rozpouštědel (délka extrakčního kroku: **5 min**).



Graf 30: Celkové množství vyextrahovaných kyselin na **ultrazvuku** do jednotlivých rozpouštědel (délka extrakčního kroku: **15 min**).



Graf 31: Celkové množství vyextrahovaných kyselin na **ultrazvuku** do jednotlivých rozpouštědel (délka extrakčního kroku: **25 min**).

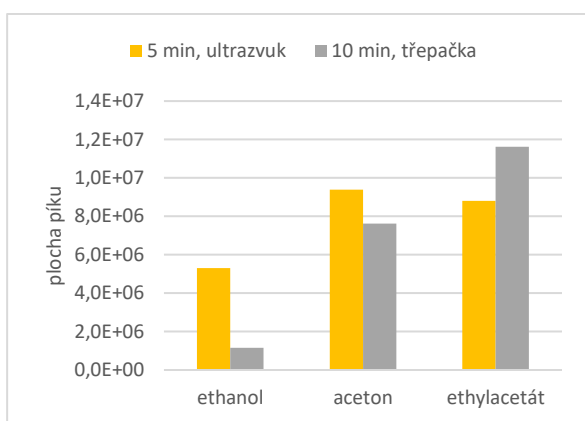


Graf 32: Celkové množství vyextrahovaných kyselin na **ultrazvuku** do jednotlivých rozpouštědel (délka extrakčního kroku: **35 min**).

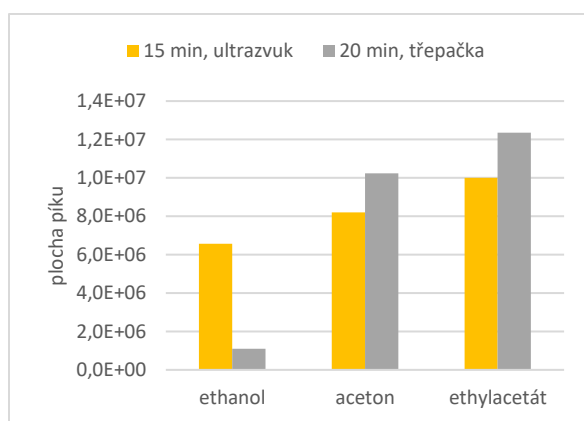
Největší extrakční schopnost pro obě kyseliny (ať už při použití třepačky nebo ultrazvuku) měl tedy ethylacetát, což odpovídá i největší rozpustnosti kyselin právě v tomto rozpouštědle (oproti acetonu a ethanolu) uvedené v dostupné literatuře [23] [25] [26]. Z grafů vyplývá i optimální doba extrakčního kroku, a sice 20 min v ethylacetátu na třepačce nebo 15 min na ultrazvuku ve stejném rozpouštědle.

Jako poslední optimalizační parametr bylo rozhodování mezi 2 použitými technikami, třepačkou a ultrazvukem, a zároveň, zda by mohla být výtěžnost extrakce vyšší i za použití kratšího času ultrazvukování, než na třepačce. Na grafech níže (**Grafy 33–36**) je toto porovnání vyjádřeno pro jednotlivá rozpouštědla a kyseliny porovnáním ploch píků kyselin.

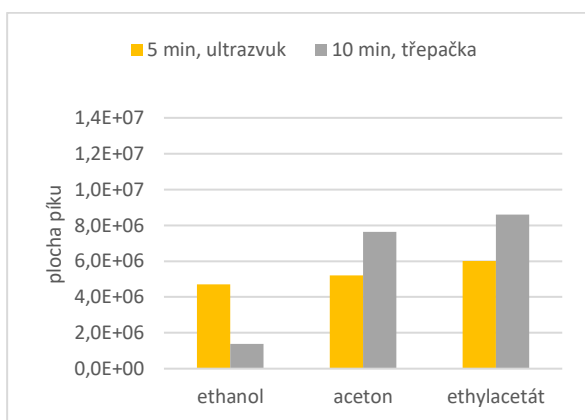
Obecně vzato byla extrakce účinnější pro obě kyseliny na třepačce, jak můžeme vidět na šedých sloupcích, které odpovídají plochám píků kyseliny palmitové (**Grafy 33 a 34**) a stearové (**Grafy 35 a 36**). Nicméně, u ethanolu jednoznačně vychází, že je výhodnější použít extrakci pomocí ultrazvuku a lze dokonce použít i kratší časy, než při extrakci na třepačce a i přesto je výtěžnost vyšší o 71–85 % pro obě kyseliny. U ostatních rozpouštědel je lepší zvolit extrakci na třepačce, kdy i při delší době extrakčního kroku na ultrazvuku, než na třepačce, je výtěžnost vyšší při použití třepačky. Z uvedených dat tedy plyne, že optimální metodou pro extrakci MK je dvoukroková extrakce ethylacetátem na třepačce s délkou jednoho extrakčního kroku 20 min.



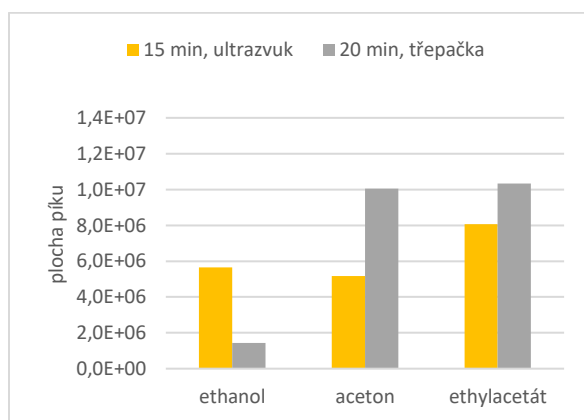
Graf 33: Porovnání výtěžností extrakce pro KYSELINU PALMITOVOU: 5 min na ultrazvuku vs. 10 min na třepačce.



Graf 34: Porovnání výtěžností extrakce pro KYSELINU PALMITOVOU: 15 min na ultrazvuku vs. 20 min na třepačce.



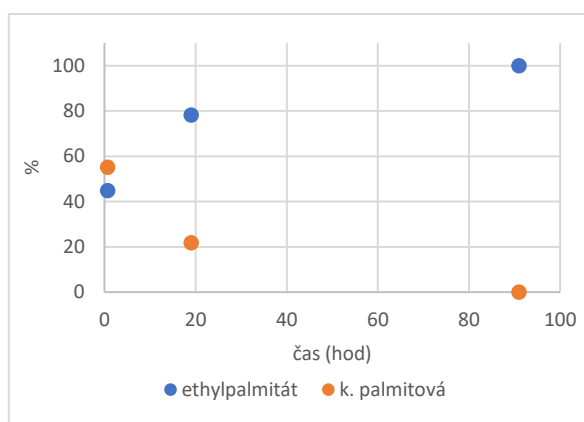
Graf 35: Porovnání výtěžností extrakce pro KYSELINU STEAROVOU: 5 min na ultrazvuku vs. 10 min na třepačce.



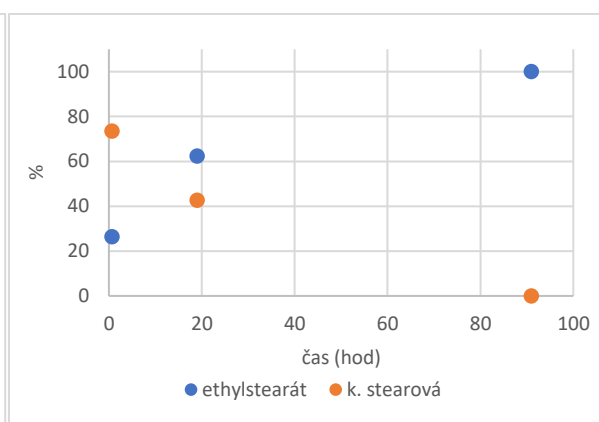
Graf 36: Porovnání výtěžností extrakce pro KYSELINU STEAROVOU: 15 min na ultrazvuku vs. 20 min na třepačce.

Při porovnání píků s knihovnou spekter a porovnáním vypočtených retenčních indexů s indexy z knihovny NIST bylo zjištěno, že se ve všech rozpouštědlech vytvořily estery stanovovaných kyselin. Jelikož byly vzorky proměřeny po 4–5 dnech od vytvoření zjišťovalo se, zda se estery tvoří ihned po vytvoření extraktu nebo až po uplynuté době. Pro tyto účely byly vytvořeny grafy závislosti plochy píku kyseliny a esteru na čase.

Byl připraven standardní roztok 1,5 mg/ml obou kyselin v ethylacetátu a bylo přidáno 100 µl 96% kyseliny sírové. Jelikož byl ethylacetát vyhodnocen jako nejlepší rozpouštědlo, bylo ověření esterifikace provedeno v něm. Tento roztok byl třepán po dobu 20 min a za dalších 20 min byl proměřen. Další proměření proběhlo po 19 hodinách a po dalších 3 dnech (měřeno po víkendu ráno), přičemž vzorky byly po celou dobu ponechány při laboratorní teplotě.



Graf 38: Závislost tvorby esteru/úbytku kyseliny palmitové na čase.



Graf 37: Závislost tvorby esteru/úbytku kyseliny stearové na čase.

