

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Hana Horká

Stanovení derivátů methanolu ve vysychavých olejích

Determination of methanol derivatives in drying oils

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Jakub Hraníček, Ph.D.

Konzultant/ka: Ing. Silvie Švarcová, Ph.D.

Ing. Martin Šťastný, Ph.D.

Praha 2022

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

Podpis

## **Abstrakt**

Tvorba karboxylátů kovů představuje závažný problém pro historické i současné malby, a proto je pochopení mechanismu jejich vzniku klíčovým bodem pro vývoj vhodných strategií konzervace a zachování celosvětového kulturního dědictví. Stanovení reaktivních složek ve vysychavých olejích je důležitým krokem k pochopení reakčního mechanismu. Tato práce je zaměřena na vývoj jednoduché a rychlé metodiky pro HPLC-DAD stanovení nízkomolekulárních degradačních produktů tradičních vysychavých olejů, konkrétně methanolu, formaldehydu a kyseliny mravenčí. V rámci této práce byly optimalizovány podmínky QuEChERS extrakce methanolu, formaldehydu a kyseliny mravenčí z různých vzorků olejů (olivový, ořechový, makový a lněný olej) s následným přečištěním vzorků od olejové matrice za použití komerčního d-SPE sorbentu (Z-Sep/C18) a dvou nanostrukturních sorbentů  $\text{CeO}_2$  a  $\text{ZrO}_2$ .

**Klíčová slova:** formaldehyd, HPLC-DAD, kyselina mravenčí, methanol, QuEChERS, vysychavé oleje

## **Abstract**

The formation of metal carboxylates is a major problem for historical and contemporary paintings, and therefore understanding the mechanism of their formation is a crucial step for developing appropriate conservation strategies and preserving the world's cultural heritage. The determination of reactive components in drying oils is an important step towards understanding the reaction mechanism. This work is aimed at developing a simple and rapid methodology for HPLC-DAD determination of low molecular weight degradation products of traditional drying oils, namely methanol, formaldehyde and formic acid. In this work, QuEChERS conditions for the extraction of methanol, formaldehyde and formic acid from various oil samples (olive, walnut, poppy and linseed oils) were optimized followed by purification of the samples from the oil matrix using a commercial d-SPE sorbent (Z-Sep/C18) and two nanostructured sorbents,  $\text{CeO}_2$  and  $\text{ZrO}_2$ .

**Key words:** drying oils, formaldehyde, formic acid, HPLC-DAD, methanol, QuEChERS

Tato diplomová práce vznikla s podporou Akademie věd České republiky v rámci programu Strategie AV21 č.23 - Město jako laboratoř změny; stavby, kulturní dědictví a prostředí pro bezpečný a hodnotný život, a rovněž za podpory výzkumné infrastruktury NanoEnviCz, podpořené Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR v rámci projektu č. LM2018124.

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Jakubovi Hraníčkoví, Ph.D. za umožnění a zaštitění mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Martinovi Šťastnému, Ph.D. za vstřícnost a čas, který mi věnoval a Ing. Silvii Švarcové, Ph.D. za ochotu a trpělivost při tvorbě této diplomové práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině a blízkým přátelům, kteří mi poskytli podporu při studiu a psaní této práce.

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>9</b>
<b>2. Teoretická část</b> .....	<b>11</b>
2.1 Tradiční vysychavé oleje využívané v olejomalbě .....	11
2.1.1 Lněný olej .....	12
2.1.2 Makový olej .....	12
2.1.3 Ořechový olej.....	12
2.2 Mechanismus schnutí vysychavých olejů .....	12
2.3 Tvorba kovových karboxylátů .....	14
2.4 Technika QuEChERS.....	17
2.5 Stanovení methanolu.....	20
2.5.1 Derivatizace methanolu pomocí FMOC-Cl.....	20
2.6 Stanovení formaldehydu .....	22
2.6.1 Derivatizace formaldehydu pomocí HBA .....	23
2.7 Stanovení kyseliny mravenčí .....	24
<b>3. Experimentální část</b> .....	<b>25</b>
3.1 Použité chemikálie .....	25
3.2 Instrumentace .....	27
3.3 Příprava zásobních roztoků .....	27
3.4 Příprava vzorků pro HPLC analýzu .....	28
3.4.1 Příprava kalibračních vzorků .....	28
3.4.2 Příprava extraktů z olejů .....	28
3.5 HPLC-DAD analýza a detekce .....	29
3.6 Vyhodnocení výsledků HPLC analýzy .....	29
3.7 Validační parametry .....	29
3.7.1 Mez detekce a mez stanovitelnosti .....	29
3.7.2 Linearita .....	30
3.8 Technika QuEChERS.....	30
3.8.1 Výtěžnost extrakce.....	30
3.8.2 Matriční efekt.....	30
<b>4. Výsledky a diskuse</b> .....	<b>32</b>
4.1 Optimalizace vlnové délky DAD detektoru .....	32
4.2 Optimalizace derivatizačních metod .....	33

4.2.1	Optimalizace derivatizační metody pro methanol .....	33
4.2.2	Optimalizace derivatizační metody formaldehydu .....	34
4.3	Optimalizace chromatografických podmínek .....	35
4.3.1	Optimalizace chromatografické analýzy methanolového derivátu.....	35
4.3.2	Optimalizace chromatografické analýzy formaldehydového derivátu .....	36
4.3.3	Optimalizace chromatografické analýzy kyseliny mravenčí .....	37
4.4	Kalibrační závislosti.....	38
4.5	Optimalizace techniky QuEChERS .....	39
4.5.1	Optimalizace doby extrakce.....	39
4.5.2	d-SPE přečištění vzorků na sorbentech .....	40
4.5.3	Optimalizovaný postup metody QuEChERS.....	45
4.6	Validace metody HPLC-DAD .....	46
4.6.1	Matriční efekt.....	47
4.7	Reálné vzorky vysychavých olejů.....	48
<b>5.</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>50</b>

## Seznam použitých zkratk a symbolů

a	směrnice kalibrační křivky
<i>A</i>	absorbance
ACN	acetonitril
AMPA	aminomethylfosfonová kyselina
$c_g$	hmotnostní koncentrace
CE	kapilární elektroforéza
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DNPH	2,4-dinitrofenylhydrazin
DNSH	dansylhydrazin
d-SPE	disperzní extrakce tuhou fází
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid
FMOC-Cl	fluorenylmethoxykarbonyl chlorid
FMOC-Met	derivát FMOC-Cl s methanolem
FMOC-OH	9-fluorenylmethanol
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GCB	grafitizované saze
GC-FID	plynová chromatografie s plamenově ionizační detekcí
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
HBA	4-hydrazinbenzoová kyselina
HBA-For	derivát HBA s formaldehydem
HPLC-DAD	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole
LLE	extrakce kapalina-kapalina
<i>LOD</i>	mez detekce
<i>LOQ</i>	mez kvantifikace
Me	kov
ME	matriční efekt
n	počet měření
NAOB	4-[N-methyl, N-(1-naftylmethyl)]-amino-4-oxobutanové kyseliny
PFBHA	O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamin hydrochlorid

PSA	primární sekundární amin ((ethylendiamin)-N-propyl)
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe
RP-HPLC	chromatografie na reverzní fázi
RSD	relativní směrodatná odchylka
$S$	plocha píku
SD	směrodatná odchylka
SPME	mikroextrakce na pevné fázi
ssNMR	NMR spektroskopie pevného stavu
TEM	transmisní elektronový mikroskop
$t_r$	retenční čas
UV/VIS	ultrafialová/viditelná oblast
VOC	těkavé organické látky
XRPD	rentgenová prášková difrakce
$\theta$	difrakční úhel
$\lambda$	vlnová délka

## 1. Úvod

Přibližně od 15. století dodnes jsou vysychavé oleje, a zejména olej lněný, široce využívány jako pojivo pro malby, a to díky jejich schopnosti vytvořit souvislý film s dobrými optickými a mechanickými vlastnosti po rozprostření do tenké vrstvy. [1,2]

V případě olejomalby jsou jednotlivé barevné vrstvy obrazu, tvořené anorganickými či organickými pigmenty a barvivy ve směsi s vysychavými oleji, postupně nanášeny na podložky z různých materiálů (plátno, dřevo, omítka). Malířské dílo má tedy velmi složitou vnitřní strukturu, jednotlivé vrstvy představují složité heterogenní chemické směsi organických a anorganických složek. [3] Všechny tyto složky přítomné v barevných vrstvách, které jsou po několik desítek, stovek, respektive i tisíce let vystaveny proměnlivým podmínkám, se vzájemně chemicky ovlivňují. Zatímco četné chemické procesy v podstatě propůjčují uměleckým dílům žádoucí vlastnosti, jiné snižují jejich estetickou hodnotu nebo dokonce způsobují jejich vážné poškození. Tyto nežádoucí jevy, často nedostatečně pochopené, jsou ovlivněny jak vnitřními, tak vnějšími faktory (např. náchylností různých složek k interakci, vzdušnou vlhkostí, teplotou). [4]

Jedním z degračních procesů je tvorba karboxylátů kovů, konkrétně mravenčanů. Na předmětech kulturního dědictví byly identifikovány různé mravenčany kovů, které se obvykle projevují zprůhledněním vrstev nebo výkvěty, které nežádoucím způsobem ovlivňují vzhled a stabilitu uměleckých děl. [5] Dihydrát mravenčanu zinečnatého ( $\text{Zn}(\text{HCOO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) byl identifikován spolu se  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{ZnS}$  jako degrační produkt zinkové běloby ( $\text{ZnO}$ ) na povrchu obrazu Salvátora Dalího „*Pár s hlavami plnými oblaků*“ (v orig. *Couple aux Têtes Pleines de Nuages*) (1936). [6] Bez ohledu na zdroj kovového kationtu je za příčinu tvorby karboxylátů považována kyselina mravenčí uvolněná z dřevěných rámců, úložných boxů či vitrín. V předchozí studii [4] však byla prokázána i rychlá tvorba mravenčanu olovnatého během počáteční fáze vysychání modelových vzorků olejových barev. K tvorbě nežádoucích mravenčanů kovů došlo i na modelových vzorcích pigmentů, které byly vystaveny parám uvolňovaným z vysychavých olejů. Kvalitativní GC-MS analýza kyseliny mravenčí a formaldehydu ve výparech vysychavých olejů prokázala, že vysychavé oleje jsou samy o sobě významným zdrojem těchto nízkomolekulárních těkavých organických sloučenin (VOC), které se mohou snadno podílet na znehodnocování vzácných uměleckých artefaktů. [4]

Vzhledem k tomu, že se vysychavé oleje (lněný olej, ořechový olej, makový olej atd.) běžně využívají při restaurátorských a konzervačních ošetřeních různých uměleckých děl (pojiva barev, impregnace, laky, či jako složky tmelů), stanovení kyseliny mravenčí popř. formaldehydu a methanolu v těchto olejích je velmi žádoucí pro vyhodnocení potenciálního rizika použití vysychavých olejů pro některé citlivé materiály.

Zprávy o přítomnosti kyseliny mravenčí v olejích jsou však spíše sporadické, což může odrážet skutečnost, že analýzy jedlých olejů se primárně zaměřují na detekci potenciálně toxických oxidačních produktů nebo sloučenin ovlivňujících aroma či chuť. [7] E. N. Frankel ve své studii zmiňuje tvorbu kyseliny mravenčí jako vedlejšího produktu oxidace nenasycených aldehydů, které vznikají rozkladem primárních nenasycených esterových hydroperoxidů autooxidací jedlých olejů. [8]

Hlavními složkami vysychavých olejů jsou glyceroltriestery (triglyceridy) mastných kyselin, pigmenty, malá množství sterolů, uhlovodíků, vosků, jiných esterů a fosfolipidů. [9,10] Tak značná složitost matric velmi stěžuje stanovení polárních těkavých produktů (methanolu, formaldehydu a kyseliny mravenčí) ve vysychavých olejích. Předúprava olejových vzorků před stanovením těkavých degradačních produktů chromatografií by měla umožnit odstranění interferentů z olejové matrice. Za tímto účelem byly navrženy různé přístupy pro krok čištění v různých olejích, jako je mikroextrakce na pevné fázi (SPME) [11], gelová permeační chromatografie (GPC) [12] a extrakce kapalina-kapalina (LLE). [13] Během posledního desetiletí se pro úpravu vzorků získaných z různých enviromentálních matric hojně využívá technika QuEChERS (viz kapitola 2.4). Pro krok disperzní extrakce pevnou fází (d-SPE) postupu QuEChERS bylo publikováno hodnocení různých kombinací sorbentů, jako je PSA, C18, GCB nebo nově Z-Sep/C18. [14,15] Tyto materiály byly navrženy pro přečištění extraktů z olejnatých rostlin a plodin, jako je avokádo a mandle, před analýzou reziduí pesticidů.

Pro analýzu olejových pojiv se tradičně využívá plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS). Hlavním omezením této metody je však nutnost obohatit těkavé sloučeniny ve vzorku oleje, proto není možné pozorovat změny časně se tvořících těkavých produktů. [16] Stále tak chybí postup pro analýzu polárních sekundárních VOC (methanolu, formaldehydu a kyseliny mravenčí) ve vysychavých olejích.

Z tohoto důvodu byla zvolena metoda HPLC-DAD pro kvantitativní analýzu těchto těkavých analytů získaných ze vzorků olejů.

## 2. Teoretická část

### 2.1 Tradiční vysychavé oleje využívané v olejomalbě

Již od středověku je známo, že oleje ze lněných semínek, máku a vlašských ořechů polymerují. Tyto oleje obsahují převážně estery nenasycených mastných kyselin s jednou či více dvojnými vazbami (kyselina olejová, linolová, kyselina linolenová). [3] Obsah těchto kyselin určuje schopnost oleje polymerovat, neboli vysychat. [17] Vysychavé oleje vytváří filmy s vynikajícími mechanickými a optickými vlastnostmi, což je činí vhodnými pro použití jako pojiva v olejomalbě. [3]

Olej je směsí triglyceridů, kde každá molekula sestává ze tří mastných kyselin spojených esterovými vazbami s glycerolem. Mastné kyseliny jsou karboxylové kyseliny s uhlovodíkovým řetězcem ( $C > 6$ ), který je plně nasycený atomy vodíku nebo nenasycený s jednou až čtyřmi dvojnými vazbami podél řetězce. Dvojně vazby mohou být uspořádány tak, že tvoří buď konjugovaný nebo nekonjugovaný systém. [2,18]

Nejběžnějšími mastnými kyselinami, které se vyskytují ve vysychavých olejích, jsou nasycené kyseliny s 12, 14, 16 nebo 18 atomy uhlíku (kyselina laurová, myristová, palmitová a stearová) a nenasycené kyseliny s 16 či 18 uhlíky, s 1, 2 nebo 3 dvojnými vazbami (kyselina olejová linolová a linolenová). [19] Právě dvojně vazby jsou reakčním centrem kyseliny, na kterém dochází k polymeraci. Čím vyšší obsah dvojných vazeb olej obsahuje, tím má lepší vytvrzující vlastnosti. [17,20] Zastoupení jednotlivých mastných kyselin (hm. %) v tradičních vysychavých olejích uvádí tabulka 1.

Tabulka 1: Zastoupení mastných kyselin (hm. %) v tradičních vysychavých olejích [21–23]

Olej	Mastné kyseliny (hm. %)				
	Palmitová (16:0)	Stearová (18:0)	Olejová (18:1)	Linolová (18:2)	Linolenová (18:3)
Lněný	4-10	2-8	10-24	12-19	48-60
Makový	9-11	1-2	11-18	69-77	3-5
Ořechový	3-8	0,5-3	9-30	57-76	2-16

### 2.1.1 Lněný olej

Lněný olej se získává lisováním zralých semen lnu setého (*Linum usitatissimum*). Při nanesení lněného oleje na podklad dojde k reakci linolenové kyseliny s kyslíkem. Vznikne tenký film tvořený linoxynem, což je glycerid kyseliny linolové. [19]

Historicky se jedná o nejvýznamnější vysychavý olej a jeho šíře využitelnosti přetrvala až do současnosti. Olej je využíván především kvůli své výborné impregnační a napouštěcí schopnosti. Konkrétně se využívá pro výrobu barev, laků, fermeže, šepsů, linolea a tiskových barev. [17] Lněný olej zvýrazňuje kresbu dřeva, časem žloutne, a dává tak dřevu jantarový nádech. Jakost lněného oleje se časem zlepšuje a nečistoty se usazují u dna. [23]

Lněný olej má své uplatnění i v potravinářském průmyslu díky vysokému obsahu omega-3 mastných kyselin, přičemž pro konzumaci je vhodný pouze lněný olej získaný lisováním za studena. [17]

### 2.1.2 Makový olej

Makový olej se lisuje ze semen bílého máku (*Papaver somniferum*). Čistí a zahušťuje se podobně jako lněný, tedy dlouhým stáním. Olej má světlé zabarvení a stářím žloutne jen málo, proto je vhodnější pro tvorbu olejových bělob. Makový olej je polovysychavý, proto schne poměrně pomalu, déle než olej ořechový a lněný. Barevná vrstva je měkčí, méně odolná vůči rozpouštědlům a náchylnější k praskání. [23]

### 2.1.3 Ořechový olej

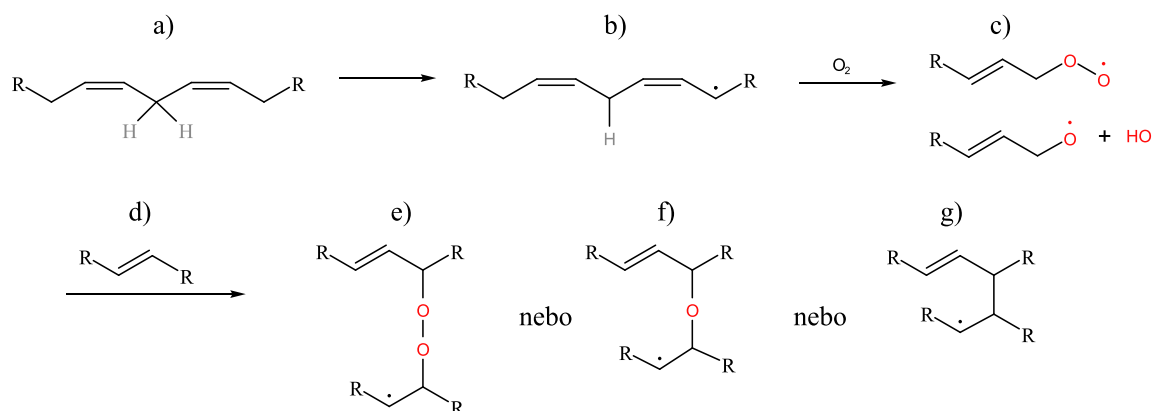
Ořechový olej se získává z plodů ořešáků (*Juglans nigra*). [17] Nejvíce se uplatňuje jako pojivo bílých barev, neboť nežloutne jako olej lněný. Nevýhodou je, že se musí rychle spotřebovat, protože se brzy kazí (žlukne). [23] Po uschnutí dává bezbarvý film, tvrdší a pevnější než film makového oleje. Tento film kromě toho nemá sklon k pozdějšímu změknutí. Další jeho význačnou vlastností je jeho nízká viskozita. Olej je velmi řídký, a proto při tření barev přijímá více pigmentů než ostatní oleje. Olejové barvy obsahující ořechový olej silněji kryjí. [24]

## 2.2 Mechanismus schnutí vysychavých olejů

Podstatou vysychání olejů je oxidační polymerace. Tento proces začíná tím, že se molekula vzdušného kyslíku naváže na vazbu uhlík-vodík (C-H) sousedící s jednou z dvojných vazeb v nenasycené mastné kyselině. [21,25] Tento počáteční autooxidační

proces, k němuž dochází během dvou až tří dnů (u filmu vystaveného běžným podmínkám prostředí a za nepřítomnosti katalyzátorů), vede k tvorbě hydroperoxidových radikálů ( $\text{HO}_2\cdot$ ), které vznikají vložením molekuly kyslíku do vazeb C-H sousedících s dvojnými vazbami uvnitř nenasycených mastných kyselin (viz obrázek 1a-c). [3] Lněný olej při působení vzduchu absorbuje velké množství kyslíku, až 20-30 % své hmotnosti. Rychlost absorpce kyslíku, který se podílí na oxidačních reakcích, se s časem zvyšuje. [3] To vede ke zvýšení viskozity filmu a ke změně indexu lomu a dalších fyzikálně-chemických vlastností. Peroxidové skupiny, které jsou velmi nestabilní, dávají vzniknout řetězové reakci, která spustí druhou reakci procesu vysychání, polymeraci a vytvoření husté zesíťované molekulární sítě (viz obrázek 1d-g). [3]

Prostřednictvím složitých chemických mechanismů vedou nově vzniklé radikály k vytvoření nových vazeb mezi různými molekulami triglyceridů až k postupnému vzniku zesíťované molekulární struktury, která obsahuje některé neoxidované, stále tekuté, a tudíž pohyblivé triglyceridové složky. Tvorba těchto makromolekul je to, co olej „vysušuje“. Úplné vyschnutí olejového filmu trvá měsíce. [3]



Obrázek 1: Schéma autooxidačních reakcí při vysychání oleje: Iniciační reakce spočívající ve ztrátě atomu vodíku a vložení molekuly kyslíku vede ke vzniku hydroperoxidových radikálů (a, b, c). V pozdější fázi reagují radikály a hydroperoxydy s dvojnými vazbami přítomnými v oleji, což vede k tvorbě dalších radikálů (d, e, f, g). Nově vzniklé radikály vyvolávají řetězovou reakci, která vede ke vzniku zesíťovaného polymeru.

