

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení kalafuny v organických pigmentech
Bc. Klára Zelenková

Diplomová práce

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Klára Zelenková**
Osobní číslo: **C17526**
Studijní program: **N1407 Chemie**
Studijní obor: **Analytická chemie**
Název tématu: **Stanovení kalafuny v organických pigmentech**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

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

1. Formou literární rešerše zpracujte problematiku použití a stanovení kalafuny se zaměřením na oblast organických pigmentů.
2. Experimentálně ověřte dostupné extrakční techniky a metody stanovení kalafuny ve vybraných pigmentech. Zaměřte se na metody HPLC/DAD a LC/MS.
3. Navrženou metodu optimalizujte.
4. Dosažená výsledky vyhodnoťte a sepište formou řádné diplomové práce.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Jan Fischer, CSc.

Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce:

Ing. Jan Vyňuchal, Ph.D.

Synthesia a.s. Pardubice

Datum zadání diplomové práce:

5. února 2019

Termín odevzdání diplomové práce:

9. května 2019



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

Prohlašuji:

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

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

.....
Klára Zelenková

ANOTACE

Diplomová práce je zaměřena na stanovení kalafuny v organických pigmentech. V teoretické části jsou stručně uvedeny organické pigmenty, jejich klasifikace a vlastnosti. Hlavní část je věnována kalafuně, jejímu chemickému složení, způsobům modifikace, použití v různých oblastech průmyslu a toxicitě s uvedením příslušné legislativy. Závěr teoretické části se týká kapalinové chromatografie, jejímu historickému vývoji a současné instrumentaci. V praktické části jsou popsány postupy extrakce kalafuny z pigmentů a její následné stanovení pomocí kapalinové chromatografie. Získané výsledky jsou diskutovány a porovnány se stávající metodou pro stanovení kalafuny v pigmentech.

KLÍČOVÁ SLOVA

organické pigmenty, extrakce, pryskyřice, kalafuna, toxicita kalafuny, kyselina abietová, kyselina neoabietová

TITLE

Determination of rosin in organic pigments

ANNOTATION

The thesis deals with the determination of rosin in organic pigments. In the theoretical part, there are briefly mentioned organic pigments, their classification and properties. The main part is dedicated to rosin, its chemical composition, methods of modification, usage in various industrial areas and toxicity information as stated in appropriate legislation. In the conclusion of the main part, there is information regarding liquid chromatography, its historical development and contemporary instrumentation. The practical part describes the process of rosin extraction from pigments and its determination by liquid chromatography. The obtained results are discussed and compared with the existing method.

KEYWORDS

organic pigments, extraction, resin, rosin, rosin toxicity, abietic acid, neoabietic acid

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu své diplomové práce doc. Ing. Janu Fischerovi, CSc. a Ing. Janu Vyňuchalovi, PhD., konzultantovi ze společnosti Synthesia, a.s., za jejich odborné vedení a odborné rady při tvorbě této diplomové práce. Dále chci poděkovat panu prof. Ing. Antonínu Lyčkovi, DrSc. za poskytnutí NMR spekter a panu Mgr. Janu Vaněčkovi za poskytnutí IČ spekter kalafuny.

OBSAH

Seznam obrázků	10
Seznam tabulek	13
Seznam zkratk	14
Úvod	15
1 Teoretická část	16
1.1 Organické pigmenty.....	16
1.1.1 Koloranty	16
1.1.2 Klasifikace kolorantů podle tzv. Colour index systému.....	17
1.1.3 Klasifikace organických pigmentů podle chemické struktury	17
1.1.4 Vlastnosti organických pigmentů	18
1.2 Výroba pigmentů ve společnosti Synthesia	19
1.2.1 Společnost Synthesia, a.s.....	19
1.2.2 Historie výroby pigmentů a barviv	20
1.2.3 Současný sortiment pigmentů.....	21
1.3 Pryskyřice	22
1.3.1 Význam pryskyřice pro chemický průmysl.....	23
1.4 Kalafuna.....	23
1.4.1 Chemické složení.....	23
1.4.2 Rozpustnost	25
1.4.3 Toxicita.....	25
1.4.4 Isomerace.....	26
1.4.5 Absorpce pryskyřičných kyselin v UV oblasti.....	27
1.4.6 Hodnocení kvality kalafuny	28
1.4.7 Modifikace kalafuny.....	28
1.4.8 Použití.....	31

1.4.9	Použití kalafuny pro výrobu barev a nátěrových hmot	32
1.4.10	Metody pro kvalitativní stanovení kalafuny	33
1.4.11	Metody pro kvantitativní stanovení kalafuny	35
1.5	Kapalinová chromatografie	35
1.5.1	Historický vývoj kapalinové chromatografie	35
1.5.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	36
2	Experimentální část	39
2.1	Přístroje a zařízení	39
2.2	Chemikálie	41
2.3	Analyzované vzorky	41
2.3.1	Kalafuna	41
2.3.2	Pigmenty	42
2.4	Pracovní postupy	45
2.4.1	Rozpustnost kalafuny v organických rozpouštědlech	45
2.4.2	Příprava mobilní fáze	45
2.4.3	Příprava kalibrační řady	45
2.4.4	Postup přípravy vzorků k HPLC analýze	46
2.4.5	Acidobazická titrace	46
2.5	Podmínky jednotlivých analýz	48
2.5.1	UV spektrometrie	48
2.5.2	IČ spektrometrie	48
2.5.3	NMR	48
2.5.4	HPLC/MS	48
2.5.5	HPLC/UV	49
2.6	Software k vyhodnocení dat	51

3	Výsledky a diskuze.....	52
3.1	Popis vzorků	52
3.1.1	Vzorky kalafun	52
3.1.2	Vzorky pigmentů	52
3.2	Určení složení vzorků kalafun	52
3.2.1	UV spektra.....	52
3.2.2	IČ spektra.....	56
3.2.3	Emisní spektrální analýza.....	58
3.2.4	NMR spektra	59
3.2.5	Hmotnostní spektra.....	61
3.3	Rozpustnost kalafuny.....	64
3.4	Optimalizace podmínek pro extrakci a analýzu kalafuny v pigmentech	66
3.4.1	Výběr chromatografické kolony.....	66
3.4.2	Výběr vhodného extrakčního činidla.....	69
3.4.3	Vliv doby ultrazvukové extrakce na výtěžnost	70
3.4.4	Vícenásobná extrakce s vybraným rozpouštědlem.....	70
3.5	Kalibrační měření	73
3.6	Finální chromatografická separace	74
3.7	Acidobazická titrace	76
3.8	Porovnání titračního a HPLC stanovení obsahu kalafuny v pigmentech	79
4	Závěr	80
	Použitá literatura	82
	Přílohy.....	88

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Ohromující barevnost pigmentů.....	16
Obrázek 2 Budova společnosti Synthesia, a.s.....	19
Obrázek 3 Sběr pryskyřice ze stromu	22
Obrázek 4 Balzámová kalafuna	23
Obrázek 5 Struktura pryskyřičných kyselin vyskytujících se v kalafuně.....	24
Obrázek 6 Příklady různých kondenzačních produktů kalafuny	25
Obrázek 7 Předpokládaný způsob isomerace a oxidace kyselin.....	26
Obrázek 8 Absorpční spektra pryskyřičných kyselin	27
Obrázek 9 Vznik tri-esteru kyseliny abietové.....	29
Obrázek 10 Hydrogenace kyseliny abietové	29
Obrázek 11 Dimerizace kyseliny abietové	30
Obrázek 12 Disproporcionace kyseliny abietové	30
Obrázek 13 Pěnový beton	31
Obrázek 14 Tavidlo určené k pájení součástek	31
Obrázek 15 Kalafuna určená pro údržbu smyčkových nástrojů	32
Obrázek 16 Porovnání kalafunovaného pigmentu a pigmentu vyrobeného..... bez přídavku kalafuny.....	33
Obrázek 17 Obecné schéma kapalinového chromatografu.....	36
Obrázek 18 Detektor diodového pole	37
Obrázek 19 Kapalinový chromatograf Agilent 1260.....	39
Obrázek 20 Kolony použité při experimentální práci.....	40
Obrázek 21 Vzorky kalafun.....	42
Obrázek 22 Pigment Yellow	43
Obrázek 23 Pigment Red	43
Obrázek 24 Diagram znázorňující vzorkování pigmentu žlutého pigmentu	44

Obrázek 25 Absorpční spektrum kalafuny WW Guangdong	53
Obrázek 26 Absorpční spektrum kalafuny WW Sunny.....	53
Obrázek 27 Absorpční spektrum sodného mýdla kalafuny	54
Obrázek 28 Absorpční spektrum kalafuny DRA	54
Obrázek 29 Absorpční spektrum částečně hydrogenované kalafuny Staybelite	55
Obrázek 30 Absorpční spektrum úplně hydrogenované kalafuny Foral AX-E.....	55
Obrázek 31 Porovnání ATR spekter kalafuny jakosti WW od více dodavatelů	56
Obrázek 32 Porovnání ATR spekter 50% sodného mýdla a mýdla Sylvaros	57
Obrázek 33 Porovnání ATR spekter nehydrogenované a hydrogenované kalafuny	57
Obrázek 34 Porovnání spekter disproporciované kalafuny DRA a WW (Sunny)	58
Obrázek 35 ¹ H-NMR spektrum standardu kyseliny neoabietové, kalafuny WW..... a kalafuny WW s přidavkem kyseliny neoabietové.....	59
Obrázek 36 ¹ H-NMR spektrum kalafuny Foral AX-E	60
Obrázek 37 ¹³ C-NMR spektrum kyseliny neoabietové, kalafuny WW..... a kalafuny WW s přidavkem kyseliny neoabietové.....	60
Obrázek 38 ¹³ C-NMR spektrum kalafuny Foral AX-E	61
Obrázek 39 Celkový iontový chromatogram a extrahovaný iontový chromatogram.....	62
Obrázek 40 Hm. spektra píků v čase 6,80 min, 7,45 min a 7,58 min.....	63
Obrázek 41 Záznam separace kalafuny WW (Guangdong) na koloně..... Nucleosil 120 C18 při 254 nm.....	66
Obrázek 42 Záznam píku standardu kyseliny abietové na koloně..... HS Discovery PEG při 252 nm.....	67
Obrázek 43 Záznam separace kalafuny WW (Guangdong) na koloně..... Poroshell 120 při 252 nm.....	67
Obrázek 44 Záznam separace kalafuny WW (Guangdong) na koloně..... Kinetex C18 při 250 nm.....	68
Obrázek 45 Záznam separace kalafuny WW (Guangdong) na koloně..... Kinetex C18 při 220 nm.....	68

Obrázek 46 Absorpční UV spektra píků z obrázku 45 odpovídající pryskyřičným kyselinám v kalafuně	69
Obrázek 47 Různá zbarvení extraktů ze vzorku žlutého pigmentu	69
Obrázek 48 Vícenásobná extrakce kalafuny ze žlutého pigmentu A	71
Obrázek 49 Vícenásobná extrakce kalafuny ze žlutého pigmentu B.....	72
Obrázek 50 Vícenásobná extrakce kalafuny z červeného pigmentu A	73
Obrázek 51 Vícenásobná extrakce kalafuny z červeného pigmentu B.....	73
Obrázek 52 Kalibrační přímka kyseliny neoabietové.....	74
Obrázek 53 Kalibrační přímka kyseliny abietové.....	74

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Hodnoty molárních absorpčních koeficientů pryskyřičných kyselin	27
Tabulka 2 Určení rozpustnosti látky	45
Tabulka 3 Rozpustnost kalafuny WW	64
Tabulka 4 Rozpustnost částečně hydrogenované kalafuny Staybelite	64
Tabulka 5 Rozpustnost úplně hydrogenované kalafuny Foral AX-E	64
Tabulka 6 Rozpustnost 50% kalafunovaného sodného mýdla	64
Tabulka 7 Rozpustnost kalafunovaného mýdla Sylvaros	65
Tabulka 8 Extrakce kyselin ve žlutém pigmentu B různými extrakčními činidly.....	70
Tabulka 9 Vliv doby ultrazvukové extrakce na výtěžnost.....	70
Tabulka 10 Vícenásobná extrakce kalafuny ze žlutého pigmentu A.....	71
Tabulka 11 Vícenásobná extrakce kalafuny ze žlutého pigmentu B	71
Tabulka 12 Vícenásobná extrakce kalafuny z červeného pigmentu A.....	72
Tabulka 13 Vícenásobná extrakce kalafuny z červeného pigmentu B	72
Tabulka 14 Stanovení volné, celkové a kalafuny ve formě soli	77
Tabulka 15 Číslo kyselosti: hodnota deklarovaná výrobcem a experimentální hodnota	77
Tabulka 16 Stanovení volné, celkové a kalafuny ve formě soli ve žlutém pigmentu	78
Tabulka 17 Stanovení volné, celkové kalafuny a kalafuny ve formě soli v červeném..... pigmentu	78
Tabulka 18 Obsah kyseliny abietové a neoabietové ve vzorcích kalafuny	75
Tabulka 19 Obsah kyseliny abietové a neoabietové ve vzorcích žlutých pigmentů	75
Tabulka 20 Obsah kyseliny abietové a neoabietové ve vzorcích filtrátů	76
Tabulka 21 Obsah kyseliny abietové a neoabietové ve vzorcích červených pigmentů.....	76

SEZNAM ZKRATEK

ASTM	Americká společnost pro testování a materiály
BET	Brunauer–Emmett–Teller (isoterma)
CAS	Registrační číslo látky
CICN	Colour Index Constitution Number
CIGN	Colour Index Generic Name
C. I.	Colour Index
DAD	Detektor diodového pole
DEMI	Demineralizovaný
DHA	Dehydroabietová kyselina
DMS	Dimethylsulfoxid
ESA	Emisní spektrální analýza
ESI-MS	Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
IC	Iontový chromatogram
IČ	Infračervený
LC	Kapalinová chromatografie
MF	Mobilní fáze
MS	Hmotnostní spektrometrie
NMR	Nukleární magnetická rezonance
PEG	Polyethylenglykol
SBU	Strategická obchodní jednotka
THF	Tetrahydrofuran
UV	Ultrafialový
WW	Označení jakosti kalafuny (Water-White)
XRD	Rentgenová difrakční analýza

ÚVOD

Kalafuna je přírodní látka, která se získává z pryskyřice. Při porušení kůry jehličnanu uniká balzám, který má za úkol chránit strom proti škůdcům, na vzduchu tento balzám ztvrdne a vzniká tak pryskyřice, která je z chemického hlediska tvořena směsí slabých organických kyselin a terpentýnu. Oddestilováním těkavých látek se získává kalafuna, která je nepostradatelnou surovinou v různých oblastech průmyslu, od průmyslu nátěrových hmot, elektrotechniky až po péči o strunné nástroje. Pro některé aplikace je nutné kalafunu modifikovat hydrogenací, při které se ztrácí její toxické vlastnosti a lze ji poté použít například i v potravinářství.

Kalafuna se využívá i při výrobě organických pigmentů. Mezi sledované vlastnosti pigmentů patří například odstín, transparence, reologie nebo stálost vůči vnějším vlivům, některé z těchto vlastností se ovlivňují přidávkem kalafuny během syntézy.

Pro stanovení kalafuny v organických pigmentech je nutné nejdříve extrahovat kalafunu z pigmentu vhodnou technikou, určit její složení a následně stanovit jednotlivé složky. Nejběžnější technikou pro stanovení kalafuny je plynová chromatografie, která má však řadu omezení a nevýhod.

Cílem této práce je zavést novou metodu, stanovení kalafuny v organických pigmentech kapalinovou chromatografií s DAD detektorem a následně metodu optimalizovat. Teoretická část práce zahrnuje úvod do organických pigmentů a jejich rozdělení, a dále informace o společnosti Synthesia, a. s., věnuje se pryskyřici a kalafuně, jejímu složení, hodnocení jakosti, způsobům modifikace a použití, v závěru je popsána technika kapalinové chromatografie. Experimentální část popisuje optimalizaci separačních podmínek a extrakce kalafuny z pigmentu, a následně porovnání se stávající metodou pro stanovení kalafuny v organických pigmentech.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Organické pigmenty

1.1.1 Koloranty

Koloranty jsou látky schopné absorbovat elektromagnetické záření z viditelné oblasti spektra ve vlnovém rozsahu 380–780 nm. Pro intenzivní vybarvení substrátu musí mít dostatečně vysoký molární absorpční koeficient ($10\,000\text{--}40\,000\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) a přilnavost, která závisí na chemické konstituci. Další požadavky se týkají konkrétního použití: kolorant pro barvení textilií musí mít dobrou stabilitu při praní, pro externí použití zase stálobarevnost na světle [1].



Obrázek 1 Ohromující barevnost pigmentů [2]

Koloranty lze podle rozpustnosti rozdělit do dvou skupin, na barviva a pigmenty (obrázek 1). Barviva jsou rozpustné látky, na substrát se aplikují většinou v roztoku, kde vytváří výhradně monomolekulární disperzi. Na rozdíl od barviv, pigmenty jsou špatně rozpustné nejen ve vodě, ale i v mnoha organických rozpouštědlech. V rozpouštědle tvoří aglomeráty, což se ve výsledném produktu projevuje nežádoucími tečkami či skvrnami nebo ztrátou lesku. Nerozpustnost je způsobena absencí solubilizačních skupin v molekule (např. $-\text{COOH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$) nebo molekula sice tyto skupiny obsahuje, ale vytváří nerozpustnou sůl (lak) [3,4].

Organické pigmenty jsou složité molekuly, jejichž nejběžnější klasifikace je na základě koloristických vlastností nebo chemické struktury [3].

1.1.2 Klasifikace kolorantů podle tzv. Colour index systému

Koloranty jsou klasifikovány pro komerční účely podle jejich názvu a chemického složení. Colour Index™ (C. I.) vyvinula Americká asociace barvářů a barvířů (The Society of Dyers and Colourists) ve spolupráci s Americkou asociací textilních chemiků a koloristů (American Association of Textile Chemists and Colorists). Jedná se o duální klasifikační systém, který se skládá z Colour Index Generic Name (CIGN) a Colour Index Constitution Number (CICN):

- **CIGN** charakterizuje chemické složení, odstín a sériové číslo, např. C.I. Acid Blue 52 nebo C.I. Pigment Yellow 176. Pod tímto názvem se nachází komerční produkty stejného chemického složení, vzniklé toutéž chemickou reakcí.
- **CICN** tvoří pěticiferné číslo. Podle prvních dvou čísel lze určit chemickou strukturu kolorantu, např. C.I. Pigment Blue 15 má CIGN 74160 a lze ho zařadit mezi ftalocyaninové pigmenty (rozmezí 74000–74999) [5,6].

1.1.3 Klasifikace organických pigmentů podle chemické struktury

a) Azo pigmenty

Azo pigmenty obsahují azoskupinu $-N=N-$ v molekule. Syntéza těchto pigmentů je ekonomicky velice přitažlivá, protože nejprve se připraví diazoniová sůl, ze které lze v následujícím kroku vyrobit poměrně široký sortiment azo pigmentů.

Příklady:

- Monoazo pigmenty
- Diazo pigmenty
- β -naftolové pigmenty
- Pigmenty odvozené od naftolu AS [7].

b) Polycyklické pigmenty

Polycyklické pigmenty obsahují kondenzované aromatické nebo heterocyklické kruhy. Mají dobrou stálobarevnost na světle, dobře odolávají povětrnostním vlivům i organickým rozpouštědly, migrují jen velice málo. Cena oproti azo pigmentům je značně vyšší.

Příklady:

- Ftalocyaninové pigmenty
- Chinakridonové pigmenty
- Antrachinonové pigmenty
- Flavanthronové pigmenty [7].

c) Dioxazinové pigmenty

Nejznámějším představitelem této skupiny je pigment Violet 23, který má vynikající stálobarevnost na světle i v povětrnosti, nemigruje. Používá se do nátěrových hmot, plastů, tiskářských barev a pro barvení vláken [7].

d) Triarylkarboniové pigmenty

Rozdělují se na dvě základní skupiny:

- Vnitřní soli trifenylmetan sulfonových kyselin
- Komplexní soli heteropolykyselin obsahujících v molekule P, W, Mo, Si nebo Fe [7].

1.1.4 Vlastnosti organických pigmentů

Výrobci organických pigmentů charakterizují vybrané fyzikální parametry, jako je například velikost částic (stupeň distribuce), krystalinita, specifický povrch nebo povrchová struktura, pro porovnání mezi jednotlivými pigmenty. Každá aplikace vyžaduje specifické vlastnosti pigmentu [1].

Tvorba a růst krystalů

Základní velikost částic většiny komerčních pigmentů je menší než 1 μm , často dokonce menší než 0,3 μm (podélný rozměr anisometrických částic). S klesající velikostí pigmentů roste u těchto malých částic povrchová energie a pro její snížení dochází k aglomeraci částic. Práškové organické pigmenty potom obsahují směs krystalitů a jednoduchých krystalů. Pro rozšíření aplikačních možností pigmentu je potřeba tyto aglomeráty rozrušit tak, jak je to jen možné. Poté už následuje spojení pigmentu s vhodným pojivem. Hotový nezpracovaný pigment je tvořen primárními krystaly, které mohou mít tvar krychlí, destiček, jehlic nebo úplně nepravidelný tvar [1].

Agregáty jsou primární částice, které rostou společně a mají i společný povrch, celková povrchová plocha je menší než součet povrchů jednotlivých částic. Agregáty se nedají rozdělit pomocí dispergace [1].

Aglomeráty nerostou společně, po ukončení růstu se spojí pouze přes rohy nebo hrany, celková plocha se tedy podstatně neliší od součtu plochy jednotlivých částic. Tato uskupení mohou být narozdíl od agregátů pomocí dispergace rozdělena na jednotlivé krystaly či agregáty [1].

Specifický povrch

Hodnoty velikosti specifického povrchu u organických pigmentů se pohybují mezi 10 a 130 m²/g. Experimentálně se určuje pomocí látky, která se adsorbuje na povrch, nejrozšířenější je technika BET pracující s adsorpčními plyny (N₂, Ar nebo Kr). Tento parametr pigmentu je důležitý například při aplikaci různých aditiv do pigmentu, mezi která patří například emulzifikátory nebo pryskyřice [1].

1.2 Výroba pigmentů ve společnosti Synthesia

1.2.1 Společnost Synthesia, a.s.

Společnost Synthesia (obrázek 2) se rozkládá v areálech Semtín a Rybitví na okraji Pardubic. Patří k nejvýznamnějším průmyslovým podnikům pardubického regionu, který brzy oslaví 100 let své existence. Na pracovištích se vystřídaly téměř čtyři generace zaměstnanců a společnost se změnila z výbušninářské továrny na významný chemický závod, který vyváží více než 75 % svých výrobků do 60 zemí světa, přičemž převážná část exportu směřuje do průmyslově vyspělých zemí [8].



Obrázek 2 **Budova společnosti Synthesia, a.s.** [9]

V roce 1994 se společnost transformovala na akciovou společnost Synthesia, a.s. a od roku 2003 je rozdělena do čtyř samostatných výrobních divizí (SBU):

SBU Nitrocelulóza

- Průmyslová nitrocelulóza – deriváty přírodní nitrocelulózy nacházející uplatnění především v oblasti nátěrových hmot a laků
- Energetická nitrocelulóza – výroba střelných prachů a průmyslových travin
- Anorganické kyseliny a soli – pro vlastní využití v dalším provozu Synthesie i pro externí zákazníky
- Oxycelulóza – Synthesia je jedním z předních výrobců pro chirurgické aplikace [8].

SBU Organická chemie

- Farmacie – jediný evropský výrobce vitamínu D₂
- Pesticidy – Synthesia nabízí účinné látky pro výrobu herbicidů
- Zákaznické syntézy – výrobky dle individuálních požadavků zákazníků založené na fosgenaci, hydrogenaci a nitraci
- Polotovary – výroba farmaceutických polotovarů pro výrobu RTG kontrastních látek [8].

SBU Energetika

- Výroba a distribuce elektrické energie a páry pro všechny výrobní části Synthesie a další subjekty v areálu společnosti [8].

SBU Pigmenty a barviva

- Přední světový výrobce vysoce jakostních organických pigmentů a přední evropský producent barviv pro přírodní a syntetické materiály
- Organické pigmenty pro barvení plastů, textilních vláken, nátěrových hmot a tiskových barev
- Největší část výroby je zaměřena na vysoce jakostní i klasické azo pigmenty.

V roce 2009 se vlastníkem společnosti Synthesia, a.s. stal Agrofert Holding, a.s. [8].

1.2.2 Historie výroby pigmentů a barviv

Historie výroby pigmentů společností Synthesia začíná v roce 1938, kdy byla uzavřena smlouva mezi ústeckým Spolkem a Explosií o vybudování závodu na výrobu organických barviv, barvářských polotovarů a farmaceutik, v těsném sousedství již existujících semtínských závodů. Plocha budoucího závodu byla symetricky rozdělena pro komplex třiceti továrních budov

se standardním půdorysem 90 x 20 metrů podle vzoru Baťovy továrny. Od 50. let se přesunuly podstatné části barvářské chemie z Ústí nad Labem do Pardubic a zřízením VCHZ, VÚOS a VŠCHT v Pardubicích se rybitevští chemici stali hybnou silou barvářského výzkumu a výroby [10].

1.2.3 Současný sortiment pigmentů

Společnost Synthesia, a.s. vyrábí a vyvíjí celou řadu kvalitních pigmentů. Kromě klasických azových pigmentů je významným evropským výrobcem vysoce jakostních pigmentů (High Performance Pigments – HPP), které jsou používány do nejnáročnějších typů nátěrových formulací [8].

Příklady pigmentů pro nátěrové hmoty:

- **P.Y. 74** (monoazo pigment, Versalová žlut' 5GXS, 5GXW)
- **P.Y. 94** (diazo kondenzační, Versalová žlut' 6G)
- **P.R. 254** (diketopyrrolopyrrolový pigment, Versalová červeň DP3G)
- **P.B. 15:3** (ftalocyaninový pigment, Versalová modř LBS) [11].

Příklady pigmentů pro tiskové barvy:

- **P.Y. 150** (kovokomplexní pigment, Versalová žlut' E5G)
- **P.O. 36** (benzimidazolový pigment, Versalová oranž HLD)
- **P.R. 166** (diazo kondenzační pigment, Versalový šarlat R)
- **P.G. 7** (ftalocyaninový pigment, Versalová zeleň BG) [12].

Příklady pigmentů pro barvení plastů:

- **P.Y. 180** (benzimidazolový pigment, Versalová žlut' HG)
- **P.R. 254** (diketopyrrolopyrrolový pigment, Versalová červeň DP3G)
- **P.Y. 147** (antrachinonový pigment, Ostaplast žlutý AGR) [13].

Kromě pigmentů určených k přípravě nátěrových hmot, tiskových barev a pigmentů pro barvení plastů vyrábí společnost Synthesia pigmenty pro speciální aplikace nebo pro preparace [13].

1.3 Pryskyřice

Jehličnaté stromy obsahují příčné nebo podélné pryskyřičné kanálky, které vznikají roze-
stoupením parenchymatických buněk. Tyto buňky do pryskyřičného kanálku vylučují tzv. bal-
zám, což je roztok isomerních pryskyřičných kyselin v tekutých těkavých monocyklických
a bicyklických terpenech, terpenových alkoholech a seskviterpenech. Jeho hlavní úlohou je
ochrana stromu před hmyzem a mikroorganismy. Porušením pryskyřičných kanálků začne bal-
zám vytékat na povrch. Při styku se vzduchem se odpaří terpeny a vzniká pryskyřice – tvrdá
hmota, kterou tvoří vykrystalizované kyseliny [14–16].

Práce spojené se sběrem a dopravou pryskyřice se nazývají těžbou pryskyřice, užívá se
také pojem smolaření. Volí se méně kvalitní porosty, které by se daly těžko využít pro těžbu
dřeva. Ze stromu se nejprve odstraní borka (vytvoří se tzv. lizina), a poté se prořezávají drážky
(obrázek 3). Méně častým způsobem je vrtání otvorů či vydlabání dutin, protože dochází ke zne-
hodnocení dřeva. Z kmene o objemu 1 m³ se získá 3–4 kg pryskyřice za rok [16].