Již po 40 minutách od smíchání standardu s ethylacetátem a přidání kyseliny sírové byl poměr ester:kyselina 45:55 u k. palmitové (**Graf 37**) a 26:74 u k. stearové (**Graf 38**). Estery se tedy tvoří prakticky hned po uvolnění kyselin do rozpouštědla. Dále je vidět, že úplná esterifikace proběhla po necelých 4 dnech. Estery vznikaly ve všech 3 rozpouštědlech, dokonce i v acetonu, kdy se extrakty po 2 týdnech zbarvily do sytě hnědé barvy, viz **Příloha 1** a **Příloha 2**. Byla provedena i analýza rozpouštědla, která vyloučila kontaminaci acetonu jiným rozpouštědlem.

Z tohoto důvodu byla kyselina sírová nahrazena nereaktivní kyselinou trihydrogenfosforečnou. Jak v roztoku standardu v acetonu s H_3PO_4 , tak v extraktu vzorku v acetonu okyseleného k. trihydrogenfosforečnou nebyly nalezeny estery mastných kyselin. Pokus byl zopakován i pro roztok standardu v ethylacetátu, nicméně tam se estery tvořily, proto se přistoupilo k použití acetonu jako rozpouštědla pro extrakci MK ze vzorků po okyselení kyselinou trihydrogenfosforečnou. **Aceton** měl na třepačce porovnatelně dobré extrakční schopnosti vzhledem k ethylacetátu a jako optimální extrakční doba byla zvolena **2x 30 minut**.

3.2 Validace metody

Validace metody byla provedena podle normy ISO/IEC 17025 s pomocí Horwitzova vztahu [77] a testovala se opakovatelnost metody:

$$HorRat = \frac{RSD_R}{PRSD_R}$$

RSD_R (%)...relativní směrodatná odchylka hodnot získaných experimentálně

$$RSD_R = 100 \times \frac{s}{\bar{x}}$$

kde s je směrodatná odchylka a \bar{x} je průměr naměřených hodnot.

$PRSD_R$ (%) ... teoretická relativní směrodatná odchylka

$$PRSD_R = 2^{(1-0,5\log C)}$$

kde C je koncentrace vyjádřena v bezjednotkové formě (hmotnostní zlomek)

Hodnoty HorRat představují referenční hodnoty pro laboratorní kontrolu kvality. Dle Horwitze je metoda opakovatelná, pokud se hodnoty HorRat pohybují v rozmezí 0,3–1,3. Hodnoty nad 1,3 mohou značit odlišnosti v přípravě vzorku, nekontrolované časy a teploty, rozdíly v koncentracích a objemech či neúplné extrakce. Hodnotu mohou ovlivňovat i nečistoty na laboratorním nádobí. Hodnoty pod 0,3 mohou značit nenahlášené průměrování nebo také výbornou přesnost přípravy vzorků [77].

Dle AOAC (Association of Official Analytical Chemists) je možné hodnoty $PRSD_R$ vynásobit ½. AOAC se domnívá, že pro opakovatelnost představují poloviční hodnoty $PRSD_R$ nejlepší případ [77].

3.2.1 Validace metody pro přímé stanovení mastných kyselin

Z regresní rovnice kalibrační závislosti byly zpětně vypočítány koncentrace jednotlivých analytů v extraktech a následně byly dopočítány (relativní) směrodatné odchylky a validační parametry z Horwitzova vztahu (**Tabulka 10**).

Tabulka 10: Validace metody pro stanovení mastných kyselin ve formě MK: validační kritéria dle Horwitz [77].

OPAKOVATELNOST											
KYSELINA PALMITOVÁ						KYSELINA STEAROVÁ					
Skutečná koncentrace (mg/ml)			Skutečná koncentrace (mg/ml)			Skutečná koncentrace (mg/ml)			Skutečná koncentrace (mg/ml)		
0,100	0,140	0,188	0,375	0,750	1,501	0,100	0,140	0,188	0,376	0,751	1,502
Skutečná koncentrace (w%)						Skutečné koncentrace (w%)					
0,013	0,018	0,024	0,048	0,096	0,191	0,013	0,018	0,024	0,048	0,096	0,192
Průměr vypočtených koncentrací (w%)						Průměr vypočtených koncentrací (w%)					
0,015	0,018	0,024	0,050	0,087	0,195	0,011	0,017	0,023	0,049	0,102	0,189
Rozdíl mezi vypočítanou a skutečnou koncentrací (%)						Rozdíl mezi vypočítanou a skutečnou koncentrací (%)					
15,987	0,026	2,225	5,188	-8,852	1,783	-12,893	-7,603	-4,490	1,907	6,317	-1,505
Směrodatná odchylka s ($\times 10^{-4}$)						Směrodatná odchylka s ($\times 10^{-3}$)					
6,6	6,2	4,7	32,2	25	46,5	0,32	0,61	1,10	2,48	4,02	9,39
RSD _r (%)						RSD _r (%)					
4,45	3,46	1,91	6,39	2,86	2,39	2,91	3,72	4,81	5,07	3,94	4,97
RSD _{HOR} (Horwitz)						RSD _{HOR} (Horwitz)					
7,71	7,33	7,02	6,32	5,69	5,13	7,71	7,33	7,01	6,32	5,69	5,13
HorRat (RSD _r /RSD _{HOR})						HorRat (RSD _r /RSD _{HOR})					
0,58	0,47	0,27	1,02	0,50	0,47	0,38	0,51	0,69	0,81	0,69	0,97

Do rozmezí 0,3–1,3 zapadají všechny vypočítané hodnoty, s výjimkou koncentrace 0,188 mg/ml u kyseliny palmitové, kde se poměr HorRat pohybuje těsně pod hodnotou 0,3, což v podstatě značí přílišnou přesnost.

Dále byly sestrojeny kalibrační křivky (**Příloha 4 a Příloha 5**), určeny parametry regrese a stanoveny limity kvantifikace a limity detekce (viz **Tabulka 11**). Limit kvantifikace (LOQ) byl stanoven jako první bod kalibrační přímky a limit detekce (LOD) vypočítán z rovnice níže:

$$LOD = \frac{(a + 3 \times s_a)}{b}$$

a úsek přímky

b směrnice přímky

s_a..... směrodatná odchylka úseku

Tabulka 11: Parametry regrese, LOD a LOQ kyseliny palmitové a stearové.

	Kyselina palmitová	Kyselina stearová
Rovnice regrese	y = 1,6393x - 0,0659	y = 1,327x - 0,0144
Koeficient determinace	0,9964	0,9979
LOD (mg/ml)	0,024	0,039
LOQ (mg/ml)	0,100	0,100

3.2.2 Validace metody pro stanovení MK jako methylesterů

Po derivatizaci mastných kyselin, tedy methylaci, bylo zjištěno, že se methylestery v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru ionizovaly mnohem lépe, než samotné mastné kyseliny, což dovolilo proměřit standardy (a posléze i vzorky) v režimu SCAN. Validace byla provedena stejným způsobem jako při validaci extrakce MK bez derivatizace s výjimkou použití jiného koncentračního rozmezí standardů. Výsledky validačních kritérií této metody jsou uvedeny v **Tabulce 12**.

Tabulka 12: Validace metody pro stanovení mastných kyselin ve formě methylesterů: validační kritéria dle Horwitz [77].

OPAKOVATELNOST											
METHYLPALMITÁT						METHYLSTEARÁT					
Skutečná koncentrace (µg/ml)			Skutečná koncentrace (µg/ml)			Skutečná koncentrace (µg/ml)			Skutečná koncentrace (µg/ml)		
5,002	10,004	14,006	18,758	37,515	75,030	5,008	10,016	14,022	18,780	37,560	75,120
Skutečná koncentrace (w% × 10 ⁻⁴)						Skutečné koncentrace (w% × 10 ⁻⁴)					
6,38	12,76	17,86	23,93	47,85	95,70	6,39	12,78	17,89	23,95	47,91	95,82
Průměr vypočtených koncentrací (w% × 10 ⁻⁴)						Průměr vypočtených koncentrací (w% × 10 ⁻⁴)					
5,47	13,43	18,02	22,43	50,38	94,76	6,10	13,33	17,89	22,55	49,57	95,28
Rozdíl mezi vypočítanou a skutečnou koncentrací (%)						Rozdíl mezi vypočítanou a skutečnou koncentrací (%)					
-14,225	5,287	0,856	-6,269	5,279	-0,988	-4,430	4,377	0,026	-5,860	3,459	-0,557
Směrodatná odchylka s (× 10 ⁻⁵)						Směrodatná odchylka s (× 10 ⁻⁵)					
1,3	1,5	1,4	0,8	1,4	3,3	2,2	2,5	1,8	5,2	3,9	5,6
RSD _r (%)						RSD _r (%)					
2,37	1,13	0,80	0,34	0,28	0,35	3,53	1,91	1,01	2,29	0,79	0,58
RSD _{HOR} (Horwitz)						RSD _{HOR} (Horwitz)					
12,11	10,91	10,37	9,92	8,94	8,05	12,10	10,90	10,37	9,92	8,94	8,05
HorRat (RSD _r /0,5RSD _{HOR})						HorRat (RSD _r /0,5RSD _{HOR})					
0,39	0,21	0,16	0,07	0,06	0,09	0,59	0,35	0,20	0,46	0,18	0,15

Žádná z hodnot HorRat nevyšla nad 1,3. U methylstearátu se polovina hodnot pohybovala v rozmezí 0,3–1,3 a zbylá polovina pod hodnotou 0,3. U methylpalmitátu se kromě hodnoty HorRat u koncentrace 5 µg/ml všechny hodnoty pohybovaly pod 0,3.

