

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Analytické a toxikologické hodnocení kvality červeného pigmentu P.R.177

Bc. Barbora Pulkrábková

Diplomová práce

2018

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2017/2018

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Barbora Pulkrábková**  
Osobní číslo: **C16548**  
Studijní program: **N1407 Chemie**  
Studijní obor: **Analytická chemie**  
Název tématu: **Analytické a toxikologické hodnocení kvality červeného pigmentu P.R. 177**  
Zadávající 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. Rešeršně zpracujte výrobu červeného pigmentu P.R. 177 a možnosti jeho analytického a toxikologického hodnocení.
2. Vypracujte postup pro stanovení vybraných nečistot v pigmentu P.R. 177 včetně jeho toxikologického hodnocení s využitím AMES testu.
3. Výsledky kriticky zhodnoťte a diskutujte.

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.**

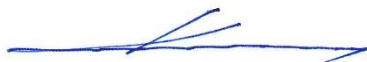
Synthesia a.s. Pardubice

Datum zadání diplomové práce:

**20. února 2018**

Termín odevzdání diplomové práce:

**11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

## **Prohlášení autora**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně. Všechny podklady a použité zdroje 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.

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

V Pardubicích dne

.....

Barbora Pulkrábková

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Janu Fischerovi, CSc., za čas, který mi věnoval při konzultacích, za pomoc a cenné rady při konzultacích. Také bych chtěla poděkovat Ing. Janu Vyňuchalovi, Ph.D. a Ing. Kateřině Šimkové za konzultace a rady při měření experimentální části ve společnosti Synthesia, a.s. Velké poděkování také patří doc. Ing. Petře Lovecké, Ph.D. za její rady a pomoc při měření Ames testu na VŠCHT v Praze. Dále bych chtěla poděkovat mému příteli a rodině za podporu a trpělivost během psaní diplomové práce.

## **Anotace**

Diplomová práce se zabývá stanovením obsahu nečistot v červeném pigmentu P.R.177 a toxikologickým hodnocením identifikovaných nečistot tohoto pigmentu. Byl optimalizován postup extrakce nečistot z pigmentu, nejlepších výsledků bylo dosaženo ultrazvukovou extrakcí pomocí DMSO po dobu 60 minut při 80 °C s velikostí navážky 1 g pigmentu. Extrakt byl analyzován kapalinovou chromatografií a jako hlavní nečistoty byly identifikovány dosud známé ASK, AHASK, BAK, DADADSK, 1-AA a AHAQ. Pomocí hmotnostní spektrometrie byla identifikována další nečistota DADASK. Genotoxické vlastnosti těchto nečistot byly testovány na kmenech *Salmonelly typhimurium*, his- TA 98 a TA 100. Zatímco na kmeni *Salmonelly typhimurium*, his- TA 98 nebyla prokázána mutagenita žádných testovaných nečistot, na kmeni *Salmonelly typhimurium*, his- TA 100 byla indikována mutagenita AHASK, ASK a 1-AA při jejich některých koncentračních hladinách.

## **Klíčová slova**

P.R. 177, extrakce, antrachinonové pigmenty, kapalinová chromatografie, Ames test, genotoxicita

## **Title**

Analytical and toxicological evaluation of the quality of the red pigment P.R.177

## **Annotation**

In this diploma thesis, determination of impurities in red pigment P.R.177 is described and toxicological evaluation of identified impurities of this pigment is given. The extraction protocol of impurities was optimized, the best results were achieved using the extraction of 1 g of pigment in ultrasonic bath with DMSO as the extraction solvent for 60 minutes at 80 °C. Extracts of pigments samples were analyzed by HPLC and so far known impurities ASK, AHASK, BAK, DADADSK, 1-AA a AHAQ were found. Another impurity DADASK was identified in the extract and its structure was elucidated by the LC/MS experiment. Genotoxicity of these impurities were tested on *Salmonella typhimurium* TA 98 and *Salmonella typhimurium* TA 100 strains. While no of tested impurities were mutagenic on the TA 98 strain, mutagenicity of AHASK, ASK and 1-AA at particular concentration level was indicated on the TA 100 strain.

## **Key words**

P.R. 177, extraction, anthraquinones pigments, liquid chromatography, Ames test, genotoxicity

## OBSAH

Úvod.....	16
1. Teoretická část.....	17
1.1. Obecné pojmy.....	17
1.1.1. Colour Index.....	17
1.1.2. Fyzikální a chemické vlastnosti pigmentů.....	17
1.2. Organické pigmenty.....	18
1.2.1. Rozdělení organických pigmentů.....	19
1.2.2. Antrachinonové koloranty.....	19
1.2.2.1. Antrachinon.....	20
1.2.2.2. Aminoantrachinonové koloranty.....	21
1.2.2.3. Hydroxyantrachinonové koloranty.....	22
1.3. Výroba pigmentů v Synthesia, a.s.....	25
1.3.1. Společnost Synthesia, a.s.....	25
1.3.2. Pigmenty vyráběné společností Synthesia, a.s.....	26
1.4. Ullmannova reakce.....	27
1.5. Pigment Red 177.....	30
1.5.1. Výroba P.R.177 ve společnosti Synthesia, a.s.....	31
1.5.1.1. Princip výroby.....	31
1.5.1.2. Syntéza DADADSK.....	33
1.6. Chromatografie.....	34
1.6.1. Rozdělení chromatografických technik.....	35
1.6.2. Kapalinová chromatografie.....	35
1.6.2.1. Instrumentace HPLC.....	36
1.6.2.2. Vyhodnocení dat.....	39
1.7. Sublimace.....	40
1.8. Amesův test mutagenity.....	40
1.8.1. Princip testu.....	40
1.8.2. Genotoxicita antrachinonových barviv.....	42
2. Experimentální část.....	45
2.1. Seznam chemikálií.....	45



2.2. Seznam použitých přístrojů.....	46
2.3. Kapalinový chromatograf Agilent Infinity 1260.....	46
2.4. Podmínky analýzy experimentu kapalinovou chromatografií.....	48
2.5. Analýza s využitím hmotnostního spektrometru.....	48
2.5.1. Podmínky analýzy s přímým vstupem vzorku.....	48
2.5.2. HPLC analýza.....	49
2.6. Podmínky analýzy pigmentu sublimací.....	49
2.7. Syntéza DADADSK.....	50
2.8. Příprava kalibračních standardů.....	52
2.9. Analyzované vzorky.....	53
2.9.1. Obecný postup přípravy vzorků k analýze.....	54
2.10. Amesův test.....	54
2.10.1. Příprava vzorků a medií pro Amesův test.....	54
2.10.2. Provedení měření.....	56
3. Výsledky a diskuze.....	58
3.1. Kalibrační měření.....	58
3.2. Optimalizace extrakce nečistot z pigmentu P.R.177.....	63
3.2.1. Výběr vhodného rozpouštědla pro extrakci.....	63
3.2.2. Vliv doby extrakce v ultrazvukové lázni na výtěžek.....	67
3.2.3. Vliv teploty ultrazvukové lázně na extrakci.....	68
3.2.4. Vliv navážky pigmentu na extrakci.....	69
3.2.5. Extrakce vzorků za optimalizovaných podmínek.....	72
3.3. Vícenásobná extrakce nečistot z pigmentu P.R.177.....	74
3.4. Sublimace.....	81
3.5. Vyhodnocení Amesova testu.....	83
4. Závěr.....	87
Seznam použité literatury.....	89
Přílohy.....	95

## SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Struktura antrachinonu .....	20
Obrázek 2: Výroba 1-aminoantrachinonu.....	21
Obrázek 3: Struktura purpurinu .....	22
Obrázek 4: Struktura alizarinu .....	23
Obrázek 5: Struktura chinizarinu .....	23
Obrázek 6: Struktura emodinu .....	24
Obrázek 7: Struktura kyseliny karmínové .....	25
Obrázek 8: Obecné schéma Ullmanovy reakce .....	27
Obrázek 9: Struktura pigmentu P.R.177 .....	31
Obrázek 10: Vybarvení P.R.177 ve směsi s TiO <sub>2</sub> .....	31
Obrázek 11: Schéma výroby P.R.177 .....	32
Obrázek 12: Reakce BAK za vzniku DADADSK, ASK, AHASK.....	33
Obrázek 13: Chromatografický proces, popis distribuce složek .....	34
Obrázek 14: Schéma kapalinového chromatografu .....	37
Obrázek 15: Schéma detektoru s diodovým polem .....	38
Obrázek 16: Vyhodnocení chromatografu .....	40
Obrázek 17: Amesův test mutagenity .....	42
Obrázek 18: Struktura aloe emodinu .....	44
Obrázek 19: Kapalinový chromatograf Agilent 1260 Infinity.....	47
Obrázek 20: Sublimační aparatura.....	50
Obrázek 21: Vzorky pigmentu P.R. 177 .....	53
Obrázek 22: Kalibrační přímka sodné soli 1-aminoantrachinon-2-sulfonové kyseliny (ASK).....	59
Obrázek 23: Kalibrační přímka disodné soli 4,4'-diamin-1,1'-diantrachinon-3,3'-disulfonové kyseliny (DADADSK).....	59
Obrázek 24: Kalibrační přímka sodné soli 1-amino-4-hydroxyantrachinon-2-sulfonové kyseliny (AHASK).....	60
Obrázek 25: Kalibrační přímka sodné soli 1-amino-4-bromo-2-antrachinon-2-sulfonové kyseliny (BAK) .....	60
Obrázek 26: Kalibrační přímka 1-aminoantrachinonu (1-AA).....	61
Obrázek 27: Kalibrační přímka 1-amino-2-hydroxyantrachinonu (AHAQ) .....	61

Obrázek 28: Chromatogram kalibračního roztoku sulfonovaných nečistot obsahující 0,086 g/l ASK, 0,082g/l DADADSK, 0,011 g/l AHASK a 0,056 g/l BAK .....	62
Obrázek 29: Chromatogram kalibračního roztoku nesulfonovaných nečistot obsahující 0,036 g/l 1-AA a 0,014 g/l AHAQ .....	63
Obrázek 30: Extrakce vzorku A acetonitrilem .....	64
Obrázek 31: Extrakce vzorku A tetrahydrofuranem.....	64
Obrázek 32: Extrakce vzorku A dioxanem.....	65
Obrázek 33: Extrakce vzorku A dimethylformamidem.....	66
Obrázek 34: Extrakce vzorku A dimethylsulfoxidem .....	66
Obrázek 35: Analýza extraktu vzorku A získaného za optimalizovaných podmínek extrakce.....	72
Obrázek 36: Analýza extraktu vzorku B získaného za optimalizovaných podmínek extrakce.....	72
Obrázek 37: Analýza extraktu vzorku C získaného za optimalizovaných podmínek extrakce.....	73
Obrázek 38: Struktura DADASK .....	74
Obrázek 39: Vyextrahované množství ASK pomocí vícenásobné extrakce v DMSO.....	76
Obrázek 40: Vyextrahované množství DADADSK pomocí vícenásobné extrakce v DMSO .....	77
Obrázek 41: Vyextrahované množství AHASK pomocí vícenásobné extrakce v DMSO .....	77
Obrázek 42: Vyextrahované množství 1-AA pomocí vícenásobné extrakce v DMSO.....	78
Obrázek 43: Vyextrahované množství AHAQ pomocí vícenásobné extrakce v DMSO .....	78
Obrázek 44:Vyextrahované množství 1-AA pomocí vícenásobné extrakce v THF.....	80
Obrázek 45: Vyextrahované množství AHAQ pomocí vícenásobné extrakce v THF .....	80
Obrázek 46: Vyextrahované množství AHASK pomocí vícenásobné extrakce v THF .....	81
Obrázek 47: Vliv sublimace na množství nečistot v pigmentu .....	82
Obrázek 48: Revertanty Salmonella typhimurium his – TA100 pro vzorek DADADSK.....	85
Obrázek 49: Revertanty Salmonelly typhimurium, his – TA 100, pozitivní kontrola.....	86

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Příklady pigmentů vyráběných Ullmannovou reakcí .....	28
Tabulka 2: Vlastnosti P.R.177 .....	30
Tabulka 3: Rozdělení chromatografických technik podle fázových systémů .....	35
Tabulka 4: Specifita DNA sekvencí jednotlivých kmenů .....	41
Tabulka 5: Mutageny použité pro pozitivní kontrolu .....	57
Tabulka 6: Mez detekce a mez kvantifikace.....	62
Tabulka 7: Hmotnostní obsah nečistot ve vzorku A extrahovaném s různou dobu v ultrazvukové lázni.....	67
Tabulka 8: Hmotnostní obsah nečistot ve vzorku B extrahovaném s různou dobu v ultrazvukové lázni.....	67
Tabulka 9: Hmotnostní obsah nečistot ve vzorku C extrahovaném s různou dobu v ultrazvukové lázni.....	68
Tabulka 10: Hmotnostní obsah nečistot ve vzorku A vyextrahovaném s různou teplotou ultrazvukové lázně .....	68
Tabulka 11: Hmotnostní obsah nečistot ve vzorku B vyextrahovaném s různou teplotou ultrazvukové lázně .....	69
Tabulka 12: Hmotnostní obsah nečistot ve vzorku C vyextrahovaném s různou teplotou ultrazvukové lázně .....	69
Tabulka 13: Koncentrace nečistot v mg/kg pigmentu v závislosti na velikosti zpracovávané navážky pro vzorek A .....	70
Tabulka 14: Koncentrace nečistot v mg/kg pigmentu v závislosti na velikosti zpracovávané navážky pro vzorek B .....	71
Tabulka 15: Koncentrace nečistot v mg/kg pigmentu v závislosti na velikosti zpracovávané navážky pro vzorek C .....	71
Tabulka 16: Hmotnostní obsah nečistot získaný vícenásobnou extrakcí vzorku A v DMSO .....	75
Tabulka 17: Hmotnostní obsah nečistot získaný vícenásobnou extrakcí vzorku B v DMSO .....	75
Tabulka 18: Hmotnostní obsah nečistot získaný vícenásobnou extrakcí vzorku C v DMSO .....	76
Tabulka 19: Hmotnostní obsah nečistot získaný vícenásobnou extrakcí vzorku A v THF .....	79
Tabulka 20: Hmotnostní obsah nečistot získaný vícenásobnou extrakcí vzorku B v THF .....	79
Tabulka 21: Hmotnostní obsah nečistot získaný vícenásobnou extrakcí vzorku C v THF .....	79

Tabulka 22: Vzorek AHASK testovaný bez metabolické aktivace na kmeni TA 100.....	83
Tabulka 23: Vzorek AHASK testovaný s metabolickou aktivací na kmeni TA 100 .....	83
Tabulka 24: Vzorek AHASK testovaný bez metabolické aktivace na kmeni TA 98.....	84
Tabulka 25: Vzorek AHASK testovaný s metabolickou aktivací na kmeni TA 98 .....	84
Tabulka 26: Výsledky Ames testu .....	85

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

1-AA	1-aminoantrachinon
ACN	Acetonitril
AHASK	Sodná sůl 1-amino-4-hydroxyantrachinon-2-sulfonové kyseliny
AHAQ	1-amino-2-hydroxyantrachinon
ASK	Sodná sůl 1-aminoantrachinon-2-sulfonové kyseliny
BAK	Sodná sůl 1-amino-4-bromo-2-anthrachinon-2-sulfonové kyseliny
C.I.	Colour Index
CICN	Colour Index Constitution Number
DAD	Detektor s diodovým polem
DADADSK	Disodná sůl 4,4'-diamin-1,1'-diantrachinon-3,3'-disulfonové kyseliny
DADASK	Sodná sůl 4,4'-diamin-1,1'-diantrachinon-3-sulfonové kyseliny
DB 3	Disperzní modř 3
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
GIGN	Colour Index Generic Name (GIGN)
HIS/BIO	Histidin/Biotin
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
MS	Hmotnostní spektrometrie
NP	Separální systém s normálními fázemi
L5178Y	Myší buňky pro Ames test genotoxicity

P.R.	Červený pigment
P.Y.	Žlutý pigment
RBBR	Rezmazol Brilliant Blue R
RP	Separáční systém s obrácenými fázemi
S9	Jaterní homogenát z potkana kmene Wistar
TA 98	Kmen Salmonelly typhimurium
TA 100	Kmen Salmonelly typhimurium
TA 1537	Kmen Salmonelly typhimurium
THF	Tetrahydrofuran
TiO <sub>2</sub>	Oxid titaničitý
UV/VIS	Ultrafialov/viditeln oblast
YG 1041	Kmen Salmonelly typhimurium
YG 1042	Kmen Salmonelly typhimurium

## Úvod

Historie pigmentů a barviv je doložena již v době kamenné, kdy byl pro estetické a rituální účely využíván grafit, či různě zbarvené hlíny. Velký nárůst používání pigmentů a barviv nastal ve starověku, nejvíce využívaný byl asphalt, křída či malachit. V 19. století nastal největší rozvoj v oblasti pigmentů a barviv. Historicky nejpoužívanějším organickým barvivem bylo indigo, které se získávalo z rostlin rodu *Indigofera*. Dalším velmi využívaným barvivem byl purpur získávaný z mořských plžů. První syntetické barvivo – mauvein, bylo syntetizováno v roce 1856, ale zdaleka nejdůležitější byl objev diazoniových barviv v roce 1862, který položil základ rozvoje výroby syntetických barviv a pigmentů.

Pigmenty a barviva hrají důležitou roli v každodenním životě, z hlediska jejich působení na lidský organismus. Každý den se s nimi setkáváme v potravinářství, barvených plastech, malířských barvách, automobilovém průmyslu a v mnoha dalších výrobcích včetně jejich aplikace ve farmacii či kosmetice. Světová spotřeba pigmentů a barviv nestále narůstá, a proto je otázka kontroly jejich kvality a dopadu na lidské zdraví a životní prostředí velmi důležitá.

Náplní této diplomové práce je analytické a toxikologické hodnocení kvality červeného pigmentu Pigment Red 177, který patří do skupiny polycyklických antrachinonových pigmentů. Tento pigment se používá hlavně pro barvení plastů, pro nátěrové hmoty a pro tiskové barvy. Některé nečistoty, respektive vedlejší produkty vznikající při syntéze tohoto pigmentu mohou být zdravotně závadné, proto je nutné mít k dispozici vhodnou analytickou metodu, kterou lze stanovit obsah těchto kontaminantů ve finálním výrobku. Zároveň je žádoucí charakterizovat možnou genotoxicitu těchto kontaminantů. Na obě dvě tyto otázky se snaží najít odpověď tato diplomová práce



# 1. Teoretická část

## 1.1. Obecné pojmy

Koloranty se rozdělují na pigmenty nebo barviva. Pigmenty jsou látky takřka nerozpustné v daném médiu, anorganické nebo organické povahy, barevné, černé nebo bílé [1]. Jedná se o materiál, který mění barvu odraženého světla, což je způsobeno absorpcí určitých vlnových délek. Výsledná barva je dána spektrem odražených vlnových délek světla. Organické pigmenty jsou téměř všechny syntetické, zatímco anorganické pigmenty lze dělit na přírodní (např. grafit, kaolin), syntetické, kovové – jemně mleté kovy (např. Al, Cu). Anorganické pigmenty mají lepší tepelnou stabilitu než pigmenty organické. Struktura pigmentu je pro snadnou identifikaci charakterizována pomocí C.I. (Colour Index) [2,3].

Barviva jsou látky rozpustné v daném médiu. Během jejich aplikace ztrácejí krystalickou strukturu. Rozdíl mezi pigmenty a barvivy je v jejich fyzikálních a chemických vlastnostech [2,3].

### 1.1.1. Colour index

Colour Index používá duální klasifikační systém skládající se z Colour Index Generic Name (GIGN) a Colour Index Constitution Number (CICN). CIGN je snadno zapamatovatelný, CICN je číslo barevného indexu, které je spojeno s chemickou strukturou [4].

### 1.1.2. Fyzikální a chemické vlastnosti pigmentů

Mezi hlavní fyzikální vlastnosti pigmentů patří krystalová modifikace, velikost povrchu, distribuce velikosti částic a tvar částic. Velikost částic je většinou menší než 1  $\mu\text{m}$ . Pigmenty tvoří primární a sekundární částice. Primární částice se stabilizují tvorbou částic sekundárních. Vznik sekundárních částic je spojen se stabilizováním jejich povrchové energie. Mezi sekundární částice patří aglomeráty a agregáty. Agregáty vznikají spojením ploch částic, aglomeráty jsou skupiny jednotlivých krystalů nebo agregátů vznikající spojením hran částic. Agregáty není možné rozdělit disperzací, zatímco aglomeráty ano [2,3].

Vlastnosti pigmentu jsou určeny chemickou strukturou, která následně ovlivňuje fyzikální vlastnosti krystalové struktury. Chemická struktura má vliv na barvu pigmentu a souvisí

s přítomností chromoforů v molekule. Jedná se o konjugovaný systém dvojných vazeb, který je zodpovědný za absorpci viditelného záření. Auxochrom je funkční skupina, která mění (zvyšuje) účinek chromoforu, způsobuje posun vlnových délek absorpčních maxim chromoforů a zvyšuje intenzitu pásů. Může docházet k následujícím efektům:

- Bathochromní (červený) posun – k delším  $\lambda$
- Hypsochromní (modrý) posun – ke kratším  $\lambda$
- Hyperchromický efekt – zvýšení intenzity absorpce
- Hypochromní efekt – snížení intenzity absorpce [5]

Barevnost molekuly je ovlivněna absorpcí elektromagnetického záření. Elektromagnetické záření způsobuje excitaci molekuly pigmentu, výsledný odstín také ovlivňuje poměr absorpce a odrazu světla [2,3].

## 1.2. Organické pigmenty

Organické pigmenty jsou převážně syntetické neboli uměle vyrobené pigmenty. V porovnání s anorganickými pigmenty mají menší hustotu, větší povrch, jsou více transparentní, mají větší barvicí sílu. Mezi další významné fyzikální a chemické vlastnosti patří tepelná stabilita a stálost v organických rozpouštědlech. Syntetické pigmenty pokrývají celé spektrum barev, přičemž většina z nich jsou azopigmenty, které jsou žluté, oranžové nebo červené [3,6].

Organické pigmenty mohou být i přírodní, získávané z živočišných nebo rostlinných zdrojů, např. mořenová červeň získaná z kořene mořeny barvířské nebo košenila z červce nopálového [3,6].

Využití pigmentů je velice široké, například pro nátěrové hmoty, tiskové barvy, plasty, textilní aplikace a automobilový průmysl [3].

### 1.2.1. Rozdělení organických pigmentů

Organické pigmenty se dělí na azopigmenty a polycyklické pigmenty, které se dále dělí na ftalocyaninové pigmenty, chinakridony, peryleny, dioxaziny, diketopyrrolo-pyrrolové pigmenty, chinoftalony, trialkylkarboniové pigmenty a deriváty antrachinonů [7].

Azo pigmenty mají žlutý až červený odstín. Dělí se na monoazo a diazo pigmenty obsahující jednu, respektive dvě  $-N=N-$  skupiny. Nízká termostabilita monoazo pigmentů omezuje jejich využití při výrobě plastů. Naopak vysoká termostabilita a chemická odolnost je u diazo pigmentů. Azo pigmenty jsou žluté až červené [8].

Polycyklické pigmenty neobsahují azoskupinu, ale obsahují lineárně-kondenzované aromatické jádro nebo cyklické fragmenty obsahující heteroatomy. Vykazují dobrou světlostálost a jsou odolné vůči migraci a rozpouštědlům. Polycyklické pigmenty se vyskytují v široké škále barevných odstínů. Do této skupiny se řadí **dioxazinové pigmenty** vykazující vynikající světlostálost, nižší termostabilitu, dobrou odolnost vůči rozpouštědlům a migraci. Barevně se jedná o fialové pigmenty. **Trialkylkarbonové pigmenty** charakterizuje nízká světlostálost a nízká odolnost vůči rozpouštědlům. Jsou používány pro jejich výbornou barevnou brilantnost a jasnost modrého odstínu. **Chinoftalonové pigmenty** mají strukturu tvořenou z ftalanhydridu a  $\alpha$ -methylchinolinu. Jsou velmi termostabilní. Barevný odstín těchto sloučenin je žlutý.

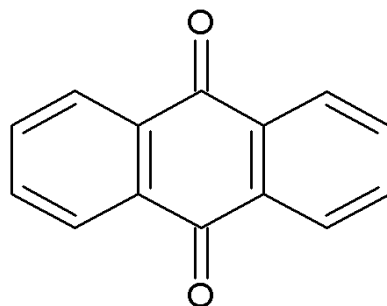
Mezi polycyklické pigmenty se také řadí i skupiny pigmentů, která využívá antrachinon jako vstupní komponentou pro jejich syntézu. Jedná se o flavantrony, indatrony či antantrony [3].

### 1.2.2. Antrachinonové koloranty

Antrachinonové pigmenty jsou deriváty antracenu. Antrachinony obsahují systém tří lineárních fúzovaných šestičtých kruhů, ve kterých jsou karbonylové skupiny umístěny na centrálním kruhu a zbylé dva kruhy jsou zcela aromatické. Jsou to silné, transparentní a světlostálé pigmenty zastupující žluté až červené odstíny. Antrachinonové pigmenty se dělí na 4 skupiny: aminoantrachinonové pigmenty, hydroxyantrachinonové pigmenty, heterocyklické antrachinonové pigmenty a polykarbocyklické antrachinonové pigmenty. Mezi heterocyklické antrachinonové pigmenty patří i pigmenty odvozené od 1,9-antrapyrimidinu [9]. Do této skupiny pigmentů patří i červený pigment P.R.177, kterým se zabývá tato diplomová práce.

### 1.2.2.1. Antrachinon

Antrachinon neboli antracen 9,10-dion (obrázek 1) je organická aromatická sloučenina, žlutý až šedo žlutý krystalický prášek. Antrachinon je obtížně rozpustný ve vodě, ale rozpustný v alkoholech. Hlavní využití antrachinonu je výroba barviv a pigmentů, např. alizarinu. Výroba antrachinonu má několik možností: oxidací antracenu, kondenzací benzenu s ftalanhydridem za přítomnosti  $\text{AlCl}_3$  (tzv. Friedel-Craftsova reakce) či z 1,4-naftochinonu a 1,3-butadienu [3]. Přírodní antrachinony se získávají z některých rostlin či hub (např. aloe, rebarbora) a využívají se jako laxativa [10].

