

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

Stanovení minoritních složek ve žlutém pigmentu P.Y. 139

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: Bc. Monika Landsmanová

Vedoucí práce: doc. Ing. Jan Fischer, CSc.

Konzultant: Ing. Kateřina Šimková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Monika Landsmanová**
Osobní číslo: **C15583**
Studijní program: **N1407 Chemie**
Studijní obor: **Analytická chemie**
Název tématu: **Analýza minoritních složek ve žlutém pigmentu P.Y. 139**
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. Vypracujte literární rešerši týkající se možnosti analýzy minoritních složek v pigmentu P.Y. 139.
2. Vypracujte metodiku pro stanovení vybraných nečistot v pigmentu P.Y. 139.
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. Kateřina Šimková

Synthesia, a. s. Pardubice

Datum zadání diplomové práce:

20. února 2017

Termín odevzdání diplomové práce:

12. května 2017



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2017

Prohlášení autora

Prohlašuji:

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

Byla jsem seznámena s tím, že se na mojí 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.

V Lázních Bohdaneč dne

Bc. Monika Landsmanová

Poděkování

Děkuji vedoucímu své diplomové práce doc. Ing. Janu Fischerovi, CSc., konzultantce Ing. Kateřině Šimkové ze společnosti Synthesia, a.s. a Ing. Janu Vyňuchalovi, PhD., také ze společnosti Synthesia, a.s. za jejich odborné vedení a praktické připomínky při zpracování této diplomové práce. Poděkování patří Ing. Radku Gotzmannovi za cenné rady v teoretické části diplomové práce a panu prof. Antonínu Lyčkovi za poskytnutí NMR spektra nečistoty kyseliny bibarbiturové.

ANOTACE

Diplomová práce se týká analýzy minoritních látek ve žlutém pigmentu P.Y. 139. V teoretické části jsou popsány pigmenty, jejich vlastnosti a použití. Dále je zde podrobněji popsána isoindolinová a isoindolinonová skupina pigmentů. Do této skupiny pigmentů patří pigment P.Y. 139, o kterém jsou zde uvedeny základní informace, včetně jeho výroby ve společnosti Synthesia, a.s. Nakonec jsou zde představeny základní informace o HPLC instrumentaci použité pro analýzu nečistot ve výrobních vzorcích pigmentu. V praktické části diplomové práce je uveden postup optimalizace jednotlivých kroků analýzy potenciálních nečistot v pigmentu. Výsledky jsou porovnány a diskutovány.

KLÍČOVÁ SLOVA

P.Y. 139, kyselina barbiturová, kyselina bibarbiturová, kyselina ftalová, ftalimid, ftalodinitril, RP – LC, HILIC

TITLE

Determination of minor substances in the yellow pigment P.Y. 139

ANNOTATION

In this diploma thesis, development of the method for the analysis of minor substances in yellow pigment P.Y. 139 is described. The theoretical part characterizes pigments, their properties and their use. The isoindoline and isoindolinone groups of pigments are described more in detail. Properties and basic production scheme of P.Y. 139 belonging to this group is given. The practical part of the thesis describes the individual steps of method optimizing for the analysis a potential impurities in production samples of the pigment. The results are compared and discussed.

KEYWORDS

P.Y. 139, barbituric acid, dibarbituric acid, phthalic acid, phthalimide, phthalodinitrile, RP – LC, HILIC

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| ÚVOD | 10 |
| 1 TEORETICKÁ ČÁST | 11 |
| 1.1 Obecné pojmy..... | 11 |
| 1.1.1 Colour Index™..... | 11 |
| 1.2 Fyzikální vlastnosti pigmentů..... | 12 |
| 1.3 Chemické vlastnosti pigmentů..... | 12 |
| 1.4 Historie pigmentů | 13 |
| 1.5 Anorganické pigmenty | 14 |
| 1.6 Organické pigmenty | 14 |
| 1.6.1 Rozdělení organických pigmentů..... | 15 |
| 1.7 Isoindolinové a isoindolinonové pigmenty..... | 15 |
| 1.7.1 Pigment P.Y. 185 | 17 |
| 1.8 Pigment P.Y. 139..... | 17 |
| 1.8.1 Základní charakteristika pigmentu P.Y. 139 | 17 |
| 1.8.2 Výroba pigmentů v Synthesia, a.s..... | 19 |
| 1.8.3 Výroba P.Y. 139 v Synthesia, a.s..... | 21 |
| 1.9 Kyselina barbiturová jako výchozí surovina pro výrobu P.Y. 139 | 23 |
| 1.9.1 Syntéza kyseliny barbiturové | 24 |
| 1.9.2 Stanovení kyseliny barbiturové | 25 |
| 1.9.3 Dihydrát sodné soli kyseliny azobarbiturové | 25 |
| 1.10 Ftalodinitril jako výchozí surovina pro výrobu pigmentu P.Y. 139 | 27 |
| 1.10.1 Syntéza ftalodinitrilu | 27 |
| 1.10.2 Stanovení ftalodinitrilu..... | 28 |
| 1.11 Kapalinová chromatografie | 28 |
| 1.11.1 Mobilní fáze | 28 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1.11.2 | Stacionární fáze | 29 |
| 1.11.3 | Rozdělení kapalinové chromatografie..... | 29 |
| 1.11.4 | Instrumentace pro kapalinovou chromatografii | 29 |
| 1.11.5 | Separční systémy v HPLC | 32 |
| 1.11.6 | HILIC chromatografie..... | 32 |
| 1.11.7 | Vyhodnocení naměřených dat v HPLC | 34 |
| 2 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 36 |
| 2.1 | Seznam použitých chemikálií | 36 |
| 2.2 | Seznam použitých přístrojů | 36 |
| 2.2.1 | Kapalinový chromatograf Agilent 1260 Infinity..... | 37 |
| 2.2.2 | Hmotnostní spektrometr | 38 |
| 2.3 | Kolony HPLC | 38 |
| 2.4 | Analyzované vzorky | 40 |
| 2.5 | Příprava mobilních fází | 41 |
| 2.6 | Příprava kalibračních roztoků standardů | 41 |
| 2.7 | Příprava vzorku k analýze | 42 |
| 2.8 | Vyhodnocování dat..... | 42 |
| 3 | VÝSLEDKY, DISKUZE | 43 |
| 3.1 | Výběr a optimalizace separačního systému..... | 43 |
| 3.2 | Izolace a identifikace neznámé nečistoty | 47 |
| 3.2.1 | MS experiment | 48 |
| 3.2.2 | NMR..... | 50 |
| 3.3 | Kalibrační měření | 52 |
| 3.4 | Analýza reálných vzorků | 54 |
| 3.4.1 | Výběr optimální kolony pro analýzy extraktů..... | 54 |
| 3.4.2 | Výběr vhodného rozpouštědla pro extrakci nečistot z pigmentu | 56 |
| 3.4.3 | Vliv velikosti navážky pigmentu na účinnost extrakce nečistot | 65 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.4.4 | Vliv různé doby extrakce v ultrazvukové lázni na účinnost extrakce..... | 65 |
| 3.4.5 | Analýza pigmentů za optimalizovaných podmínek | 67 |
| 4 | ZÁVĚR..... | 71 |
| 5 | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 73 |

Přílohy

SEZNAM ZKRATEK

AcN – acetonitril

DAD – detektor s diodovým polem

DMAA – dimethylacetamid

DMF – dimethylformamid

DMSO – dimethylsulfoxid

FDN – ftalodinitril

FI – ftalimid

HILIC – chromatografie hydrofilních interakcí

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

KB – kyselina barbiturová

KBB – kyselina bibarbiturová

KF – kyselina ftalová

MeOH – methanol

MS – hmotnostní spektrometrie

NMR – nukleární magnetická rezonance

NP – separační systém s normálními fázemi

RP – separační systém s obrácenými fázemi

THF – tetrahydrofuran

UV/VIS – ultrafialová/viditelná oblast

ÚVOD

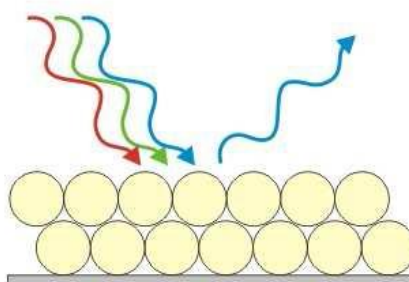
Tato diplomová práce se zabývá analýzou nečistot v pigmentu P.Y. 139. Světová spotřeba organických pigmentů neustále roste, zároveň vzrůstá zájem o obsah látek v pigmentech. Pigmenty jsou látky takřka nerozpustné, organické nebo anorganické povahy, barevné, bílé nebo černé. P.Y. 139 je žluto – oranžový pigment, který vyrábí společnost Synthesia, a.s. v různých kvalitách. Tento pigment patří do skupiny isoindolinových a isoindolinonových pigmentů a nachází své uplatnění v plastech, nátěrových hmotách nebo tiskových barvách.

Cílem práce realizované ve spolupráci se společností Synthesia, a. s. bylo optimalizovat metodu pro rutinní analýzu tohoto pigmentu pomocí kapalinové chromatografie s DAD detektorem a kvantifikovat touto metodou množství nečistot v pigmentu. Obsah nečistot ve finálním produktu má, kromě vlivu na zdravotní nezávadnost pigmentu, také vliv na jeho výsledné koloristické vlastnosti. Proto zavedení rutinní metody pro stanovení potenciálních nečistot ve vyráběném pigmentu může napomoci optimalizaci výrobního procesu s cílem minimalizovat přítomnost nečistot ve finálním produktu.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Obecné pojmy

Koloranty se v současné době rozdělují na pigmenty nebo barviva, tyto látky jsou schopné absorbovat viditelné elektromagnetické záření (světlo) v rozsahu 380 – 780 nm (obr. č. 1) [1].



Obr. č. 1: Vznik barvy; světlo různých vlnových délek dopadá na pigment. Částečně dojde k absorpci, výsledná barva je dána spektrem odražených vlnových délek [2]

Pigmenty jsou látky takřka nerozpustné, organické nebo anorganické povahy, barevné, bílé nebo černé. Barviva jsou látky většinou rozpustné v daném (aplikačním) prostředí, ztrácející svou krystalickou strukturu. Odlišnost těchto dvou pojmů je založena na fyzikálních vlastnostech [1]. Organické pigmenty v porovnání s pigmenty anorganickým mají větší rozpustnost, menší tepelnou stabilitu a menší stálost na světle [3]. Struktura pigmentu je pro jednoznačnou a rychlou identifikaci charakterizována tzv. C. I.

1.1.1 Colour Index™

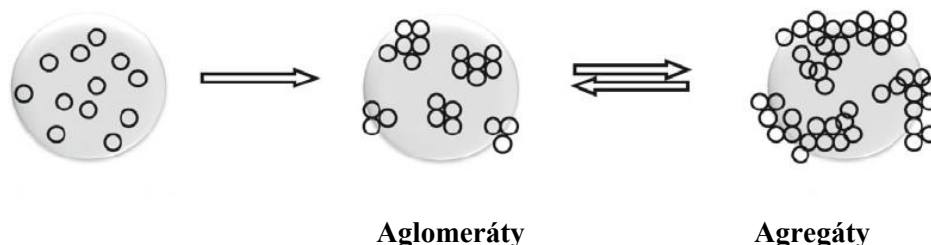
Colour index (C. I.) je název všech komerčních a technicky používaných barviv a pigmentů. Již od roku 1924 Colour Index vydává Americká asociace barvářů a barvířů (SDC) ve spolupráci s americkou asociací textilních chemiků a koloristů (AATCC). Neustále dochází k rozšiřování tohoto klasifikačního systému. C. I. používá dvojí klasifikační systém:

- a) *Colour Index Generic Name (GIGN)*
 - snadno zapamatovatelný, vztahuje se k aplikaci
 - C. I. Pigment Yellow; C. I. Solvent Black
- b) *Colour Index Constitution Number (CICN)*
 - spojen s chemickou strukturou

- C. I. Pigment Red 48 (C.I. 15865) – sodná sůl
- C. I. Pigment Red 48:1 (C. I. 15865:1) – barnatá sůl [4].

1.2 Fyzikální vlastnosti pigmentů

Důležitými vlastnostmi pigmentů jsou povrchová struktura, krystalová mřížka, tvar krystalů nebo velikost částic. Všechny pigmenty mají určitou velikost částic, po zpracování většinou méně než 1 μm . Pigmenty se vyskytují ve formě primárních nebo sekundárních částic. Primární částice organického pigmentu mohou vytvářet z důvodu stabilizace své povrchové energie sekundární částice (agregáty, aglomeráty, obr. č. 2). Agregáty jsou částice vznikající spojením plochy částic. Při dispergaci v médiu nedochází ke zpětnému rozdělení na primární částice. Aglomeráty jsou útvary, které vznikly spojením hran částic. Tento útvar se při dispergaci rozdělí zpět na původní částice. Tyto vlastnosti lze například studovat (popisovat) pomocí elektronového mikroskopu práškové rentgenové difrakce (měření velikosti a distribuce částic) [1,3,5].



Obr. č. 2: Rozdělení velikosti částic [6]

1.3 Chemické vlastnosti pigmentů

Vlastnosti pigmentu jsou základním způsobem určovány chemickou stavbou. Chemická konstituce má vliv na barvu pigmentu a je ovlivněna přítomností chromoforů v molekule. Chromofor je systém konjugovaných dvojných vazeb (π – elektronový systém) ovlivňující absorpci záření. Přítomnost dalších elektron – donorových či elektron – akceptorových skupin v molekule ovlivňuje posun vlnových délek absorpčních maxim a jejich intenzitu (hyperchromní/hypochromní posun, bathochromní/hypsochromní posun).

Bathochromní posun – posun absorpce záření k delším vlnovým délkám

Hypsochromní posun – posun absorpce záření ke kratším vlnovým délkám

Hypochromní posun – snížení intenzity absorpce záření

Hyperchromní posun – zvýšení intenzity absorpce záření

Barevnost molekuly souvisí s absorpcí elektromagnetického záření, které způsobí excitaci molekuly barviva (pigmentu). Výsledný odstín pigmentu dále závisí na poměru absorpce a odrazu světla [3,5].

Barvicí schopnost je schopnost barevného pigmentu obarvit barvený podklad. V případě bílého pigmentu se jedná naopak o schopnost zesvětlit barevný pigment. Jde o specifickou vlastnost každého pigmentu [5].

Pigmenty podléhají na světle degradaci, okolní prostředí (tzv. pojivo) má také vliv na stabilitu sloučeniny vůči působení světla. Existuje vztah mezi chemickou strukturou a světlostálostí pigmentů. Například větší stálobarevností na světle u pigmentů lze docílit zavedením karboamidové skupiny nebo halogenů.

Finálními formami pigmentů jsou:

- 1) Neupravené práškové pigmenty
- 2) Upravené suché práškové pigmenty – granuláty (dotované pomocnými látkami – např. snižujícími prašnost pigmentu)
- 3) Pigmentové preparace

1.4 Historie pigmentů

Syntetické organické pigmenty se vyrábějí od druhé poloviny 19. století [6]. K první syntéze organického barviva došlo již v roce 1856 Williamem Henry Perkinem. Namísto očekávané syntetizace chininu, došlo ke vzniku purpurového barviva. Perkin získal britský patent a v roce 1859 si otevřel továrnu [7,8].

Organické pigmenty začaly být vyráběny jako vedlejší produkty z výroby barviv, obvykle srážením barviva s kovovými solemi. Tyto organické pigmenty měly špatnou světlostálost a rychle dosáhly své špatné pověsti. Na konci 19. a počátkem 20. století se vedení ve vývoji a výrobě syntetických organických barviv a pigmentů ujmul Německo [3]. Mnohé z těchto pigmentů byly azopigmenty syntetizované diazotační reakcí diazoniové soli a následnou kopulací. Syntetické organické pigmenty neobsahující azoskupinu byly zavedeny

počátkem roku 1930, se zavedením ftalocyaninové modře a zeleně a postupně byly objevovány a zaváděny do výroby další třídy organických pigmentů [7].

1.5 Anorganické pigmenty

Anorganické pigmenty mohou být jak syntetické, tak i přírodní. Nejčastěji to jsou oxidy a sulfidy kovů, soli olova, nebo sloučeniny kadmia a rtuti. Tyto pigmenty jsou nerozpustné v běžně dostupných rozpouštědlech, mají lepší tepelnou stabilitu než organické pigmenty. Anorganické pigmenty snadno dispergují v plastech, mají dobrou krycí schopnost, ale v porovnání s organickými pigmenty nabízejí užší výběr odstínů [3].