Dále byly z kalibračních grafů (**Příloha 6** a **Příloha 7**) odečteny rovnice regrese a koeficienty determinace. LOQ byl opět stanoven jako první bod kalibrační závislosti, viz **Tabulka 13**.

Tabulka 13: Parametry regrese a LOQ methylpalmitátu a methylstearátu.

	Methylpalmitát	Methylstearát
Rovnice regrese	$y = 0,0402x - 0,0221$	$y = 0,0406x - 0,0272$
Koeficient determinace	0,9981	0,999
LOQ (µg/ml)	5,276	5,008

Hodnoty HorRat, jak už pro metodu bez derivatizace, tak s derivatizací, se nenacházely nad hodnotou 1,3, což vyloučilo větší vliv matrice či vliv jiných zmiňovaných faktorů a obě metody pro stanovení mastných kyselin se dají považovat za opakovatelné.

3.3 Analýza reálných vzorků

Byly zanalyzovány 2 druhy obalů na vejce. TM (1; 2; 3) značí 3 různé vzorky tmavších obalů od vajec, SV (1; 2; 3) značí 3 různé vzorky světlejších obalů od vajec. Extrakty získaly růžovou (TM 1; 2; 3) a světle růžovou barvu (SV 1; 2; 3) viz **Příloha 3**. Roztoky se začaly zbarvovat hned po okyselení. Co se týče kvalitativních znaků, kyselina palmitová měla retenční čas 10,06 min a kyselina stearová eluovala v čase 11,36 min. Na chromatogramech vzorku TM1 (**Příloha 8** a **Příloha 9**) můžeme vidět charakteristické píky kyselin, které vlivem větší sorpce v koloně chvostují. Methylestery díky vyšší těkavosti eluují dříve, methylpalmitát v čase 9,77 min a methylstearát v čase 11,09 min. Píky jsou symetrické, viz **Příloha 10** a **Příloha 11**. Ve vzorcích nebyly nalezeny žádné další látky ve významných koncentracích.

Výsledky stanovení koncentrací MK v papírových obalech v mg/ml (resp. µg/ml) byly převedeny na hmotnost mastných kyselin v gramech na m² vzorku a jsou uvedeny v **Tabulce 14**. Mastné kyseliny byly stanoveny dvěma metodami, jako volné MK (bez derivatizace) a dále jako methylestery těchto kyselin (s derivatizací).

Tabulka 14: Výsledky analýzy vzorků bez derivatizace a s derivatizací.

Vzorky	Bez derivatizace		Po derivatizaci	
	Kyselina palmitová (g/m ²)	Kyselina stearová (g/m ²)	Kyselina palmitová (g/m ²)	Kyselina stearová (g/m ²)
TM1	1,39	1,15	0,88	0,88
TM2	0,95	0,76	0,61	0,62
TM3	1,01	0,89	0,83	0,85
SV1	0,89	0,74	0,79	0,81
SV2	1,02	0,94	0,66	0,68
SV3	1,14	1,09	0,77	0,90

U stanovení MK ve formě volných MK se většina koncentrací pohybovala kolem 1 g/m². Nejvíce mastných kyselin nacházelo ve vzorku TM1 (1,39 g/m² kyseliny palmitové a 1,15 g/m² kyseliny stearové) a nejméně ve vzorku SV1 (0,89 g/m² kyseliny palmitové a 0,74 g/m² kyseliny stearové). Průměrně se ve vzorcích nacházelo 1,07 g/m² kyseliny palmitové a 0,93 g/m² kyseliny stearové. Jelikož se MK používají jako separátory ve výrobním procesu ve formě vápenatých solí, pro informaci je v této diplomové práci uvedena průměrná koncentrace těchto solí ve vzorcích, a sice 1,21 g/m² palmitanu vápenatého a 1,04 g/m² stearanu vápenatého.

U stanovení MK jako methylesterů byla největší koncentrace kyselin stanovena ve vzorku TM1 (0,88 g/m² kyseliny palmitové a 0,88 g/m² kyseliny stearové) a nejmenší ve vzorku TM2 (0,61 g/m² kyseliny palmitové a 0,62 g/m² kyseliny stearové).

3.3.1 Porovnání metody stanovení MK a MEMK

Hlavní výhodou stanovení mastných kyselin bez derivatizace je úprava vzorku, kdy postačí vyextrahovat MK z obalů a vzorky jsou v podstatě připraveny k analýze na GC-MS, s čímž je spojena jistá časová úspora. Menší počet úkonů při zpracování vzorku také snižuje chybu při stanovení. Možnou komplikací analýzy MK může být jejich horší ionizace v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru, proto také bylo nutné vzorky zakoncentrovat. Další nevýhodou může být i vyšší sorpce MK v koloně či zanášení lineru a s tím spojené chvostování píků, které potom ztěžuje odečítání ploch píků.

Naproti tomu převedení mastných kyselin na methylestery poskytuje symetrické píky s vysokou intenzitou. Nicméně, zjištěné koncentrace mastných kyselin po derivatizaci jsou nižší, než bez derivatizace, což může být způsobeno několika faktory jako je neúplná esterifikace, ztráty při přípravě methylesterů a zároveň může mít vliv i povaha vzorku. Obecnou nevýhodou metody s MEMK je tedy vyšší počet kroků při úpravě vzorku.

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo provést literární rešerši zaměřenou na mastné kyseliny používané jako lubrikanty při výrobě papírových obalů a v experimentální části vyvinout metodu pro izolaci a stanovení kyseliny palmitové a stearové ve vzorcích papírových obalů. V této práci byly jako reálné vzorky použity papírové obaly na vejce.

Pro extrakci byla testována 3 rozpouštědla, ve kterých se dle literatury rozpouští kyseliny palmitová a stearová a zároveň jsou běžně dostupná a relativně netoxická, konkrétně ethanol, aceton a ethylacetát. Dále byl zkoumán optimální počet extrakčních kroků a čas jednoho kroku, rovněž i vliv extrakce s asistencí ultrazvuku a extrakce na třepačce. Jelikož se kyseliny ve vzorku nacházely ve formě solí, byla do rozpouštědla přidána i 96% kyselina sírová, která se poté projevila jako nevhodná, jelikož se jejím vlivem ve všech rozpouštědlech tvořily estery mastných kyselin, aceton nevyjímaje. Proto byla nahrazena kyselinou trihydrogenfosforečnou a přestože ethylacetát vyšel jako nejvhodnější rozpouštědlo, nemohl být použit ani s H_3PO_4 , protože i vlivem této kyseliny se v roztoku tvořily estery, a proto byl nahrazen acetonem. Optimální metoda pro extrakci mastných kyselin z papírových obalů je tedy 2x opakovaná extrakce na třepačce v acetonu po dobu 30 minut s přidavkem kyseliny trihydrogenfosforečné.

Dále byly testovány metody pro stanovení mastných kyselin jako volných mastných kyselin a jako methylesterů. Výhodou derivatizace MK bylo zlepšení intenzity píků a zlepšení jejich symetrie v chromatogramu. Nevýhodou byla víceokrová úprava vzorku a s tím spojené možné ztráty, případně se mohla projevit neúplná esterifikace mastných kyselin nebo vliv povahy vzorku. Naopak výhodou stanovení mastných kyselin bez derivatizace bylo právě méně kroků úpravy vzorku. Obě metody, jak už pro stanovení volných mastných kyselin nebo MK jako methylesterů, byly zvalidovány dle validačních kritérií podle Horwitze a měly uspokojivé výsledky. Dají se proto považovat za opakovatelné. Výsledky analýzy reálných vzorků, ve kterých byly MK derivatizovány, poskytovaly menší hodnoty, než u analýzy volných MK. Přestože mastné kyseliny se většinou kvůli analýze na plynovém chromatografu derivatizují, lze je stanovit i bez derivatizace, a to s dobrými výsledky a relativně jednoduchým způsobem zamezujícím ztrátě při větším počtu úkonů úpravy vzorku.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Uniqueness of an egg carton manufacturing process. *Egg Tray Machine* [online]. Beston Group Co., Ltd., 2022 [cit. 2022-02-22]. Dostupné z: <https://bestoneggtraymachine.com/uniqueness-egg-carton-manufacturing-process/>
- [2] ZABANIOTOU, A. a E. KASSIDI. Life cycle assessment applied to egg packaging made from polystyrene and recycled paper. *Journal of Cleaner Production* [online]. 2003, 11(5), 549-559 [cit. 2022-03-26]. ISSN 09596526. Dostupné z: doi:10.1016/S0959-6526(02)00076-8
- [3] The Role of Alum in Historical Papermaking. *Conservation Online* [online]. Washington, DC: Foundation for Advancement in Conservation (FAIC), 2019 [cit. 2022-03-26]. Dostupné z: <https://cool.culturalheritage.org/byorg/abbey/an/an17/an17-4/an17-407.html>
- [4] A complete solution for your egg tray production line - QTM. *Pulp molding machine manufacturer - Make best use of waste paper* [online]. China: Salam Machinery, 2020 [cit. 2022-03-29]. Dostupné z: <https://salammachinery.com/egg-tray-production-line/>
- [5] Flotace: Filtrace vody. *Čištění vody, úprava vody a recyklace vody: ENVI-PUR* [online]. Soběslav: ENVI-PUR, s.r.o., 2022 [cit. 2022-03-27]. Dostupné z: <https://www.envi-pur.cz/upravny-pitne-vody-flotace-rozpustenym-vzduchem-daf/>
- [6] Manufacturing Process For Egg Carton Making Machine. *Environmental XPRT: The Environmental Industry Online* [online]. San Juan de la Cruz: XPRT B2B S.L., 2022 [cit. 2022-02-22]. Dostupné z: <https://www.environmental-expert.com/news/manufacturing-process-for-egg-carton-making-machine-1044216>
- [7] Egg Carton Making Machine. *Pulp Molding Machine* [online]. Beston (Henan) Machinery Co. ltd., 2022 [cit. 2022-02-22]. Dostupné z: <https://pulpmouldingmachines.com/egg-carton-making-machine/>
- [8] KUDZAL, A., Z. ZHANG a J. LAGASSEY. Axiomatic design of an improved egg carton manufacturing process. *Proceedings of the 8th international conference on axiomatic design* [online]. 2014, 187–194 [cit. 2022-03-27]. Dostupné z:

<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.730.1521&rep=rep1&type=pdf>

- [9] SEYIDOV, F. T., Y. MANSOORI a J. T. NEZHAD. Hydrophobicizing mould release agent for press moulding. *Industrial Lubrication and Tribology* [online]. 2007, 59(5), 236-241 [cit. 2022-02-22]. ISSN 0036-8792. Dostupné z: doi:10.1108/00368790710776829
- [10] RAWAT, S. S. a A. P. HARSHA. Current and Future Trends in Grease Lubrication. *Automotive Tribology* [online]. Singapore: Springer Singapore, 2019, 147-182 [cit. 2022-02-28]. Energy, Environment, and Sustainability. ISBN 978-981-15-0433-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-15-0434-1_9
- [11] MANG, T. a W. DRESEL. *Lubricants and Lubrication* [online]. 2. Německo: Wiley-VCH, 2007 [cit. 2022-02-28]. ISBN 978-3527314973. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9783527645565>
- [12] KOOLMAN, J. a K. H. RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [13] AHMAD, M. U. *Fatty Acids: Chemistry, Synthesis, and Applications* [online]. 1. Londýn: Academic Press and AOCS Press, 2017 [cit. 2022-02-28]. ISBN 978-1-5231-1444-3. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=QioUDgAAQBAJ&lpg=PP1&dq=Fatty%20Acids%20Chemistry%20and%20synthesis%20and%20applications%20book&lr&hl=cs&pg=PP1#v=onepage&q=Fatty%20Acids:%20Chemistry,%20synthesis%20and%20applications%20book&f=false>
- [14] SHAHIDI, F., ed. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* [online]. 7. USA: Wiley, 2020 [cit. 2022-03-27]. ISBN 9780471384601. Dostupné z: doi:10.1002/047167849X
- [15] PUPRASIT, K., D. WONGSAWAENG, K. NGAOSUWAN, W. KIATKITTIPONG a S. ASSABUMRUNGRAT. Non-thermal dielectric barrier discharge plasma hydrogenation for production of margarine with low trans-fatty acid formation.

- Innovative Food Science & Emerging Technologies* [online]. 2020, 66(6) [cit. 2022-03-28]. ISSN 14668564. Dostupné z: doi:10.1016/j.ifset.2020.102511
- [16] SÁNCHEZ, M. A., G. C. TORRES, V. A. MAZZIERI a C. L. PIECK. Selective hydrogenation of fatty acids and methyl esters of fatty acids to obtain fatty alcohols- a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* [online]. 2017, 92(1), 27-42 [cit. 2022-03-28]. ISSN 02682575. Dostupné z: doi:10.1002/jctb.5039
- [17] BURLESON, G., B. BUTCHER, B. GOODWIN, K. SHARP a B. RUDER. Soap-Making Process Improvement: Including Social, Cultural and Resource Constraints in the Engineering Design Process. *International Journal for Service Learning in Engineering, Humanitarian Engineering and Social Entrepreneurship* [online]. 2017, 12(2), 81-102 [cit. 2022-03-28]. ISSN 1555-9033. Dostupné z: doi:10.24908/ijse.v12i2.7572
- [18] Fatty acid. *Encyclopedia Britannica / Britannica* [online]. UK a USA: Encyclopædia Britannica, Inc., 2022 [cit. 2022-02-28]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/fatty-acid>
- [19] Palmitic acid. *Hazardous Substances Data Bank* [online]. USA: National Library of Medicine, 2022 [cit. 2022-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/5001>
- [20] Fatty Acids and Industrial Products. *Peter Cremer North America* [online]. USA: Cremer North America, 2022 [cit. 2022-02-28]. Dostupné z: <https://www.petercremerna.com/blog/2021/5/19/fatty-acids-and-industrial-products>
- [21] Stearic acid. *National Center for Biotechnology Information* [online]. USA: National Center for Biotechnology Information, 2022 [cit. 2022-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281>
- [22] Palmitic acid. *National Center for Biotechnology Information* [online]. USA: National Center for Biotechnology Information, 2022 [cit. 2022-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Palmitic-acid>

- [23] CALVO, B., I. COLLADO a E. A. CEPEDA. Solubilities of Palmitic Acid in Pure Solvents and Its Mixtures. *Journal of Chemical & Engineering Data* [online]. 2009, 54(1), 64-68 [cit. 2022-03-29]. ISSN 0021-9568. Dostupné z: doi:10.1021/je8005979
- [24] CALVO, B. a E. A. CEPEDA. Solubilities of Stearic Acid in Organic Solvents and in Azeotropic Solvent Mixtures. *Journal of Chemical & Engineering Data* [online]. 2008, 53(3), 628-633 [cit. 2022-03-29]. ISSN 0021-9568. Dostupné z: doi:10.1021/je7006567
- [25] NOUBIGH, A.. Stearic acid solubility in mixed solvents of (water + ethanol) and (ethanol + ethyl acetate): Experimental data and comparison among different thermodynamic models. *Journal of Molecular Liquids* [online]. 2019, 296 [cit. 2022-03-29]. ISSN 01677322. Dostupné z: doi:10.1016/j.molliq.2019.112101
- [26] LIU, W. J., C. SUN, P. X. ZHAO a S. F. WANG. Solubility of Stearic Acid in Ethanol, 1-Propanol, 2-Propanol, L-Butanol, Acetone, Methylene Chloride, Ethyl Acetate and 95% Ethanol from (293 to 315) K. *Advanced Materials Research* [online]. 2012, 550-553, 71-74 [cit. 2022-03-29]. ISSN 1662-8985. Dostupné z: doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.550-553.71
- [27] Palmitic acid. *The Merck Index Online - chemicals, drugs and biologicals* [online]. USA: Royal Society of Chemistry, 2022 [cit. 2022-02-28]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m8367/palmitic%20acid?q=unauthorize>
- [28] CARTA, G., E. MURRU, S. BANNI a C. MANCA. Palmitic Acid: Physiological Role, Metabolism and Nutritional Implications. *Frontiers in Physiology* [online]. 2017, 8 [cit. 2022-03-11]. ISSN 1664-042X. Dostupné z: doi:10.3389/fphys.2017.00902
- [29] BARRAU, S., P. DEMONT, E. PEREZ, A. PEIGNEY, C. LAURENT a C. LACABANNE. Effect of Palmitic Acid on the Electrical Conductivity of Carbon Nanotubes–Epoxy Resin Composites. *Macromolecules* [online]. 2003, 36(26), 9678-9680 [cit. 2022-03-11]. ISSN 0024-9297. Dostupné z: doi:10.1021/ma030399m
- [30] Sodium palmitate. *Knovel* [online]. Elsevier, 2022 [cit. 2022-03-29]. Dostupné z: <https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpHPRAVE01/cid:kt00BZYO>

N9/viewerType:khtml/root_slug:handbook-plastics-rubber/url_slug:sodium-palmitate?b-q=sodium%20palmitate&include_synonyms=no&sort_on=default&page=26&view=collapsed&zoom=1&q=sodium%20palmitate

- [31] Calcium palmitate. *The Merck Index Online - chemicals, drugs and biologicals* [online]. USA: Royal Society of Chemistry, 2022 [cit. 2022-03-27]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m2959/calcium-palmitate?q=authorize>
- [32] GULDNER, G. T. a C. KNIGHT. Napalm Toxicity. *National Center for Biotechnology Information* [online]. USA: Royal Society of Chemistry, 2020 [cit. 2022-03-28]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537127/>
- [33] Stearic acid. *The Merck Index Online - chemicals, drugs and biologicals* [online]. USA: Royal Society of Chemistry, 2022 [cit. 2022-02-28]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m10200/stearic%20acid?q=unauthorize>
- [34] Stearic acid. *Knovel* [online]. Elsevier, 2022 [cit. 2022-03-29]. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpHPRAVE01/cid:kt00BZYUV1/viewerType:khtml/root_slug:handbook-plastics-rubber/url_slug:stearic-acid?b-q=stearic%20acid&include_synonyms=no&sort_on=default&page=39&view=collapsed&zoom=1&q=stearic%20acid
- [35] KUMARAVEL, A., M. MURUGANANTHAN, R. MANGALAM a S. JAYAKUMAR. A novel, biocompatible and electrocatalytic stearic acid/nanosilver modified glassy carbon electrode for the sensing of paraoxon pesticide in food samples and commercial formulations. *Food Chemistry* [online]. 2020, 323 [cit. 2022-03-28]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2020.126814
- [36] WANG, Y., B. LI a C. XU. Fabrication of superhydrophobic surface of hierarchical ZnO thin films by using stearic acid. *Superlattices and Microstructures* [online]. 2012, 51(1), 128-134 [cit. 2022-03-28]. ISSN 07496036. Dostupné z: doi:10.1016/j.spmi.2011.11.006