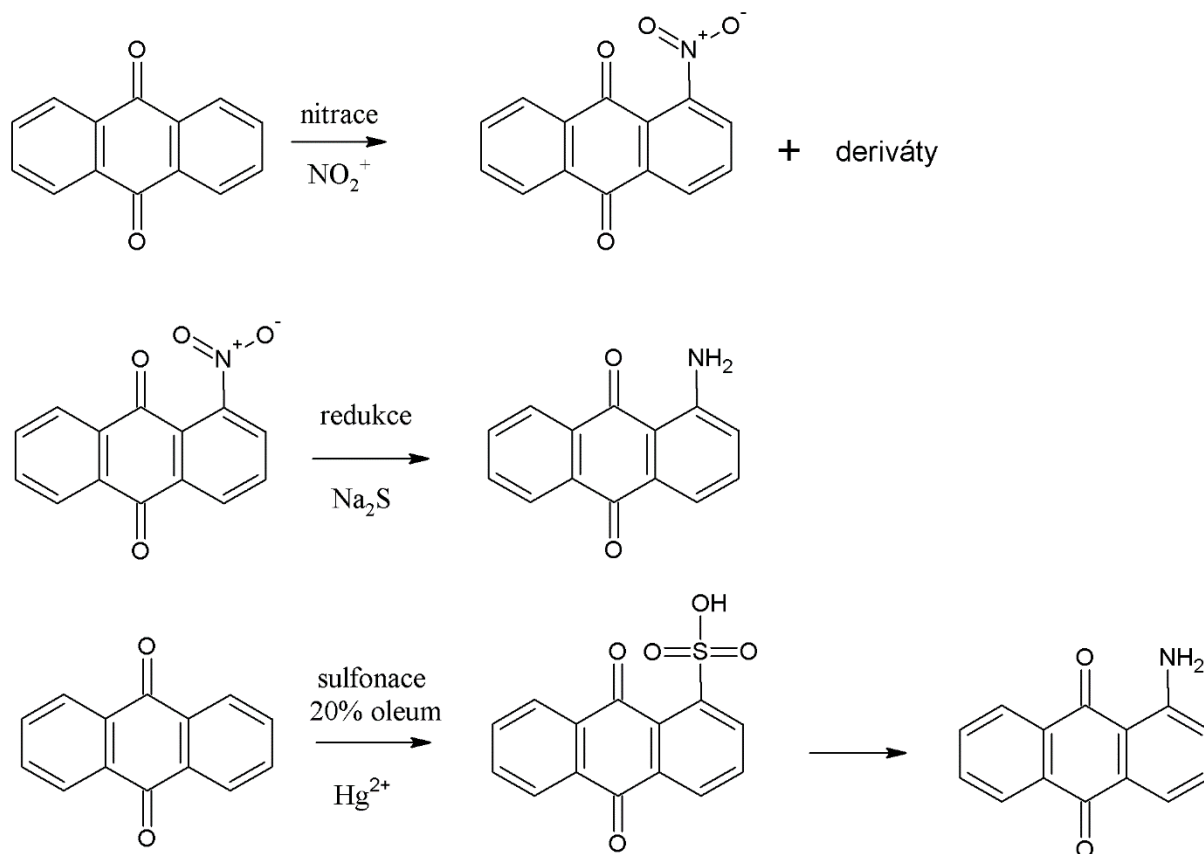


*Obrázek 1:* Struktura antrachinonu

Molekulová hmotnost (g/mol)	208,21
Sumární vzorec	$\text{C}_{14}\text{H}_8\text{O}_2$
Odstín	Žlutý
CAS Number	84-65-1 [20]
Bod tání ( $^{\circ}\text{C}$ )	286 $^{\circ}\text{C}$

### 1.2.2.2. Aminoantrachinonové koloranty

Výchozí surovinou pro výrobu antrachinonových kolorantů je 1-aminoantrachinon (1-AA). Může být vyráběn nitrací antrachinonu a následnou redukcí vzniklého 1-nitroantrachinonu sulfidem sodným, dalším způsobem výroby 1-AA je postup přes 1-sulfoantrachinon (obrázek 3), která je ale finančně náročnější, kvůli čištění odpadních vod od rtuti (obrázek 2). Z 1-AA byl v roce 1901 připraven Indantron (Pigment Blue 60) [3].

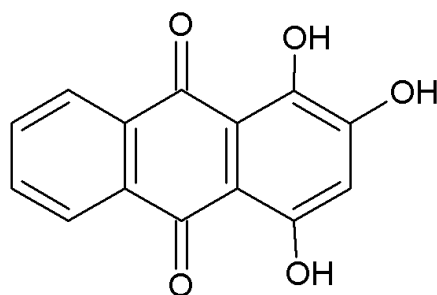


**Obrázek 2:** Výroba 1-aminoantrachinonu

Do této skupiny pigmentů patří také antrachinonové azo pigmenty, které se připravují diazotací 1-aminoantrachinonu [3] a antrachinonové pigmenty připravené Ullmanovou kondenzací, mimo jiné i červený pigment P.R.177, který je charakterizován z analytického a toxikologického hlediska dále v diplomové práci.

### 1.2.2.3. Hydroxyantrachinonové koloranty

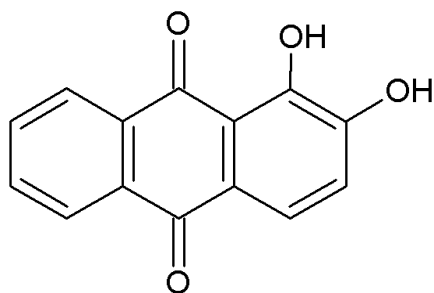
Purpurin neboli 1,2,4-trihydroxyantrachinon (obrázek 3) je pevná krystalická látka, žluto - červené barvy. Krystaly tvoří jehlice, které mají oranžové zbarvení, žluté zbarvení se objeví, pokud je purpurin rozpuštěn ve vroucí vodě s alkáliemi, naopak červené zbarvení je typické po rozpuštění v ethanolu. K oddělení od alizarinu se využívá rozpustnost purpurinu ve vroucím roztoku síranu hlinitého, ze kterého se vysráží kyselinou. Purpurin se využívá jako barvivo pro bavlnu [11,12].



**Obrázek 3:** Struktura purpurinu

Molekulová hmotnost (g/mol)	256,29
Sumární vzorec	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>
Odstín	Žluto-červený
CAS Number	81-54-9
Bod tání (°C)	259 °C

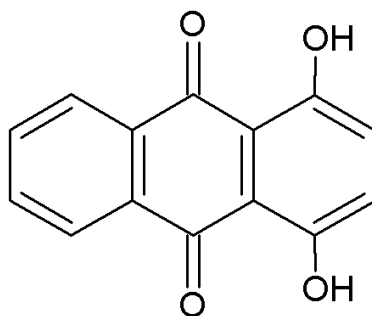
Alizarin neboli 1,2-dihydroxyantrachinon (obrázek 4) je výrazné červené barvivo, které si dříve využívalo k barvení textilií. Hlavní využití alizarinu je v pigmentech do malířských barev nebo v biologickém průmyslu jako barvicí činidlo pro vápník [13]. Barevnost alizarinu se mění v závislosti na pH. Při pH 10 je roztok fialový, při pH 7 je roztok červený a při pH 5 je roztok oranžový. Alizarin byl poprvé syntetizován v roce 1868, kdy tato syntéza významně nahradila využívání přírodního alizarinu, který se získával z mořeny barvířské [14].



**Obrázek 4:** Struktura alizarinu

Molekulová hmotnost (g/mol)	240,21
Sumární vzorec	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
Odstín	Červený
CAS Number	72-48-0
Bod tání (°C)	279 °C

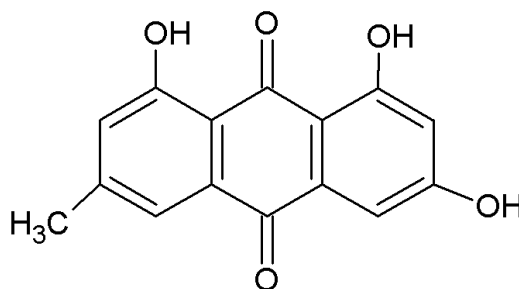
Chinizarin, neboli 1,4-dihydroxyantrachinon (obrázek 5) je oranžovo červený prášek, odvozený od antrachinonu náhradou dvou vodíkových atomů za hydroxy skupiny. V přírodě se nachází v kořenech mořeny barvířské. Chinizarin je levné barvivo, které se využívá k barvení benzínu. Další využití je jako meziprodukt pro syntézu barviv odvozených od alizarinu. Nahrazení OH skupiny bromem poskytuje další barviva [14].



**Obrázek 5:** Struktura chinizarinu

Molekulová hmotnost (g/mol)	240,21
Sumární vzorec	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
Odstín	Oranžovo-červený
CAS Number	81-64-1
Bod tání (°C)	198 °C

Emodin neboli 6-methyl-1,3,8-trihydroxyantrachinon (obrázek 6) je látka vyskytující se v některých rostlinách a houbách. Emodin omezuje působení glukokortikoidů a také bylo prokázáno, že emodin izolovaný z rebarbory má protirakovinné účinky na určité druhy rakoviny [15, 16].



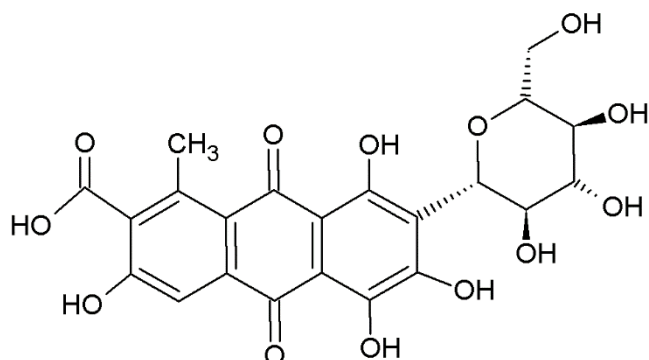
**Obrázek 6:** Struktura emodinu

Molekulová hmotnost (g/mol)	270,24
Sumární vzorec	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>
Odstín	Žlutý
CAS Number	518-82-1
Bod tání (°C)	256 °C

Košenila neboli karmín (obrázek 7) je přírodní červené barvivo, které se získává ze sušených těl samiček červce nopálového. Hlavním barvivem, které samičky obsahují je kyselina karmínová. Kyselina karmínová je kapalina rozpustná ve vodě. Barevný odstín roztoku závisí na pH, pro pH 3 je oranžový, pro pH 5,5 červený a pro pH 7 purpurový. Kyselinu karmínovou najdeme také pod označením E120, kdy se využívá jako potravinářské barvivo. Další využití E120 je ve farmaceutickém, kosmetickém či textilním průmyslu. Kyselina karmínová může způsobovat



alergické reakce. Strukturální název kyseliny karmínové. Přijatelná denní dávka v potravinách je 0 – 5 mg/kg tělesné hmotnosti [17].



**Obrázek 7:** Struktura kyseliny karmínové

Molekulová hmotnost (g/mol)	492,39
Sumární vzorec	C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub>
Odstín	Oranžový
CAS Number	1260-17-9
Bod tání (°C)	120 °C

### 1.3. Výroba pigmentů v Synthesia, a.s.

#### 1.3.1. Společnost Synthesia, a.s.

Synthesia, a.s. je moderní chemická firma se sídlem v Semtíně, je součástí koncernu Agrofert. Společnost už 95 let úspěšně dodává výrobky kvalifikované chemie v různých odvětvích chemické výroby. Produkce společnosti je určena jak pro domácí trh, tak i pro export na evropské trhy a do zámoří, kam směřuje více než tři čtvrtiny výbory [18].

Společnost je rozdělena do čtyř SBU (strategic business units):

- SBU Pigmenty a barviva
  - Pigmenty – barvení plastů a vláken, výroba nátěrových hmot, tiskových barev
  - Barviva – barvení a potisk textilních materiálů, dřeva
- SBU Organická chemie
  - Farmacie – jediný evropský výrobce vitamínu D2

- Pesticidy – výroba herbicidů
- Zákaznické syntézy – založené na fosgenaci, hydrogenaci a nitraci
- Polotovary – pro výrobu kontrastních látek
- SBU Energetika
  - Energetika – výroba a distribuce horké páry a tepla pro areál Synthesia a.s.
- SBU Nitrocelulóza
  - Průmyslová nitrocelulóza – nátěrové hmoty a laky
  - Energetická nitrocelulóza – střelné prachy a průmyslové trhaviny
  - Anorganické kyseliny a soli – využití v dalším provozu Synthesie
  - Oxycelulóza – chirurgické aplikace

Výzkumu a vývoji je ve společnosti Synthesia, a.s. věnována velká pozornost. Vysoký inovační potenciál je důsledkem vysokého počtu odborníků z oblasti kvalifikované chemie. Nedílné místo v oblasti inovace technických a technologických řešení v aplikované chemii zaujímá společnost Výzkumný ústav organických syntéz (VÚOS), která je dceřinou společností firmy Synthesia, a.s. [19].

### **1.3.2. Pigmenty vyráběné společností Synthesia, a.s.**

Společnost Synthesia, a.s. vyrábí vysoce jakostní organické pigmenty pro barvení plastů, vláken nebo pro výrobu nátěrových hmot. Na trh dodává klasické azopigmenty, ale i vysoce jakostní HP (High Performance) pigmenty.

- Příklady pigmentů vyráběných pro tiskové barvy:
  - Monoazo pigmenty: P.Y. 3, P.Y. 74
  - Disazo kondenzační pigmenty: P.Y. 93, P.Y. 95, P.R. 166, P.R. 242
  - Benzimidazolové pigmenty: P.Y. 181, P.R. 176
  - Bisacetoacetylidové pigmenty: P.Y. 155
- Příklady pigmentů vyráběných pro nátěrové hmoty:
  - Monoazo pigmenty: P.Y. 1, P.Y. 3, P.Y. 74
  - Disazo kondenzační pigmenty: P.Y. 93, P.Y. 95, P.Y. 128, P.R. 166
  - Isoindolinové pigmenty: P.Y. 139
  - Benzimidazolové pigmenty: P.Y. 151, P.Y. 154, P.O. 36
  - Bisacetoacetylidové pigmenty: P.Y. 155

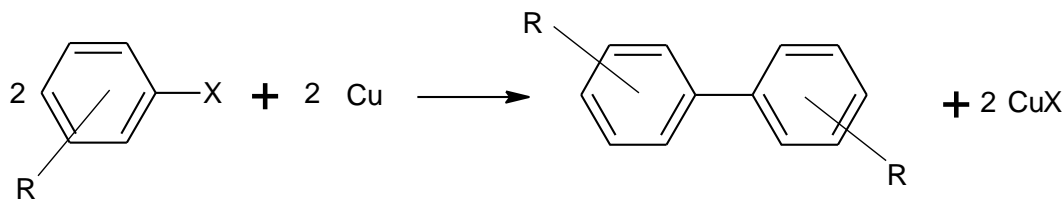
- $\beta$  – naftolové pigmenty: P.R. 4
- Antrachinonové pigmenty: P.R. 177
- Příklady pigmentů vyráběných pro plasty:
  - Disazo kondenzační pigmenty: P.Y. 95, P.R. 166, P.R. 214
  - Isoindolinové pigmenty: P.Y. 139
  - Antrachinonové pigmenty: P.R. 177
- Příklady preparace:
  - Vodou ředitelné – pro nátěrové hmoty
  - Masterbatch-pro plasty [20]

#### 1.4. Ullmannova reakce

Ullmannova reakce byla poprvé popsána německým chemikem v roce 1901. Při klasickém uspořádání Ullmannovy reakce (obrázek 8) spolu reagují 2 stejné molekuly arylhalogenidu za přítomnosti mědi [21]. Ullmannova reakce (označována také jako Ullmannova kondenzace či Ullmann coupling) je kondenzační reakcí. Mezi molekulami arylhalogenidu vzniká vazba C–C a dochází k odštěpení příslušného halogenidu měďného. Nejvyšší reaktivitu poskytují jod – a bromderiváty, nejméně reaktivní jsou chlorované aromáty, fluorované aromáty reaktivitu nevykazují. Pro původní Ullmannovu reakci je potřebná vysoká teplota (100-360 °C), respektive použití vysokotepelných organických rozpouštědlech [22].

Novější postupy Ullmannovy reakce využívají další kovy jako nikl nebo paladium a umožňují provádět reakci za podstatně mírnějších podmínek, včetně heterokondenzací [2].

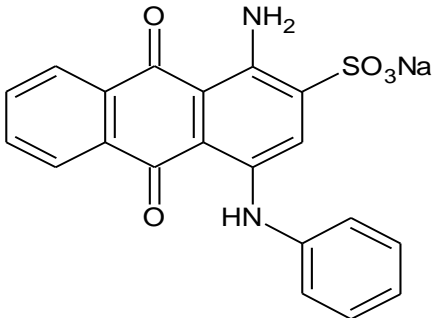
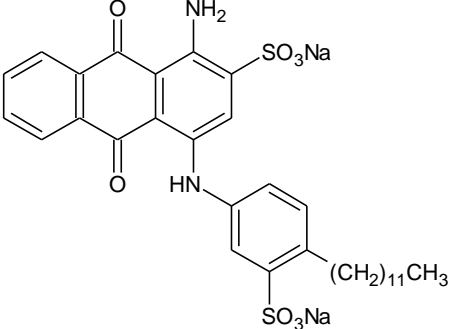
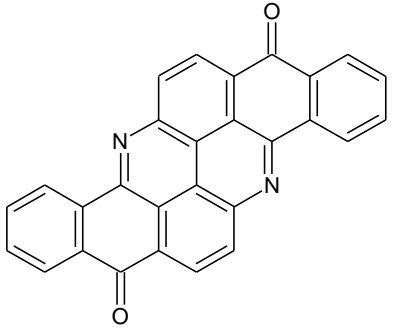
Ullmannova reakce se také využívá při výrobě organických pigmentů. Některé příklady takto vyráběných pigmentů jsou uvedeny v tabulce 1.

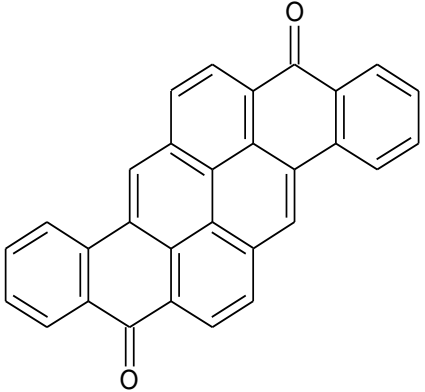
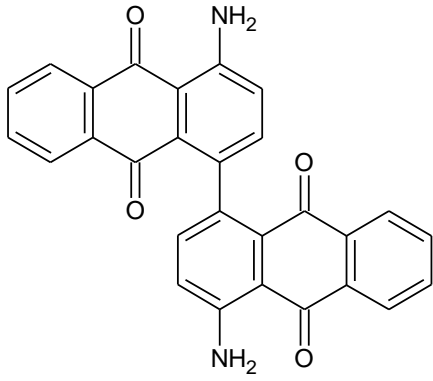


**Obrázek 8:** Obecné schéma Ullmannovy reakce

**Tabulka 1:** Příklady pigmentů vyráběných Ullmannovou reakcí (podle [23])

Pokračování tabulky 1 na straně 27

Název	Vzorec	Sumární vzorec	CI	Použití
<p><b>Acid Blue 25</b></p>		$C_{20}H_{13}N_2NaO_5S$	62055	Barvení nylonu, hedvábí, vlny.
<p><b>Acid Blue 138</b></p>		$C_{32}H_{36}N_2Na_2O_8S_2$	62075	Barvení hedvábí, vlny, polyamidu.
<p><b>Yellow 24</b></p>		$C_{28}H_{12}N_2O_2$	70600	Kovové nátěry a práškové lakování.

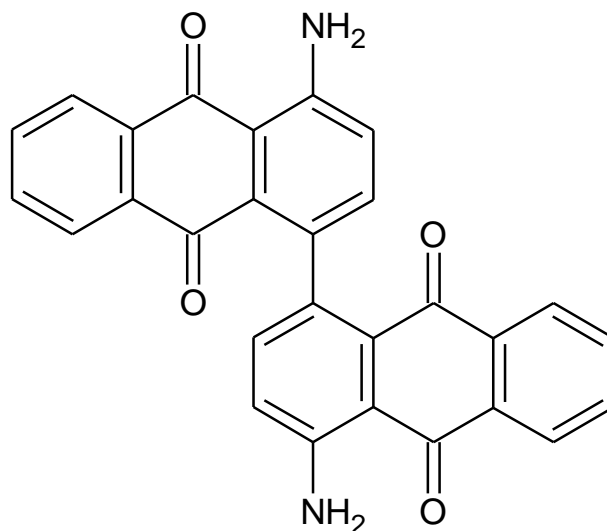
Název	Vzorec	Sumární vzorec	CI	Použití
Orange 40		C <sub>30</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	59700	Již se nevyrobí.
Red 177		C <sub>28</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	65300	Pro nátěrové hmoty, barvení olefinů.

## 1.5. Pigment Red 177

Pigment Red 177 (obrázek 9) patří do skupiny antrachinonových pigmentů. Systematický název je 4,4'-diamino-1,1'-diantrachinon, zkráceně P.R. 177. Difrakční analýza tohoto pigmentu ukázala, že dva antrachinonové celky jsou pootočený o 75°. Toto optimální prostorové uspořádání umožňuje tvorbu intermolekulární vodíkové vazby [3]. Základní fyzikální vlastnosti uvádí tabulka 2. P.R. 177 je vhodný pro barvení nátěrových hmot, pro tiskové barvy, barvení plastů [24]. Vybarvení P.R.177 ve směsi s TiO<sub>2</sub> je ukázáno na obrázku 10.

**Tabulka 2:** Vlastnosti P.R.177 [25]

Molekulová hmotnost (g/mol)	444,45
Sumární vzorec	C <sub>28</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
Číslo CAS	4051-63-2
C.I.	Pigment Red 177
C.I. Číslo	56298
EU No.	223-754-4
Odstín	modravě červený
Hustota (g/cm <sup>3</sup> )	1,488
pH	7-8
Tepelná stabilita (°C) 5 min	230
Bod tání (°C) 5 min	356-358
Obsah těkavých látek při 105 °C (%)	max. 2,5
Chemická třída	Antrachinon



**Obrázek 9:** Struktura pigmentu P.R.177

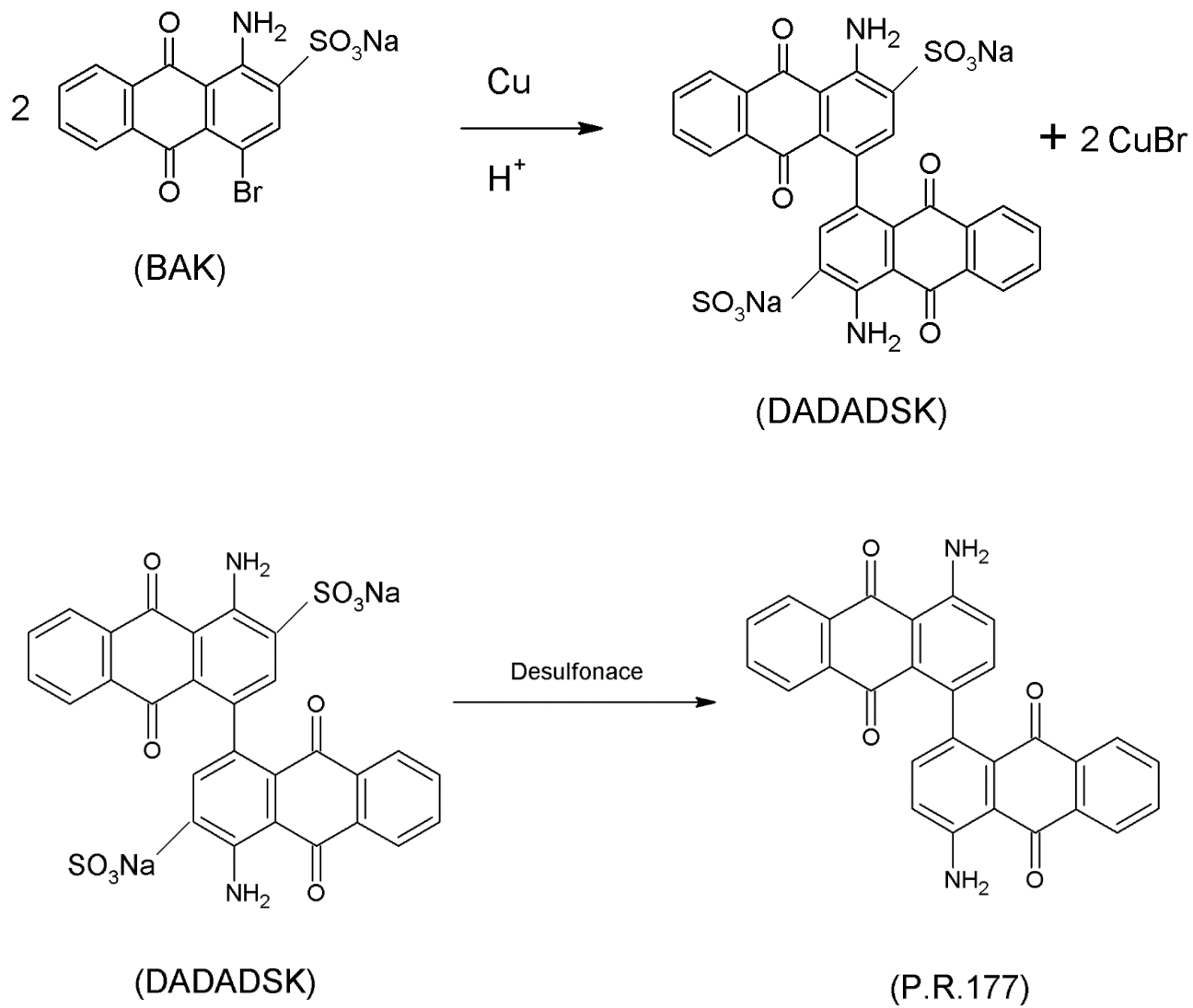


**Obrázek 10:** Vybarvení P.R.177 ve směsi s TiO<sub>2</sub> [24]

### 1.5.1. Výroba P.R. 177 ve společnosti Synthesia, a.s.

#### 1.5.1.1. Princip výroby

4,4'-diamino-1,1'-diantrachinon lze získat reakcí sodné soli 1-amino-4-bromo-2-anthrachinonsulfonové kyseliny (BAK) s kovovou mědí nebo oxidem mědi ve vodném, slabě kyselém prostředí, kdy reakce probíhá za zvýšené teploty. Izolací meziprojektu disodné soli 4,4'-diamin-1,1'-diantrachinon-3,3'-disulfonové kyseliny (DADADSK) a desulfonací v prostředí zředěné kyseliny sírové získáme finální pigment. Schéma výroby P.R.177 je na obrázku 11. Po ukončení syntézy dochází k izolaci pigmentu z reakční směsi a jeho čištění. Dále dochází ke zpracování odpadních kalů obsahujících bromid měďný [26].