Na území ČR se pryskyřice těžila ve velkém množství pouze v období obou světových
válek. V současnosti se pro těžbu pryskyřice využívají především borovice v Číně, Francii, Ame-
rice a Indonésii. Hlavním zdrojem v Evropě je borovice přímořská (*Pinus pinaster*), pěstovaná
hlavně ve Francii v departementech Gironde a Landes, v severní Evropě je to borovice lesní (*P.*
sylvestris), ve Spojených státech amerických borovice bahenní (*P. palustris*) a borovice kadi-
dlová (*P. taeda*) [14–16].



Obrázek 3 Sběr pryskyřice ze stromu [17]

1.3.1 Význam pryskyřice pro chemický průmysl

Surová pryskyřice se po přečištění od jehličí, kůry, částí dřeva apod. destiluje, čímž se získávají terpentýnové silice, které se používají jako složky laků, barev, mýdel nebo kosmetických přípravků. Terpentýn ze smrku a jedle je označován jako štrasburský, z modřínu jako benátský. Tuhý zbytek po oddestilování terpentýnu z pryskyřice se nazývá kalafuna. Tento produkt se používá například pro výrobu lepidel nebo jako součást tiskařských barev [16].

1.4 Kalafuna

Kalafuna je křehká, transparentní, sklovitá pevná látka, která se získává oddestilováním těkavého terpentýnu z pryskyřice. Její pojmenování je odvozeno od starořeckého města Kolofón, které bylo významným vývozcem pryskyřice [18,19].

Rozlišují se tři typy kalafun:

- balzámová kalafuna: z pryskyřice odebrané z živých stromů (obrázek 4)
- dřevná kalafuna: z pryskyřice, která je extrahovaná z pařezů
- tálový olej: izoluje se destilací z tálového mýdla po přidání minerální kyseliny [20,21].

Tálové mýdlo je meziproduktem při výrobě papíru, je tvořené zejména solemi mastných a pryskyřičných kyselin [20,21].



Obrázek 4 Balzámová kalafuna [15]

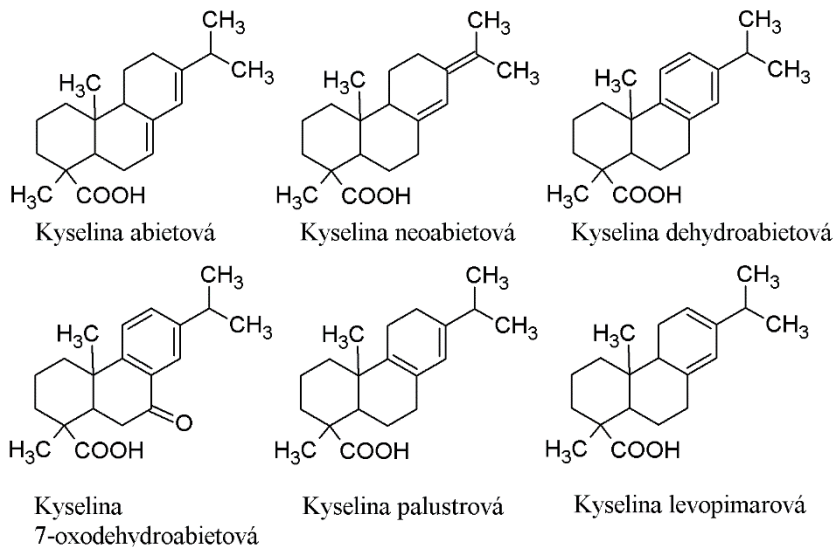
1.4.1 Chemické složení

Chemické složení kalafuny je ovlivněno druhem jehličnanu i jeho geografickým umístěním. Kalafuna je složena z 90–95 % z diterpenoidních monokarboxylových kyselin sumárního

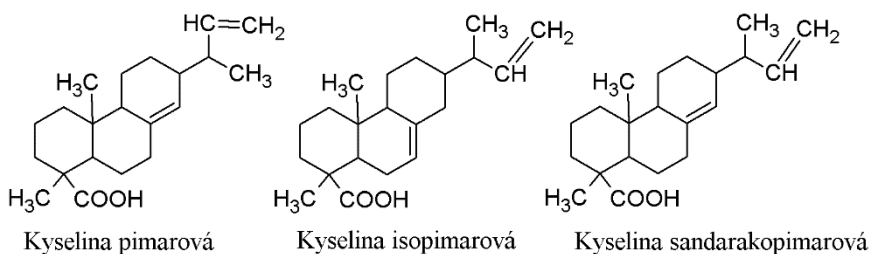
vzorce $C_{19}H_{29}COOH$. Zbylá procenta tvoří odpovídající estery (reziny), aldehydy a alkoholy (rezinoly) [20,22].

Nejběžnější kyseliny v kalafuně získané z borovice jsou kyselina abietová, pimarová a isopimarová. Pryskyřičné kyseliny v kalafuně jsou rozděleny do dvou skupin (obrázek 5): kyseliny abietového typu s konjugovanými dvojnými vazbami (tvoří 90 % z obsahu kyselin) a pimarového typu, u kterých dvojná vazba v konjugaci nejsou [14,20].

Kyseliny abietového typu



Kyseliny pimarového typu

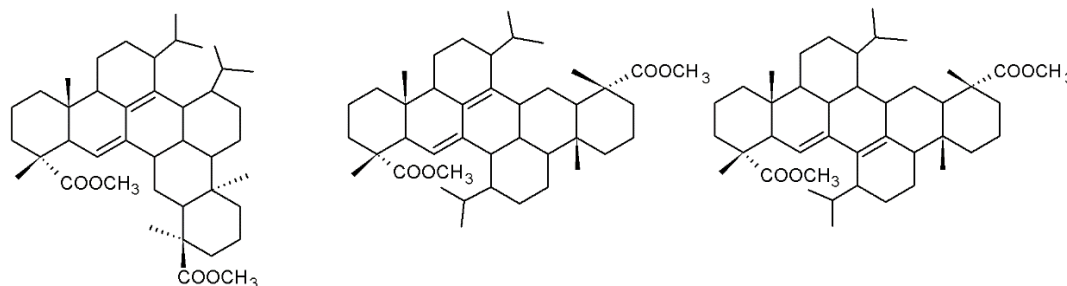


Obrázek 5 **Struktura pryskyřičných kyselin vyskytujících se v kalafuně,**
upraveno podle [20]

Poměr jednotlivých kyselin se podle různých zdrojů liší. Chen a kol. uvedl následující složení blíže nespecifikované balzámové kalafuny: kyselina abietová 18–33 %, neoabietová 14–16 %, palustrová 6–35 %, pimarová 5–6 %, isopimarová 18 %, dehydroabietová 69 %, levopimarová [23].

Joye a kol. zkoumal obsah kyselin v jednotlivých druzích borovic. Dále analyzoval 10 vzorků kalafuny. Kyselina abietová tvořila 22–50 % a kyselina neoabietová mezi 2,2–24 % z celkové hmotnosti kalafuny [24].

Kondenzací pryskyřičných kyselin vznikají produkty (obrázek 6), které mají velký význam v průmyslu zabývajícím se výrobou lepidel, inkoustů nebo nátěrových laků. Mohou se vyskytovat například ve smole, vedlejším produktu destilace tálového oleje [25].



Obrázek 6 Příklady různých kondenzačních produktů kalafuny, upraveno podle [23]

1.4.2 Rozpustnost

Kalafuna patří mezi látky ve vodě nerozpustné. Rozpustnost kalafuny ve vodě je 0,9–8,1 mg/l (20 °C). Peng a kol. zkoušel rozpustnost pryskyřičných kyselin ve vodě. Rozpustnost kyseliny abietové po 72hod míchání byla 2,75 mg/l. U ostatních kyselin se pohybovala mezi 1,7 a 5,11 mg/ml (nejvíce rozpustná je kyselina dehydroabietová) [26].

Monovalentní sůl kalafuny má ve vodě rozpustnost mnohem vyšší, začíná na hodnotě 438 mg/l a může se i neomezeně mísit. U divalentní soli se rozpustnost pohybuje v rozmezí 18,2–65 mg/ml [27].

Hodnoty rozpustnosti v organických rozpouštědlech nejsou v dostupné literatuře deklarovány.

1.4.3 Toxicita

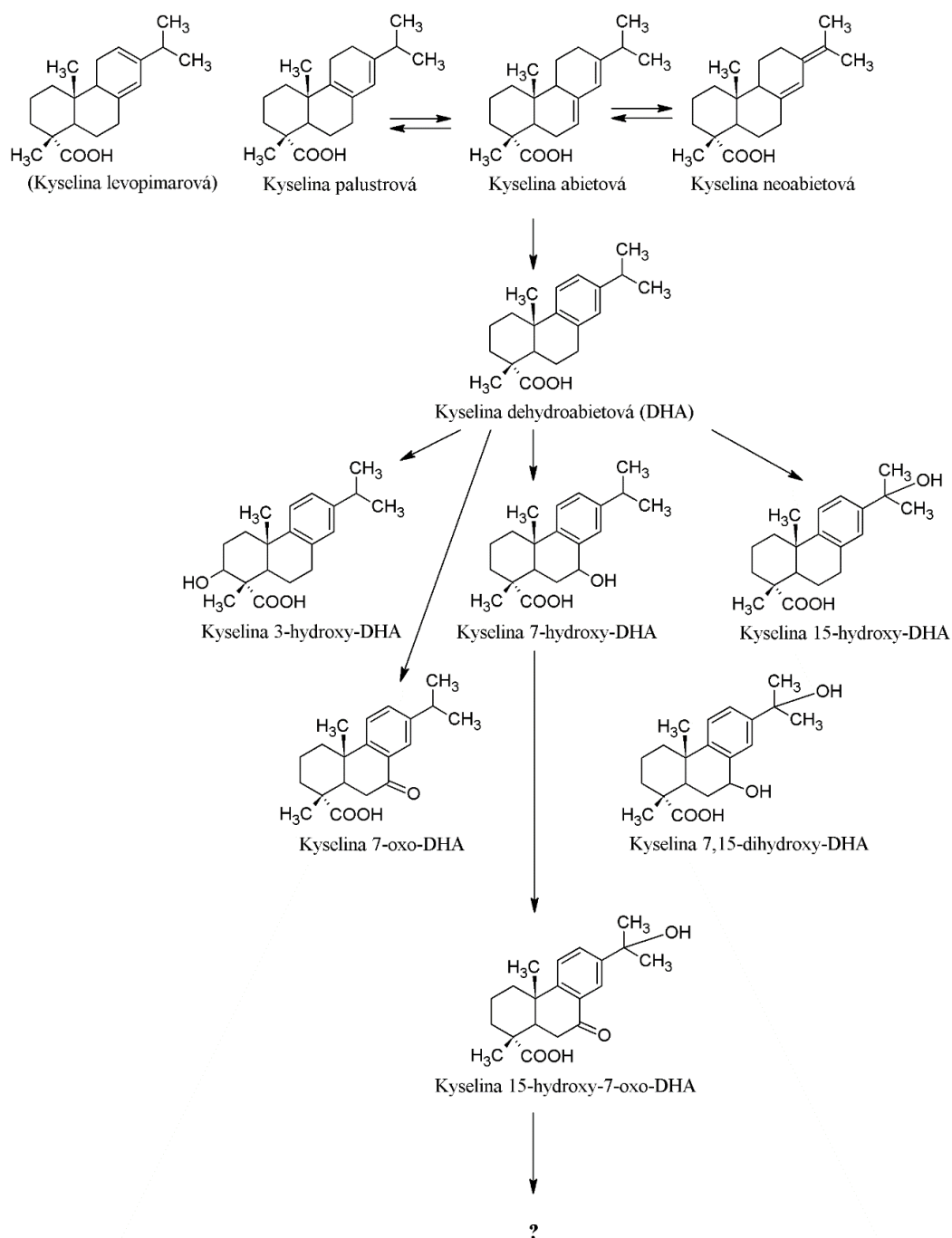
Hlavní komponentu kalafuny, kyselinu abietovou, uvádějí některé zdroje jako alergen způsobující astma a kontaktní dermatitidu. Podle jiných zdrojů má samotná kyselina abietová zanedbatelné alergenní vlastnosti, tuto vlastnost mají spíše produkty, které vznikají její oxidací na vzduchu, například 7-oxodehydroabietová kyselina nebo 15-hydroperoxyabietová kyselina (silný alergen) [20,28].

Další pohled na toxikologické hodnocení kalafuny se zaměřuje na to, zda se kalafuna vyskytuje ve formě volné kyseliny nebo soli. Kalafunát (CAS 68201-60-5) v koncentraci vyšší než 1 hm. % je dráždivý pro oko, senzibilizující pro kůži a toxický pro vodní organismy, kalafuna (CAS 8050-09-7) ve stejné koncentraci je pouze senzibilizující pro kůži [43].

1.4.4 Isomerace

Kyseliny abietového typu mají sklon k isomeraci (obrázek 7), a to buď termální (při teplotě nad 175 °C) nebo působením zředěných minerálních kyselin [20].

Předpokládá se, že termální isomerace probíhá při zahřátí kyselin nad jejich bod měknutí, přičemž kyseliny pimarového typu jsou vůči isomeraci odolnější než kyseliny abietového typu. Například po hodinovém zahřívání kyseliny abietové na 200 °C výsledný produkt obsahuje 81 % kyseliny abietové, 14 kyseliny palustrové a 5 % kyseliny neoabietové [23].



Obrázek 7 Předpokládaný způsob isomerace a oxidace kyselin, upraveno podle [29]

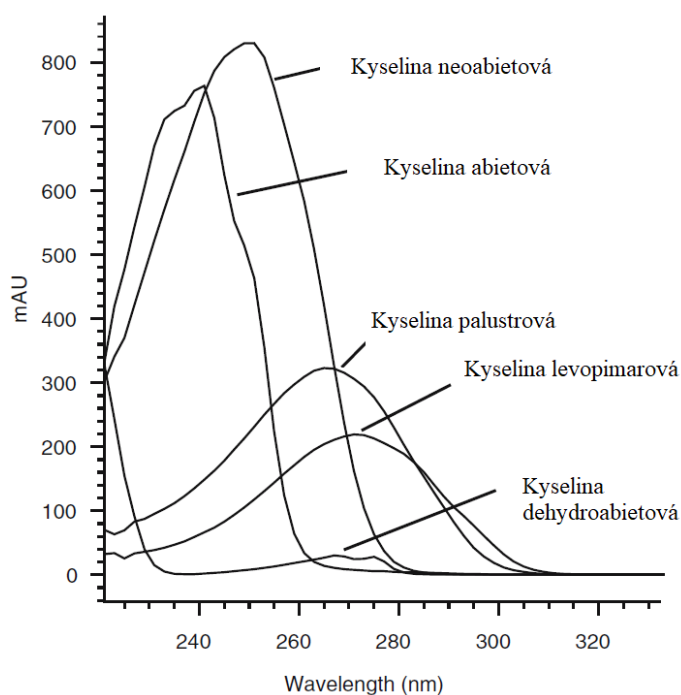
1.4.5 Absorpce pryskyřičných kyselin v UV oblasti

V UV oblasti nejvíce absorbuje kyselina abietová a neoabietová, dále pak palustrová, levopimarová a nejmenší absorpci z kyselin abietového typu má kyselina dehydroabietová (tabulka 1) [18].

Tabulka 1 Hodnoty molárních absorpčních koeficientů pryskyřičných kyselin [18]

Pryskyřičná kyselina	Hodnota molárního absorpčního koeficientu ϵ_λ [dm ³ ·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]
Kyselina abietová	24 150
Kyselina neoabietová	24 540
Kyselina palustrová	9 060
Kyselina levopimarová	5 800
Kyselina dehydroabietová	698

Absorpční maxima pryskyřičných kyselin jsou následující: 240 nm (k. abietová), 250 nm (k. neoabietová), 266 nm (k. palustrová), 272 nm (k. levopimarová). Kyselina dehydroabietová byla vyhodnocována při 268 nm (obrázek 8) [18].



Obrázek 8 Absorpční spektra pryskyřičných kyselin ($c = 1$ mmol/l), upraveno podle [18]

Pro kyselinu dehydroabietovou lze použít i fluorometrickou detekci (excitace 225 nm, emise 285 nm) [30].

1.4.6 **Hodnocení kvality kalafuny**

Kvalita kalafuny se obvykle určuje pomocí její barvy nebo teploty měknutí. Platí úměra, že kalafuna světlejší barvy je kvalitnější. Nejčistší kalafuna je označována jako Extra-White (X), nabízena je ovšem zřídka. Nejvíce žádaná je dobře dostupná kalafuna Water-White (WW). O něco méně kvalitní je kalafuna Window-Glass (WG). Další kalafuny (např. N, M, K, I, H) jsou podstatně tmavší barvy. Barva je ovlivněna zejména ročním obdobím, během něhož byl proveden sběr pryskyřice. Pryskyřice získaná na konci zimy či z kraje jara má světle žlutou barvu, kdežto letní a podzimní sběr se vyznačuje tmavší pryskyřicí měkké konzistence [18,31].

Bod měknutí se běžně pohybuje mezi 70 až 80 °C, vyšší bod měknutí prezentuje kalafunu lepší jakosti. Dalším kritériem, hodnotícím jakost kalafun, je číslo kyselosti; vyhovující hodnoty jsou 160–170 mg KOH/g kalafuny. Procenta nezmýdelnitelné hmoty značí část kalafuny, která není tvořena pryskyřičnými kyselinami. Přijatelná hodnota je pod 10 %, vyšší hodnota značí menší kvalitu kalafuny [14].

Přehled standardů zabývajících se stanovením sledovaných parametrů kalafuny lze nalézt na webových stránkách American Society for Testing and Materials (ASTM):

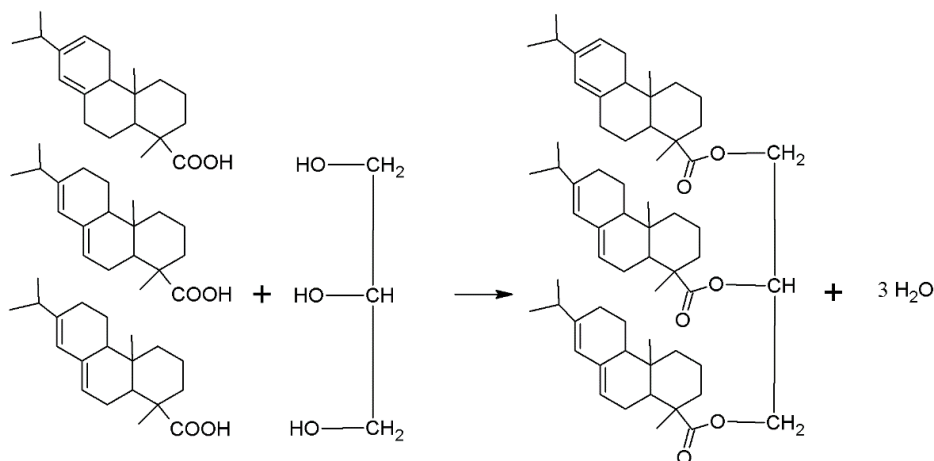
- D 269-92 Nerozpustný podíl kalafuny
- D 464-92 Číslo zmýdelnění
- D 465-92 Číslo kyselosti
- D 509-70 Vzorkování a klasifikace
- D 889-58 Obsah těkavého oleje
- D 1063-51 Obsah prachu
- D 1064-58 Obsah železa
- D 1065-92 Nezmýdelnitelný podíl
- D 3008-90 Stanovení pryskyřičných kyselin plynovou chromatografií
- E 28-92 Stanovení bodu měknutí [14].

1.4.7 **Modifikace kalafuny**

Kalafuna je díky nenasyčeným vazbám poměrně málo stabilní látka. Aby se rozšířila oblast její použitelnosti do různých oblastí, je vhodné ji nejprve chemicky modifikovat a vytvořit z ní tak látku stabilnější. Takto modifikovat lze jak balzámovou, tak i dřevnou kalafunu a tálový olej. Příkladem modifikace kalafuny je esterifikace, hydrogenace, dimerizace nebo funkcionalizace [32].

a) Esterifikace

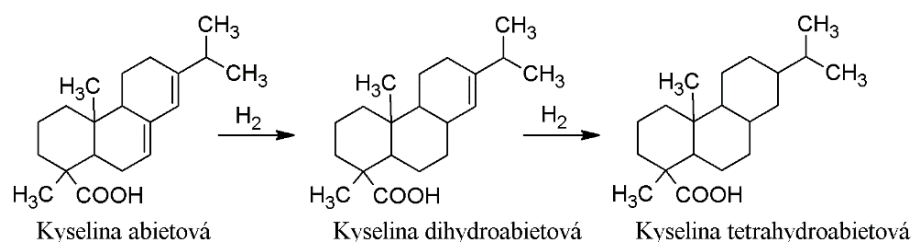
Ester je produkt reakce mezi pryskyřičnou kyselinou a alkoholem, typicky methanolem, triethylen glykolem, pentaerythritolem či glycerolem (obrázek 9). Esterifikace je rovnovážná reakce, jejíž rovnováhu lze posunout ve prospěch produktů odebráním vody. Výběr alkoholu použitého k esterifikaci závisí na požadovaných vlastnostech výsledné modifikované kalafuny (barva, stabilita). Pokud je vyžadován produkt o vysoké tepelné stabilitě, spíše se upravuje hydrogenací [32].



Obrázek 9 Vznik tri-esteru kyseliny abietové, upraveno podle [32]

b) Hydrogenace

Hydrogenace (obrázek 10) je běžná metoda ke zlepšení tepelné stability kalafuny. Průběh reakce lze kontrolovat a připravit tak buď částečně hydrogenovaný produkt (např. Staybelite-ETM) či úplně hydrogenovaný (např. ForalTM AX-E). Molekula bez dvojných vazeb je odolnější vůči oxidaci, dochází také k zesvětlení barvy [32].

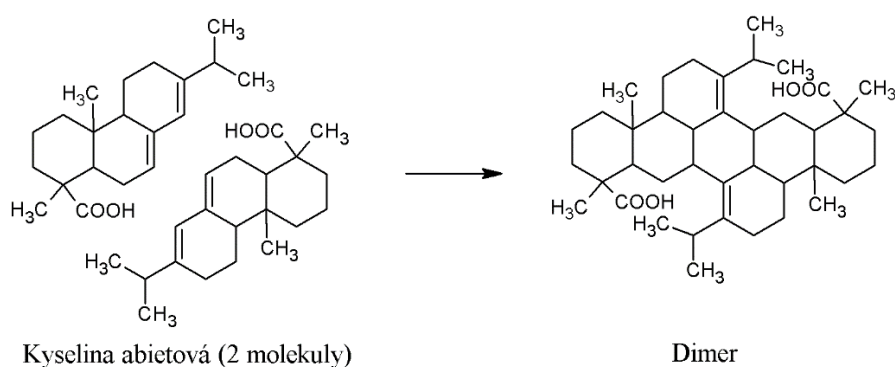


Obrázek 10 Hydrogenace kyseliny abietové, upraveno podle [32]

Hydrogenovaná kalafuna má řadu výhod:

- světlejší barva
- lepší stabilita
- snížená schopnost sensibilizace (menší alergenní potenciál)
- méně absorbuje v UV oblasti [32].

c) Dimerizace

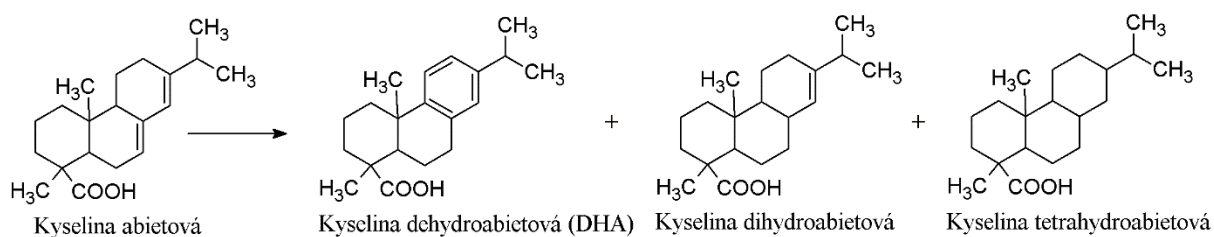


Obrázek 11 **Dimerizace kyseliny abietové**, upraveno podle [32]

Dimerizací molekul (obrázek 11) dochází také ke zlepšení tepelné stability a zvýšení bodu měknutí [32].

- d) Reakce nenasyčené dikarboxylové kyseliny (např. maleinové nebo fumarové) s esterem kalafuny
- e) Reakce s fenolem
- f) Redukce karboxylové skupiny na hydroxylovou [32].
- g) Disproporcionace

Při teplotě nad 200 °C kyselina abietová disproporcionuje za vzniku kyseliny dehydroabietové, tetrahydroabietové a dihydroabietové (obrázek 12) [20].



Obrázek 12 **Disproporcionace kyseliny abietové**, upraveno podle [29,32]

1.4.8 Použití

- Speciální protiskluzové nátěry

Upravená kalafuna se využívá při přípravě speciálních nátěrů určených pro tvorbu vodorovných dopravních značek (přechod pro chodce, dočasné změny organizace silničního provozu, protiskluzová úprava vozovky apod.) [33].

- Fyzikální pěnidlo

Reakcí kalafuny s hydroxidem lze připravit mýdlo, které funguje jako fyzikální pěnidlo při přípravě pěnového betonu. Vznikem dutinek v betonu (obrázek 13) se nejen šetří materiál a sníží se jeho hustota, ale vylepší se tím hlavně jeho mechanické vlastnosti a trvanlivost [34].



Obrázek 13 Pěnový beton [34]

- Lepidlo

- Antimikrobiální prostředek

Kyselina abietová může být převedena na abietylamin acetát, který inhibuje růst řas, bakterií a plísní.

- Pájení (obrázek 14)



Obrázek 14 Tavidlo určené k pájení součástí [35]

- Potravinářský průmysl

Kalafuna po hydrogenaci se používá při výrobě žvýkaček.

- Impregnace a ochrana dřeva

- Klížídlo v papírenském průmyslu

- Změkčovadlo v gumárenském průmyslu

Přídavek kalafuny do gumy zvyšuje její plasticitu, tepelnou odolnost a anti-abrazivní vlastnosti. Dále se používá jako dispergační činidlo a emulzifikátor [33].

- Zvýšení tření u smyčcových nástrojů

Pro správnou funkci smyčcových nástrojů je nejprve nutné namazat koňské žíně kalafunou – bez ní by smyčec nevydával žádný zvuk. Množství nanesené kalafuny ovlivňuje zvuk a celkovou kvalitu tónu. Dutý tón naznačuje malé množství, naopak přebytek je indikován skřípavým zvukem. Zde se také rozlišuje mezi světlou a tmavou kalafunou – tmavá kalafuna (obrázek 15) se lépe hodí pro použití v nižší teplotě, zatímco světlá kalafuna s vyšším bodem tání je vhodnější pro použití v teple, nástroj pak vydává velmi čisté tóny [36].



Obrázek 15 Kalafuna určená pro údržbu smyčcových nástrojů [36]

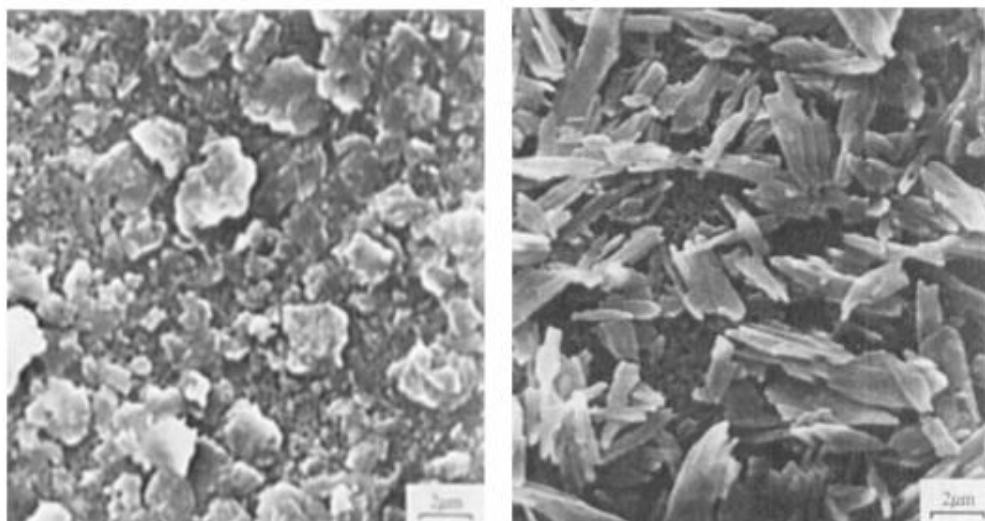
1.4.9 Použití kalafuny pro výrobu barev a nátěrových hmot

Kalafuna má své využití mimo jiné i při výrobě pigmentů. Přidává se ve formě sodné či draselné soli během kopulační reakce či po jejím proběhnutí. Množství zachycené kalafuny se ovlivňuje hodnotou pH, časem, mícháním a dalšími podmínkami. Kalafuna obalí povrch částice pigmentu, inhibuje růst krystalů a přechází tak vzniku aglomerátů. Z takto upraveného pigmentu lze připravit výsledný produkt o větší transparentci (menší kryvosti) [4,6].