- [37] KHATTAB, T. A., A. L. MOHAMED a A. G. HASSABO. Development of durable superhydrophobic cotton fabrics coated with silicone/stearic acid using different cross-linkers. *Materials Chemistry and Physics* [online]. 2020, 249 [cit. 2022-03-28]. ISSN 02540584. Dostupné z: doi:10.1016/j.matchemphys.2020.122981
- [38] PERWEEN, S., Z. KHAN, S. SINGH a A. RANJAN. PVA-PDMS-Stearic acid composite nanofibrous mats with improved mechanical behavior for selective filtering applications. *Scientific Reports* [online]. 2018, 8(1) [cit. 2022-03-28]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-34440-5
- [39] TÁBI, T. a K. PÖLÖSKEI. The Effect of Processing Parameters and Calcium-stearate on the Ejection Process of Injection Molded Poly(Lactic Acid) Products. *Periodica Polytechnica Mechanical Engineering* [online]. 2021, 66(1), 17-25 [cit. 2022-02-28]. ISSN 1587-379X. Dostupné z: doi:10.3311/PPme.18246
- [40] XIE, P., K. WANG a G. LUO. *Calcium Stearate as an Acid Scavenger for Synthesizing High Concentrations of Bromobutyl Rubber in a Microreactor System* [online]. 2018, 57(11), 3898-3907 [cit. 2022-02-28]. ISSN 0888-5885. Dostupné z: doi:10.1021/acs.iecr.8b00285
- [41] QURAIISHI, M. A., V. KUMAR, P. P. ABHILASH a B. N. SINGH. Calcium Palmitate: A Green Corrosion Inhibitor for Steel in Concrete Environment. *Journal of Materials and Environmental Science* [online]. 2012, 3(4), 365-372 [cit. 2022-02-28]. ISSN 2028-2508. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/268439995_Calcium_Palmitate_A_Green_Corrosion_Inhibitor_for_Steel_in_Concrete_Environment
- [42] Magnesium stearate. *The Merck Index Online - chemicals, drugs and biologicals* [online]. USA: Royal Society of Chemistry, 2022 [cit. 2022-03-27]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m7024/magnesium-stearate?q=authorize>
- [43] Magnesium palmitate. *National Center for Biotechnology Information* [online]. USA: National Center for Biotechnology Information, 2022 [cit. 2022-03-27]. Dostupné z:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Magnesium-palmitate#section=Industry-Uses>

- [44] PATEL, N. K. a S. N. SHAH. Biodiesel from Plant Oils. *Food, Energy, and Water* [online]. Elsevier, 2015, 277-307 [cit. 2022-02-22]. ISBN 9780128002117. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800211-7.00011-9
- [45] LIU, Z., J. WANG, C. LI a S. ROCHFORT. Development of one-step sample preparation methods for fatty acid profiling of milk fat. *Food Chemistry* [online]. 2020, 315 [cit. 2022-02-22]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2020.126281
- [46] ABBOTT, S. K., A. M. JENNER, T. W. MITCHELL, S. H. J. BROWN, G. M. HALLIDAY a B. GARNER. An Improved High-Throughput Lipid Extraction Method for the Analysis of Human Brain Lipids. *Lipids* [online]. 2013, 48(3), 307-318 [cit. 2022-02-22]. ISSN 0024-4201. Dostupné z: doi:10.1007/s11745-013-3760-z
- [47] LI, Y., F. GHASEMI NAGHDI, S. GARG, T. ADARME-VEGA, K. J. THURECHT, W. GHAFOR, S. TANNOCK a P. M. SCHENK. A comparative study: the impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research. *Microbial Cell Factories* [online]. 2014, 13(1) [cit. 2022-02-22]. ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/1475-2859-13-14
- [48] CASCANT, M. M., C. BREIL, S. GARRIGUES, M. DE LA GUARDIA, A. S. FABIANO-TIXIER a F. CHEMAT. A green analytical chemistry approach for lipid extraction: computation methods in the selection of green solvents as alternative to hexane. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2017, 409(14), 3527-3539 [cit. 2022-02-22]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-017-0323-9
- [49] LI, C., Y. YAO, G. ZHAO et al. Comparison and Analysis of Fatty Acids, Sterols, and Tocopherols in Eight Vegetable Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2011, 59(23), 12493-12498 [cit. 2022-02-22]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf203760k

- [50] ROS-FREIXEDES, R. a J. ESTANY. On the Compositional Analysis of Fatty Acids in Pork. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics* [online]. 2014, 19(1), 136-155 [cit. 2022-02-22]. ISSN 1085-7117. Dostupné z: doi:10.1007/s13253-013-0162-x
- [51] SINAGA, M. S., M. R. RAMADHAN, G. RICO a W. G. T. SITOMPUL. Effect of Acidification Mole Ratio And Solvent Volume Ratio of Glycerol Purification. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* [online]. 2019, 505(1) [cit. 2022-03-29]. ISSN 1757-8981. Dostupné z: doi:10.1088/1757-899X/505/1/012116
- [52] Sample purification. *Merck* [online]. Německo: Merck KGaA, 2022 [cit. 2022-03-29]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/applications/analytical-chemistry/sample-preparation/purification>
- [53] VARZAKAS, T. a C. TZIA, ed. *Food Engineering Handbook* [online]. Boca raton, Florida: CRC Press, 2014 [cit. 2022-03-29]. ISBN 9780429171727. Dostupné z: doi:10.1201/b17803
- [54] MEULLEMIESTRE, A., E. PETITCOLAS, Z. MAACHE-REZZOUG, F. CHEMAT a S.A. REZZOUG. Impact of ultrasound on solid–liquid extraction of phenolic compounds from maritime pine sawdust waste. Kinetics, optimization and large scale experiments. *Ultrasonics Sonochemistry* [online]. 2016, 28, 230-239 [cit. 2022-02-24]. ISSN 13504177. Dostupné z: doi:10.1016/j.ultsonch.2015.07.022
- [55] OROIAN, M., F. DRANCA a F. URSACHI. Comparative evaluation of maceration, microwave and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from propolis. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2020, 57(1), 70-78 [cit. 2022-02-24]. ISSN 0022-1155. Dostupné z: doi:10.1007/s13197-019-04031-x
- [56] NAVIGLIO, D., P. SCARANO, M. CIARAVOLO a M. GALLO. Rapid Solid-Liquid Dynamic Extraction (RSLDE): A Powerful and Greener Alternative to the Latest Solid-Liquid Extraction Techniques. *Foods* [online]. 2019, 8(7) [cit. 2022-03-29]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods8070245

- [57] ZHANG, Q. W., L. G. LIN a W. C. YE. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine* [online]. 2018, 13(1) [cit. 2022-05-08]. ISSN 1749-8546. Dostupné z: doi:10.1186/s13020-018-0177-x
- [58] AZAR, L.. Cavitation in ultrasonic cleaning and cell disruption. *Controlled Environments* [online]. 2009, 14-17 [cit. 2022-03-11]. Dostupné z: <http://www.absotecthailand.com/docs/Cavitation.pdf>
- [59] KUYPER, B.. *An investigation into the source and distribution of bromoform in the southern African and Southern Ocean marine boundary layer*. Cape Town, 2014. Disertační práce. University of Cape Town.
- [60] ZACHAŘ, P. a D. SÝKORA. Plynová chromatografie. In: *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. Praha: VŠCHT [cit. 2022-03-29]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/lach2/GC.pdf>
- [61] CHURÁČEK, J. *Analytická separace látek: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 80-03-00569-8.
- [62] ŠTULÍK, K. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [63] HOLČAPEK, M. *Hmotnostní spektrometrie* [online]. Univerzita Pardubice, 2022 [cit. 2022-03-30]. Dostupné z: https://holcapek.upce.cz/teaching/Mol_spek/Mol_spek_prednaska6_MS.pdf
- [64] REZA OVEISI, M., M. HAJIMAHMOODI, N. SADEGHI a B. JANNAT. Quantitative determination of fatty acids in infant formula by GC without derivatization. *Acta medica Iranica* [online]. 2006, 44(4), 225-229 [cit. 2022-03-29]. Dostupné z: <https://acta.tums.ac.ir/index.php/acta/article/view/3188>
- [65] CHIU, H. H. a C. H. KUO. Gas chromatography-mass spectrometry-based analytical strategies for fatty acid analysis in biological samples. *Journal of Food and Drug Analysis* [online]. 2020, 28(1), 60-73 [cit. 2022-03-27]. ISSN 10219498. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfda.2019.10.003