1.6 Organické pigmenty

Termín "syntetický organický pigment" se týká pigmentů uměle vyráběných. Mnohé z nich obsahují azoskupinu ($-N=N-$) ve své struktuře. Tyto pigmenty mají ve své struktuře cyklický skelet. Aromatický systém obsahuje konjugované vazby, které tvoří tzv. chromofor pigmentu (nositel barevnosti). Na aromatickém jádře mohou být další funkční skupiny, které ovlivňují barevnost (auxochromy). V oblasti průmyslové aplikací se vyskytuje řada organických pigmentů, které obsahují kov ve formě koordinačních komplexů nebo ve formě nerozpustných solí, i tyto látky jsou považovány za organické pigmenty [5,9]. Všechny syntetické organické pigmenty jsou prakticky nerozpustné v prostředí, ve kterém jsou syntetizovány [3].

Syntetické organické pigmenty pokrývají celé spektrum barev od fialové k modré, zelené, žluté, oranžové a červené. Většina z nich jsou azopigmenty, které jsou obvykle žluté, oranžové nebo červené. Syntetické organické pigmenty vykazují široký rozsah fyzikálních a chemických vlastností. Příkladem je tepelná stabilita, stálost v organických rozpouštědlech, světlostálost a stabilita vůči rekrystalizaci. Vedle široké škály syntetických organických pigmentů existuje i řada přírodních organických pigmentů, které se získávají z rostlinných nebo živočišných zdrojů. Většinou se jedná o karotenoidní systémy nebo chinoidní, vázané ve formě glykosidů.

Pigmenty jsou využívány pro celou řadu aplikací v různých oblastech, např. nátěrové hmoty, tiskařské barvy, automobilový průmysl, barvení plastů a textilu, atd. [1,3,5].

1.6.1 Rozdělení organických pigmentů

Pigmenty je možno rozlišovat z mnoha hledisek. Nejčastěji podle toho, zda mají nebo nemají ve své struktuře azo skupinu. Pigmenty obsahující azo skupinu jsou nazývány azopigmenty. Pigmenty neobsahující azo skupinu jsou nazývány polycyklické pigmenty. Dále je možno dělit pigmenty dle aplikací na klasické a vysoce jakostní, tzv. HP (high performance). Vysoce jakostní pigmenty jsou zpravidla aplikovány v těch nejnáročnějších aplikacích. Příkladem mohou být autolaky [5].

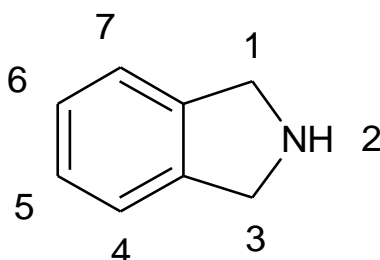
Pro potřeby předkládané diplomové práce bude blíže představena isoindolinová a isoindolononová skupina pigmentů, kam patří pigment P.Y. 139.

1.7 Isoindolinové a isoindolononové pigmenty

Tyto pigmenty byly zavedeny na trh až v polovině roku 1960, ačkoli byly patentovány již v roce 1940 [3].

Struktura této skupiny pigmentů je odvozena od isoindolinového kruhu. Isoindolin (obr. č. 3) je heterocyklická organická sloučenina se sumárním vzorcem C_8H_9N . Tato aromatická sloučenina má bicyklickou strukturu, skládající se z šestičlenného aromatického kruhu kondenzovaného na pětičlenném kruhu obsahujícím dusík. Struktura sloučeniny je podobná indolinu s tím rozdílem, že má atom dusíku v poloze 2 místo 1 ve struktuře pětičlenného kruhu. Isoindolin sám o sobě není běžně se vyskytující sloučenina [10].

1 – substituované isoindoliny jsou chirální. 1,3 – disubstituované isoindoliny jsou složkami některých léčiv a produktů (léčiva na bázi inhibice acetylcholinesterázy sloužící k léčbě Alzheimerovy choroby) [10].

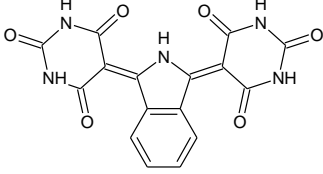
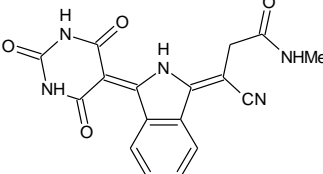
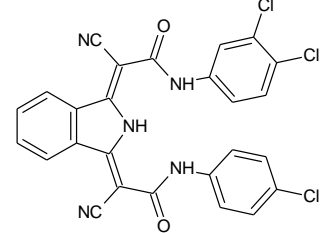
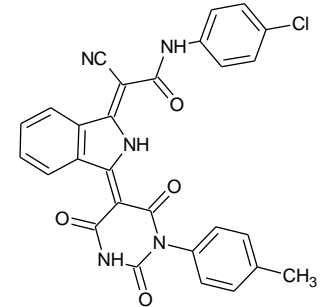
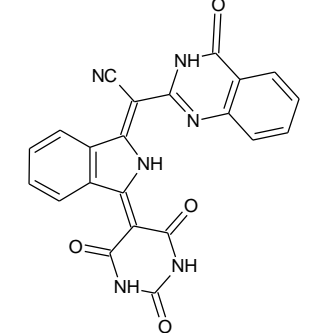


Obr. č. 3: Isoindolinová struktura

Isoindolinový typ pigmentů byl popsán teprve nedávno, připravuje se z jednoho nebo dvou ekvivalentních komponent, připojených aktivovanou methylenovou skupinou na jeden ekvivalent isoindolinu. Pigmenty jsou dostupné v odstínech žluté, oranžové, červené a hnědé. Do této skupiny patří P.Y. 139, P.Y. 185, P.O. 66, P.O. 69 a P.R. 260 (tabulka č. 1). Pigmenty

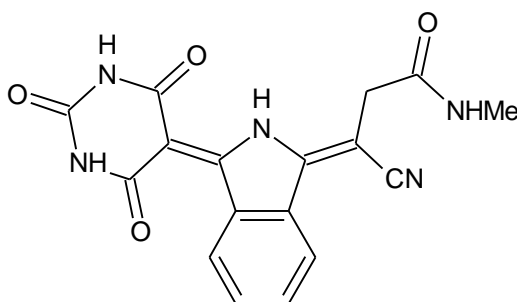
jsou vysoce kvalitní, vyznačují se vynikajícími aplikačními stálostmi. Jednotliví zástupci jsou používáni například v originálních nebo správkových autolacích, v segmentu průmyslových nátěrových hmot (tekutých i práškových) nebo v aplikaci tiskových barev [3,5].

Tabulka č. 1: Zástupci isoindolinových a isoindolinonových pigmentů

| Struktura | Odstín | C.I. název | C.I. konstituce |
|---|--------------------|------------|-----------------|
|  | Červeno – žlutá | P.Y. 139 | 56298 |
|  | Zeleno – žlutá | P.Y. 185 | 56280 |
|  | Nažloutlá oranžová | P.O. 66 | 48210 |
|  | Nažloutlá oranžová | P.O. 69 | 56292 |
|  | Nažloutlá červená | P.R. 260 | 56295 |

1.7.1 Pigment P.Y. 185

P.Y. 185 (obr. č. 4) a P.Y. 139 (obr. č. 5) jsou nejvýznamnějšími zástupci této skupiny pigmentů. P.Y. 185 se vyskytuje v nazelenalých odstínech žluté. Tento pigment je odolný vůči organickým rozpouštědlům, ale nestabilní v alkalickém prostředí. Hlavní oblastí využívající tento pigment jsou tiskové barvy [3].



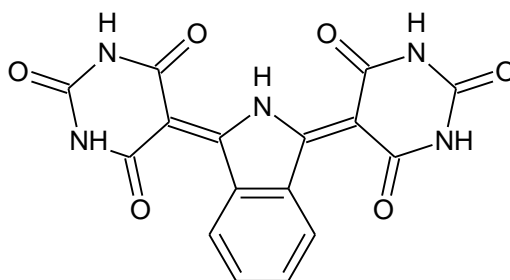
Obr. č. 4: Struktura pigmentu P.Y. 185

1.8 Pigment P.Y. 139

Tato diplomová práce se zabývá analýzou pigmentu P.Y. 139. Tento pigment je vyráběn celosvětově mnoha společnostmi pod různými obchodními názvy: TCY 13902, TCY 13901, Paliotol® Yellow L 2140 nebo Graphtol Yellow H2R [11,12,13]. Společnost Synthesia, a.s. tento pigment vyrábí pod komerčním názvem Versalová žlut' 5 RD, 6 RD, 7 RD, které jsou určeny pro nátěrové hmoty a ve verzi Versalová žlut' 4 RDP a 5 RDP určené pro aplikaci v plastech.

1.8.1 Základní charakteristika pigmentu P.Y. 139

P.Y. 139 je organický pigment klasifikovaný jako derivát isoindolinu. Tato žluto – oranžová pevná látka je prakticky nerozpustná ve většině rozpouštědel. Pigment není zcela stálý v alkalickém prostředí. Chemická struktura je uvedena na obr. č. 5. [3].



Obr. č. 5: Struktura pigmentu P.Y. 139

Název dle IUPAC: 5,5'-(1H-Isoindol-1,3(2H)-diylidene)-di(2,4,6(1H,3H,5H)-pyrimidinetrion) [15].

| | |
|----------------|--------------------|
| C. I. | Pigment Yellow 139 |
| C. I. číslo | 56298 |
| CAS číslo | 36888-99-0 |
| Chemická třída | Isoindolin [14] |



TiO₂ 1:1



TiO₂ 1:10

Obr. č. 6: Vybarvení P.Y. 139 ve směsi s TiO₂ [14]

Pigment nachází své uplatnění v plastech, nátěrových hmotách nebo tiskových barvách. Existuje několik typů dle velikosti částic, které vykazují velmi rozdílné vlastnosti, včetně koloristických, což platí zejména i pro kryvost (obr. č. 6). Kryvá verze je odstínově červenější s nižší barevnou vydatností, na druhou stranu umožňuje připravit vysoce koncentrované formulace nátěrových hmot s dobrými rheologickými vlastnostmi a bez nežádoucího vlivu na zhoršení lesku nátěru. Ve srovnání s transparentní verzí tohoto C. I. Nr. vykazuje například lepší stálost na světle a v povětrnosti. Naopak transparentní verze se vyznačuje vysokou barevnou vydatností, která se s výhodou uplatňuje v barvení plastů.

P.Y. 139 se používá jako náhrada ekologicky závadných chromových žlutých pigmentů [3,5].

1.8.1.1 Toxikologické informace

Akutní toxicita

- Orální: LD (krysa) > 5000 mg/kg
- Dermální: nedráždivé (králík)
- Oční: nedráždivé (králík)
- Vdechnutí: prach může být dráždivý pro horní cesty dýchací

1.8.1.2 Ekologické informace

- Tento produkt není škodlivý pro životní prostředí [16]

1.8.2 Výroba pigmentů v Synthesia, a.s.

1.8.2.1 Společnost Synthesia, a.s.

Synthesia, a.s. je chemická firma sídlící v Pardubicích – Semtíně zaměřená na kvalifikovanou chemii. Společnost již 95 let úspěšně prezentuje na světovém trhu výrobky v různých segmentech chemické výroby. Společnost patří do koncernu Agrofert. Produkce společnosti je určena především pro export na evropské trhy a do zámoří, kam směřuje více než tři čtvrtiny své výroby.

Společnost Synthesia, a.s. je rozdělena do čtyř SBU (strategic business units):

SBU Pigmenty a barviva

- Pigmenty – barvení plastů i vláken, výroba nátěrových hmot a tiskových barev
- Barviva – barvení a potisk textilních materiálů

SBU Nitrocelulóza

- Průmyslová nitrocelulóza – nátěrové hmoty a laky
- Vojenská nitrocelulóza – těžební a zbrojní průmysl
- Anorganické kyseliny a soli – využití v dalším provozu Synthesie
- Oxycelulóza – biomedicína

SBU Organická chemie

- Farmacie
- Pesticidy – příprava z vlastních vyvinutých účinných látek
- Zákaznické syntézy
- Polotovary

SBU Energetika

- Energetika – výroba a distribuce horké páry a tepla pro areál Synthesia, a.s. [17,18]

Výzkum a vývoj ve společnosti Synthesia, a.s. je považován za klíčovou oblast. Vysoký inovační potenciál je důsledkem vysokého počtu odborníků z oblasti kvalifikované chemie. Hledání nových technických a technologických řešení v aplikované chemii zajišťuje pro společnost Synthesia, a.s. vlastní dceřiná společnost Výzkumný ústav organických syntéz (VÚOS). [17,19].

1.8.2.2 Příklady pigmentů vyráběných společností Synthesia, a.s.

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

- Příklady pigmentů 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

β – naftolové pigmenty: P.R. 4

Antrachinonové pigmenty P.R. 177

- Příklady pigmentů 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 pro plasty

Disazo kondenzační pigmenty: P.Y. 95, P.R. 166, P.R. 214

Isoindolinové pigmenty: P.Y. 139

Antrachinonové: P.R. 177

- Příklady preparace
 - a) vodou ředitelné – pro nátěrové hmoty
 - b) masterbatch – pro plasty [5,17]

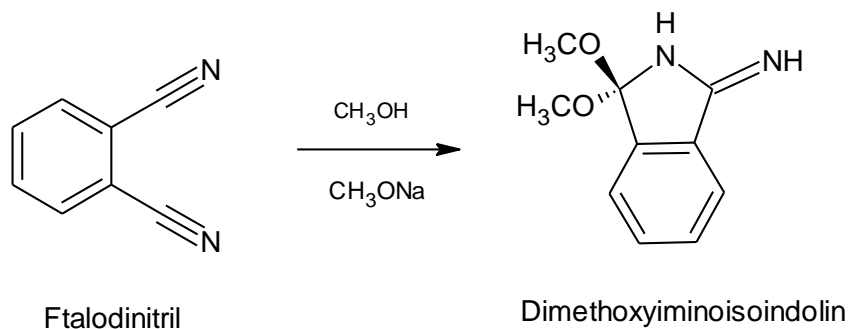
1.8.3 Výroba P.Y. 139 v Synthesia, a.s.

Princip výroby

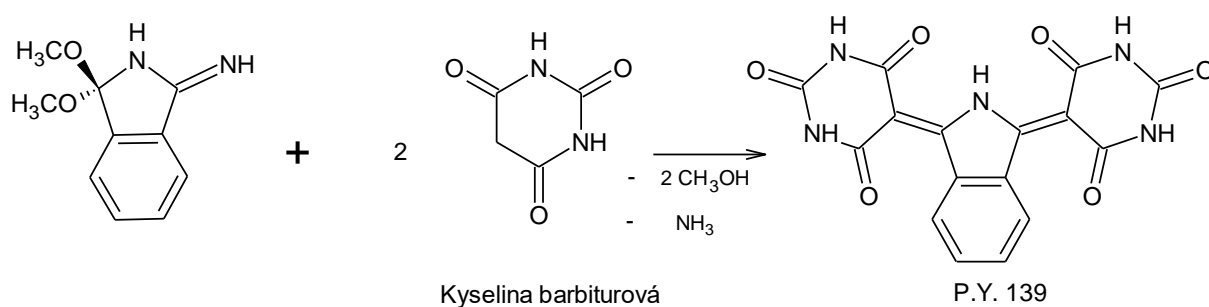
K roztoku methanolátu sodného v methanolu se přidá ftalodinitril. Vzniklá suspenze se předloží do vodné suspenze kyseliny barbiturové. Poté se směs zahřeje a oddestiluje methanol. Surový pigment se odfiltruje a promyje horkou vodou. Kondicionace (finalizační a čistící proces) pigmentu se provádí ve vodném prostředí po dobu několika hodin při pH = 6. Po kondicionaci se směs odfiltruje. Koláč se následně opět promyje horkou vodou a suší se.