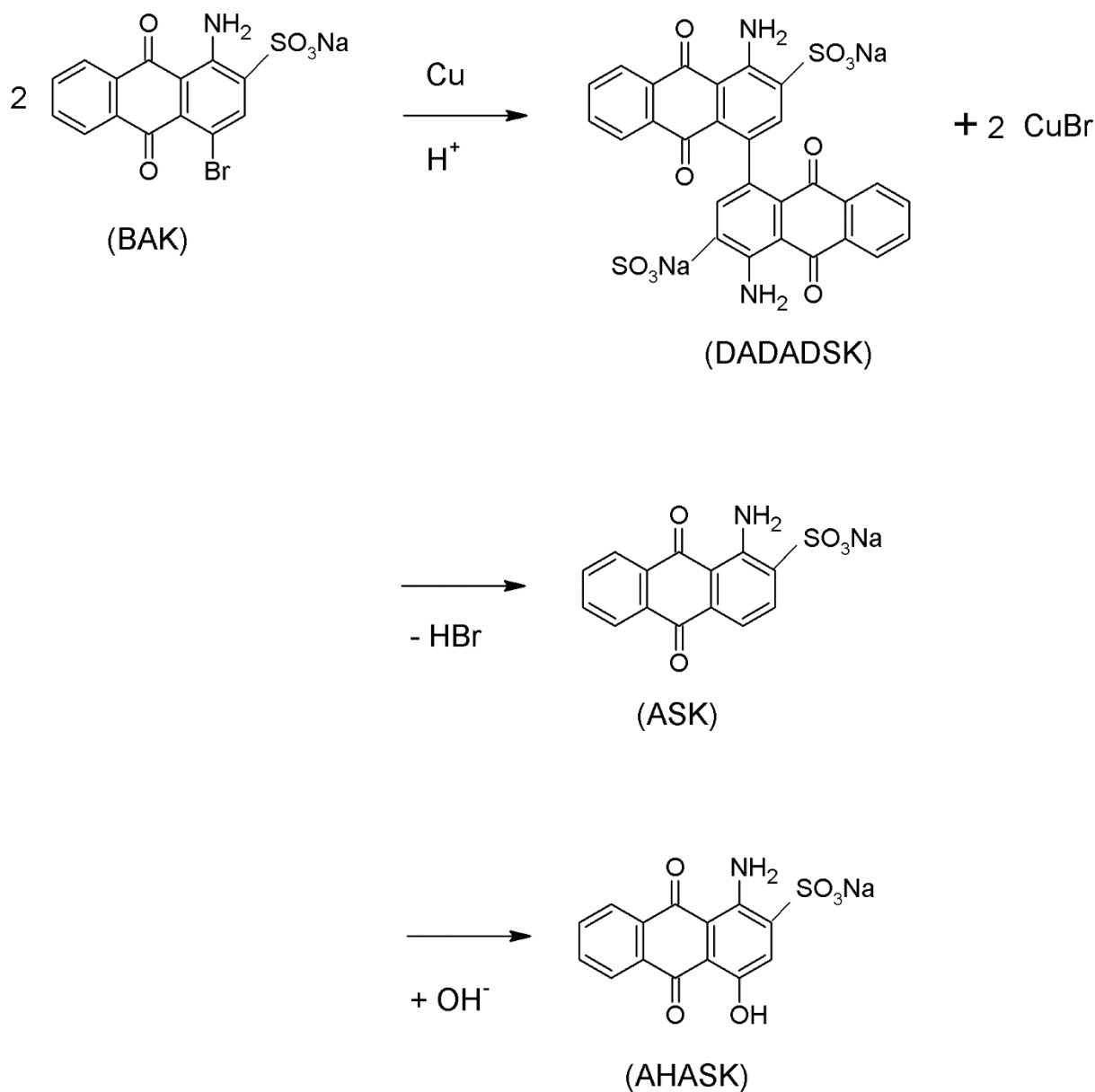


**Obrázek 11:** Schéma výroby P.R.177



### 1.5.1.2. Syntéza DADADSK

Při syntéze meziprojektu DADADSK Ullmanovou kondenzací ze sodné soli 1-amino-4-bromo-2-antrachinon-2-sulfonové kyseliny vznikají vedle DADADSK další vedlejší produkty: sodná sůl 1-aminoantrachinon-2-sulfonové kyseliny (ASK) a sodná sůl 1-amino-4-hydroxyantrachinon-2-sulfonové kyseliny (AHASK). ASK je produktem dehalogenace, kdy se odštěpuje HBr. AHASK vzniká nukleofilní náhradou bromu v BAK za hydroxylovou skupinu (obrázek 12) [27].

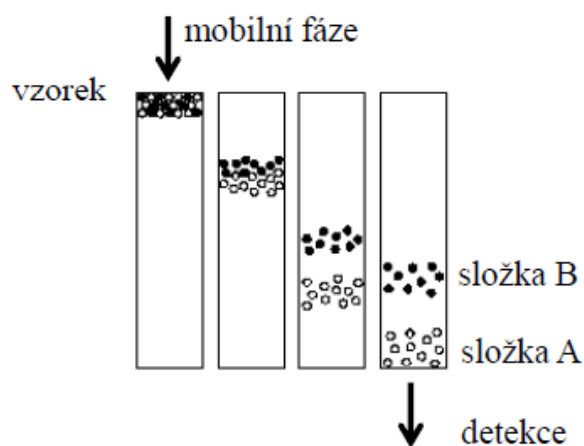


**Obrázek 12:** Reakce BAK za vzniku DADADSK, ASK, AHASK

## 1.6. Chromatografie

Chromatografie je analytická separační metoda vhodná pro kvalitativní i kvantitativní analýzu směsí. Jedná se o fyzikálně – chemickou separační techniku využívající dělení složek směsi mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, fází stacionární a mobilní. Stacionární fáze je nepohyblivá, mobilní fáze je pohyblivá, postupuje ložem stacionární fáze. Během separace se analyt rozděluje mezi mobilní a stacionární fázi, přičemž čas, který analyt stráví v jedné či druhé fázi závisí na jeho afinitě ke každé z nich. Základní princip separace je uveden na obrázku 13.

Cílem separace je identifikace a stanovení obsahu jedné nebo více složek vzorku, nebo zvýšení koncentrace jedné složky vzorku vzhledem k ostatním pro získání čisté složky.



**Obrázek 13:** Chromatografický proces, popis distribuce složek [28]

Dalším hlediskem při dělení chromatografických technik může být jejich uspořádání. Z tohoto pohledu lze hovořit o chromatografii v plošném uspořádání (papírová a tenkovrstvá chromatografie), o chromatografii v kolonovém uspořádání (sloupec stacionární fáze je uvnitř kolony) a o kapilární chromatografii, kdy stacionární fáze je zakotvena na vnitřním povrchu kapilární kolony.

Dle velikosti separovaného vzorku můžeme hovořit o chromatografii v analytickém měřítku, kdy je separováno malé množství vzorku a nedochází k přetížení separačního systému (lineární

oblast sorpční izotermy) a o preparativní chromatografii využívané pro separaci, respektive přečišťování většího množství vzorku [29,30].

### 1.6.1. Rozdělení chromatografických technik

V tabulce 3 je uvedeno základní rozdělení chromatografických technik podle povahy mobilní a stacionární fáze.

**Tabulka 3:** Rozdělení chromatografických technik podle fázových systémů [28,29]

	<b>Mobilní fáze</b>	<b>Stacionární fáze</b>	<b>Název</b>
<b>Plynová chromatografie</b>	Plyn	tuhá fáze kapalina	adsorpční rozdělovací
<b>Kapalinová chromatografie</b>	kapalina	tuhá fáze kapalina	adsorpční rozdělovací
<b>Superkritická fluidní chromatografie</b>	nadkritická tekutina	tuhá fáze	superkritická fluidní

### 1.6.2. Kapalinová chromatografie

V kapalinové chromatografii dochází k rozdělování látek mezi stacionární fází umístěnou v koloně a mobilní fází, která je kapalná. V současnosti je vlastní stacionární fáze nejčastěji navázána na vhodný nosič (silikagel, oxid hlinitý, organický polymer či uhlík) [31,32]. Podle polaritý stacionární a použité mobilní fáze lze nejčastěji používané separační systémy v kapalinové chromatografii rozdělit na:

- Systémy s normálními fázemi (NP)

V tomto případě je stacionární fáze vysoce polární (čistý silikagel, polární chemicky vázané stacionární fáze) a mobilní fáze je méně polární (nepolární uhlovodík + polární organické rozpouštědlo). Převažujícím mechanismem separace je adsorpce.

- Systémy s obrácenými fázemi (RP)

Stacionární fáze je nepolární povahy (nejčastěji se jedná o chemicky navázané dlouhé alifatické řetězce – C18 či C8 – na vhodnou matici – silikagel) a mobilní fáze je naopak směsí vody a s vodou

mísitelného polárního organického rozpouštědla. Převažujícím mechanismem separace je rozdělování mezi dvě nemísitelné fáze [33].

- HILIC chromatografie

Jedná se o chromatografii hydrofilních interakcí na polárních sorbentech v prostředí vodně – organické mobilní fáze. Tato technika kombinuje principy NP a RP kapalinové chromatografie, je vhodná na polární látky rozpustné ve vodě. Separační pořadí látek v HILIC chromatografii je opačné ve srovnání se separacemi v systémech s obrácenými fázemi. Jako sorbenty se využívají polární chemicky vázané stacionární fáze a mobilní fáze je nejčastěji směs acetonitrilu či methanolu s vodou (obsah vody do 40 %) s přísadkou vhodného pufru [32].

Vedle těchto nejčastěji používaných separačních systémů mohou být k separacím využity i mechanismy iontové výměny (ionto – výměnná chromatografie) či síťový efekt (gelová permeační chromatografie) [34].

Podle časové změny složení mobilní fáze rozlišujeme eluci gradientovou či izokratickou. Při izokratické eluci je složení mobilní fáze po celou dobu separace konstantní. Výhodou izokratické eluce je stabilní základní linie chromatogramu, ale nevýhodou je rozmývání píků později se elujících látek. Pokud se složení mobilní fáze během separace mění, jedná se o gradientovou eluci. Výhodou použití gradientu eluční síly mobilní fáze je urychlení eluce silně se zadržujících složek v koloně. Píky takto separovaných látek jsou vlivem samozaostřujícího efektu užší a ostřejší než při izokratické eluci. Výhodné je použití gradientové eluce při separaci složitějších směsí látek. V některých případech může docházet k driftu základní linie chromatogramu vlivem změny složení mobilní fáze [28,32].

### 1.6.2.1. Instrumentace HPLC

Kapalinový chromatograf se skládá ze čtyř základních částí: čerpadlo, dávkovač vzorků, kolona se stacionární fází a detektor (obrázek 14).

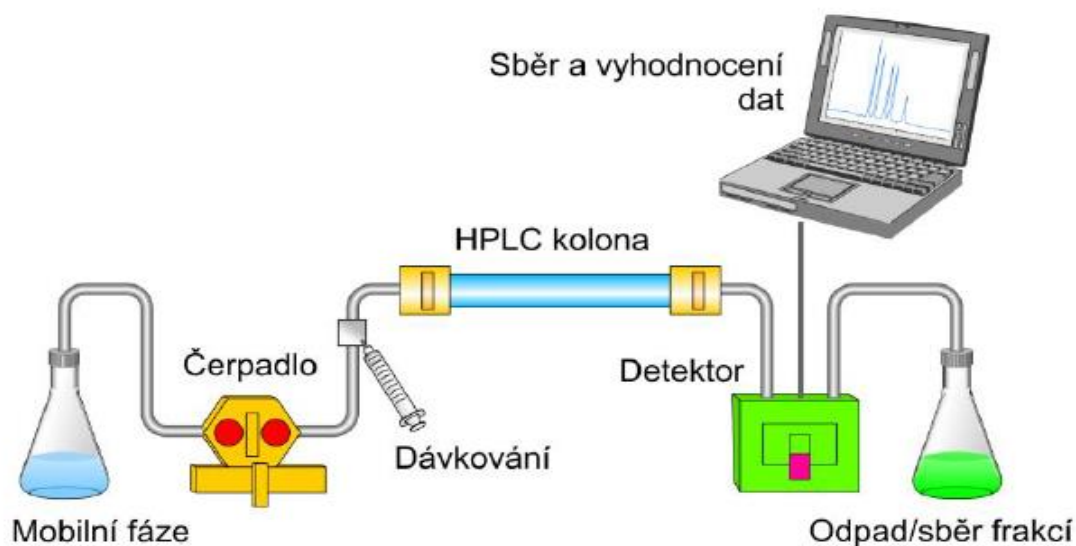
Vysokotlaké čerpadlo čerpá mobilní fázi celým systémem kapalinového chromatografu. Vzhledem k značnému hydrodynamickému odporu kolony, která je plněna částicemi stacionární fáze o malém průměru, musí být čerpadlo pro analytickou kapalinovou chromatografii schopné

dodávat průtok 0,1 – 10 ml při pracovním tlaku až do 100 MPa. Současně je vyžadována minimální fluktuace a dobrá reprodukovatelnost nastaveného průtoku. Tyto nároky splňují vysokotlaká pístová čerpadla s dvěma čerpacími hlavami s malým pracovním objemem.

Dávkovač vzorků musí umožňovat vnesení analyzovaných látek do systému bez přerušení toku mobilní fáze. Nejčastěji se k tomu využívá šesticečný dávkovací ventil s manuálním ovládním nebo je tento ventil součástí počítačově řízeného autosampleru.

Kolona je trubice vyrobená z vhodného inertního materiálu (nerez, titan, speciální plasty) a opatřená koncovými koncovkami pro její zapojení do systému. Její konstrukce musí odolávat pracovním tlakům dosahovaným v systému. V současnosti se délka kolony pro analytickou HPLC pohybuje od 30 do 150 (250) mm, její vnitřní průměr bývá 2 až 4,6 mm. Kolona je naplněná stacionární fází, běžný průměr částic stacionární fáze je od 1,7 do 3 (5)  $\mu\text{m}$ . Částice stacionární fáze mohou být plně porézní či povrchově porézní [31,32].

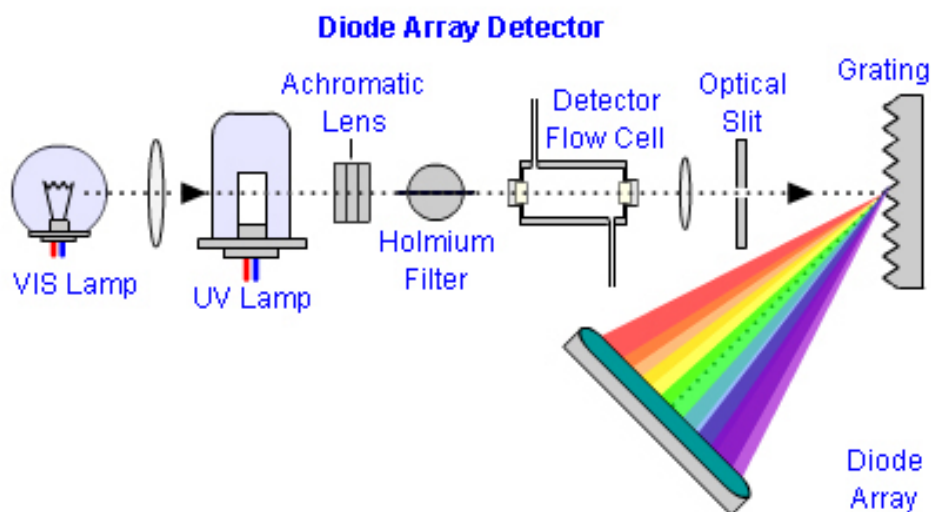
K detekci v kapalinové chromatografii lze využít různých fyzikálně – chemických principů. Nejčastěji používané typy detektorů jsou:



**Obrázek 14:** Schéma kapalinového chromatografu [35]

## Detektory HPLC

- Fotometrický detektor pracující v UV/VIS oblasti záření
- odezva je detektoru je daná absorpcí záření analyzovanou látkou proti čisté mobilní fázi.
- Možno pracovat při fixní či monochromátorem nastavitelné vlnové délce.
- Nejčastěji používaný typ detektoru
- Speciálním případem tohoto detektoru je detektor s diodovým polem (obrázek 15), který umožňuje kontinuální snímání celých UV/VIS spekter (či jejich částí) eluátu vycházejícího z kolony. Tento typ detektoru může napomoci s identifikací neznámých látek [36]



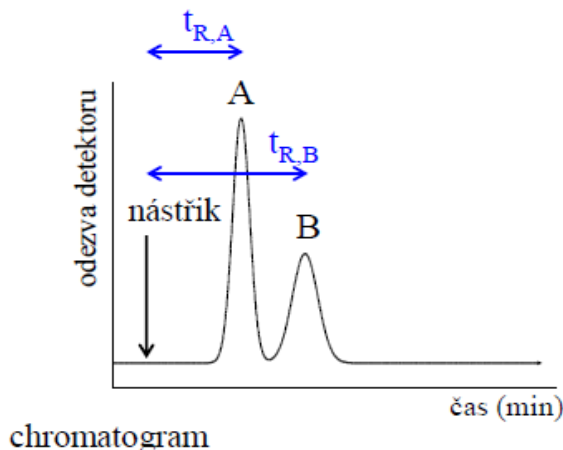
**Obrázek 15:** Schéma detektoru s diodovým polem [37]

- Fluorimetrický detektor
- Měří přirozenou fluorescenci analyzovaných látek, respektive fluorescenci fluoreskujících separovaných derivátů připravených z analyzovaných látek
- Vysoce citlivý, vysoce selektivní
  
- Refraktometrický detektor
- Měří rozdíl indexu lomu čistého eluátu a eluátu s analyzovanou látkou

- Univerzální, avšak málo citlivý ve srovnání s ostatními detektory
- Nevhodný pro použití s gradientovou elucí
- Elektrochemický detektor
  - pro elektrochemicky aktivní látky
  - měří se proud mezi pracovní (polarizovatelnou) a pomocnou elektrodou v závislosti na vloženém napětí
  - vysoce selektivní
- Vodivostní detektor
  - vhodný pouze pro detekci iontových látek
  - měří elektrickou vodivost eluátu mezi 2 elektrodami, které jsou umístěné v detekční průtokové cele
- Hmotnostní detektor
  - hmotnostní spektrometr zapojený online s kapalinovým chromatografem
  - identifikace látek ve složitých směsích, určení struktury neznámých látek
  - v současné době již vyřešeno robustní spojení kapalinového chromatografu a hmotnostního spektrometru pro různé způsoby ionizace
  - možnost selektivní i univerzální detekce [28,32]

#### 1.6.2.2. Vyhodnocení dat

Časovým záznamem odezvy detektoru je chromatogram (obrázek 16). Kvalitativní veličinou analyzované látky je její retenční čas  $t_r$  (či její retenční objem  $V_R$ ). Retenční čas je čas mezi okamžikem nástřiku a časem maxima píku. Mrtvý čas  $t_M$  (či mrtvý objem  $V_M$ ) charakterizuje vlastnosti separační kolony. Kvantitativní charakteristikou je velikost plochy pod píkem dané látky [28].



**Obrázek 16:** Vyhodnocení chromatografu [28]

## 1.7. Sublimace

Sublimace je čisticí metoda, která využívá přímý přechod krystalické látky z pevného skupenství na skupenství plynné. Při zpětné kondenzaci par vzniká čistá krystalická látka, která je zbavena nečistot a příměsí. Velkou výhodou této metody je, že při sublimaci není dosaženo teploty tání a tlak nasycené páry sublimující látky je v rovnováze s tlakem okolí při nižší teplotě, než je teplota tání. Využití sublimace je vedle využití v analytické chemii i v tiskařských technikách. [38]

## 1.8. Amesův test mutagenity

Amesův test je základní test pro hodnocení genotoxických (mutagenních) účinků chemických látek. Tento test byl poprvé popsán v roce 1971 Brucem Amesem [39].

### 1.8.1. Princip testu

Principem Amesova testu je detekce bodové reverzní mutace geneticky modifikované bakterie. Pro testování se používají kmeny bakterie *Salmonella typhimurium*, his-, která nese mutace v genech účastnících se syntézy aminokyseliny histidinu. Neschopnost kmenu *Salmonella typhimurium* syntetizovat histidin je způsobena mutací v histidinovém operonu, kdy mutované kmeny nemají schopnost syntetizovat histidin, a proto vyžadují jeho externí zdroj v médiu. Při



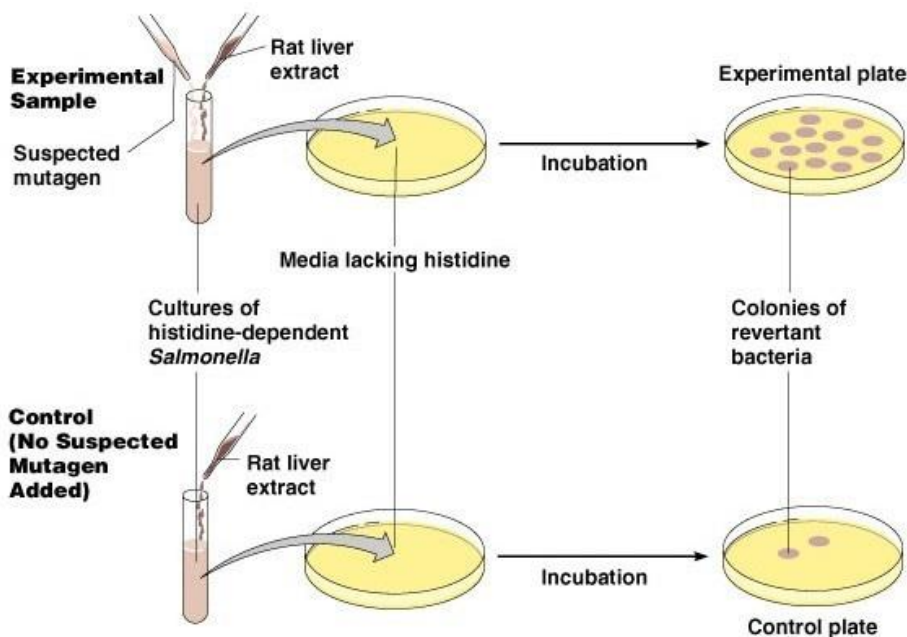
testování se sleduje schopnost dané látky způsobit reverzní mutaci a obnovit růst bakterie v médiu bez histidinu.

Některé látky nejsou mutagenní samy o sobě, ale mutagenní jsou až jejich metabolity, proto se pro stimulaci metabolismu přidává homogenát z krysích jater. Kultivace bakterií se provádí na agaru s malým množstvím histidinu, který nastartuje růst bakterií. Po spotřebování histidinu, který je přítomný v agaru (tzv. iniciační dávky) přežívají pouze reverzně mutované bakterie, které jsou schopny autonomní syntézy histidinu. Po 48 hodinách se stanoví mutagenní potenciál látky na základě počtu pozorovaných revertujících kolonií. Za podmínek testu je počet samovolně revertujících kolonií je pro každý kmen konstantní. Pro indikátorový kmen *Salmonella typhimurium*, his- TA 98 je očekávaný počet spontánních revertant 20-50, pro kmen *Salmonella typhimurium*, his- TA 100 je očekávaný počet spontánních revertant 100–200. Specifita DNA sekvencí jednotlivých kmenů je vypsána v tabulce 4[40,41,42].

**Tabulka 4:** Specifita DNA sekvencí jednotlivých kmenů

<b>Kmen</b>	<b>Typ mutace</b>	<b>Detail změny</b>
<b>TA100</b>	transice AT→GC	CTC, CCC
<b>TA98</b>	posunová mutace -1	-C-G-C-G-
<b>TA97</b>	posunová mutace +4	opal
<b>TA102</b>	transverze GC→AT	ochre
<b>TA1535</b>	transice AT→GC	CTC, CCC
<b>TA1537</b>	posunová +1	-C-C-C-

Schéma provedení Amesova testu mutagenity je znázorněno na obrázku 17.



*Obrázek 17:* Amesův test mutagenity [43]

### 1.8.2. Genotoxicita antrachinonových barviv

Mutace je dědičná změna genotypu, která může být indukovaná či spontánní. Spontánní mutace jsou způsobeny chybou v replikačním či reparačním mechanismu DNA. Indukované mutace jsou uměle vyvolané účinkem určitého mutagenu [44].