- [66] ZHANG, H., Z. WANG a O. LIU. Development and validation of a GC–FID method for quantitative analysis of oleic acid and related fatty acids. *Journal of Pharmaceutical Analysis* [online]. 2015, 5(4), 223-230 [cit. 2022-02-22]. ISSN 20951779. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpha.2015.01.005
- [67] ANTOLÍN, E. M., D. M. DELANGE a V. G. CANAVACIOLO. Evaluation of five methods for derivatization and GC determination of a mixture of very long chain fatty acids (C24: 0–C36). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2008, 46(1), 194-199 [cit. 2022-03-28]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2007.09.015
- [68] GUARRASI, V., M. R. MANGIONE, V. SANFRATELLO, V. MARTORANA a D. BULONE. Quantification of Underivatized Fatty Acids From Vegetable Oils by HPLC with UV Detection. *Journal of Chromatographic Science* [online]. 2010, 48(8), 663-668 [cit. 2022-02-22]. ISSN 0021-9665. Dostupné z: doi:10.1093/chromsci/48.8.663
- [69] PANDOHEE, J., R. J. REES, M. J. S. SPENCER, A. RAYNOR a O. A. H. JONES. Combining computational and experimental approaches to select chromophores to enable the detection of fatty acids via HPLC. *Analytical Methods* [online]. 2019, 11(23), 2952-2959 [cit. 2022-03-28]. ISSN 1759-9660. Dostupné z: doi:10.1039/C9AY00616H
- [70] GUO, H., C. HU, J. QIAN a D. WU. Determination of Underivatized Long Chain Fatty Acids Using HPLC with an Evaporative Light-Scattering Detector. *Journal of the American Oil Chemists' Society* [online]. 2012, 89(2), 183-187 [cit. 2022-03-28]. ISSN 0003-021X. Dostupné z: doi:10.1007/s11746-011-1898-5
- [71] VALTO, P., J. KNUUTINEN a R. ALÉN. Direct injection analysis of fatty and resin acids in papermaking process waters by HPLC/MS. *Journal of Separation Science* [online]. 2011, 34(8), 925-930 [cit. 2022-03-28]. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201000893
- [72] MAHESAR, S. A., S. T. H. SHERAZI, A. R. KHASKHELI, A. A. KANDHRO a S. UDDIN. Analytical approaches for the assessment of free fatty acids in oils and fats.

- Anal. Methods* [online]. 2014, 6(14), 4956-4963 [cit. 2022-03-27]. ISSN 1759-9660.
Dostupné z: doi:10.1039/C4AY00344F
- [73] REJEB, I. B. a M. GARGOURI. Determination of Olive Oil Acidity Using an Enzymatic Method. *Analytical Letters* [online]. 2011, 44(8), 1454-1462 [cit. 2022-03-27]. ISSN 0003-2719. Dostupné z: doi:10.1080/00032719.2010.520385
- [74] FEDOSOV, S. N., J. BRASK a X. XU. Microtitration of Free Fatty Acids in Oil and Biodiesel Samples Using Absorbance and/or Fluorescence of Pyranine. *Journal of the American Oil Chemists' Society* [online]. 2012, 89(12), 2155-2163 [cit. 2022-03-27]. ISSN 0003-021X. Dostupné z: doi:10.1007/s11746-012-2117-8
- [75] LI, S. G., H. ZHANG a W. T. XUE. A novel method for the determination of acid value of vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. 2007, 109(11), 1088-1094 [cit. 2022-03-27]. ISSN 1438-7697. Dostupné z: doi:10.1002/ejlt.200700058
- [76] ALDAI, N., B. E. MURRAY, A. I. NÁJERA, D. J. TROY a K. OSORO. Derivatization of fatty acids and its application for conjugated linoleic acid studies in ruminant meat lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2005, 85(7), 1073-1083 [cit. 2022-04-21]. ISSN 00225142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.2110
- [77] RIVERA, C. a R. RODRÍGUEZ. Horwitz equation as quality benchmark in ISO / IEC 17025 testing laboratory. *Computer Science* [online]. 2011 [cit. 2022-04-05]. Dostupné z: <https://www.semanticscholar.org/paper/HORWITZ-EQUATION-AS-QUALITY-BENCHMARK-IN-ISO-%2F-IEC-Rivera-Rodr%C3%ADguez/d6d6a38d1a9e01e526ca4e2b5b8d804670e5414f>

PŘÍLOHY

Příloha 1: Extrakty testovacích vzorků v acetonu za použití H_2SO_4 (foceno ihned po přípravě).	75
Příloha 2: Extrakty testovacích vzorků v acetonu za použití H_2SO_4 (foceno po 2 týdnech)...	75
Příloha 3: Extrakty ze vzorků (aceton + H_3PO_4), zleva: 3 extrakty z tmavších obalů, 3 ze světlejších.....	75
Příloha 4: Kalibrační závislost pro kyselinu palmitovou.	76
Příloha 5: Kalibrační závislost pro kyselinu stearovou.	76
Příloha 6: Kalibrační závislost pro methylpalmitát.	77
Příloha 7: Kalibrační závislost pro methylstearát.....	77
Příloha 8: Ukázka chromatogramu: vzorek TM 1, mastné kyseliny.	78
Příloha 9: Ukázka chromatogramu: vzorek TM 1, mastné kyseliny, přiblíženo.....	78
Příloha 10: Ukázka chromatogramu: vzorek TM 1, methylestery mastných kyselin.	79
Příloha 11: Ukázka chromatogramu: vzorek TM 1, methylestery mastných kyselin, přiblíženo.	79



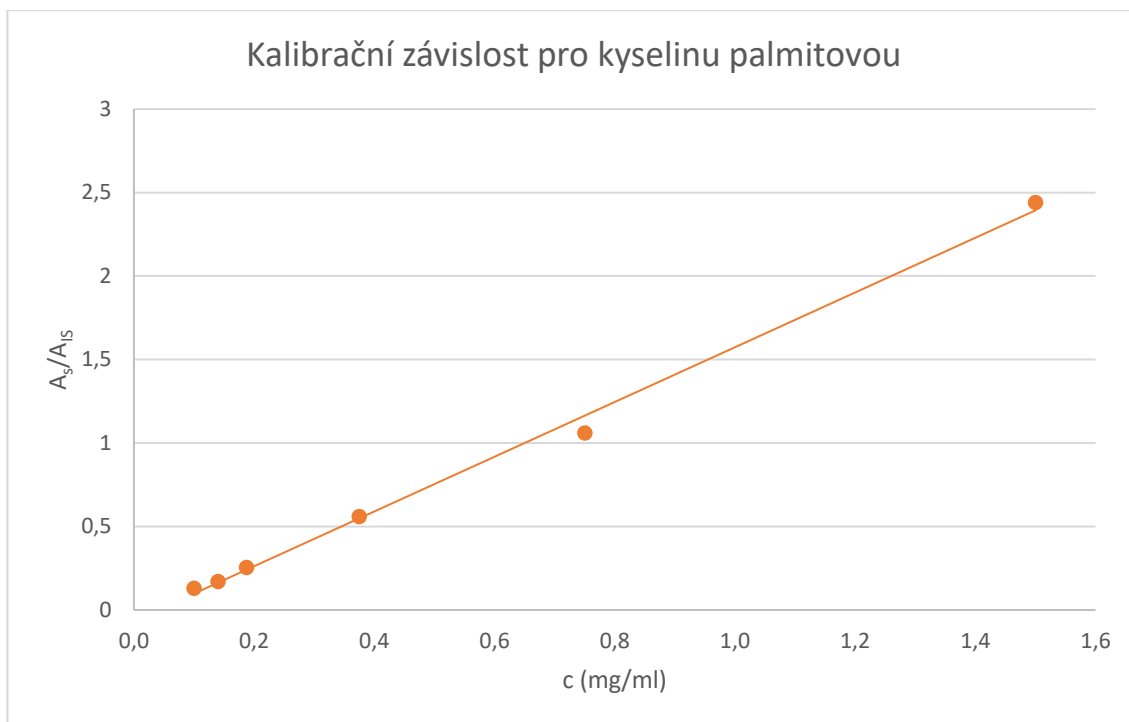
Příloha 1: Extrakty testovacích vzorků v acetonu za použití H_2SO_4 (foceno ihned po přípravě).