Reakční schéma

I. Stupeň kondenzace

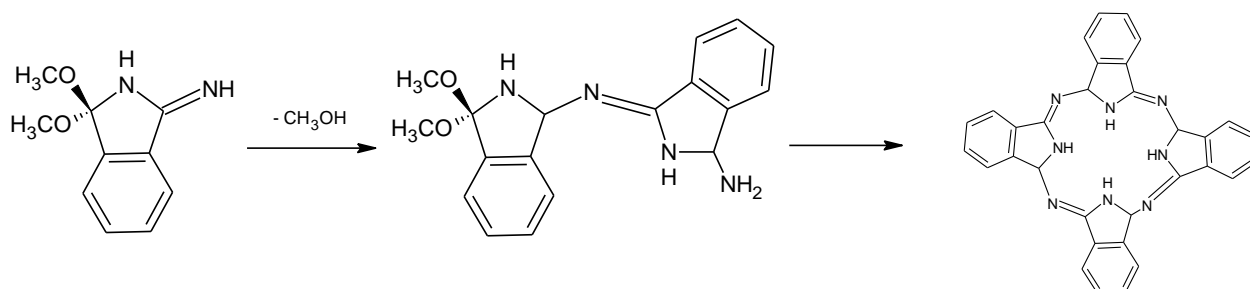


II. Stupeň kondenzace

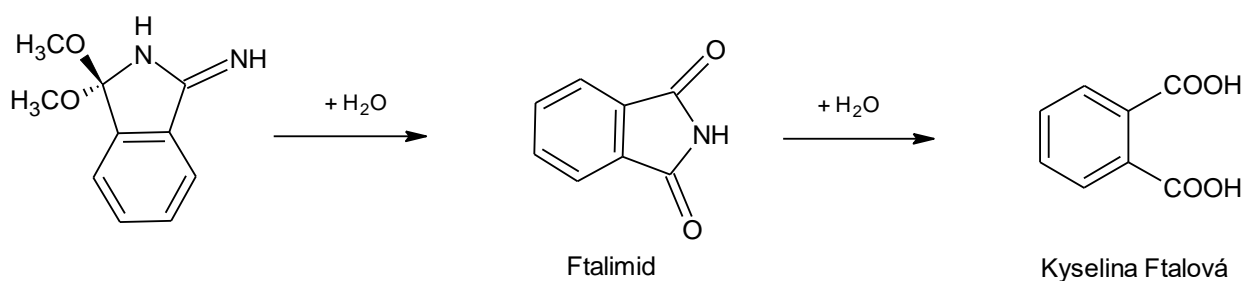


Možné vedlejší reakce

Jako vedlejší produkt reakce může vznikat za výše uvedených podmínek z ftalimidu porfirinová struktura

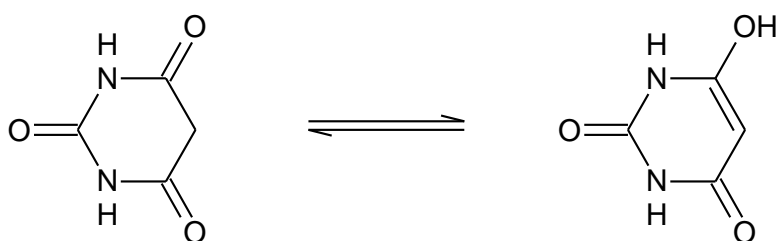


Při hydrolyze nezreagovaného dimethoxyiminoisoindolinu vzniká ftalimid a následně kyselina ftalová



Kyselina barbiturová nachází široké použití v různých odvětvích průmyslu a její deriváty – barbituráty mají významné farmakologické vlastnosti a používají se jako sedativa a hypnotika. Některé deriváty kyseliny barbiturové mají také antimikrobiální účinky.

Kruhový systém kyseliny barbiturové může existovat v různých konfiguracích, z nichž všechny jsou v dynamické rovnováze mezi sebou (obr. č. 8). Ve formě keto jsou atomy uhlíku číslo 2, 4 a 6 součástí karbonylové skupiny, zatímco ve formě enol jsou tyto uhlíkové atomy vázány s hydroxylovými skupinami na základě přesunu polohy aktivovaných vodíků ze sousedních vazeb. Keto forma převládá v kyselých roztocích, zatímco enol forma je přítomna hlavně v alkalickém prostředí.

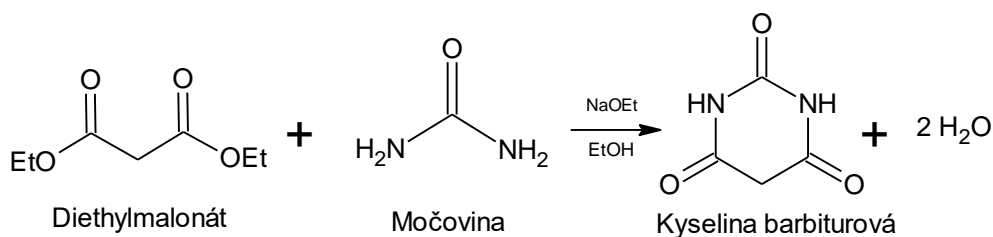


Obr. č. 8: Keto a enol forma kyseliny barbiturové

V závislosti na použitém rozpouštědle a koncentraci vodíkových iontů systému, mohou být jedna, dvě nebo všechny tři z karbonylových vazeb ovlivněny způsobem enolizace. Methylenová skupina mezi dvěma karbonylovými skupinami je velmi chemicky reaktivní. Žádný z tautomerních izomerů nebyl nikdy izolován [21,23].

1.9.1 Syntéza kyseliny barbiturové

V roce 1879 francouzský chemik Édouard Grimaux syntetizoval barbiturovou kyselinu z kyseliny malonové, močoviny a fosforyltrichloridu (POCl_3). Kyselina malonová byla od té doby nahrazena diethylmalonátem, protože s použitím esteru není nutné řešit kyselost karboxylové skupiny (obr. č. 9) [24].



Obr. č. 9: Syntéza kyseliny barbiturové

1.9.2 Stanovení kyseliny barbiturové

Ke stanovení kyseliny barbiturové a jejich derivátů – barbiturátů lze použít různé techniky, například kapalinovou chromatografii nebo kapilární elektroforézu s elektrochemickou detekcí v amperometrickém modu. Elektrochemická detekce probíhá pomocí tří elektrodového systému: mikrodisková elektroda z uhlíkových vláken, referentní AgCl elektroda a pomocná Pt elektroda. V případě intoxikace barbituráty lze množství těchto farmak zjistit pomocí plynové chromatografie. Ovšem tato technika není vždy stoprocentní, vzhledem k častému výskytu analogů těchto sloučenin. V současnosti bylo zavedeno spojení GC/MS, umožňující rutinní analýzy [25,26,27,28].

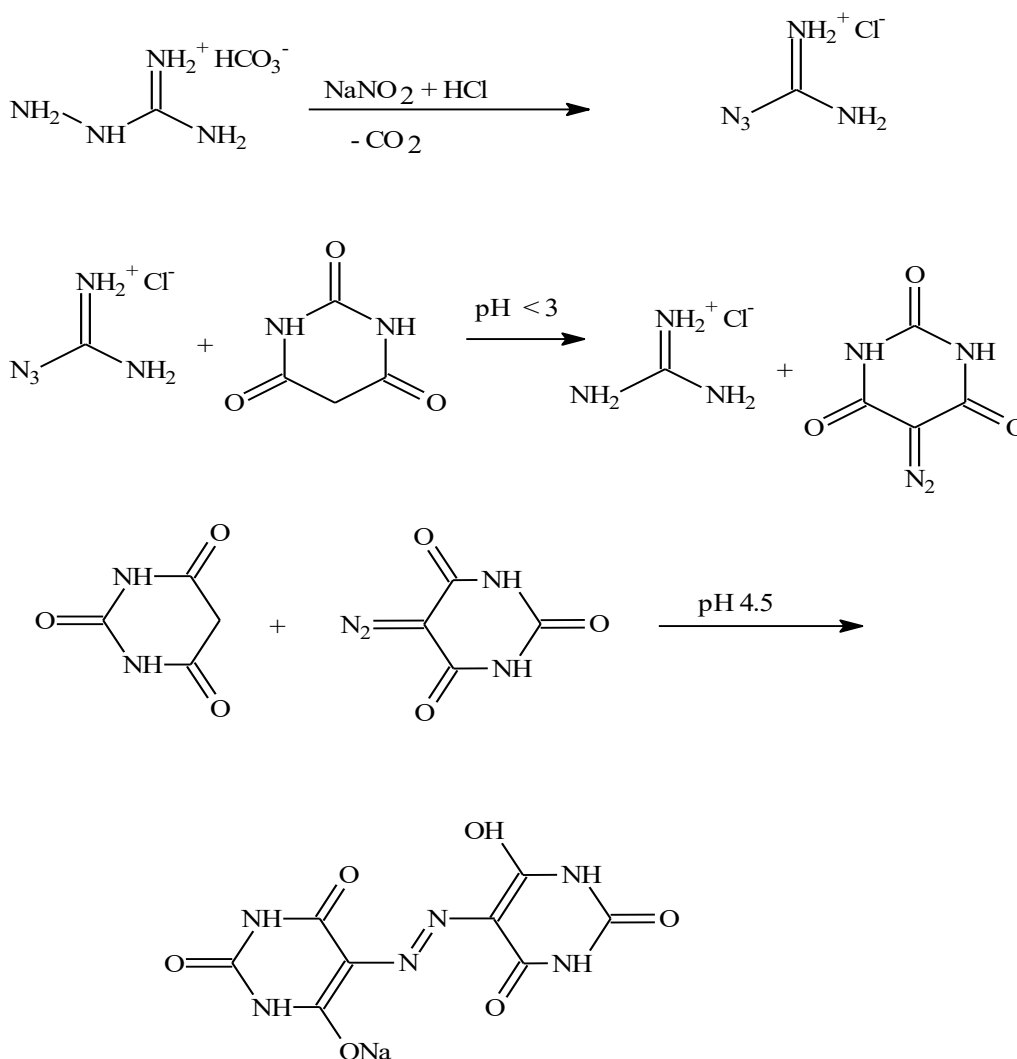
Nedávno byla vyvinuta nová kinetická – spektrofotometrická metoda pro stanovení kyseliny barbiturové. Tato metoda je založena na inhibičním účinku kyseliny barbiturové na reakci mezi kyselinou chlorovodíkovou a bromičnanem za vzniku bromu a chloru. Odbarvení methyloranže jako substrátu produktu zmiňované reakce je spektrofotometricky monitorováno při 510 nm; stanovovaná kyselina barbiturová inhibuje reakci, tudíž nevznikají halogeny schopny odbarvit methyloranž. Tato metoda je poměrně rychlá a citlivá [29].

Další spektrofotometrická metoda je založena na kopulační reakci kyseliny barbiturové s diazotovaným nitroanilinem v zásaditém prostředí. Reakcí vzniká intenzivně žluté ve vodě rozpustné a stabilní monoazobarvivo. Reakce probíhá ve dvou krocích: v prvním kroku reakce o-, m- a p-nitroanilinu s dusitanem sodným v kyselém prostředí produkuje diazosloučeniny. Ve druhém kroku diazo sloučeniny v alkalickém prostředí reagují s kyselinou barbiturovou v poměru 1:1 a vytváří žlutou azo sloučeninu, jejíž množství lze monitorovat při vlnových délkách 418, 380 a 370 nm [30].

1.9.3 Dihydrát sodné soli kyseliny azobarbiturové

Kyselina barbiturová je výchozí látkou dalšího pigmentu vyráběného společností Synthesia, a.s. – P.Y. 150. Tento pigment patří do skupiny azomethinových kovových

komplexů. Jedná se o komplex niklu a dihydrátu sodné soli kyseliny azobarbiturové, která je jeho výchozí surovinou (obr. č. 10). P.Y. 150 poskytuje specifický zelenavý a kalnější odstín žluté, který je široce používán při formulacích odstínů imitujících dekor dřeva. Díky velmi dobrým aplikačním vlastnostem (termostabilita, stálost v migraci) má pigment univerzální použití zejména v segmentech barvení plastů a tiskových barvách. Jako jeden z mála organických pigmentů se používá i pro náročnější aplikace, jako např. barvení polypropylenových a polyamidových vláken. [3,5].



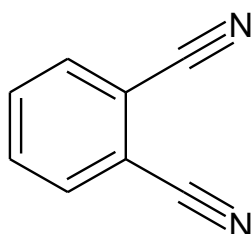
Obr. č. 10: Chemismus přípravy dihydrátu monosodné soli azobarbiturové kyseliny

K dispozici je více způsobů přípravy dihydrátu monosodné soli azobarbiturové kyseliny. Syntéza probíhá pomocí azidoformamidinu, který slouží jako přenašeč azo skupiny.

Azidoformamidin se získá reakcí aminoguanidinu s kyselinou dusitou. Tato reakce probíhá v prvním kroku. Ve druhém kroku vzniklá diazobarbiturová kyselina, která reaguje s přebytkem kyseliny barbiturové. Ve třetím kroku vzniká sodná sůl azobarbiturové kyseliny ve formě dihydrátu [31].

1.10 Ftalodinitril jako výchozí surovina pro výrobu pigmentu P.Y. 139

Je organická sloučenina se sumárním vzorcem $C_6H_4(CN)_2$. Ftalodinitril (obr. č. 11) je látka pevná, krystalická, šedo – bílé barvy. Jedná se o derivát benzenu, který obsahuje dvě nitrilové skupiny [32].



Obr. č. 11: Struktura ftalodinitrilu

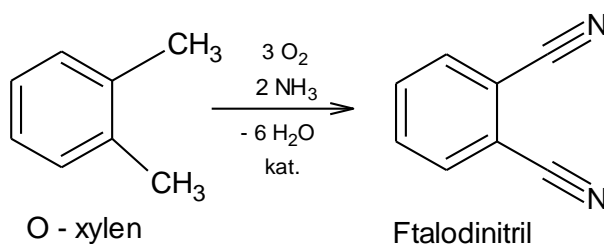
| | |
|------------------|----------------------------|
| Molární hmotnost | 128,13 g.mol ⁻¹ |
| CAS číslo | 91-15-6 |
| Bod tání | 139 – 141 °C |
| Bod varu | 150 – 152 °C, sublimuje |

Sloučenina má nízkou rozpustnost ve vodě, ale je rozpustná v běžných organických rozpouštědlech. Používá se jako surovina pro výrobu například pigmentů ftalocyaninů, nebo dalších pigmentů (P.Y. 185 a P.Y. 139) a pro ftalodinitrilové kompozity a polymery [32,33].

1.10.1 Syntéza ftalodinitrilu

Ftalodinitril byl poprvé popsán v roce 1896 Johannesem Pinnowem, jako vedlejší produkt syntézy orthodicyanodiazomidobenzenu. Ftalodinitril se vyrábí průmyslově,

jednostupňovou kontinuální reakcí. Jedná se o amoxidaci o - xylenu při 480 °C. Reakce je znázorněna na obr. č. 12 [34].



Obr. č. 12: Syntéza ftalodinitrilu

1.10.2 Stanovení ftalodinitrilu

Ftalodinitril je látka nepolárního charakteru. Ke stanovení lze použít například kapalinovou chromatografii s nepolární stacionární fází.

1.11 Kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, dříve označovaná jako kapalinové chromatografie s vysokým tlakem) je technika v analytické chemii sloužící k oddělení nebo identifikaci látek ve směsi [35]. HPLC využívá k analýze látek jejich opakovanou distribuci mezi dvě nemísitelné fáze – stacionární a mobilní fází. Kapalně rozpouštědlo (mobilní fáze) s nadávkovaným vzorkem obsahujícím analyzované látky prochází kolonou naplněnou pevnou stacionární fází. Každá složka ze vzorku se zadržuje v koloně po jinou dobu, čímž dojde v ideálním případě k rozdělení původní směsi na jednotlivé látky. Separace látek probíhá na základě opakovaného ustavování rovnováhy analyzované látky mezi stacionární a mobilní fází v koloně a vlivem odlišnosti mezi fyzikálně – chemickými vlastnostmi analyzovaných látek dochází k jejich vzájemné separaci [35,36].

1.11.1 Mobilní fáze

Mobilní fáze unáší vzorek kolonou. Podle časové změny složení mobilní fáze rozlišujeme gradientovou a izokratickou eluci. Při gradientové eluci dochází ke změně složení

mobilní fáze s časem. To má za následek urychlení eluce více zadržovaných látek. Použitím gradientové eluce se může dosáhnout např. zvýšení počtu píků rozseparovaných za jednotku času. Mobilní fáze jsou směsi rozpouštědel vhodně zvolené podle typu separačního mechanismu. Jedná se nejčastěji o binární směsi rozpouštědel s různou eluční silou (např. voda/acetonitril nebo methanol, hexan/dichlormethan, ...) k nimž může být přidáno v malém množství vhodné aditivum upravující vlastnosti mobilní fáze (pH, iontová síla, ...).