Deriváty mastných kyselin obsahující dien, např. kyseliny linolové, jsou k této reakci zvláště náchylné, protože vytvářejí pentadienylové radikály. Mononenasyčené mastné kyseliny, například kyselina olejová, podléhají vysychání pomaleji, protože meziproducty allylových radikálů jsou méně stabilní (tj. tvoří se pomaleji). [26]

Rychlost oxidačních i polymeračních reakcí lze během vysychání zvýšit, což vede ke vzniku rovnoměrnější olejové vrstvy. Zahřívání lněného oleje při teplotách nad 100 °C nebo přidávání sušidel pro urychlení procesu schnutí se používá již od starověku. Tradičně se jako sušidlo do lněného oleje přidával oxid olovnatý, nebo se olej zahříval v olověných nádobách. Dnes se sušidla obvykle vyrábějí z linoleátů přechodných kovů nebo jiných syntetických katalyzátorů. [3] Zahřívání oleje bez přístupu kyslíku (předpolymerovaný lněný olej) proces vysychání naopak zpomaluje. Tento olej tvoří filmy, které jsou trvanlivější, odolnější a méně náchylné ke žloutnutí. [3]

Nicméně stejně jako u všech organických látek podléhají filmy lněného oleje degradaci, která mění jeho původní vlastnosti. Faktory, jako je teplota, světlo a reaktivní látky v atmosféře, ovlivňují stabilitu olejové barvy, která se postupně stává citlivější na vlhkost. Po proběhnutí autooxidačních procesů, může hydrolýza a oxidační reakce vést k částečnému rozkladu struktury zesíťovaného polymeru za vzniku menších molekul, což vede ke vzniku sekundárních hydroxylovaných produktů (aldehydy, ketony a alkoholy) či terciárních karboxylových produktů ve formě volných nasycených mastných kyselin, které se spontánní hydrolýzou uvolní z esterových vazeb triacylglycerolů. [21,25]

### **2.3 Tvorba kovových karboxylátů**

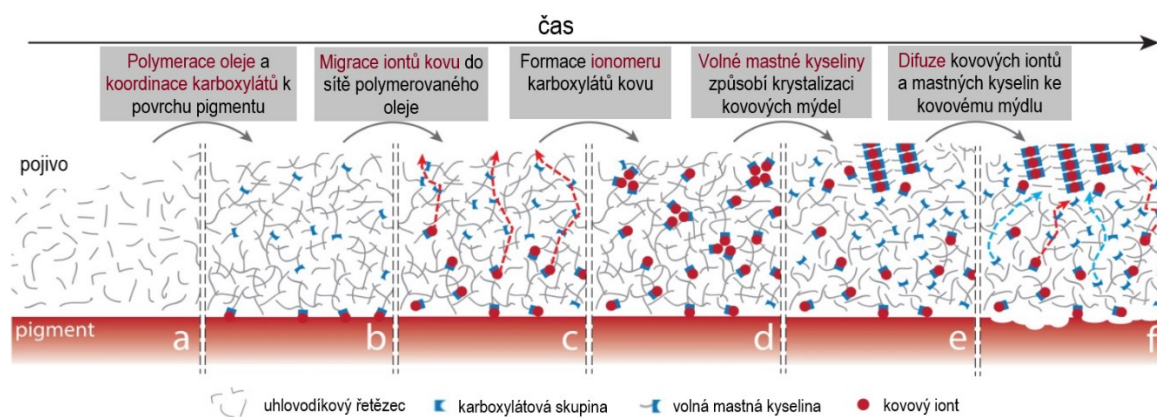
Tvorba kovových karboxylátů v barevných vrstvách uměleckých děl je velmi složitý chemický proces, který vzniká reakcí mastné složky pojiva s kationty některých kovů pocházejících z používaných pigmentů. [3,27,28] Přestože tzv. zmýdelnění postihuje hlavně olejomalby, může se vyskytovat také u vaječných temper. [29] Původně je olejový film tvořen nepolárním a hydrofobním materiálem, ale během procesů stárnutí způsobených kontaktem s pigmenty a atmosférou se jeho chemická a fyzikální povaha pomalu mění.

Hydrolýza a oxidační reakce vedou k částečnému rozkladu zesíťované struktury polymeru za vzniku menších karboxylátů a hydroxylovaných sloučenin. V přítomnosti zásaditých či disociovatelných pigmentů mohou karboxyláty tvořit organokovové sloučeniny salinizačními reakcemi. Tyto degradační produkty jsou vysoce hydrofilní, díky čemuž je vysychající olej reaktivnější vůči vlhkosti, která může pronikáním do filmu urychlit oxidační a hydrolýzní reakce. [3]

Nejběžnějšími kovovými ionty, které se mohou objevovat v barevných vrstvách, tak i v podkladové barvě, a které se podílejí na saponifikaci, jsou zinek a olovo. Tyto ionty pochází ze zinkové běloby (ZnO) [30], olovnaté běloby ( $2\text{Pb}(\text{CO}_3)_2 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$  a/nebo  $\text{PbCO}_3$ ) [31], olovnato-cínčitě žluti ( $\text{Pb}_2\text{SnO}_4$ ) [32], minia ( $\text{Pb}_3\text{O}_4$ ), oxidu olovnatého ( $\text{PbO}$ ) [33] nebo chromové žluti ( $\text{PbCrO}_4$ ) [34]. V obrazech byla také nalezena mýdla měděná, vápenatá, draselná a hliníková. [35]

Mastné kyseliny v kovových mýdlech jsou téměř výhradně nasycené, konkrétně kyselina palmitová a stearová. Příležitostně mohou být tyto kyseliny doprovázené dikarboxylovou kyselinou azelaovou [36] nebo nenasycenou kyselinou olejovou [37].

U olejomalb se předpokládá, že raným stadiem tvorby kovových karboxylátů je vznik ionomeru, který vzniká během polymerace filmu olejové barvy, kde jsou karboxylátové skupiny vzniklé procesem autooxidace koordinovány kovovými kationty ( $\text{Zn}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$ ) uvolněnými z povrchu pigmentu a migrujícími v barevné vrstvě přeskokováním z jedné  $\text{COO}^-$  skupiny ke druhé. [38] Postupem času dojde k difuzi kovových iontů a dalších mastných kyselin ke kovovému mýdlu. Výsledná mýdla vzniklá touto reakcí mohou následně krystalizovat, agregovat a vystupovat k povrchu malby a způsobit tak jeho deformaci (viz obrázek 2). [39]



Obrázek 2: Schéma mechanismu tvorby kovových karboxylátů v barevné vrstvě v čase; upraveno podle [40].

Mezi projevy konečného stadia saponifikace, které negativně ovlivňuje vzhled a stabilitu díla, patří například vznik tzv. protruzí, majících za následek odpadávání barevné vrstvy (obrázek 3C) [39], zprůhlednění zmýdelnatělé barevné vrstvy a tím

zviditelnění podkladové vrstvy (viz obrázek 3A) [27,28], či tvorba výkvětů na povrchu malby (viz obrázek 3B).



Obrázek 3: Příklady důsledků tvorby kovových mýdel v obrazech – zprůhlednění napadené vrstvy zvýrazňující podkladovou vrstvu (A), výkvěty (B) a protruze (C). Převzato z [35,41–43].

Proces tvorby mýdla závisí na mnoha vnitřních a vnějších faktorech, konkrétně na typu reagujících pigmentů, složení pojiva, charakteru příměsí, koncentraci jednotlivých složek, relativní vlhkosti, teplotě, typu podkladu, předchozím čištění a konzervaci apod. [27,28]

Jedním z neočekávaných výsledků studia saponifikace byl právě i mravenčan olovnatý  $Pb(HCOO)_2$ , který byl jednoznačně identifikován rentgenovou práškovou difrakcí (XRPD) a také potvrzen pomocí  $^{13}C$  a  $^{207}Pb$  nukleární magnetické rezonance pevného stavu (ssNMR). [4] V případě maleb je jediným dosud publikovaným případem, detekce dihydrátu mravenčanu zinečnatého ( $Zn(HCOO)_2 \cdot 2H_2O$ ), který byl spolu s  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  a  $ZnS$  identifikován jako produkt degradace zinkové běloby ( $ZnO$ ) na ploše již zmíněného Dalího obrazu „*Pár s hlavami plnými oblaků*“ (1936). V minulosti byly různé kovové mravenčany také pozorovány jako četné korozní produkty na kovových artefaktech z olova, mědi nebo jejich příslušných slitin ale také na skle nebo vápenatých předmětech. [44]

Monitorování vývoje karboxylátů kovů v barevných vrstvách by mohlo sloužit jako užitečný nástroj pro sledování aktuálního stavu maleb a k predikci potenciálních rizik vyplývajících z podmínek prostředí a/nebo konzervačního ošetření. [25]

## 2.4 Technika QuEChERS

V této práci byla pro extrakci a přečištění vzorků olejů použita technika QuEChERS, což je anglická zkratka šesti slov, které vystihují vlastnosti této techniky: Quick (rychlá), Easy (jednoduchá), Cheap (levná), Effective (efektivní), Rugged (robustní) a Safe (bezpečná). [45] Jedná se o moderní techniku, původně vyvinutou pro analýzu veterinárních léčiv v živočišných tkáních a následně upravenou pro analýzu reziduí pesticidů v ovoci, zelenině, cereáliích, potravinách a dalších zemědělských produktech. [46] Tato technika může být jednoduše optimalizována pro další různé matrice a analyty. Faktory, které lze měnit jsou: typ, pH nebo polarita rozpouštědel (acetonitril, ethylacetát, aceton), třepání či míchání, doba extrakce, typ a množství přidané soli (síran hořečnatý, chlorid sodný, octan sodný), množství a typy sorbentů. [45,47]

Později byla navržena modifikace původní techniky tak, aby byla vhodná i pro analýzu matric s vysokým obsahem oleje (např. avokáda nebo oliv). [48]

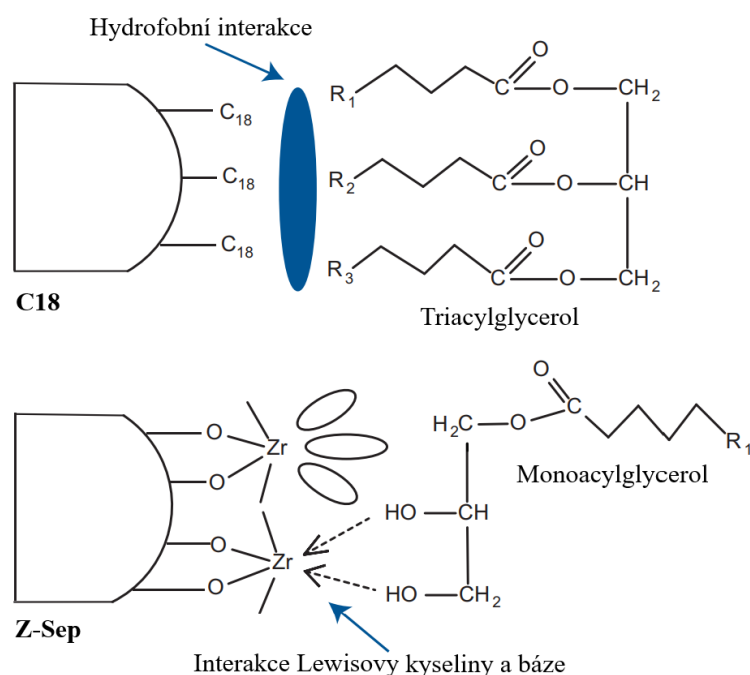
Technika QuEChERS se skládá ze dvou hlavních kroků. První krok procedury je extrakce (zhomogenizovaného) vzorku pomocí organického rozpouštědla a frakcionace olejové a rozpouštědlové fáze za pomoci soli. Druhý krok je extrakce a přečištění organické vrstvy za pomoci disperzní SPE techniky (d-SPE) za využití celé řady sorbentů. [49]

Použití acetonitrilu jako extrakčního rozpouštědla je vhodné z několika důvodů. Rozpustnost lipidů v acetonitrilu je omezená, proto je koextrakce lipidů tímto rozpouštědlem relativně nízká. Kromě toho je acetonitril kompatibilní s mobilní fází používanou při HPLC separaci. [50] I přesto mohou být některé látky koextrahovány do acetonitrilové fáze a jejich přítomnost může způsobit problémy při následné analýze (například překrýváním jednotlivých signálů).

Pro krok přečištění se často používá disperzní extrakce pevnou fází (d-SPE), kdy je sorbent přimíchán přímo do extraktu. [45] Například pro odstranění barviv, sterolů a jiných polárních a nepolárních sloučenin bylo dříve popsáno použití grafitického uhlíku (GCB). [45,51] Sacharidy, mastné a další organické kyseliny, lipidy a některé pigmenty lze odstranit přidáním sorbentu na bázi primárních a sekundárních aminů (PSA), pro

odstranění lipidů a mastných kyselin s dlouhými řetězci se přidává sorbent C18. [15,45,51] Pro odstranění chlorofylu se osvědčil chlorofiltr. [45,52]

Relativně nově se pro odstranění interferentů z olejových matric využívá směsný sorbent Z-sep/C18, což je komerčně dostupná směs dvou sorbentů. Jedním z nich je endkapovaný, polymerně vázaný oktadecyl na silikagelu (C18) a druhým oxid křemičitý potažený oxidem zirkoničitým ( $ZrO_2$ ). [53] V materiálu Z-Sep/C18 je zadržování lipidů založeno na dvou synergických interakcích: i) interakci mezi polárními skupinami lipidu a iontově výměnnou skupinou sorbentu a ii) interakci mezi hydrofobními řetězci lipidu a hydrofobními skupinami sorbentu (C18). Pro první typ interakce, se obecně předpokládá, že v těchto materiálech působí atom zirkonu jako Lewisova kyselina (akceptor elektronů), zatímco aniontová centra kyslíku ( $O^{2-}$ ) působí jako Lewisova báze. Povrchové hydroxylové skupiny mohou sloužit jako Brønstedova kyselina i báze, jelikož mohou odevzdávat nebo přijímat proton v závislosti na pH. Princip interakce koextraktů s povrchem sorbentu Z-Sep/C18 je uveden na obrázku 4. [50,54]

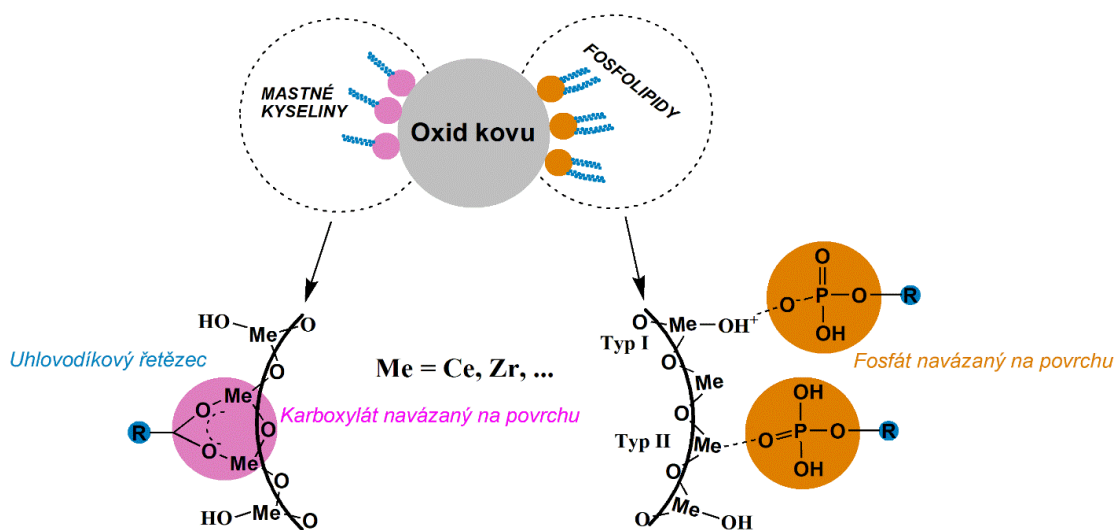


Obrázek 4: Interakce sorbentu Z-Sep/C18 s mono/triacylglyceroly přítomnými v olejové matrici. Retence lipidů je založena na dvou synergických interakcích. Obrázek přejat z [53].

Dále byly pro porovnání účinnosti přečištění extraktů získaných ze vzorků oleje použity nanostrukturální oxidy kovů, oxid ceričitý ( $CeO_2$ ) a oxid zirkoničitý ( $ZrO_2$ ), které byly

připraveny v Pilotním centru Ústavu anorganické chemie AV ČR, v.v.i. Tyto nanokrystalické oxidy kovů představují významnou třídu anorganických nanočásticových systémů, široce využívaných v různých technologických oblastech, především v katalýze. [55] Vysoký specifický povrch spolu s povrchovými hydroxylovými skupinami (Me-OH) lze efektivně využít nejen v katalýze, ale také v analytické chemii pro předúpravu vzorků. [56]

Interakce mezi nanočásticemi oxidů kovů a biomolekulami byly intenzivně studovány a jedná se o tzv. bio-nano rozhraní. [57] Lze předpokládat, že mechanismus přečištění vzorků probíhá tak, jak je znázorněno na obrázku 5. Po interakci mastných kyselin s povrchem oxidů kovů pravděpodobně dojde k vytvoření vrstvy kolem povrchu oxidů kovů, v níž se polární karboxylová skupina váže na povrch oxidu kovů a nepolární, hydrofobní část tak směřuje do rozpouštědla. Naproti tomu fosfolipidy obsažené v olejích mohou interagovat s oxidy kovů v závislosti na reakčních podmínkách, jako je teplota, hodnota pH, vliv rozpouštědla a typ oxidu. [58,59] Výsledkem je acidobazická kondenzační reakce s uvolněním molekuly vody jako vedlejšího produktu. [59]



Obrázek 5: Předpokládané interakce mezi mastnými kyselinami a fosfolipidy s povrchem oxidů kovů.

## 2.5 Stanovení methanolu

Methanol se nejčastěji analyzuje pomocí plynové chromatografie, nejčastěji ve spojení s plamenovým ionizačním detektorem (GC-FID). [60–62] Jeho retenční čas se však může překrývat s jinými těkavými sloučeninami (např. s acetaldehydem), což může vést k záměně analytů a nesprávné interpretaci výsledků. Alternativní analýzou methanolu je spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). [62–65] Pro GC/MS analýzu popsali Lee *a spol.* derivatizaci methanolu 3,4-dihydro-2H-pyranem za kyselý katalýzy koncentrované kyseliny chlorovodíkové. GC/MS má však omezení kvůli podobné molekulové hmotnosti methanolu a kyslíku a nízkému bodu varu methanolu. [65] Další nevýhodou plynové chromatografie je nákladná instrumentace, jako je například headspace dávkovač pro dávkování vzorku a nutnost drahých nosných plynů (He, N<sub>2</sub>, Ar).