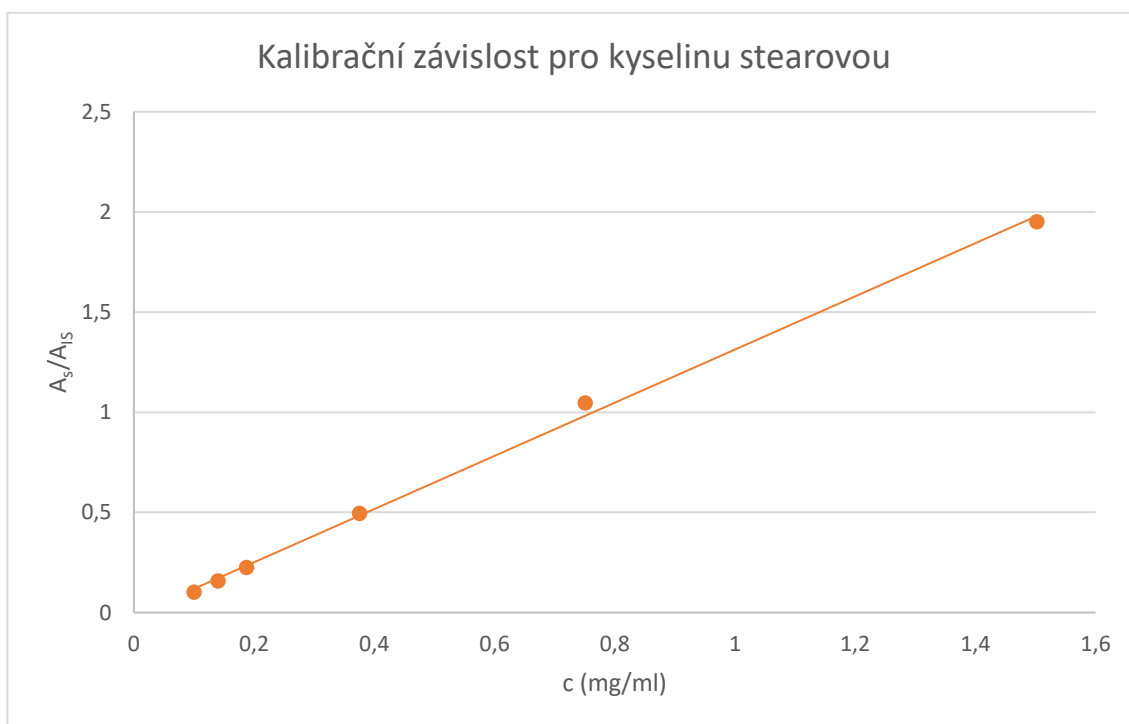
Příloha 2: Extrakty testovacích vzorků v acetonu za použití H_2SO_4 (foceno po 2 týdnech).



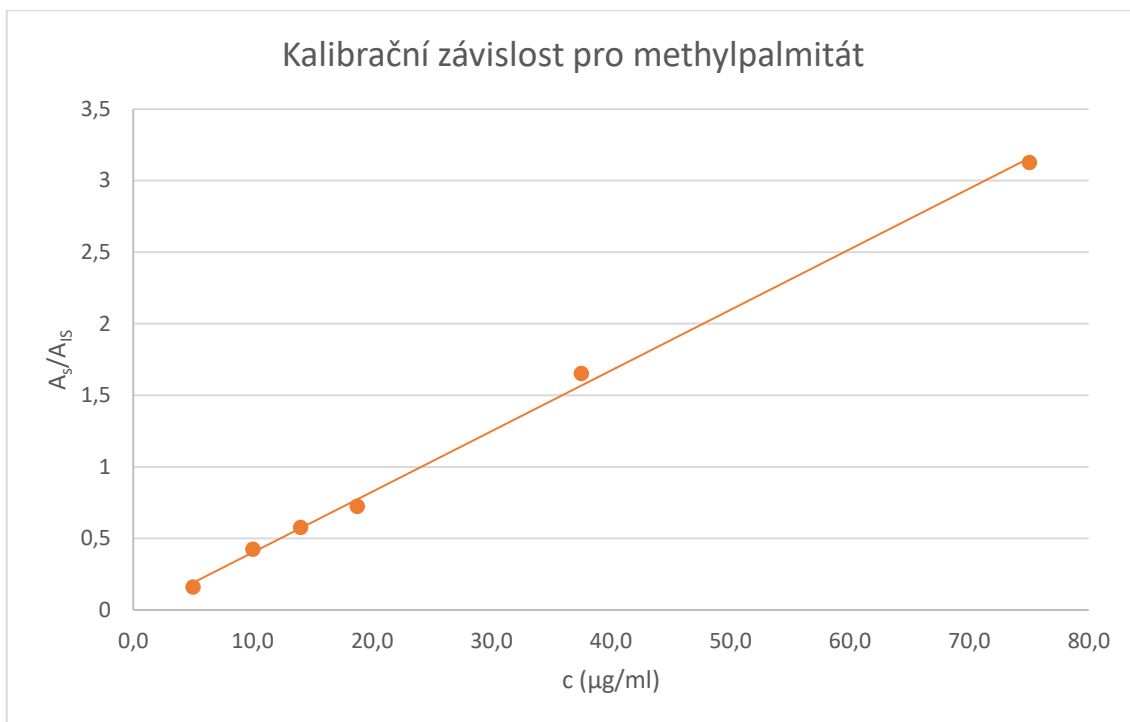
Příloha 3: Extrakty ze vzorků (aceton + H_3PO_4), zleva: 3 extrakty z tmavších obalů, 3 ze světlejších.



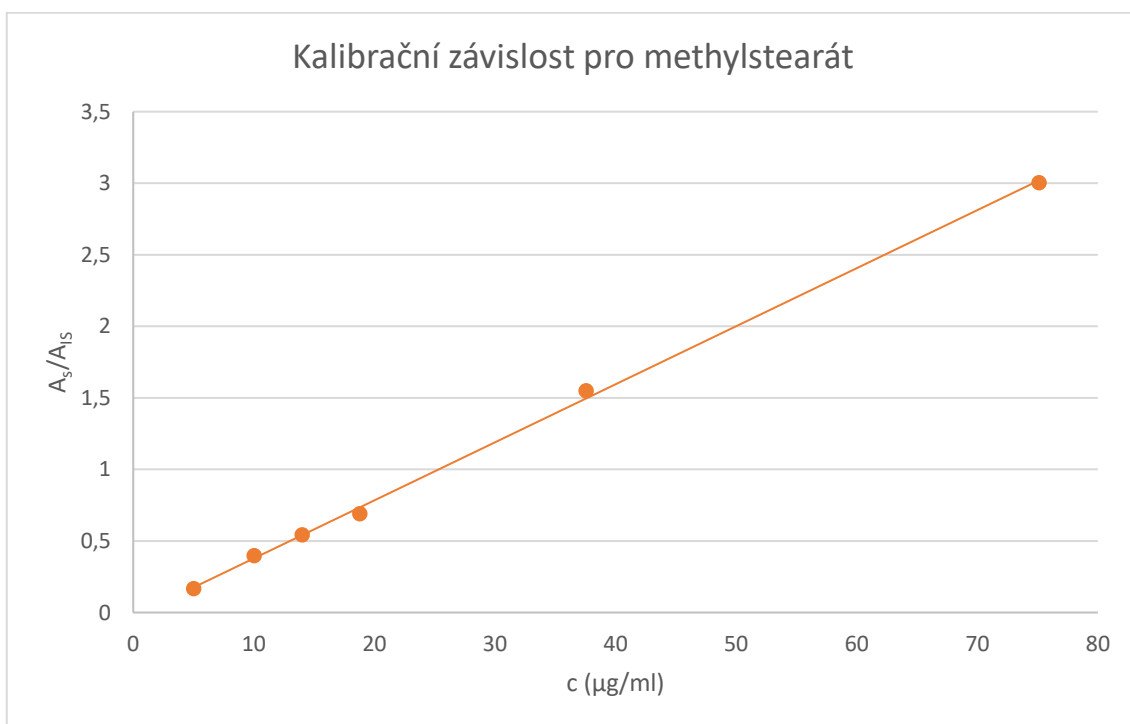
Příloha 4: Kalibrační závislost pro kyselinu palmitovou.



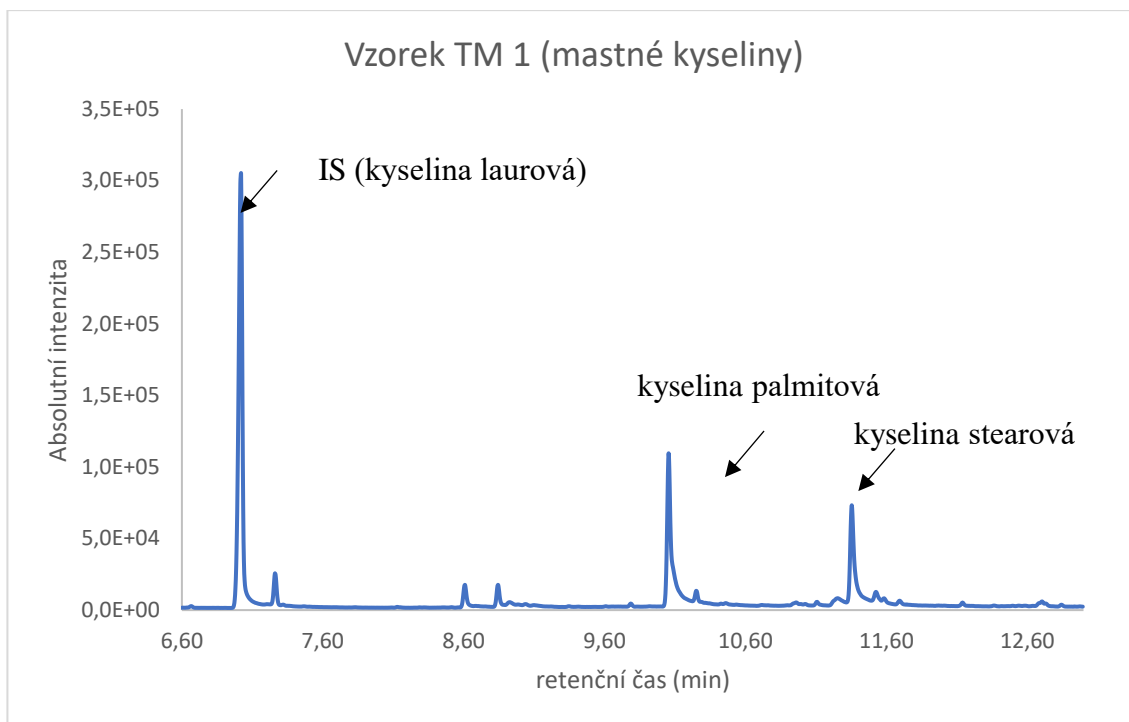
Příloha 5: Kalibrační závislost pro kyselinu stearovou.