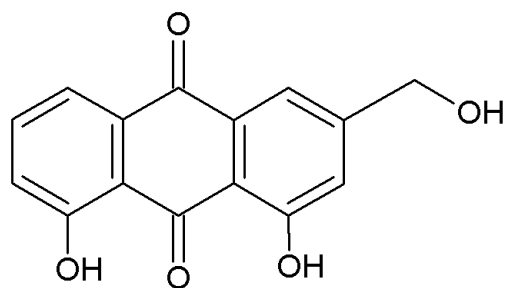
Antrachinony byly studovány pro jejich inhibiční účinek na proliferaci maligních – rakovinových buňkách vaječníku, prsu, prostaty, tlustého střeva a pankreatu. Antrachinony izolované z rojoku barvířského (*Morinda elliptica*) mezi které patří například 3-hydroxy-1-methoxyanthrachinon-2-aldehyd, 1,3-dihydroxy-9,10-dioxoantracen-2-karbaldehyd, rubiadin (1,3-dihydroxy-2-methyl-9,10-anthrachinon) nebo 1,3-dihydroxy-2-methoxymethylantrachinon vykazovaly silnou cytotoxicitu vůči buňkách karcinomu prsu a leukémie [45]. Naopak emodin vykazuje anti-mutagenní účinek pro buňky karcinomu tlustého střeva. Mezi další protinádorové antrachinony patří *aloe-emodin* (obrázek 18) přítomný v listech *Aloe vera*, který výrazně inhibuje růst buněk karcinomu kůže a leukémie [45]. Chryzofanol (1,8-dihydroxy-3-methylantrachinon) a rhein (1,8-dihydroxy-3-karboxyl-9,10-antrachinon) jsou dalšími protinádorovými látkami z řad

antrachinonů. Jejich mechanismus působení spočívá v inhibici poškozené DNA, které je zprostředkována benzo-pyrenem v buněčné hepatomové linii [46].

Hlavními metabolity antrachinonu jsou 1-hydroxyantrachinon a 2-hydroxyantrachinon. Tyto dvě sloučeniny byly testovány na genotoxicitu pomocí Ames testu na kmeni *Salmonella typhimurium* TA 98 a kmeni *Salmonella typhimurium* TA100. 1- hydroxyantrachinon je dle studie negativní, avšak při opakovaném podání 1 % 1- hydroxyantrachinonu byly zjištěny tumory jater, žaludku a tlustého střeva u potkanů. 2- hydroxyantrachinon v Amesově testu pozitivní pro dva kmeny *Salmonelly* s metabolickou aktivací. Pro kmen *Salmonella typhimurium* TA 98 je Ames test pro 2-hydroxyantrachinon pozitivní, zatímco pro kmen *Salmonella typhimurium* TA 100 je test pozitivní pouze po metabolické aktivaci. Ze studie bylo potvrzeno, že obě testované sloučeniny potřebují metabolickou aktivaci, aby byly výsledky testu na genotoxicitu pozitivní [47].

Mezi další antrachinonové koloranty, které byly testovány na genotoxicitu patří metabolity emodinu, v-hydroxyemodin a 2-hydroxyemodin. 2-hydroxyemodin je mutagenem pro kmen *Salmonelly typhimurium* TA1537. V mikronukleonovém testu na myších buňkách L5178Y má 2- hydroxyemodin daleko vyšší hodnoty mikronukleární frekvence než emodin, zatímco v- hydroxyemodin má hodnoty nižší. Studie prokázala, že hladina cytochrom P450 závisí na biotransformaci emodinu a to může vést k bioaktivaci či detoxikaci. 2-hydroxyemodin podléhá bioaktivační reakci, ale u v-hydroxyemodinu se jedná o jeho detoxikaci [48,49].

Antrachinonové barvivo Disperze Blue 3 (DB 3) je mutagenní na kmenech salmonely TA98 i pro nižší koncentrace po metabolické aktivaci. Výrazná mutace DB3 je popsána pro kmen *Salmonelly typhimurium* YG1041 a YG1042, kdy je zvýšení až 17-ti násobné. Remazol Brilliant Blue R (RBBR) je mutagenní na kmenech *Salmonelly typhimurium* TA 98 a TA 100, kdy mutagenita roste lineárně s koncentrací. RBBR je méně mutagenní než DB 3, kdy počet revertujících kolonií je dvojnásobný. Kmeny *Salmonelly typhimurium* TA 100 a YG1042 ukazují detekci substituovaných mutací a kmeny TA 98 a YG1041 ukazují na posunové mutace [50].



**Obrázek 18:** Struktura aloë emodinu

Důležitou roli v inhibici růstu savčích nádorových buněk hraje počet hydroxylových skupin na antrachinonovém jádře. Antrachinony se dvěma nebo třemi hydroxy – skupinami byly účinnější než antrachinony bez hydroxylových skupin. Antrachinony se dvěma meta-hydroxylovými skupinami vykazují silnou cytotoxicitu proti karcinomu prsu a leukémii [44].

## 2. Experimentální část

### 2.1. Seznam chemikálií

Chemikálie	Čistota	Výrobce
Acetonitril	pro HPLC	Fisher Scientifics
Dimethylformamid	pro HPLC	Lach-Ner, s.r.o.
Dioxan	Pro HPLC	J.T.Baker
Dimethylsulfoxid	Pro HPLC	Avantor
Methanol	pro HPLC	Fisher Scientifics
Tetrahydrofuran	pro HPLC	Lach-Ner, s.r.o.
Octan amonný	p.a.	Lach-Ner, s.r.o.
1-AA	97 %	Sigma Aldrich
ASK ve formě sodné soli	Čistota ověřena dodavatelem	Synthesia, a.s.
AHASK ve formě sodné soli	Čistota ověřena dodavatelem	Synthesia, a.s.
BAK ve formě sodné soli	Čistota ověřena dodavatelem	Synthesia, a.s.
DADADSK ve formě disodné soli	Čistota ověřena dodavatelem	Synthesia, a.s.
AHAQ	96 %	Alfa Aesar

## 2.2. Seznam použitých přístrojů

Typ přístroje	Název přístroje	Výrobce
Analytické váhy	AE 200	Mettler Toledo
Hmotnostní spektrometr	Qtrap 4500	AB Sciex
Kapalinový chromatograf	Infinity 1260	Agilent
Odstředivka	E-18 K	Sigma
Odstředivka	EBA 200	Hetttrick Zentrifugen
pH-metr	340i	WTW
Ultrazvuková lázeň	RK 103 H	Bandelin
Sublimační aparatura	Dye sublimation unit DSU 303	CreaPhys GmbH

## 2.3. Kapalinový chromatograf Agilent 1260 Infinity

Použitý kapalinový chromatograf (obrázek 19) byl sestaven z těchto jednotlivých částí:

### Čerpadlo

- Dvojice sériově zapojených pístů s plynule proměnným zdvihem a aktivním vstupním ventilem, kompenzace stlačitelnosti kapaliny
- Nastavitelný průtok do 10 ml/min při maximálním tlaku 60 MPa
- Možnost tvorby nízkotlakého gradientu až ze 4 složek

## Autosampler

- Kapacita až 100 uzavíratelných nádobek na vzorek o objemu 1,8 ml
- Rozsah dávkovaných objemů 0,1–100  $\mu$ l



*Obrázek 19:* Kapalinový chromatograf Agilent 1260 Infinity

## Kolonový termostat

- Umožňuje nastavení konstantní teploty od 10-80 °C

## Detektor

- detektor s diodového polem a rozsahem vlnových délek od 190–950 nm
- Možnost současného záznamu analýzy až při 8 vlnových délkách včetně záznamu 3 D spekter
- Počet diod: 1024, rozlišení: 0,74 nm

## 2.4. Podmínky analýzy extraktu kapalinovou chromatografií

- Kolona: Kinetex C18 5 $\mu$ m, 100 Å, 150 x 4,6 mm (Phenomenex)
- Průtok: 1ml/min
- Nástřik: 5 $\mu$ l
- Mobilní fáze: octan amonný
- Detekce UV: 254 nm
- Teplota laboratorní

Optimalizované podmínky gradientové eluce:

Složka A: 1 g/l octan amonný ve vodě

Složka B: Acetonitril

Časový průběh gradientu:

Čas [min]	Složka A [%]	Složka B [%]
0	75	25
20	20	80
22	0	100
22,1	75	25
30	75	25

## 2.5. Analýza s využitím hmotnostního spektrometru

### 2.5.1. Podmínky analýzy s přímým vstupem vzorku

- záznam spekter s lineární iontovou pastí v režimu Enhanced MS, pozitiv/negativ, skenovací rychlost 10000 Da/s, rozsah m/z 50-1000, podmínky na zdroji Curtain Gas 30 psi, Gas 1 – 50 psi, Gas 2 – 60 psi, teplota 350 °C, ion spray voltage 4500/-4500 V, declustering potential 70/-70 V, entrance potential 10/-10 V, collision energy 10/-10 V



- Pro dva nejintenzivnější signály v každém spektru (pozitiv/negativ) v rozsahu m/z 200- 800 jejichž intenzita překročila  $1E+5$  byla následně provedena MS/MS analýza s kolizní energií 30/-30 V

### 2.5.2. HPLC analýza

- Kinetex C18 2,6  $\mu\text{m}$ , 100 x 3.0 mm
- Průtok 0,28 ml/min,
- Mobilní fáze: acetonitril/ octan amonný 12mM,
- Průtok 0,28 ml/min,
- Teplota 40 °C,
- Nástřik: 1  $\mu\text{l}$  vzorku
- Detekce UV: 254 nm

Optimalizované podmínky gradientové eluce:

- Složka A: 12mM octan amonný
- Složka B: Acetonitril
- Časový průběh gradientu:

Čas [min]	Složka A [%]	Složka B [%]
0	75	25
20	20	80
22	0	100
22,1	75	25
30	75	25

### 2.6. Podmínky analýzy pigmentu sublimací

- Třízonový výhřev – nastavení teplot T1 = 320 °C, T2 = 250 °C, T3 = 150 °C
- Vakuum  $10^{-5}$  –  $10^{-6}$  mbar
- Na obrázku 20 je ukázána použitá sublimační aparatura



*Obrázek 20:* Sublimační aparatura

## 2.7. Syntéza DADADSK

V 500 ml destilační baňce bylo smícháno 25 g BAK a 75 ml destilované vody. Za stálého míchání na elektromagnetickém míchadle byla suspenze vyhřáta na 80 °C a poté při této teplotě udržována po dobu 1 hodiny. Dále byla suspenze dohřáta na 98 °C a upraveno pH= 2,8 pomocí kyseliny sírové. Po úpravě pH byl přidána prášková měď, destilovaná voda, kyselina sírová a směs vyhřáta na 95°C. Vzniklá směs byla při této teplotě udržována 30 minut. Po ukončení kondenzace byl odebrán vzorek a analyzován pomocí HPLC.

Po kondenzaci byla suspenze v 2000 ml kádince doplněna na objem 1200 ml a dohřáta na teplotu 98 °C. Při této teplotě byla zfiltrována přes přehřátou Büchnerovu nálevku a promyta 100 ml horké vody. Kleráty byly převedeny do kádinky o objemu 2000 ml a doplněny objem 1500 ml. Za míchání byla suspenze vyhřáta na 80 °C a bylo upraveno pH na hodnotu 2,75. Dále bylo provedeno vysolení při 80 °C 30 g NaCl.

Dále bylo v kádince o objemu 2000ml vyhřáto na 80 °C 500 ml vody. Do vyhřáté vody byla vnesena pasta DADADSK, která byla zhomogenizována a bylo upraveno pH na 7,9 zředěným

NaOH. Následně byly vneseny 2 g křemeliny a 4 g karborafinu. Tato suspenze byla míchána při 95-98 °C po dobu 1 hodiny. Po zhomogenizování byla provedena klerace při 98 °C, bez promytí koláče. Kleráty byly převedeny do 2000 ml kádinky a doplněny na V=1500 ml. Poté bylo za stálého míchání na elektrickém míchadle upraveno pH na 2,75. Po úpravě pH byla suspenze za stálého míchání vyhřáta na 80 °C a při této teplotě bylo provedeno vysolení 30 g NaCl. Suspenze byla za stálého míchání samovolně ochlazena na 60 °C a poté opět vyhřáta na 80 °C. Dále byla suspenze za stálého míchání samovolně chlazená a byla provedena kontrola úplnosti vysolení (kapkou na filtračním papíru). Po vyhovujícím vysolení byla suspenze filtrována přes Büchnerovu nálevku a poté byl filtrační koláč promyt roztokem NaCl (15 g NaCl + 900 ml H<sub>2</sub>O). Získaná pasta byla usušena při 160 °C a podrobena analýze na HPLC.

Do 500 ml destilační baňky byla navážena vodná pasta DADADSK (33,6 g). K pastě bylo přilito 8,1 ml H<sub>2</sub>O a 115 ml 98 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Pasta s kyselinou byla řádně promíchána a následovalo postupné vyhřátí na 171 °C. Na této teplotě se směs držela 2 hodiny. Po této teplotě byl odebrán vzorek směsi. Dále byla provedena tenkovrstvá chromatografie – soustava: 4 ml octanu ethylnatého, 1,5 ml ethanolu a 1 ml čpavku. Chromatogram se posuzuje za mokra, vyhovující musí být čistý bez přítomnosti výchozí DADADSK.

Po vyhovující desulfonaci se směs ochladila na 135 °C a následně vysrážela do destilované vody pod vakuem na laboratorním srážedle. Vysrážená směs se nafilmovala a promyla roztokem Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> (4 g Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> do 200 ml H<sub>2</sub>O) a horkou vodou do neutrální reakce na kongo papírek. Získaná pasta se zvažila a usušila do druhého dne v laboratorní sušárně vyhřáté na 100 °C. Usušený pigment byl umletý na laboratorním mlýnku a vyhodnocen.

Pasta z desulfonace se vnesla za míchání do 500 ml sulfonační baňky, kde bylo předloženo 300 ml destilované vody. Po homogenizaci bylo upraveno pH na hodnotu 9-11. po ustálení pH se přidalo 40 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1:3 a začalo se vyhřívát na 80 °C. na této teplotě se reakční směs držela 2 hodiny. Následně se směs zfiltrovala přes Büchnerovu nálevku a promyla destilovanou vodou. Pasta se usušila v laboratorní sušárně vyhřáté na 100 °C.

## **2.8. Příprava kalibračních standardů**

### **1-aminoantrachinon (1-AA)**

Na analytických vahách bylo naváženo 0,0091 g 1-aminoantrachinonu. Navážka byla převedena do 250 ml odměrné baňky a byl přidán roztok dimethylsulfoxidu. Baňka byla vložena do ultrazvukové lázně na 5 minut a poté doplněna roztokem rozpouštědla po rysku. Dále bylo z baňky odpipetováno 0,1; 1,08; 2,04; 2,53 a 3,01 ml roztoku do 10 ml baněk a baňky byly doplněny po rysku roztokem DMSO. Poté byla část převedena do nádobek pro autosampler HPLC.

### **1-amino-2-hydroxyantrachinon (AHAQ)**

Na analytických vahách bylo naváženo 0,0035 g 1-amino-2-hydroxyantrachinon. Navážka byla převedena do 250 ml odměrné baňky a byl přidán roztok dimethylsulfoxidu. Baňka byla vložena do ultrazvukové lázně na 5 minut a poté doplněna roztokem rozpouštědla po rysku. Dále bylo z baňky odpipetováno 0,1; 0,59; 1,08; 1,56 a 2,04 ml roztoku do 10 ml baněk a baňky byly doplněny po rysku roztokem DMSO. Poté byla část převedena do nádobek pro autosampler HPLC.

### **Sodná sůl 1-amino-4-hydroxyantrachinon-2-sulfonové kyseliny (AHASK)**

Na analytických vahách bylo naváženo 0,0055g sodné soli 1-amino-4-hydroxyantrachinon-2-sulfonové kyseliny. Navážka byla převedena do 50 ml odměrné baňky a byl přidán roztok dimethylsulfoxidu. Baňka byla vložena do ultrazvukové lázně na 5 minut a poté doplněna roztokem rozpouštědla po rysku. Dále bylo z baňky odpipetováno 0,05; 0,100; 0,150; 0,200 a 0,300 ml roztoku do 10 ml baněk a baňky byly doplněny po rysku roztokem DMSO. Poté byla část převedena do nádobek pro autosampler HPLC.

### **Sodná sůl 1-amino-4-bromo-2-anthrachinonsulfonové kyseliny (BAK)**

Na analytických vahách bylo naváženo 0,0028 g sodné soli 1-amino-4-bromo-2-anthrachinon-2-sulfonové kyseliny. Navážka byla převedena do 50 ml odměrné baňky a byl přidán roztok dimethylsulfoxidu. Baňka byla vložena do ultrazvukové lázně na 5 minut a poté doplněna roztokem rozpouštědla po rysku. Dále bylo z baňky odpipetováno 0,2; 2,56; 5,1; 7,56 a 10 ml roztoku do 10 ml baněk a baňky byly doplněny po rysku roztokem DMSO. Poté byla část převedena do nádobek pro autosampler HPLC.

### **Sodná sůl 1-aminoantrachinon-2-sulfonové kyseliny (AHASK)**

Na analytických vahách bylo naváženo 0,0043 g sodné soli 1-aminoantrachinon-2-sulfonová kyseliny. Navážka byla převedena do 50 ml odměrné baňky a byl přidán roztok dimethylsulfoxidu. Baňka byla vložena do ultrazvukové lázně na 5 minut a poté doplněna roztokem rozpouštědla po rysku. Dále bylo z baňky odpipetováno 0,05; 0,100; 0,150; 0,200 a 0,300 ml roztoku do 10 ml baněk a baňky byly doplněny po rysku roztokem DMSO. Poté byla část převedena do nádobek pro autosampler HPLC.

### **Disodná sůl 4,4'-diamin-1,1'-diantrachinon-3,3'-disulfonové kyseliny (DADADSK)**

Na analytických vahách bylo naváženo 0,0041 g disodné soli 4,4'-diamin-1,1'-diantrachinon-3,3'-disulfonové kyseliny. Navážka byla převedena do 50 ml odměrné baňky a byl přidán roztok dimethylsulfoxidu. Baňka byla vložena do ultrazvukové lázně na 5 minut a poté doplněna roztokem rozpouštědla po rysku. Dále bylo z baňky odpipetováno 0,05; 0,500; 1,200; 2,100 a 4,080 ml roztoku do 10 ml baněk a baňky byly doplněny po rysku roztokem DMSO. Poté byla část převedena do nádobek pro autosampler HPLC.

## **2.9. Analyzované vzorky**

Pro potřeby diplomové práce poskytla společnost Synthesia, a.s. pro měření tři vzorky pigmentu P.R. 177. Vzorky jsou označeny jako A, B, C a pocházejí z procesu výroby. Ve všech třech případech se nejedná o vzorky určené pro komerční účely.

Všechny vzorky jsou složením červený sypký prášek, bez zápachu (obrázek 21).



**Obrázek 21:** Vzorky pigmentu P.R. 177

### 2.9.1. Obecný postup přípravy vzorků k analýze

Do plastových zkumavek o objemu 12 ml byl na analytických vahách navážen 1 g vzorku pigmentu P.R. 177. Ke vzorku bylo přidáno vhodného rozpouštědlo a vzorek byl vložen do ultrazvukové lázně vyhřáté na danou teplotu po určitou dobu. Poté byl vzorek doplněn rozpouštědlem na objem 10 ml a vložen do odstředivky, kde byl odstředován 5 minut při 5000 otáčkách za minutu. Po odstředění byl supernatan přefiltrován do skleněných nádobek pro HPLC. K filtrování byly použity 0,2 µm stříkačkové filtry vhodné pro dané rozpouštědlo.

## 2.10. Amesův test

### 2.10.1. Příprava vzorků a médií pro Amesův test

#### Minimální glukosové médium (tuhá půda):

Zásobní roztoky:

Roztok A: 30 g Noble agaru + 1000 ml destilované vody, pH 6,8 - 7,2

Roztok B: 798 ml destilované vody

Roztok C: 10 % glukosa (100 ml)

Roztok D: 20 %  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (2 ml)

Roztok E: VB soli

105,0 g  $K_2HPO_4$

45,0 g  $KH_2PO_4$

10,0 g  $(NH_4)_2SO_4$

5,5 g pentahydrát citronanu sodného

} Doplněno destilovanou vodou na  
objem 500 ml

- Roztoky A–E byly sterilizovány autoklávem 121 °C, 0,1 MPa, 20 minut

#### Příprava misek

K roztoku B sterilně přidáno 100 ml roztoku C, 2 ml roztoku D a 100 ml roztoku E, poté smícháno s roztokem A, poté rozlito na misky.

### **TOP Agar**

3 g	Noble agar	}	Doplněno destilovanou vodou (pH 6,8–7,2) na objem 500 ml
2,5 g	NaCl		

- Sterilizace byla provedena autoklávem 121 °C, 0,1 MPa, 20 minut

### **Minimální roztok histidinu a biotinu (His/Bio min)**

L-histidin x HCl	9,6 mg / 100 ml destilované vody
D-biotin	12,36 mg / 100 ml destilované vody

- Sterilizace byla provedena autoklávem

### **0,2M fosfátový pufr (pH 7,4 ± 0,2)**

15,6 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  / 100 ml destilované vody

35,8 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  / 100 ml destilované vody

- Roztoky byly smíchány: 19 ml roztoku  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 81 ml roztoku  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ . Úprava roztoku na hodnotu pH 7,4 ± 0,2 byla provedena roztokem  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Sterilizace byla provedena autoklávem. Roztok byl uchováván při 4°C.

### **S9 směs pro metabolickou aktivaci**

S9 směs obsahuje jaterní homogenát z potkana kmene Wistar o obsahu proteinů 26,20 mg/ml a byl získán z laboratoře Výzkumného ústavu organických syntéz a.s., Centrum ekologie, toxikologie a analytiky, Pardubice. Byl uchováván při teplotě -80°C.

### **Roztok kofaktorů na 10 ml S9 směsi (množství postačující pro 20 misek)**

30,64 mg	NADP
15,20 mg	glukosa-6-fosfát
0,20 ml	roztok $\text{MgCl}_2/\text{KCl}$
(61,5 g KCl a 40,7 g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ do 500 ml deionizované vody, autoklávovat)	
5,0 ml	fosfátový pufr (pH 7,4)
4,61 ml	sterilní destilovaná voda
0,19 ml	jaterní homogenát

- Připravenou směs je nutno uchovávat na ledu v lednici.

### **Roztoky antibiotik**

zásobní roztok ampicilinu 2,5 mg/1 ml destilované vody

- Sterilizace byla provedena pomocí mikrobiálních filtrů 0,2 µm.

### **Příprava vzorků a medií**

Ze zásobních roztoků byly připraveny 4 roztoky (navážením 0,005 g do 1 ml DMSO, vloženy do ultrazvukové lázně na 20 minut) od každé testované látky, podle potřebných koncentrací. Zásobní roztok byl ředěn DMSO. Všechny roztoky byly připravovány pseudosterilně. Dále byl připraven TOP agar s minimálním množstvím histidinu a biotinu, se kterým byl smíchán v poměru 9:1 (TOP agar: Histidin/Biotin).

### **Příprava kmenů *Salmonella typhimurium* his-**

Do 10 ml Noble media v 50 ml zkumavce bylo zaočkováno 30 µl testovaného kmene a přidáno 100 µl zásobního roztoku ampicilinu pro TA kmeny. Poté následovala kultivace přes noc při 37 °C. Narostlá kultura byla odstředěna (4 °C, 10 minut, 5000 rpm) a peleta byla resuspendována v 5 ml fyziologického roztoku, poté byla naředěna fyziologickým roztokem na  $OD_{560} = 0,4$ .

#### **2.10.2. Provedení měření**

Vzorky byly testovány na kmenech *Salmonella typhimurium* his- TA 98 a TA 100. Test byl proveden bez i s metabolickou aktivací.

Ve vodní lázni vyhřáté na 50 °C byly umístěny zkumavky s 2 ml TOP agaru s His/Bio min (9:1), 0,1 ml naředěného kmene *Salmonella typhimurium* his-, 0,1 ml testovaného vzorku a 0,5 ml fosfátového pufru (pH 7,2) pro měření bez aktivace nebo 0,1 ml S9 směsi pro měření s aktivací.

Po promíchání byla zkumavka vylita na Petriho misku s pevným glukosovým médiem. Negativní kontrola byla provedena bez přidání vzorku. Pozitivní kontrola (tabulka 5) obsahovala místo testovaného vzorku 100 µl mutagenu. Po zatuhnutí agaru byly misky kultivovány v závěsu při 37 °C, 78 hodin, ve tmě. Po kultivaci byl spočítán počet revertujících kolonií pomocí spočítán ručně.