Stupeň kalafunace pigmentu je velmi důležitý u pigmentů určených pro inkousty na vodní bázi. Kalafuna významně ovlivňuje reologické vlastnosti nátěrové hmoty, při vysokém přídavku kalafuny může mít tendenci k houstnutí a zatuhnutí – zcela nevhodné zejména pro flexotisk a sítotisk [4,6].

Navzdory důležitosti kalafunování pigmentu specifické interakce mezi kalafunou a pigmentem zatím nebyly vysvětleny. Mezi možné interakce patří van der Waalsovy interakce

(interakce funkčních skupin, vodíkové vazby, dipól-dipól interakce). Riddel a kol. tyto interakce zkoumal na diarylidovém pigmentu P.Y. 13 pomocí nukleární magnetické rezonance (^{13}C CP/MAS NMR) a rentgenové difrakční analýzy (XRD). K dispergaci použil dvě dispergační činidla: kyselinu abietovou a částečně hydrogenovanou kalafunu Staybelite. Výsledky experimentu potvrzují, že kalafuna pokrývající pigment je amorfni látka, má nepravidelnou strukturu. Kalafunovaný pigment má lepší uspořádání krystalů (obrázek 16 vlevo), mechanismus působení je však nejasný. Možné je čistě fyzikální působení kalafuny, kdy vrstva kalafuny působí tlakem na krystaly pigmentu a tak zlepši krystalovou strukturu [38].



Obrázek 16 Porovnání kalafunovaného pigmentu (vlevo) a pigmentu vyrobeného bez přídavku kalafuny (vpravo), upraveno podle [39]

1.4.10 Metody pro kvalitativní stanovení kalafuny

Liebermann-Storch test

Liebermann-Storch reakce rovněž známá jako Storch-Morawski reakce slouží ke kvalitativnímu stanovení kalafuny ve vzorku. Patří ke klasickým testům pro stanovení kalafuny a jejich derivátů (volné kyseliny abietové, jejich solí a esterů), podrobný postup lze nalézt ve standardu ASTM D1542. Vzorek reaguje s acetanhydridem za varu, po ochlazení se vzorek okyselí kyselinou sírovou a vzniká specifické fialové zbarvení, které trvá pouze pár sekund a poté se mění do hněda [40,41].

Fosilní pryskyřice s názvem Kauri, která se těží na Novém Zélandu a tvoří jednu z nejpoužívanějších pryskyřic při výrobě nátěrových laků, dává totožné zbarvení při Liebermann-Storch testu jako kalafuna. Podobné zbarvení dávají další fosilní pryskyřice

(např. Amber, Manila, Pontianak, Borneo), které reagují na tmavě červenou barvu s přechodem do hnědé či přímo na hnědou barvu. To je důvodem, proč při analýzách dochází k falešné pozitivě u vzorků, které jsou výrobcem deklarovány jako prosté kalafuny [40,41].

Modifikovaný Liebermann-Storch test (Michel)

Vzorek se rozpustí v chloroformu, přidá se kyselina sírová a řádně se promíchá. Po oddělení organické fáze se po kapkách přidá acetanhydrid. V přítomnosti byť stopových množství kalafuny se organická vrstva zbarví do fialova [41].

Halphen-Hick test

Pro tento test je potřeba připravit dvě reagenty:

1. Fenolová – jeden objemový díl fenolu je rozpuštěn ve dvou dílech tetrachlormethanu;
2. Bromová – jeden objemový díl bromu je rozpuštěn ve čtyřech dílech tetrachlormethanu.

Malé množství vzorku je rozpuštěno v 1–2 ml reagenty 1. Jamka kapkovací destičky se naplní roztokem vzorku tak, aby část tekutiny přetekla do ostatních jamek. Do přilehlé jamky se okamžitě přidá 1 ml reagenty 2, páry bromu se rozšíří nad jamku se vzorkem (je výhodné destičku přikrýt hodinovým sklem). Vzniká krátce trvajících fialové zbarvení [41].

Marini test

Ve zkumavce se pomalu zahřeje 0,2–1,0 g vzorku pryskyřice s 2–3 g oxidu vápenatého. V pozitivním případě vzniklé páry zbarví kyselinu dusičnou do červeně-fialové barvy [41].

Cohen Test

Smíchá se jeden objemový díl kyseliny chlorsulfonové s pěti díly chloroformu. 1 ml tohoto roztoku se přidá k 1% roztoku pryskyřice v chloroformu. Kalafuna je indikována fialově červeným zbarvením. Dřevná kalafuna dává růžově červené zbarvení. Tungový olej a olej z lněného semínka zde neinterferují [41].

Donath Test

Tento test se používá pro kvantitativní stanovení kalafuny ve včelím vosku, ceresinu apod. (tyto látky nezbarvují kyselinu dusičnou). Ke vzorku je přidán pětinašobný objemový díl kyseliny, následuje var po dobu jedné minuty. Přidá se stejné množství vody a přebytek amoniaku. Červené zbarvení značí přítomnost kalafuny. Tato metoda se považuje za orientační [41].

Test s octanem měďnatým

Test je založen na reakci anhydridu kyseliny abietové, který je přítomný v kalafuně, s octanem měďnatým. Vzniká měďnatá sůl kyseliny abietové rozpustná v benzínu, kde tvoří smaragdově zelený roztok [42].

1.4.11 Metody pro kvantitativní stanovení kalafuny

Acidobazická titrace

Acidobazická titrace umožňuje stanovení volné kalafuny (tzn. stanovení všech pryskyřičných kyselin s přepočtem na kyselinu abietovou), celkové kalafuny a dopočet kalafuny ve formě solí kyselin (kalafunátu) [43].

Plynová chromatografie

Plynová chromatografie byla první a v současnosti je nejpoužívanější technikou ke stanovení kalafuny, a to po derivatizaci pryskyřičných kyselin na methylestery. Nevýhodou této metody je zejména nestabilita derivatizovaných produktů, jejich toxicita, případně výbušnost [18,22].

Kapalinová chromatografie

Separace pomocí HPLC probíhá při laboratorní teplotě, tím se lze vyhnout isomeraci pryskyřičných kyselin. Dále není potřeba žádná derivatizace. Separace pomocí HPLC má však i své nevýhody. Všechny pryskyřičné kyseliny mají podobnou hydrofobicitu a mají nedostatek chromoforů v molekule [20].

1.5 Kapalinová chromatografie

1.5.1 Historický vývoj kapalinové chromatografie

Svůj název získala chromatografie na přelomu 19. a 20. století, kdy ruský botanik Michail Semjonovič Cvět separoval rostlinné pigmenty, chlorofyly a xanthofyly, průchodem jejich roztoku přes uhličitan vápenatý. Jednotlivé složky se na jednoduché koloně ukázaly jako oddělené barevné proužky, a proto si metoda vysloužila název chromatografie, z řec. *chroma* = barva [46,47].

Více než 60 let se v chromatografii používaly částice s rozměrem 50–100 μm , a eluent procházel kolonou pouze gravitačně. Tímto způsobem proces probíhal i několik hodin, a proto technika nešla využít pro analytické účely. Chromatografie od té doby prošla mnoha změnami. Jedna z nejdůležitějších proběhla na základě upozornění britského chemika Martina z roku 1939, že pro vyšší účinnost separace jsou potřeba menší částice a kolony vyrobené tak, aby snesly působení vyššího tlaku. Až v 70. letech dodavatelé nabídli částice ze silikagelu

o průměru 5 a 10 μm , a s tím je spojený vznik vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) [46,47].

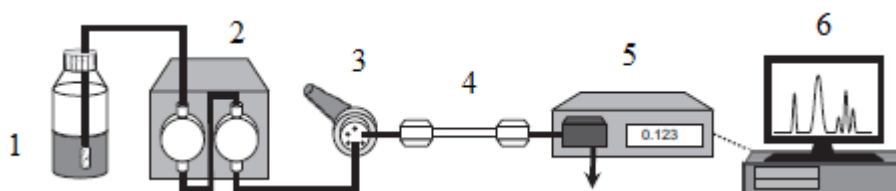
1.5.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Moderní separace v kapalinové chromatografii je založena na distribuci složky mezi dvě fáze. První z nich se nazývá stacionární fáze uložená v koloně (sorbent), druhá je fáze mobilní, která se pohybuje celým systémem a je v kontaktu se stacionární fází. Vzorek je během průchodu kolonou distribuován mezi obě fáze. Složky, které jsou silně zadržované, se stacionární fází pohybují pomalu. Naproti tomu složky zadržující se málo putují téměř stejně rychle jako mobilní fáze. Výsledkem rozdílů v retenci se vzorek rozdělí na jednotlivé složky (zóny), které lze dále kvalitativně či kvantitativně analyzovat [46,47].

HPLC je v současnosti široce rozšířená technika využívaná v potravinářství, medicíně, farmaceutice, analýze životního prostředí a mnoha dalších odvětvích. Lze analyzovat látky od molekulové hmotnosti 50 g/mol až do několika milionů (ve formě molekul, makromolekul, iontů, dokonce i viry). Umožňuje separaci směsi molekul, včetně izomerů: strukturních, geometrických, optických atp. [46,47].

Schéma HPLC

Na následujícím obrázku (obrázek 17) je znázorněno základní schéma kapalinového chromatografu:



Obrázek 17 Obecné schéma kapalinového chromatografu

1 – zásobník mobilní fáze, 2 – čerpadlo, 3 – dávkovač, 4 – kolona, 5 – detektor,
6 – vyhodnocovací zařízení, upraveno podle [48]

Mobilní fáze je skladována v nádobě, jejíž materiál musí být kompatibilní s použitým rozpouštědlem, pro chromatografii s normálními či obrácenými fázemi se používá sklo. Součástí přívodní trubice k čerpadlu bývá filtrační zařízení ve formě kovové frity [48].

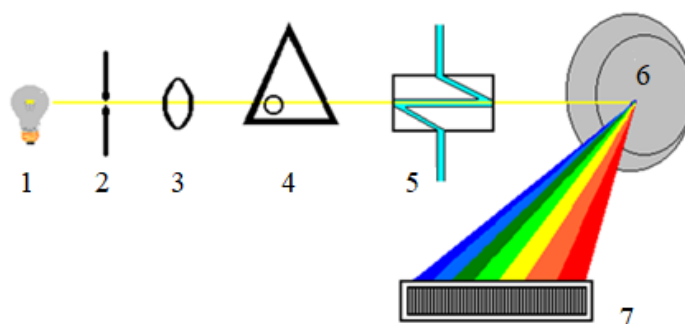
Hlavním úkolem čerpadla v HPLC je dodat konstantní a bezpulzní tok mobilní fáze do kolony. Zatímco konvenční HPLC pracuje při tlaku do 400 bar, při použití částic s průměrem menším než 2 μm se tlak pohybuje mezi 1000 a 1400 bar. Při nutnosti rozdělit směs látek, jejichž složky se výrazně liší v retenci, se využívá gradientová eluce. Při této technice dochází ke smíšení různě polárních mobilní fází, jejichž poměr se mění s časem a zvyšuje se tak eluční síla mobilní

fáze. Většinou se používá eluce s dvousložkovými (binárními) gradienty, čehož lze dosáhnout dvěma způsoby. První uspořádání je nízkotlaké a spočívá ve smísení mobilních fází ve směšovací komůrce pomocí solenoidových ventilů nebo čerpání z dvou až tří pomocných podávacích čerpadel. Výsledná směs je poté dále čerpána vysokotlakým čerpadlem. Druhé uspořádání je vysokotlaké, při kterém je každá složka mobilní fáze dávkována vlastním vysokotlakým čerpadlem do směšovací komůrky před kolonou (tedy ve vysokotlaké části přístroje). Časovou změnu koncentrace účinné eluční složky v mobilní fázi označujeme jako profil gradientu [48,49].

Dávkování může probíhat manuálně, nicméně většina současných přístrojů je vybavena autosamplerem, který sám dávkuje vzorky z ampulek umístěných v zásobníku či mikrotitrační destičce. K zavádění vzorku do toku mobilní fáze slouží dávkovací ventil, který umožňuje nadávkovat vzorek bez přerušování toku mobilní fáze. Nejčastěji se k tomu využívá tzv. šesticečný dávkovací ventil [46].

Chromatografická kolona je trubice či kapilára naplněná stacionární fází. Plášť kolony musí odolávat vysokým tlakům, jeho vnitřní povrch musí být dostatečně hladký a samozřejmě zcela chemicky inertní. Jako materiál se používá nerezová ocel, plast nebo tavený křemen. Plášť je na koncích uzavřen porézní kovovou fritou, která současně umožňuje průtok mobilní fáze a zabraňuje uvolňování fáze stacionární [50].

V současnosti se používají různé detektory, které je možné rozdělit do dvou skupin: selektivní (signál je úměrný pouze koncentraci analytu) a univerzální (signál je úměrný celkové vlastnosti eluátu jako celku, tzn. mobilní fázi a detekované komponenty). Nejčastěji používané detektory jsou detektor UV/Vis, fluorescenční, elektrochemický, vodivostní, chemiluminiscenční nebo detektor diodového pole (DAD, diode array detector, obrázek 18), který snímá celé spektrum v reálném čase bez přerušování chromatografické separace [50].



Obrázek 18 **Detektor diodového pole**, upraveno podle [50]

Princip DAD je následující: Záření ze zdroje (1) prochází štěrbinou (2), čočkou (3), clonou (4) a měrnou celou detektoru (5), poté se spektrálně rozkládá holografickou mřížkou (6) a

na každou z fotodiod (7) dopadá zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí v cele detektoru. Každá z fotodiod je napojena na kondenzátor, který je nabitý na určitou hodnotu. Dopadem záření na diodu vzniká fotoelektrický proud, který vybije kondenzátor. V další fázi se kondenzátory nabíjí a měří se proud, kterým se kondenzátor dobije na původní hodnotu. Sekvence vybíjení a nabíjení se opakuje (řádově v ms) a zaznamenávají se údaje o absorbanci při každé vlnové délce. Spektrální rozlišení je dáno počtem diod na poli (obvykle 512–1024). Tyto detektory umožňují srovnání snímaných spekter s knihovnou nebo vypočítat čistotu píku. Vedle těchto detektorů se stále více používá hmotnostní spektrometr jako detekční systém. Výhodou tohoto spojení je možnost identifikace látek po jejich separaci na základě jejich hmotnostních spekter [50].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístroje a zařízení

- kapalinový chromatograf Agilent 1260 Infinity (Waldborn, Německo)

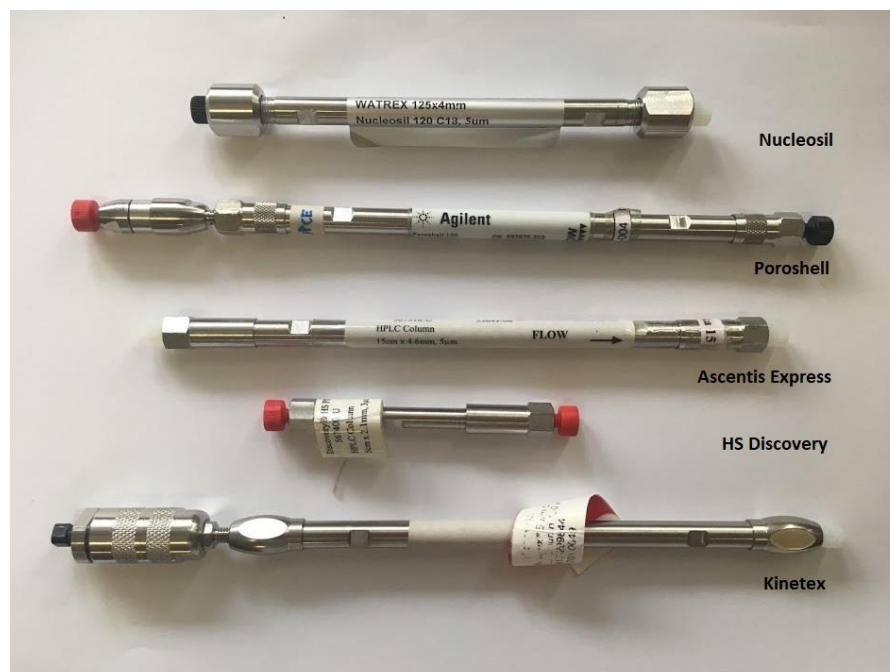
Kapalinový chromatograf Agilent 1260 Infinity (obrázek 19) má nastavitelný průtok 0,1–10 ml/min, maximální tlak je 400 bar, autosampler s dávkovaným objemem 0,1–100 μ l, kolonový termostat (10–80 °C), detektor diodového pole (rozsah vlnových délek 190–950 nm, 1024 diod, rozlišení 0,74 nm, záznam analýzy až při 8 vlnových délkách současně).



Obrázek 19 **Kapalinový chromatograf Agilent 1260**

- kolona Nucleosil 120 C18, 125 x 4 mm; 5 μ m (Watrex, ČR)
- kolona Poroshell 120 C18, 150 x 3 mm; 2,7 μ m (Agilent, USA)
- kolona Discovery HS PEG, 50 x 2,1 mm; 3 μ m (Supelco/Merck, ČR)
- kolona Ascentis Express F5, 150 x 3,0 mm; 2,7 μ m (Supelco/Merck, ČR)
- kolona Kinetex C18, 150 x 6 mm; 5 μ m (Phenomenex, USA)

Fotografie kolon využitých pro experimentální práci je na následující straně (obrázek 20).



Obrázek 20 Kolony použité při experimentální práci

- hmotnostní spektrometr AB Sciex 4500 (Framingham, USA)
Tandemový kvadrupólový hmotnostní spektrometr, 2. hmotnostní analyzátor může fungovat jako iontová past.
- spektrofotometr Helios Beta (Unicam, UK), kyvety
Jednopaprskový přístroj k měření absorbance vzorku v rozsahu vlnových délek 190–1100 nm. Je vybavený sedmimístným karuselem, který umožňuje paralelní měření až 7 kyvet.
- titrátor DL 70 (Mettler Toledo, USA)
- odstředivka EBA 200 (Hettich Zentrifugen, Německo)
- ultrazvuková lázeň RK 103 H (Bandelin, Německo)
- analytické váhy AE 200 (Mettler Toledo, USA)
- pH metr (WTW, ČR)
- centrifugační nádobky 15 ml (VWR Chemicals, ČR)
- injekční stříkačky Norm-Ject 3 ml (VWR Chemicals, ČR), membránové filtry PTFE 0,2 μm (Sigma-Aldrich, USA)
- vialky 2 ml (Agilent Technologies, USA)

2.2 Chemikálie

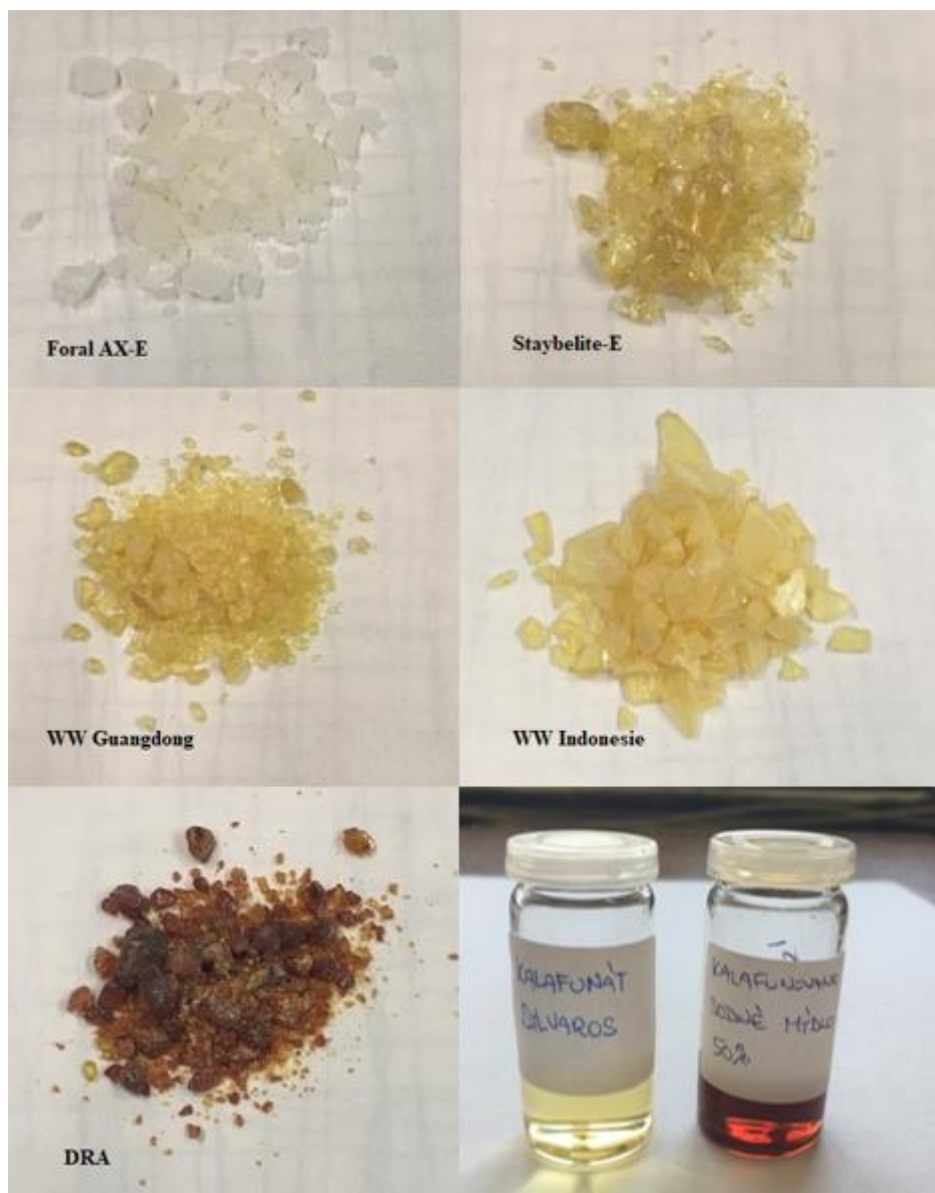
- kyselina abietová (Fluorochem, UK)
- kyselina neoabietová (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- methanol (Honeywell Chemicals, USA)
- dimethylsulfoxid (Macron Fine Chemicals, USA)
- acetonitril (Sigma – Aldrich, ČR)
- tetrahydrofuran (Macron Fine Chemicals, USA)
- kyselina mravenčí (Lach – Ner, ČR)
- octan amonný (Sigma – Aldrich, ČR)

2.3 Analyzované vzorky

2.3.1 Kalafuna

Společnost Synthesia poskytla pro potřeby diplomové práce šest vzorků balzámové kalafuny a dva vzorky kalafunovaného mýdla (obrázek 21):

- kalafuna WW (Guangdong, Čína)
- kalafuna WW (Sunny, Čína)
- kalafuna WW (Brenntag, ČR)
- kalafuna DRA (Polimeri Europa Portugal, S.A., Portugalsko)
- kalafuna Staybelite-E (Eastman, USA)
- kalafuna Foral AX-E (Eastman, USA)
- 50% sodné mýdlo (Porta, ČR)
- kalafunát Sylvaros (Arizona Chemical, USA)



Obrázek 21 Vzorky kalafun, vlastní zpracování

2.3.2 Pigmenty

Pro potřeby diplomové práce poskytla společnost Synthesia dva vzorky žlutého a pět vzorků červeného pigmentu. Vzorky od každého pigmentu jsou označeny písmeny, liší se množstvím i druhem aplikované kalafuny. Vzorky pocházejí z procesu výroby, nejsou určeny pro komerční účely.

Žlutý pigment

Po ukončení syntézy žlutého pigmentu (obrázek 22) se aplikuje sodná sůl kalafuny a směs se homogenizuje. Poté se odfiltruje pevný pigment na kalolisu a suší se na pásové sušárně.



Obrázek 22 **Pigment Yellow**, vlastní zpracování

Každý ze vzorků žlutého pigmentu byl odebrán ve třech fázích výroby:

- vodná suspenze pigmentu s kalafunou (odsušená na misce na vzduchu)
- pevná pasta po odfiltrování tekuté části a zbavení nečistot promytím technologickou vodou a demineralizovanou vodou (usušená v laboratorní sušárně)
- vzorky filtrátů a promývacích vod (šest vzorků od každého pigmentu)
- pevná pasta (po provozním odsušení).

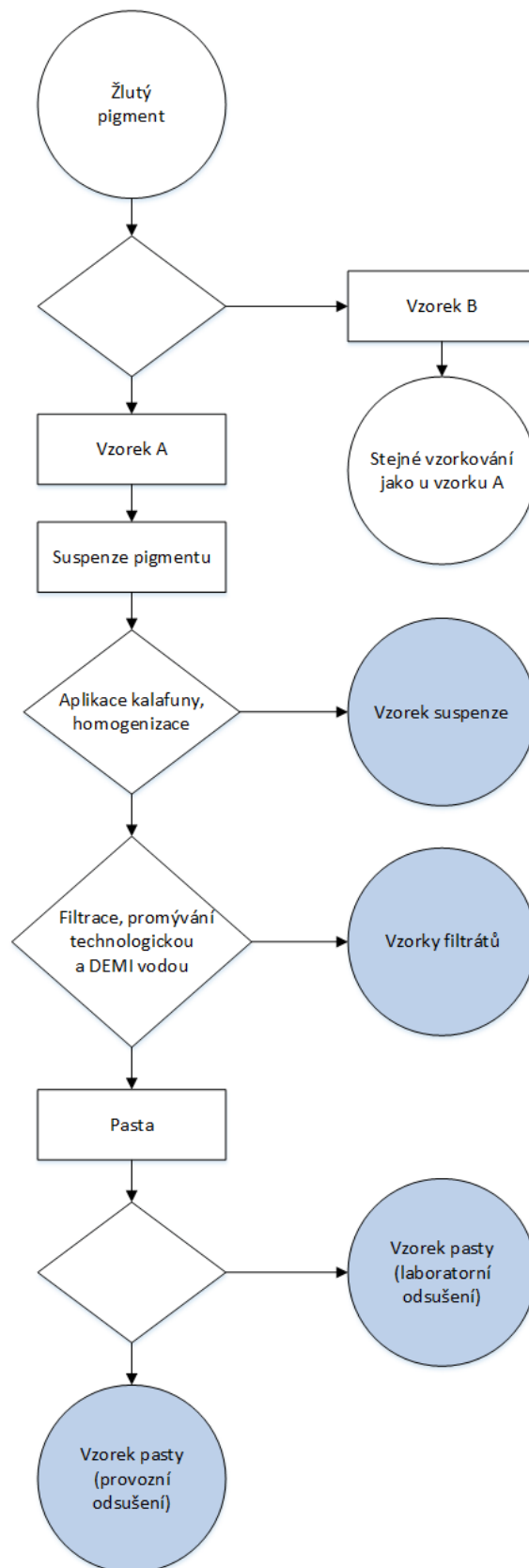
Vzorkování žlutého pigmentu je také znázorněno na diagramu (obrázek 24) na následující straně.

Červený pigment

Pro diplomovou práci bylo poskytnuto 5 vzorků červeného pigmentu (obrázek 23), u všech vzorků se jednalo o provozně osušenou pastu. Vzorky A, B obsahují stejnou dávku 50% sodného mýdla. Vzorky červeného pigmentu C, D, E jsou dispergovány pomocí hydrogenované kalafuny Foral AX-E o různých dávkách.



Obrázek 23 **Pigment Red**, vlastní zpracování



Obrázek 24 Diagram znázorňující vzorkování pigmentu žlutého pigmentu, vlastní zpracování

2.4 Pracovní postupy

2.4.1 Rozpustnost kalafuny v organických rozpouštědlech

Ke 100 mg vzorku kalafuny bylo přidáno 0,1; 1; 2; 15 a 50 ml rozpouštědla (vody, methanolu, dimethylsulfoxidu, acetonitrilu nebo tetrahydrofuranu, tabulka 2). Směs byla třepána po dobu 1 minuty při laboratorní teplotě. V případě, že se látka za těchto podmínek rozpustila, zkoušela se rozpustnost v 50 ml rozpouštědla v ultrazvuku po dobu 15 minut.