V předchozích studiích bylo popsáno několik způsobů, jak převést methanol na vhodný derivát pro následné stanovení pomocí HPLC. Kuo *a spol.* v roce 2002 popsali derivatizaci methanolu pomocí 4-[N-methyl, N-(1-naftylmethyl)]-amino-4-oxobutanové kyseliny (NAOB), 4-dimethylaminopyridinu (DMAP) a 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid hydrochloridu (EDC) před následným stanovením metodou HPLC s UV detekcí. [66] Chen *a spol.* (1997) popsali jednoduchou a citlivou metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro stanovení methanolu v lidské plazmě po derivatizaci s 3-bromomethyl-7-methoxy-1,4-benzoxazin-2-onem s použitím benzalkoniumchloridu jako katalyzátoru fázového přenosu. [67] Jako nejvýhodnější se pro stanovení methanolu pomocí RP-HPLC s DAD detekcí jeví činidlo 9-fluorenylmetyloxykarbonyl chlorid (FMOC-Cl). [68] Tohoto činidla využil Gu Huanga *a spol.* ve své dřívější studii, kde popisuje jednoduché a selektivní stanovení alifatických alkoholů C1-C4 na RP-HPLC (kapalinová chromatografie s reverzními fázemi) s fluorescenční detekcí (viz kapitola 2.5.1).

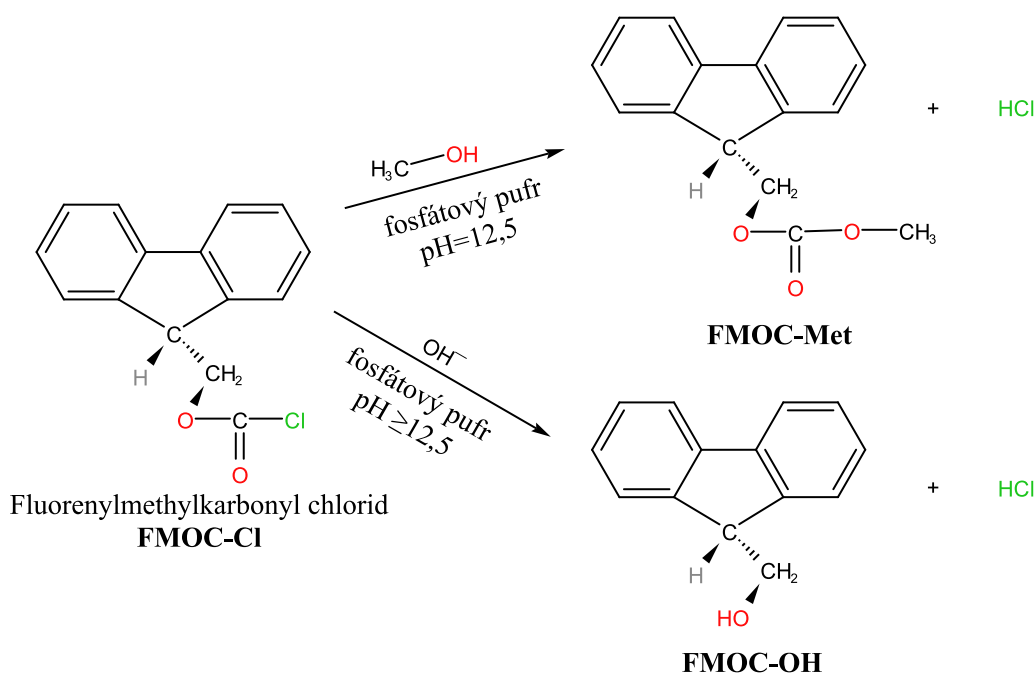
### 2.5.1 Derivatizace methanolu pomocí FMOC-Cl

9-fluorenylmetyloxykarbonyl chlorid (FMOC-Cl) je činidlo, které se využívá jako chránící látka aminoskupin, při syntéze bicyklického analogu prolinu, k syntéze peptidů a oligonukleotidů a dále pro derivatizaci glyfosátu a jeho degradačního produktu kyseliny

aminomethylfosfonové (AMPA). Běžně se využívá jako předkolonové derivatizační činidlo pro HPLC analýzu aminokyselin. [69]

Alkoholy jsou méně reaktivní vůči FMOC-Cl než jsou aminokyseliny, protože OH skupina má menší nukleofilní aktivitu než skupina NH<sub>2</sub>. Zásadité prostředí může usnadnit derivatizační reakci posílením nukleofilní reaktivity alkoholů. [68]

Huang *a spol.* (1999) popsali předkolonovou derivatizaci pomocí FMOC-Cl pro RP-HPLC stanovení nízkomolekulárních alifatických alkoholů (C1-C4) detekované fluorescenčním detektorem. Derivatizační reakce probíhala při laboratorní teplotě v prostředí acetonitrilu s vodou v poměru 1:1 (obj./obj.). Reakce (viz obrázek 6) vede ke vzniku značného množství HCl, proto je nutné zásadité prostředí udržovat pomocí pufru. V tomto případě byl použit 42 mmol/l fosfátový pufr, jehož pH bylo testováno v rozsahu 11-13. Maximálního výtěžku reakce za vzniku derivátu FMOC-Met bylo dosaženo při pH 12,5. Při hodnotě pH nižší než 12,5 zůstalo nezreagováno značné množství derivatizačního činidla, jehož pík interferoval se sousedním píkem derivátu methanolu (FMOC-Met) a způsoboval vyšší šum základní linie. Nad pH 12,5 převládla hydrolyza derivatizačního činidla a snížila zdánlivý výnos reakce. FMOC-Cl je rozložitelný v bazických podmínkách (pH  $\geq$  12), kde se hydrolyzou a následnou dekarboxylační reakcí přemění na 9-fluorenylmethanol (FMOC-OH). Tato nežádoucí reakce (obrázek 6) může snížit kapacitu reakce, proto je nutné použít velký nadbytek derivatizačního činidla. [68] Tento aspekt byl v této práci zohledněn při optimalizaci metody pro derivatizaci methanolu (viz kapitola 4.2.1)



Obrázek 6: Reakční schéma derivatizační reakce methanolu s FMOC-Cl. Touto reakcí vzniká derivát činidla s methanolem FMOC-Met, produkt hydrolyzy derivatizačního činidla FMOC-OH a HCl.

## 2.6 Stanovení formaldehydu

Pro stanovení formaldehydu byla popsána celá řada metod. Pro chromatografické stanovení nízkomolekulárních karbonylových sloučenin (C1–C5) může být použit kryogenní záchyt a následné stanovení dvourozměrnou plynovou chromatografií s MS detekcí. Zachycené karbonylové sloučeniny a voda se rozdělí v koloně s vysoce polární náplní (5% 1,2,3-tris(2-kyanoethoxy)propan). Kolonou prošlé karbonylové sloučeniny jsou následně separovány a stanoveny na kapilární analytické koloně s nepolární náplní. [70–72] Aplikace chemické derivatizace v plynové chromatografii při detekci formaldehydu není tak častá jako u kapalinové chromatografie, přesto bylo popsáno několik metod. Jedna z nich využívá reakce O-alkylhydroxylaminů s karbonylovou sloučeninou za vzniku příslušného O-alkyloximu. [72] Další metoda chemické derivatizace pro plynovou chromatografii je založena na reakci formaldehydu s 2-(benzylamino)ethanolem, při níž vzniká příslušný 3-benzyloxazolidin. Plynný formaldehyd je zachytáván na sorbentu Chromosorb 102 s navázaným činidlem a následně desorbován isooktanem. Odpovídající deriváty jsou separovány na chromatografické kapilární koloně. [72,73] Derivatizaci s 2,4-dinitrofenylhydrazinem (DNPH) lze v plynové chromatografii také použít, nedosáhla však velkého rozšíření. [74–76] Hlavními důvody jsou nízká těkavost hydrazonů, malá citlivost běžně používaných

plamenových ionizačních detektorů a vznik dvojitých píků konformačních isomerů některých derivátů, které mohou ztížit identifikaci a kvantifikaci v komplexních vzorcích.

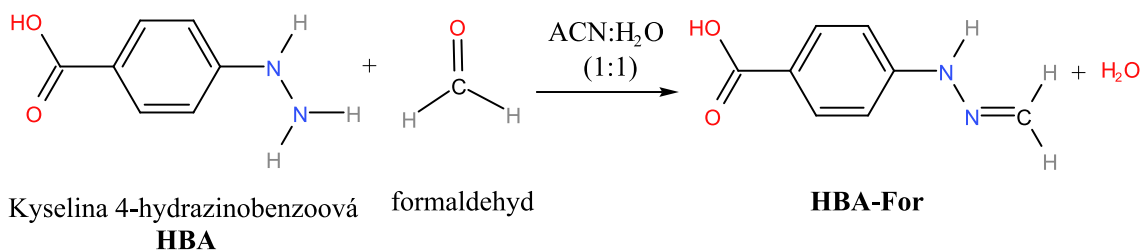
Častější uplatnění než u plynové chromatografie nachází chemická derivatizace ve vysoce účinné kapalinové chromatografii. Dříve byla popsána činidla pro derivatizaci aldehydů, konkrétně O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamin hydrochlorid (PFBHA) [77], cysteamin [78,79] a dansylhydrazin (DNSH) [80]. Pravděpodobně nejvíce aldehydů se stanovuje po jejich derivatizaci s výše zmiňovaným 2,4-dinitrofenylhydrazinem. [81–86] Reakce s formaldehydem probíhá v kyselém prostředí za vzniku příslušných hydrazonů, které jsou po separaci na chromatografické koloně detekovány UV/VIS detektorem. [72] Použití DNPH však může mít řadu nevýhod, jako je jeho nízká selektivita, nízká rozpustnost ve vodě a také to, že činidlo často obsahuje poměrně velké množství nečistot, nejčastěji formaldehyd, acetaldehyd a aceton. S kontaminací činidla DNPH formaldehydem se často setkáváme kvůli jeho rozšířenému výskytu v životním prostředí. [86–88] Z tohoto důvodu nebylo toto činidlo vybráno pro derivatizaci formaldehydu v této práci.

Ze studie [89] vyplývá, že vhodným činidlem pro derivatizaci aldehydů je kyselina 4-hydrazinobenzoová (HBA) (viz. kapitola 2.6.1). Toto činidlo tvoří s aldehydovými sloučeninami barevný produkt, který lze detekovat pomocí spektrofotometru. [90,91]

### 2.6.1 *Derivatizace formaldehydu pomocí HBA*

Jedním z derivatizačních činidel pro analýzu aldehydů je kyselina 4-hydrazinobenzoová (HBA), která se ukázala jako poměrně výhodné derivatizační činidlo díky své relativně vysoké rozpustnosti ve vodě a dalších rozpouštědlech, vysoké selektivitě a citlivosti, jednoduchým přípravným krokům a použitelnosti pro různé separační a/nebo detekční techniky, jako je HPLC-UV nebo kapilární elektroforéza (CE) spojená s detekcí DAD. [89]

Lima *a spol.* uvádí, že reakce nejlépe probíhá při pokojové teplotě v prostředí acetonitrilu s vodou v poměru 1:1. Derivatizační metoda formaldehydu a je založena na nukleofilní reakci formaldehydu s HBA za vzniku odpovídajících hydrazonů s maximem absorpance při 320 nm (viz. obrázek 7).



Obrázek 7: Schéma derivatizační reakce HBA s formaldehydem za vzniku příslušného hydrazonu (HBA-For)

## 2.7 Stanovení kyseliny mravenčí

V současné době existuje celá řada metod stanovení organických kyselin bez potřeby jejich derivatizace, jako jsou metody elektrochemické [92], enzymatické [93], či spektrofotometrické [94]. V literatuře a v některých aplikačních listech lze nalézt chromatografické podmínky pro stanovení organických kyselin především v džusech a víně. [95,96] Tyto metody lze jednoduše aplikovat také na jiné druhy vzorků, jako jsou například oleje po jejich přečištění od nežádoucích interferentů.

Použití plynové chromatografie (GC) pro stanovení organických kyselin není příliš vhodné, zejména z toho důvodu, že v případě organických kyselin se jedná zejména o netěkavé látky, které je potřeba před GC analýzou derivatizovat.

Ze všech dostupných metod se jeví jako nejefektivnější jejich stanovení pomocí HPLC, nejčastěji v kombinaci s UV/VIS detekcí. [97] Metoda HPLC tak umožňuje rychlé a citlivé stanovení organických kyselin v různých matricích a nevyžaduje přitom složité úpravy vzorků před analýzou.

### 3. Experimentální část

#### 3.1 Použité chemikálie

K přípravě mobilních fází pro chromatografické analýzy byl použit:

- acetonitril, HPLC Gradient grade (J.T.Baker, Polsko)
- destilovaná voda

Pro přípravu standardních roztoků studovaných analytů byly použity:

- methanol, UHPLC gradient grade (Fisher Scientific, Velká Británie)
- formaldehyd, 36-38 % (p.a., Penta s.r.o., Česká republika)
- kyselina mravenčí, 98% (p.a., Penta s.r.o., Česká republika)

Pro derivatizaci methanolu pomocí fluorenylmethoxykarbonyl chloridu (FMOC-Cl) v prostředí 42 mmol/l fosfátového pufru o pH=12,5 byly použity následující chemikálie:

- FMOC-Cl pro HPLC derivatizaci ( $\geq 99,0$  % (HPLC), Sigma-Aldrich, Německo)
- dihydrát fosforečnanu sodného (p.a.,  $\geq 99,0\%$ , Sigma-Aldrich, Německo)
- hydroxid sodný, (Penta s.r.o., Česká republika)
- acetonitril, HPLC Gradient grade (J.T.Baker, Polsko)

Pro derivatizaci formaldehydu pomocí kyseliny 4-hydrazinobenzoové (HBA) byly použity následující chemikálie:

- kyselina 4-hydrazinobenzoová, min. 97 %, pro syntézu (Carl Roth, Německo)
- acetonitril, HPLC Gradient grade (J.T.Baker, Polsko)

Pro analýzu reálných vzorků byly vybrány tyto vzorky olejů:

- Nevysychavý olej:
  - olivový olej (Extra Virgin Olive Oil 2019/2020, Michail & Tomaras Family Farm, Finikounda, Messinia, Řecko)
- Vysychavé oleje (obrázek 8):
  - Iněný olej, lisovaný za studena a filtrovaný (Kremer Pigmente, Německo)

- makový olej, filtrovaný, rafinovaný, s číslem kyselosti nad 0,40 (Kremer Pigmente, Německo)
- olej z vlašských ořechů, lisovaný za studena, filtrovaný, bez další úpravy (Kremer Pigmente, Německo)



Obrázek 8: Vzorky vysychavých olejů (zleva lněný, makový a ořechový olej)

Pro disperzní extrakci tuhou fází (QuEChERS) byly použity následující chemikálie:

- Extrakční rozpouštědlo: acetonitril, HPLC Gradient grade (J.T.Baker, Polsko)
- Sorbenty:
  - Supel<sup>TM</sup> QuE Z-Sep/C18 Tube o objemu 2 ml (Supelco, Sigma-Aldrich, Německo), která obsahuje směs 20 mg Z-Sep a 50 mg Discovery DSC-18
  - nanokrystalický oxid titaničitý (TiO<sub>2</sub>) připravený v Pilotním centru Ústavu anorganické chemie AV ČR, v.v.i.
  - nanokrystalický oxid ceričitý (CeO<sub>2</sub>) připravený v Pilotním centru Ústavu anorganické chemie AV ČR, v.v.i.
- Soli:
  - octan sodný bezvodý (CH<sub>3</sub>COONa; Lach-Ner, Česká republika)
  - síran hořečnatý bezvodý čistý (MgSO<sub>4</sub>; Lach-Ner, Česká republika)

### 3.2 Instrumentace

Vzorky pro stanovení, identifikaci a kvantitativní analýzu těkavých analytů byly separovány na koloně s polárním fenyl-etherovým endkapingem ReproSil Star Phenyl - Ether, 3  $\mu\text{m}$ , 100 x 4,6 mm (Dr. Maisch, Německo) a analyzovány pomocí HPLC systému Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific™, Palo Alto, USA) vybaveného detektorem s diodovým polem (DAD), kvartérní gradientovou pumpou a autosamplerem.

Sběr a vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí softwaru Chromeleon Chromatography Data System (CDS) (Thermo Scientific).

Absorpční spektra byla naměřena pomocí UV/VIS spektrofotometru LAMBDA™ 35 (PerkinElmer Inc., USA) se softwarem WinLab. Byla použita křemenná kyveta s optickou dráhou 1 cm. Vzorky byly měřeny proti referenčnímu vzorku čistého acetonitrilu.

Materiálová charakterizace práškových sorbentů byla prováděna pomocí práškového rentgenového difraktometru (XRPD) Bruker D2 s rentgenovou lampou (Cu(K $\alpha$ ), 30 kV, 10 mA) a jednodimenzionálním detektorem (1D) LynxEye (Bruker, Karlsruhe, Germany). Byla použita Sollerova clona 2.5 a divergenční clona (šířka štěrbin 0,6 mm). Difrakční záznam byl skenován s krokem 0.00405° a byl měřen v rozsahu od 5° do 95° 2 $\theta$ . Získaná data byla zpracována v programu DiffraPlusEva (Bruker AXS) s databází JCPDS PDF-2 (ICDD, USA) a se strukturními modely z ICSD databáze (FIZ Karlsruhe, Německo). Mikrostruktura a morfologie práškových sorbentů byly studovány pomocí transmisního elektronového mikroskopu (TEM) FEI Talos F200X.

### 3.3 Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztok methanolu o koncentraci 12000 mg/l pro přípravu kalibračních roztoků byl připraven odpipetováním 378,9  $\mu\text{l}$  koncentrovaného methanolu do 25ml odměrné baňky, roztok byl doplněn acetonitrem po rysku.

Zásobní roztok formaldehydu o koncentraci 4000 mg/l byl připraven 91,7  $\mu\text{l}$  of formaldehydu a roztok byl doplněn ve 25ml odměrné baňce roztokem acetonitrilu po rysku.

Zásobní roztok kyseliny mravenčí o koncentraci 2000 mg/l byl připraven odpipetováním 41  $\mu\text{l}$  koncentrované kyseliny mravenčí do 50ml odměrné baňky a doplněn acetonitrem po rysku.

Zásobní roztok FMOC-Cl o koncentraci 3000 mg/l byl připraven odvážením 0,3000 g FMOC-Cl do 100ml odměrné baňky a doplněn acetonitrem po rysku.

42mM fosfátový pufr o pH 12,5 byl připraven odvážením 3,2762 g dihydrátu fosforečnanu sodného do 300 ml destilované vody, následně byla do roztoku ponořena skleněná elektroda a pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 12,5 pomocí roztoku NaOH o koncentraci 40 g/l. Takto připravený pufr byl doplněn destilovanou vodou na objem 500 ml.

Zásobní roztok HBA o koncentraci 3000 mg/l byl připraven odvážením 0,3000 g HBA do 100ml odměrné baňky a doplněn roztokem acetonitril:voda (1:1) po rysku. Takto připravený roztok se velmi rychle rozkládá na světle, proto byl uchováván v tmavé lahvi v lednici (4 °C) za nepřístupu světla.

### **3.4 Příprava vzorků pro HPLC analýzu**

#### *3.4.1 Příprava kalibračních vzorků*

Pro přípravu kalibračních roztoků methanolu o koncentracích 0; 50; 100; 300; 500; 600; 800 a 1000 mg/l bylo odpipetováno vypočítané množství zásobního roztoku o koncentraci 12000 mg/l, následně bylo přidáno 250 µl 42mM fosfátového pufru o pH=12,5 a roztok byl doplněn acetonitrem na objem 500 µl. Derivatizační reakce byla započata přidáním 1000 µl FMOC-Cl o koncentraci 3000 mg/l. Reakce probíhala po dobu 1 h a poté byl vzorek připraven k HPLC analýze.