**Tabulka 5:** Mutageny použité pro pozitivní kontrolu

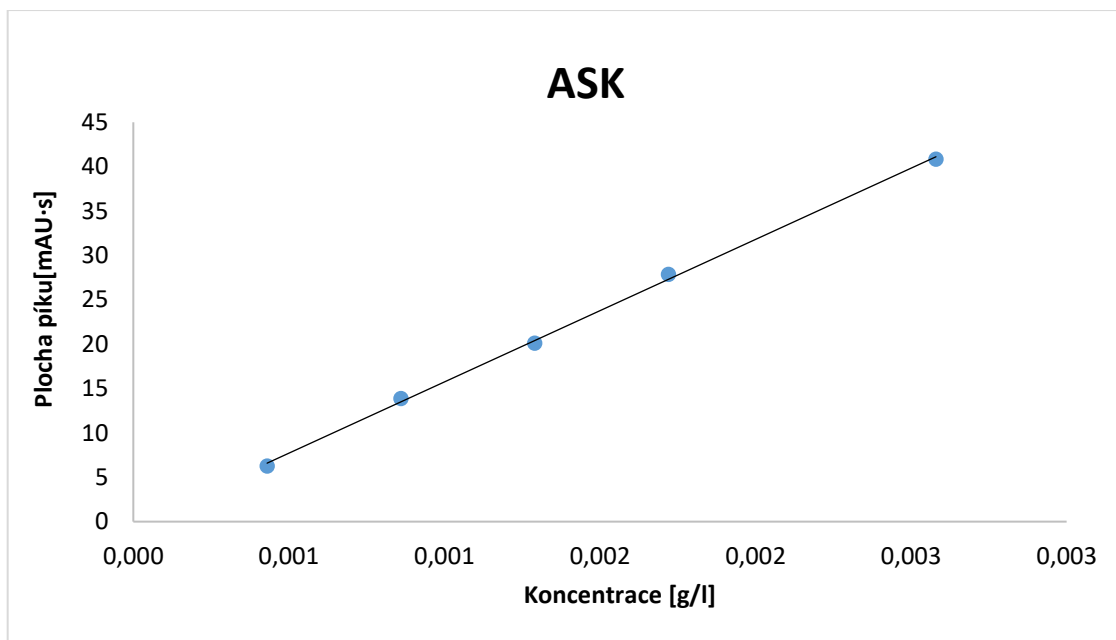
<b>Indikátorový kmen</b>	<b>Bez metabolické aktivity</b>	<b>S metabolickou aktivací</b>
TA 98	daunomycin (1 µg/misku)	2- aminofluoren (5 µg/misku)
TA 100	azid sodný (3 µg/misku)	2- aminofluoren (5 µg/misku)

### 3. VÝSLEDKY A DISKUZE

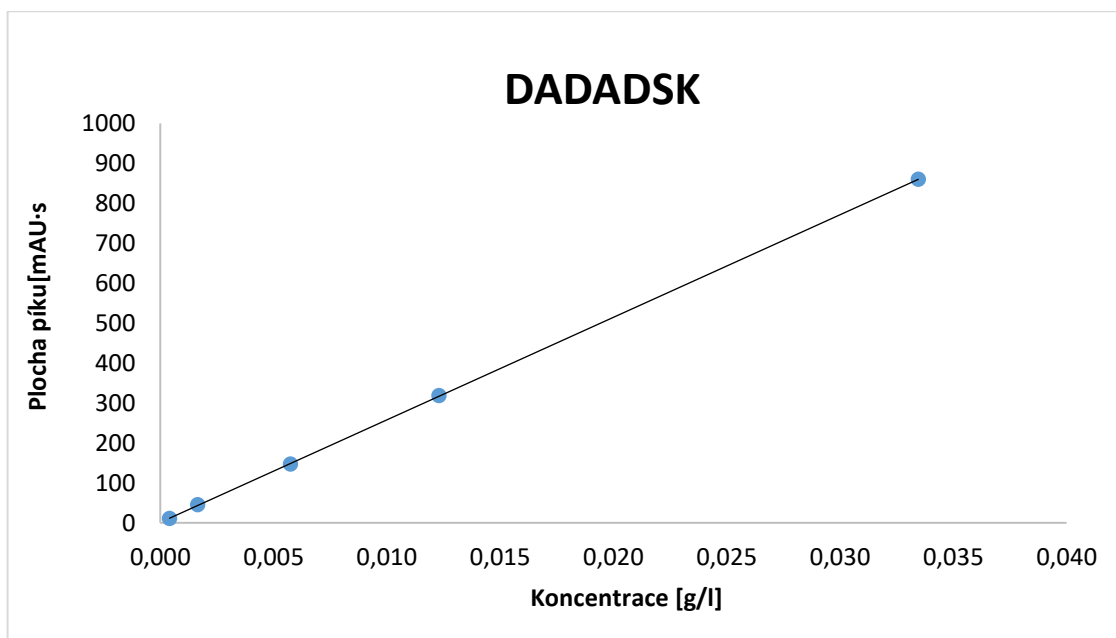
S přihlédnutím k reakčnímu mechanismu pro výrobu pigmentu P.R.177, uvedeného v kapitole 1.5.1. byly vytypovány následující látky, které se v pigmentu mohou nacházet jako nečistoty. Jedná se o ASK, AHASK, BAK, DADADSK, 1-AA a AHAQ. Analýzou pigmentu pomocí dosud používaným postupem ve společnosti Synthesia, a.s. (navážení 1 g pigmentu a doplnění do 10 ml DMSO, vložení na 20 minut do ultrazvukové lázně při laboratorní teplotě, odstředění 5 minut při 5000 otáčkách a přefiltrování pomocí stříkačkových filtrů do skleněných nádobek) byla potvrzena přítomnost těchto nečistot ve vzorcích červeného pigmentu 177. Protože bylo zjištěno, že dosud používaná metoda neposkytuje dostačující údaje o kvantitativním obsahu nečistot v pigmentu, bylo cílem práce optimalizovat podmínky pro přípravu vzorku pigmentu k analýze s důrazem na maximální výtěžnost extrakčního postupu. Dále bylo nutné se zabývat genotoxickými vlastnostmi uvedených nečistot v pigmentu, neboť jejich přítomnost má vliv na toxikologické hodnocení pigmentu.

#### 3.1. Kalibrační měření

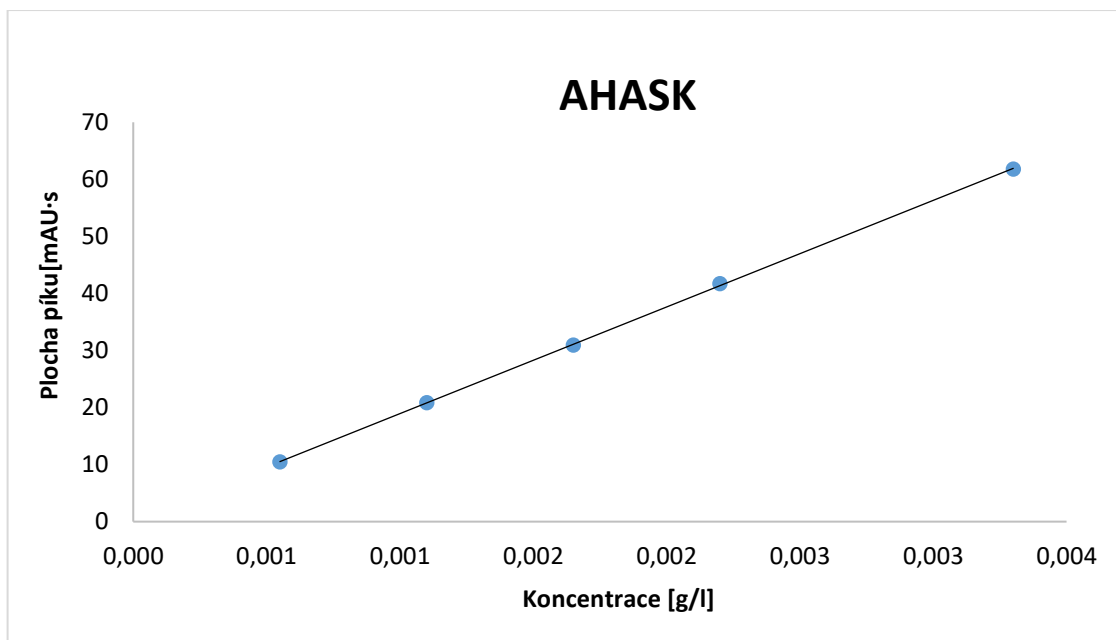
Podle postupu uvedeného v kapitole 2.8. byly připraveny kalibrační roztoky známých nečistot, které pokrývaly předpokládaný rozsah obsahu nečistot podle předběžných orientačních analýz vzorku pigmentu. Z dat naměřených pomocí HPLC byly sestrojeny kalibrační závislosti (závislost ploch píků na koncentraci daných látek) a tyto závislosti byly proloženy lineární regresní křivkou. Dále byly vypočítány meze detekce a meze kvantifikace. S využitím analýzy rozptylu byly vypočítány meze detekce a meze stanovitelnosti pro jednotlivé standardy nečistot. Souhrnně jsou tyto parametry uvedeny v tabulce 6. Odpovídající kalibrační přímky jsou na obrázcích 22-27. V tabulce Ia-Ie v příloze jsou uvedena kalibrační data pro každou z analyzovaných nečistot. Analýza každého standardu byla opakována třikrát.



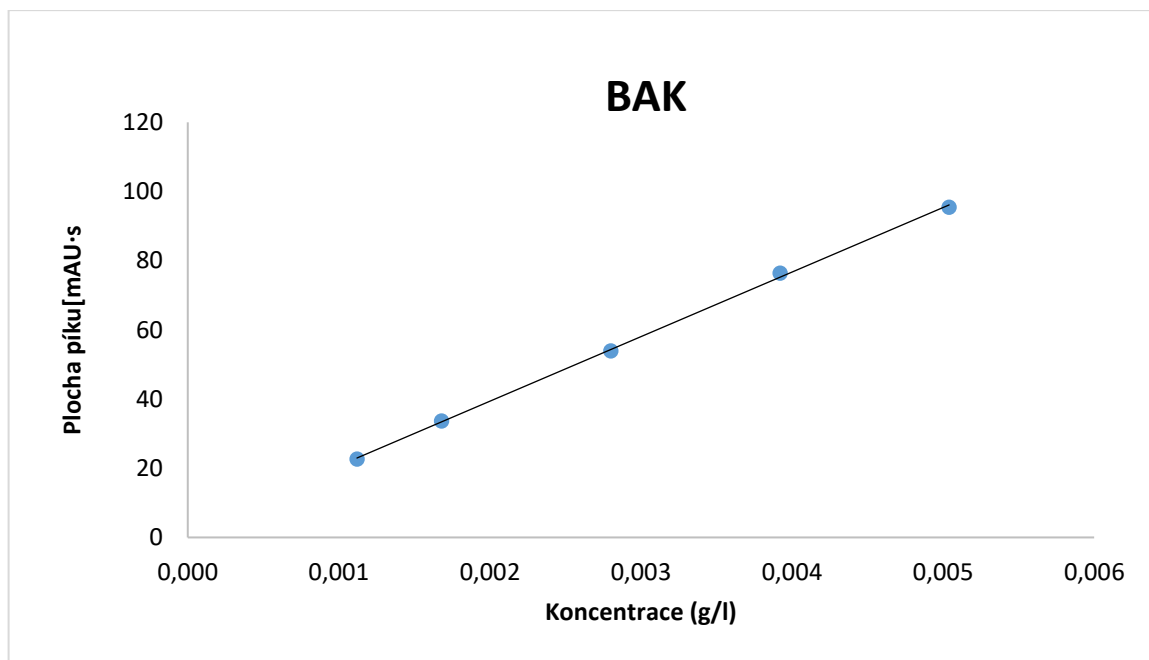
**Obrázek 22:** Kalibrační přímka sodné soli 1-aminoantrachinon-2-sulfonové kyseliny (ASK)



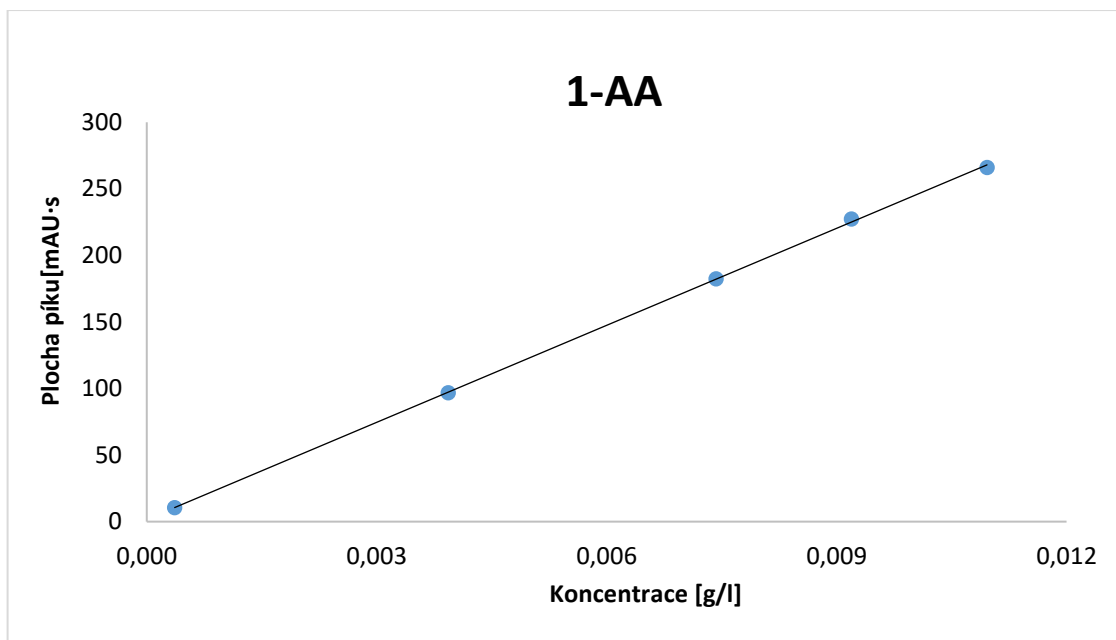
**Obrázek 23:** Kalibrační přímka disodné soli 4,4'-diamin-1,1'-diantrachinon-3,3'-disulfonové kyseliny (DADADSK)



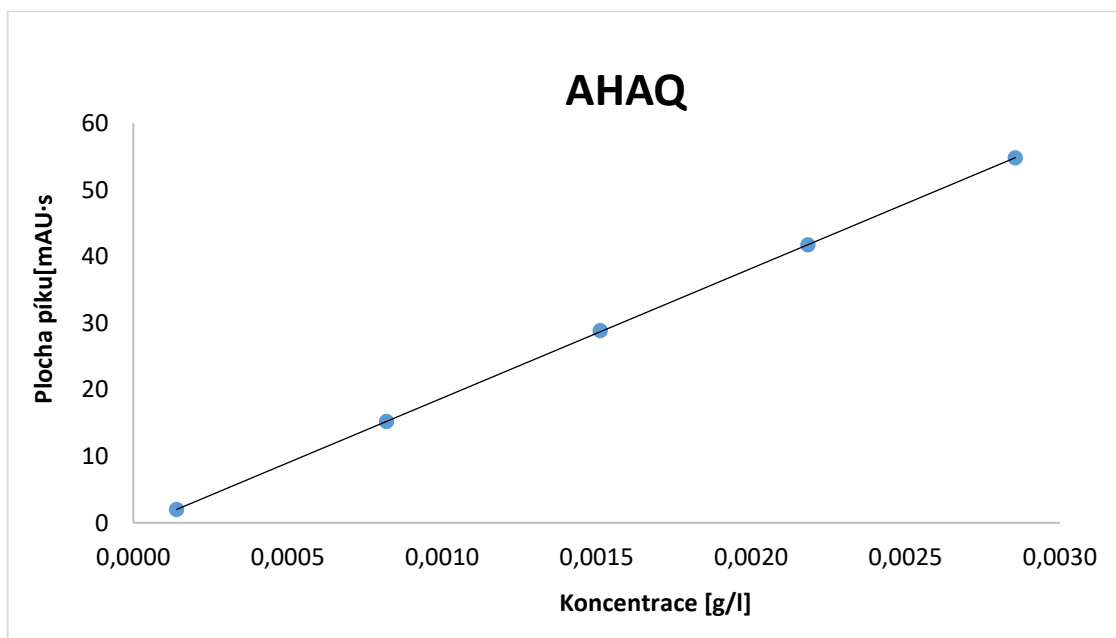
**Obrázek 24:** Kalibrační přímka sodné soli 1-amino-4-hydroxyantrachinon-2-sulfonové kyseliny (AHASK)



**Obrázek 25:** Kalibrační přímka sodné soli 1-amino-4-bromo-2-antrachinon-2-sulfonové kyseliny (BAK)



*Obrázek 26:* Kalibrační přímka 1-aminoantrachinonu (1-AA)



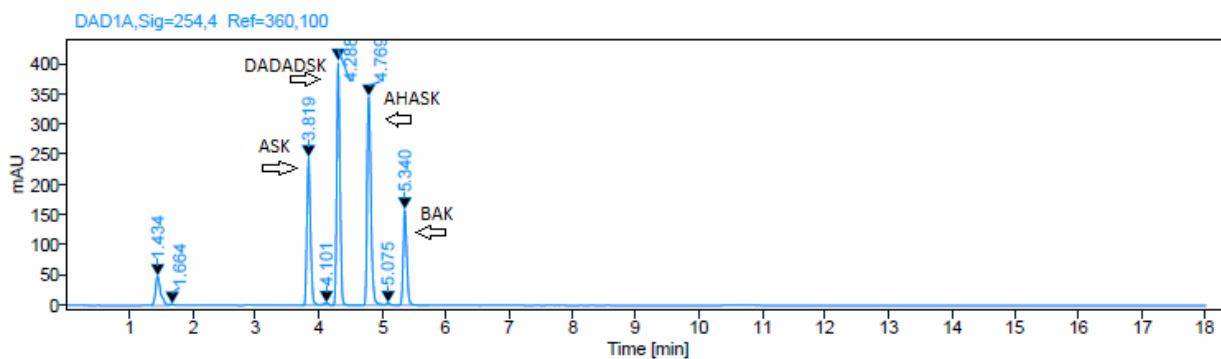
*Obrázek 27:* Kalibrační přímka 1-amino-2-hydroxyantrachinonu (AHAQ)

**Tabulka 6:** Mez detekce a mez kvantifikace

Standard	Koncentrace [g/l]	Rovnice regrese	LOD [mg/kg]	LOQ [mg/kg]
ASK	0,086	$y = 16056x - 0,3154; R^2 = 0,999$	0,195	0,650
DADADSK	0,082	$y = 25678x + 1,0011; R^2 = 1$	0,192	0,641
AHASK	0,110	$y = 18045x + 2,4493; R^2 = 0,9995$	0,087	0,290
BAK	0,056	$y = 18664x + 2,0535; R^2 = 0,9994$	0,073	0,243
1-AA	0,034	$y = 24290x + 1,74; R^2 = 0,9998$	0,364	0,167
AHAQ	0,014	$y = 19459x - 0,7211; R^2 = 1$	0,050	0,167

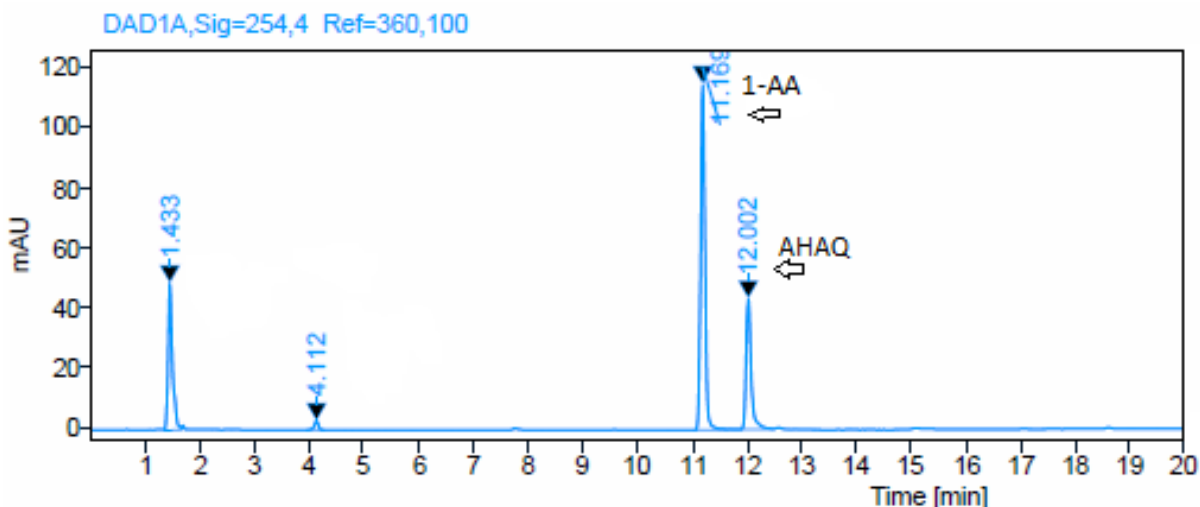
Na obrázku 28 je ukázka analýzy směsi kalibračních standardů sulfonovaných látek obsahujících 0,086 g/l ASK, 0,082g/l DADADSK, 0,011 g/l AHASK a 0,056 g/l BAK.

Analýza kalibračních standardů nesulfonovaných látek je uvedena na obrázku 29 (0,036 g/l 1-AA a 0,014 g/l AHAQ). Na záznamu analýz nejsou kromě hlavních píků analyzovaných standardů a minoritních píků příslušejících použitému DMSO ( $r_t = 1,4, 1,6, 4,1$  a  $5,1$  minuty), lze tedy považovat použité standardy nečistot za dostatečně čisté.



**Obrázek 28:** Chromatogram kalibračního roztoku sulfonovaných nečistot obsahující 0,086 g/l ASK, 0,082g/l DADADSK, 0,011 g/l AHASK a 0,056 g/l BAK

- Podmínky analýzy jsou uvedeny v kapitole 2.4



**Obrázek 29:** Chromatogram kalibračního roztoku nesulfonovaných nečistot obsahující 0,036 g/l 1-AA a 0,014 g/l AHAQ

- Podmínky analýzy jsou uvedeny v kapitole 2.4

## 3.2. Optimalizace extrakce nečistot z pigmentu P.R.177

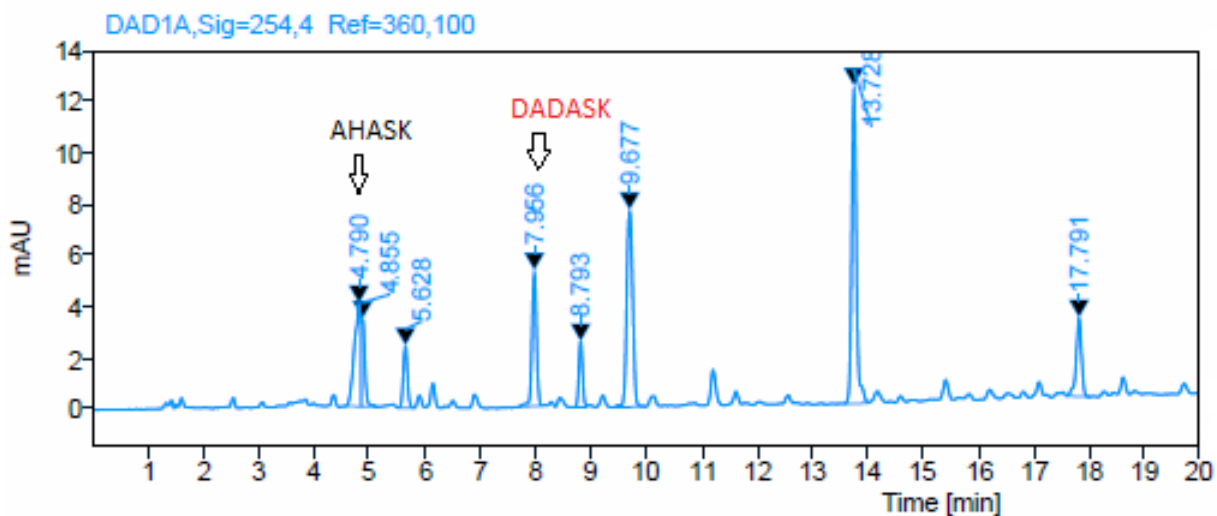
### 3.2.1. Výběr vhodného rozpouštědla pro extrakci

Výběr vhodného rozpouštědla je hlavním parametrem pro účinnou extrakci. Rozpouštědlo by nemělo reagovat s nečistotami ani s matricí pigmentu a mělo by zároveň vyextrahovat co nejvíce nečistot. Pro extrakci nečistot z pigmentu bylo vybráno 5 rozpouštědel: acetonitril, tetrahydrofuran, dioxan, dimethylformamid a dimethylsulfoxid.

Pro extrakci byl použit postup přípravy vzorků uvedený v kapitole 2.8.1. Výběr rozpouštědel byl testován na vzorku A, kde bylo očekáváno největší množství nečistot.

#### Extrakce acetonitrilem

Po extrakci a přefiltrování se stříkačkovým filtrem byl filtrát narůžovělý. Na obrázku 30 je HPLC záznam extrakce nečistot uvedeným rozpouštědlem. Ze záznamu je patrné, že použitím acetonitrilu, bylo vyextrahováno 7 nečistot, což je výrazně menší množství než při extrakcích prováděných podle dosavadní metodiky společnosti Synthesia, a.s.

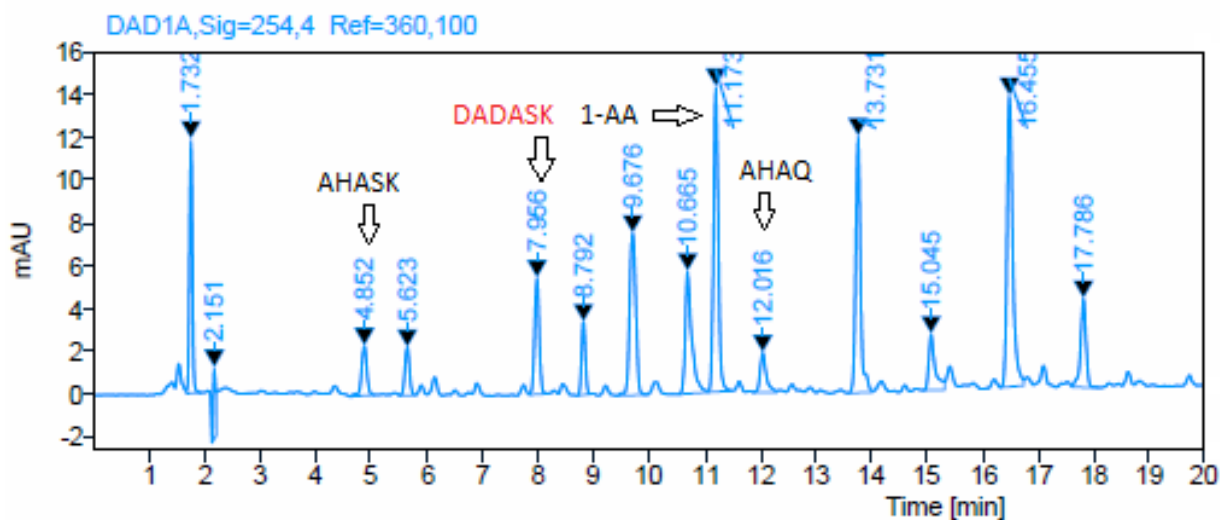


**Obrázek 30:** Extrakce vzorku A acetonitrilem

- Podmínky analýzy jsou uvedeny v kapitole 2.4.

### Extrakce tetrahydrofuranem

Po extrakci a přefiltrování se stříkačkovým filtrem byl filtrát narůžovělý. Z HPLC záznamu je vidět 14 nečistot vyextrahovaných použitím tetrahydrofuranu (obrázek 31), což je více než při použití acetonitrilu, ale stále méně než při extrakcích prováděných podle dosavadní metodiky společnosti Synthesia, a.s.