1.11.2 Stacionární fáze

Uvnitř kolony se nachází stacionární fáze, která je chemicky vázaná na vhodný nosič (společný název sorbent). Nosičem je nejčastěji silikagel, oxid hlinitý, oxid zirkoničitý, organický polymer nebo uhlík. Nejčastěji jsou v kapalinové chromatografii používány stacionární fáze typu alkylsilikagelů (C8, C18), iontoměniče nebo grafitizovaný uhlík. V současnosti se používají sorbenty s velikostí částic 2 – 5 mikrometrů [36,37].

1.11.3 Rozdělení kapalinové chromatografie

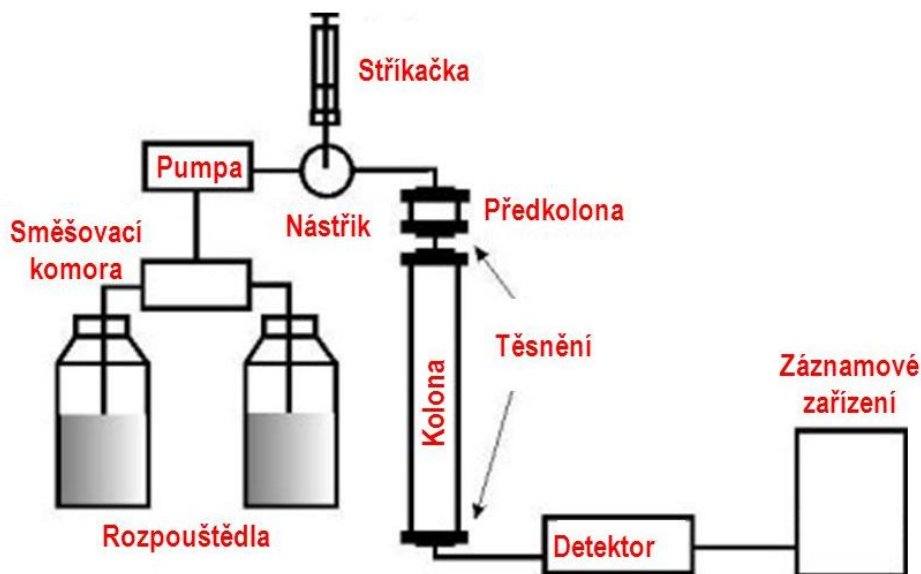
- **Podle uspořádání**
 - a) Planární – papírová (PC), tenkovrstvá (TLC)
 - b) Sloupcová – kolonová (CC), vysokoúčinná (HPLC)

- **Podle mechanismu interakce složek vzorku mezi stacionární a mobilní fází**
 - a) Rozdělovací
 - b) Adsorpční
 - c) Afinitní
 - d) Gelová
 - e) Iontově výměnná

1.11.4 Instrumentace pro kapalinovou chromatografii

Na obr. č. 13 je schéma kapalinového chromatografu, který obvykle obsahuje tyto základní části: jedno nebo více čerpadel složek mobilní fáze, dávkovač vzorků, kolonu a detektor. Vysokotlaký dávkovací ventil vnáší vzorek analyzované směsi do proudu mobilní

fáze, která jej nese do kolony. Kolona obsahuje vhodnou stacionární fázi a dochází v ní k separaci směsi na jednotlivé složky. Kolona je vyrobena z inertního materiálu (nerez, titan, plast, ...) s délkou nejčastěji 30 – 250 mm a vnitřním průměrem 2 – 4,6 mm. Za kolonou umístěný detektor generuje signál úměrný množství vzorku složky na výstupu z kolony a tím umožňuje kvantitativní analýzu složek vzorku.

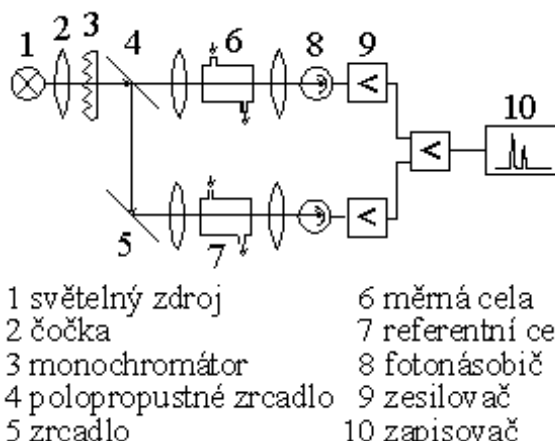


Obr. č. 13: Schéma kapalinového chromatografu [38]

1.11.4.1 Detektory HPLC

a) UV/VIS – spektrofotometrický (obr. č. 14)

- nejčastěji používaný detektor
- absorpce vzorku záření různé vlnové délky
- kvantitativní vyhodnocení je dáno Bouguer – Lambert – Beerovým zákonem, který vyjadřuje vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy, koncentrací absorbující složky a velikostí absorbance



Obr. č. 14: Schéma UV/VIS detektoru [39]

b) Fluorescenční

- poskytuje odezvu pro látky vykazující fluorescenci
- emitované záření dopadá na fotonásobič, jehož proud je úměrný pohlcenému fluorescenčnímu záření

c) Elektrochemický

- měří proud, který vzniká průchodem oxidované nebo redukované látky měrnou celou
- v měrné cele jsou umístěny elektrody (3 elektrodový systém), na kterých je vloženo napětí

d) Vodivostní

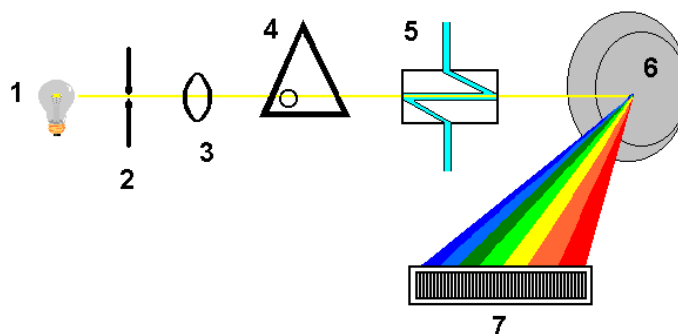
- v měrné cele jsou umístěny dvě elektrody, mezi kterými protéká eluát z kolony
- měří se elektrická vodivost tohoto eluátu

e) Refraktometrický

- nižší citlivost, vyšší mez detekce
- odezva úměrná rozdílu indexu lomu látky ve srovnávací a měrné kyvetě

f) Detektor s diodovým polem (DAD detektor, obr. č. 15)

- detektor měří celé spektrum v reálném čase
- záření po rozkladu holografickou mřížkou dopadá na systém fotodiód
- na každou fotodiodu dopadá zářivý tok o určité vlnové délce
- vznikající fotoelektrický proud je úměrný množství dopadajícího záření na fotodiody
- spektrální rozlišení je dáno počtem diód [36]



Obr. č. 15: Schéma detektoru s diodovým polem [40]
 1 – zdroj záření; 2 – štěrbina; 3 – čočka; 4 – měrná cela; 5 – detektor;
 6 – holografická mřížka; 7 – systém fotodiod

1.11.5 Separační systémy v HPLC

1.11.5.1 Systémy s normálními fázemi (NP)

Stacionární fáze je polární. Nejčastěji se používají stacionární fáze anorganické (silikagel, oxid hlinitý, oxid zirkoničitý) a chemicky vázané polární stacionární fáze (aminové, nitrilové). Mobilní fáze jsou méně polární než fáze stacionární. Nejčastěji se používají nepolární organická rozpouštědla ve směsi s polárnější složkou (hexan, heptan a propanol, dioxan, tetrahydrofuran, ...).

1.11.5.2 Systém s obrácenými fázemi (RP)

Stacionární fáze je nepolární. Nejčastěji se používají stacionární fáze chemicky vázanými alkylovými (C8, C18 a jiné alkyly) nebo arylovými skupinami, hydrofobní polymery (styren – divinylbenzen) nebo krystalický uhlík. Mobilní fáze jsou polárnější než fáze stacionární. Nejčastěji jde o směsi organických rozpouštědel a vody [36].

1.11.6 HILIC chromatografie

HILIC chromatografie je chromatografie hydrofilních interakcí na polárních sorbentech, ve vodně – organických mobilních fázích. Původně byla tato technika vyvinuta pro separaci polárních aminokyselin nebo sacharidů. Vzhledem k popularizaci této techniky došlo v posledních letech k velkému nárůstu počtu kolon pro separaci. V současnosti se HILIC kolony používají při analýze životního prostředí, potravin, léčiv nebo tenzidů [41].

O HILIC chromatografii lze říci, že vznikla spojením NP – LC a RP – LC. Separace je zaměřena na polární látky, které jsou rozpustné ve vodě. Při separaci nejsou nepolární látky

zadržovány. Při HILIC separaci je tedy eluční pořadí opačné ve srovnání se separacemi v systémech s obrácenými fázemi [36,41].

1.11.6.1 Mobilní fáze v HILIC

Mobilní fáze jsou vodně – organické, organickou složkou bývá acetonitril nebo methanol. Voda je obsažena 5 – 40 % s přídavkem vhodného pufru upravujícího výsledné vlastnosti mobilní fáze. Použití vody dává této technice řadu výhod, jako například samotná příprava mobilní fáze nebo její snadná dostupnost.

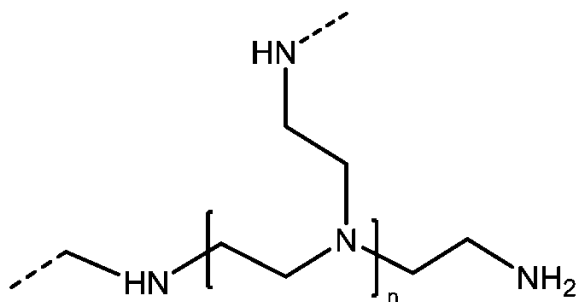
1.11.6.2 Stacionární fáze v HILIC

Stacionární fáze pro HILIC jsou polární (tabulka č. 2). Může se jednat o silikagel se sníženou povrchovou koncentrací silanolů nebo se používají chemicky vázané stacionární fáze s navázanými aminopropylými –, amidovými –, kyanopropylými –, diolovými –, polyethylenglykolovými či polyethyleniminovými skupinami (obr. č. 16). Na povrchu stacionární fáze se nachází tenká vrstva vody, která zajišťuje zvýšenou afinitu polárních sloučenin ke stacionární fázi a tím dochází ke zvýšení jejich retence [41,42].

Tabulka č. 2: Stacionární fáze používané při HILIC; [42]

| stacionární fáze | chemická struktura |
|---------------------|--|
| a. silikagel | –OH |
| kyanopropyl | –(CH ₂) ₃ –CN |
| aminopropyl | –(CH ₂) ₃ –NH ₂ |
| diol | –CH ₂ –CH–CH ₂ –OH OH |
| b. PAC | –(CH ₂ –CH) _n – C=O OH |
| c. ZIC | CH ₃ –CH ₂ –N ⁺ (CH ₂) ₃ –SO ₃ [–] CH ₃ |

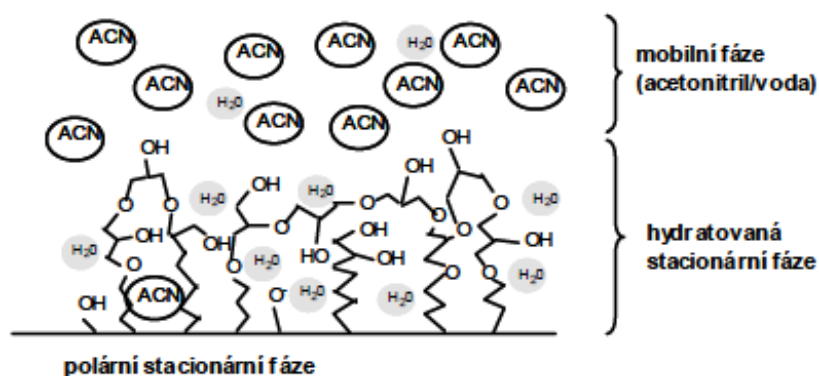
PAC – polymerní aniontová fáze, ZIC – zwitteriontová fáze



Obr. č. 16: Polyetyleniminová stacionární fáze [43]

1.11.6.3 Mechanismus separace HILIC

Separace je řízena hydrofilními interakcemi, pro které je potřeba, aby se na povrchu sorbentu stacionární fáze vytvořila hydratovaná vrstva. Vznikající interakce jsou proton – donor akceptorového a dipól – dipólového charakteru mezi stacionární fází a kapalinou na jejím povrchu. Díky hydratované vrstvě (obr. č. 17) dochází k rozdělování analytu, podmínkou je ale přítomnost dostatečného množství vody v mobilní fázi, obvykle 5 – 40 % [41,42,44].

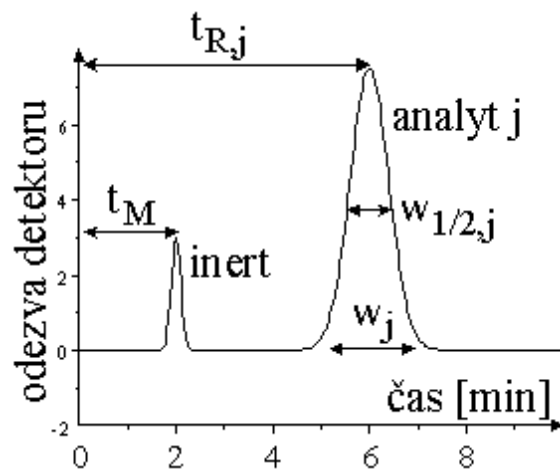


Obr. č. 17: Ustavení hydratované vrstvy na povrchu stacionární fáze modifikované dioly [42]

1.11.7 Vyhodnocení naměřených dat v HPLC

Výsledkem analýzy látky je chromatogram (obr. č. 18). Důležité veličiny pro jeho vyhodnocení je retenční objem (V_R), resp. retenční čas (t_r) mezi okamžikem nástřiku a maximem (vrcholem) píku. Retenční objem (čas) je kvalitativní charakteristikou separované látky. Další důležitou veličinou je mrtvý objem (V_M), resp. mrtvý čas (t_M), který charakterizuje

vlastnosti separační kolony a stacionární fáze v ní. Velikost plochy pod píkem analyzované látky je kvantitavním ukazatelem [36,45].



Obr. č. 18: Vyhodnocení chromatogramu [38]

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Seznam použitých chemikálií

| Chemikálie | Čistota | Výrobce |
|------------------------|------------------|-----------------------|
| Acetonitril | 99,9 %, pro HPLC | Sigma – Aldrich |
| Dimethylacetamid | 99 % | Sigma – Aldrich |
| Dimethylformamid | Pro HPLC | Lach – Ner, s.r.o. |
| Dimethylsulfoxid | Pro HPLC | Lach – Ner, s.r.o. |
| Kyselina barbiturová | 99 % | Sigma – Aldrich |
| Kyselina bibarbiturová | - | Izolát z pigmentu |
| Kyselina fosforečná | 85 % | Lach – Ner, s.r.o. |
| Kyselina ftalová | - | Lach – Ner, s.r.o. |
| Kyselina mravenčí | 98 % | Lach – Ner, s.r.o. |
| Methanol | Pro HPLC | Lach – Ner, s.r.o. |
| Mravenčan amonný | 99 % | Lach – Ner, s.r.o. |
| Tetrahydrofuran | 99,70 % | VWR Prolabo chemicals |

2.2 Seznam použitých přístrojů

| Typ přístroje | Název přístroje | Výrobce |
|-------------------------|-------------------------|----------------------|
| Analytické váhy | AE 200/663317 | Mettler |
| Hmotnostní spektrometr | Qtrap 4500 | AB Sciex |
| Kapalinový chromatograf | Infinity 1260 | Agilent |
| Odparka | Laborota 4003 – control | Heidolph |
| Odstředivka | EBA 200 | Hettrick Zentrifugen |
| pH - metr | WTW82362WEILHEIM | WTW |
| Ultrazvuková lázeň | RK 103 H | Bandelin |

2.2.1 Kapalinový chromatograf Agilent 1260 Infinity

K měření vzorků pigmentu P.Y. 139 byl použit kapalinový chromatograf Agilent 1260 Infinity (sestava uvedena na obr. č. 19).