Pro přípravu kalibračních roztoků formaldehydu o koncentraci 0; 50; 100; 300; 500; 600; 800 a 1000 mg/l bylo odpipetováno vypočítané množství zásobního roztoku formaldehydu o koncentraci 4000 mg/l a roztok byl doplněn acetonitrem na celkový objem 0,5 ml. Derivatizační reakce byla započata přidáním 750 µl zásobního roztoku HBA o koncentraci 3000 mg/l. Reakce probíhala 1 h a poté byl vzorek připraven k HPLC analýze.

Pro přípravu kalibračních roztoků kyseliny mravenčí o koncentraci 0; 50; 100; 300; 500; 600; 800; 1000 mg/l bylo odpipetováno vypočítané množství zásobního roztoku kyseliny mravenčí o koncentraci 2000 mg/l a roztok byl doplněn acetonitrem na objem 1,5 ml. Takto byl vzorek připraven k HPLC analýze.

#### *3.4.2 Příprava extraktů z olejů*

Získání extraktů olejů bylo součástí vývoje metody stanovení, optimalizovaný postup je proto pospaný v kapitole 4.5.3.

Pro stanovení methanolu bylo do 2ml tmavé vialky typu SUPELCO odebráno 250 µl extraktu z oleje. K tomuto podílu bylo přidáno 250 µl fosfátového pufru o pH=12,5 a následně 1000 µl derivatizačního činidla FMOC-Cl o koncentraci 3000 mg/l (výsledná koncentrace FMOC-Cl v roztoku byla 2000 mg/l). Derivatizační reakce probíhala po dobu 60 min a tím byl vzorek připraven k HPLC analýze.

V případě formaldehydu bylo do 2ml vialky odpipetováno 750 µl extraktu z oleje a 750 µl derivatizačního činidla HBA o koncentraci 3000 mg/l (výsledná koncentrace HBA v roztoku byla 1500 mg/l). Derivatizační reakce probíhala po dobu 60 min a tím byl vzorek připraven k HPLC analýze.

Pro analýzu kyseliny mravenčí bylo odebráno 1500 µl extraktu z oleje do 2ml vialky a následně se provedla HPLC analýza.

### **3.5 HPLC-DAD analýza a detekce**

Chromatografická analýza byla nastavena a optimalizována zvlášť pro každý analyt s ohledem na použitý gradient mobilní fáze a její průtok, objem nástřiku a teplotu kolony. Po každém vzorku oleje se navíc kolona před kondicionováním promyla acetonitrilem. Každý roztok byl nastříknut třikrát za stanovených chromatografických podmínek.

### **3.6 Vyhodnocení výsledků HPLC analýzy**

Pro vyhodnocení výsledků byl použit program OriginPro 2015 od firmy OriginLab Corporation (Northampton, MA, USA), pomocí kterého byly zjištěny retenční časy a plochy píků analytů ve standardech a vzorcích. Na základě těchto údajů byly poté za pomoci programu Microsoft Office Excel 2016 provedeny potřebné výpočty.

### **3.7 Validační parametry**

#### *3.7.1 Mez detekce a mez stanovitelnosti*

Mez detekce (*LOD*, mg/l) a mez stanovitelnosti (*LOQ*, mg/l) lze vypočítat několika způsoby, například z poměru signálu a šumu či ze směrodatné odchylky odezvy a směrnice kalibrační přímky.

Meze detekce (*LOD*) a meze stanovitelnosti (*LOQ*) byly v této práci vypočteny pomocí vzorců (1) a (2):

$$LOD = 3,3 \cdot \frac{SD}{a} \quad (1)$$

$$LOQ = 10 \cdot \frac{SD}{a} \quad (2),$$

kde SD je směrodatná odchylka odezvy (z angl. „*standard deviation*“) a *a* je směrnice kalibrační přímky. [98]

### 3.7.2 *Linearita*

Linearita byla stanovena pro koncentrační rozsah analytů 50-1000 mg/l a jednotlivé standardy byly analyzovány třikrát za stejných chromatografických podmínek. Byly sestrojeny kalibrační přímky závislosti plochy píku na koncentraci a pomocí nich byly získány hodnoty korelačních koeficientů  $R^2$  pro jednotlivé analyty.

## 3.8 Technika QuEChERS

V této práci byla k extrakci zkoumaných těkavých analytů použita technika QuEChERS, avšak s určitými modifikacemi, které spočívaly v odlišném použití solí (tzv. acetátová pufovaná metoda). [99] Použití bezvodého síranu hořečnatého snižuje objem vodné fáze hydratací solí, podporuje oddělení rozpouštědla a zlepšuje výtěžnost polárních analytů. [100,101] Přídavek octanu sodného posiluje vysolovací efekt, umožňuje pufování acetonitrilu a lepší extrakci polárních analytů citlivých na pH. [102]

Jako extrakční rozpouštědlo byl zvolen acetonitril, v němž je rozpustnost lipidů z olejové matrice omezená, proto je koextrakce lipidů tímto rozpouštědlem relativně nízká. Kromě toho je použití acetonitrilu výhodné díky jeho kompatibilitě s mobilními fázemi používanými při HPLC separaci jednotlivých analytů. [103]

### 3.8.1 *Výtěžnost extrakce*

Výtěžnost extrakce stanovovaných analytů pro tři spikované koncentrace, 125, 250 a 500  $\mu\text{g/g}$ , s pěti replikáty pro každý analyt byla vypočtena podle rovnice (3) [104]:

$$\% \text{ výtěžnost} = \left( \frac{c_{zjištěná} - c_{původní}}{c_{spikovaná}} \right) \cdot 100 \% \quad (3)$$

Pro vyjádření koncentrace analytů v reálném vzorku po extrakci byly zjištěné koncentrace vztaženy na navážku vzorku (5g).

### 3.8.2 *Matriční efekt*

Stanovení vlivu matrice bylo založeno na procentuálním rozdílu signálu analytu v matrici ve srovnání se signálem v rozpouštědle. Matriční efekt byl určen pro tři vysychavé oleje (lněný, makový, ořechový) a tři spikované koncentrace (125, 250 a 500  $\mu\text{g/g}$ ) s pěti

replikáty pro každý analyt. Matriční efekt (ME) byl vypočten pomocí rovnice (4), kde  $S$  označuje plochu píku [105]:

$$\% ME = \left( \frac{S_{\text{spikovaného extraktu}} - S_{\text{standardu}}}{S_{\text{standardu}}} \right) \cdot 100 \% \quad (4).$$

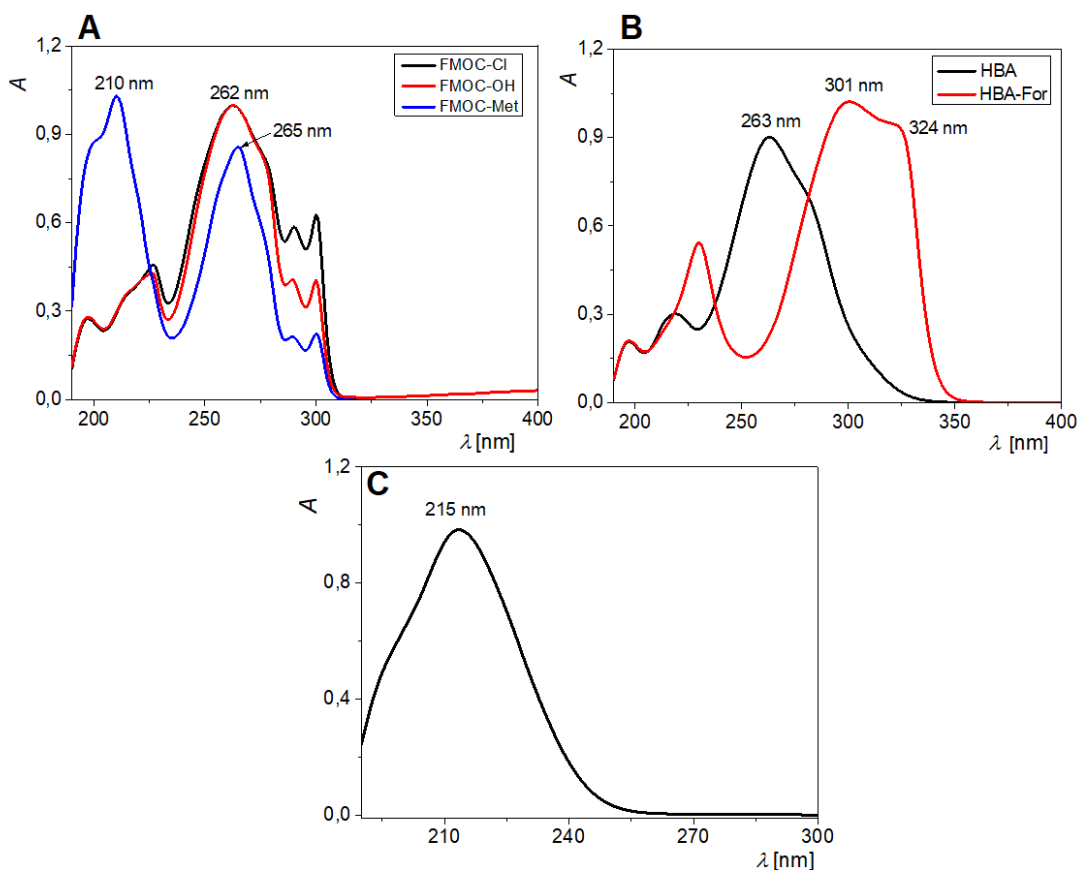
## 4. Výsledky a diskuse

### 4.1 Optimalizace vlnové délky DAD detektoru

Absorpční spektra pro jednotlivé standardy byla stanovena pomocí UV/VIS spektrofotometru v rozsahu vlnových délek 200-800 nm s krokem 0,5 nm proti čistému acetonitrilu jako referenčnímu rozpouštědлу. Zjištěná absorpční maxima (obrázek 9) pro jednotlivé analyty byla následně nastavena na DAD detektoru. Záznamy jednotlivých chromatogramů byly pořizovány při takto zjištěných absorpčních maximech jednotlivých analytů.

Vlnová délka pro DAD detekci methanolu byla nastavena na hodnotu 262 nm, která odpovídá absorpčnímu maximu FMOC-Cl, respektive 265 nm pro derivát FMOC-Met (obrázek 9A). Pro DAD detekci formaldehydu byly vlnové délky nastaveny na absorpční maximum 263 nm pro HBA a 301 nm pro derivát HBA-For (obrázek 9B).

Nederivatizované organické kyseliny se obvykle detekují ultrafialovým detektorem (UV) při vlnových délkách v rozmezí 210 - 220 nm, kde mají karboxylové skupiny absorpční pás. [106] Na základě UV/VIS spektra byla pracovní vlnová délka HPLC pro detekci DAD nastavena na 215 nm, což je pozorované maximum absorbance pro kyselinu mravenčí (obrázek 9C).



Obrázek 9: UV/VIS spektra studovaných sloučenin: (A) derivatizační činidlo FMO-CI (černá čára), produkt jeho hydrolyzy FMO-OH (červená čára) a derivát methanolu (FMO-Met, modrá čára); (B) HBA derivatizační činidlo (černá čára) a derivát formaldehydu (HBA-For, červená čára); (C) kyselina mravenčí.

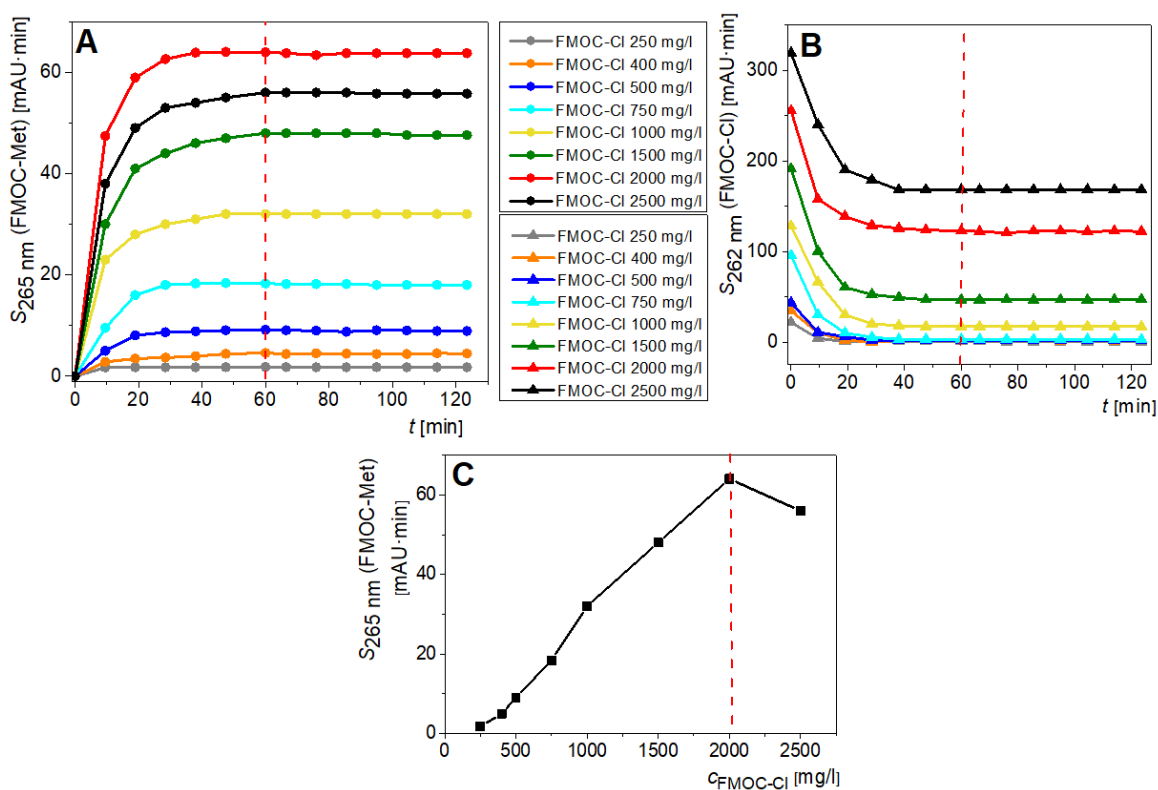
## 4.2 Optimalizace derivatizačních metod

Na začátku experimentů bylo dále nutné najít optimální podmínky pro derivatizaci analytů (methanolu a formaldehydu), jako je rychlost derivatizační reakce a koncentrace derivatizačních činidel.

### 4.2.1 Optimalizace derivatizační metody pro methanol

Obrázek 10 ukazuje časový průběh derivatizační reakce standardu methanolu o koncentraci 500 mg/l za použití různých koncentrací derivatizačního činidla FMO-CI (250 - 2500 mg/l) za vzniku methanolového derivátu FMO-Met v prostředí 42 mM fosfátového pufru o pH= 12,5. Stanovení probíhalo za běžné laboratorní teploty (~ 25 °C). Výsledky prezentované na obrázku 10 ukazují, že optimální koncentrace derivatizačního činidla (pro koncentraci vzorku methanolu 500 mg/l) je 2000 mg/l (červená křivka). Při této koncentraci probíhala derivatizační reakce s nejvyšším

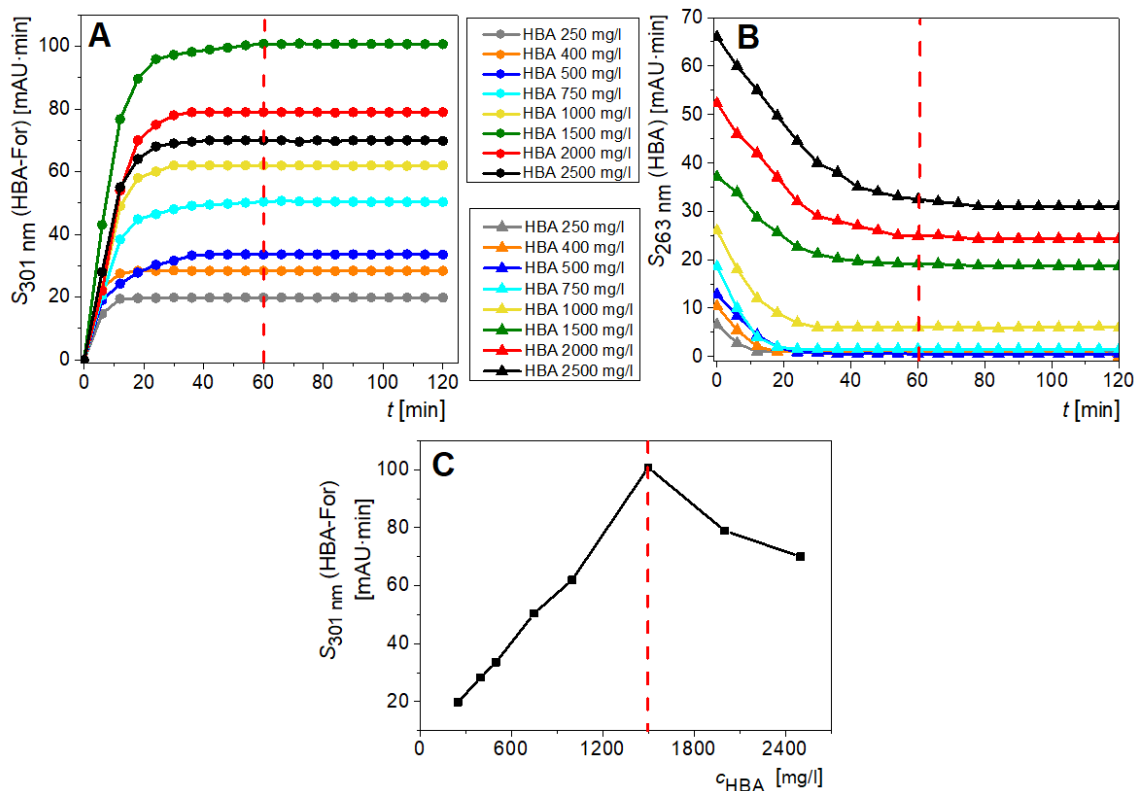
výtěžkem derivátu a zároveň v roztoku zbylo dostatečné množství derivatizačního činidla FMO-CI. Jako optimální doba derivatizace byla vybrána hodnota 60 minut.



Obrázek 10: Optimalizace doby derivatizace methanolu o koncentraci 500 mg/l za použití rozdílné koncentrace derivatizačního činidla FMO-CI. Křivky znázorňují časovou závislost, kde v čase dochází k nárůstu plochy píku derivátu FMO-CI-Met (A) a k poklesu plochy píku derivatizačního činidla FMO-CI (B). Graf C znázorňuje závislost plochy píku derivátu FMO-CI-Met na koncentraci derivatizačního činidla FMO-CI. Červená přerušovaná čára znázorňuje vybranou dobu derivatizace (graf A a B) a optimální koncentraci derivatizačního činidla (graf C).

#### 4.2.2 Optimalizace derivatizační metody formaldehydu

De Lima *a spol.* ve své studii uvádí, že optimální doba pro proběhnutí derivatizační reakce je 60 minut. [89] Vzhledem k tomu, že byly použity jiné koncentrace HBA a formaldehydu než v uváděné studii, bylo nutné ověřit kinetiku derivatizace za níže uvedených podmínek. V rámci optimalizace byla určena ideální doba derivatizace a koncentrace derivatizačního činidla. Výsledky uvedené na obrázku 11 ukazují, že optimální koncentrace derivatizačního činidla HBA odpovídala koncentraci 1500 mg/l (zelená křivka) pro koncentraci formaldehydu 500 mg/l, jelikož tato koncentrace poskytla nejvyšší plochu píku, a zároveň v roztoku zbylo dostatečné množství HBA (viz obrázek 11B). Optimální doba derivatizace je 60 minut, tedy stejně jako v předchozí studii. [89]



Obrázek 11: Optimalizace doby derivatizace formaldehydu o koncentraci vzorku 500 mg/l za použití různé koncentrace derivatizačního činidla HBA. Křivky znázorňují časovou závislost, kde v čase dochází k nárůstu plochy píku derivátu HBA-For a k poklesu plochy píku derivatizačního činidla. Graf C znázorňuje závislost plochy píku derivátu HBA-For na koncentraci derivatizačního činidla HBA. Červená přerušovaná čára znázorňuje vybranou dobu derivatizace (graf A a B) a optimální koncentraci derivatizačního činidla (graf C).