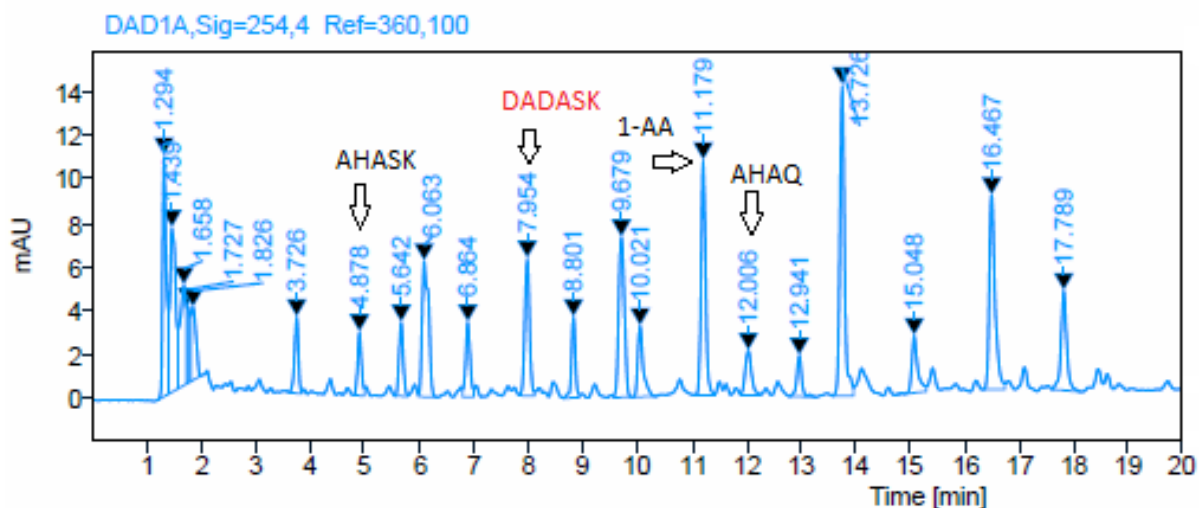
**Obrázek 31:** Extrakce vzorku A tetrahydrofuranem

- Podmínky analýzy jsou uvedeny v kapitole 2.4.



## Extrakce dioxanem

Po extrakci a přefiltrování se stříkačkovým filtrem byl filtrát narůžovělý. Z HPLC záznamu je vidět, že použitím dioxanu bylo vyextrahováno 17 nečistot (obrázek 32). Množství nečistot je zhruba srovnatelné jako při extrakci tetrahydrofuranem.

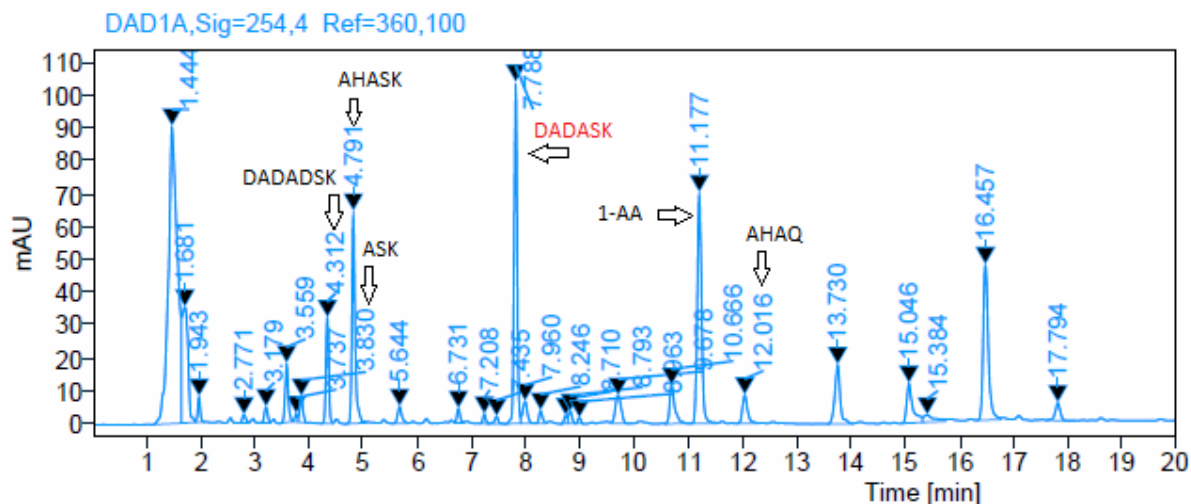


**Obrázek 32:** Extrakce vzorku A dioxanem

- Podmínky analýzy jsou uvedeny v kapitole 2.4.

## Extrakce dimethylformamidem

Po extrakci a přefiltrování byl filtrát růžový. Pomocí dimethylformamidu bylo vyextrahováno 29 nečistot, což je výrazně větší počet než při použití acetonitrilu, tetrahydrofuranu či dioxanu (obrázek 33). Zároveň je z odezvy na záznamu vidět, že množství jednotlivých vyextrahovaných nečistot bylo podstatně větší než u dosud testovaných rozpouštědel. Počet vyextrahovaných nečistot je porovnatelný s dosud používaným postupem ve společnosti Synthesia, a.s.

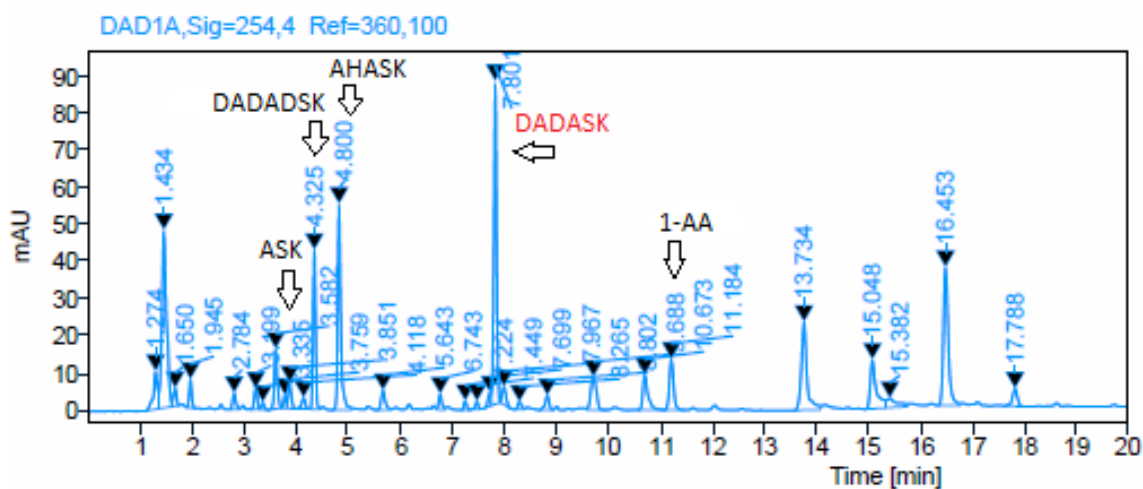


**Obrázek 33:** Extrakce vzorku A dimethylformamidem

- Podmínky analýzy jsou uvedeny v kapitole 2.4.

### Extrakce dimethylsulfoxidem

Po extrakci a přefiltrování byl filtrát růžový. Pomocí dimethylsulfoxidu bylo vyextrahováno 27 nečistot, což je větší počet než při použití acetonitrilu, tetrahydrofuranu či dioxanu a porovnatelný s extrakcí dimethylformamidem (obrázek 34). Ze záznamu analýzy vyplývá, že pomocí dimethylsulfoxidu bylo vyextrahováno porovnatelné množství nečistot jako s použitím dimethylformamidu. Vzhledem k následnému testování vzorků na genotoxicitu, při které se používá jako rozpouštědlo dimethylsulfoxid, byl dimethylsulfoxid vybrán jako nejvhodnější rozpouštědlo pro následné experimenty.



**Obrázek 34:** Extrakce vzorku A dimethylsulfoxidem

- Podmínky analýzy jsou uvedeny v kapitole 2.4.

### 3.2.2. Vliv doby extrakce v ultrazvukové lázni na výtěžek

Dalším parametrem, který byl optimalizován, byla doba extrakce vzorku v ultrazvukové lázni. Vzorek připravený v DMSO byl extrahován 10, 20, 30, 45 a 60 minut v ultrazvukové lázni při laboratorní teplotě, následně odstředěn, přefiltrován a analyzován HPLC dle postupu uvedeného v kapitole 2.8.1. Vliv doby extrakce byl testován na všech třech analyzovaných vzorcích pigmentu.

Výsledky přepočítané na mg vyextrahovaných nečistot vztažené 1 kg pigmentu jsou uvedeny v tabulkách 7-9. Z nich lze pozorovat, že trend vzrůstajícího výtěžku v závislosti na prodlužování doby extrakce není příliš patrný, největší vliv má doba extrakce na výtěžek AHASK u vzorku B a 1-AA u vzorků A a C. Proto byla vybrána pro další experimenty doba extrakce 60 minut.

**Tabulka 7:** Hmotnostní obsah nečistot ve vzorku A extrahovaném s různou dobu v ultrazvukové lázni

Vzorek A		Hmotnostní obsah [mg/kg]								
Extrakce	10 minut		20 minut		30 minut		45 minut		60 minut	
ASK	17,8	16,4	16,8	16,8	17,2	15,2	15,8	19,4	19,3	18,7
DADADSK	58,3	54,2	54,7	54,2	54,3	46,5	47,6	58,7	57,4	54,6
AHASK	130,9	126,7	125,4	122,7	128,0	110,6	116,7	140,7	143,9	135,7
1-AA	31,6	32,4	32,4	32,2	35,9	33,6	38,6	37,3	56,9	43,7

**Tabulka 8:** Hmotnostní obsah nečistot ve vzorku B extrahovaném s různou dobu v ultrazvukové lázni

Vzorek B		Hmotnostní obsah [mg/kg]								
Extrakce	10 minut		20 minut		30 minut		45 minut		60 minut	
ASK	14,7	17,8	14,4	15,6	12,8	15,0	13,0	16,1	16,88	15,8
DADADSK	57,7	71,1	56,5	61,9	48,7	58,1	49,7	61,6	61,74	59,3
AHASK	368,1	446,7	358,3	392,9	318,9	375,4	324,2	399,4	414,72	396,6
1-AA	21,5	25,3	20,0	21,1	20,6	22,6	22,0	23,7	24,28	25,3

**Tabulka 9:** Hmotnostní obsah nečistot ve vzorku C extrahovaném s různou dobu v ultrazvukové lázni

Vzorek C		Hmotnostní obsah [mg/kg]								
Extrakce	10 minut		20 minut		30 minut		45 minut		60 minut	
ASK	20,7	20,9	21,0	19,6	21,3	20,5	22,4	20,4	20,3	19,7
DADADSK	126,6	127,9	129,0	119,5	128,8	124,6	130,7	120,1	116,0	118,4
AHASK	230,0	238,2	232,3	220,3	236,4	233,0	250,0	228,8	226,0	226,5
1-AA	45,1	47,3	43,8	45,2	48,5	48,0	52,6	51,6	54,7	44,8

### 3.2.3. Vliv teploty ultrazvukové lázně na extrakci

Třetím optimalizovaným parametrem byla teplota ultrazvukové lázně. Teplota extrakce byla nastavena na 20 °C, 40 °C, 60 °C a 80 °C. Pro výběr optimální teploty byly použity všechny 3 vzorky, které byly připraveny dle postupu v kapitole 2.9.1., s DMSO jako extrakčním rozpouštědlem. Doba extrakce byla vzorku v ultrazvukové lázni byla 60 minut.

Výsledky extrakcí při různé teplotě jsou uvedeny v tabulkách 10-12. Z nich vyplývá, že nejvyšší extrakční výtěžek pro všechny nečistoty byl při 80 °C. Největší vliv teploty na výtěžek extrakce byl pozorován u AHASK a 1-AA.

**Tabulka 10:** Hmotnostní obsah nečistot ve vzorku A vyextrahovaném s různou teplotou ultrazvukové lázně

Vzorek A		Hmotnostní obsah [mg/kg]							
Extrakce	20 °C		40 °C		60 °C		80 °C		
ASK	16,8	16,6	16,8	16,0	16,4	16,0	17,8	17,5	
DADADSK	50,7	51,2	50,7	44,9	50,6	50,9	49,1	48,4	
AHASK	110,9	113,5	110,9	105,8	106,7	106,6	121,1	121,7	
1-AA	32,8	34,6	32,8	49,2	45,5	21,7	64,3	65,4	
AHAQ	-	-	-	6,6	-	-	8,1	7,65	

**Tabulka 11:** Hmotnostní obsah nečistot ve vzorku B vyextrahovaném s různou teplotou ultrazvukové lázně

Vzorek B		Hmotnostní obsah [mg/kg]							
Extrakce	20 °C		40 °C		60 °C		80 °C		
ASK	13,89	14,7	15,29	15,27	13,87	13,5	16,99	16,4	
DADADSK	52,35	56,6	56,94	56,94	50,37	48,5	55,56	49,7	
AHASK	342,64	368,7	376,39	380,27	334,54	332,9	423,71	413,1	
1-AA	21,28	22,3	25,69	28,24	12,89	14,7	53,89	49,2	

**Tabulka 12:** Hmotnostní obsah nečistot ve vzorku C vyextrahovaném s různou teplotou ultrazvukové lázně

Vzorek C		Hmotnostní obsah [mg/kg]							
Extrakce	20 °C		40 °C		60 °C		80 °C		
ASK	19,9	19,5	22,7	21,1	19,9	18,3	22,3	22,3	
DADADSK	117,8	117,6	128,8	123,6	110,5	103,8	117,8	118,5	
AHASK	224	225	252,8	238,9	217,5	202,1	250	252,7	
1-AA	50,1	49,3	66,5	59,1	30,8	31,3	103	89,8	

Z tabulek 7-12 vyplývá, že největší vliv teploty a doby extrakce na výtěžek nečistot u všech analyzovaných pigmentů je hlavně pro 1-AA a pro AHASK. Z nutnosti použít dlouhou dobu extrakce a při vysoké teplotě lze usuzovat na velice pevnou vazbu nečistot ve struktuře pigmentu.

### 3.2.4. Vliv navážky pigmentu na extrakci

Posledním optimalizovaným parametrem byl vliv navážky pigmentu na výtěžek extrakce. Navážka byla zvolena na 0,5 g, 1 g, 1,5 g a 2 g. Všechny tři vzorky byly zpracovány extrakcí 60 minut v ultrazvuku při teplotě 80 °C. Při filtrování odstředěných extraktů přes 0,2 µm filtry určené pro DMSO bylo zjištěno, že extrakt z navážky 2 g není možné přefiltrovat z důvodu nedostatečného odstředění, kdy nedošlo k oddělení odstředěného pigmentu a supernatantu a tím k okamžitému

ucpání stříkačkového filtru při následné filtraci do nádobky pro autosampler. Navážku 1,5 g byla na hranici zpracovatelnosti odstředěním, proto byla jako optimální navážka zvolen 1 g pigmentu. Důvodem snahy použít co největší navážku pigmentu pro extrakci byla možnost snížení detekčního limitu nečistot v analyzovaných pigmentech. Pro navážku 1 g bylo očekáváno vyextrahování zhruba dvojnásobného hmotnostního obsahu známých látek než pro navážku 0,5 g. Toto bylo splněno pro látky obsahující-SO<sub>3</sub> skupinu, kde je dobře patrný trend mezi vyextrahovaným množstvím nečistot a velikostí navážky. Pro látky ze skupiny nesulfonovaných antrachinonů je vliv navážky na vyextrahované množství těchto nečistot malý, dokonce byl pozorován pokles vyextrahovaného množství nečistot při zvýšené navážce pigmentu (tabulky 13-15). Tento jev může být způsoben obtížnou rozpustností v extrakčním rozpouštědle.

**Tabulka 13:** Koncentrace nečistot v mg/kg pigmentu v závislosti na velikosti zpracovávané navážky pro vzorek A

Vzorek A		Hmotnostní obsah [mg/kg]					
Extrakce	0,5 g		1 g		1,5 g		
ASK	9,8	10,3	22,7	18,1	33,7	31,3	
DADADSK	26,1	27,8	61,7	50,7	92,0	86,0	
AHASK	62,6	68,6	148,8	119,3	222,2	207,0	
1-AA	47,5	78,4	35,7	64,2	79,5	76,2	
AHAQ	9,8	9,6	9,3	8,1	9,7	9,5	

**Tabulka 14:** Koncentrace nečistot v mg/kg pigmentu v závislosti na velikosti zpracovávané navážky pro vzorek B

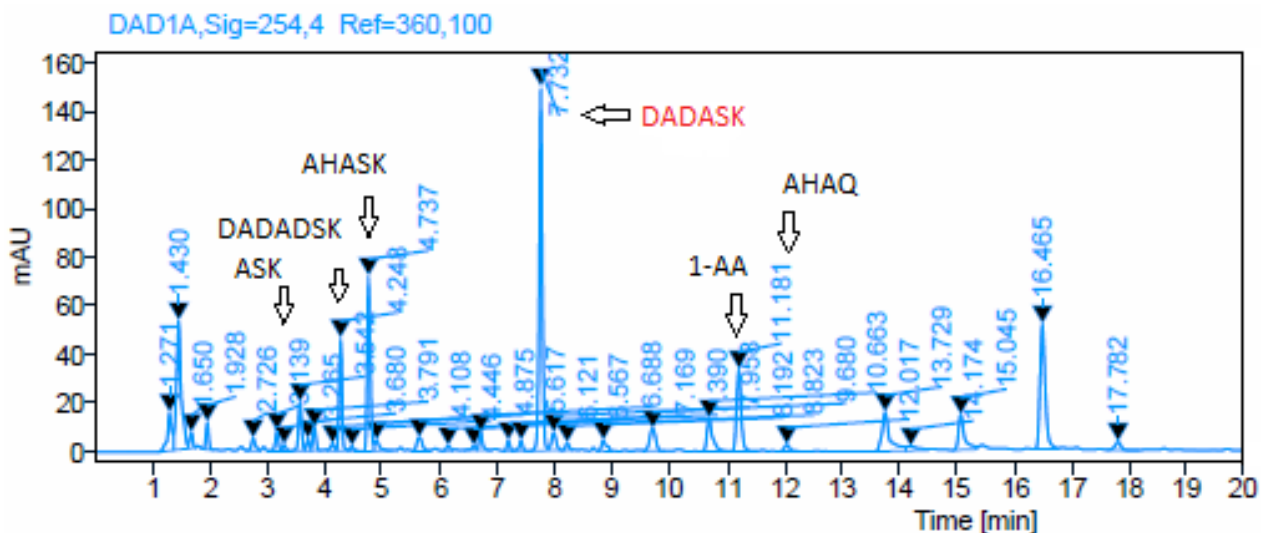
Vzorek B		Hmotnostní obsah [mg/kg]				
Extrakce	0,5 g		1 g		1,5 g	
ASK	7,3	8,0	16,1	15,5	28,4	25,4
DADADSK	21,3	25,8	56,9	53,8	94,4	89,5
AHASK	181,9	198,4	406,4	392,4	723,2	649,1
1-AA	181,9	70,3	406,4	43,6	723,2	35,9
AHAQ	8,9	8,9	-	-	-	-

**Tabulka 15:** Koncentrace nečistot v mg/kg pigmentu v závislosti na velikosti zpracovávané navážky pro vzorek C

Vzorek C		Hmotnostní obsah [mg/kg]				
Extrakce	0,5 g		1 g		1,5 g	
ASK	-	-	23,4	-	-	-
DADADSK	45,7	72,5	122,5	171,6	192,5	279,4
AHASK	104,4	72,6	264,5	154,3	390,6	246,2
1-AA	92,5	114,7	85,6	87,4	52,8	66,1
AHAQ	8,9	5,1	8,8	-	-	-

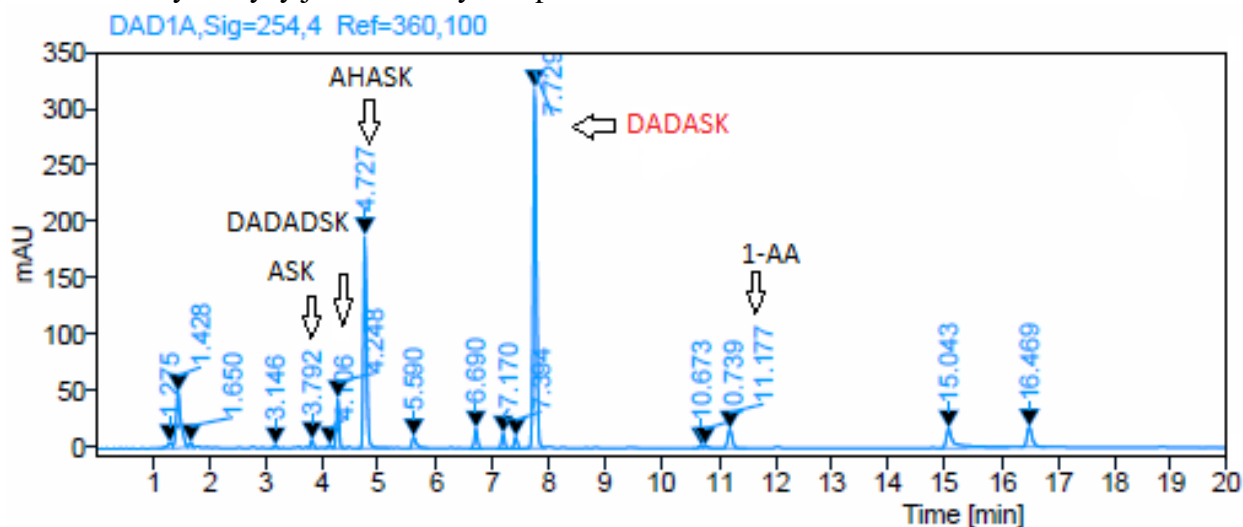
### 3.2.5. Extrakce vzorků za optimalizovaných podmínek

Vzorky A, B, C byly extrahovány za optimalizovaných podmínek – navážením 1 g pigmentu do 12 ml zkumavky, doplněním do 10 ml DMSO, vloženy na 60 minut do ultrazvukové lázně vyhřáté na 80 °C a poté odstředěny 5 minut při 5000 otáčkách. Následně byly vzorky přefiltrovány přes 0,2 µm stříkačkové filtry pro DMSO a analyzovány na HPLC. Chromatogramy získaných extraktů jednotlivých vzorků jsou na obrázcích 35-37.



Obrázek 35: Analýza extraktu vzorku A získaného za optimalizovaných podmínek extrakce

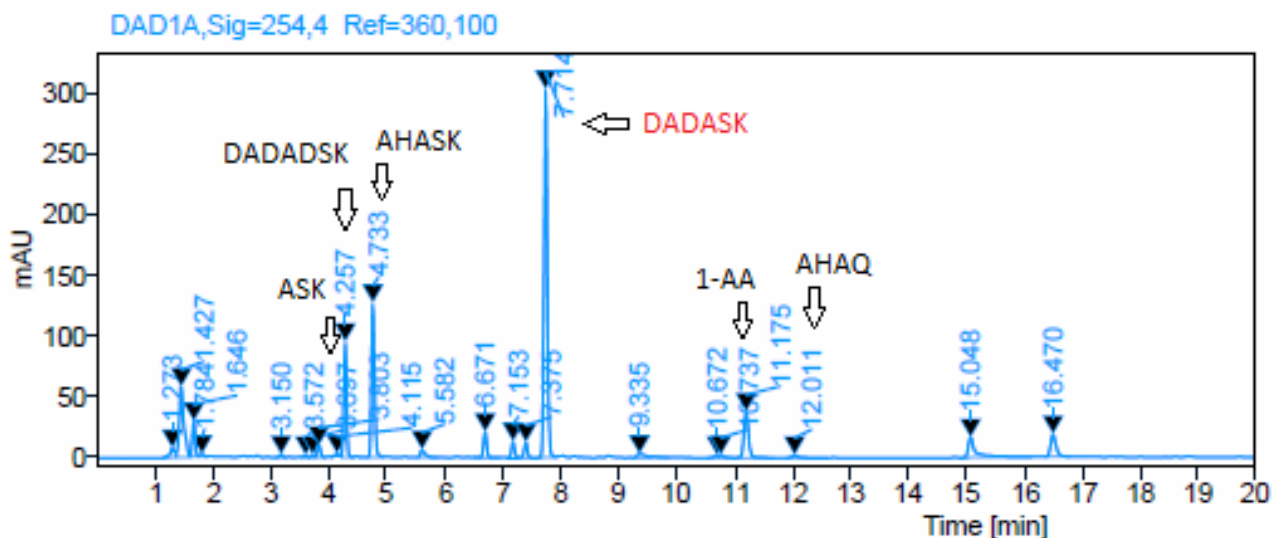
- Podmínky analýzy jsou uvedeny v kapitole 2.4.



Obrázek 36: Analýza extraktu vzorku B získaného za optimalizovaných podmínek extrakce

- Podmínky analýzy jsou uvedeny v kapitole 2.4.



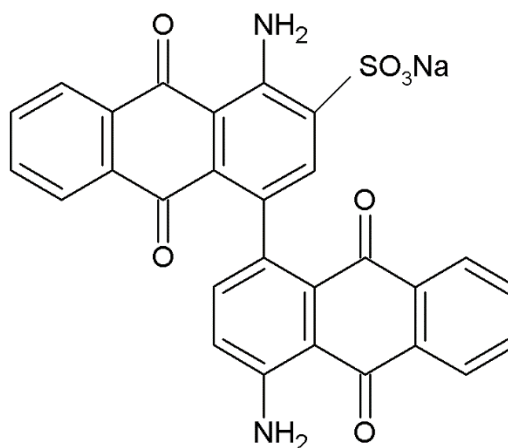


**Obrázek 37:** Analýza extraktu vzorku C získaného za optimalizovaných podmínek extrakce

- Podmínky analýzy jsou uvedeny v kapitole 2.4.