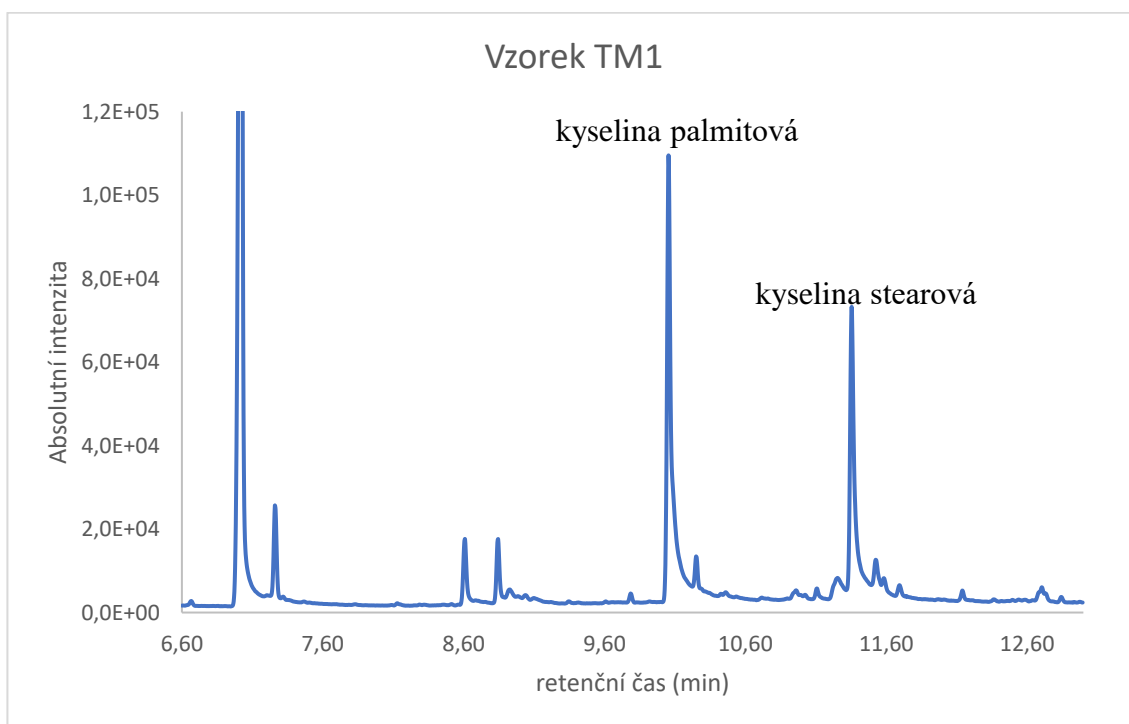
Příloha 6: Kalibrační závislost pro methylpalmitát.



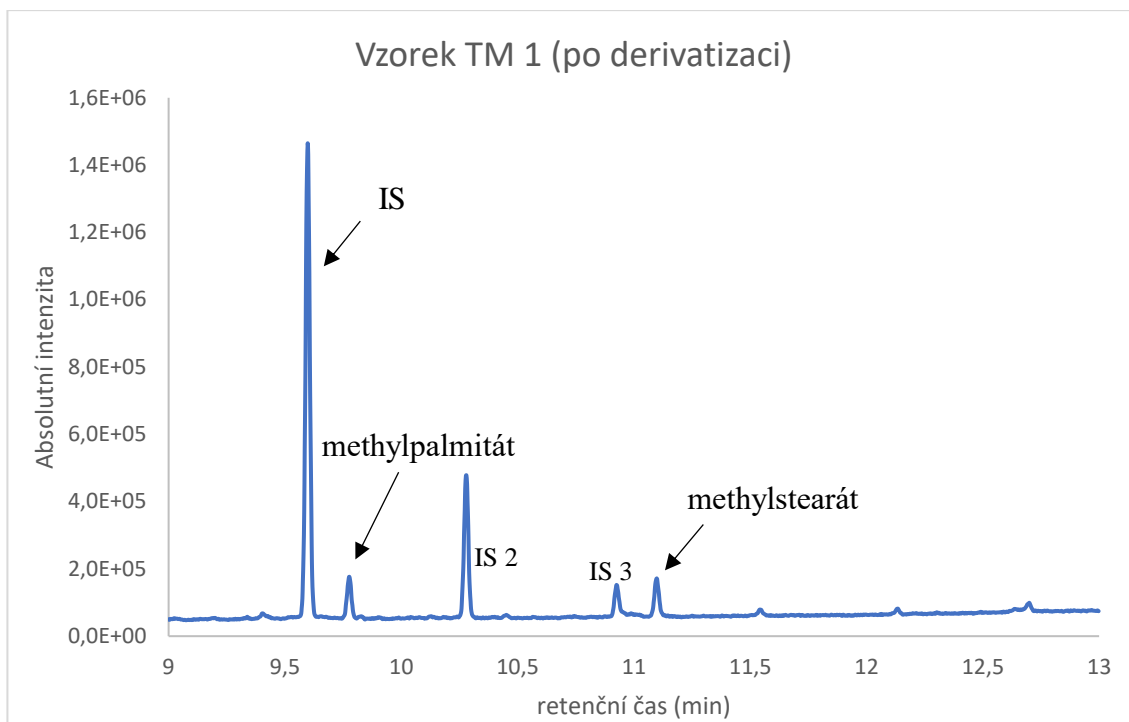
Příloha 7: Kalibrační závislost pro methylstearát.



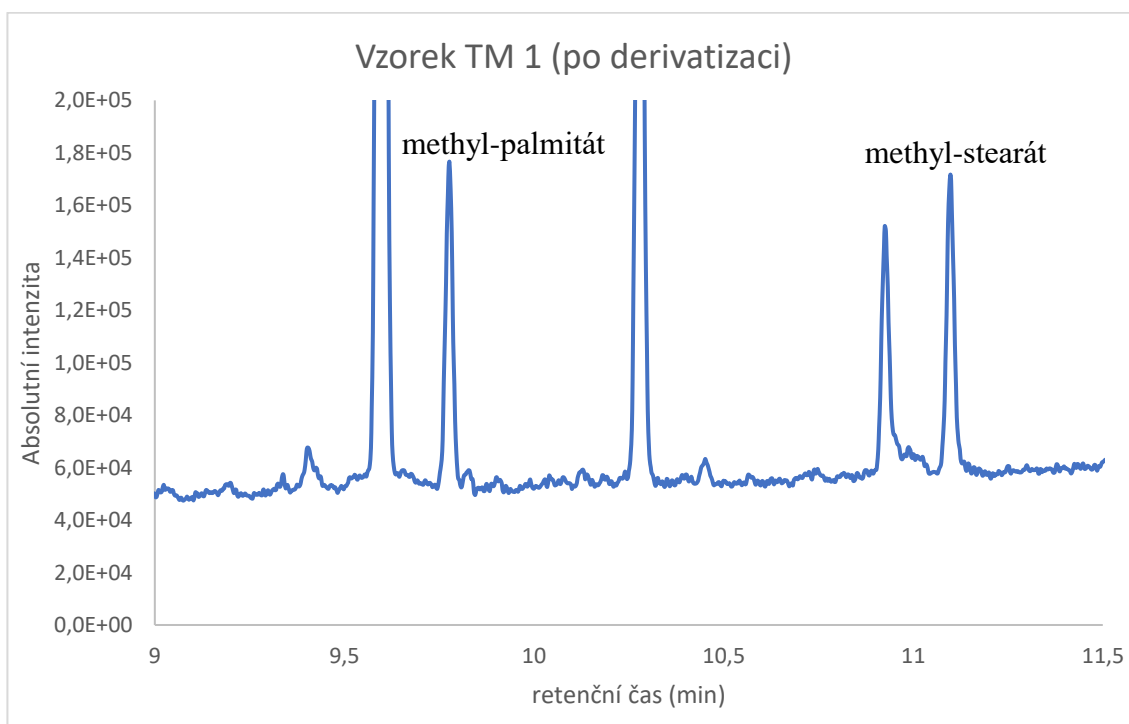
Příloha 8: Ukázka chromatogramu: vzorek TM 1, mastné kyseliny.



Příloha 9: Ukázka chromatogramu: vzorek TM 1, mastné kyseliny, přiblíženo.



Příloha 10: Ukázka chromatogramu: vzorek TM 1, methylestery mastných kyselin.



Příloha 11: Ukázka chromatogramu: vzorek TM 1, methylestery mastných kyselin, přibliženo.