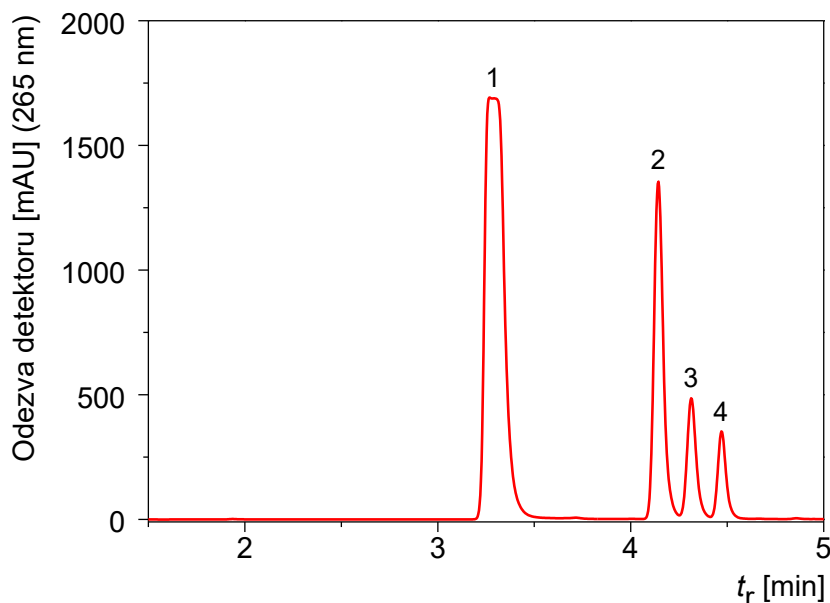
### 4.3 Optimalizace chromatografických podmínek

#### 4.3.1 Optimalizace chromatografické analýzy methanolvého derivátu

Pro stanovení FMOC-Cl a jeho methanolvého derivátu (FMOC-Met) byly stanoveny a optimalizovány následující chromatografické podmínky. Podmínky pro gradientovou eluci (5 mmol/l HCl/acetonitril) přejaté z [68] byly testovány a následně upraveny. Jako mobilní fáze byl zvolen gradient acetonitrilu s vodou. Acetonitril v mobilní fázi se během 6 minut lineárně zvyšoval ze 45 % na 100 %, následně byl obsah acetonitrilu snížen na 45 % a tento obsah byl držen 2 minuty.

Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,8 ml/min v celém gradientu, teplota kolony 30 °C a objem nástřiku 5  $\mu$ l. Chromatogram separace standardu FMOC-Cl, jeho produktu hydrolyzy (FMOC-OH) a derivátu methanolu (FMOC-Met) je uveden na obrázku 12. Chromatogram ukazuje, že pík č.1 s retenčním časem  $\sim 3,3$  min odpovídá derivatizačnímu činidlu FMOC-Cl. Činidlo doprovází produkt jeho hydrolyzy FMOC-

OH se dvěma píky, které odpovídají retenčním časům ~ 4,31 min (pík č. 3) a ~ 4,46 min (pík č. 4). Derivát methanolu poskytuje pík č. 2 při ~ 4,2 min.

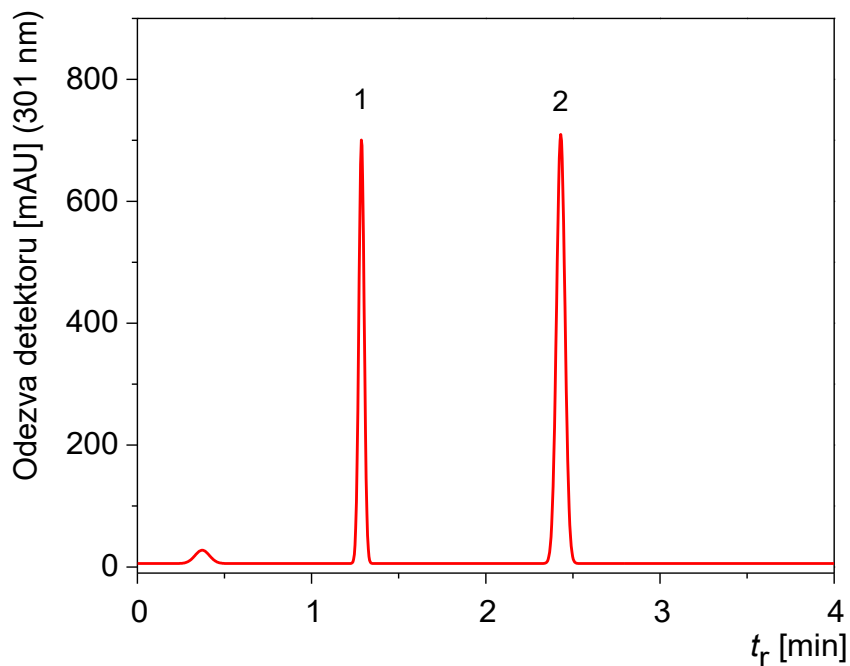


Obrázek 12: Chromatogram standardu methanolu o koncentraci 500 mg/l. Pík č.1 odpovídá derivatizačnímu činidlu FMOC-Cl, pík 2 odpovídá derivátu derivatizačního činidla s methanolem (FMOC-Met) a píky 3 a 4 poskytují derivát hydrolyzy FMOC-OH.

#### 4.3.2 Optimalizace chromatografické analýzy formaldehydového derivátu

Pro stanovení HBA a jeho derivátu s formaldehydem (HBA-For) byly optimalizovány a stanoveny následující chromatografické podmínky. Pro izokratickou eluci byla po celou dobu analýzy použita mobilní fáze acetonitril (ACN):voda (H<sub>2</sub>O) v poměru 30 % ACN: 70 % H<sub>2</sub>O. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml/min, teplota kolony 30 °C a objem nástřiku 1 µl.

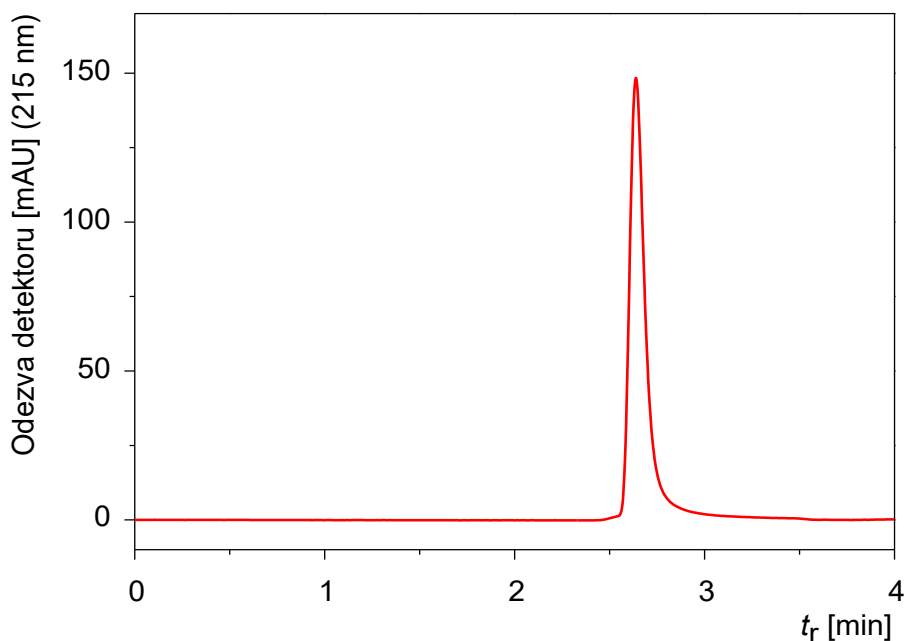
Chromatogram separace standardu HBA a formaldehydového derivátu (HBA-For) je znázorněn na obrázku 13. Chromatogram ukazuje, že derivatizačnímu činidlu HBA odpovídá pík s retenčním časem ~ 1,3 min (pík č.1) a formaldehydovému derivátu (HBA-For) odpovídá pík s retenčním časem ~ 2,4 min (pík č.2).



Obrázek 13: Chromatogram standardu formaldehydu o koncentraci 500 mg/l. Pík č.1 poskytuje derivatizační činidlo HBA, pík č.2 derivát derivatizačního činidla s formaldehydem HBA-For.

#### 4.3.3 Optimalizace chromatografické analýzy kyseliny mravenčí

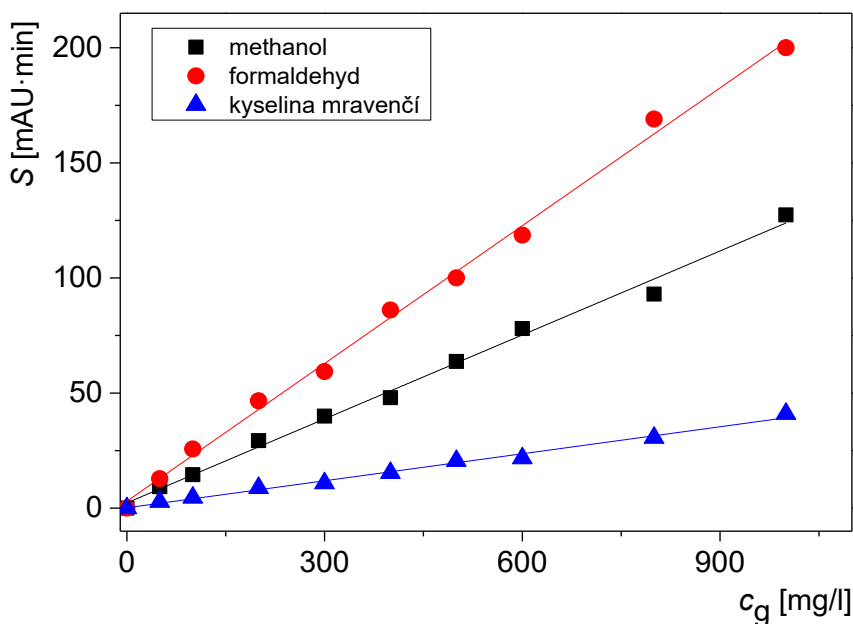
Pro stanovení kyseliny mravenčí byly přejaty a optimalizovány následující chromatografické podmínky. [89] Jako mobilní fáze byl zvolen acetonitril okyselený kyselinou fosforečnou (0,1%) pro izokratickou eluci po celou dobu analýzy. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml/min, teplota kolony 30 °C a objem nástřiku 20  $\mu$ l. Chromatogram na obrázku 14 ukazuje pík kyseliny mravenčí s odpovídajícím retenčním časem  $\sim$  2,7 min.



Obrázek 14: Chromatogram standardu kyseliny mravenčí o koncentraci 500 mg/l.

#### 4.4 Kalibrační závislosti

Pro methanol, formaldehyd a kyselinu mravenčí byly změřeny kalibrační závislosti v rozsahu 50-1000 mg/l (viz obrázek 15). Jako analytický signál pro konstrukci kalibračních závislostí byly použity plochy píků. Po vynesení plochy píků jednotlivých standardů do grafu v závislosti na koncentraci, byla použita metoda lineární regrese.



Obrázek 15: Kalibrační závislosti jednotlivých analytů v rozsahu koncentrací 50-1000 mg/l.

Rovnice lineární regrese, koeficient determinace  $R^2$ , mez detekce, mez kvantifikace a retenční charakteristiky shrnuje tabulka č. 2.

Tabulka 2: Retenční charakteristiky a lineární regrese, včetně koeficientu determinace  $R^2$ ,  $LOD$  a  $LOQ$  získané pro stanovované analyty a jejich deriváty

Analyt/derivát	$t_r$ [min]	$\lambda$ [nm]	Rozsah [mg/l]	Rovnice lineární regrese	$R^2$	$LOD$ [mg/l]	$LOQ$ [mg/l]
Fmoc-Met	4,07 - 4,27	265	50 - 1000	$y = 0,13x + 2,05$	0,9983	23	71
HBA-For	2,35 - 2,61	301	50 - 1000	$y = 0,20x + 3,22$	0,9963	11	32
K. mravenčí	2,54 - 2,82	215	50 - 1000	$y = 0,04x + 0,50$	0,9992	2	5

#### 4.5 Optimalizace techniky QuEChERS

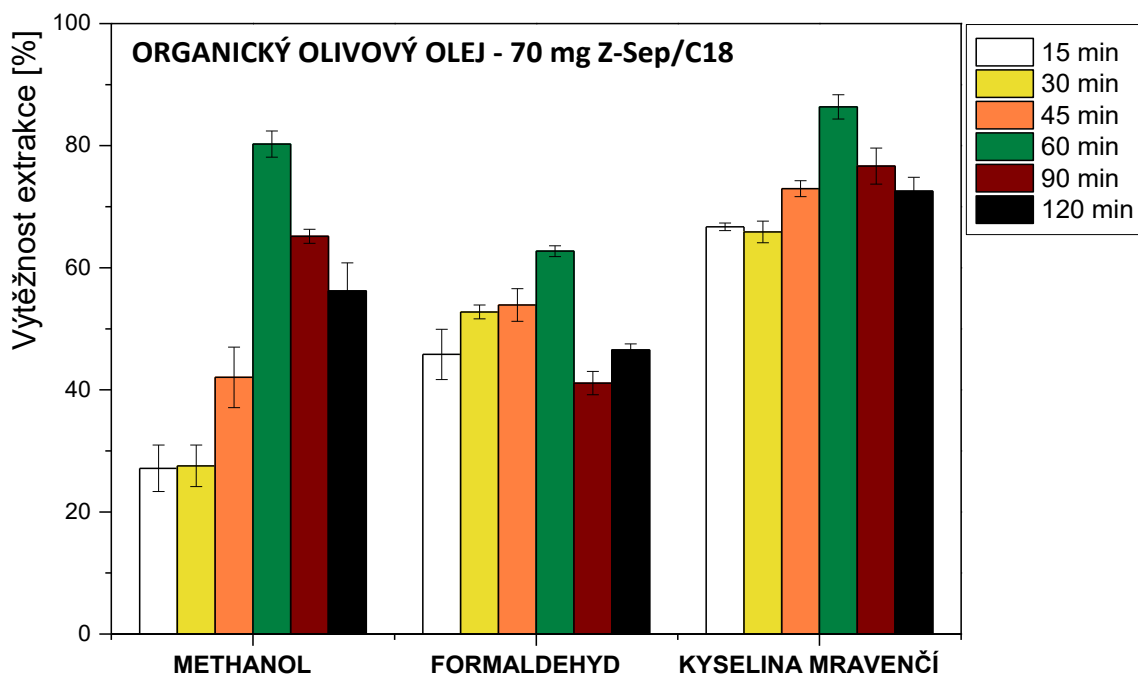
Stanovení methanolu, formaldehydu a kyseliny mravenčí v olejových matricích je náročným analytickým úkolem kvůli vysokému obsahu triglyceridů ve vzorcích a možné přítomnosti lipofilních analytů. Obecně jsou hlavními kroky postupu stanovení extrakce organickými rozpouštědly a dále čištění, kdy se odstraní koextrahované složky matrice. [39,107–110]

V rámci optimalizace byl zkoumán vliv různých parametrů na výtěžnost extrakce, jako je doba extrakce, různé typy a navážky sorbentů pro přečištění disperzní extrakcí na tuhé fázi (d-SPE) na výtěžnost extrakce.

##### 4.5.1 Optimalizace doby extrakce

V prvních experimentech byl studován vliv doby extrakce do acetonitrilu na výtěžky analytů ze spikovaného vzorku olivového oleje. Olivový olej je řazen mezi nevysychavé oleje. Obsahuje převážně jednoduché nenasycené mastné kyseliny, především kyselinu olejovou, často vázanou v molekule trioleinu (triglycerid kyseliny olejové), což způsobuje nižší oxidovatelnost a následnou polymeraci ve srovnání s vysychavými oleji. [111,112] Volbou olivového oleje byla zaručena minimální tvorba těkavých derivátů procesem autooxidace (vysychání), a tím nedošlo k výraznému zkreslení výtěžnosti extrakce. Zároveň však bylo pro účely optimalizace metody zajištěno realistické složení vzorku (tj. mnohosložkový charakter směsi a složitá matrice), které by se stěžilo nasimulovat při použití čistých sloučenin. K přečištění vzorků bylo použito 70 mg komerčního sorbentu Z-Sep/C18.

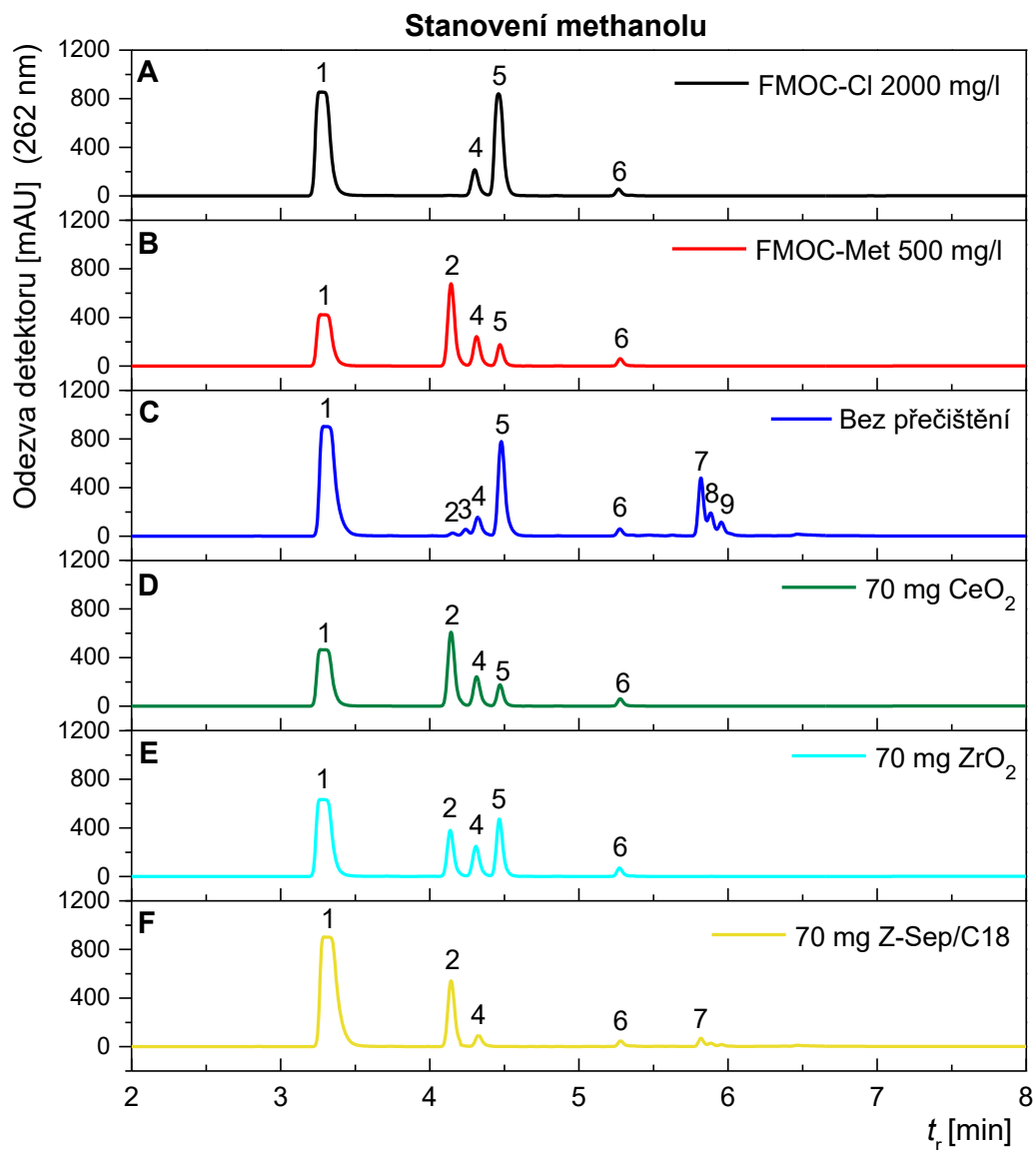
V těchto předběžných experimentech byl spikovaný vzorek olivového oleje o koncentraci 500 µg/g v triplikátech extrahován po dobu 15; 30; 45; 60; 90 a 120 minut za použití orbitální třepačky. Výsledky uvedené na obrázku 16 ukazují, že nejvyšší výtěžky byly ve všech případech získány po 60 minutách, proto byl v následujících experimentech zvolen tento extrakční čas.