Tabulka 2 Určení rozpustnosti látky, upraveno podle [51]

Množství rozpouštědla potřebné pro úplné rozpuštění látky	< 0,1 ml	1 ml	2 ml	15 ml	50 ml	> 50 ml
Rozpustnost látky	Velmi snadno rozpustná	Snadno rozpustná	Dobře rozpustná	Špatně rozpustná		Velmi špatně rozpustná/prakticky nerozpustná

2.4.2 Příprava mobilní fáze

Voda okyselená kyselinou mravenčí

Do odměrné baňky o objemu 500 ml bylo odpipetováno pomocí automatické pipety 50 μ l kyseliny mravenčí a doplněno po rysku deionizovanou vodou. Obsah baňky byl promíchán a přelit do skleněné láhve určené pro kapalinový chromatograf. pH takto připraveného roztoku bylo 3,4.

Octan amonný

Na analytických vahách byl navážen 1 g octanu amonného. Navážka byla rozpuštěna v odměrné baňce o objemu 1 l. Roztok byl zfiltrován přes filtr (0,2 μ m) a přelit do skleněné lahve pro kapalinový chromatograf.

2.4.3 Příprava kalibrační řady

Kyselina neoabietová

Zásobní roztok byl připraven navážením 0,1010 g kyseliny neoabietové (98% čistota) na analytických vahách. Navážka byla převedena do 100 ml odměrné baňky a doplněna po rysku methanolem. Ze zásobního roztoku byl odpipetován určitý objem (přehled v tabulce příloze 3) do 10 ml baňky a doplněno po rysku methanolem. Byly dávkovány 2 μ l roztoku.

Kyselina abietová

Zásobní roztok byl připraven navážením 0,1033 g kyseliny abietové (95% čistota) na analytických vahách. Navážka byla převedena do 100 ml odměrné baňky a doplněna po rysku methanolem. Ze zásobního roztoku byl odpipetován určitý objem do 10 ml baňky (přehled v tabulce v příloze 4) a doplněno po rysku methanolem. Byly dávkovány 2 μ l roztoku.

2.4.4 Postup přípravy vzorků k HPLC analýze

Vzorek kalafuny

Pevné vzorky kalafuny byly nadrcené na jemný prášek pomocí misky s tloučkem. U vzorků kalafunovaných mýdel nebyla potřeba speciální úprava před analýzou. Pro přípravu standardu bylo naváženo 100 mg vzorku kalafuny do 100 ml odměrné baňky a doplněno po rysku methanolem. Následně byl vzorek přefiltrován přes PTFE filtr 0.2 μ m přímo do nádoby pro autosampler a analyzován.

Vzorek pigmentu

Do 15 ml centrifugační zkumavky bylo naváženo 250 mg vzorku pigmentu. Automatickou pipetou bylo přidáno 5 ml methanolu. Vzniklá suspenze byla důkladně protřepána a obsah centrifugační zkumavky odstředován po dobu 5 minut při 3000 ot./min. Vzniklý kapalný podíl byl následně přefiltrován přes PTFE filtr 0.2 μ m, extrakt 10x zředěn a analyzován.

Vzorky filtrátu

Z filtrátu bylo odpipetováno 2,5 ml do 10 ml baňky, doplněno po rysku methanolem a baňka byla řádně protřepána. Tento roztok byl přefiltrován přes PTFE filtr 0.2 μ m, extrakt 4x zředěn a analyzován.

2.4.5 Acidobazická titrace

Bylo naváženo 1,0–1,5 g vzorku pigmentu nebo 0,8 g vzorku kalafuny s přesností na 4 desetinná místa do 250 ml kádinky, přidáno 40 ml ethanolu a po dokonalém rozmíchání bylo přidáno 40 ml destilované vody.

Roztok v kádince byl ztitrován roztokem hydroxidu sodného o koncentraci 0,1 mol/l za potenciometrické indikace na kombinovanou skleněnou elektrodu. Z bodu ekvivalence se vypočetl obsah kalafuny ve formě kyseliny abietové (Rovnice 1).

Tentýž roztok (po první titraci) byl ztitrován zpět roztokem kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 0,1 mol/l. Titrační křivka obsahovala 2 skoky. Z rozdílu spotřeb v bodu

ekvivalence druhé vlny a první vlny titrace (nadbytečný hydroxid sodný) se vypočítal obsah celkové kalafuny (Rovnice 2). Množství kalafunátu bylo spočítáno z rozdílu celkové a volné kalafuny (Rovnice 3). Data získaná z titrace hydroxidem sodným lze využít pro výpočet experimentální hodnoty čísla kyselosti (Rovnice 4) a porovnání s hodnotou deklarovanou výrobcem (výsledky lze porovnat v tabulce 15).

Výpočet procent volné kalafuny

$$\text{Volná kalafuna [\%]} = \frac{a \cdot f_{\text{NaOH}} \cdot 3,02}{m} \quad \text{Rovnice 1}$$

a spotřeba odměrného roztoku 0,1 mol/l hydroxidu sodného [ml]

f_{NaOH} faktor odměrného roztoku hydroxidu sodného

m navážka vzorku [g]

Výpočet procent celkové kalafuny

$$\text{Celková kalafuna [\%]} = \frac{b \cdot f_{\text{HCl}} \cdot 3,02}{m} \quad \text{Rovnice 2}$$

b rozdíl spotřeb odměrného roztoku 0,1 mol/l kyseliny chlorovodíkové [ml]
z bodu ekvivalence druhé a první vlny titrace

f_{HCl} faktor odměrného roztoku HCl

m navážka vzorku [g]

Výpočet procent solí kyselin

$$\text{Kalafuna ve formě soli [\%]} = \% \text{ kalafuny celkové} - \% \text{ kalafuny volné [43]} \quad \text{Rovnice 3}$$

Výpočet čísla kyselosti

$$\text{Číslo kyselosti [mg KOH/1 g kalafuny]} = \frac{V_{\text{NaOH}} \cdot M_r(\text{KOH}) \cdot f \cdot c \cdot f_{\text{NaOH}}}{m} \quad \text{Rovnice 4}$$

V_{NaOH} objem NaOH potřebného k dosažení bodu ekvivalence [ml]

M_r molekulová hmotnost

f přepočítání molekulové hmotnosti KOH/NaOH ($f = 1,40$)

c koncentrace roztoku hydroxidu sodného [mol/l]

f_{NaOH} faktor roztoku hydroxidu sodného

m navážka kalafuny [g]

2.5 Podmínky jednotlivých analýz

2.5.1 UV spektrometrie

Podmínky analýzy:

- jednopaprskový UV spektrometr Helios Beta
- rozsah vlnových délek: 190–320 nm
- tloušťka kvvety: 1 cm

2.5.2 IČ spektrometrie

Podmínky analýzy:

- jednodrazový ATR nástavec MIRacle (Pike), pozadí: čistý ATR krystal
- spektrometr Nicolet 6700 FTIR
- rozsah vlnočtů: 640–4000 cm^{-1} (rozlišení 4 cm^{-1} , 64 skenů).

2.5.3 NMR

Podmínky analýzy:

- přístroj Bruker AVANCE III HD 400
- 400,13 resp. 100,62 MHz, při laboratorní teplotě
- vzorky byly rozpuštěny v deuteriochloroformu (CDCl_3)
- ^1H a ^{13}C chemické posuny byly vztaženy vůči centrálnímu signálu rozpouštědla nebo TMS ($\delta = 7,27$ resp. 77,0 nebo 0.00).

2.5.4 HPLC/MS

- hmotnostní spektrometr AB Sciex 4500 (Framingham, USA) s trojitým kvadrupólem/lineární iontovou pastí

HPLC podmínky:

- kolona Ascentis Express F5, 150 x 3 mm; 2,7 μm
- gradient 40-90 % MeOH za 5 minut, dále isokraticky 90 % do 10 min
- průtok 0,5 ml/min.

MS podmínky:

- curtain gas: 20 psi
- ion source gas 1: 40 psi
- ion source gas 2: 50 psi
- teplota 400 °C
- ion spray voltage: -4500 V
- vstupní potenciál: -10 V
- deklasterační potenciál -120 V.

2.5.5 HPLC/UV

Kolona Nucleosil 120

Podmínky analýzy:

- kolona: Nucleosil C18, 4 x 125 mm; 5 μm (Watrex, ČR)
- průtok: 1 ml/min
- detekce UV: 220, 241, 254, 272 nm
- teplota: 30 °C
- mobilní fáze: isokratická eluce methanol-5% kyselina octová-voda 85:5:10.

Kolona Poroshell 120

Podmínky analýzy:

- kolona: Poroshell 120 C18, 3 x 150 mm; 2,7 μm (Agilent, USA)
- průtok: 1 ml/min

- detekce UV: 220, 241, 252, 266, 300 nm
- teplota: 35 °C
- mobilní fáze: gradientová eluce acetonitril–octan amonný
- časový průběh gradientové eluce:

Čas [min]	Acetonitril [%]	Octan amonný [%]
0	40	60
6	90	10
6,1	90	10
12	90	10
12,1	40	60
15	40	60

Kolona Discovery HS

Podmínky analýzy:

- kolona: Discovery HS PEG 50 x 2,1 mm; 3 µm (Supelco/Merck, ČR)
- průtok: 1 ml/min
- detekce UV: 220, 241, 252, 266, 272 nm
- teplota: 30 °C
- mobilní fáze: isokratická eluce acetonitril-voda 70:30.

Kolona Kinetex C18

Podmínky analýzy:

- kolona: Kinetex C18, 150 x 6 mm; 5 µm (Phenomenex, USA)
- průtok: 1 ml/min
- detekce UV: 220, 240, 250, 270 nm
- teplota: 30 °C
- mobilní fáze: isokratická eluce acetonitril–0,01% HCOOH 70:30.

2.6 Software k vyhodnocení dat

Vyhodnocení chromatogramů proběhlo v programu OpenLab CDS (Agilent). Vzorce chemických sloučenin uvedené v teoretické části byly vytvořeny pomocí programu ACD/ChemSketch, který je k dispozici ve freeware verzi. Diagram vzorkování žlutého pigmentu (obrázek 24) je vytvořený v programu MS Visio, který je dostupný na terminálovém serveru Univerzity Pardubice.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Popis vzorků

3.1.1 Vzorky kalafun

Jednotlivé vzorky kalafun se od sebe velmi liší a to barvou, hrubostí nebo zápachem. Největější je vzorek hydrogenované kalafuny Foral AX-E, která je téměř bílé barvy, kalafuna Staybelite a kalafuny jakosti WW mají srovnatelnou světle žlutou barvu. Nejtmavší je kalafuna DRA, která je barvou na první pohled velice odlišná od ostatních. Kalafuna WW od dodavatele Brenntag se od ostatních liší hrubostí. Zatímco ostatní vzorky jsou ve formě různě velkých krystalků, tato kalafuna je uspořádána do destiček. Kalafuna Foral AX-E i Staybelite jsou téměř bez zápachu, ostatní vzorky jsou příjemně cítit po pryskyřici.

3.1.2 Vzorky pigmentů

Vzorky pigmentů jsou práškové, bez zápachu (obrázky 22, 23).

3.2 Určení složení vzorků kalafun

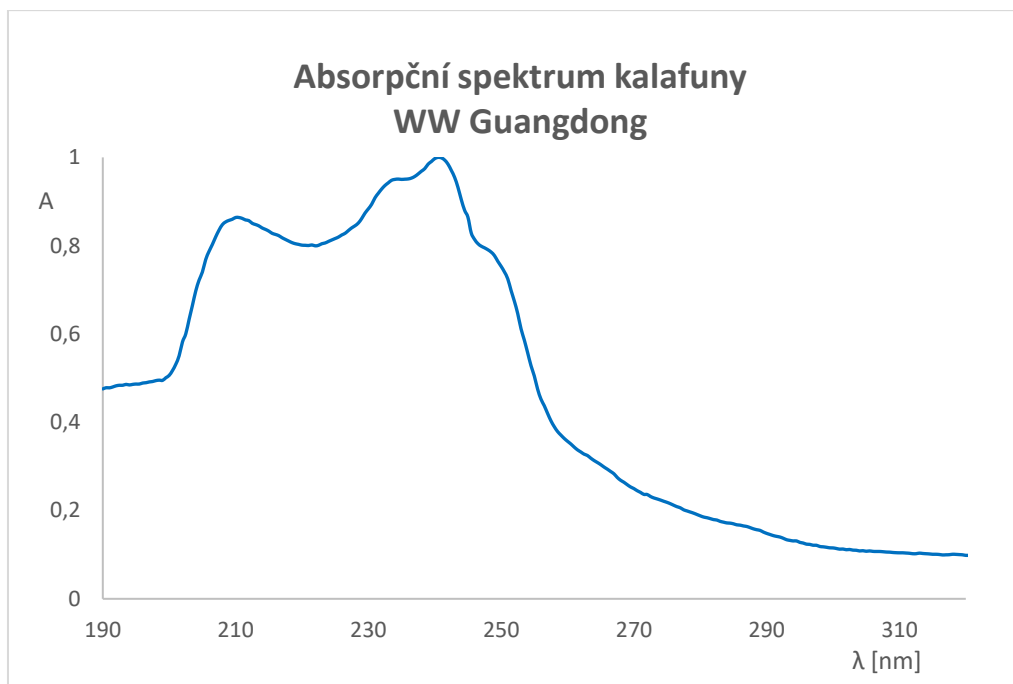
K identifikaci látek obsažených v kalafuně byla využita UV, IČ, NMR a MS spektra. Vybrané vzorky byly analyzovány také pomocí emisní spektrální analýzy (ESA).

3.2.1 UV spektra

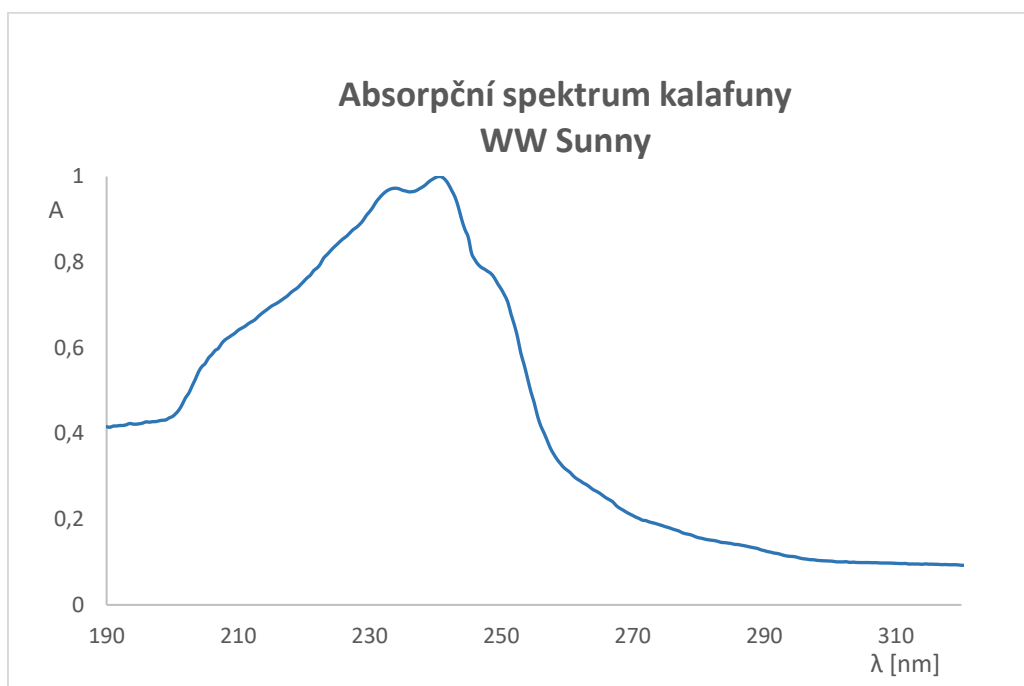
Vzorky kalafun byly rozpuštěny v methanolu a proměřeny v blízké oblasti UV záření v rozsahu vlnových délek 190–320 nm (obrázky 25–30). Výsledná data byla standardizována tak, aby nejvyšší bod spektra měl jednotkovou absorpenci a tvar výsledných absorpčních spekter vzorků kalafun mohl být navzájem porovnán.

U všech vzorků je zřetelný absorpční pás s maximem $\lambda_{\max} = 210$ nm (výjimkou je absorpční spektrum sodného mýdla kalafuny, které obsahuje pás s maximem při 200 nm), nejspíše odpovídajícího aromatickému systému. Z možných potenciálních struktur kyselin obsažených v kalafuně se může jednat o kyselinu dehydroabietovou nebo z ní odvozené oxidované sloučeniny, obsahující aromatické jádro a hydroxy- či oxo-skupinu (obrázek 7). U vzorků kalafuny jakosti WW od různých dodavatelů je vidět různá intenzita absorpce při 210 nm.

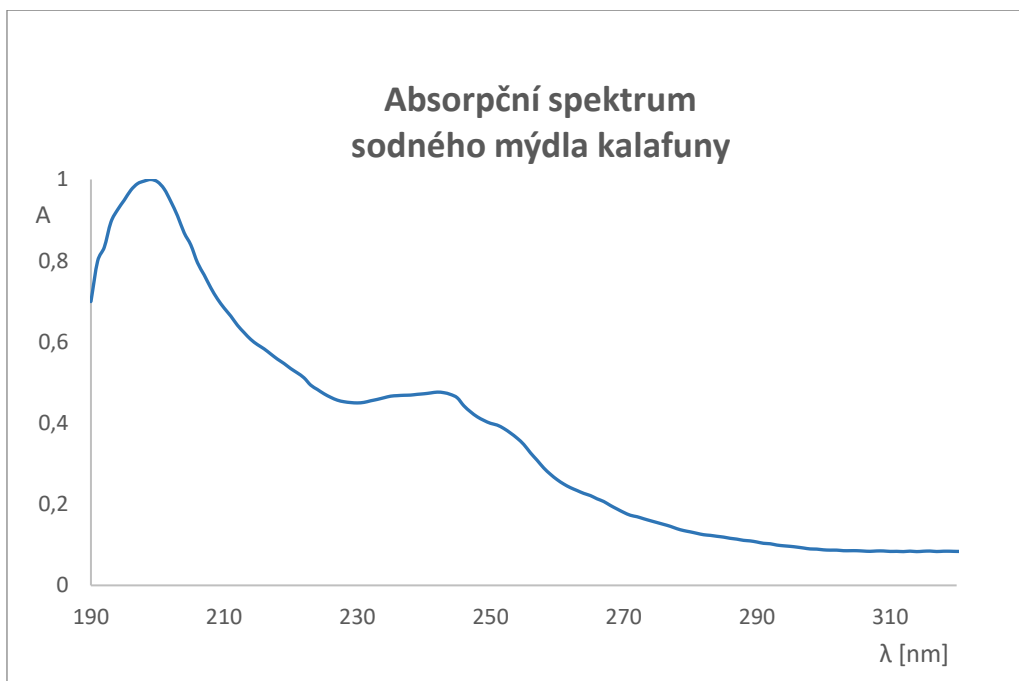
Dále všechny vzorky obsahují zřetelný pás s maximem $\lambda_{\max} = 240$ nm, které odpovídá kyselině abietové (viz obrázek 8).



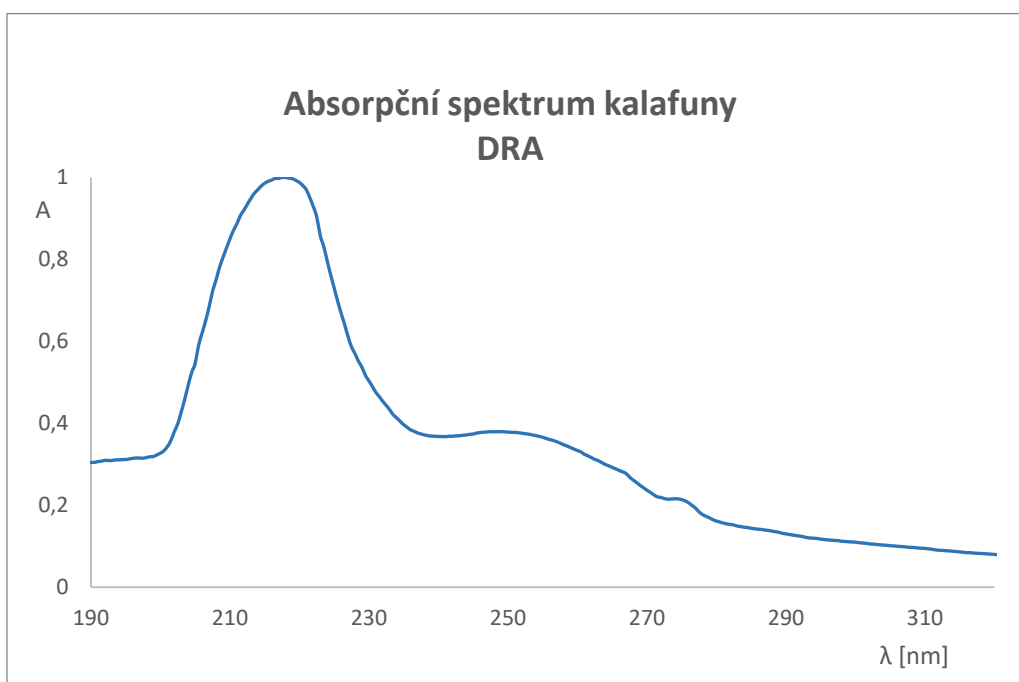
Obrázek 25 Absorpční spektrum kalafuny WW Guangdong



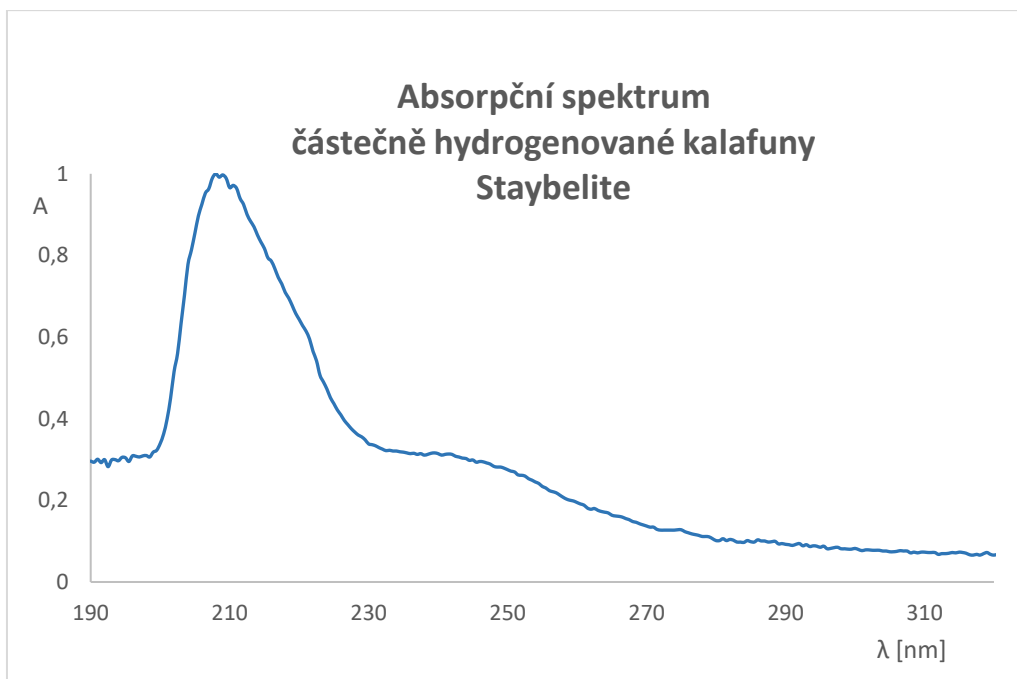
Obrázek 26 Absorpční spektrum kalafuny WW Sunny



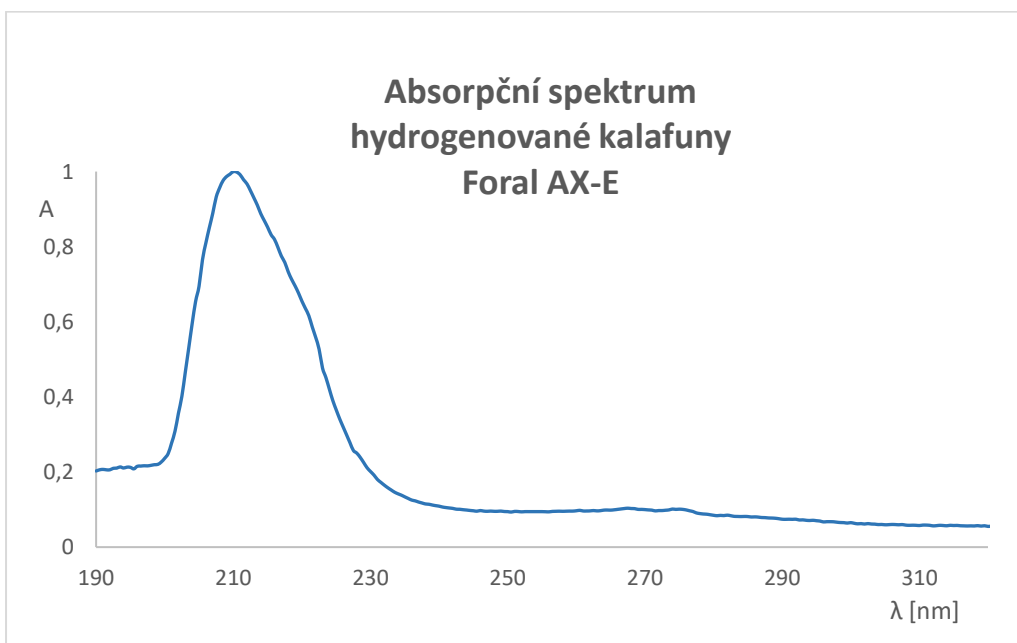
Obrázek 27 Absorpční spektrum 50% sodného mýdla kalafuny



Obrázek 28 Absorpční spektrum kalafuny DRA



Obrázek 29 Absorpční spektrum částečně hydrogenované kalafuny Staybelite



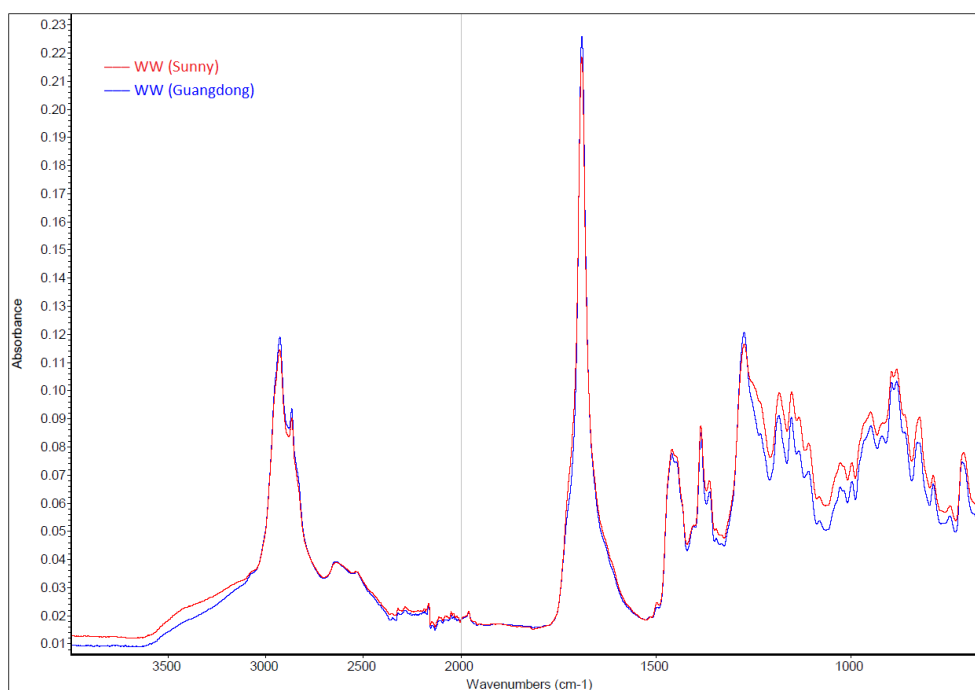
Obrázek 30 Absorpční spektrum úplně hydrogenované kalafuny Foral AX-E

3.2.2 IČ spektra

Při studiu složení vzorků kalafun pomocí IČ spektrometrie byly nejdůležitější následující pásy:

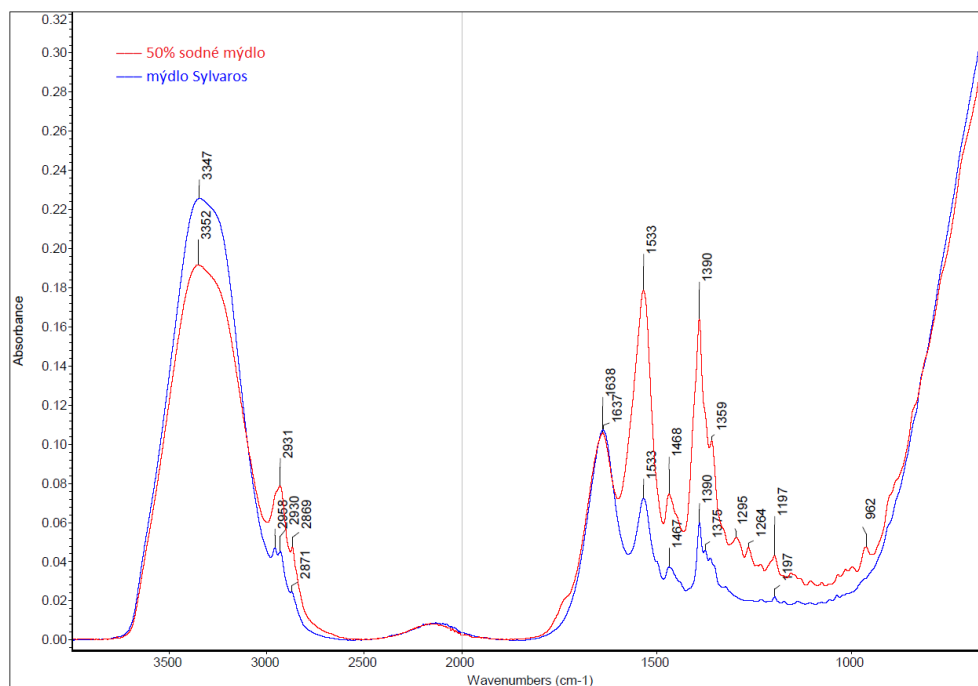
- pás náležící volné karboxylové skupině (-COOH): 1690 cm^{-1}
- pás -C-O- skupiny: 1273 cm^{-1}
- pásy náležící solím karboxylových kyselin: 1533 a 1390 cm^{-1}
- alifatický skelet: pásy 2928 , 2867 , 1459 cm a 1385 cm^{-1} .