Obr. č. 19: Kapalinový chromatograf Agilent 1260 Infinity

Čerpadlo analytického systému

- dvojice sériově zapojených pístů s plynule proměnným zdvihem a aktivním vstupním ventilem
- čerpadlo umožňuje tvorbu nízkotlakého kvartérního gradientu
- rozsah průtoků až do 10 ml/min a tlakový rozsah do 600 bar (400 bar VL verze) s možností nastavení kompresibility mobilní fáze (umožňuje využít tento typ pump jak pro analytické, tak pro semi – preparativní aplikace)

Autosampler analytického systému

- možná instalace aditivního modulu pro termostatování vzorků v rozsahu 4 – 40 °C
- flow – through design nástřikového systému na principu vialka za jehlou

- kapacita vialek – 100 pozic
- rozsah: 0,1 – 100 μ l

Termostat analytického systému

- od teploty 10 °C do 80 °C
- vysoká rychlost vyhřátí nebo ochlazení pro maximální flexibilitu použití

Detektor analytického systému

- detektor diodového pole s rozsahem vlnových délek od 190 do 950 nm
- možnost simultánního měření až při 8 vlnových délkách včetně záznamu 3D spekter
- rozlišení: 0,74 nm; počet diod: 1024

2.2.2 Hmotnostní spektrometr

Podmínky analýzy:

- Vzorek rozpuštěn v MeOH, 100x zředěno, přímá infuze 5 μ l/min
- Typ skenu: product ion (MS2), polarita: negativ, produkt m/z 237, scan rate: 200 Da/s
- Curtain gas: 20 psi, ion spray voltage: -4500 V, gas: 1 – 20 psi, gas: 2 – 0 psi, declustering potential: 90 V, entrance potential: -10 V, collision energy: -30 V, collision cell exit potential: -6 V

2.3 Kolony HPLC

1. Hypersil HILIC GOLD

- Výrobce: Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
- Rozměry: 150 x 3 mm
- Velikost částic: 3 μ m
- Typ stacionární fáze: polyethyleniminová, zakotvená na silikagelu
- Mobilní fáze: A: acetonitril
B: 50 mM mravenčan amonný, pH = 5
Poměr mobilních fází: A:B = 70 %:30 %
- Průtok: 1 ml/min
- Teplota kolony: 35 °C
- Dávkovaný objem: 5 μ l

- Doba analýzy: 12 minut
- Detekce: UV; 254 nm, 320 nm

2. Kolona ACE C4 100A

- Výrobce: Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, Scotland
- Rozměry: 150 x 4,6 mm
- Velikost částic: 3 μm
- Typ stacionární fáze: C4 navázaná na silikagel
- Mobilní fáze: A: acetonitril:methanol (1:3)
B: voda + 0,1 % (v/v) H_3PO_4
Poměr mobilních fází: A:B = 40 %:60 %
- Průtok: 0,6 ml/min
- Teplota kolony: 18 °C
- Dávkovaný objem: 5 μl
- Doba analýzy: 10 minut
- Detekce: UV; 254 nm, 320 nm

3. Kinetex C18 100A

- Výrobce: Phenomenex, Torrance, Kalifornie, USA
- Rozměry: 150 x 4,6 mm
- Velikost částic: 5 μm
- Typ stacionární fáze: C18 navázaná na silikagel
- Mobilní fáze: A: acetonitril
B: 10 mM octan amonný
Poměr mobilních fází: A:B = 40 %:60 %
- Průtok: 1 ml/min
- Teplota kolony: 30 °C
- Dávkovaný objem: 5 μl
- Doba analýzy: 10 minut
- Detekce: UV; 254 nm

4. Inertsil ODS-3V

- Výrobce: GL Sciences, Tokyo, Japonsko

2.5 Příprava mobilních fází

Pufr s mravenčanem amonným

Na analytických vahách bylo naváženo 3,153 g mravenčanu amonného. Tato navážka byla rozpuštěna ve skleněné láhvi s 1000 ml vody určené pro kapalinový chromatograf. Přikapáváním kyseliny mravenčí se pomocí pH – metru dosáhlo požadovaného pH =5.

Voda okyselená kyselinou fosforečnou

Do skleněné láhve bylo odměřeno 1000 ml vody určené pro kapalinový chromatograf. Poté byl do této láhve odpipetován pomocí automatické pipety 1 ml kyseliny fosforečné a pufr byl dán do ultrazvuku na 5 minut pro kvalitní smíchání.

Pufr s octanem amonným

Na analytických vahách bylo naváženo 0,9 g octanu amonného. Tato navážka byla rozpuštěna ve skleněné láhvi s 1000 ml vody určené pro kapalinový chromatogram. Pro úpravu pH na 3,2 bylo k takto připravenému roztoku přidáno 1,5 ml kyseliny mravenčí.

2.6 Příprava kalibračních roztoků standardů

Kyselina barbiturová

Na analytických vahách bylo naváženo přesně 0,05 g kyseliny barbiturové. Navážka byla převedena do 50 ml baňky a přidán roztok AcN:MeOH (1:3). Baňka byla vložena na 5 minut do ultrazvukové lázně, poté doplněna rozpouštědlem po rysku. Následně bylo z 50 ml baňky odpipetováno 0,0025; 0,005; 0,010; 0,015; 0,020; 0,025; 0,050; 0,075; 0,100; 0,150 a 0,200 ml roztoku do 10 ml baněk. Baňky byly doplněny po rysku roztokem AcN:MeOH (1:3) a část jejich obsahu byla převedena do 2 ml skleněných nádobek pro autosampler HPLC.

Kyselina bibarbiturová

Na analytických vahách bylo naváženo přesně 0,007 g kyseliny bibarbiturové. Navážka byla převedena do 25 ml baňky a přidán roztok AcN:MeOH (1:3). Baňka byla vložena na 5 minut do ultrazvukové lázně, poté doplněna rozpouštědlem po rysku. Následně bylo z 25 ml baňky odpipetováno 0,05; 0,075; 0,1; 0,125; 0,19; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2,4; 3,7; 5;

8 a 10 ml roztoku do 10 ml baněk. Baňky byly doplněny po rysku roztokem AcN:MeOH (1:3) a část jejich obsahu byla převedena do 2 ml skleněných nádobek pro autosampler HPLC.

Kyselina ftalová

Na analytických vahách bylo naváženo přesně 0,025 g kyseliny ftalové. Navážka byla převedena do 25 ml baňky a přidán roztok AcN:MeOH (1:3). Baňka byla vložena na 5 minut do ultrazvukové lázně, poté doplněna rozpouštědlem po rysku. Následně bylo z 25 ml baňky odpipetováno 0,03; 0,04; 0,06; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,8; a 1ml roztoku do 10 ml baněk. Baňky byly doplněny po rysku roztokem AcN:MeOH (1:3) a část jejich obsahu byla převedena do 2 ml skleněných nádobek pro autosampler HPLC.

2.7 Příprava vzorku k analýze

Do plastových zkumavek o objemu 12 ml bylo na analytických vahách naváženo 0,5 ($\pm 0,0005$) g vzorku pigmentu P.Y. 139.

Po navázení bylo ke vzorku přidáno vhodné rozpouštědlo a vzorek byl vložen do ultrazvukové lázně. Po uplynutí potřebné doby v ultrazvukové lázni byl vzorek vyjmut a doplněn množstvím rozpouštědla do 10 ml. Takto doplněný vzorek byl vložen v uzavřené plastové zkumavce do odstředivky a 5 minut odstředován při 5000 otáčkách za minutu.

Po odstředění byl téměř čirý supernatant přefiltrován do skleněných 2 ml nádobek pro autosampler HPLC s využitím 0,2 μm stříkačkového filtru. Tento krok zabraňuje ucpání kolony pevnými částicemi prošlého pigmentu.

2.8 Vyhodnocování dat

Vyhodnocování dat bylo provedeno programem *ChemStation*, verze *Open Lab CDS C.01.07[27]*. K tvorbě chemických vzorců byl použit program *ChemSketch*, který je poskytován jako *freeware verze*.

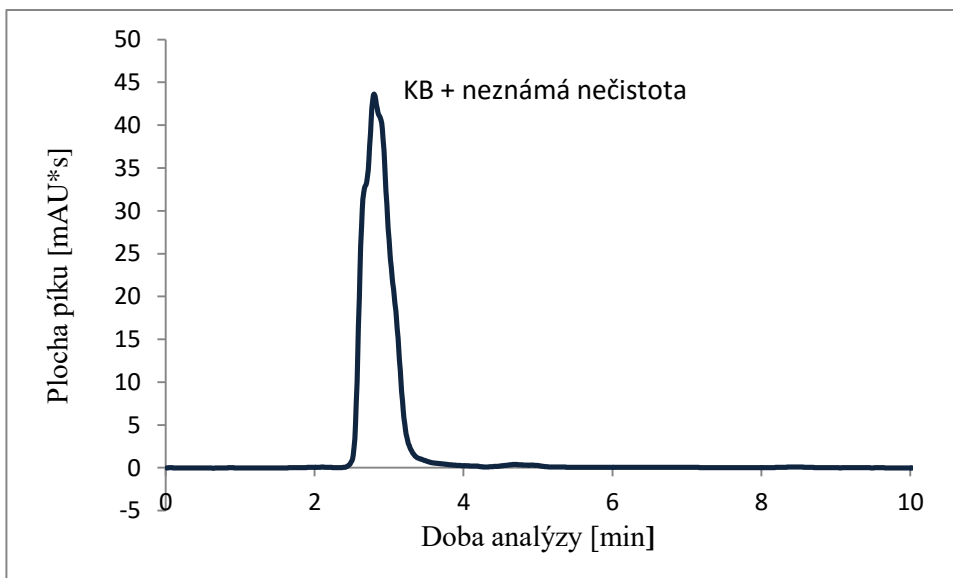
3 VÝSLEDKY, DISKUZE

3.1 Výběr a optimalizace separačního systému

Na základě chemismu reakce při výrobě pigmentu P.Y. 139 (viz kapitola 1.8.3) byly vytipovány nečistoty, které se v pigmentu mohou nacházet. Jedná se o kyselinu barbiturovou, kyselinu ftalovou, ftalimid a ftalodinitril. Předběžnou analýzou extraktu vzorku pigmentu P.Y. 139 (extrakce směsí AcN:MeOH 1:3) byly některé vytipované vedlejší látky potvrzeny.

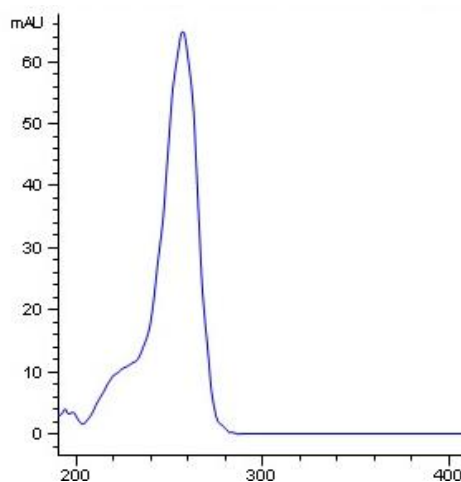
K analýze byly zpočátku použity kolony s nepolární stacionární fází typu C18. Při analýze na koloně Inertsil ODS – 3V a na koloně Kinetex C18 100A nedošlo k separaci předpokládaných nečistot. Látky kyselé povahy (např. kyselina barbiturová) se na uvedených kolonách nezadržovala a k její eluci docházelo v mrtvém objemu kolony. Ani zvýšením obsahu vody nebo acetonitrilu v mobilní fázi na 80 % a okyselením pufrům octanem amonným, nedošlo ke vzrůstu retence polárních látek. Další diskuze a ukázky analýzy extraktu pigmentu na těchto kolonách jsou v kapitole 3.4.1.

Na základě neuspokojivých výsledků separací na kolonách s vysoce nepolární stacionární fází byla k analýzám použita silikagelová kolona se zakotvenou stacionární fází s kratším uhlíkovým řetězcem a tedy s vyšší polaritou. Konkrétně byla použita kolona ACE C4 a mobilní fáze okyselená kyselinou fosforečnou (kapitola 2.3) pro potlačení disociace kyselých látek. Při analýze extraktu pigmentu na této koloně bylo zjištěno, že pík v retenčním čase 3,3 min je deformovaný. Ze záznamu chromatogramu při vlnové délce 320 nm se potvrdila domněnka, že v této oblasti se elují dvě látky – kyselina barbiturová a dosud neznámá nečistota (obr. č. 21). S využitím detektoru s diodovým polem lze snímat UV/VIS spektra eluátu v reálném čase. Došlo k zaznamenání spekter obou částí deformovaného píku (vzestupná a sestupná část) z nichž bylo potvrzeno, že jako první se ve směsné zóně eluuje kyselina barbiturová (změřené UV spektrum je na obr. č. 22) následovaná neznámou nečistotou s odlišným UV spektrem s absorpčním maximem okolo 320 nm (obr. č. 23).

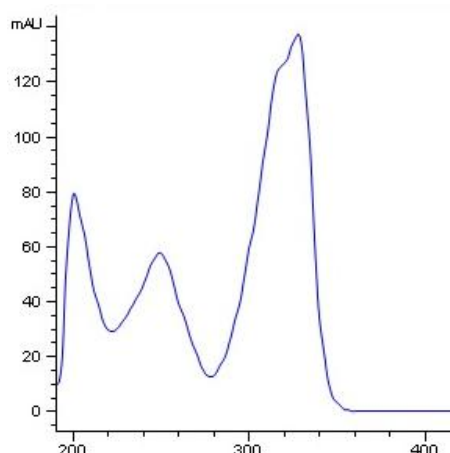


Obr. č. 21: Směsný pík kyseliny barbiturové a neznámé nečistoty

Kolona ACE C4100A, rozměry: 150 x 4,6 mm, velikost částic: 3 μm , mobilní fáze: A: AcN:MeOH (1:3), B: voda + 0,1 % (v/v) H_3PO_4 , poměr mobilních fází: A:B = 40 %:60 %, průtok: 0,6 ml/min, teplota kolony: 18 $^\circ\text{C}$, dávkovaný objem: 5 μl , doba analýzy: 10 minut, detekce: UV; 254 nm.

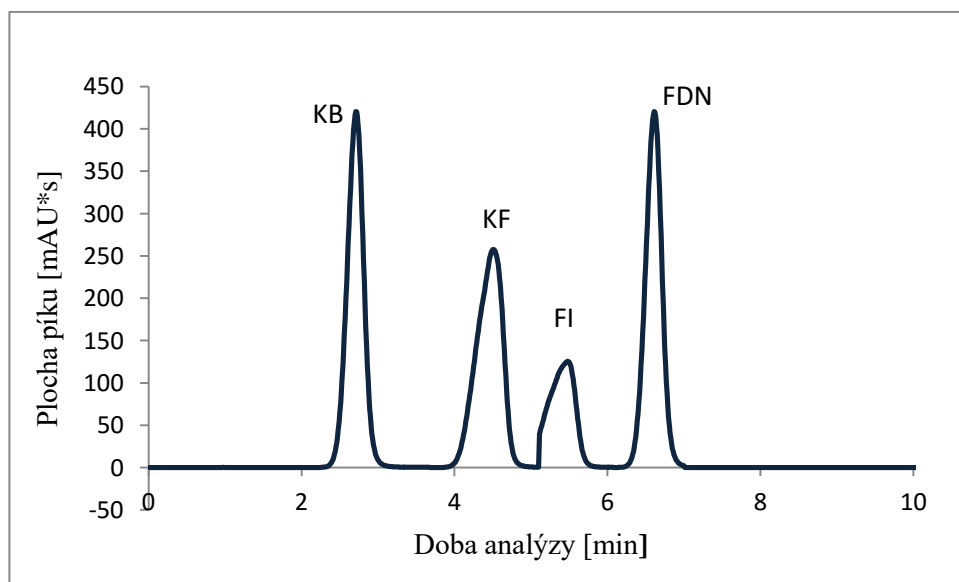


Obr. č. 22: UV spektrum kyseliny barbiturové



Obr. č. 23: UV spektrum neznámé látky

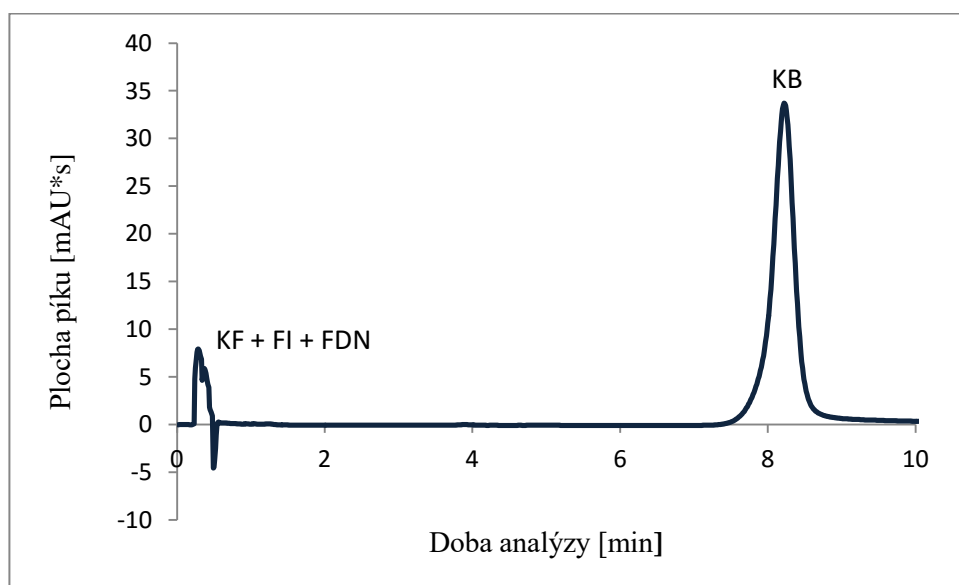
Na této koloně také došlo k rozdělení i ostatních potenciálních nečistot. Chromatogram směsi standardů nečistot (kyselina barbiturová, kyselina ftalová, ftalimid a ftalodinitril) analyzovaných na této koloně je uvedený na obr. č. 24. Z provedených analýz na koloně ACE C4 koloně vyplývá, že tato kolona je vhodná pro separaci všech potenciálních nečistot s výjimkou dosud neznámé nečistoty koelující s kyselinou barbiturovou.