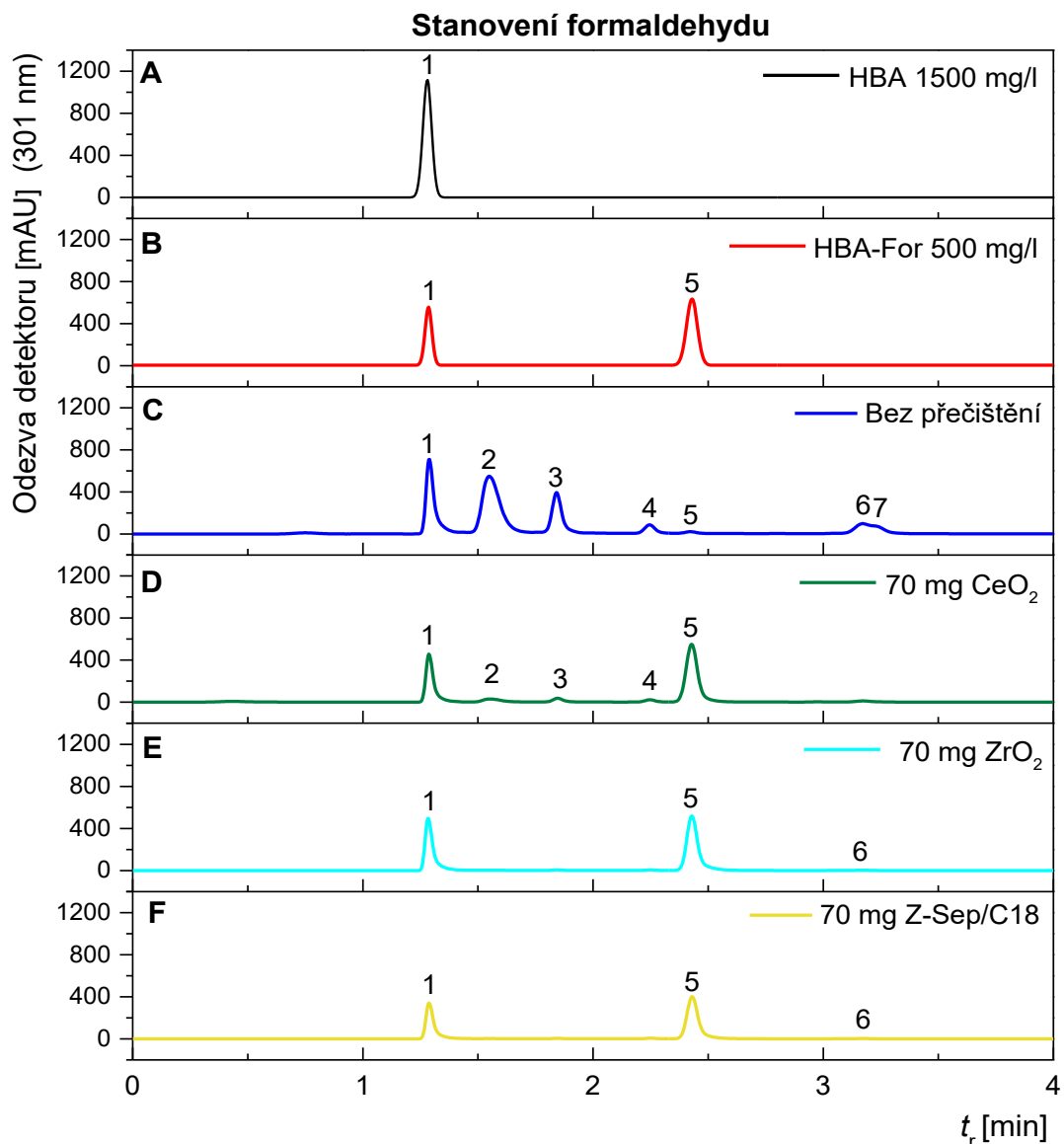
Obrázek 16: Vliv doby extrakce na výtěžnost analytu. Spikovaný vzorek organického olivového oleje o koncentraci analytů 500 µg/g. Nejvyšších výtěžků bylo dosaženo po 60 minutách extrahování pro všechny tři analyty. Chybové úsečky označují RSD pro n = 3.

#### 4.5.2 d-SPE přečištění vzorků na sorbentech

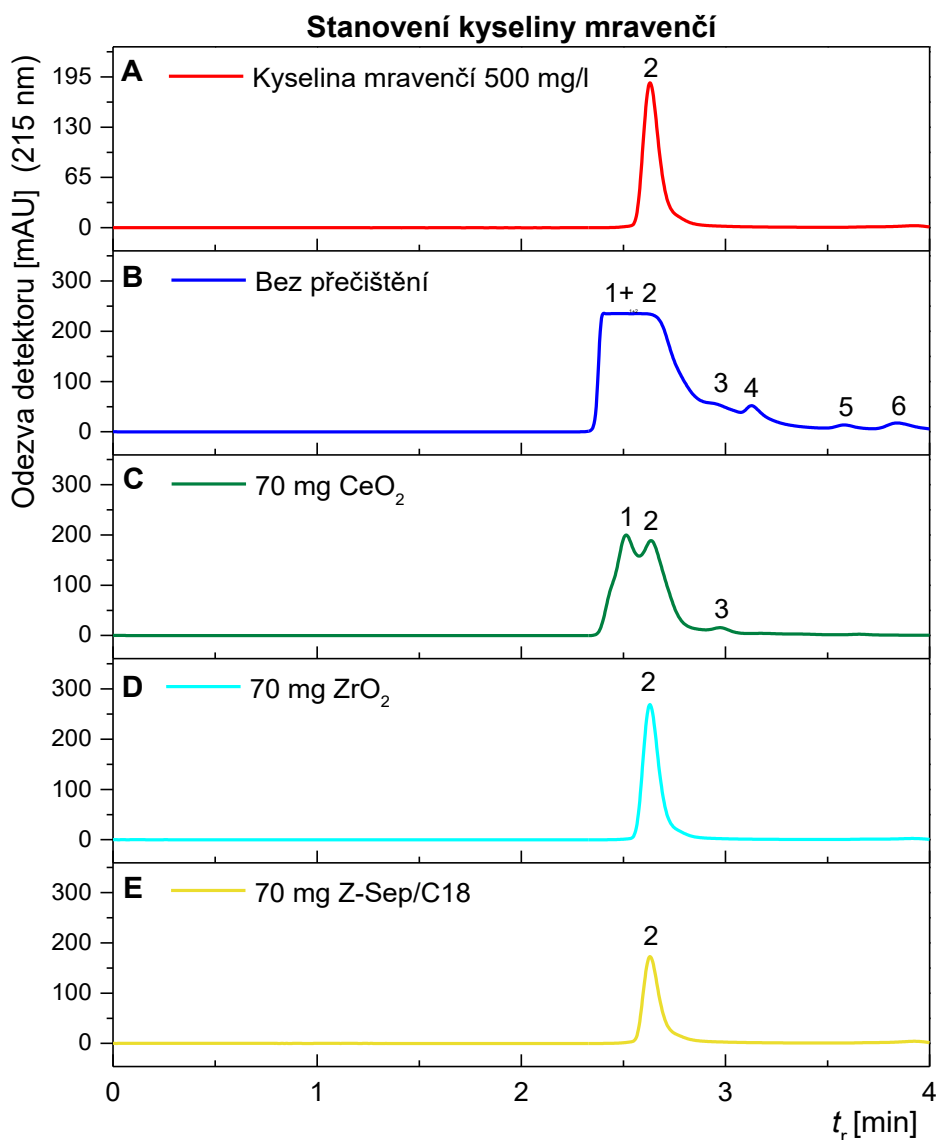
Na obrázcích 17, 18 a 19 jsou znázorněny reálné chromatogramy vzorků olivového oleje spikovaného jednotlivými analyty. Je patrné, že se do acetonitrilu koextrahuje velké množství interferentů z olejové matrice a pokud není vzorek přečištěn, není možné vyhodnocení jednotlivých analýz díky fúzi jednotlivých píků. Pokud není vzorek přečištěný, olejová matrice pravděpodobně brání derivatizační reakci, či můžou přednostně zreagovat nečistoty s derivatizačním činidlem. K přečištění acetonitrilové fáze proto byla využita disperzní extrakce tuhou fází (d-SPE).



Obrázek 17: Chromatogramy ( $\lambda = 262 \text{ nm}$ ) standardu A) Fmoc-Cl o koncentraci 2000 mg/l, B) jeho methanolového derivátu (Fmoc-Met) o koncentraci 500 mg/l spolu s chromatogramy extraktů z olivového oleje (spikovaná koncentrace analytů 500  $\mu\text{g/g}$ ) bez a po přečištění různými d-SPE sorbenty (C, D, E, F). 1. pík poskytuje Fmoc-Cl; 2. pík derivát methanolu (Fmoc-Met); 4. a 5. pík Fmoc-OH; 3., 5. a 6. pík koextrahovaná nečistota.

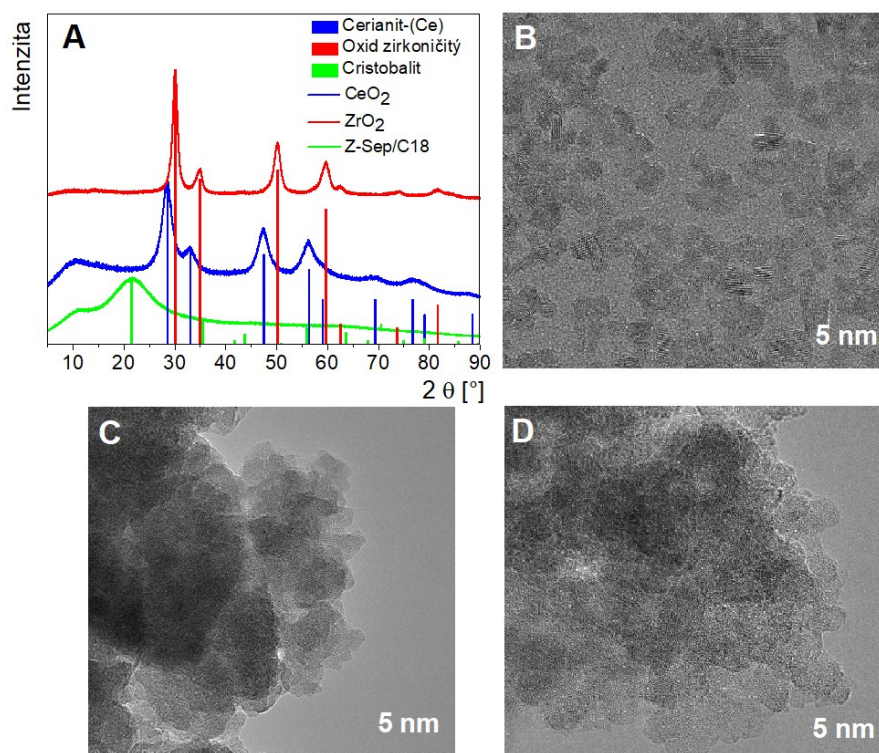


Obrázek 18: Chromatogramy ( $\lambda = 301$  nm) A) standardu HBA o koncentraci 1500 mg/l, B) jeho formaldehydového derivátu HBA-For o koncentraci 500 mg/l. Dále chromatogramy spikovaných extraktů olivového oleje o koncentraci analytů 500  $\mu$ g/g bez a po přečištění různými d-SPE sorbenty (C, D, E, F). 1. pík odpovídá derivatizačnímu činidlu HBA; 2.- 4. a 6. a 7. pík poskytují neznámé nečistoty; 5. pík derivát formaldehydu s derivatizačním činidlem (HBA-For).



Obrázek 19: Chromatogramy ( $\lambda = 215 \text{ nm}$ ) A) standardu kyseliny mravenčí o koncentraci 500 mg/l a spikované extrakty z olivového oleje obohacené o koncentraci analytů 500 mg/l bez a po přečištění různými d-SPE sorbenty (B, C, D, E): 1., 3.- 6. pík poskytují koextrahované nečistoty a 2. pík kyselina mravenčí.

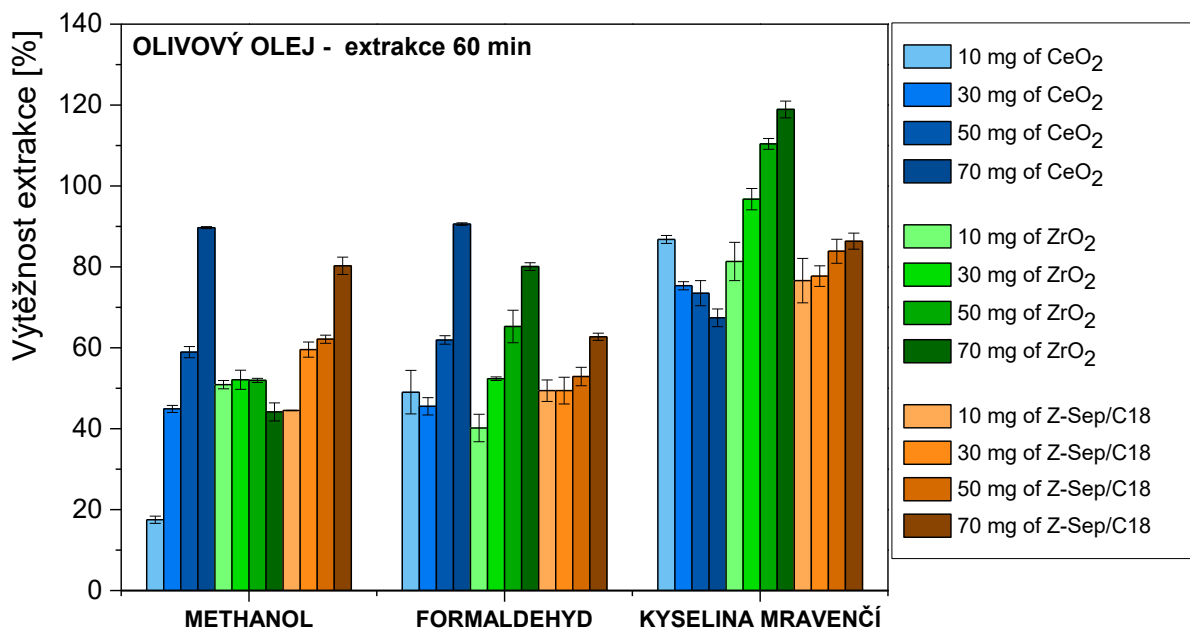
Pro přečištění acetonitrilové fáze byl zvolen komerční předvážený QuEChERS sorbent Z-Sep/C18 (70 mg), a dále dva nanostrukturní oxidy kovů  $\text{ZrO}_2$  a  $\text{CeO}_2$ , které se k tomuto účelu běžně nevyužívají. Strukturní charakterizace všech sorbentů pomocí rentgenové práškové difrakční analýzy (XRPD) a transmisního elektronového mikroskopu je znázorněna na obrázku 20. V rámci optimalizace metody byl testován vliv množství d-SPE sorbentů na výtěžnost extrakce. S ohledem na množství komerčně dostupného sorbentu byly v následujících experimentech testovány tyto navážky d-SPE sorbentů: 10; 30; 50 a 70 mg.



Obrázek 20: a) XRPD záznamy testovaných sorbentů a TEM mikrofotografie b)  $\text{CeO}_2$ , c)  $\text{ZrO}_2$ , d) Z-Sep/C18.

Z obrázku 21 je patrné, že nejlepšího výtěžku extrakce zkoumaných analytů z olivového oleje (spikovaná koncentrace analytů  $500 \mu\text{g/g}$ ) a odstranění matricových interferentů bylo dosaženo při použití  $70 \text{ mg}$  sorbentu na bázi oxidu ceričitého pro methanol a formaldehyd (oba výtěžnost extrakce  $\sim 90 \%$ ) a  $70 \text{ mg}$  oxidu zirkoničitého ( $\text{ZrO}_2$ ) pro kyselinu mravenčí (výtěžnost extrakce  $\sim 120 \%$ ). Tento výsledek může být daný tím, že bylo v olivovém oleji obsaženo malé množství kyseliny mravenčí.

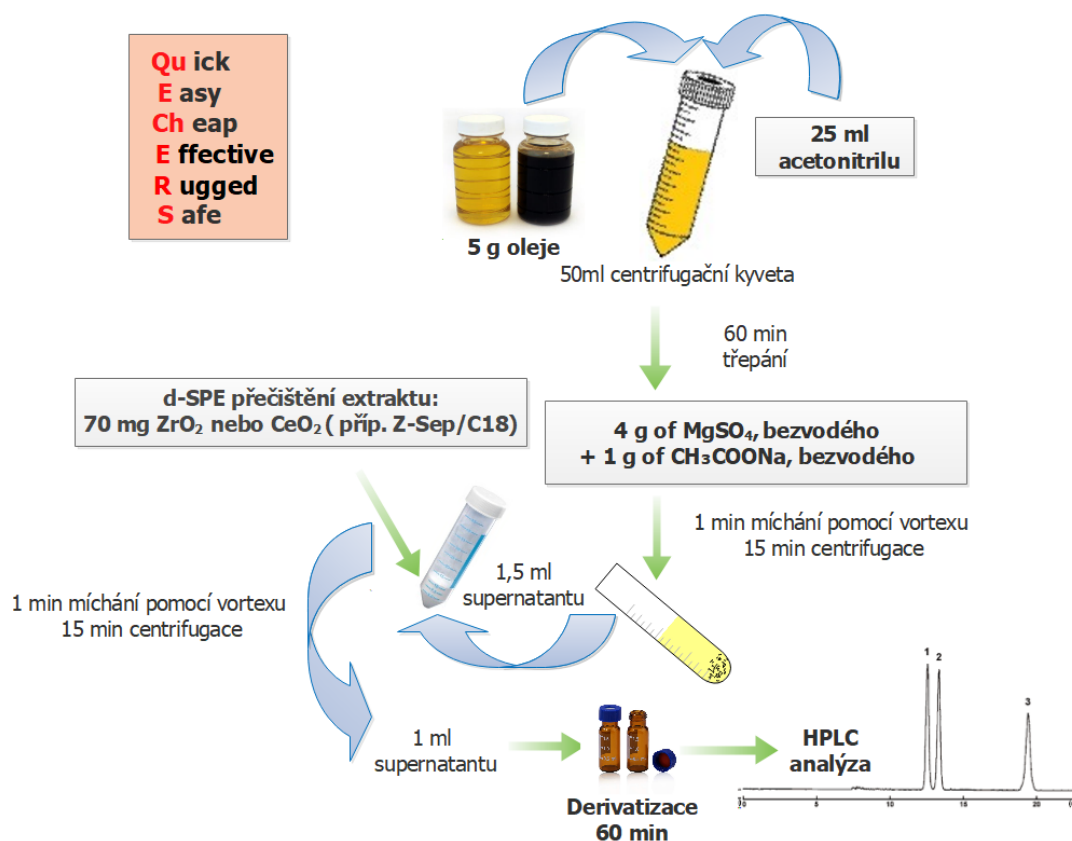
Na základě těchto výsledků lze předpokládat, že oxid ceričitý a oxid zirkoničitý v nanostrukturální formě jsou účinnými sorbenty pro odstranění většiny rušivých látek z olejové matrice s vysokým obsahem tuků a pigmentů, proto byly dále využity pro d-SPE přečištění vzorků vysychavých olejů.



Obrázek 21: Grafy znázorňující výtěžnost extrakce spikovaného vzorku o koncentraci 500 µg/g za použití různého množství sorbentu pro organický olivový olej. Chybové úsečky označují RSD % (n = 3).