Prvním úkolem bylo porovnat kalafuny jakosti WW od více dodavatelů (obrázek 31). Ukázalo se, že vzorky od dodavatele Guangdong a Sunny mají z hlediska výsledků infračervené spektrometrie prakticky stejné složení. Intenzita odpovídající volné karboxylové skupině i solím je u obou vzorků prakticky shodná.

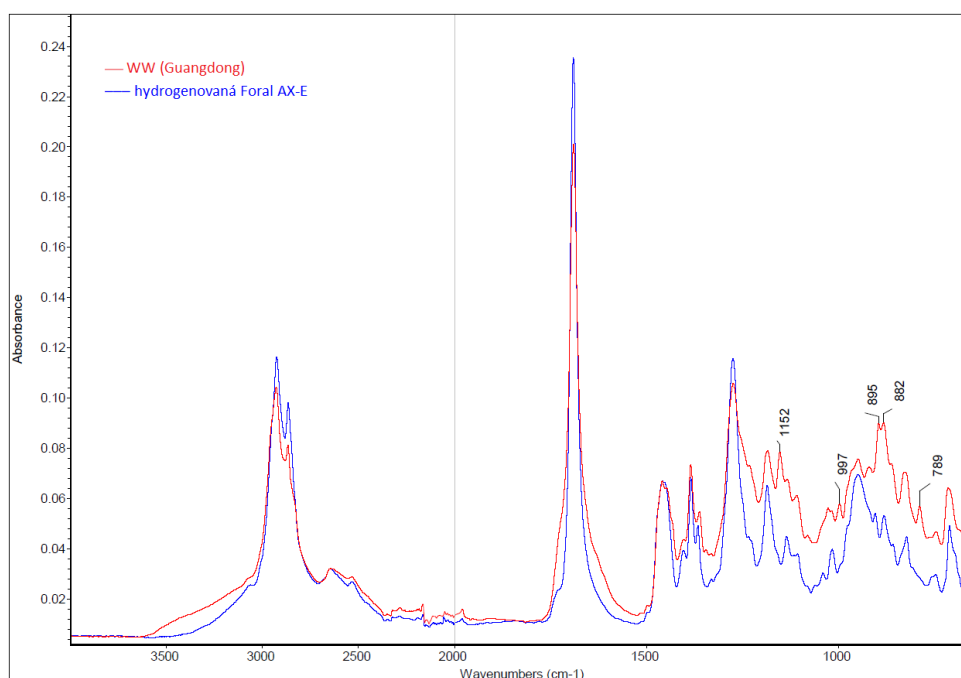


Obrázek 31 Porovnání ATR spekter kalafuny jakosti WW od více dodavatelů

K dispozici byly také dva vzorky kalafunátu: 50% sodné mýdlo a kalafunát Sylvaros. Z porovnání spekter (obrázek 32) lze pozorovat intenzivní nárůst příslušných pásů a dále lze vyvodit, že mýdlo Sylvaros obsahuje podstatně méně solí karboxylových kyselin oproti kalafunátu s 50% obsahem sodného mýdla.

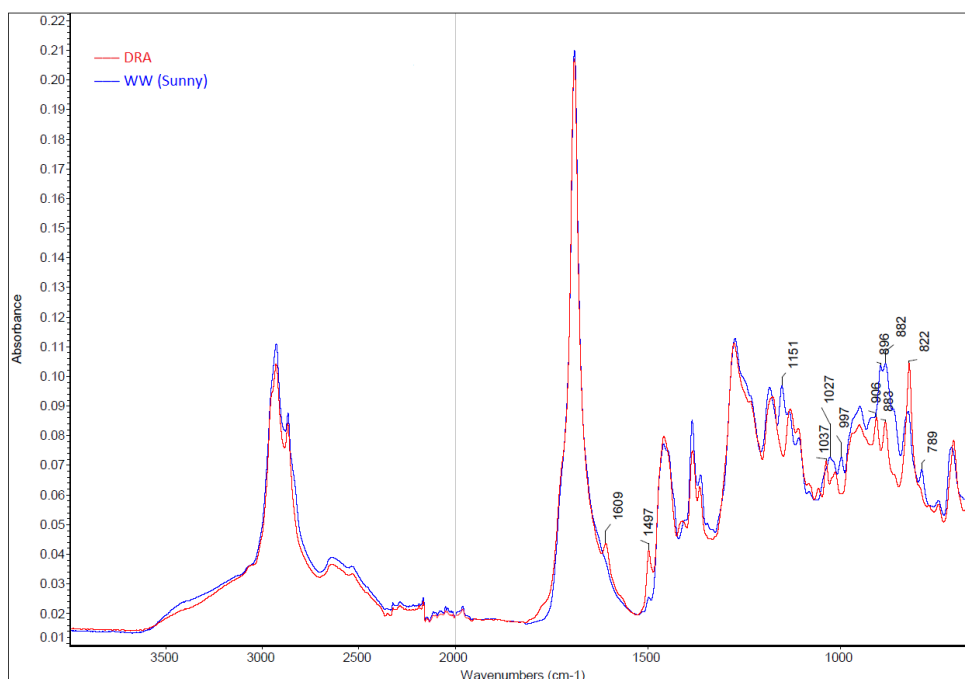


Obrázek 32 Porovnání ATR spekter 50% sodného mýdla a mýdla Sylvaros



Obrázek 33 Porovnání ATR spekter nehydrogenované a hydrogenované kalafuny

Při porovnání kalafuny s konjugovaným systémem dvojných vazeb (kalafuna WW) a hydrogenované kalafuny (Obrázek 33) se ukazuje, že kalafuna WW obsahuje navíc pásy o vlnočtech 895 a 882 cm^{-1} . Tyto pásy obsahují obě kalafuny WW, částečně hydrogenovaná kalafuna Staybelite obsahuje pouze pás 882 cm^{-1} .



Obrázek 34 Porovnání spekter disproportionované kalafuny DRA a WW (Sunny)

Při porovnání kalafuny DRA s kalafunou WW (obrázek 34) lze u kalafuny DRA pozorovat navíc přítomnost pásů 1609 a 1497 cm^{-1} . Tyto pásy nejspíše odpovídají aromatickému systému, který je u kalafuny DRA ve vyšší koncentraci.

3.2.3 Emisní spektrální analýza

Vzorky kalafuny WW (Guangdong), hydrogenované kalafuny Foral AX-E a 50% sodného mýdla byly analyzovány z hlediska obsahu kovů.

Podle výsledků analýz dodaných externím servisním pracovištěm obsahuje sodné mýdlo 48 064 mg/kg sodíku, dále obsahuje draslík, vápník a v malém množství také železo, fosfor, hliník a mangan. Vzorky kalafun obsahují stejné kovy, v poměrech jednotlivých kovů se však liší. V kalafuně WW se vyskytuje čtyřnásobné množství sodíku, trojnásobné množství vápníku a poloviční množství draslíku než v hydrogenované kalafuně. Z toho vyplývá, že hydrogenovaná kalafuna tedy obsahuje větší množství volných karboxylových kyselin.

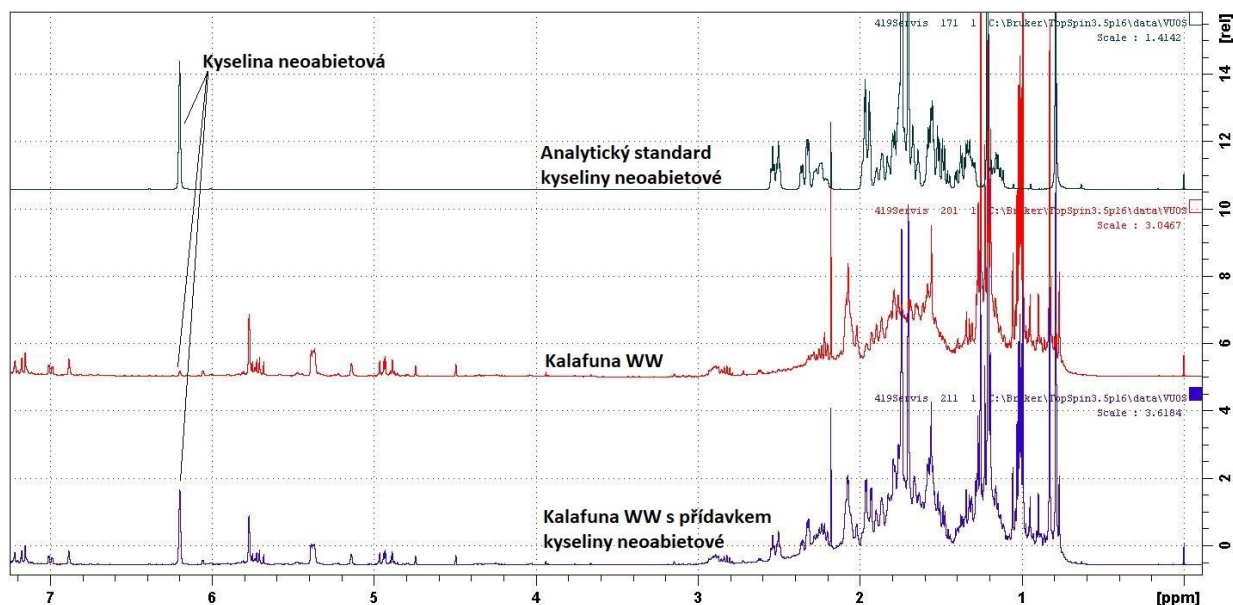
Všechny vzorky obsahují velký počet kovových iontů, z nichž většina je ale pod limitem kvantifikace, včetně toxických kovů (As, Cd, Pb, Hg). Přesné hodnoty jsou uvedeny v tabulce v příloze 1.

3.2.4 NMR spektra

Technika NMR není příliš často využívána k analýze pryskyřičných kyselin. Skakovsii je autorem jedné z mála prací zaměřených na toto téma. Ve své práci uvádí chemické posuny jednotlivých vodíků v ^1H -NMR spektrech příslušných kyselin [52].

a) ^1H -NMR spektra

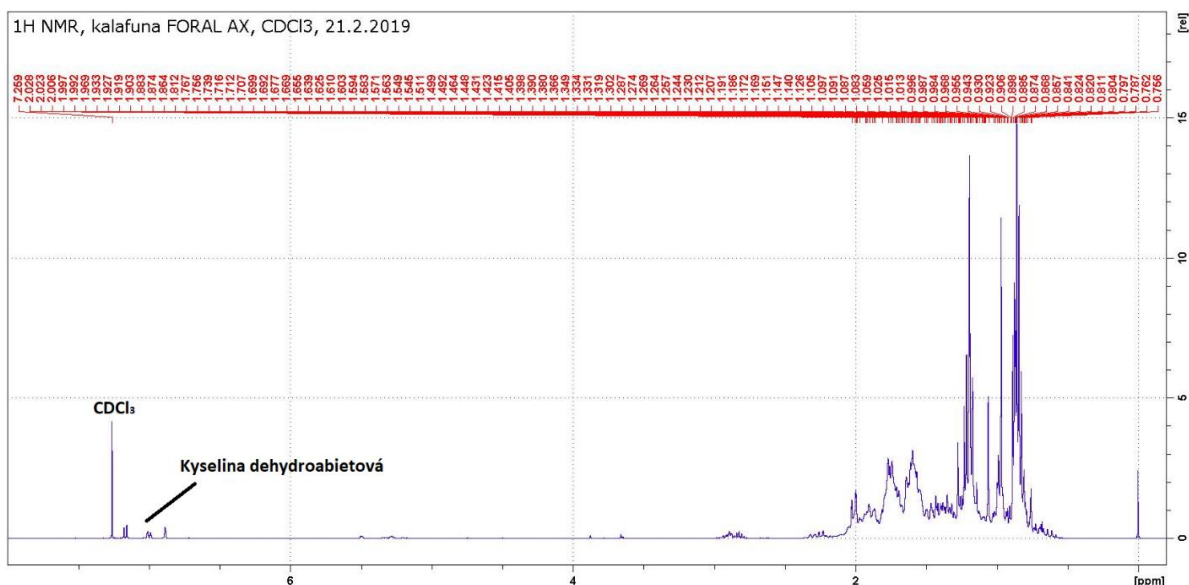
Ve spektru lze pozorovat posuny odpovídající vodíkům na dvojně vazbě (4–8 ppm) a dále vodíkům na jednoduché vazbě (0–3 ppm), jejichž signály se navzájem překrývají. Experimentálně bylo potvrzeno, že literární údaje lze použít k identifikaci kyselin v kalafuně. Byl proměřen analytický standard kyseliny neoabietové (obrázek 35 nahoře), vzorek samotné kalafuny WW (obrázek 35 uprostřed), dále kalafuny s přidavkem standardu kyseliny neoabietové. Při srovnání spekter byl pozorován přírůstek signálu (obrázek 35 dole) [52].



Obrázek 35 ^1H -NMR spektrum standardu kyseliny neoabietové (nahore), kalafuny WW (uprostřed) a kalafuny WW s přidavkem kyseliny neoabietové (dole)

V kalafuně WW (Guangdong) byla nalezena kyselina abietová ($\delta = 5,78$ a $5,38$ ppm), kyselina neoabietová ($\delta = 6,21$ ppm) a kyselina dehydroabietová ($\delta = 7,20$; $7,04$ a $6,92$ ppm) [52].

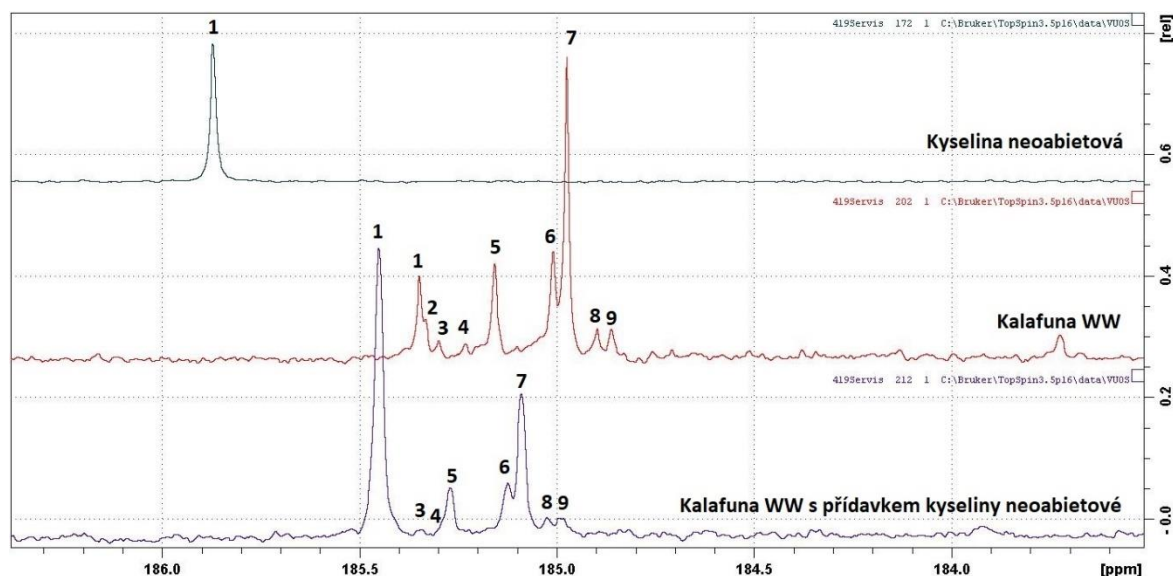
NMR spektrum hydrogenované kalafuny Foral AX-E obsahuje pouze signály vodíků z aromatického jádra, které přísluší kyselině dehydroabietové (obrázek 36).



Obrázek 36 ^1H -NMR spektrum kalafuny Foral AX-E

b) ^{13}C -NMR spektra

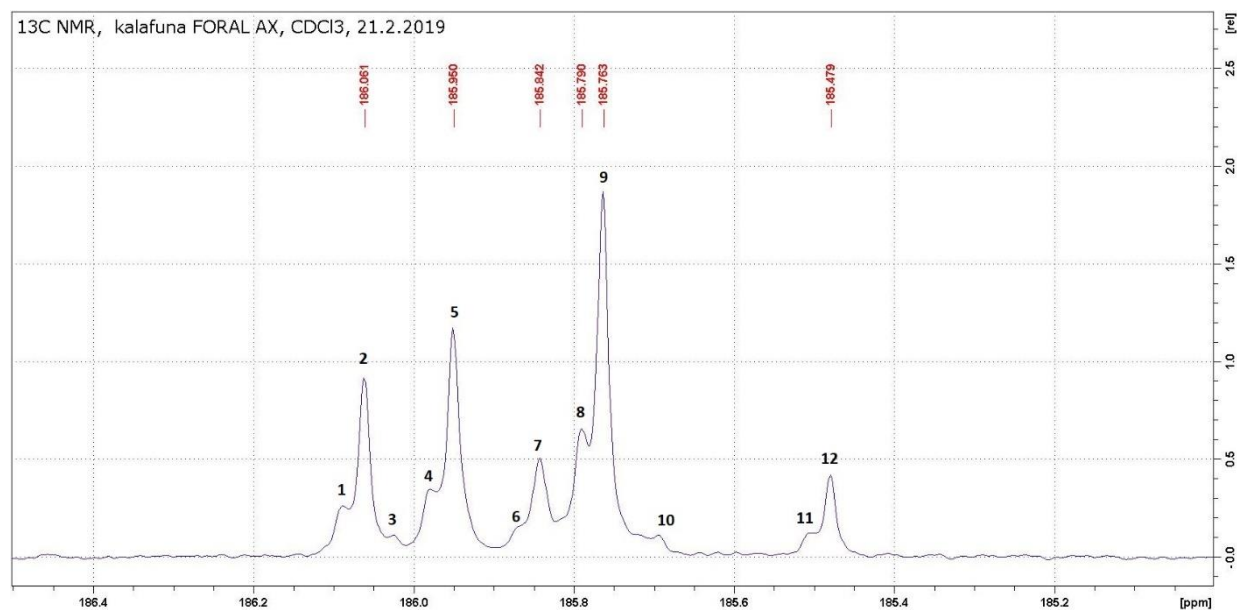
^{13}C -NMR spektra lze využít k identifikaci počtu karboxylových skupin. V kalafuně WW (Guangdong) bylo nalezeno 9 signálů karboxylových skupin (obrázek 37 uprostřed). Narozdíl od ^1H -NMR spekter, zde signál standardu kyseliny neoabietové (obrázek 37 nahoře, signál 1) neodpovídal chemickým posunem žádnému signálu ve spektru. S pomocí přidavku standardu do vzorku kalafuny se ale její přítomnost potvrdila, opět lze pozorovat nárůst jejího signálu (obrázek 37 dole).



Obrázek 37 ^{13}C -NMR spektrum kyseliny neoabietové (nahoře), kalafuny WW (uprostřed) a kalafuny WW s přidavkem kyseliny neoabietové (dole)

Ve směsi ostatních pryskyřičných kyselin došlo ke změně hodnoty chemického posunu signálu karboxylové skupiny kyseliny neoabietové. Hodnota chemického posunu chloroformu (7,27 ppm) ani hodnoty ostatních uhlíkových signálů posunuté nebyly. Přesný důvod není známý, může to být například vznikem kondenzačních produktů.

V hydrogenované kalafuně bylo nalezeno 12 signálů karboxylové skupiny, přičemž podle hodnot chemického posunu se nejedná o stejné kyseliny jako ve vzorku kalafuny WW (obrázek 38).