Obr. č. 24: Analýza směsi standardů na koloně ACE C4 100A

Kolona ACE C4100A, rozměry: 150 x 4,6 mm, velikost částic: 3 μm , mobilní fáze: A: AcN:MeOH (1:3), B: voda + 0,1 % (v/v) H_3PO_4 , poměr mobilních fází: A:B = 40 %:60 %, průtok: 0,6 ml/min, teplota kolony: 18 $^\circ\text{C}$, dávkovaný objem: 5 μl , doba analýzy: 10 minut, detekce: UV; 254 nm.

Na základě shodného retenčního chování neznámé nečistoty a kyseliny barbiturové na kolonách s nepolární stacionární fází (úplná koeluce na C18 kolonách, částečná koeluce na koloně C4) bylo předpokládáno, že neznámá nečistota bude podobně polární jako kyselina barbiturová. Proto k separaci těchto dvou látek byl vybrán separační systém na bázi chromatografie hydrofilních interakcí na polárních stacionárních fázích, tento separační mechanismu je vhodný právě pro separaci látek s vysokou polaritou. K analýzám byla použita kolona Hypersil HILIC GOLD s navázanými polyethyleniminovými skupinami. Jako mobilní fáze byla použita směs vody s mravenčanem amonným okyseleným kyselinou mravenčí na pH = 5 a acetonitrilu. Na této koloně mají podle předpokladu malou retenci látky nepolárního charakteru (ftalodinitril, ftalimid a kyselina ftalová), zatímco kyselina barbiturová je zadržována silněji (obr. č. 25). Zároveň došlo k rozdělení kyseliny barbiturové a neznámé nečistoty vyextrahované z pigmentu.



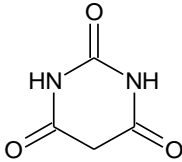
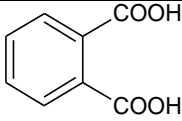
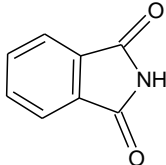
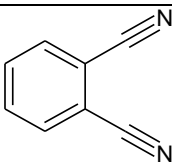
Obr. č. 25: Analýza standardů na koloně Hypersil HILIC GOLD

Kolona: Hypersil HILIC GOLD, rozměry: 150 x 3 mm, velikost částic: 3 μm , mobilní fáze: A: acetonitril, B: 50 mM mravenčan amonný, pH = 5, poměr mobilních fází: A:B = 70%:30 %, průtok: 1 ml/min, teplota kolony: 35 °C, dávkovaný objem: 5 μl , doba analýzy: 12 minut, detekce: UV; 254 nm.

Na základě získaných výsledků byly pro kompletní analýzy potenciálních nečistot v pigmentu P.Y. 139 vybrány dva separační systémy: systém RP – HPLC s kolonou C4 pro analýzu kyseliny ftalové, ftalimidu a ftalodinitrilu a systém HILIC pro analýzu kyseliny

barbiturové a dosud neznámé látky. Přehled retenčního chování potenciálních nečistot v pigmentu je uvedeno v tabulce č. 3.

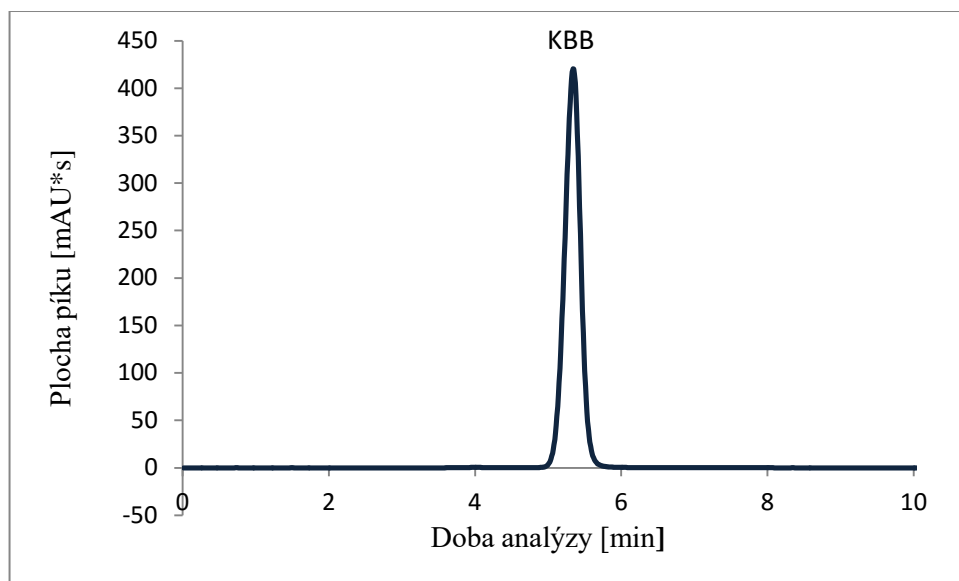
Tabulka č. 3: Možné nečistoty v pigmentu

| Látka | Struktura | Retenční čas [min] | |
|----------------------|---|---------------------|-----------|
| | | Kolona HILIC GOLD | Kolona C4 |
| Neznámá látka | | 5,7 | 3,3 |
| Kyselina barbiturová |  | 8,6 | 3,3 |
| Kyselina ftalová |  | 0,5 | 4,5 |
| Ftalimid |  | 0,5 | 5,2 |
| Ftalodinitril |  | 0,5 | 6,4 |

3.2 Izolace a identifikace neznámé nečistoty

Pro identifikaci neznámé nečistoty pomocí spektrálních technik bylo nejdříve nutné izolovat cílovou nečistotu z pigmentu v dostatečném množství. K tomuto kroku byl využit vzorek pigmentu, který podle analýz extraktů obsahoval pouze dosud neznámou nečistotu. Pro tento účel byl standardním postupem uvedeným v experimentální části připraven vzorek pigmentu s navázkou cca 30 g. Extrakt byl odpařen na rotační odparce k suchu. Čistota získané látky byla ověřena na HPLC (obr. č. 26). Pro MS analýzu byl použit extrakt převedením do minimálního objemu směsi AcN:MeOH 1:3. Pro NMR analýzu byla část

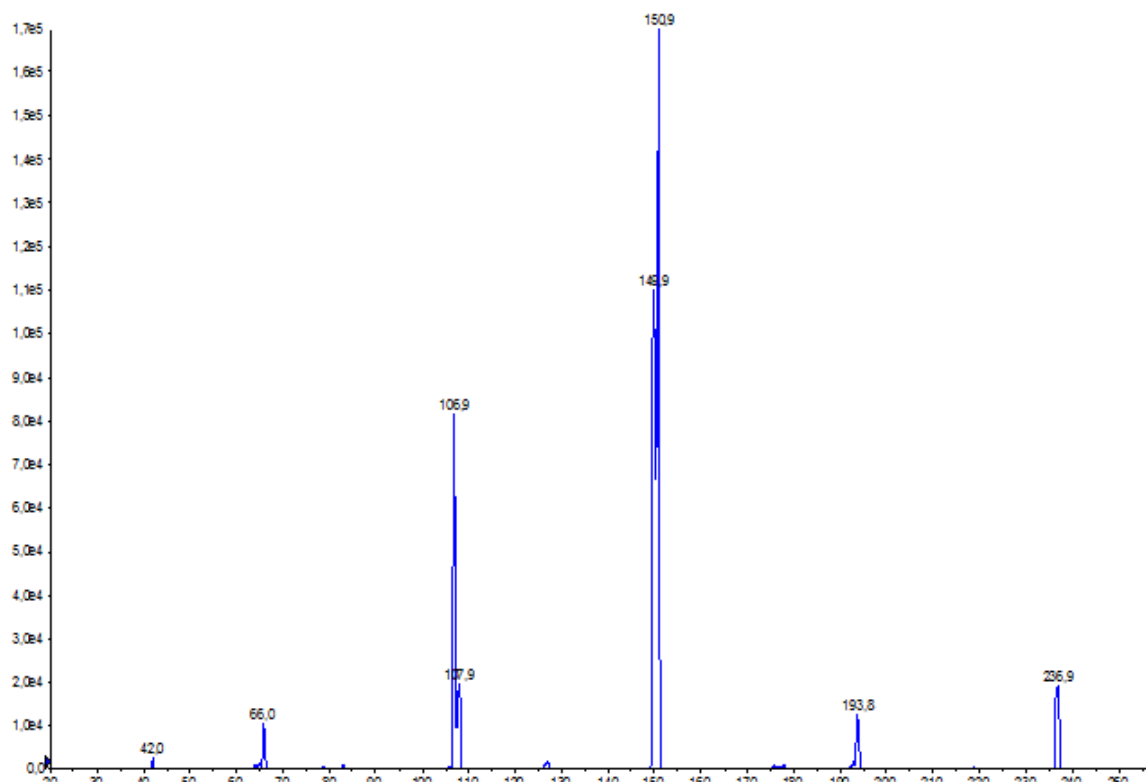
extraktu odpařena k suchu a odparek byl rozpuštěn v rozpouštědle vhodném pro NMR (deuterovaný dimethylsulfoxid).



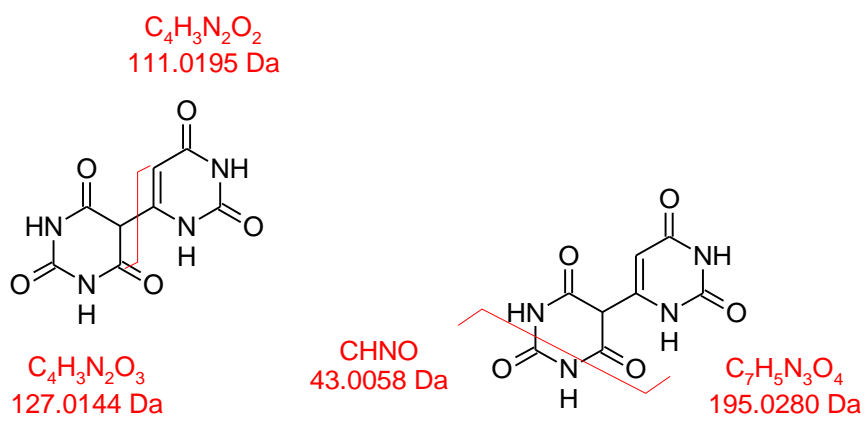
Obr. č. 26: Analýza standardu kyseliny bibarbiturové na koloně Hypersil HILIC GOLD
Kolona: Hypersil HILIC GOLD, rozměry: 150 x 3 mm, velikost částic: 3 μm , mobilní fáze: A: acetonitril, B: 50 mM mravenčan amonný, pH = 5, poměr mobilních fází: A:B = 70 %:30 %, průtok: 1 ml/min, teplota kolony: 35 $^{\circ}\text{C}$, dávkovaný objem: 5 μl , doba analýzy: 12 minut, detekce: UV; 254 nm.

3.2.1 MS experiment

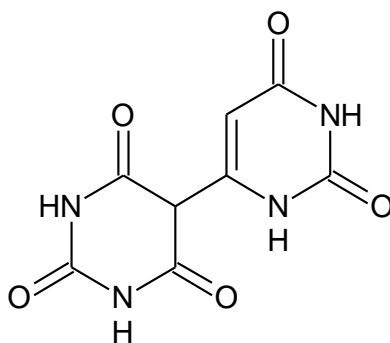
K identifikaci látky pomocí hmotnostní spektrometrie byl využit hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem umožňující analýzu fragmentačních iontů z vybraného matečného iontu. Na základě předpokládané struktury neznámé nečistoty a vzhledem k tomu, že v jednoduchém MS spektru byl nejintenzivnější ion s $m/z = 237$ ($[\text{M} - \text{H}]^-$), byl tento ion podroben v následujícím MS/MS kroku fragmentaci v kolizní cele za podmínek uvedených v experimentální části. Výsledné fragmentační spektrum je uvedeno na obr. č. 28. Analýzou získaného MS/MS spektra byla jako původní látka navržena struktura vzniklá kondenzací dvou molekul kyseliny barbiturové, dále označovaná jako kyselina bibarbiturová (obr. č. 29). Identifikace možných fragmentových iontů v MS/MS spektru je na obr. č. 27. Identifikace neznámé látky jako kyseliny bibarbiturové dobře koreluje i s jejím chromatografickým chováním.