#### 4.5.3 Optimalizovaný postup metody QuEChERS

5 g vzorku oleje bylo naváženo do 50ml centrifugační zkumavky, ke vzorku oleje bylo přidáno 25 ml extrakčního rozpouštědla acetonitrilu. Takto připravená směs byla po dobu 60 minut třepána na třepáče. Poté byly do centrifugační zkumavky naváženy pomocí předvážek 4 g bezvodého síranu hořečnatého (MgSO<sub>4</sub>) a 1 g bezvodého octanu sodného (CH<sub>3</sub>COONa). Soli napomáhají k lepšímu oddělení fází a zároveň pohltí část olejnatých složek. Směs byla důkladně promíchána pomocí vortexu po dobu 1 min a následně vložena do odstředivky a odstředěna při 5000 rpm po dobu 15 minut. Po tomto kroku se odpipetovalo 1,5 ml supernatantu do vialek s předváženými sorbenty pro přečištění. Pro methanol a formaldehyd bylo použito 70 mg sorbentu CeO<sub>2</sub> a pro přečištění vzorku kyseliny mravenčí 70 mg ZrO<sub>2</sub>. Směs byla 1 min promíchána pomocí vortexu a následně vložena do odstředivky a odstředěna při 10 000 rpm po dobu 4,5 min. Po odstředění bylo odebráno potřebné množství vzorku k HPLC analýze. Tento postup byl využit pro všechny vzorky olejů. Schéma QuEChERS extrakce a přečištění vzorků je uvedeno na obrázku 22.



Obrázek 22: Schéma optimalizovaného postupu metody QuEChERS.

#### 4.6 Validace metody HPLC-DAD

Tabulka 3 uvádí výtěžnosti a relativní směrodatné odchylky stanovovaných analytů z vysychavých olejů po přečištění na sorbentu CeO<sub>2</sub> (methanol a formaldehyd) a ZrO<sub>2</sub> (kyselina mravenčí) pro tři spikované koncentrace (125, 250 a 500 μg/g).

Výsledky ukazují, že nejvyšší výtěžky analytů byly získány z oleje z vlašských ořechů v rozmezí od 101% do 121%. Relativní směrodatná odchylka vyjádřená v procentech (% RSD) byla pro všechny studované analyty menší než 10 %. Ze vzorku makového oleje byly získané výtěžky v rozmezí od 93% do 118 %, s RSD méně než 6 %. Naproti tomu v případě lněného oleje byly výtěžnosti nižší a pohybovaly se v rozmezí 82 až 92 %, přičemž RSD se pohybovalo v rozmezí 2–7 %.

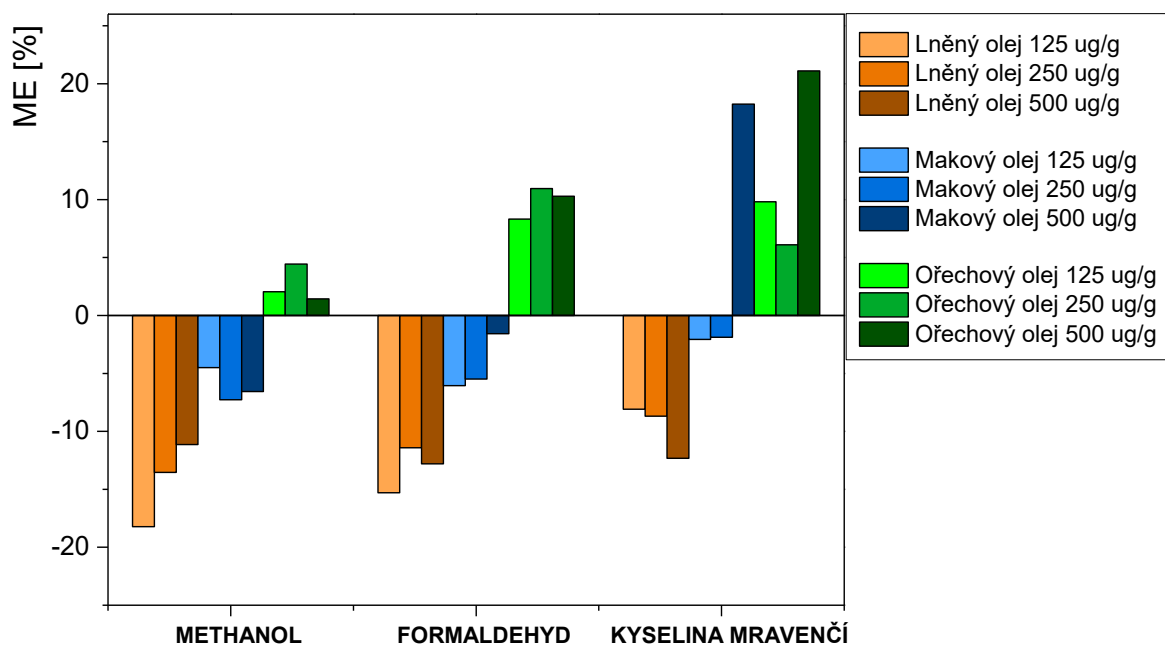
Tabulka 3: Validační údaje vyvinutého postupu QuEChERS/HPLC-DAD včetně výtěžností a relativních standardních odchylek třech spikovaných koncentrací analytů (125, 250 a 500 µg/g) získaných ze vzorků vysychavých olejů (lněný olej, makový olej a ořechový olej)

Lněný olej						
Analyt/Derivát	500 µg/g		250 µg/g		125 µg/g	
	Výtěžnost (%)	RSD (%)	Výtěžnost (%)	RSD (%)	Výtěžnost (%)	RSD (%)
FMOC-Met	89	4	86	6	82	6
HBA-For	87	7	89	5	85	5
Kyselina mravenčí	88	3	91	2	92	4
Makový olej						
Analyt/Derivát	500 µg/g		250 µg/g		125 µg/g	
	Výtěžnost (%)	RSD (%)	Výtěžnost (%)	RSD (%)	Výtěžnost (%)	RSD (%)
FMOC-Met	93	3	93	4	96	5
HBA-For	98	2	95	5	94	6
Kyselina mravenčí	118	3	98	3	98	3
Ořechový olej						
Analyt/Derivát	500 µg/g		250 µg/g		125 µg/g	
	Výtěžnost (%)	RSD (%)	Výtěžnost (%)	RSD (%)	Výtěžnost (%)	RSD (%)
FMOC-Met	101	5	104	4	102	6
HBA-For	110	3	111	3	108	3
Kyselina mravenčí	121	4	106	5	110	5

#### 4.6.1 Matriční efekt

Matriční efekt, vypočítaný podle vzorce v kapitole 3.8.2, znázorňuje obrázek 23. Je patrné, že analyty ovlivňuje buď pozitivní nebo negativní efekt matrice. Negativní hodnoty znamenají potlačení signálu díky působení matrice, zatímco pozitivní výsledky ukazují na navýšení odezvy. Matriční efekt (ME) je obvykle klasifikován jako mírný ( $< \pm 20\%$ ), střední ( $\pm 20\% < ME < \pm 50\%$ ) nebo silný ( $\pm 50\% < ME$ ). [113] Pro ořechový olej byly pro všechny tři analyty získány pozitivní hodnoty signálu, který se pohyboval od +1 % do +21 %, přičemž pro kyselinu mravenčí bylo zaznamenáno nejvyšší zvýšení odezvy ve srovnání s ostatními analyty. Matriční efekt lněného oleje se pohyboval od -18 % do -8 % pro všechny analyty, nejvíce potlačen byl signál vzorku methanolu o koncentraci 125 µg/g. Matriční efekt makového oleje se pohyboval v rozmezí od -7 % do +18 %. Nejvíce potlačený byl signál methanolu o spikovaných koncentracích 250 a 500

µg/g. Nejvyššího zesílení signálu bylo pozorováno u kyseliny mravenčí při spikované koncentraci 500 µg/g.



Obrázek 23: Znázornění matričního efektu (ME, %) pro různé spikované vzorky vysychavých olejů (lněný, makový a ořechový olej) o koncentraci analytu v rozmezí 125-500 µg/g.

#### 4.7 Reálné vzorky vysychavých olejů

Výsledky získané ze vzorků vysychavých olejů (tabulka 4) ukazují na přítomnost degradačních (oxidačních) produktů v olejích (lněný, makový a ořechový olej), které byly skladovány v uzavřených lahvích po dobu tří měsíců. Data ukazují nulovou koncentraci methanolu, který pravděpodobně vytékal či zcela zoxidoval na formaldehyd a kyselinu mravenčí. Koncentrace formaldehydu se pohybovaly od  $260,5 \pm 3,6$  µg/g do  $303,8 \pm 1,7$  µg/g. Kyselina mravenčí, konečný oxidační produkt, byla detekována v koncentračním rozmezí od  $72,4 \pm 5,8$  µg/g do  $386,3 \pm 3,2$  µg/g. Nejvíce degradačních produktů obsahoval lněný olej, který je díky nejvyššímu obsahu nenasycených mastných kyselin nejvíce náchylný k oxidaci.

Tabulka 4: Koncentrace degradačních produktů ve vysychavých olejích po 3 měsících skladování

Lněný olej	
Analyt/Derivát	Koncentrace ( $\mu\text{g/g}$ ) $\pm$ RSD (%), n=3
FMOC-Met	0
HBA-For	$303,8 \pm 1,7$
Kyselina mravenčí	$386,3 \pm 3,2$
Makový olej	
Analyt/Derivát	Koncentrace ( $\mu\text{g/g}$ ) $\pm$ RSD (%), n=3
FMOC-Met	0
HBA-For	$299,6 \pm 1,0$
Kyselina mravenčí	$72,4 \pm 5,8$
Ořechový olej	
Analyt/Derivát	Koncentrace ( $\mu\text{g/g}$ ) $\pm$ RSD (%), n=3
FMOC-Met	0
HBA-For	$260,5 \pm 3,6$
Kyselina mravenčí	$119,5 \pm 0,5$

## 5. Závěr

V rámci diplomové práce byla navržena jednoduchá a spolehlivá HPLC-DAD metoda pro analýzu vybraných degradačních produktů (methanolu, formaldehydu a kyseliny mravenčí) ve vzorcích vysychavých olejů (lněného, makového a ořechového oleje).

Limit detekce této metody pro methanol byl stanoven na 23 mg/l, formaldehydu 11 mg/l a pro kyselinu mravenčí 2 mg/l. Limit kvantifikace methanolu byl 71 mg/l, formaldehydu 32 mg/l a 5 mg/l pro kyselinu mravenčí.

Použití extrakce na bázi QuEChERS umožňuje získat uspokojivé výsledky výtěžnosti analytů ze vzorků olejů. Pro odstranění rušivých organických složek olejové matrice byly navrženy nové typy sorbentů na bázi oxidu ceričitého ( $\text{CeO}_2$ ) a oxidu zirkoničitého ( $\text{ZrO}_2$ ). Purifikace extraktů ukázala, že s těmito nanostrukturními oxidy kovů lze dosáhnout vyšších výtěžků extrakce ve srovnání s komerčně dostupným sorbentem Z-Sep/C18.

Navrhovaný postup prošel validační studií pro tři spikované koncentrace 125, 250 a 500  $\mu\text{g/g}$ .

V reálných vzorcích vysychavých olejů byl detekován pouze formaldehyd a kyselina mravenčí.

Tato navrhovaná metoda může sloužit k analýze reaktivních složek ve vysychavých olejích. To může napomoci k pochopení mechanismu vzniku kovových karboxylátů v barevných vrstvách uměleckých děl. Stanovení reaktivních složek je také důležité pro volbu vhodného oleje, čímž lze předcházet vzniku degradačních produktů na bázi krystalických mravenčanů na různých uměleckých objektech, pro jejichž konzervaci či restaurování se využívají produkty obsahující právě vysychavé oleje. Na tuto práci bude navazovat studie časové závislosti vzniku degradačních produktů při různých podmínkách skladování, na základě které bude navržen postup pro restaurování a konzervování malířských děl.

## Soupis bibliografických citací

- [1] M. Lazzari, O. Chiantore, *Drying and oxidative degradation of linseed oil*, 1999.
- [2] Y. Orlova, R.E. Harmon, L.J. Broadbelt, P.D. Iedema, Review of the kinetics and simulations of linseed oil autoxidation, *Progress in Organic Coatings*. 151 (2021). <https://doi.org/10.1016/J.PORGCOAT.2020.106041>.
- [3] M. Matteini, R. Mazzeo, A. Moles, *Chemistry for restoration: painting and restoration materials*, Nardini Editore, Florencie, 2016.
- [4] S. Švarcová, E. Kočí, P. Bezdička, S. Garrappa, L. Kobera, J. Plocek, J. Brus, M. Šťastný, D. Hradil, Uncovering lead formate crystallization in oil-based paintings, *Dalton Transactions*. 49 (2020) 5044–5054. <https://doi.org/10.1039/D0DT00327A>.
- [5] G. Eggert, A. Fischer, The formation of formates: a review of metal formates on heritage objects, *Heritage Science*. 9 (2021) 1–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s40494-021-00499-z>.
- [6] K. Keune, G. Boevé-Jones, Its Surreal: Zinc-Oxide Degradation and Misperceptions in Salvador Dalí's , 1936, *Issues in Contemporary Oil Paint*. (2014) 283–294. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-10100-2\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-319-10100-2_19).
- [7] S.P. Kochhar, Oxidative pathways to the formation of off-flavours, *Food Taints and Off-Flavours*. (1996) 168–225. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2151-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2151-8_6).
- [8] E.N. Frankel, Volatile lipid oxidation products, *Prog Lipid Res*. 22 (1983) 1–33. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(83\)90002-4](https://doi.org/10.1016/0163-7827(83)90002-4).
- [9] C. Stenberg, Influence of the fatty acid pattern on the drying of linseed oils, (2004).
- [10] F. Tanasă, C.-A. Teacă, M. Zănoagă, Protective coatings for wood, *Handbook of Modern Coating Technologies*. (2021) 175–267. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63237-1.00006-1>.
- [11] A. Kanavouras, A. Kiritsakis, R.J. Hernandez, Comparative study on volatile analysis of extra virgin olive oil by dynamic headspace and solid phase micro-extraction, *Food Chemistry*. 90 (2005) 69–79. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2004.03.025>.
- [12] B. Azinfar, M. Zirrahi, H. Hassanzadeh, J. Abedi, Characterization of heavy crude oils and residues using combined Gel Permeation Chromatography and simulated distillation, *Fuel*. 233 (2018) 885–893. <https://doi.org/10.1016/J.FUEL.2018.06.110>.
- [13] R.B. Orm, M. Citeau, A. Comitis, R. Savoie, C. Harscoat-Schiavo, P. Subra-Paternault, P. Carré, J.D. Leao, F. Joffre, Walnut oil deacidification by liquid-liquid extraction with ethanol in a single-and multistage crossflow process, *OCL Oilseeds and Fats Crops and Lipids*. (2020). <https://doi.org/10.1051/ocl/2020029i>.
- [14] A. Tartaglia, F. D'Ambrosio, P. Ramundo, V. Ferrone, D. Ricci, M. Locatelli, Innovative approach to increase sensibility and selectivity in analytical chemistry: QuEChERS method, *Reviews in Separation Sciences*. 2 (2020) 19–34. <https://doi.org/10.17145/RSS.20.003>.
- [15] T. Tuzimski, S. Szubartowski, Method Development for Selected Bisphenols Analysis in Sweetened Condensed Milk from a Can and Breast Milk Samples by HPLC–DAD and HPLC–QqQ–MS: Comparison of Sorbents (Z-SEP, Z-SEP Plus, PSA, C18, Chitin and EMR-Lipid) for Clean-Up of QuEChERS Extract, *Molecules* 2019, Vol. 24, Page 2093. 24 (2019) 2093. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24112093>.

- [16] I. Bonaduce, L. Carlyle, M.P. Colombini, C. Duce, C. Ferrari, E. Ribechini, P. Selleri, M.R. Tiné, A multi-analytical approach to studying binding media in oil paintings: Characterisation of differently pre-treated linseed oil by DE-MS, TG and GC/MS, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 107 (2011) 1055–1066. <https://doi.org/10.1007/S10973-011-1586-6>.
- [17] M. Hronová, Vliv směsných sikařiv na charakteristiky zasychání rostlino-olejných fermeží, bakalářská práce, Masarykova Univerzita, 2019.
- [18] V. Kohútová, Studium malířských výtvarných děl infračervenou a Ramanovou spektroskopii, disertační práce, Masarykova Univerzita, 2016.
- [19] U. Poth, Drying Oils and Related Products, in: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2001. [https://doi.org/10.1002/14356007.a09\\_055](https://doi.org/10.1002/14356007.a09_055).
- [20] D.H. Parker, *Principles of Surface Coating Technology*, Interscience Publishers, New York, 1965.
- [21] J. Mills, R. White, *Organic chemistry of museum objects*, Routledge, 2012. <https://doi.org/https://doi.org/10.4324/9780080513355>.
- [22] J.D.J. van den Berg, *Analytical chemical studies on traditional linseed oil paints*, Molart, 2002.
- [23] L. Kašpárková, Rozdělení olejů, (2012). [https://www.sspu-opava.cz/static/UserFiles/File/\\_sablon/Technologie\\_grafiky\\_IVY\\_32\\_INOVACE\\_A-02-17.pdf](https://www.sspu-opava.cz/static/UserFiles/File/_sablon/Technologie_grafiky_IVY_32_INOVACE_A-02-17.pdf) (cit. 28.12. 2021).
- [24] B. Slánský, Technika v malířské tvorbě, [http://old.avu.cz/~mica/digibooks/210\\_002\\_slansky.pdf](http://old.avu.cz/~mica/digibooks/210_002_slansky.pdf) (cit. 2.5. 2022).
- [25] F.C. Izzo, M. Kratter, A. Nevin, E. Zendri, A Critical Review on the Analysis of Metal Soaps in Oil Paintings, *ChemistryOpen*. 10 (2021) 904–921. <https://doi.org/10.1002/open.202100166>.
- [26] N.A. Porter, S.E. Caldwell, K.A. Mills, Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids, *Lipids*. 30 (1995) 277–290. <https://doi.org/10.1007/BF02536034>.
- [27] Kovová mýdla, <https://www.alma-lab.cz/cs/vyzkum-a-vyvoj/pripadove-studie/kovovamydla> (cit. 3.12. 2021).
- [28] D. Hradil, Přínos materiálových analýz pro interpretaci techniky malby a umělecko-historická bádání obecně, Akademie výtvarných umění v Praze, 2013.
- [29] E. Kočí, J. Rohlíček, L. Kobera, J. Plocek, S. Švarcová, P. Bezdička, Mixed lead carboxylates relevant to soap formation in oil and tempera paintings: the study of the crystal structure by complementary XRPD and ssNMR, *Dalton Transactions*. 48 (2019) 12531–12540. <https://doi.org/10.1039/C9DT02040C>.
- [30] A. Artesani, Zinc oxide instability in drying oil paint, *Materials Chemistry and Physics*. 255 (2020) 123640. <https://doi.org/10.1016/J.MATCHEMPHYS.2020.123640>.
- [31] K. Keune, A. van Loon, J.J. Boon, SEM Backscattered-Electron Images of Paint Cross Sections as Information Source for the Presence of the Lead White Pigment and Lead-Related Degradation and Migration Phenomena in Oil Paintings, *Microscopy and Microanalysis*. 17 (2011) 696–701. <https://doi.org/10.1017/S1431927610094444>.