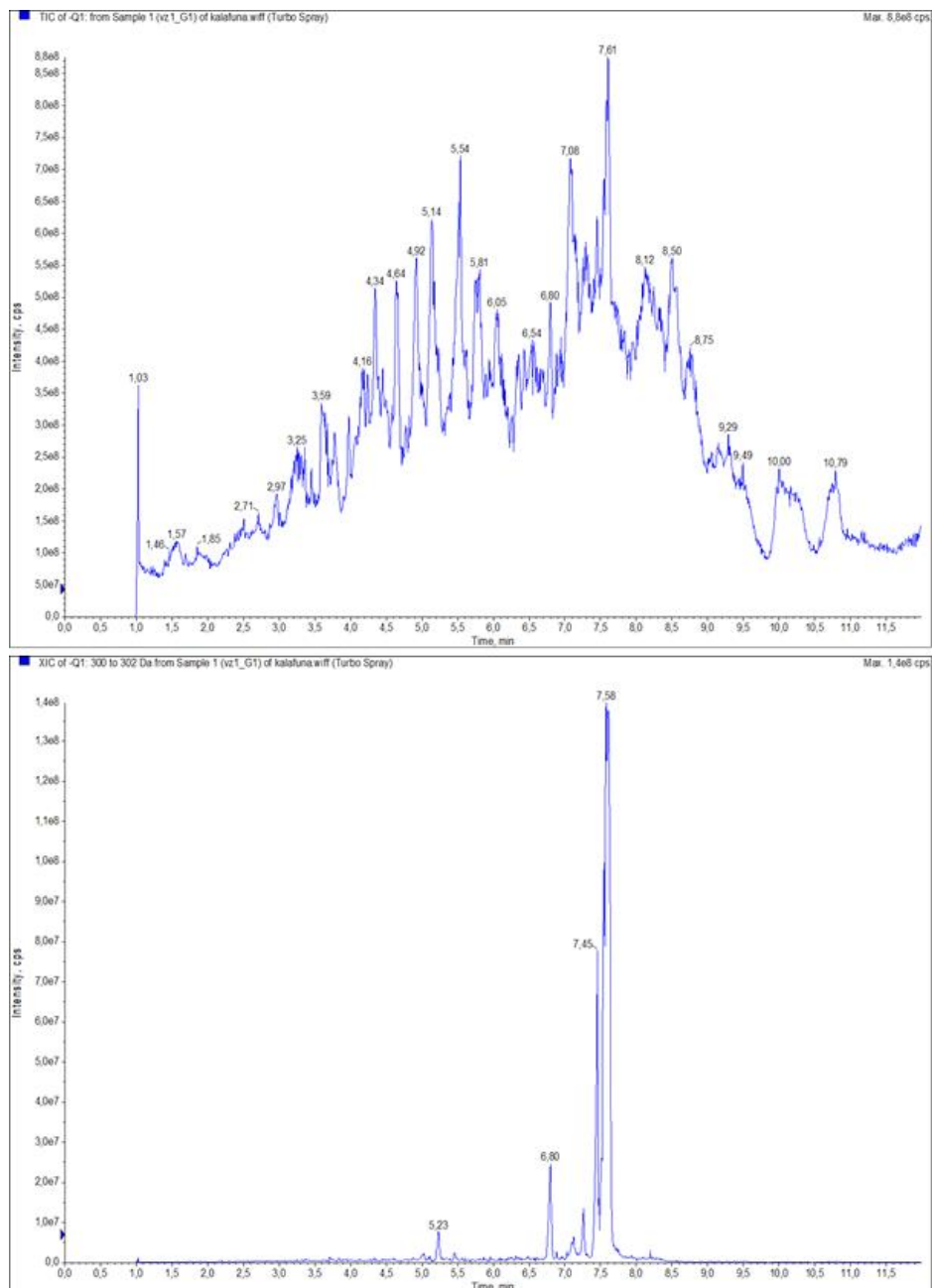


Obrázek 38 ^{13}C -NMR spektrum kalafuny Foral AX-E

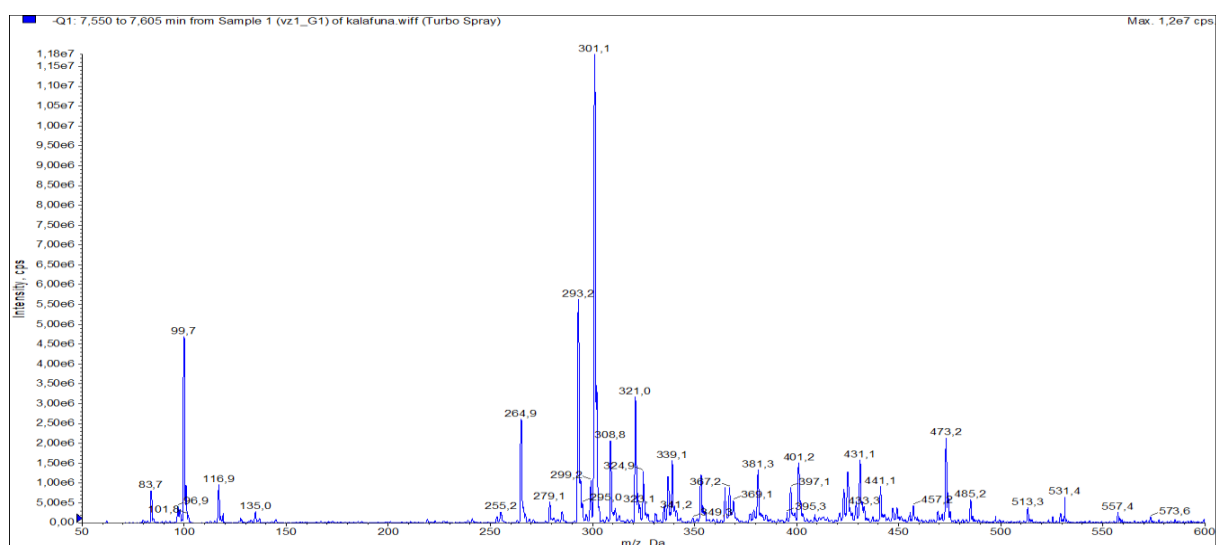
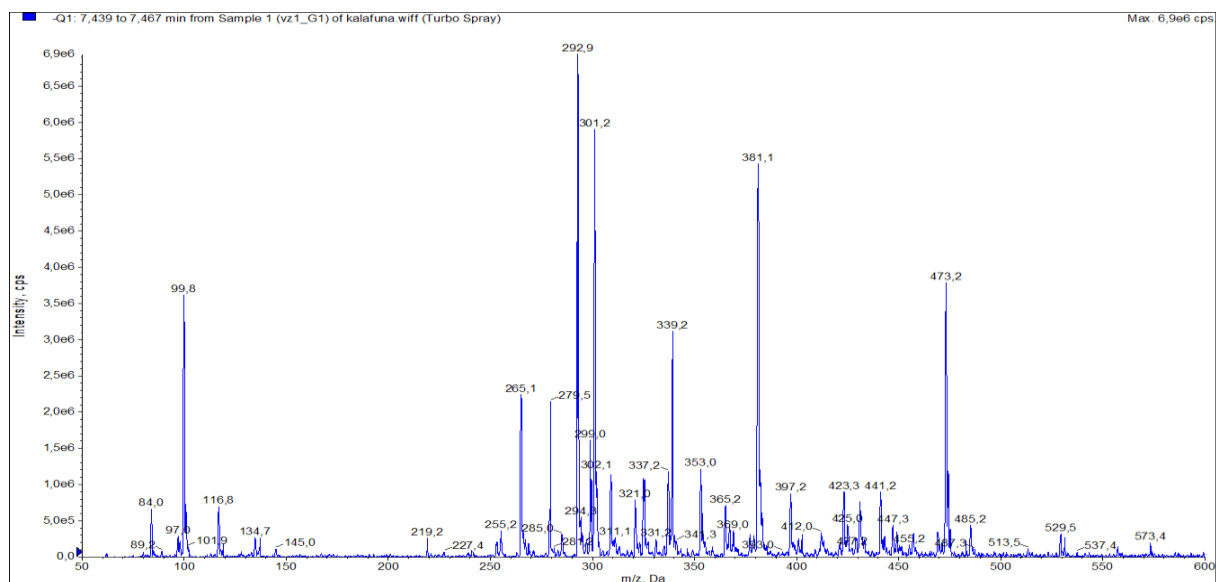
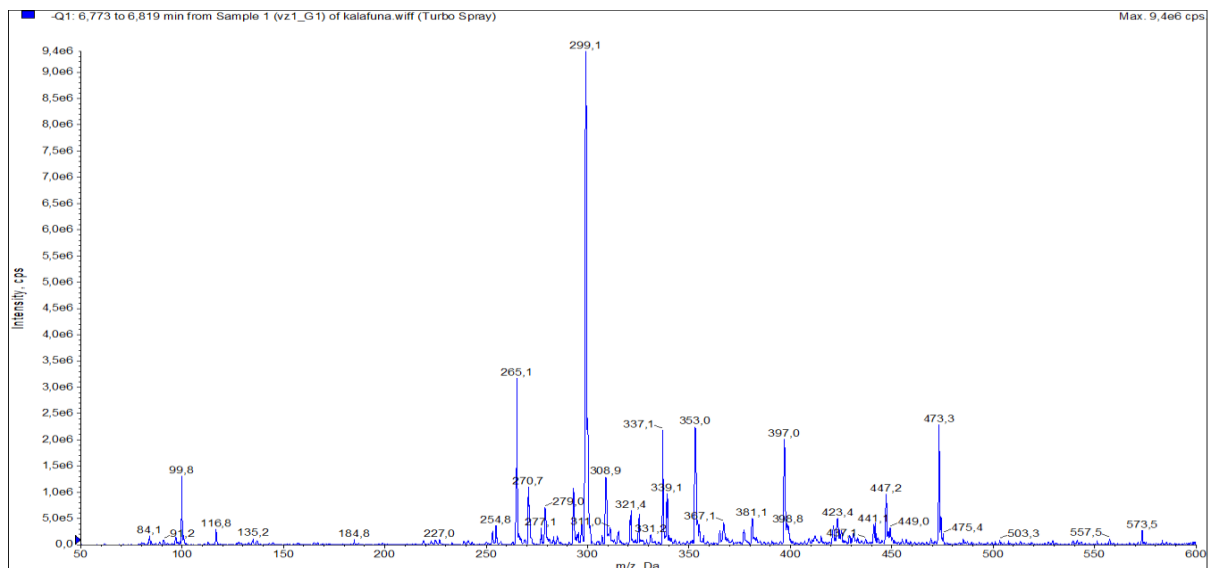
Vzhledem k změnám hodnot chemických posunů signálů karboxylových skupin ve směsi jsou ^{13}C -NMR spektra k identifikaci pryskyřičných kyselin méně vhodná.

3.2.5 Hmotnostní spektra

Vzorek kalafuny WW (Guangdong) byl analyzován HPLC/MS systémem. Na obrázku 39 je uveden celkový iontový chromatogram vzorku pro rozsah $m/z = 50-600$ a dále iontový chromatogram pro konkrétní rozsah $m/z = 300-302$ odpovídající kyselinám přítomným v analyzovaných vzorcích. Na obrázku 43 a přiložených hmotnostních spektrech (obrázek 40) jednotlivých látek je patrné, že píky s retenčními časy 7,58 min a 7,45 min obsahují isomerní kyseliny s $m/z = 302$ (kyselina abietová a její isomery) a pík s retenčním časem 6,80 min obsahuje kyselinu s $m/z = 300$.



Obrázek 39 Celkový iontový chromatogram (nahore) a extrahovaný iontový chromatogram (dole)



Obrázek 40 Hm. spektra píkú v čase 6,80 min (nahore), 7,45 min (uprostřed) a 7,58 min (dole)

3.3 Rozpustnost kalafuny

Podle postupu uvedeného v kapitole 2.4.1. byla zkoušena rozpustnost u pěti vzorků kalafuny: kalafuny WW, částečně hydrogenované kalafuny Staybelite, hydrogenované Foral AX-E, sodného mýdla od dodavatele Porta a mýdla Sylvaros. Pokud byl roztok úplně homogenní, látka byla označena za daných podmínek za rozpustnou (+). V případě, že zůstal podíl nerozpuštěn, látka byla označena jako nerozpustná (-). Pokud se vzorek nerozpustil po protřepání ani v 50 ml rozpouštědla, byl umístěn na 15 minut do ultrazvukové lázně a znovu odečten výsledek (tabulky 3–7).

Tabulka 3 Rozpustnost kalafuny WW

Vzorek	Rozpouštědlo	0,1 ml	1 ml	2 ml	15 ml	50 ml	ULZ
Kalafuna WW (Guangdong, Sunny, Brenntag)	Voda	-	-	-	-	-	-
	Methanol	-	+	+	+	+	+
	Acetonitril	-	-	-	+	+	+
	Dimethylsulfoxid	-	+	+	+	+	+
	Tetrahydrofuran	-	-	+	+	+	+

Tabulka 4 Rozpustnost částečně hydrogenované kalafuny Staybelite

Vzorek	Rozpouštědlo	0,1 ml	1 ml	2 ml	15 ml	50 ml	ULZ
Částečně hydrogenovaná kalafuna Staybelite	Voda	-	-	-	-	-	-
	Methanol	-	+	+	+	+	+
	Acetonitril	-	-	-	-	-	+
	Dimethylsulfoxid	-	+	+	+	+	+
	Tetrahydrofuran	-	-	+	+	+	+

Tabulka 5 Rozpustnost úplně hydrogenované kalafuny Foral AX-E

Vzorek	Rozpouštědlo	0,1 ml	1 ml	2 ml	15 ml	50 ml	ULZ
Úplně hydrogenovaná kalafuna Foral AX-E	Voda	-	-	-	-	-	-
	Methanol	-	+	+	+	+	+
	Acetonitril	-	-	-	-	-	+
	Dimethylsul-	-	+	+	+	+	+
	Tetrahydrofuran	-	+	+	+	+	+

Tabulka 6 Rozpustnost 50% kalafunovaného sodného mýdla

Vzorek	Rozpouštědlo	0,1 ml	1 ml	2 ml	15 ml	50 ml	ULZ
50% sodné mýdlo kalafuny	Voda	-	+	+	+	+	+
	Methanol	-	+	+	+	+	+
	Acetonitril	-	-	-	-	-	-
	Dimethylsulfoxid	-	-	-	-	-	-
	Tetrahydrofuran	-	-	-	-	-	-

Tabulka 7 **Rozpustnost kalafunovaného mýdla Sylvaros**

Vzorek	Rozpouštědlo	0,1 ml	1 ml	2 ml	15 ml	50 ml	ULZ
Kalafunát Sylvaros	Voda	+	+	+	+	+	+
	Methanol	-	-	+	+	+	+
	Acetonitril	-	-	-	-	-	-
	Dimethylsul-	-	-	+	+	+	+
	Tetrahydrofuran	+	+	+	+	+	+

Zkoušení rozpustnosti neproběhlo za účelem určení přesné hodnoty rozpustnosti dané látky v rozpouštědle za daných podmínek, nýbrž pro porovnání rozpouštědel mezi sebou a výběr optimálního rozpouštědla pro extrakci kalafuny z pigmentu.

Vzorky kalafuny WW, částečně hydrogenované kalafuny Staybelite a hydrogenované kalafuny Foral AX-E se ve vodě nerozpustily ani po 15min působení ultrazvukové lázně. V literatuře jsou deklarovány hodnoty 0,9–8,1 mg/l, což odpovídá látce ve vodě nerozpustné. U vzorku sodného mýdla stačí pro rozpuštění navážky 1 ml rozpouštědla, ve vodě je dobře rozpustné.

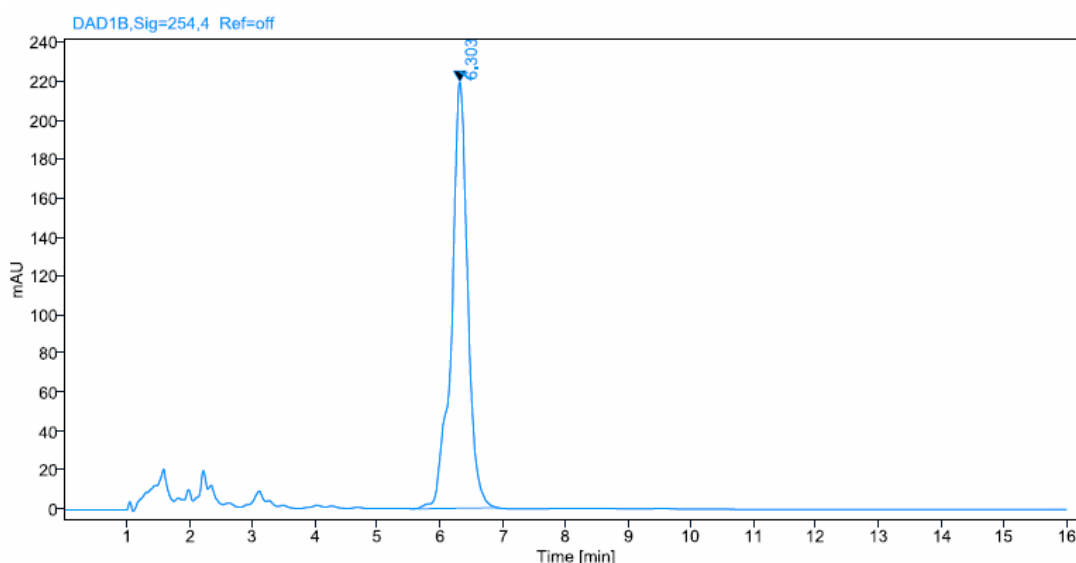
Co se týká organických rozpouštědel, nejvhodnějším rozpouštědlem pro kalafunu je methanol nebo dimethylsulfoxid, kdy pro úplné rozpuštění navážky vzorku stačí 1 ml rozpouštědla. O něco méně rozpustná je v tetrahydrofuranu a nejméně v acetonitrilu. Sodné mýdlo lze dobře rozpustit také v methanolu.

3.4 Optimalizace podmínek pro extrakci a analýzu kalafuny v pigmentech

3.4.1 Výběr chromatografické kolony

Kolona Nucleosil 120 C18

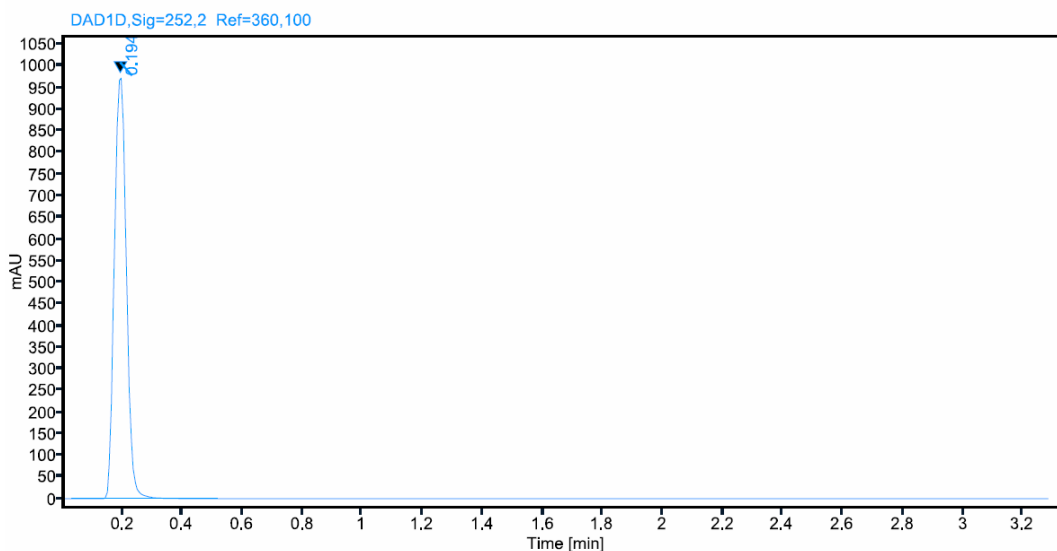
Pro detekci byly zvoleny vlnové délky absorpčních maxim pryskyřičných kyselin, které se v kalafuně nejčastěji vyskytují, tj. kyseliny abietové (240 nm), neoabietové (252 nm), palustrové (266 nm) a levopimarové (270 nm). Na obrázku 41 je ukázkový chromatogram separace kalafuny WW (Guangdong) při 254 nm, kde je možné vidět koeluci dvou kyselin v píku s retenčním časem 6,3 min.



Obrázek 41 Záznam separace kalafuny WW (Guangdong) na koloně Nucleosil 120 C18 při 254 nm. Experimentální podmínky viz kapitola 2.5.5.

Kolona HS Discovery

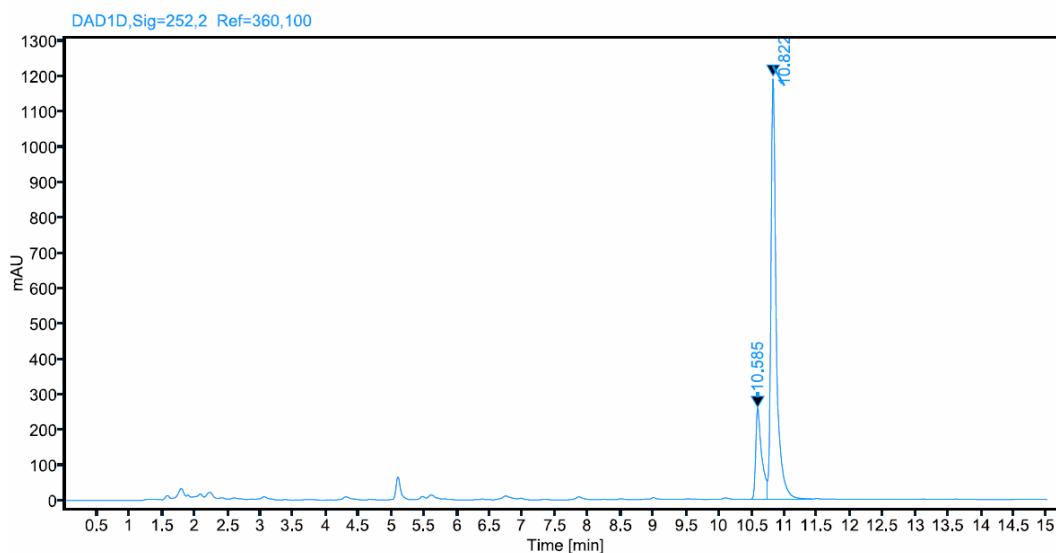
Stacionární fáze v koloně HS Discovery je polyethylenglykolová, pryskyřičné kyseliny k ní mají velmi malou afinitu. Kyselina abietová eluovala příliš blízko mrtvého objemu ($V_M = 0,186$ ml, určen pomocí thiomocoviny). Na obrázku 42 je ukázkový chromatogram při 252 nm.



Obrázek 42 Záznam píku standardu kyseliny abietové na koloně HS Discovery PEG při 252 nm. Experimentální podmínky viz kapitola 2.5.5.

Kolona Poroshell 120 C18

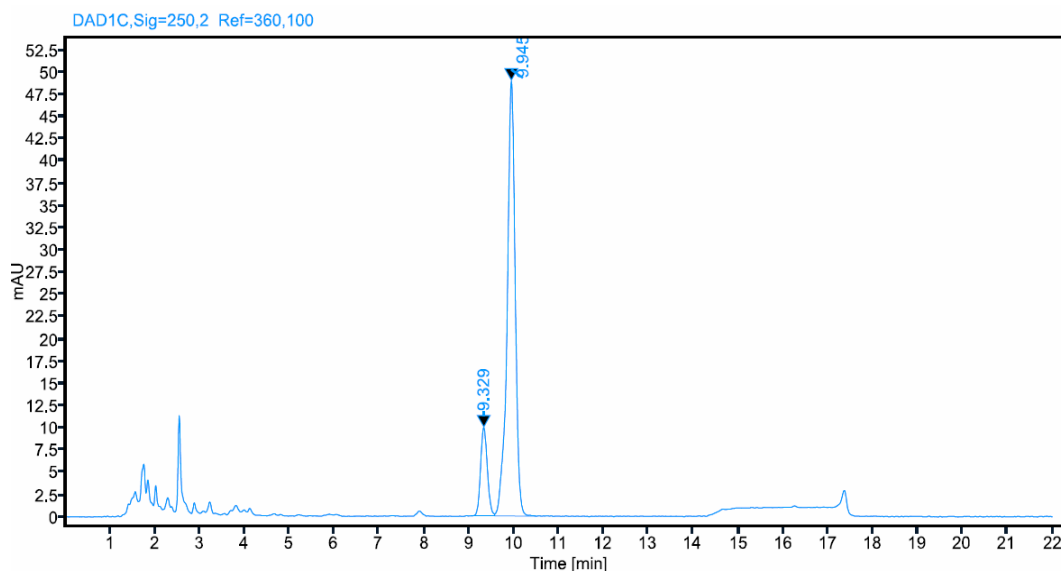
Jako další byla zvolena kolona s oktadecylsilikagelovou stacionární fází, stejně jako v případě kolony Nucleosil, od které se kolona Poroshell liší rozměry i velikostí částic. Při použití gradientu došlo k částečnému rozdělení kyseliny neoabietové ($t_R = 10,6$ min) od abietové ($t_R = 10,8$ min), úplného rozdělení se na této koloně nepodařilo dosáhnout (obrázek 43).



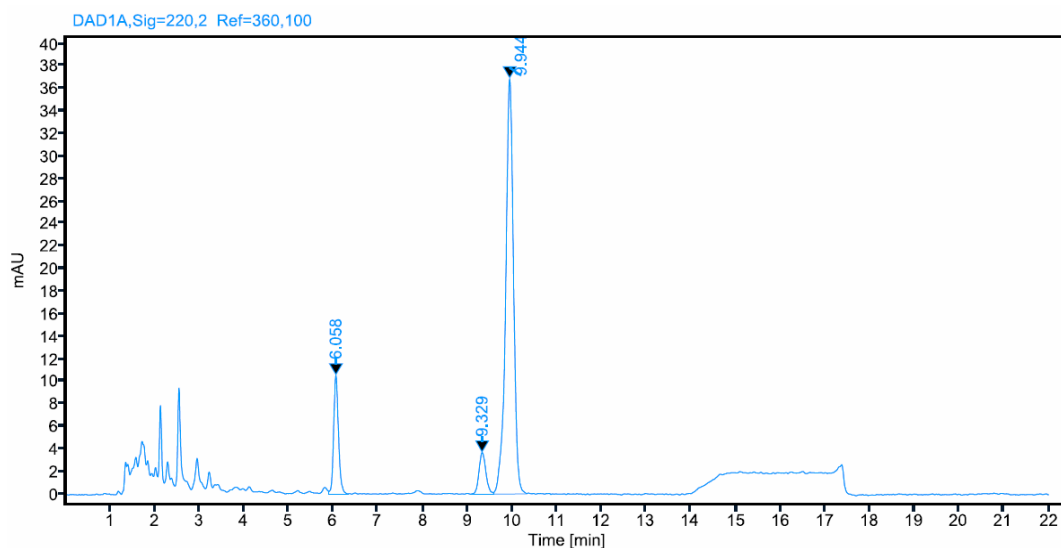
Obrázek 43 Záznam separace kalafuny WW (Guangdong) na koloně Poroshell 120 C18 při 252 nm. Experimentální podmínky viz kapitola 2.5.5.

Kolona Kinetex C18

Na koloně Kinetex C18 se rozdělila kyselina abietová a neoabietová za isokratické eluce 70% acetonitrilem. Pro zlepšení tvaru píků a zabránění disociace byla vodná část mobilní fáze okyselena 0,01% kyselinou mravenčí. V kalafuně WW (Guangdong) byla při 250 nm identifikována kys. neoabietová s $t_R = 9,3$ min a abietová s $t_R = 9,9$ min (obrázek 44). Při 220 nm bylo možné pozorovat i kyselinu dehydroabietovou, která eluovala již v 6. minutě (obrázek 45).

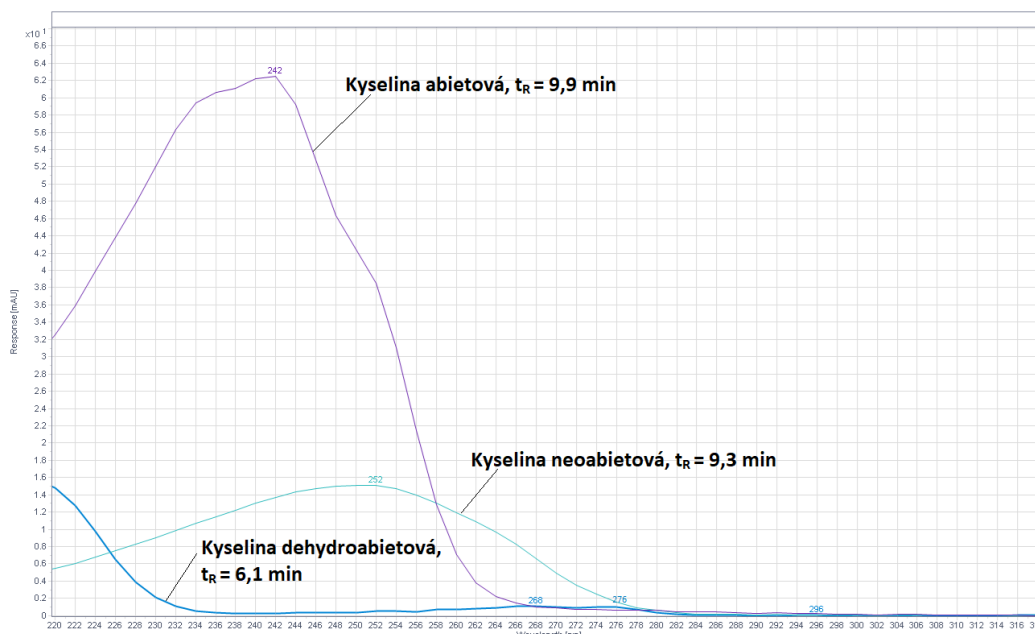


Obrázek 44 Záznam separace kalafuny WW (Guangdong) na koloně Kinetex C18 při 250 nm. Experimentální podmínky viz kapitola 2.5.5.



Obrázek 45 Záznam separace kalafuny WW (Guangdong) na koloně Kinetex C18 při 220 nm. Experimentální podmínky viz kapitola 2.5.5.

Absorpční UV spektra píků kyseliny dehydroabietové, neoabietové a abietové (obrázek 46) z předchozího chromatogramu (obrázek 45) odpovídají absorpčním spektrům kyselin uvedených v literárních zdrojích (obrázek 8).



Obrázek 46 Absorpční UV spektra píků z obrázku 45 odpovídající pryskyřičným kyselinám v kalafuně

Z testovaných kolon bylo dosaženo nejlepších výsledků na koloně Kinetex C18, proto tato kolona a odpovídající separační podmínky byly použity pro další analýzy.

3.4.2 Výběr vhodného extrakčního činidla

Pro extrakci byla použita čtyři organická rozpouštědla, která byla dostupná v čistotě pro HPLC: methanol, acetonitril, tetrahydrofuran a dimethylsulfoxid. Extrakty žlutého pigmentu pomocí různých organických rozpouštědel měly odlišné zbarvení. Methanolvý extrakt měl světle žlutou barvu, acetonitrilový středně žlutou, tetrahydrofuranový oranžovou a dimethylsulfoxidový extrakt temně rudou barvu (obrázek 47).



Obrázek 47 Různá zbarvení extraktů ze vzorku žlutého pigmentu, vlastní zpracování

Jak již bylo ověřeno při zkoušení rozpustnosti (tabulky 3-7), kalafuna je snadno rozpustná ve všech organických rozpouštědlech s výjimkou acetonitrilu, který je pro extrakci méně vhodný, tímto extrakčním činidlem se v porovnání s ostatními činidly vyextrahovala méně než polovina celkového množství kalafuny (tabulka 8).

Tabulka 8 Extrakce kyselin ze žlutého pigmentu B různými extrakčními činidly

Extrakční činidlo	Kyselina neoabietová	Kyselina abietová
	Průměrná plocha pro 250 mg navážky	Průměrná plocha pro 250 mg navážky
Methanol	156,0 ± 1,0	350,4 ± 1,1
Acetonitril	58,7 ± 1,3	133,0 ± 3,1
Tetrahydrofuran	149,23 ± 1,6	358,0 ± 3,1
Dimethylsulfoxid	159,32 ± 1,0	366,05 ± 2,7

Každý vzorek byl proměřen 3x, kompletní hodnoty jsou v příloze 2. Výsledky extrakce kalafuny z pigmentu korespondují s rozpustností kalafuny v příslušném činidle. Jako nejvhodnější extrakční činidlo byl zvolen methanol.

3.4.3 Vliv doby ultrazvukové extrakce na výtěžnost

Byl testován vliv doby působení ultrazvukové lázně na vyextrahované množství kalafuny z pigmentu. Experiment byl proveden na vzorku žlutého pigmentu B, který byl extrahován methanolem bez působení ultrazvuku (vzorek byl důkladně protřepán s rozpouštědlem v centrifugační nádobce, odstředěn a zanalyzován), po 5min, 15min a 30min (tabulka 9) působení ultrazvukové extrakce. Každý vzorek byl proměřen 3x, hodnoty jsou v příloze 3.

Tabulka 9 Vliv doby ultrazvukové extrakce na výtěžnost

Délka působení ultrazvukové extrakce [min]	Kyselina neoabietová	Kyselina abietová
	Průměrná plocha pro 250 mg navážky	Průměrná plocha pro 250 mg navážky
0	153,4 ± 0,5	348,34 ± 1,6
5	154,3 ± 2,1	350,7 ± 4,7
15	154,9 ± 1,4	348,6 ± 0,4
30	158,3 ± 4,2	356,8 ± 7,5

Z výsledků měření vyplývá, že doba ultrazvukové extrakce nemá vliv na vyextrahované množství kalafuny z pigmentu. Obě pryskyřičné kyseliny lze tedy vyextrahovat bez působení ultrazvukové lázně, což vypovídá o velmi slabé interakci mezi pigmentem a kalafunou.

3.4.4 Vícenásobná extrakce s vybraným rozpouštědlem

Vícenásobná extrakce methanolem byla provedena na dvou vzorcích žlutého pigmentu a dvou vzorcích červeného pigmentu. Vzorky byly připraveny způsobem uvedeným

v kapitole 2.4.4. Zbytek methanolu v centrifugační nádobce po první extrakci byl poté dekantován, bylo aplikováno čisté rozpouštědlo, vzorek znovu extrahován a extrakt analyzován. Postup násobné extrakce byl poté ještě jednou zopakován.

a) Žluté pigmenty

Z výsledků opakované extrakce kalafuny methanolem (tabulky 10 a 11) vyplývá, že první extrakcí se ze žlutých pigmentů vyextrahuje přibližně 90 % celkového množství kalafuny.