Použitím optimalizovaných podmínek extrakce bylo pro vzorek A, bylo vyextrahováno 29 nečistot, z toho 5 nečistot (ASK, AHASK, DADADSK, 1-AA, AHAQ), pro které byly k dispozici standardy a tudíž bylo možné stanovit jejich množství v jednotlivých vzorcích. Pro vzorek B bylo vyextrahováno 15 nečistot, z nichž 5 lze kvantifikovat (ASK, AHASK, DADADSK, 1-AA, AHAQ). Stejným způsobem bylo ve vzorku C nalezeno celkem 20 nečistot, z toho 5 kvantifikovatelných.

Na chromatogramech extraktů ze všech vzorků se vyskytoval velice intenzivní pík v  $t_r=7,7$  minut, kterému neodpovídala žádná známá nečistota. Proto byly vzorky následně analyzovány kapalinovou chromatografií ve spojení s hmotnostní detekcí za účelem identifikace dalších nečistot. Experimentální podmínky těchto analýz jsou uvedeny v kapitole 2.5. Interpretací  $MS^+$  a  $MS^-$  spekter tohoto píku byla navržena struktura nečistoty uvedená na obrázku 38. Protože k této látce nebyl k dispozici standard, proto nebylo možné stanovit její množství ve vzorcích.



**Obrázek 38:** Struktura DADASK

### 3.3. Vícenásobná extrakce nečistot z pigmentu P.R.177

Vzhledem k očekávané nízké rozpustnosti některých nečistot v extrakčních rozpouštědlech byl ověřen vliv vícenásobné extrakce na velikost výtěžku nečistot z pigmentu. Pro vícenásobnou extrakci nečistot z pigmentu byly použity dvě rozpouštědla – dimethylsulfoxid a tetrahydrofuran. V případě extrakce pomocí DMSO byl optimalizovaný postup extrakce nečistot z pigmentu byl upraven kvůli nedokonalému odstředění; bylo použito 17 000 otáček po dobu 22 minut. Tímto způsobem byla extrakce každého vzorku provedena celkem třikrát po sobě vždy s novým podílem extrakčního rozpouštědla a každý extrakt byl analyzován samostatně.

Nalezená množství vyextrahovaných nečistot vícenásobnou extrakcí jednotlivých vzorků pomocí DMSO jsou uvedena v tabulkách 16-18 a na obrázcích 39-43. Z těchto experimentů vyplývá, že látky obsahující sulfo skupinu se extrahují DMSO z pigmentu velice snadno a největší podíl (více než 75 %) nečistot je vyextrahován již během první extrakce. Naopak málo polární nečistoty (1-AA a AHAQ) jsou velice pevně navázány ve struktuře pigmentu (intramolekulární vazby), a proto je kvantitativní vyextrahování těchto nečistot z pigmentu velice obtížné a jak je vidět z odpovídajících dat, ani po třetí opakované extrakci nedochází k poklesu vyextrahovaného podílu nečistot. Jednou z možných příčin tohoto jevu může být velice pomalá kinetika extrakce těchto nečistot z důvodu jejich pevné vazby ve struktuře pigmentu.

Výsledky vícenásobné extrakce tetrahydrofuranem jsou uvedeny v tabulkách 19-21 a na obrázcích 44-46. Z nich vyplývá, že tetrahydrofuranem byly vyextrahovány pouze nečistoty 1-AA a AHAQ, přičemž trend závislosti vyextrahovaného množství na počtu opakování extrakce je podobný jako v případě DMSO. Z dalších nečistot byla tetrahydrofuranem vyextrahována pouze AHASK ze vzorku A. Z toho vyplývá, že tetrahydrofuran není vhodným extrakčním rozpouštědlem pro látky obsahující sulfoskupinu, což je v souladu s experimenty prováděnými v kapitole 3.2.1. při hledání nejlepšího extrakčního rozpouštědla.

**Tabulka 16:** Hmotnostní obsah nečistot získaný vícenásobnou extrakcí vzorku A v DMSO

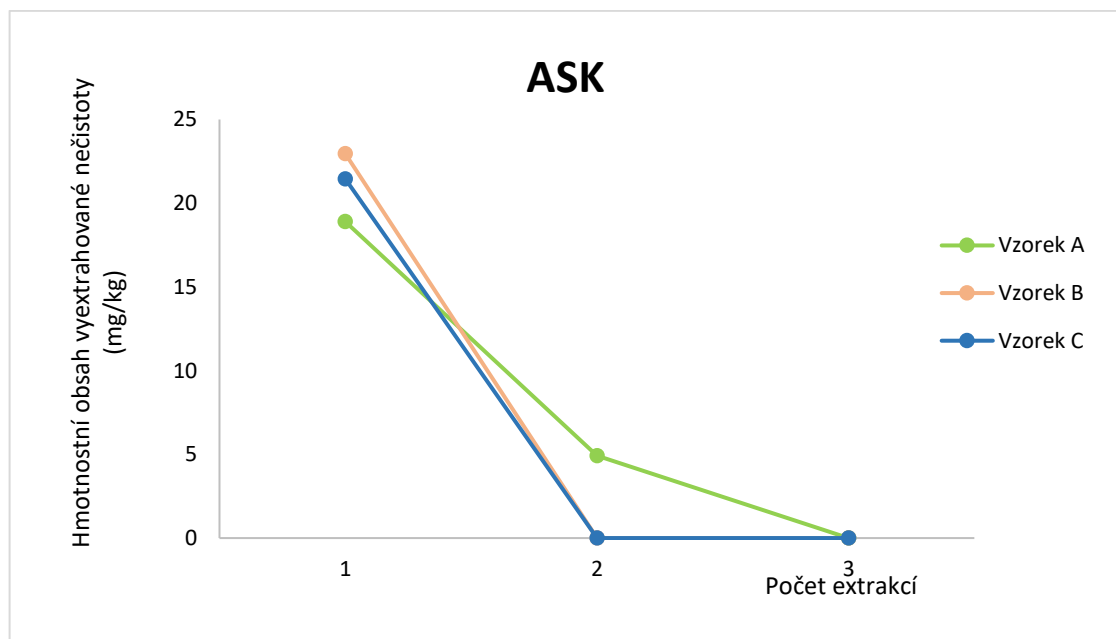
Vzorek A	Hmotnostní obsah [mg/kg]						
	Extrakce DMSO	1.extrakce	2.extrakce	3.extrakce	% 1.extrakce	% 2.extrakce	% 3.extrake
ASK		18,9	4,9	-	79,4	20,6	-
DADADSK		50,1	9,1	2,5	81,1	14,8	4,1
AHASK		128,2	31,8	2,8	78,7	19,5	1,7
1-AA		74,4	101,1	102,7	26,7	36,3	36,9
AHAQ		8,6	12,4	14,0	24,6	35,4	39,9

**Tabulka 17:** Hmotnostní obsah nečistot získaný vícenásobnou extrakcí vzorku B v DMSO

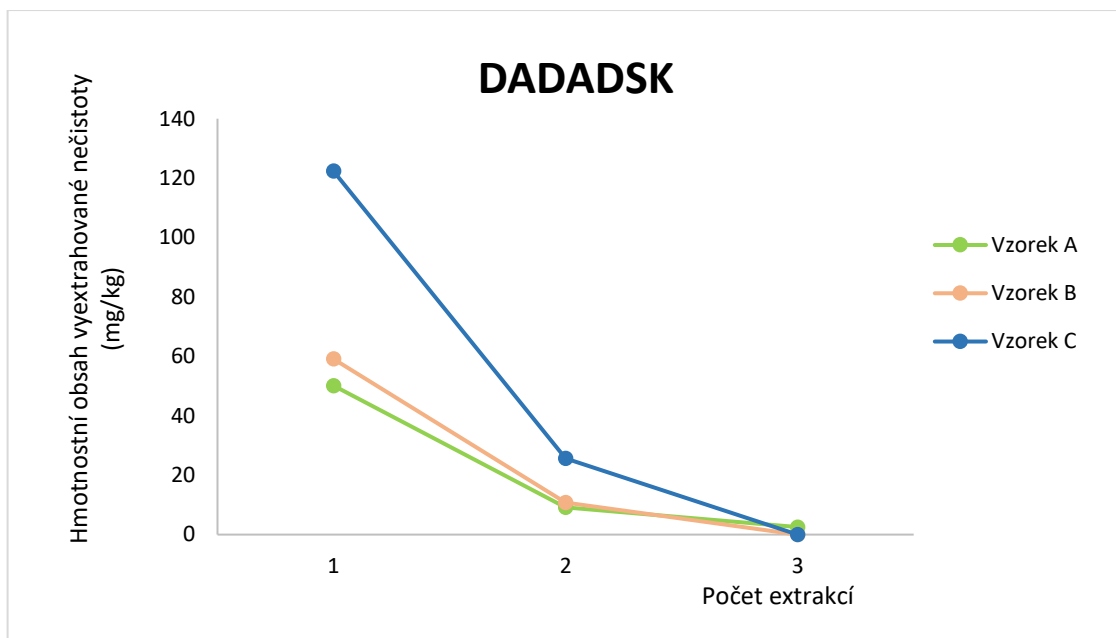
Vzorek B	Hmotnostní obsah [mg/kg]						
	Extrakce DMSO	1.extrakce	2.extrakce	3.extrakce	% 1.extrakce	% 2.extrakce	% 3.extrakce
ASK		23,0	-	-	100,00	-	-
DADADSK		59,1	10,8	-	84,6	15,4	-
AHASK		417,0	88,9	12,4	80,4	17,2	2,4
1-AA		52,3	72,5	82,4	25,3	35,0	39,8
AHAQ		6,4	8,1	10,6	25,4	32,5	42,1

**Tabulka 18:** Hmotnostní obsah nečistot získaný vícenásobnou extrakcí vzorku C v DMSO

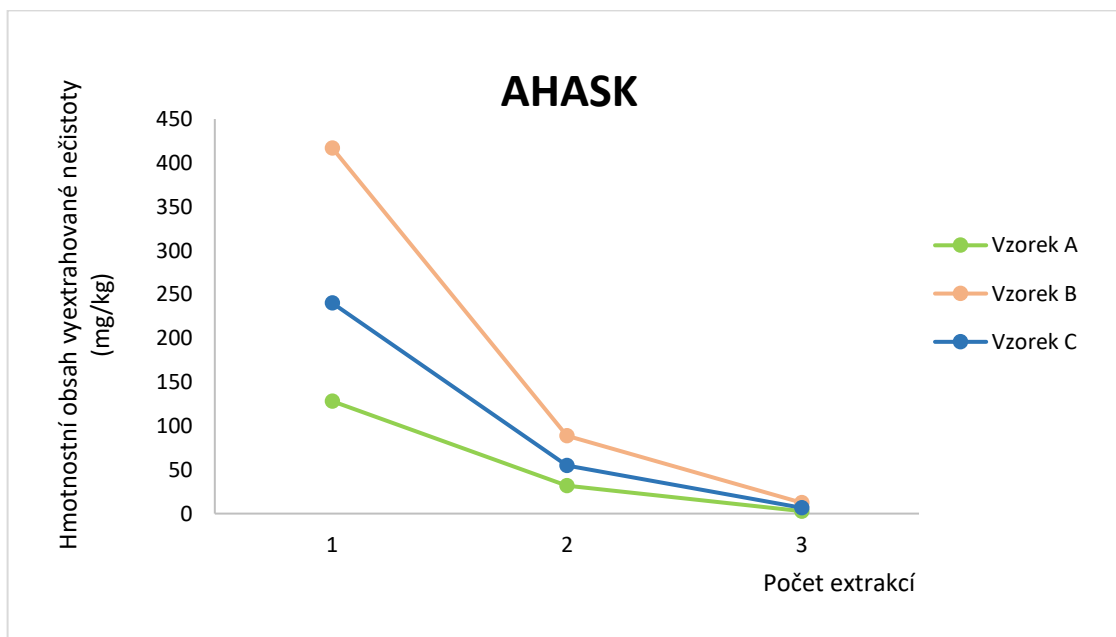
Vzorek C	Hmotnostní obsah [mg/kg]						
	Extrakce DMSO	1.extrakce	2.extrakce	3.extrakce	% 1.extrakce	% 2.extrakce	% 3.extrakce
ASK		21,5	-	-	100,00	-	-
DADADSK		122,3	25,7	-	82,7	17,4	-
AHASK		240,2	54,9	6,6	79,6	18,2	2,2
1-AA		100,6	128,1	109,2	29,8	37,9	32,3
AHAQ		8,6	9,1	7,9	33,5	35,7	30,8



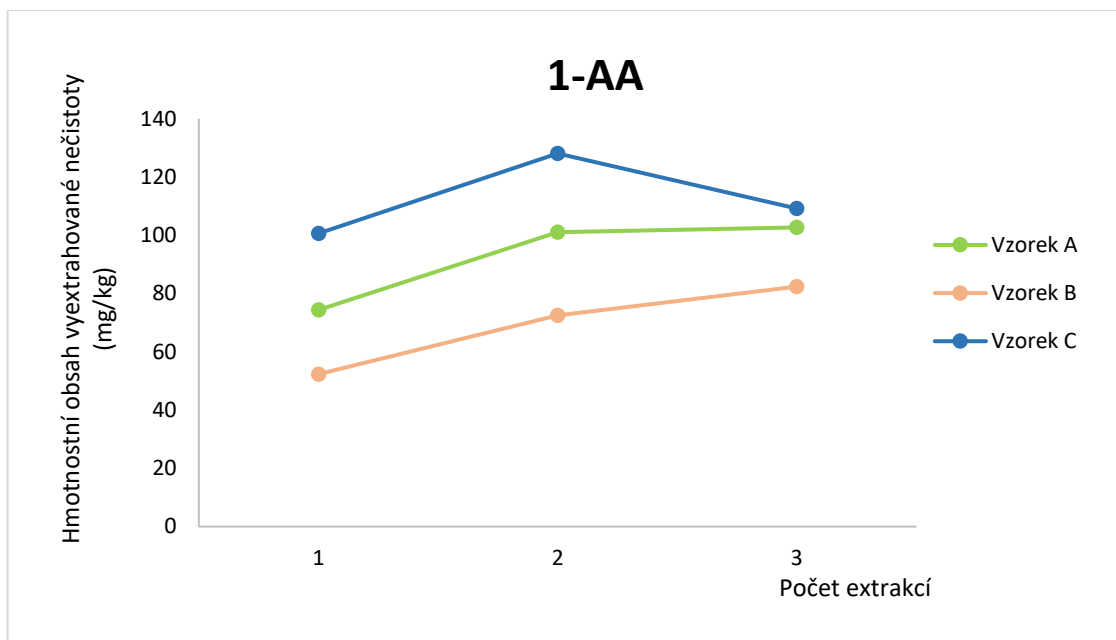
**Obrázek 39:** Vyextrahované množství ASK pomocí vícenásobné extrakce v DMSO



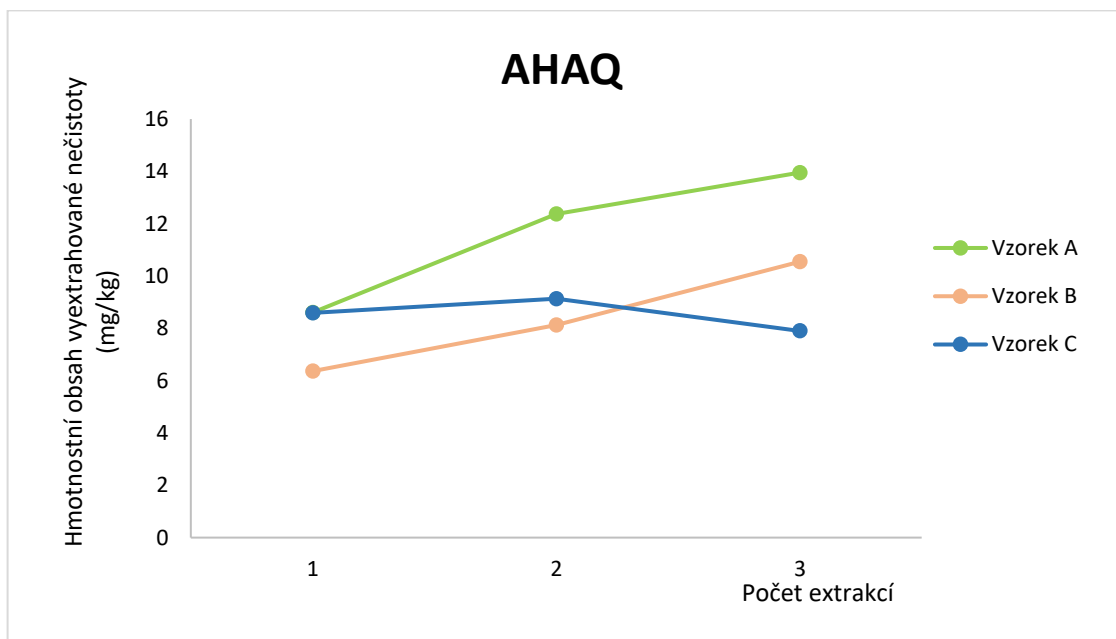
**Obrázek 40:** Vyextrahované množství DADADSK pomocí vícenásobné extrakce v DMSO



**Obrázek 41:** Vyextrahované množství AHASK pomocí vícenásobné extrakce v DMSO



**Obrázek 42:** Vyextrahované množství 1-AA pomocí vícenásobné extrakce v DMSO



**Obrázek 43:** Vyextrahované množství AHAQ pomocí vícenásobné extrakce v DMSO

**Tabulka 19:** Hmotnostní obsah nečistot získaný vícenásobnou extrakcí vzorku A v THF

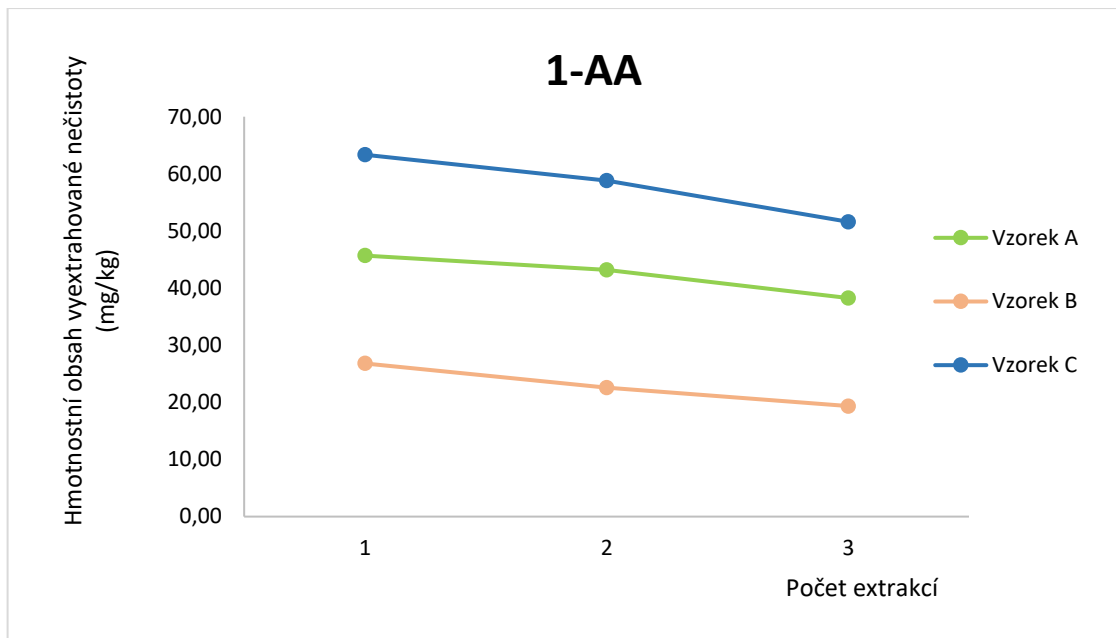
Vzorek A		Hmotnostní obsah [mg/kg]				
Extrakce THF	1.extrakce	2.extrakce	3.extrakce	% 1.extrakce	% 2.extrakce	% 3.extrakce
AHASK	7,6	-	-	100,0	-	-
1-AA	45,7	43,2	38,3	35,9	34,0	30,1
AHAQ	10,9	10,6	9,3	35,5	34,4	30,1

**Tabulka 20:** Hmotnostní obsah nečistot získaný vícenásobnou extrakcí vzorku B v THF

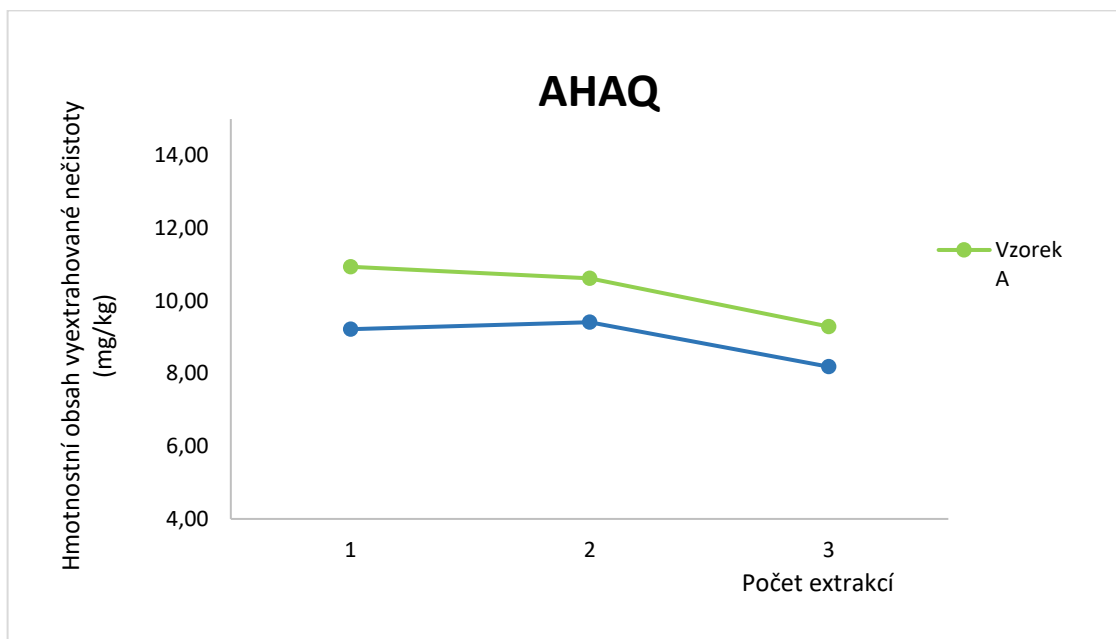
Vzorek B		Hmotnostní obsah [mg/kg]				
Extrakce THF	1.extrakce	2.extrakce	3.extrakce	% 1.extrakce	% 2.extrakce	% 3.extrakce
1-AA	26,8	22,6	19,4	39,0	32,9	28,2

**Tabulka 21:** Hmotnostní obsah nečistot získaný vícenásobnou extrakcí vzorku C v THF

Vzorek C		Hmotnostní obsah [mg/kg]				
Extrakce THF	1.extrakce	2.extrakce	3.extrakce	% 1.extrakce	% 2.extrakce	% 3.extrakce
1-AA	63,3	58,8	51,6	36,5	33,9	29,7
AHAQ	9,2	9,4	8,2	34,4	35,1	30,5



**Obrázek 44:** Vyextrahované množství 1-AA pomocí vícenásobné extrakce v THF



**Obrázek 45:** Vyextrahované množství AHAQ pomocí vícenásobné extrakce v THF





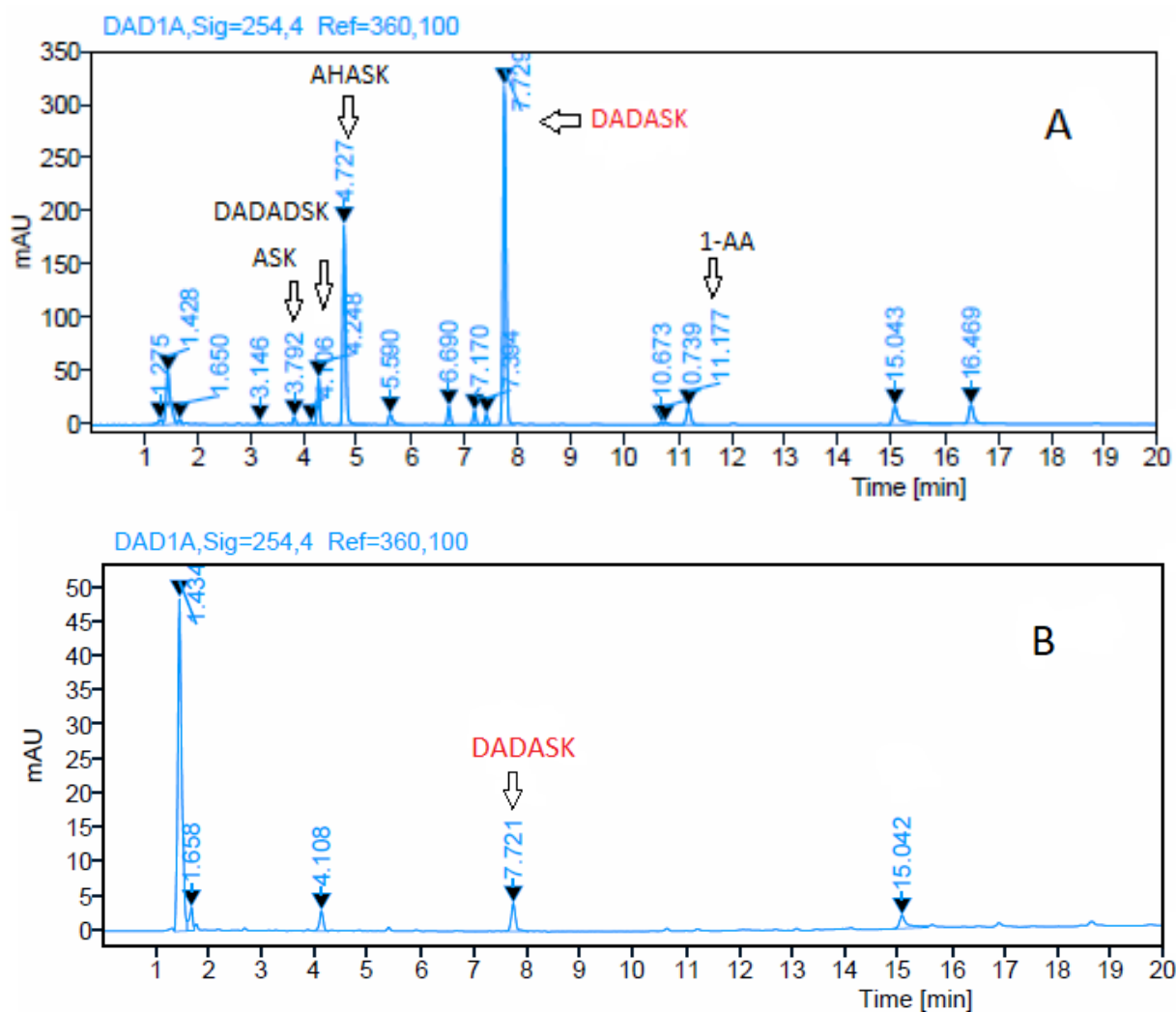
**Obrázek 46:** Vyextrahované množství AHASK pomocí vícenásobné extrakce v THF

### 3.4. SUBLIMACE

Pro přípravu čistého pigmentu bez nečistot byla jako čistící metoda použita sublimace. K přečištění byl vybrán vzorek B, ve kterém byl zjištěn nejmenší obsah nečistot. Podmínky sublimace jsou uvedeny v kapitole 2.6. Porovnání analýz extraktu nečištěného pigmentu B a téhož pigmentu po přesublimování je na obrázku 47, extrakce probíhala za optimalizovaných podmínek (1 g vzorku do 10 ml DMSO, 60 minut v ultrazvukové lázni vyhřáté na 80 °C).