- [32] J.J. Hermans, K. Keune, A. van Loon, P.D. Iedema, The crystallization of metal soaps and fatty acids in oil paint model systems, *Physical Chemistry Chemical Physics*. 18 (2016) 10896–10905. <https://doi.org/10.1039/c6cp00487c>.
- [33] M. Cotte, E. Checroun, W. de Nolf, Y. Taniguchi, L. de Viguerie, M. Burghammer, P. Walter, C. Rivard, M. Salomé, K. Janssens, J. Susini, Lead soaps in paintings: Friends or foes?, *Studies in Conservation*. 62 (2017) 2–23. <https://doi.org/10.1080/00393630.2016.1232529>.
- [34] L. Monico, K. Janssens, M. Cotte, L. Sorace, F. Vanmeert, G. Brunetti, C. Miliani, Chromium speciation methods and infrared spectroscopy for studying the chemical reactivity of lead chromate-based pigments in oil medium, Elsevier. (2015). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.08.028>.
- [35] P. Noble, A Brief History of Metal Soaps in Paintings from a Conservation Perspective, (2019) 1–22. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-90617-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-90617-1_1).
- [36] J. Hermans, K. Helwig, The Identification of Multiple Crystalline Zinc Soap Structures Using Infrared Spectroscopy, *Applied Spectroscopy*, Vol. 74, Issue 12, Pp. 1505-1514. 74 (2020) 1505–1514.
- [37] K. Helwig, J. Poulin, M.-C. Corbeil, E. Moffatt, D. Duguay, Conservation Issues in Several Twentieth-Century Canadian Oil Paintings: The Role of Zinc Carboxylate Reaction Products, *Issues in Contemporary Oil Paint*. (2014) 167–184. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-10100-2\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-319-10100-2_11).
- [38] J.J. Hermans, K. Keune, A. van Loon, R.W. Corkery, P.D. Iedema, Ionomer-like structure in mature oil paint binding media, (2016) 93363–93369. <https://doi.org/10.1039/c6ra18267d>.
- [39] L. Li, Z. Zhou, C. Pan, C. Qian, S. Jiang, F. Liu, Determination of organophosphorus pesticides in soybean oil, peanut Oil and sesame oil by low-temperature extraction and GC-FPD, *Chromatographia* . 66 (2007) 625–629. <https://doi.org/10.1365/S10337-007-0349-9>.
- [40] J.J. Hermans, Metal soaps in oil paint, dizertační práce, Amsterdamská univerzita , 2017.
- [41] River landscape by Aert van der d.Ä Neer, (1650). [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/8a/River\\_Landscape\\_by\\_Aert\\_van\\_der\\_Neer\\_Mauritshuis\\_912.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/8a/River_Landscape_by_Aert_van_der_Neer_Mauritshuis_912.jpg) (cit. 27.4. 2022).
- [42] P. Noble, A. van Loon, J.J. Boon, Selective darkening of ground layers associated with the wood grain in 17th-century panel paintings, in: 2008.
- [43] A. Sawicka, A. Burnstock, F.C. Izzo, K. Keune, J.J. Boon, K. Kirsch, K.J. van den Berg, Metal soap efflorescence in contemporary oil paintings, *Issues in Contemporary Oil Paint*. (2014) 311–332. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-10100-2\\_21](https://doi.org/10.1007/978-3-319-10100-2_21).
- [44] K. Jan van den Berg, A. Burnstock Matthijs de Keijzer, J. Krueger Tom Learner, A. de Tagle Gunnar Heydenreich Editors, *Its Surreal: Zinc-Oxide Degradation and Misperceptions in Salvador Dalí’s Couple with Clouds in Their Heads, 1936*, Springer.
- [45] P. Sudová, Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků v pevných maticích hydrosféry metodou QuEChERS-Porovnání se stávajícími metodami, 2012.
- [46] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Štajnbaher, F.J. Schenck, Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase

- extraction” for the determination of pesticide residues in produce, *J AOAC Int.* 86 (2003) 412–431. <https://doi.org/10.1093/JAOAC/86.2.412>.
- [47] dSPE (QuEChERS), <https://www.chromservis.eu/i/dspe-quechers?lang=CZ> (cit. 18.4. 2022).
- [48] S.C. Cunha, S.J. Lehotay, K. Mastovska, J.O. Fernandes, M. Beatriz, P.P. Oliveira, Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives, *Journal of Separation Science.* 30 (2007) 620–632. <https://doi.org/10.1002/JSSC.200600410>.
- [49] K. Jakubů, Oleokanthal v olivovém oleji, Diplomová práce, Univerzita Pardubice, 2018.
- [50] T. Rejczak, T. Tuzimski, A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach, *Open Chemistry.* 13 (2015) 980–1010. <https://doi.org/https://doi.org/10.1515/chem-2015-0109>.
- [51] R.E. Majors, S.J. Lehotay, M. Anastassiades, The QuEChERS Revolution, *LC-GC Europe.* 23 (2010) 418–429.
- [52] X. Wang, ChloroFiltr®: A Novel Sorbent for Chlorophyll Removal, *LC-GC Asia Pacific.* 16 (2013) 33.
- [53] Supel™ QuE Products for “QuEChERS” Method, 2014.
- [54] Ł. Rajski, A. Lozano, A. Uclés, C. Ferrer, A.R. Fernández-Alba, Determination of pesticide residues in high oil vegetal commodities by using various multi-residue methods and clean-ups followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A.* 1304 (2013) 109–120. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2013.06.070>.
- [55] J.C. Védrine, Heterogeneous catalysis on metal oxides, *Catalysts.* 7 (2017). <https://doi.org/10.3390/CATAL7110341>.
- [56] I. Hagarová, L. Nemček, Application of Metallic Nanoparticles and Their Hybrids as Innovative Sorbents for Separation and Pre-concentration of Trace Elements by Dispersive Micro-Solid Phase Extraction: A Minireview, *Frontiers in Chemistry.* 9 (2021) 302. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2021.672755/BIBTEX>.
- [57] J.S. Erlichman, J.C. Leiter, Complexity of the nano-bio interface and the tortuous path of metal oxides in biological systems, *Antioxidants.* 10 (2021). <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10040547>.
- [58] H.C. Roth, S. Schwaminger, P. Fraga García, J. Ritscher, S. Berensmeier, Oleate coating of iron oxide nanoparticles in aqueous systems: the role of temperature and surfactant concentration, *Journal of Nanoparticle Research* 2016 18:4. 18 (2016) 1–12. <https://doi.org/10.1007/S11051-016-3405-2>.
- [59] S.P. Pujari, L. Scheres, A.T.M. Marcelis, H. Zuilhof, Covalent Surface Modification of Oxide Surfaces, *Angewandte Chemie International Edition.* 53 (2014) 6322–6356. <https://doi.org/10.1002/ANIE.201306709>.
- [60] G. Mergen, Z. Kayaalti, E. Dural, Simultaneous headspace-GC-FID analysis for methanol and ethanol in blood, saliva, and urine: Validation of method and comparison of specimens, *LC-GC North America.* (2010).
- [61] R. Caruso, G.L. Gambino, M. Scordino, L. Sabatino, P. Traulo, G. Gagliano, Gas chromatographic quantitative analysis of methanol in wine: operative conditions,

- optimization and calibration model choice, *Natural Product Communications* . 6 (2011) 1939–1943. <https://doi.org/10.1177/1934578X1100601237>.
- [62] G.C. Zhuang, Y.S. Lin, M. Elvert, V.B. Heuer, K.U. Hinrichs, Gas chromatographic analysis of methanol and ethanol in marine sediment pore waters: Validation and implementation of three pretreatment techniques, *Marine Chemistry*. 160 (2014) 82–90. <https://doi.org/10.1016/J.MARCHEM.2014.01.011>.
- [63] X. Xu, J. Fillos, K. Ramalingam, A. Rosenthal, Quantitative analysis of methanol in wastewater by GC-MS with direct injection or headspace SPME sample introduction, *Analytical Methods*. 4 (2012) 3688–3694. <https://doi.org/10.1039/C2AY25452B>.
- [64] H. Molavi, A. Yousefpour, A. Mirmostafa, A. Sabzi, S. Hamed, M. Narimani, N. Abdi, Static headspace GC/MS method for determination of methanol and ethanol contents, as the degradation markers of solid insulation systems of power transformers, *Chromatographia*. 80 (2017) 1129–1135. <https://doi.org/10.1007/S10337-017-3315-1>.
- [65] J.B. Lee, Y.A. Jeong, D.J. Ahn, I.S. Bang, SPME-GC/MS Analysis of methanol in biospecimen by derivatization with pyran compound, *Molecules*. 25 (2019) 41. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25010041>.
- [66] C.C. Kuo, Y.H. Wen, C.M. Huang, H.L. Wu, S.S. Wu, A removable derivatization HPLC for analysis of methanol in Chinese liquor medicine, *Journal of Food and Drug Analysis*. 10 (2002) 101–106. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2757>.
- [67] S.H. Chen, C.H. Yen, H.L. Wu, S.M. Wu, H.S. Kou, S.J. Lin, Derivatization-High Performance Liquid Chromatographic Determination of Methanol in Human Plasma, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 20 (2006) 1967–1978. <https://doi.org/10.1080/10826079708005556>.
- [68] G. Huang, G. Deng, H. Qiao, X. Zhou, Determination of Trace C1–C4 Aliphatic Alcohols in Aqueous Samples by 9-Fluorenylmethyl Chloroformate Derivatization and Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, *Analytical Chemistry*. 71 (1999) 4245–4249. <https://doi.org/10.1021/AC990010M>.
- [69] S. Ehling, T.M. Reddy, Analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in nutritional ingredients and milk by derivatization with fluorenylmethyloxycarbonyl chloride and liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63 (2015) 10562–10568. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04453>.
- [70] D. Pierotti, Analysis of trace oxygenated hydrocarbons in the environment, *Journal of Atmospheric Chemistry*. 10 (1990) 373–382. <https://doi.org/10.1007/BF00115780>.
- [71] A. Jonsson, S. Berg, Determination of low-molecular-weight oxygenated hydrocarbons in ambient air by cryogradient sampling and two-dimensional gas chromatography, *Journal of Chromatography A*. 279 (1983) 307–322. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)93630-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)93630-1).
- [72] K. Motyka, P. Mikuška, A Survey of Methods for Determination of Formaldehyde and Other Carbonyl Compounds in Atmosphere, *Chemické Listy*. 99 (2005) 13–20.
- [73] E.R. Kennedy, R.H. Hill, Determination of Formaldehyde in Air as an Oxazolidine Derivative by Capillary Gas Chromatography, *American Chemistry*. 54 (1982) 1739–1742.

- [74] L. Johnson, G. Eklund, P. Marstorp, Determination of Carbonyl Compounds in Automobile Exhausts and Atmospheric Samples, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* . 9 (2006) 7–26. <https://doi.org/10.1080/03067318108071506>.
- [75] Y. Hoshika, Y. Takata, Gas Chromatographic Separation of Carbonyl Compounds as Their 2,4-dinitrophenylhydrazones Using Glass Capillary Columns, *Journal of Chromatography A*. 120 (1976) 379–389. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(76\)80015-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(76)80015-5).
- [76] H. Kallio, R.R. Linko, J. Kaitaranta, Gas-liquid chromatographic analysis of 2,4-dinitrophenyl-hydrazones of carbonyl compounds, *Journal of Chromatography A*. 65 (1972) 355–360. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)92557-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)92557-3).
- [77] M. Bao, P.J. Joza, A. Masters, W.S. Rickert, Analysis of selected carbonyl compounds in tobacco samples by using pentafluorobenzylhydroxylamine derivatization and gas chromatography-mass spectrometry, *Beitrag Zur Tabakforschung International/Contributions to Tobacco Research*. 26 (2014) 86–97. <https://doi.org/10.2478/CTTR-2014-0017>.
- [78] A. Yasuhara, T. Shibamoto, Formaldehyde quantitation in air samples by thiazolidine derivatization: factors affecting analysis, *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 72 (1989) 899–902. <https://doi.org/10.1093/JAOAC/72.6.899>.
- [79] A. Yasuhara, T. Shibamoto, Determination of volatile aliphatic aldehydes in the headspace of heated food oils by derivatization with 2-aminoethanethiol, *Journal of Chromatography A*. 547 (1991) 291–298. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)88652-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)88652-0).
- [80] S. Gong, Y. Liang, L. Tang, P. Huang, Y. Dai, [Determination of formaldehyde and acetaldehyde in packaging paper by dansylhydrazine derivatization-high performance liquid chromatography-fluorescence detection], *Se Pu = Chinese Journal of Chromatography*. 35 (2017) 755–759. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1123.2017.03008>.
- [81] S. Selim, Separation and quantitative determination of traces of carbonyl compounds as their 2,4-dinitrophenylhydrazones by high-pressure liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*. 136 (1977) 271–277. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)86279-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)86279-2).
- [82] D. Grosjean, Chemical ionization mass spectra of 2,4-dinitrophenylhydrazones of carbonyl and hydroxycarbonyl atmospheric pollutants, *Analytical Chemistry*. 55 (1983) 2436–2439. <https://doi.org/10.1021/AC00264A057>.
- [83] K.L. Olson, S.J. Swarin, Determination of aldehydes and ketones by derivatization and liquid chromatography—mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*. 333 (1985) 337–347. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)87364-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)87364-7).
- [84] E. Hudgens, T. Kleindienst, D. Smith, Improved high-performance liquid chromatographic method for artifact-free measurements of aldehydes in the presence of ozone using 2,4-dinitrophenylhydrazine, *J Chromatogr*. 483 (1989) 431–436.
- [85] A. Grömping, K. Cammann, Some new aspects of a HPLC-method for the determination of traces of formaldehyde in air, *Fresenius' Zeitschrift Für Analytische Chemie* 1989 335:7. 335 (1989) 796–801. <https://doi.org/10.1007/BF01204090>.
- [86] C.F.H. Allen, J.H. Richmond, Some limitations of 2,4-dinitrophenylhydrazine as a reagent for carbonyl groups, *Journal of Organic Chemistry*. 2 (2002) 222–226. <https://doi.org/10.1021/JO01226A003>.

- [87] METHOD 8315A: Determination of carbonyl compounds by High performance liquid chromatography (HPLC), (1996).
- [88] H. Wang, X. Zhang, Z. Chen, Development of DNPH/HPLC method for the measurement of carbonyl compounds in the aqueous phase: Applications to laboratory simulation and field measurement, *Environmental Chemistry*. 6 (2009) 389–397. <https://doi.org/10.1071/EN09057>.
- [89] L.F. de Lima, P.F. Brandão, T.A. Donegatti, R.M. Ramos, L.M. Gonçalves, A.A. Cardoso, E.A. Pereira, J.A. Rodrigues, 4-hydrazinobenzoic acid as a derivatizing agent for aldehyde analysis by HPLC-UV and CE-DAD, *Talanta*. 187 (2018) 113–119. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2018.04.091>.
- [90] P. Dvořák, Voltametrie s předřazenou extrakcí jako nový přístup pro rychlé stanovení formaldehydu v dřevěných výrobcích, diplomová práce, Univerzita Karlova, 2020.
- [91] M.P. Cruz, I.M. Valente, L.M. Gonçalves, J.A. Rodrigues, A.A. Barros, Application of gas-diffusion microextraction to the analysis of free and bound acetaldehyde in wines by HPLC-UV and characterization of the extracted compounds by MS/MS detection, *Anal Bioanal Chem*. 403 (2012) 1031–1037. <https://doi.org/10.1007/S00216-011-5664-1>.
- [92] A.C. Silva, A.S. Lourenço, M.C.U. de Araujo, Simultaneous voltammetric determination of four organic acids in fruit juices using multiway calibration, *Food Chem*. 266 (2018) 232–239. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.06.005>.
- [93] I. Mato, J.F. Huidobro, V. Cendón, S. Muniategui, M.A. Fernández-Muiño, M.T. Sancho, Enzymatic determination of citric acid in honey by using polyvinylpolypyrrolidone clarification, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46 (1998) 141–144. <https://doi.org/10.1021/JF970418P>.
- [94] E.N. Fernandes, B.F. Reis, Automatic spectrophotometric procedure for the determination of tartaric acid in wine employing multicommutation flow analysis process, *Analytica Chimica Acta*. 557 (2006) 380–386. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2005.10.036>.
- [95] M.W. Dong, HPLC analysis of organic acids in juice and wine using resin and reversed-phase columns, *LC-GC: Magazine of Liquid and Gas Chromatography*. 16 1092–1097.
- [96] E.M. Coelho, C.V. da Silva Padilha, G.A. Miskinis, A.G.B. de Sá, G.E. Pereira, L.C. de Azevêdo, M. dos Santos Lima, Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil, *Journal of Food Composition and Analysis*. 66 (2018) 160–167. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2017.12.017>.
- [97] W.M. Reuter, Analysis of Organic Acids in Fruit Juices by HPLC and UV Detection, 2015.
- [98] A. Petruczynik, T. Tuzimski, T. Plech, J. Misiurek, K. Szalast, G. Szymczak, Comparison of anticancer activity and hplc-dad determination of selected isoquinoline alkaloids from *thalictrum foetidum*, *berberis* sp. And *chelidonium majus* extracts, *Molecules*. 24 (2019). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24193417>.
- [99] S.J. Lehotay, K.A. Son, H. Kwon, U. Koesukwiwat, W. Fu, K. Mastovska, E. Hoh, N. Leepipatpiboon, Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables, *Journal of Chromatography A*. 1217 (2010) 2548–2560. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2010.01.044>.
- [100] T.M. Rizzetti, M. Kemmerich, M.L. Martins, O.D. Prestes, M.B. Adaime, R. Zanella, Optimization of a QuEChERS based method by means of central composite design for

- pesticide multiresidue determination in orange juice by UHPLC-MS/MS, *Food Chem.* 196 (2016) 25–33. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.09.010>.
- [101] J. Ondrucová, *Izolace a analýza účinných látek v rostlinném materiálu*, bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, 2014.
- [102] C.I. Kosma, O.L. Koloka, T.A. Albanis, I.K. Konstantinou, Accurate mass screening of pesticide residues in wine by modified QuEChERS and LC-hybrid LTQ/Orbitrap-MS, *Food Chem.* 360 (2021). <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.130008>.
- [103] T. Rejczak, T. Tuzimski, A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach, *Open Chemistry.* 13 (2015) 980–1010. <https://doi.org/10.1515/CHEM-2015-0109/MACHINEREADABLECITATION/RIS>.
- [104] R.C. Chokwe, S. Dube, M.M. Nindi, Development of an HPLC-DAD method for the quantification of ten compounds from *Moringa oleifera* lam. and its application in quality control of commercial products, *Molecules* . 25 (2020) 4451. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25194451>.
- [105] V. Pucci, S. di Palma, A. Alfieri, F. Bonelli, E. Monteagudo, A novel strategy for reducing phospholipids-based matrix effect in LC–ESI-MS bioanalysis by means of HybridSPE, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 50 (2009) 867–871. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2009.05.037>.
- [106] S. Kil Cho, Development of HPLC-UV Method for Detection and Quantification of Eight Organic Acids in Animal Feed, *Journal of Chromatography.* (2017). <https://doi.org/10.4172/2157-7064.1000385>.
- [107] A.E. Hiskia, M.E. Atmajidou, D.F. Tsipi, Determination of Organophosphorus Pesticide Residues in Greek Virgin Olive Oil by Capillary Gas Chromatography, *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 46 (1998) 570–574. <https://doi.org/10.1021/JF970427Y>.
- [108] K. Patel, R.J. Fussell, M. Hetmanski, D.M. Goodall, B.J. Keely, Evaluation of gas chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry for the determination of organochlorine pesticides in fats and oils, *Journal of Chromatography A.* 1068 (2005) 289–296. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2005.01.040>.
- [109] A. di Muccio, P. Fidente, D.A. Barbini, R. Dommarco, S. Seccia, P. Morrica, Application of solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry to the determination of neonicotinoid pesticide residues in fruit and vegetables, *Journal of Chromatography A.* 1108 (2006) 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2005.12.111>.
- [110] L. Polgár, B. Kmellár, J.F. García-Reyes, P. Fodor, Comprehensive evaluation of the clean-up step in QuEChERS procedure for the multi-residue determination of pesticides in different vegetable oils using LC-MS/MS, *Analytical Methods.* 4 (2012) 1142–1148. <https://doi.org/10.1039/C2AY05543K>.
- [111] B. Frohn, *Olivový olej a přírodní léčba*, Fontána, 2002.
- [112] K. Novotná, *Chemické složení a vlastnosti olivového oleje*, bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009.
- [113] W. Zhou, S. Yang, P.G. Wang, Matrix effects and application of matrix effect factor, *Bioanalysis.* 9 (2017) 1839–1844. <https://doi.org/10.4155/BIO-2017-0214>.