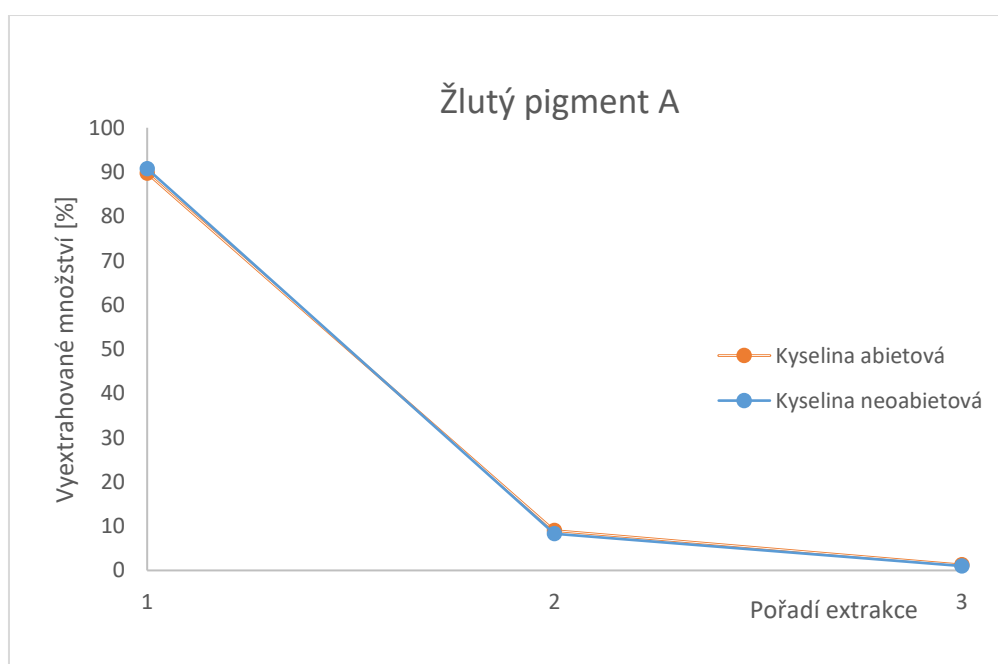
Tabulka 10 Vícenásobná extrakce kalafuny ze žlutého pigmentu A

Žlutý pigment A	Plocha	1.Extrakce	Plocha	2.Extrakce	Plocha	3.Extrakce
		[%]		[%]		[%]
Kyselina neoabietová	251,4	90,5	26,4	9,5	-	-
Kyselina abietová	628,3	90,2	68,3	9,8	-	-

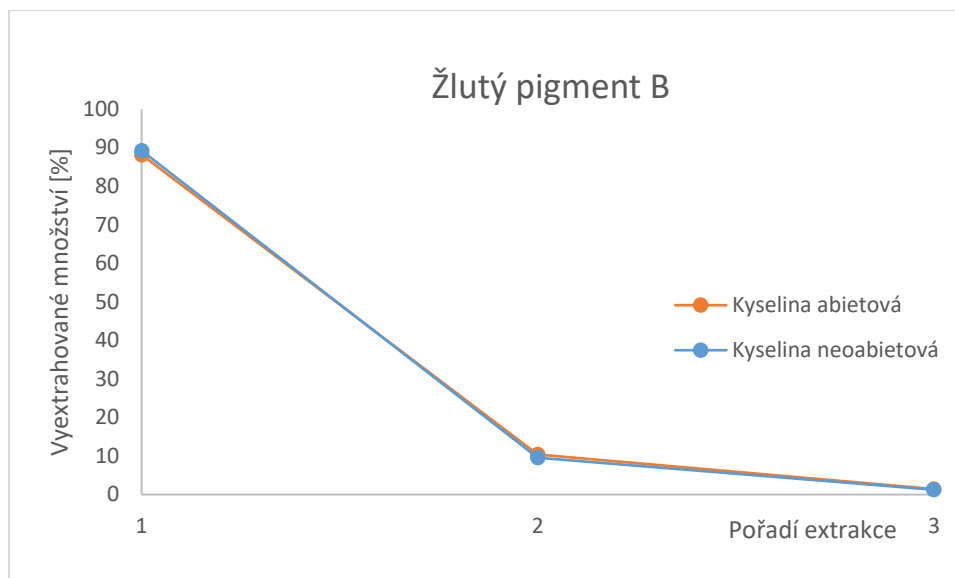
Tabulka 11 Vícenásobná extrakce kalafuny ze žlutého pigmentu B

Žlutý pigment B	Plocha	1.Extrakce	Plocha	2.Extrakce	Plocha	3.Extrakce
		[%]		[%]		[%]
Kyselina neoabietová	252,1	89,2	26,9	9,5	3,7	1,3
Kyselina abietová	339,8	88,2	40,1	10,4	5,4	1,4

Vysoký podíl vyextrahovaného množství již v první extrakce opět potvrzuje předpoklad, že kalafuna není silně vázaná na pigment. Data z tabulek jsou také graficky znázorněna na obrázcích 48, 49.



Obrázek 48 Vícenásobná extrakce kalafuny ze žlutého pigmentu A



Obrázek 49 Vícenásobná extrakce kalafuny ze žlutého pigmentu B

b) Červené pigmenty

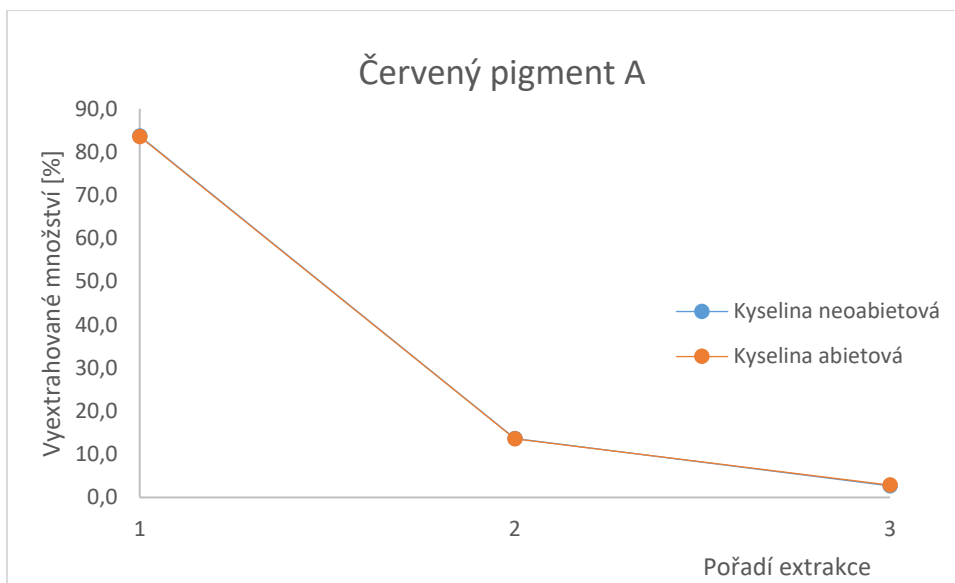
Stejně jako v případě žlutých pigmentů, vícenásobná extrakce methanolem byla provedena na dvou vzorcích červeného pigmentu. Výsledky uvedené v tabulkách 12 a 13 ukazují, že první extrakcí se vyextrahuje přibližně stejný podíl kalafuny z obou vzorků červených pigmentů i podobný relativní podíl ve srovnání se žlutými pigmenty (cca 85–90 %). Data jsou graficky znázorněna na obrázcích 50 a 51.

Tabulka 12 Vícenásobná extrakce kalafuny z červeného pigmentu A

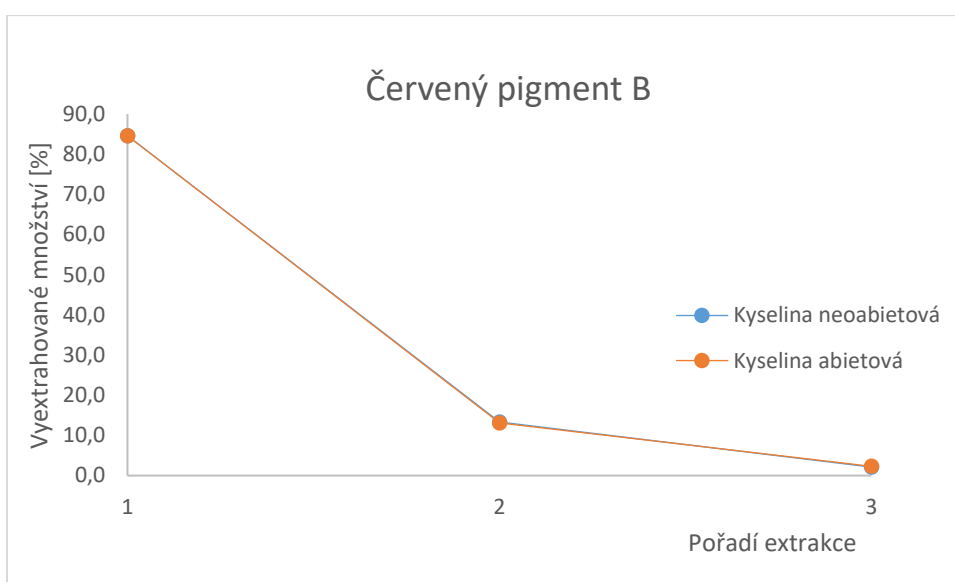
Červený pigment A	Plocha	1.Extrakce	Plocha	2.Extrakce	Plocha	3.Extrakce
		[%]		[%]		[%]
Kyselina neoabietová	17,6	83,7	2,9	13,7	0,6	2,7
Kyselina abietová	172,5	83,6	28,0	13,6	5,9	2,9

Tabulka 13 Vícenásobná extrakce kalafuny z červeného pigmentu B

Červený pigment B	Plocha	1.Extrakce	Plocha	2.Extrakce	Plocha	3.Extrakce
		[%]		[%]		[%]
Kyselina neoabietová	17,2	84,6	2,7	13,3	0,4	2,1
Kyselina abietová	178,7	84,6	27,6	13,1	4,9	2,3



Obrázek 50 Vícenásobná extrakce kalafuny z červeného pigmentu A

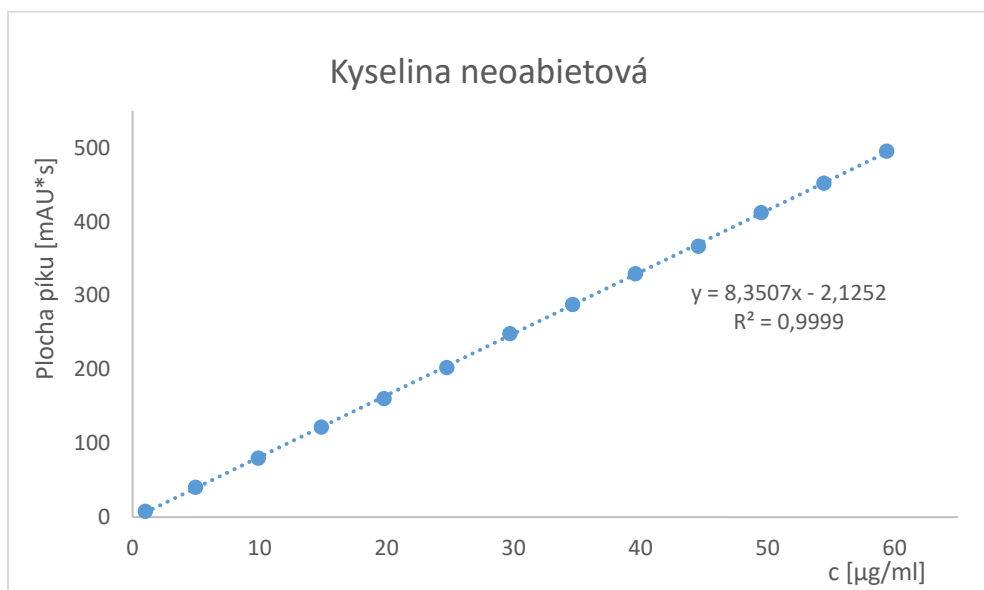


Obrázek 51 Vícenásobná extrakce kalafuny z červeného pigmentu B

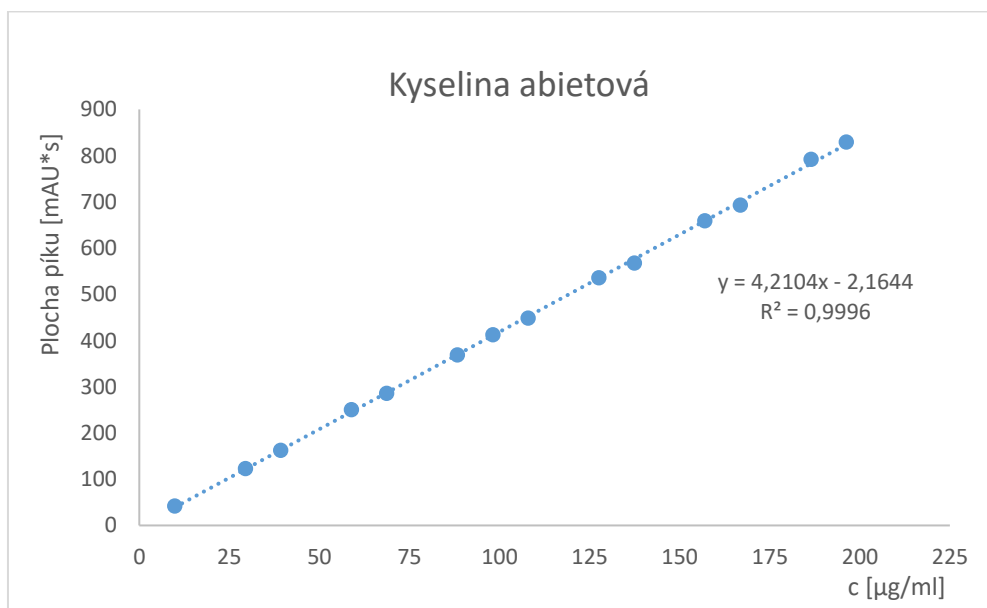
3.5 Kalibrační měření

Podle postupu uvedeného v kapitole 2.4.3. byly připraveny kalibrační roztoky vybraných pryskyřičných kyselin, kyseliny abietové a neoabietové. V přílohách 4 a 5 jsou pipetované objemy a výsledné průměrné plochy píků (měření bylo provedeno třikrát). U každé kyseliny byla sestrojena závislost průměrné plochy píku na koncentraci (obrázky 52, 53), která byla proložena lineární regresní závislostí. Parametry kalibračních závislostí, koeficienty determinace, meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) pro jednotlivé standardy jsou uvedeny v tabulce

v příloze 6. Mez detekce a mez kvantifikace byly vypočteny jako trojnásobek resp. desetinásobek směrodatné odchylky šumu základní linie.



Obrázek 52 Kalibrační přímka kyseliny neoabietové



Obrázek 53 Kalibrační přímka kyseliny abietové

3.6 Finální chromatografická separace

Finální zoptimalizovaná separace pryskyřičných kyselin byla provedena na koloně Kinetex C18, 150 x 6 mm; 5 μm . Nástřik vzorků extraktu z pigmentu byl 2 μl , u vzorků kalafun byl snížen na 1 μl (sodné mýdlo 2 μl). Abietová i neoabietová kyselina byly detekovány při 250 nm. V tabulce 18 jsou uvedena hmotnostní procenta daných kyselin ve vzorcích kalafun

(průměr ze tří měření, kompletní data jsou v tabulce v příloze 7). Ve všech vzorcích byla identifikována i kyselina dehydroabietová, ke které nebyl dispozici analytický standard.

Tabulka 14 **Obsah kyseliny abietové a neoabietové ve vzorcích kalafuny**

Vzorek kalafuny	Kyselina neoabietová [Hm. %]	Kyselina abietová [Hm. %]	Kyselina dehydroabietová (Identifikace)
WW Guangdong	1,8 ± 0,4	29,0 ± 0,2	+
WW Sunny	1,8 ± 0,2	27,7 ± 1,2	+
WW Brenntag	4,3 ± 0,4	28,1 ± 1,0	+
50% Sodné mýdlo	0,3 ± 0,01	6,5 ± 0,3	+
DRA	0	0	+
Staybelite	0	0	+
Foral AX-E	0	0	+

U kalafun WW od dodavatelů Guangdong, Sunny a Brenntag byly nalezeny hodnoty 27,7–29 % kyseliny abietové, což koresponduje s hodnotami uvedenými v literatuře [23,24].

Dále byly proměřeny extrakty ze vzorků pigmentů. V suspenzi žlutých pigmentů bylo nalezeno nižší procento kyselin než v provozně odsušené pastě, což je způsobeno přítomností solí a nečistot, které se vymyjí v průběhu promývání (kalafuna tak v suspenzi tvoří menší podíl). V konečném pigmentu (provozně odsušené pastě), tvoří kyselina abietová 3 % ve žlutém pigmentu A a 1,6 % ve žlutém pigmentu B. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 19 (kompletní data jsou v přílohách 8 a 9). V souladu s dávkováním kalafuny se během technologického procesu v pigmentu A navázala přibližně dvojnásobná dávka kyseliny abietové.

Tabulka 15 **Obsah kyseliny abietové a neoabietové ve vzorcích žlutých pigmentů**

Vzorek pigmentu		Kyselina neoabietová [Hm. %]	Kyselina abietová [Hm. %]	Kyselina dehydroabietová (Identifikace)
Žlutý pigment A	Odsušená suspenze	0,6 ± 0,01	2,6 ± 0,003	+
	Pasta odsušená v sušárně	0,7 ± 0,02	2,7 ± 0,10	+
	Provozně odsušená pasta	0,7 ± 0,06	3,0 ± 0,09	+
Žlutý pigment B	Odsušená suspenze	0,1 ± 0,002	1,0 ± 0,03	+
	Pasta odsušená v sušárně	0,1 ± 0,002	1,6 ± 0,02	+
	Provozně odsušená pasta	0,1 ± 0,005	1,6 ± 0,04	+

Po dokončení syntézy žlutého pigmentu byly nejdříve odebrány filtráty z počátku filtrace, po 10 minutách a na konci filtrace. Poté byl pigment promýván nejprve technologickou a demineralizovanou vodou. Ve vzorcích filtrátů a promývacích vod ze žlutého pigmentu A byla nalezena kalafuna (koncentrace kyselin uvedeny v tabulce 20, kompletní data v příloze 10), zatímco promývací vody z pigmentu B kalafunu neobsahovaly. Z toho vyplývá, že veškerá kalafuna byla

úpravou pH v pigmentu B zafixována, zatímco v pigmentu A se odplavovala ve formě sodné soli.

Tabulka 16 **Obsah kyseliny abietové a neoabietové ve vzorcích filtrátů**

Vzorek filtrátu	Kyselina neoabietová c [mg/l]	Kyselina abietová c [mg/l]	Kyselina dehydroabietová (Identifikace)
Filtrát začátek	9,5 ± 0,2	58,9 ± 0,6	+
Filtrát po 10 min	27,0 ± 0,2	120,7 ± 0,4	+
Filtrát konec	29,8 ± 0,1	133,9 ± 1,0	+
Technologická voda po 5 hod	9,8 ± 0,1	47,7 ± 0,4	+
Technologická voda konec	107,0 ± 6,4	502,0 ± 27,9	+
Demineralizovaná voda po 4 m ³	123,2 ± 1,1	521,0 ± 1,9	+
Demineralizovaná voda konec	90,1 ± 0,3	380,4 ± 0,4	+

Lze pozorovat rostoucí koncentrace kalafuny ve filtrátech až do promývání pigmentu demineralizovanou vodou po 4m³, koncentrace při ukončení promývání naopak klesla. Výsledky analýz obsahu kalafuny v extraktech z pigmentů a ve filtrátech získané kapalinovou chromatografií umožňují sledování trendu obsahu kalafuny v pigmentu v závislosti na průběhu technologie výroby. Jedná se o výhodu HPLC oproti acidobazické titraci, která je metodou neselektivní a její výsledky by byly zkreslené úpravami pH, ke kterým dochází při technologickém postupu výroby jednotlivých pigmentů.

V tabulce 21 jsou uvedeny nalezené obsahy kyselin v červených pigmentech A a B, do kterých byla aplikována stejná dávka sodného mýdla. V obou pigmentech se zachytilo 0,8 % kyseliny abietové a 0,04 % kyseliny neoabietové. Kompletní data jsou uvedena v příloze 11.

Tabulka 17 **Obsah kyseliny abietové a neoabietové ve vzorcích červených pigmentů**

Vzorek pigmentu		Kyselina neoabietová [mg/kg]	Kyselina abietová [Hm. %]	Kyselina dehydroabietová (Identifikace)
Červený pigment A	Provozně odsušená pasta	0,04 ± 0,002	0,8 ± 0,004	+
Červený pigment B	Provozně odsušená pasta	0,04 ± 0,001	0,8 ± 0,002	+

Vzorky červeného pigmentu C, D a E nebyly proměřeny, protože obsahují hydrogenovanou kalafunu Foral AX-E, kterou není možné na HPLC-DAD identifikovat.

3.7 Acidobazická titrace

Ze spotřeb hydroxidu sodného a kyseliny chlorovodíkové při titracích lze vypočítat obsah volné a celkové kalafuny, a z těchto hodnot poté dopočítat procento soli (výpočet je uveden

na straně 46). Celkovou hodnotu kalafuny tvoří karboxylové kyseliny a její soli, volnou tvoří všechny pryskyřičné kyseliny. Nejvyšší hodnota celkové kalafuny byla nalezena u kalafuny WW (Brenntag). Velmi čistá kalafuna je také úplně hydrogenovaná kalafuna Foral AX-E. Ostatní kalafuny se pohybují mezi 88 a 93,3 % (tabulka 14). Zbytek do 100 % tvoří látky neutrální povahy, jako jsou estery, aldehydy nebo alkoholy.

a) Vzorky kalafun

Tabulka 18 **Titrační stanovení volné, celkové kalafuny a kalafuny ve formě soli**

Vzorek kalafuny	Volná kalafuna [Hm. %]	Celková kalafuna [Hm. %]	Sůl [Hm. %]
WW (Guangdong)	89,6	85,9	-3,7
WW (Sunny)	93,5	91,1	-2,4
WW (Brenntag)	102,9	101,4	-1,5
50% sodné mýdlo	16,2	86,2	70,0
DRA	91,1	92,10	1
Staybelite	92,9	90,5	-2,4
Foral AX-E	97,9	94,8	-3,1

Malý rozdíl ve spotřebě hydroxidu sodného a kyseliny chlorovodíkové může způsobit, že obsah soli nevyjde nulový, ale může být i záporný (spotřeby lze porovnat v příloze 12).

Jiným vyjádřením kvality kalafuny je číslo kyselosti, které udává množství hydroxidu draselného v mg potřebného k neutralizaci volných kyselin obsažených v 1 g látky. Vyhovující hodnoty u kalafuny jsou alespoň 160 mg KOH/g kalafuny, přičemž kalafuna vyšší jakosti má vyšší číslo kyselosti. Porovnání hodnot experimentálních a udaných výrobcem je uvedeno v tabulce 15. V souladu s předchozími výsledky se ukazuje, že nejvyšší obsah volných kyselin obsahuje kalafuna WW (Brenntag). Všechny vzorky kalafun mají vyhovující čistotu.

Tabulka 19 **Číslo kyselosti: hodnota deklarovaná výrobcem a experimentální hodnota**

Vzorek kalafuny	Deklarovaná hodnota čísla kyselosti [mg KOH/g]	Experimentální hodnota čísla kyselosti [mg KOH/g]
WW (Guangdong)	167	166
WW (Sunny)	167	173
WW (Brenntag)	164-174	191
DRA	Neuvedeno	169
Staybelite	155-175	172
Foral AX-E	158-173	181

b) Vzorky pigmentů

Stejným způsobem jako u vzorku čisté kalafuny lze titraci provést i u vzorku pigmentu. Žluté pigmenty A a B vznikly stejnou chemickou reakcí, jedná se o produkty stejného

chemického složení. Technologický postup mezi vzorky se liší množstvím aplikované kalafuny (WW od dodavatele Guangdong ve formě kalafunátu) a úpravou pH. Do žlutého pigmentu A byl aplikován dvouapůlnásobek kalafunátu oproti vzorku B. U vzorku A se pH upravuje na hodnotu 10,5, proto je většina kalafuny ve formě soli. Vzorek B je po aplikaci kalafunátu vykyselen na hodnotu 5,5, čímž se kalafuna převede do formy volných kyselin (tabulka 16).

Tabulka 20 Titrační stanovení volné, celkové kalafuny a kalafuny ve formě soli ve žlutých pigmentech

Žlutý pigment		Volná kalafuna [Hm. %]	Celková kalafuna [Hm. %]	Sůl [Hm. %]
A	Suspence pigmentu s kalafunou	-	-	-
	Pasta pigmentu odsušená v laboratorní sušárně	1,3	3,6	2,3
	Provozně odsušená pasta	1,4	3,9	2,5
B	Suspence pigmentu s kalafunou	-	-	-
	Pasta pigmentu odsušená v laboratorní sušárně	3,6	3,7	0,1
	Provozně odsušená pasta	3,9	4,0	0,1

Navážky vzorků pigmentu, spotřeby hydroxidu sodného a kyseliny chlorovodíkové jsou uvedeny v tabulce v příloze 13.

Do červených pigmentů A, B byla aplikována stejná dávka 50% sodného mýdla kalafuny od firmy Porta. Opět lze pozorovat vliv pH, kdy ve vzorku A je kalafuna ve formě volné kyseliny, zatímco vzorek B obsahuje kalafunát (tabulka 17). Vzorky červených pigmentů C, D, E obsahují úplně hydrogenovanou kalafunu Foral AX-E (vzorek C jednu dávku, D a E dvě dávky kalafunátu). Procento zachycení kalafuny u vzorků C, D a E vyrobených stejným technologickým postupem prakticky nezáleží na množství přidané kalafuny a z výsledků je možné usoudit, že jedna dávka kalafuny je dostačující.

Tabulka 21 Titrační stanovení volné, celkové kalafuny a kalafuny ve formě soli v červených pigmentech

Červený pigment		Volná [Hm. %]	Celková [Hm. %]	Sůl [Hm. %]
A	Provozně odsušená pasta	7,1	9,1	2,0
B		1,8	10,5	8,7
C		4,1	7,1	3,0
D		6,0	9,1	3,1
E		5,2	8,0	2,8

3.8 Porovnání titračního a HPLC stanovení obsahu kalafuny v pigmentech

V příloze 14 jsou uvedeny souhrnné výsledky analýz obsahu kalafuny v obou pigmentech. V případě žlutého pigmentu A jsou obsahy kalafuny nalezené titračně i pomocí HPLC analýzy velmi podobné. U vzorků žlutého pigmentu B je obsah kalafuny nalezený titračně vyšší než obsah zjištěný HPLC, což může být způsobeno odlišným technologickým postupem, kdy vzorek pigmentu B je během výroby vykyselen a část neodmyté kyseliny může zkreslovat výsledky stanovení acidobazickou titrací.

U červeného pigmentu jsou rozdíly mezi obsahy kyseliny stanovenými titrační a HPLC analýzou ještě markantnější, což je nejspíše způsobeno technologií výroby pigmentu. Nutno poznamenat, že zvolenou HPLC technikou lze stanovit pouze ty kyseliny v kalafuně, které absorbují v UV oblasti.

4 ZÁVĚR

Stávající metoda ke stanovení kalafuny v organických pigmentech používaná ve společnosti Synthesia, a. s. je acidobazická titrace. Tato metoda umožňuje zjistit celkový obsah kalafuny, který odpovídá součtu všech pryskyřičných kyselin, přičemž nelze rozlišit poměry jednotlivých kyselin obsažených v kalafuně; obsah je přepočten na kyselinu abietovou, což je možné za předpokladu přítomnosti kyselin o stejné molekulové hmotnosti (nepřesnost by způsobila například přítomnost kondenzovaných produktů). Výhodou této titrace je možnost stanovení obsahu solí pryskyřičných kyselin, který lze zjistit výpočtem z rozdílu spotřeb při titraci hydroxidem sodným a zpětné titraci kyselinou chlorovodíkovou.