Na chromatogramu extraktu (obrázek 47 B) jsou vidět pouze píky s ret. časy 1,4, 1,6 a 4,1 minuty, které odpovídají extrakčnímu rozpouštědлу a dále pík s  $t_r = 7,7$  minut odpovídající DADASK a pík neznámé nečistoty s  $t_r = 15$  minut. V porovnání s obsahem těchto nečistot s původním nepřečištěným pigmentem bylo zjištěno, že v přečištěném pigmentu klesl obsah zbytkové DADASK na 1,8 %, respektive obsah neznámé nečistoty s  $t_r = 15$  minut na 10,8 % z původních množství v nepřečištěném pigmentu. Další nečistoty v přečištěném pigmentu nebyly

nalezeny. Z toho vyplývá možnost použití sublimační techniky pro přípravu čistého standardu pigmentu



**Obrázek 47:** Vliv sublimace na množství nečistot v pigmentu

A: Analýza DMSO extraktu vzorku B pigmentu před sublimací

B: Analýza DMSO extraktu přesublimovaného vzorku B pigmentu

Podmínky extrakce: 1 g vzorku do 10 ml DMSO, 60 minut v ultrazvukové lázni vyhřáté na 80 °C

Podmínky analýzy jsou uvedeny v kapitole 2.6.

### 3.5. Vyhodnocení Amesova testu

Mutagenita testovaných látek byla vyhodnocena Amesovým testem porovnáním počtu reversních mutantů indukovaných testovanou látkou a spontánních mutantů, kontrolou. Zvýšení počtu revertant ukazuje na přítomnost mutagenního účinku. K vyhodnocení se používá vztahu  $R_{ti} / R_c$ .  $R_{ti}$  je průměrný počet revertant pro jednotlivé koncentrace testované látky a  $R_c$  je průměrný počet kolonií, které spontánně revertují na kontrolních miskách bez přidaného mutagenu. Je-li poměr vyšší než 2, jedná se o mutagenní látku. Výsledky vyhodnocení Amesova testu jsou uvedeny v tabulkách 22-25.

**Tabulka 22:** Vzorek AHASK testovaný bez metabolické aktivace na kmeni TA 100

<b>Bez metabolické aktivace, TA 100</b>				
<b>AHASK</b>				
<b>µg/plate</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>průměr</b>	<b>Koeficient</b>
<b>500</b>	44	46	45,0	<b>1,8</b>
<b>250</b>	51	47	49,0	<b>1,9</b>
<b>50</b>	55	41	48,0	<b>1,9</b>
<b>5</b>	60	61	60,5	<b>2,4</b>
<b>PK</b>	1200	1223	1211,5	<b>47,5</b>
<b>DNK</b>	24	27	25,5	

**Tabulka 23:** Vzorek AHASK testovaný s metabolickou aktivací na kmeni TA 100

<b>Metabolická aktivace, TA 100</b>				
<b>AHASK</b>				
<b>µg/plate</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>průměr</b>	<b>Koeficient</b>
<b>500</b>	30	47	38,5	<b>0,8</b>
<b>250</b>	60	46	53,0	<b>1,1</b>
<b>50</b>	56	50	53,0	<b>1,1</b>
<b>5</b>	42	37	39,5	<b>0,8</b>
<b>PK</b>	1200	1223	1211,5	<b>25,5</b>
<b>DNK</b>	45	50	47,5	

**Tabulka 24:** Vzorek AHASK testovaný bez metabolické aktivace na kmeni TA 98

<b>Bez metabolické aktivace, TA 98</b>					
<b>AHASK</b>					
<b>ug/plate</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>průměr</b>	<b>Koeficient</b>
<b>500</b>	1	5	7	4,3	<b>0,8</b>
<b>250</b>	12	5	7	8,0	<b>1,4</b>
<b>50</b>	12	6	9	9,0	<b>1,6</b>
<b>5</b>	7	14	4	8,3	<b>1,5</b>
<b>PK</b>	1532	1223	1544	1433,0	<b>252,9</b>
<b>DNK</b>	6	6	5	5,7	

**Tabulka 25:** Vzorek AHASK testovaný s metabolickou aktivací na kmeni TA 98

<b>Metabolická aktivace, TA 98</b>					
<b>AHASK</b>					
<b>ug/plate</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>průměr</b>	<b>Koeficient</b>
<b>500</b>	6	6	9	7,0	<b>0,7</b>
<b>250</b>	11	14	20	15,0	<b>1,6</b>
<b>50</b>	10	8	10	9,3	<b>1,0</b>
<b>5</b>	10	10	8	9,3	<b>1,0</b>
<b>PK</b>	1532	1223	1544	1433,0	<b>148,2</b>
<b>DNK</b>	9	8	12	9,7	

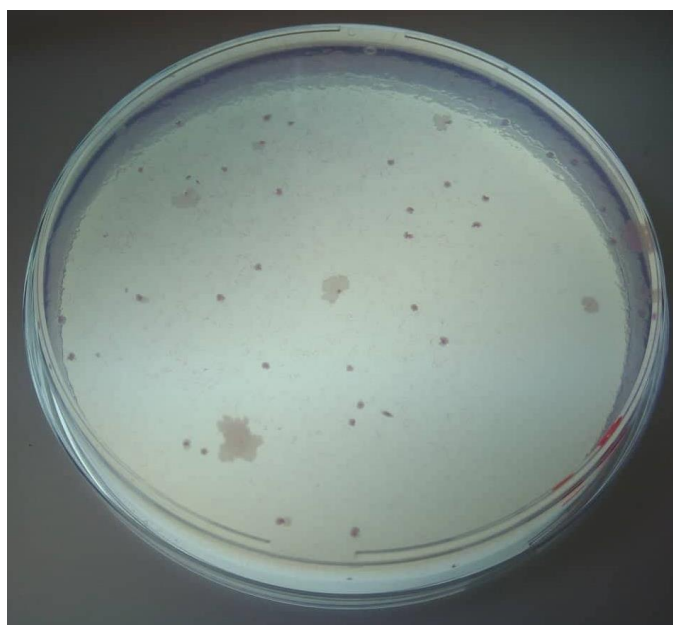
Z naměřených dat pro Amesův test bylo zjištěno, že žádný z testovaných vzorků není mutagenní pro kmen *Salmonella typhimurium* his- TA 98. Pro kmen *Salmonella typhimurium* his- TA 100 byly pro vzorek AHASK detekovány hodnoty oscilující kolem hodnoty 2 bez metabolické aktivace, s metabolickou aktivací na stejném kmeni mutagenita nebyla prokázána. Další látky, které vyšly při testování Amesovým testem jako mutagenní pro kmen *Salmonella typhimurium* his- TA 100 byly 1-AA a ASK, kdy poměr revertant byl na hranici hodnoty 2. Mutagenní výsledek byl

stejně jako u vzorku AHASK pouze pro kmen TA 100. Testování na kmeni TA 98 vyšlo negativně. Porovnání negativní a pozitivní kontroly je na obrázcích 48 a 49.

**Tabulka 26:** Výsledky Ames testu

Vzorek	TA 98 -	TA 98 +	TA 100 -	TA 100 +
ASK	-	-	+	-
AHASK	-	-	+	-
BAK	-	-	-	-
DADADSK	-	-	-	-
1-AA	-	-	+	-
AHAQ	-	-	-	-

V tabulce 26 jsou uvedeny výsledky pro všechny vzorky testované Ames testem. Negativní výsledek (nemutagení) je označen -, pozitivní výsledky (mutagení) jsou označeny +.



**Obrázek 48:** Revertanty *Salmonella typhimurium* his – TA100 pro vzorek DADADSK



**Obrázek 49:** Revertanty *Salmonelly typhimurium*, his – TA 100, pozitivní kontrola

## 4. ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo optimalizovat extrakci nečistot z pigmentu P.R.177. Na základě reakčního mechanismu byly vytypovány nečistoty, které se ve vzorcích mohou vyskytovat a pomocí HPLC byla přítomnost těchto nečistot potvrzena. Identifikované nečistoty jsou sodná sůl 1-amino-4-hydroxyantrachinon-2-sulfonové kyseliny, sodná sůl 1-aminoantrachinon-2-sulfonové kyseliny, sodná sůl 1-amino-4-bromo-2-antrachinon-2-sulfonové kyseliny, disodná sůl 4,4'-diamin-1,1'-diantrachinon-3,3'-disulfonové kyseliny, sodná sůl 4,4'-diamin-1,1'-diantrachinon-3,3'-sulfonové kyseliny, 1-aminoantrachinon a 1-amino-2-hydroxyantrachinon. Poté byly optimalizovány podmínky extrakce vzorku (extrakční rozpouštědlo, teplota, doba extrakce a navážka pigmentu) s cílem vyextrahování maximálního množství nečistot z pigmentu. Jako nejvhodnější rozpouštědlo byl vybrán dimethylsulfoxid i vzhledem k jeho dalšímu využití při Amesově testu mutagenity. Dále byla optimalizována doba extrakce vzorku v ultrazvukové lázni, kdy nejlepší výsledky byly získány pro dobu extrakce 60 minut. Následně byla optimalizována teplota extrakce, nejvyšších výtěžků bylo dosaženo při teplotě ultrazvukové lázně 80 °C. Posledním optimalizovaným parametrem byla velikost navážky vzorku. Největší hmotnostní výtěžek extrakce nečistot byl pro navážku 1,5 g, ale tuto navážku bylo velmi obtížné kvantitativně převést do filtrační aparatury a dodržet obecný postup přípravy vzorku, proto byla jako optimální zvolena navážka 1 g pigmentu. Pro vícenásobnou extrakci nečistot z pigmentu P.R.177 bylo nutné použít vyšší otáčky odstředivky a zvýšit dobu extrakce; místo 5 minut při 5000 otáčkách za minutu, byly vzorky odstředovány s použitím účinnější odstředivky 22 minut při 5000 otáčkách. Ani vícenásobnou extrakcí vzorků DMSO se nepodařilo nesulfonované nečistoty kvantitativně vyextrahovat (1-AA a AHAQ), což může být způsobeno jejich pevným zabudováním do struktury pigmentu. Hlavní podíl sulfonovaných nečistot (přes 75%) se extrahuje již při první extrakci. Jako další rozpouštědlo pro vícenásobnou extrakci nečistot z pigmentu byl vybrán tetrahydrofuran. S použitím tetrahydrofuranu jako extrakčního rozpouštědla pro vícenásobnou extrakci se podařilo vyextrahovat převážně pouze nesulfonované nečistoty, ASK byla vyextrahována pouze u vzorku A pro 1. extrakci.

S využitím hmotnostní spektrometrie byla navržena struktura dosud neidentifikované nečistoty pigmentu P.R.177, která se na chromatogramu eluuje s  $r_t=7,7$  minut. Jedná se o DADASK – sodnou sůl 4,4'-diamin-1,1'-diantrachinon-sulfonové kyseliny. Nečistota nebyla dosud izolována v dostatečném množství pro následný Amesův test ke zjištění její mutagenity.

Přečištěním pigmentu pomocí sublimace došlo k zásadní redukci obsahu nečistot v pigmentu. V přečištěném pigmentu byla pozorována pouze neznámá nečistota s  $r_t= 15,04$  minut a DADASK, jejich obsah ve srovnání s nepřečištěným pigmentem poklesl o přibližně 90 % v případě neznámé nečistoty a o 98 % v případě DADASK. Ostatní nečistoty přítomné v původním vzorku nebyly zjištěny. Tímto způsobem lze připravit vysoce čistý standard pigmentu.

V poslední části diplomové práce byly nečistoty ASK, AHASK, BAK, DADADSK, 1-AA a AHAQ podrobeny Amesově testu na zjištění jejich mutagenity. Mutagenita nečistot byla testována na kmenech *Salmonelly typhimurium*, his- TA 98 a TA 100. Pro kmen *Salmonelly typhimurium*, his- TA 98 byly všechny testované nečistoty nemutagenní, zatímco pro kmen TA 100 byly nečistoty AHASK, 1-AA a ASK hodnoceny jako mutagenní. Nejvyšší hodnoty parametru mutagenity byly pro AHASK, pro 1-AA a ASK byla mutagenita nižší, a navíc pouze v případě některých koncentrací.

V diplomové práci se podařilo zoptimalizovat dosud používanou metodu pro analýzu nečistot v pigmentu P.R.177 a touto metodou zjistit jejich obsah v dodaných vzorcích pigmentu. Dále byla otestována mutagenita identifikovaných nečistot pomocí Amesova testu na kmenech *Salmonelly typhimurium*, his- TA 98 a TA 100. Mutagenita vzorků pigmentů je ve společnosti Synthesia, a.s. testována pouze na kmeni *Salmonelly typhimurium*, his- TA 98, a proto by bylo vhodné pro budoucí posuzování mutagenity reálných vzorků z výroby testování i na kmeni TA 100, protože v diplomové práci byla potvrzena mutagenita pouze pro tento kmen. Dále by bylo vhodné k testování mutagenity použít i pigment přečištěný sublimací, případně nově identifikovanou nečistotu DADASK.



## Seznam použité literatury

- [1] Ambrogi V, Carfagna C, Cerruti P, Marturano V. Additives in Polymers. *Modif Polym Prop.* 2016:87-108. doi:10.1016/B978-0-323-44353-1.00004-X
- [2] Dušek, L. (2004) *Organické pigmenty*, Univerzita Pardubice, 240 s.
- [3] Herbst, W., Hunger, K. (2004) *Industrial organic pigments: production, properties, applications*, 3. vydání, Wiley-VCH, Weinheim, 672 s.
- [4] Oficiální stránky the Colour Index [online], [cit. 2018-03-18]. Dostupné z: <<https://colour-index.com/introduction-to-the-colour-index> >
- [5] Creighton TE. The physical and chemical basis of molecular biology. 2010:642. <<http://www.worldcat.org/oclc/761183333> >
- [6] Murphy J. *Additives for Plastics Handbook.*; 2001. doi:10.1016/B978-185617370-4/50003-8
- [7] Gotzmann R., osobní sdělení technologického pracovníka společnosti Synthesia, a.s.
- [8] Chemistry C, Christie BRM. Pigments 9.1. str.212-249.
- [9] Univerzita Pardubice: Antrachinonová barviva [online], [cit. 2018-03-18]. Dostupné z: <[https://www.upce.cz/sites/default/binary\\_www\\_old/fcht/uocht/spektrum/ktol-karbonylova2.pdf](https://www.upce.cz/sites/default/binary_www_old/fcht/uocht/spektrum/ktol-karbonylova2.pdf) >
- [10] Müller-Lissner S, A, Adverse Effects of Laxatives: Fact and Fiction. *Pharmacology* 1993;47(suppl 1):138-145.

- [11] Lee HW, Ryu HW, Kang MG, Park D, Oh SR, Kim H. Selective inhibition of monoamine oxidase A by purpurin, an anthraquinone. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2017;27(5):1136-1140. doi:10.1016/j.bmcl.2017.01.085
- [12] Ranjitha S, Rajarajan G, Gnanendra TS, Anbarasan PM, Aroulmoji V. Structural and optical properties of Purpurin for dye-sensitized solar cells. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc*. 2015;149:997-1008. doi:10.1016/j.saa.2015.04.046
- [13] Gholivand MB, Yamini Y, Dayeni M, Seidi S, Tahmasebi E. Adsorptive removal of alizarin red-S and alizarin yellow GG from aqueous solutions using polypyrrole-coated magnetic nanoparticles. *J Environ Chem Eng*. 2015;3(1):529-540. doi:10.1016/j.jece.2015.01.011
- [14] Bien, H.-S.; Stawitz, J.; Wunderlich, K. (2005), "Anthraquinone Dyes and Intermediates", *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Weinheim: Wiley-VCH, doi:10.1002/14356007.a02\_355
- [15] Bae UJ, Song MY, Jang HY, et al. Emodin isolated from *Rheum palmatum* prevents cytokine-induced  $\beta$ -cell damage and the development of type 1 diabetes. *J Funct Foods*. 2015;16:9-19. doi:10.1016/j.jff.2015.04.016
- [16] Yang L, Tan J, Wang BC, Zhu LC. Synthesis, characterization, and anti-cancer activity of emodin-Mn(II) metal complex. *Chin J Nat Med*. 2014;12(12):0937-0942. doi:10.1016/S1875-5364(14)60137-0
- [17] ELSEVIER. Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings - 1st Edition. *www.elsevier.com* [online]. [cit. 2018-02-01].
- [18] Oficiální stránky Synthesia, a.s., [online], [cit. 2018-03-18]. Dostupné z: < <https://www.synthesia.eu/cze/o-spolecnosti> >

- [19] Oficiální stránky Synthesia, a.s. [online], [cit. 2018-03-18]. Dostupné z: < <https://www.synthesia.eu/cze/vyzkum-a-vyvoj> >
- [20] Oficiální stránky Synthesia, a.s., [online], [cit. 2018-03-18]. Dostupné z: < <https://www.synthesia.eu/cze/o-spolecnosti/profil-spolecnosti> >
- [21] F. Ullmann; Jean Bielecki (1901). "Ueber Synthesen in der Biphenylreihe". *Chemische Berichte*. 34 (2): 2174–2185. doi:10.1002/cber.190103402141.
- [22] Gao A, Liu H, Hu L, Zhang H, Hou A, Xie K. Synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-Au/Cu magnetic nanoparticles and its efficient catalytic performance for the Ullmann coupling reaction of bromamine acid. *Chinese Chem Lett*. 2017; 177:3-6. doi:10.1016/j.ccllet.2017.11.040
- [23] Diplomová práce, M.Šimek: Problematika recyklace kovu použitého při homocoupling reakci, 2014
- [24] Oficiální stránky Synthesia, a.s., [online], [cit. 2018-03-18]. Dostupné z: < <https://pigments.synthesia.eu/cze/organicke-pigmenty/pro-naterove-hmoty/versalova-cerven-a2bn> >
- [25] Oficiální stránky xcolorpigment, [online], [cit. 2018-03-18]. Dostupné z < <http://www.xcolorpigment.com/pigment-red-177.html> >
- [26] *4,4'-diamino-1,1'-dianthraquionyl Compounds and Process for their Manufacture* [patent]. GB926514.22.4.1963
- [27] Tech-A, Examination INEART, Chemistry O. *Chromatography* 1. 1903;6:373-390.
- [28] Churáček, J. (1990) *Analytická separace látek*, 1.vydání. SNTL, 384 s. ISBN 80–03–00569-8.

- [29] Craig LC. Partition Chromatography and Countercurrent Distribution. *Anal Chem.* 1950;22(11):1346-1352. doi:10.1021/ac60047a003
- [30] Majors RE, Barth HG, Lochmueller CH. Column liquid chromatography. *Anal Chem.* 1982;54(5):323-363. doi:10.1021/ac00242a028
- [31] Motono T, Kitagawa S, Ohtani H. High performance liquid chromatography at -196 °c. *Anal Chem.* 2016;88(13):6852-6858. doi:10.1021/acs.analchem.6b01417
- [32] Williams A. 12. Liquid Chromatography. 2001.
- [33] Rafferty JL, Zhang L, Siepmann JI, Schure MR. Retention mechanism in reversed-phase liquid chromatography: A molecular perspective. *Anal Chem.* 2007;79(17):6551-6558. doi:10.1021/ac0705115
- [34] Shlbukawa M, Ohta N, Kuroda R. Distribution processes of inorganic solutes in gel chromatography. *Anal Chem.* 1981;53(11):1620-1627. doi:10.1021/ac00234a018
- [35] Obrázek Schéma kapalinového chromatografu [online], [cit.2018-03-18]. Dostupné z: <<http://www.laboratoryjournal.com/sites/gitlabor.de/files/images/special/53056402original.jpg>>
- [36] LaCourse ME, LaCourse WR. General instrumentation in HPLC. *Liq Chromatogr Fundam Instrum Second Ed.* 2017;1:417-429. doi:10.1016/B978-0-12-805393-5.00017-8
- [37] Obrázek Schéma detektoru s diodovým polem [online], [cit.2018-03-18]. Dostupné z: <<https://www.crawfordscientific.com/technical/chromatography-technical-tips/hplc-chromatography-tips/diode-array-detector-settings>>

- [38] Wikipedia: Sublimation [online], [cit. 2018-03-18]. Dostupné z:  
< [https://en.wikipedia.org/wiki/Sublimation\\_\(phase\\_transition\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Sublimation_(phase_transition)) >
- [39] López de Cerain A, Azqueta A, Vettorazzi A. Mutagenic Activity in Meat Samples after Deep-frying in Olive Oil: Comparison with other Oils. *Olives Olive Oil Heal Dis Prev.* 2010;989-996. doi:10.1016/B978-0-12-374420-3.00106-6
- [40] Kobayashi H, Suzuki N, Ogra Y. Mutagenicity comparison of nine bioselenocompounds in three Salmonella typhimurium strains. *Toxicol Reports.* 2018;5(August 2017):220-223. doi:10.1016/j.toxrep.2018.01.005
- [41] Competencies O, Knowledge P, Terms K, Topics K. Genetic Toxicology
- [42] Corporation I V, Rock V. Chemical Profiles. 2006:627-644. doi:10.1021/tx0503552
- [43] Obrázek Amesův test mutagenity [online], [cit. 2018-03-18]. Dostupné z:  
< <https://www.creative-proteomics.com/services/ames-test.htm> >
- [44] Mohammed MM. Structure antimutagenicity relationship of anthraquinones. *Nat Prod Chem Res.* 2016;4(5):1-11. doi:10.4172/2329-6836.1000228
- [45] Ali AM, Ismail NH, Mackeen MM, et al. Antiviral, cytotoxic and antimicrobial activities of anthraquinones isolated from the roots of Morinda elleptica. *Pharm Biol.* 2000;38(4):298-301. doi:10.12980/APJTB.4.2014C701
- [46] Kuo YC, Tsai WJ, Meng HC, Chen WP, Yang LY, Lin CY. Immune reponses in human mesangial cells regulated: By emodin from Polygonum hypoleucum Ohwi. *Life Sci.* 2001;68(11):1271-1286. doi:10.1016/S0024-3205(00)01033-X

- [47] Insc E, Barcelona M. Anthraquinone Genotoxicity and carcinogenicity potential of different manufacturing origins October 2012. 2012;(October).
- [48] Müller SO, Eckert I, Lutz WK, Stopper H. Genotoxicity of the laxative drug components emodin, aloe-emodin and danthron in mammalian cells: Topoisomerase II mediated? *Mutat Res - Genet Toxicol*. 1996;371(3-4):165-173. doi:10.1016/S0165-1218(96)90105-6
- [49] Mueller SO, Stopper H. Characterization of the genotoxicity of anthraquinones in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 1999;1428(2-3):406-414. doi:10.1016/S0304-4165(99)00064-1
- [50] Novotný Č, Dias N, Kapanen A, et al. Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo- and anthraquinone dyes. *Chemosphere*. 2006;63(9):1436-1442. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.10.002

## Přílohy

Tabulka Ia:

ASK	Výsledná koncentrace [mg/ml]	Ø Plocha píku
1.	0,0004	6,3
2.	0,0009	13,9
3.	0,0013	20,1
4.	0,0017	27,9
5.	0,0026	40,8

Tabulka Ib:

DADADSK	Výsledná koncentrace [mg/ml]	Ø Plocha píku
1.	0,0004	10,6
2.	0,0016	44,8
3.	0,0057	146,7
4.	0,0123	318
5.	0,0335	859,9

Tabulka Ic:

AHASK	Výsledná koncentrace [mg/ml]	Ø Plocha píku
1.	0,0022	41,7
2.	0,0033	61,8
3.	0,0055	101,8
4.	0,0077	143,5
5.	0,0100	179,6

**Tabulka Id:**

<b>BAK</b>	<b>Výsledná koncentrace [mg/ml]</b>	<b>Ø Plocha píku</b>
1.	0,0011	22,7
2.	0,0017	33,6
3.	0,0028	53,9
4.	0,0039	76,4
5.	0,0050	95,4

**Tabulka Ie:**

<b>1-AA</b>	<b>Výsledná koncentrace [mg/ml]</b>	<b>Ø Plocha píku</b>
1.	0,0036	10,4
2.	0,0039	50,0
3.	0,0074	182,4
4.	0,0092	227,3
5.	0,0110	266,1

**Tabulka If:**

<b>AHAQ</b>	<b>Výsledná koncentrace [mg/ml]</b>	<b>Ø Plocha píku</b>
1.	0,0001	2,0
2.	0,0008	15,2
3.	0,0015	28,9
4.	0,0022	41,7
5.	0,0029	54,8