Obr. č. 27: MS spektrum neznámé látky



Obr. č. 28: Fragmentované ionty v MS/MS spektru

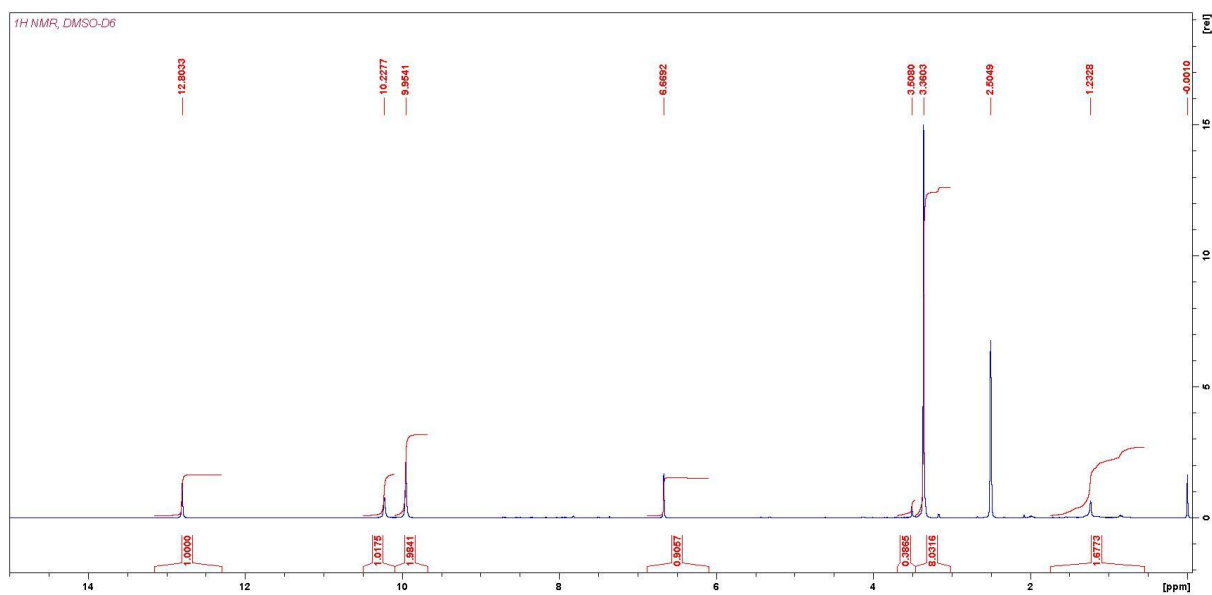


Obr. č. 29: Kyselina bibarbiturová

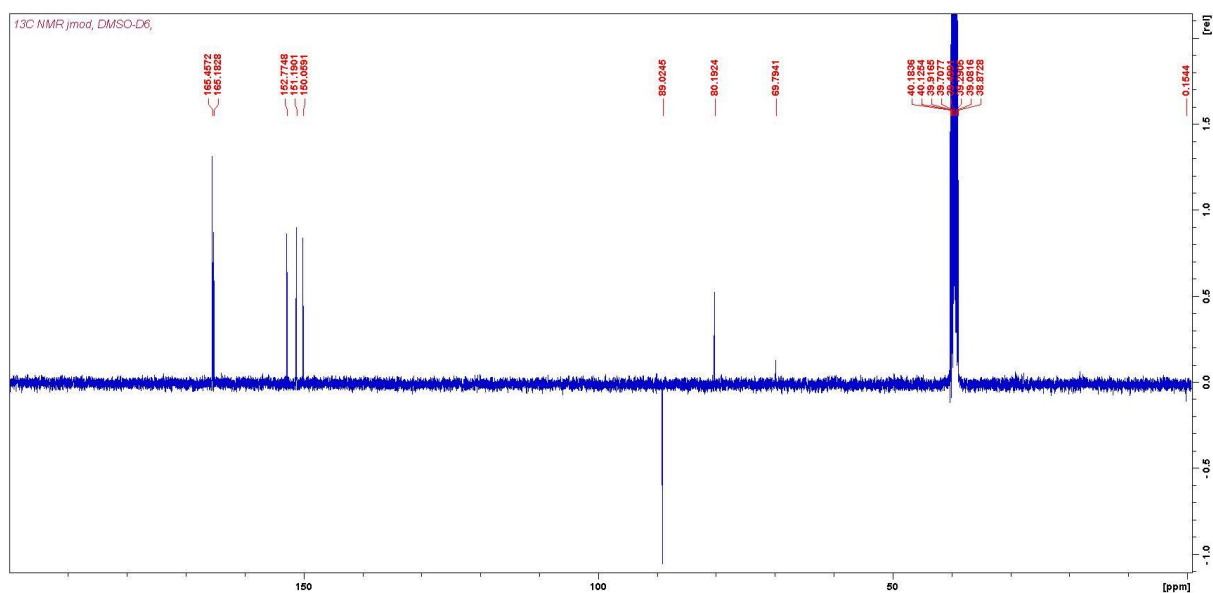
Název dle IUPAC: [4,5'-bipyrimidin]-2,2',4',6,6'-(1H,1'H,3H,3'H,5'H)-penton

3.2.2 NMR

Identifikace kyseliny bibarbiturové jako neznámé nečistoty byla potvrzena její NMR analýzou. Výsledky měření ^1H a ^{13}C NMR spekter vzorku izolované neznámé nečistoty rozpuštěného v deuterovaném dimethylsulfoxidu jsou na obr. č. 30 a 31.



Obr. č. 30: ^1H NMR spektrum neznámé látky

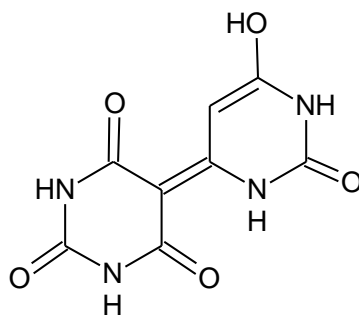


Obr. č. 31: ^{13}C NMR spektrum neznámé látky

^1H a ^{13}C NMR spektra látky Nečistoty P.Y. 139 byla změřena na přístroji Bruker AVANCE III HD 400 při 400,13 resp. 100,62 MHz a při laboratorní teplotě. Vzorek byl rozpuštěn v hexadeuteriodimethylsulfoxidu a byla provedena měření spekter standardním způsobem. ^1H a ^{13}C chemické posuny byly vztaženy vůči centrálnímu signálu rozpouštědla ($\delta = 2,50$ resp. 39,5).

V ^1H NMR spektru Nečistoty P.Y. 139 se vyskytují čtyři typy signálů vodíků ($\delta = 12,80(1\text{H})$, $10,23(1\text{H})$, $9,95(2\text{H})$, a $6,67(1\text{H}, \text{skupina CH})$. V ^{13}C NMR spektru nečistoty P.Y. 139 jsou signály při 165,5 (2C), 165,2, 152,8, 151,2, 150,6, 80,2 (všechny kvarterní) a 89,8 (CH).

Po vyhodnocení NMR dat byla navržena následující struktura nečistoty P.Y. 139. Stimulací ^1H a ^{13}C NMR spekter byly získány výsledky, které podporují navrženou strukturu při respektování uvedené tautomerní formy (obr. č. 32). V NMR spektru nebyl pozorován jeden signál kyselého vodíku (OH), což lze vysvětlit výměnou s vodou z rozpouštědla.



Obr. č. 32: Tautomerní forma kyseliny bibarbiturové z měření NMR
 Název dle IUPAC: 5-(6-hydroxy-2-oxo-2,3-dihydropyrimidin-4(1*H*)-yliden)pyrimidin-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-trion

3.3 Kalibrační měření

Na základě předběžných analýz extraktů pigmentů bylo zjištěno, že ftalodinitril a ftalimid se v analyzovaných vzorcích nenacházejí, tudíž nebyly do kalibračních měření zahrnuty. Podle postupu uvedeného v experimentální části byly připraveny sady kalibračních roztoků kyseliny barbiturové, kyseliny bibarbiturové a kyseliny ftalové v koncentračních rozsazích pokrývajících jejich předpokládaný obsah v analyzovaných vzorcích. Z chromatogramů získaných při opakovaných analýzách roztoků standardů byly vytvořeny kalibrační závislosti ploch píků na koncentracích a tyto závislosti byly proloženy regresní přímkou. Regresní závislosti spolu s příslušnými korelačními koeficienty jsou uvedeny na obr. č. 33, 34 a 35. Kalibrační závislost je dostatečně lineární. Ze záznamů chromatogramů byly dále určeny meze detekce (jako trojnásobek směrodatné odchylky šumu nulové linie záznamu) a meze kvantifikace (jako desetinásobek směrodatné odchylky šumu nulové linie záznamu). Kalibrační data jsou uvedena v příloze v tabulkách č. 12, 13 a 14.

$LOD_{KB} = 0,010 \text{ mg/l}$, tomu odpovídá 0,2 mg/kg pigmentu

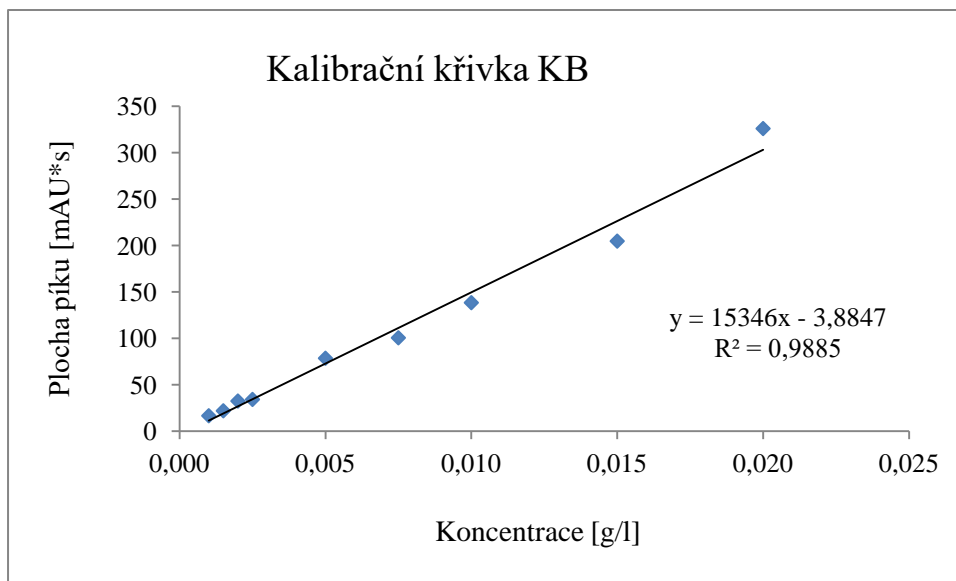
$LOQ_{KB} = 0,033 \text{ mg/l}$, tomu odpovídá 0,66 mg/kg pigmentu

$LOD_{KBB} = 0,012 \text{ mg/l}$, tomu odpovídá 0,24 mg/kg pigmentu

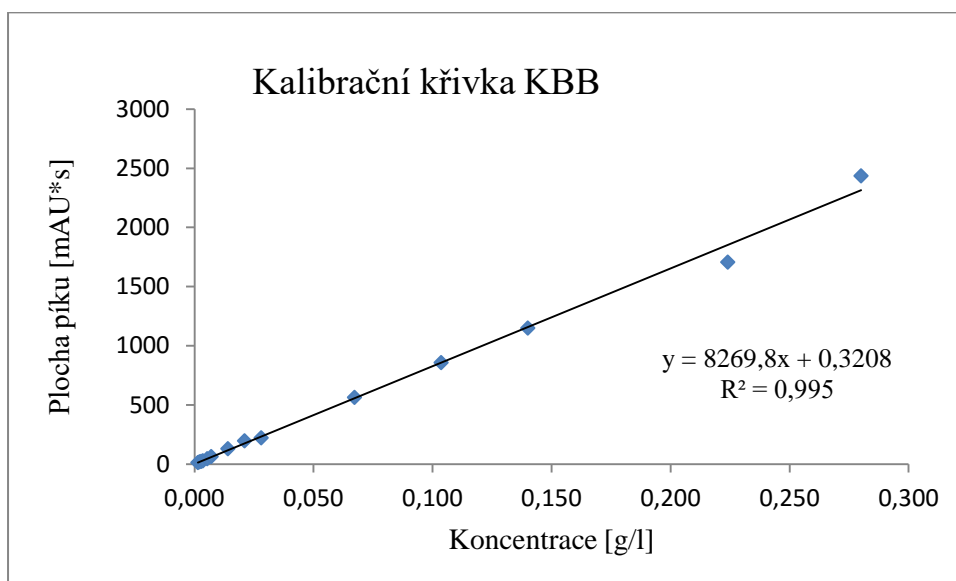
$LOQ_{KBB} = 0,041 \text{ mg/l}$, tomu odpovídá 0,80 mg/kg pigmentu

$LOD_{KF} = 0,066 \text{ mg/l}$, tomu odpovídá 1,32 mg/kg pigmentu

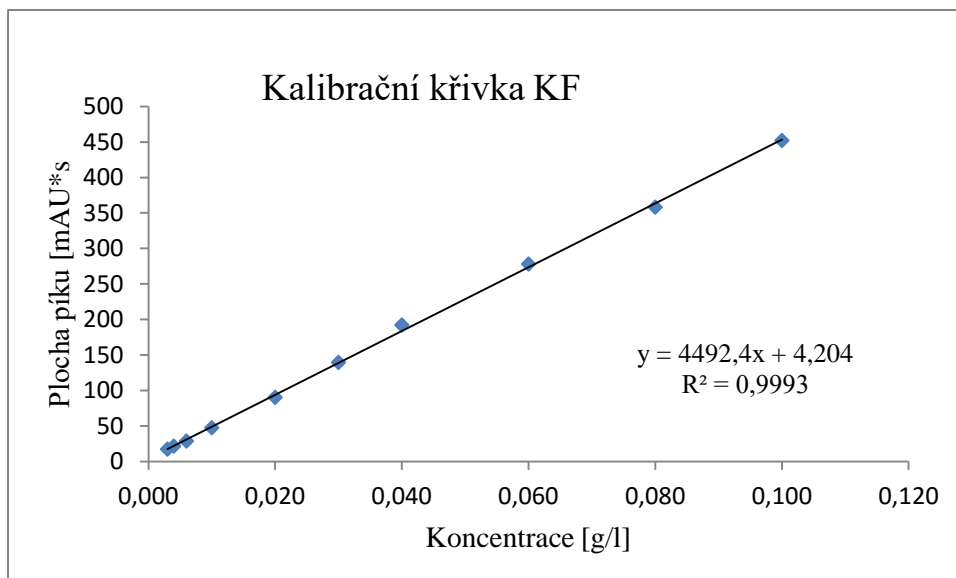
$LOQ_{KF} = 0,220 \text{ mg/l}$, tomu odpovídá 4,39 mg/kg pigmentu



Obr. č. 33: Kalibrační závislost plochy píků na koncentraci kyseliny barbiturové



Obr. č. 34: Kalibrační závislost plochy píků na koncentraci kyseliny bibarbiturové



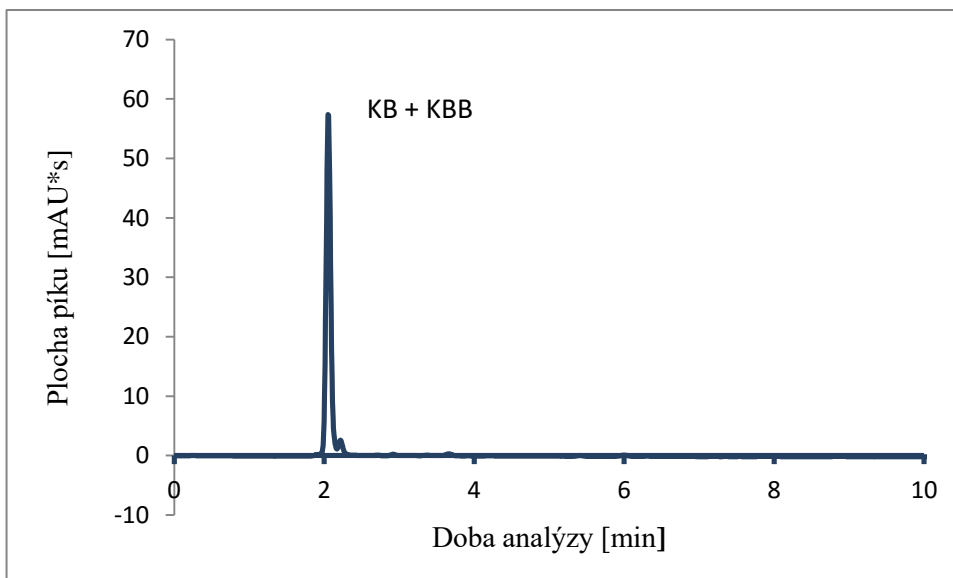
Obr. č. 35: Kalibrační závislost plochy píků na koncentraci kyseliny ftalové

3.4 Analýza reálných vzorků

3.4.1 Výběr optimální kolony pro analýzy extraktů

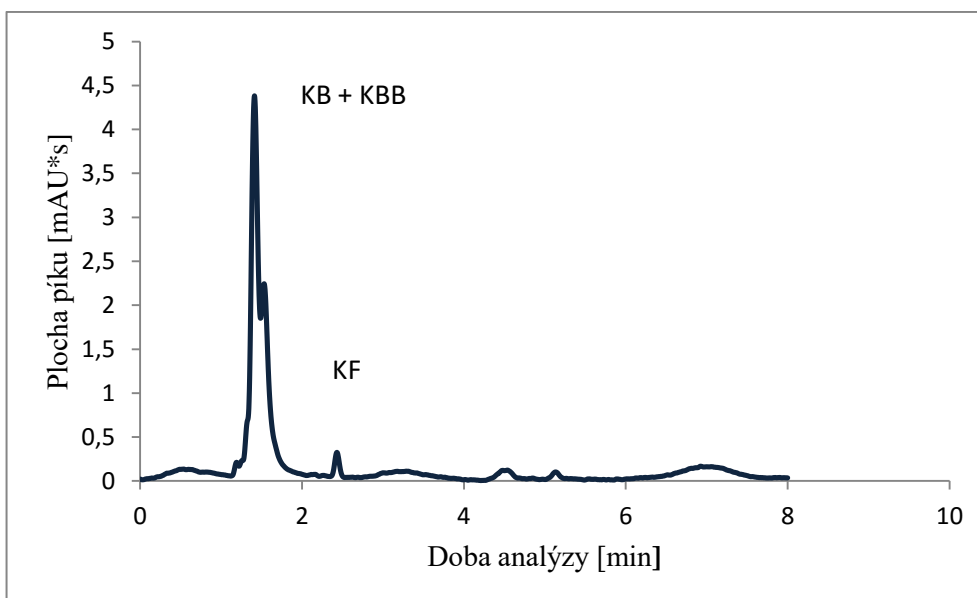
Stejně jako v případě počátečních analýz standardů potenciálních nečistot byly k analýzám extraktů pigmentů použity kolony s nepolární stacionární fází Inertsil ODS – 3V a Kinetex C18 100A. Pigmenty byly extrahovány postupem uvedeným v experimentální části do směsi acetonitril:methanol (1:3). Na těchto kolonách nedocházelo k retenci silně kyselých látek (kyselina barbiturová a bibarbiturová) viz obr. č. 36 a obr. č. 37. Na koloně Kinetex C18 je náznak separace kyseliny barbiturové a bibarbiturové, zatímco na koloně Inertsil ODS – 3V jsou všechny látky prakticky nerozseparované. Z toho vyplývá nevhodnost těchto kolon se silně hydrofobní stacionární fází k analýzám extraktů z pigmentů.