Jak bylo během experimentů ověřeno, tuto metodu nelze aplikovat na všechny druhy vzorků, protože se nejedná o specifickou metodu a výslednou hodnotu ovlivňuje pH matrice (pigmentu). U některých značek pigmentu se po ukončení syntézy cíleně upravuje pH, a proto je výsledná hodnota obsahu kalafuny zatížena chybou. Při úpravě pH do kyselé oblasti je hodnota falešně pozitivní, což bylo možné pozorovat u titrace vzorků suspenzí žlutých pigmentů.

Výsledky stávající metody byly porovnány s novou metodou, stanovení obsahu kalafuny kapalinovou chromatografií s DAD detektorem. Tímto způsobem lze stanovit pouze takové pryskyřičné kyseliny v kalafuně, které obsahují vhodný chromofor, tj. kyseliny abietového typu (kyselina abietová, neoabietová, palustrová, levopimarová a kyselina dehydroabietová) a dále oxidované molekuly odvozené od výše uvedených.

K extrakci kalafuny z předložených vzorků pigmentů byl použit methanol, nicméně vhodnými extrakčními činidly jsou i DMS nebo THF. Z výsledků vícenásobné extrakce vyplývá, že účinnost první extrakce je téměř 90 %. což značí, v souladu s literárními údaji [38], že kalafuna není silně vázaná na pigment. Doba působení ultrazvukové lázně neměla na vyextrahované množství kalafuny žádný vliv, proto optimalizovaná extrakce probíhala bez ultrazvuku.

Pro potřeby diplomové práce byly k dispozici standardy kyseliny abietové a neoabietové. Další standardy pryskyřičných kyselin nebyly k dispozici z důvodu jejich nedostupnosti na trhu, resp. z velice vysoké ceny.

Analyzované vzorky kalafun lze rozdělit na kalafunáty (50% sodné mýdlo, Sylvaros), disproporcionované (kalafuna DRA, kalafunát Sylvaros), hydrogenované (kalafuna Foral AX-E), částečně hydrogenované (kalafuna Staybelite) a nemodifikované kalafuny (jakost WW, k dispozici od třech dodavatelů).

Kapalinovou chromatografií bylo zjištěno, že disproporcionované vzorky obsahují pouze kyselinu dehydroabietovou. U kalafun jakosti WW byly stanoveny hodnoty kyseliny neoabietové

a kyseliny abietové, které se podařilo chromatograficky úplně rozlišit při isokratické eluci 70% acetonitrem na koloně Kinetex C18. Hydrogenovanou kalafunu přítomnou ve vzorcích červeného pigmentu C, D a E není kvůli absenci chromoforu možné s HPLC-DAD identifikovat.

Velmi důležité jsou toxikologické vlastnosti kalafuny, přičemž závisí na tom, zda je kalafuna ve formě volné kyseliny nebo soli. Kalafunát přítomný ve vzorcích pigmentu je v koncentraci větší než 1 hm. % dráždivý pro oko, senzibilizující pro kůži a toxický pro vodní organismy, zatímco kalafuna ve stejné koncentraci je pouze senzibilizující pro kůži.

Obě metody mají své výhody i nevýhody. Pomocí acidobazické titrace lze rozlišit mezi volnou kalafunou a kalafunátem, což u HPLC není možné. Nicméně je to metoda neselektivní a lze ji ovlivnit hodnotou pH matrice, která u HPLC není problémem, lze také sledovat poměry jednotlivých kyselin ve vzorku.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] L. DUŠEK. *Organické pigmenty*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2004.
- [2] Organické pigmenty, fotografie [online].
Dostupné z: <https://www.flickr.com/photos/vosya/7954172792/in/photostream/>
- [3] V. AMBROGI, C. CARFAGNA, P. CERRUTI, V. MARTURANO. *Additives in Polymers. Modification of Polymer Properties*. Elsevier, 2017, s. 87-108. DOI: 10.1016/B978-0-323-44353-1.00004-X [online].
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978032344353100004X>
- [4] R. GOTZMANN, osobní sdělení pracovníka společnosti Synthesia, a.s.
- [5] Color Index. Webové stránky vyvinuté Americkou asociací barvářů a barvířů ve spolupráci s Americkou asociací textilních chemiků a koloristů [online].
Dostupné z: <https://colour-index.com/introduction-to-the-colour-index#CN%20and%20Organic%20Pigments>
- [6] P. LADEN. *Chemistry and Technology of Water Based Inks*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1996 [online].
- [7] W. HERBST, K. HUNGER, G. WILKER, H. OHLEIER, R. WINTER. *Industrial Organic Pigments*. Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2004 [online].
- [8] Profil společnosti Synthesia, a.s [online].
Dostupné z: <https://www.synthesia.eu/cze/o-spolecnosti/profil-spolecnosti>
- [9] Pardubice živě. Online zpravodajství pro pardubický kraj [online].
Dostupné z: <http://www.pardubicezive.eu/pardubicka-chemicka-se-diky-miliardovym-investicim-meni-v-moderni-firmu/>
- [10] L. HOLUB. *Pohled do historie Synthesie: 1920 - 2000*. Pardubice, 2000 [online].
- [11] Oficiální webové stránky společnosti Synthesia: Kompletní sortiment pigmentů pro nátěrové hmoty [online].

- Dostupné z: <https://pigments.synthesia.eu/cze/organicke-pigmenty/pro-naterove-hmoty>
- [12] Oficiální webové stránky společnosti Synthesia: Kompletní sortiment pigmentů pro tiskové barvy [online].
Dostupné z: <https://pigments.synthesia.eu/cze/organicke-pigmenty/pro-tiskove-barvy>
- [13] Oficiální webové stránky společnosti Synthesia: Kompletní sortiment pigmentů pro plasty [online].
Dostupné z: <https://pigments.synthesia.eu/cze/organicke-pigmenty/pro-plasty>
- [14] J. COPPEN, J. W. A. HONE. *Gum Naval Stores: Turpentine and Rosin from Pine Resin*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1995 [online].
- [15] Encyklopaedia Britannica: Rosin Chemistry. Webová encyklopedie [online].
Dostupné z: <https://www.britannica.com/technology/rosin>
- [16] Těžba pryskyřice. Projekt spolufinancovaný Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem ČR InoBio [online].
Dostupné z: <https://docplayer.cz/9089230-Tezba-pryskyrice-tento-projekt-je-spolu-financovan-evropskym-socialnim-fondem-a-statnim-rozpocetem-cr-inobio-cz-1-07-2-2-00-28-0018.html>
- [17] Universidad Politécnica de Madrid: Resin Tapping Modifications May Yield Greater Production. Vzdělávací portál [online].
Dostupné z: <https://phys.org/news/2015-05-resin-modifications-yield-greater-production.html>
- [18] P. J. KERSTEN, B. J. KOPPER, K. F. RAFFA, B. L. ILLMAN. Rapid Analysis of Abietanes in Conifers. *Journal of Chemical Ecology*. 2006, 32(12), 2679-2685 [cit. 2018-12-07]. DOI: 10.1007/s10886-006-9191-z [online].
Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10886-006-9191-z>
- [19] Kolofón. Wikipedie: otevřená encyklopedie [online].
Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Kolof%C3%B3n>

- [20] S. SADHRA, C. N. GRAY, I. S. FOULDS. High-performance Liquid Chromatography of Unmodified Rosin and its Applications in Contact Dermatology. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1997, 700(1-2), 101-110. DOI: 10.1016/S0378-4347(97)00293-4 [online].
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378434797002934>
- [21] M. ROUSKOVÁ, A. HEYBERGER, J. TŘÍSKA, M. KRTIČKA. Kapalinová extrakce fytoesterolů a dalších cenných látek z tálových mýdel. *Chem. Listy* 105, 251-255 (2011) [online].
- [22] L. MCKEON, F. REGAN, B. BURNS, R. LEONARD. Determination of Resin Acid Composition in Rosin Samples Using Cyclodextrin-modified Capillary Electrophoresis. *Journal of Separation Science*. 2014, 37(19), 2791-2796. DOI: 10.1002/jssc.201400014 [online].
Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201400014>
- [23] G. F. CHEN. *Progress in Organic Coatings*. 20. USA: Elsevier Sequoia, 1992, 139-167 [online].
- [24] N. M. JOYE, R. V. LAWRENCE. Resin Acid Composition of Pine Oleoresins. *Journal of Chemical & Engineering Data*. 1967, 12(2), 279-282. DOI: 10.1021/je60033a034 [online].
Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/je60033a034>
- [25] R. FUJII, K. ARIMOTO, D. F. ZINKEL. Dimeric Components from the Dimerization of Abietic Acid. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1987, 64(8), 1144-1149. DOI: 10.1007/BF02612991 [online].
Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1007/BF02612991>
- [26] G. PENG, J. C. ROBERTS. Solubility and Toxicity of Resin Acids. *Water Research* [online]. 2000, 34(10), 2779-2785. DOI: 10.1016/S0043-1354(99)00406-6 [online].
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135499004066>
- [27] Webové stránky European Chemicals Agency (ECHA) [online].
Dostupné z: <https://echa.europa.eu/cs/registration-dossier/-/registered-dossier/15505/4/9>

- [28] U. NILSSON, N. BERGLUND, F. LINDAHL, S. AXELSSON, T. REDEBY, P. LASSEN, A.T. KARLBERG. SPE and HPLC/UV of Resin Acids in Colophonium-containing Products. *Journal of Separation Science*. 2008, 31(15), 2784-2790. DOI: 10.1002/jssc.200800210 [online].
Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200800210>
- [29] K. J. van den BERG. Analysis of Diterpenoid Resins and Polymers in Paint Media and Varnishes with an Atlas of Mass Spectra. MOLART Report 10. FOM Institute AMOLF Amsterdam 2003 [online].
Dostupné z: http://wiki.collectiewijzer.nl/images/8/84/Molart_Report_10.pdf
- [30] K. HROBOŇOVÁ, J. LEHOTAY, I. SKAČÁNI, J. ČIŽMÁRIK. HPLC Determination and MS Identification of Dehydroabietic Acid and Abietic Acid in Propolis. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2005, 28(11), 1725-1735. DOI: 10.1081/JLC-200060463 [online].
Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/JLC-200060463>
- [31] Strings. Online časopis pro hudebníky [online].
Dostupné z: <http://stringsmagazine.com/the-differences-between-dark-and-amber-rosin/>
- [32] Eastman. Webové stránky výrobce pryskyřičných produktů [online].
Dostupné z: https://www.eastman.com/Markets/Tackifier_Center/Tackifier_Families/Rosin_Resins/Pages/Rosin_Resins.aspx
- [33] Foreverest. Webové stránky výrobce pryskyřičných produktů [online].
Dostupné z: <https://foreverest.cn/news-list/application-of-gum-rosin>
- [34] SIMO Research Institute of Organic Chemistry: Types of Foaming Agents. Webové stránky institutu SIMO [online].
Dostupné z: <http://www.simo-chem.com/news/types-of-foaming-agents-14983507.html>
- [35] GM Electronic. Prodejce tavidel, kalafun a příbuzných výrobků [online].
Dostupné z: <https://www.gme.cz/kalafuna-plech-25g>
- [36] Connolly Music Company: String Family: Violins, Violas, Cellos. Online časopis pro hudebníky [online].

- Dostupné z: <https://www.connollymusic.com/stringovation/how-to-rosin-your-bow>
- [37] Johnson String Instrument: Strad Rosin for Violin. Prodejce strunných nástrojů a příslušenství [online].
Dostupné z: <https://www.johnsonstring.com/cgi-bin/music/scripts/violin-violacello-music.cgi?itemno=RNVVSTRAD>
- [38] F. RIDDELL. Effects of Abietic Acid Derivative Rosination on C.I. Pigment Yellow 13. *Dyes and Pigments*. 1997, 35(3), 191-203. DOI: 10.1016/S0143-7208(96)00114-3 [online].
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143720896001143>
- [39] W. CZAJKOWSKI, F. JONES. Investigation of the Effects of Rosination in the Preparation of Lithol Red R (C.I. Pigment Red 49). *Journal of the Society of Dyers and Colourists*. 1977, 93(8), 313-317. DOI: 10.1111/j.1478-4408.1977.tb03365.x [online].
Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1478-4408.1977.tb03365.x>
- [40] P. E. JAMESON. The Liebermann-Storch Color Test for Rosin-A Correction. *Journal of Industrial & Engineering Chemistry*. 1916, 8(9), 855-855. DOI: 10.1021/i500009a602 [online].
Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/i500009a602>
- [41] G. G. SWARD. *Paint Testing Manual: Physical and Chemical Examination of Paints, Varnishes, Lacquers, and Colors*. Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 1972.
- [42] E. H WIRTH. The Detection of Rosin in Official Resins, Gum-resins and Balsams**Scientific Section, A. Ph. A., Asheville meeting, 1923. *The Journal of the American Pharmaceutical Association* (1912). 1924, 13(6), 520-531. DOI: 10.1002/jps.3080130604 [online].
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0898140X15353192>
- [43] Vnitřní dokumentace společnosti Synthesia, a. s.
- [44] D. W. MCMARTIN, K. M. PERU, J. V. HEADLEY, M. WINKLER, J. A. GILLIES. Evaluation of Liquid Chromatography–Negative Ion Electrospray Mass Spectrometry for the Determination of Selected Resin Acids in River Water. *Journal of*

Chromatography A. 2002, 952(1-2), 289-293. DOI: 10.1016/S0021-9673(02)00106-1 [online].

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967302001061>

- [45] A. RIGOL, A. LATORRE, S. LACORTE, D. BARCELÓ. Direct Determination of Resin and Fatty Acids in Process Waters of Paper Industries by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 2003, 38(4), 417-426 [cit. 2019-04-10]. DOI: 10.1002/jms.454 [online].

Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jms.454>

- [46] D. A. SKOOG, F. J. HOLLER, S. R. CROUCH. *Principles of Instrumental Analysis*. 6th ed. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole, c2007 [online].

- [47] I. Ya. YASHIN, A. Ya. YASHIN. *Liquid Chromatography. Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*. Elsevier, 2012, s. 285-310. DOI: 10.1016/B978-0-12-384862-8.00010-8 [online].

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123848628000108>

- [48] J. G. SHACKMAN. *General Instrumentation. Liquid Chromatography*. Elsevier, 2013, s. 283-306. DOI: 10.1016/B978-0-12-415807-8.00013-4 [online].

Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124158078000134>

- [49] J. CHURÁČEK. *Analytická separace látek*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990.

- [50] HPLC. Webové stránky zaměřené na vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. [online]

Dostupné z: <http://hplc.cz/>

- [51] Český lékopis: Pharmacopoea bohemica. 2. dopl. vyd. Praha: Grada Publishing, 1997.

- [52] E. D. SKAKOVSKII, L. Yu. TYCHINSKAYA, O. A. GAIDUKEVICH, N. G. KOZLOV, A. Yu. KLYUEV, S. A. LAMOTKIN, S. I. SHPAK, S. V. RYKOV. NMR Determination of the Composition of Balsams from Scotch Pine Resin. *Journal of Applied Spectroscopy*. 2008, 75(3), 439-443. DOI: 10.1007/s10812-008-9065-y [online].

PŘÍLOHY

Příloha 1 Stanovení kovů ve vzorcích kalafuny

Prvek	Obsah solí [mg/kg]		
	Kalafuna WW	Kalafuna Foral AX-E	50% sodné mýdlo
Ag	< 15	< 15	< 15
Al	7	3	5
As	< 25	< 25	< 25
B	< 25	< 25	< 25
Be	< 5	< 5	< 5
Bi	< 25	< 25	< 25
Ba	< 25	< 25	< 25
Cd	< 1,5	< 1,5	< 1,5
Ca	336	120	270
Co	< 15	< 15	< 15
Cr	< 10	< 10	< 10
Cu	< 15	< 15	< 15
Fe	18	9	16
K	18	37	500
Li	< 15	< 15	< 15
Mg	5	4	6
Mn	< 15	< 15	< 15
Mo	< 15	< 15	< 15
Na	203	50	48000
Ni	< 15	< 15	< 15
P	18	25	15
Pd	< 15	< 15	< 15
Pb	< 25	< 25	< 25
Sb	< 25	< 25	< 25
Se	< 25	< 25	< 25
Sn	< 25	< 25	< 25
Sr	< 5	< 5	< 5
Ti	< 15	< 15	< 15
Tl	< 25	< 25	< 25
Zn	8	4	< 15

Příloha 2 Vliv extrakčního činidla na výtěžnost

Extrakční činidlo	Navážka [mg]	Kyselina neoabietová			Kyselina abietová		
		Plocha	Průměrná plocha pro navážku 250 mg	SD	Plocha	Průměrná plocha pro navážku 250 mg	SD
Methanol	254,2	159,4	156,0	1,0	354,8	350,4	1,1
	248,5	153,6			349,5		
	249,7	156,4			350,3		
Acetonitril	249,4	60,5	58,7	1,3	134,5	133,0	3,1
	249,7	57,8			128,5		
	250,3	57,8			135,6		
THF	251,6	149,2	149,5	1,6	356,0	358,0	3,1
	250,5	152,0			361,4		
	250,9	149,0			360,8		
DMSO	250,5	159,3	157,6	1,0	366,1	361,6	2,7
	252,8	158,5			363,6		
	252,9	159,0			364,0		

Příloha 3 Vliv doby ultrazvukové extrakce na výtěžnost

Doba ULZ extrakce [min]	Navážka [mg]	Kyselina neoabietová			Kyselina abietová		
		Plocha	Průměrná plocha pro navážku 250 mg	SD	Plocha	Průměrná plocha pro navážku 250 mg	SD
0	252,7	155,5	153,4	0,5	353,3	348,34	1,6
	256,6	156,8			355,3		
	253,2	155,6			354,0		
5	253,0	153,5	154,3	2,1	349,9	350,7	4,7
	250,4	157,2			357,6		
	252,1	155,5			352,4		
15	254,2	159,4	154,9	1,4	354,8	348,6	0,4
	248,5	152,5			346,7		
	250,3	154,8			348,4		
30	250,8	164,0	158,3	4,2	367,9	356,8	7,5
	250,2	153,2			349,0		
	250,4	158,7			355,6		

Příloha 4 Kalibrační data pro závislost kyseliny neoabietové (n = 3)

Kalibrační bod	Pipetovaný objem zásobního roztoku [ml]	Koncentrace [µg/ml]	Průměrná plocha píku
1	0,01	1,0	7,7
2	0,05	4,9	40,4
3	0,1	9,9	79,8
4	0,15	14,8	121,7
5	0,2	19,8	160,4
6	0,25	24,7	202,4
7	0,3	29,7	248,2
8	0,35	34,6	287,9
9	0,4	39,6	329,5
10	0,45	44,5	366,8
11	0,5	49,5	412,0
12	0,55	54,4	451,9
13	0,6	59,4	495,4

Příloha 5 Kalibrační data pro závislost kyseliny abietové (n = 3)

Kalibrační bod	Pipetovaný objem zásobního roztoku [ml]	Koncentrace [µg/ml]	Průměrná plocha píku
1	0,1	9,8	41,6
2	0,3	29,4	122,7
3	0,4	39,3	162,5
4	0,6	58,9	250,6
5	0,7	68,7	285,6
6	0,9	88,3	368,5
7	1	98,1	412,7
8	1,1	107,9	448,0
9	1,3	127,6	535,4
10	1,4	137,4	567,8
11	1,6	157,0	658,5
12	1,7	166,8	692,6
13	1,9	186,5	791,5
14	2	196,3	829,5

Příloha 6 Parametry kalibračních závislostí, koeficienty determinace, meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) pro jednotlivé standardy

Standard	Koncentrační rozsah [µg/ml]	Rovnice regrese	LOD [µg/ml]	LOQ [µg/ml]
Kyselina neoabietová	1–59,4	$y = 8,35 \cdot x - 2,13$	0,25	0,68
Kyselina abietová	9,8–196,3	$y = 6,07 \cdot x - 2,21$	0,28	0,72

Příloha 7 HPLC analýza vzorků kalafuny

Vzorek kalafuny	Navážka [mg]	Kyselina neoabietová				Kyselina abietová			
		Plocha	c [Hm. %]	Průměrná hodnota c [Hm. %]	SD	Plocha	c [Hm. %]	Průměrná hodnota c [Hm. %]	SD
WW Guangdong	99,7	52,6	1,3	1,8	0,4	612,1	29,3	29,0	0,2
	100,4	81,1	2,0			609,9	29,0		
	100,6	82,5	2,0			609,5	28,9		
Sodné mýdlo	113,4	23,9	0,3	0,3	0,01	291,5	6,1	6,5	0,3
	107,5	23,4	0,3			303,6	6,7		
	103,3	22,8	0,3			283,2	6,5		
DRA	100,2	0	0	0	0	0	0	0	0
	99,6	0	0			0	0		
	99,7	0	0			0	0		
WW Brenntag	99,2	158,1	3,9	4,3	0,4	562,7	27,0	28,1	1,0
	100,7	188,9	4,5			604,7	28,6		
	100,7	190,5	4,6			607,9	28,8		
Staybelite	101,9	0	0	0	0	0	0	0	0
	100,2	0	0			0	0		
	101,3	0	0			0	0		
Foral AX-E	100,6	0	0	0	0	0	0	0	0
	99,7	0	0			0	0		
	99,9	0	0			0	0		
WW Sunny	100,1	80,8	2,0	1,8	0,2	601,9	28,7	27,7	1,2
	100,2	66,3	1,6			544,7	25,9		
	99,8	75,9	1,9			594,3	28,4		

Příloha 8 HPLC analýza vzorku žlutého pigmentu A

Vzorek žlutého pigmentu A	Navážka [mg]	Kyselina neoabietová				Kyselina abietová			
		Plocha	c [Hm. %]	Průměrná hodnota c [Hm. %]	SD	Plocha	c [Hm. %]	Průměrná hodnota c [Hm. %]	SD
Odsušená suspenze	253,7	238,3	0,567	0,575	0,01	547,6	2,574	2,577	0,003
	251,5	241,0	0,579			544,0	2,579		
	251,6	241,1	0,579			544,3	2,579		
Pasta odsušená v sušárně	253,4	263,9	0,629	0,657	0,02	545,8	2,568	2,685	0,10
	250,5	278,4	0,671			576,6	2,744		
	251,3	279,6	0,671			578,3	2,743		
Provozně odsušená pasta	250,6	318,3	0,766	0,710	0,05	637,5	3,031	2,978	0,10
	253,1	297,1	0,708			610,4	2,874		
	250,5	272,2	0,7656			637,0	3,030		

Příloha 9 HPLC analýza vzorku žlutého pigmentu B

Vzorek žlutého pigmentu B	Navážka [mg]	Kyselina neoabietová				Kyselina abietová			
		Plocha	c [Hm. %]	Průměrná hodnota c [Hm. %]	SD	Plocha	c [Hm. %]	Průměrná hodnota c [Hm. %]	SD
Odsušená suspenze	249,7	27,8	0,072	0,070	0,002	214,2	1,029	0,99	0,03
	253,8	26,7	0,068			203,4	0,962		
	251,6	26,8	0,069			207,3	0,988		
Pasta odsušená v sušárně	250,5	51,4	0,128	0,126	0,002	341,6	1,629	1,62	0,01
	251,1	49,7	0,124			336,0	1,599		
	250,5	51,0	0,127			340,1	1,627		
Provozně odsušená pasta	251,7	55,8	0,138	0,132	0,004	350,1	1,662	1,61	0,04
	252,2	52,2	0,129			334,2	1,584		
	252,3	52,9	0,130			335,3	1,588		

Příloha 10 HPLC analýza filtrátů

	Kyselina neoabietová				Kyselina abietová			
	Plocha	c [mg/l]	Průměrná hodnota c [mg/l]	SD	Plocha	c [mg/l]	Průměrná hodnota c [mg/l]	SD
Filtrát začátek	18,0	9,7	9,5	0,2	60,0	59,0	58,9	0,6
	17,1	9,2			59,7	58,7		
	17,9	9,6			58,4	57,5		
Filtrát po 10 min	53,8	26,8	27,0	0,2	124,4	120,2	120,7	0,4
	54,4	27,1			125,3	121,1		
	53,2	26,5			124,4	120,2		
Filtrát konec	60,0	29,8	29,8	0,1	139,3	134,4	133,9	1,0
	60,0	29,8			138,3	133,4		
	59,5	29,5			136,9	132,1		
Technologická voda po 5 hod	18,2	9,8	9,8	0,1	48,0	47,7	47,7	0,4
	18,2	9,7			48,1	47,7		
	18,0	9,6			47,2	46,9		
Technologická voda konec	237,3	114,7	107,0	6,4	561,0	535,0	502,0	27,9
	205,2	99,3			491,4	468,9		
	215,5	104,2			510,4	486,9		
DEMI voda po 4 m ³	255,5	123,4	123,2	1,1	546,9	521,6	521,0	1,9
	254,6	123,0			545,5	520,3		
	250,4	120,9			542,0	517,0		
DEMI voda konec	186,1	90,1	90,1	0,3	398,7	380,8	380,4	0,4
	185,8	90,0			397,9	380,0		
	184,8	89,5			397,6	379,8		

Příloha 11 HPLC analýza vzorku červených pigmentů A a B

Vzorek	Navážka [mg]	Kyselina neoabietová				Kyselina abietová			
		Plocha	c [Hm. %]	Průměrná hodnota c [Hm. %]	SD	Plocha	c [Hm. %]	Průměrná hodnota c [Hm. %]	SD
Červený pigment A	254,1	15,9	0,043	0,041	0,002	169,4	0,802	0,807	0,004
	254,1	14,2	0,038			170,9	0,809		
	255,0	16,1	0,043			171,8	0,810		
Červený pigment B	254,2	15,7	0,042	0,041	0,001	176,0	0,832	0,829	0,002
	253,6	15,3	0,041			174,6	0,828		
	253,5	15,2	0,041			174,5	0,828		

Příloha 12 Acidobazická titrace vzorků kalafuny

Vzorek kalafuny	Navážka vzorku [mg]	Spotřeba NaOH [ml]	Spotřeba HCl [ml]
WW (Guangdong)	84,1	2,46	2,31
WW (Sunny)	94,1	2,87	2,74
WW (Brenntag)	52,3	1,75	1,70
50% sodné mýdlo	83,9	0,44	2,31
DRA	53,7	1,60	1,58
Staybelite	79,1	2,40	2,29
Foral AX-E	82,5	2,63	2,50

Příloha 13 Acidobazická titrace vzorků pigmentu

Vzorek		Navážka vzorku [g]	Spotřeba NaOH [ml]	Spotřeba HCl [ml]	
Žlutý pigment	A	Suspenze pigmentu (Odsušená na vzduchu)	1,559	0,27	28,02
		Pasta pigmentu (Odsušená v laboratorní sušárně)	1,472	0,63	1,77
		Pasta pigmentu (Provozně odsušená)	1,774	0,81	2,27
	B	Suspenze pigmentu (Odsušená na vzduchu)	1,478	0,75	10,57
		Pasta pigmentu (Odsušená v laboratorní sušárně)	1,172	1,36	1,42
		Pasta pigmentu (Provozně odsušená)	1,269	1,57	1,66
Červený pigment	A	Pasta pigmentu (Provozně odsušená)	1,443	3,32	4,18
	B		1,364	0,81	4,61
	C		1,359	1,80	3,10
	D		1,450	2,79	4,19
	E		1,602	1,57	1,66

Příloha 14 Porovnání titračního a HPLC stanovení obsahu kalafuny v pigmentech

Vzorek		HPLC			Titrace		
		Kyselina neoabietová	Kyselina abietová	Pryskyřičné kyseliny součet	Volná	Celková	Sůl
		c [Hm. %]	c [Hm. %]	c [Hm. %]	c [Hm. %]	c [Hm. %]	c [Hm. %]
Žlutý pigment A	Suspenze (Odsušená na vzduchu)	0,6	2,6	3,2	–	–	–
	Pasta (Laboratorní sušárna)	0,6	2,7	3,3	1,3	3,7	2,3
	Pasta (Provozní odsušení)	0,7	3,0	3,7	1,4	3,9	2,5
Žlutý pigment B	Suspenze (Odsušená na vzduchu)	0,1	1,0	1,1	–	–	–
	Pasta (Laboratorní sušárna)	0,1	1,6	1,7	3,6	3,7	0,1
	Pasta (Provozní odsušení)	0,1	1,6	1,7	3,9	4,0	0,1
Červený pigment A	Pasta (Provozní odsušení)	0,04	0,8	0,8	7,1	9,1	2,0
Červený pigment B	Pasta (Provozní odsušení)	0,04	0,8	0,8	1,8	10,5	8,7