Pro další analýzy byla proto ve shodě s analýzami standardů nečistot použita méně hydrofobní kolona s kratšími uhlíkovými řetězci, kolona typu C4 (ACE C4) a kolona Hypersil HILIC GOLD. Kolona C4 je vhodná pro analýzu nepolárních látek, HILIC kolona je vhodná pro analýzu polárních látek v extraktech.



Obr. č. 36: Analýza extraktů vzorku B

Kolona: Inertsil ODS – 3V, rozměry: 250 x 4,6 mm, velikost částic: 5 μ m, mobilní fáze: A: acetonitril, B: 10 mM octan amonný, poměr mobilních fází: A:B = 40 %:60 %, průtok: 1 ml/min, teplota kolony: 30 °C, dávkovaný objem: 5 μ l, doba analýzy: 10 minut, detekce: UV; 254 nm.



Obr. č. 37: Analýza extraktů vzorku B

Kolona: Kinetex C18 100A, rozměry: 150 x 4,6 mm, velikost částic: 5 μ m, mobilní fáze: A: acetonitril, B: 10 mM octan amonný, poměr mobilních fází: A:B = 40 %:60 %, průtok: 1 ml/min, teplota kolony: 30 °C, dávkovaný objem: 5 μ l, doba analýzy: 10 minut, detekce: UV; 254 nm.

3.4.2 Výběr vhodného rozpouštědla pro extrakci nečistot z pigmentu

Výběr vhodného extrakčního rozpouštědla má klíčový význam pro úspěšnou extrakci nečistot z analyzovaného pigmentu. Rozpouštědlo by nemělo reagovat se stanovovanými nečistotami a mělo by mít dobrou solvatační schopnost k uvolňování extrahovaných látek z pevné formy pigmentu. Pro extrakci nečistot ze vzorků pigmentu byla testována následující rozpouštědla, případně jejich směsi: tetrahydrofuran, acetonitril, směs acetonitril:methanol (1:3), dimethylformamid, dimethylsulfoxid a dimethylacetamid.

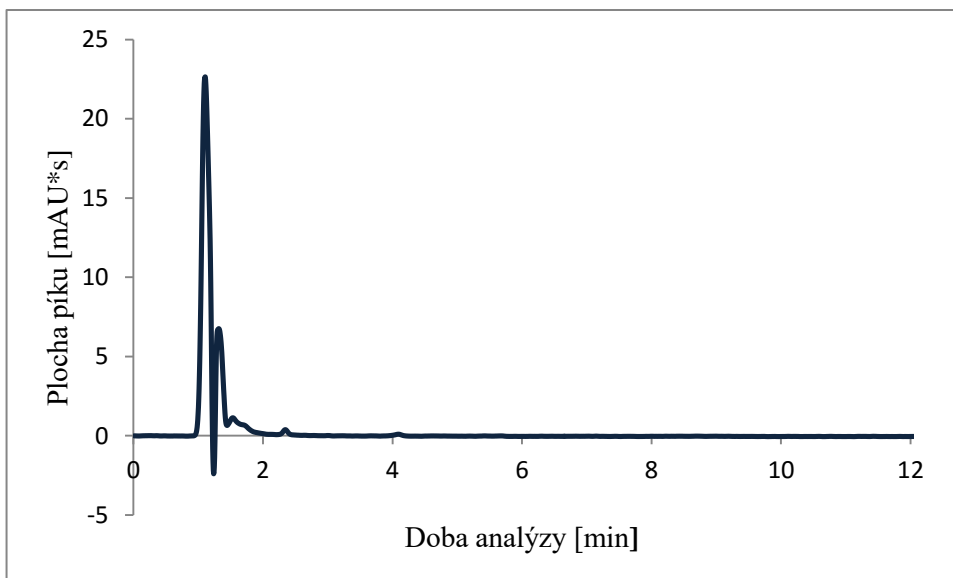
Extrakce probíhala postupem uvedeným v kapitole 2.7. Získaný extrakt byl následně analyzován kapalinovou chromatografií ve dvou shora uvedených separačních systémech, pro stanovení kyseliny ftalové, případně dalších méně polárních nečistot (kolona ACE C4) a pro stanovení kyseliny barbiturové a bibarbiturové vedle sebe (kolona Hypersil HILIC GOLD). Ve všech případech byl k extrakci použit vzorek pigmentu B, který obsahuje největší množství nečistot. Dále jsou uvedeny a stručně diskutovány výsledky extrakcí s jednotlivými rozpouštědly.

Extrakce tetrahydrofuranem

Po provedené extrakci a přefiltrování s použitím 0,2 µm stříkačkového filtru byl filtrát téměř bezbarvý. Na záznamu analýzy na koloně Hypersil HILIC GOLD nejsou viditelné žádné píky v očekávané oblasti eluce potenciálních nečistot (KBB 5,7 min.; KB 8,6 min, obr. č. 38). Pík v oblasti mrtvého objemu kolony neinterferuje s potenciálně stanovovanými nečistotami. Na záznamu analýzy extraktu na koloně C4 je vidět přítomnost deformovaného píku v oblasti potenciální eluce kyseliny ftalové (obr. č. 39).

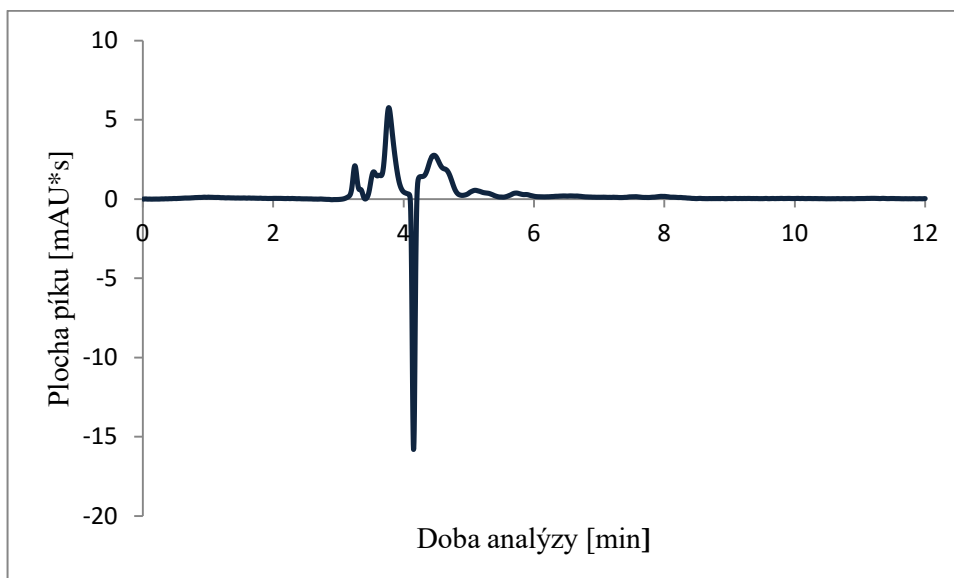
Extrakce acetonitrilem

Po provedené extrakci a přefiltrování s použitím 0,2 µm stříkačkového filtru byl filtrát téměř bezbarvý. Na záznamu analýzy na koloně Hypersil HILIC GOLD jsou viditelné píky v očekávané oblasti eluce potenciálních nečistot (KBB 5,7 min.; KB 8,6 min, obr. č. 40), avšak jejich velikost je malá a špatně vyhodnotitelná. Pík v oblasti mrtvého objemu kolony neinterferuje s potenciálně stanovovanými nečistotami. Na záznamu analýzy extraktu na koloně C4 je vidět přítomnost deformovaného píku (rozpouštědlo, systémový pík?) v oblasti potenciální eluce kyseliny ftalové ($t_r = 4,5$ min, obr. č. 41).



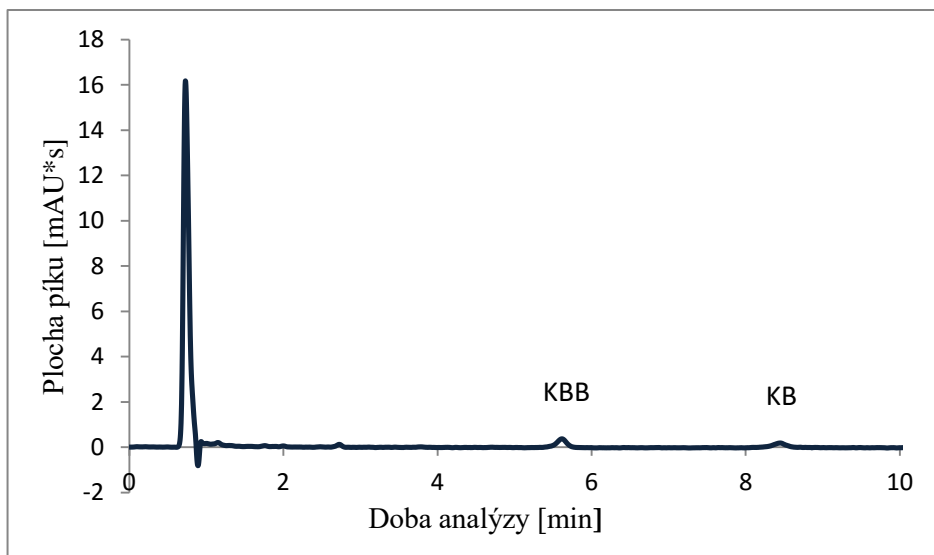
Obr. č. 38: Analýza extraktů vzorku B, rozpouštědlo: THF

Kolona: Hypersil HILIC GOLD, rozměry: 150 x 3 mm, velikost částic: 3 μm , mobilní fáze: A: acetonitril, B: 50 mM mravenčan amonný, pH = 5, poměr mobilních fází: A:B = 70 %:30 %, průtok: 1 ml/min, teplota kolony: 35 $^{\circ}\text{C}$, dávkovaný objem: 5 μl , doba analýzy: 12 minut, detekce: UV; 254 nm.



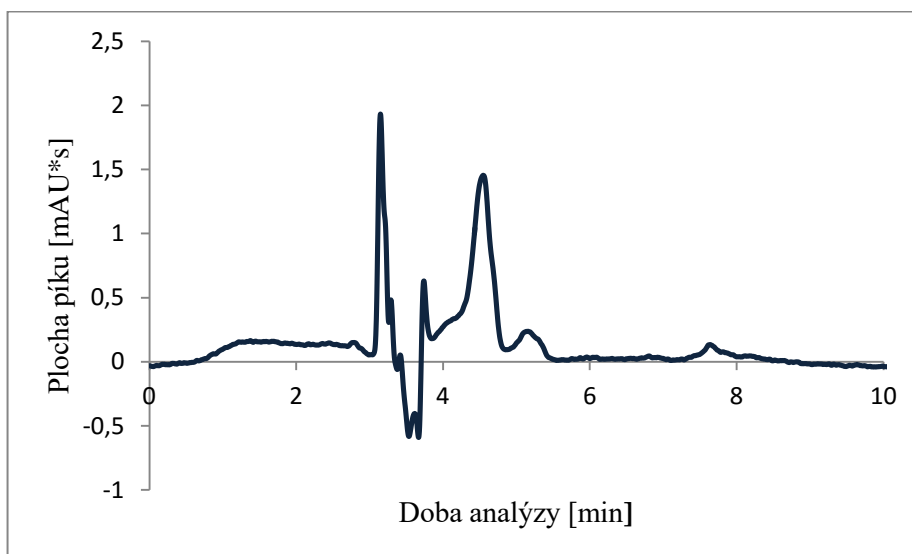
Obr. č. 39: Analýza extraktů vzorku B, rozpouštědlo: THF

Kolona ACE C4100A, rozměry: 150 x 4,6 mm, velikost částic: 3 μm , mobilní fáze: A: AcN:MeOH (1:3), B: voda + 0,1 % (v/v) H_3PO_4 , poměr mobilních fází: A:B = 40 %:60 %, průtok: 0,6 ml/min, teplota kolony: 18 $^{\circ}\text{C}$, dávkovaný objem: 5 μl , doba analýzy: 10 minut, detekce: UV; 254 nm.



Obr. č. 40: Analýza extraktů vzorku B, rozpouštědlo: acetonitril

Kolona: Hypersil HILIC GOLD, rozměry: 150 x 3 mm, velikost částic: 3 μm , mobilní fáze: A: acetonitril, B: 50 mM mravenčan amonný, pH = 5, poměr mobilních fází A:B = 70 %:30 %, průtok: 1 ml/min, teplota kolony: 35 °C, dávkovaný objem: 5 μl , doba analýzy: 12 minut, detekce: UV; 254 nm.



Obr. č. 41: Analýza vzorku B s rozpouštědlem acetonitril

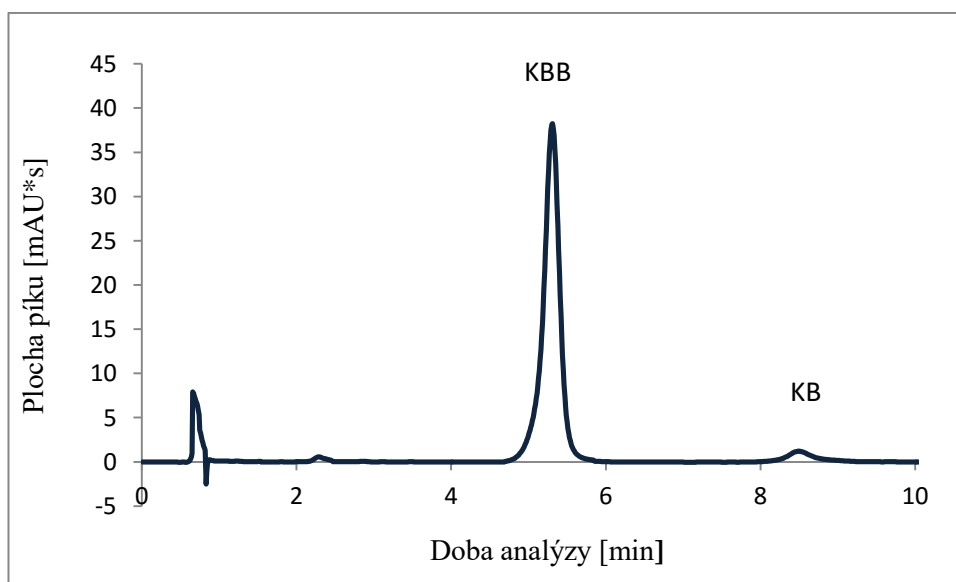
Kolona ACE C4100A, rozměry: 150 x 4,6 mm, velikost částic: 3 μm , mobilní fáze: A: AcN:MeOH (1:3), B: voda + 0,1 % (v/v) H_3PO_4 , poměr mobilních fází: A:B = 40 %:60 %, průtok: 0,6 ml/min, teplota kolony: 18 °C, dávkovaný objem: 5 μl , doba analýzy: 10 minut, detekce: UV; 254 nm.

Extrakce směsi acetonitril:methanol (1:3)

Po provedené extrakci a přefiltrování s použitím 0,2 µm stříkačkového filtru byl filtrát téměř bezbarvý. Na záznamu analýzy na koloně Hypersil HILIC GOLD je vidět minimální pík v oblasti mrtvého objemu kolony, velmi intenzivní pík kyseliny bibarbiturové a zároveň pík kyseliny barbiturové (obr. č. 42). Na záznamu analýzy extraktu na koloně C4 je dobře identifikovatelný pík kyseliny fталové (4,5 min), s nímž deformovaný směsný pík s dalšími vyextrahovanými nečistotami (KB, KBB) nijak neinterferuje (obr. č. 43).

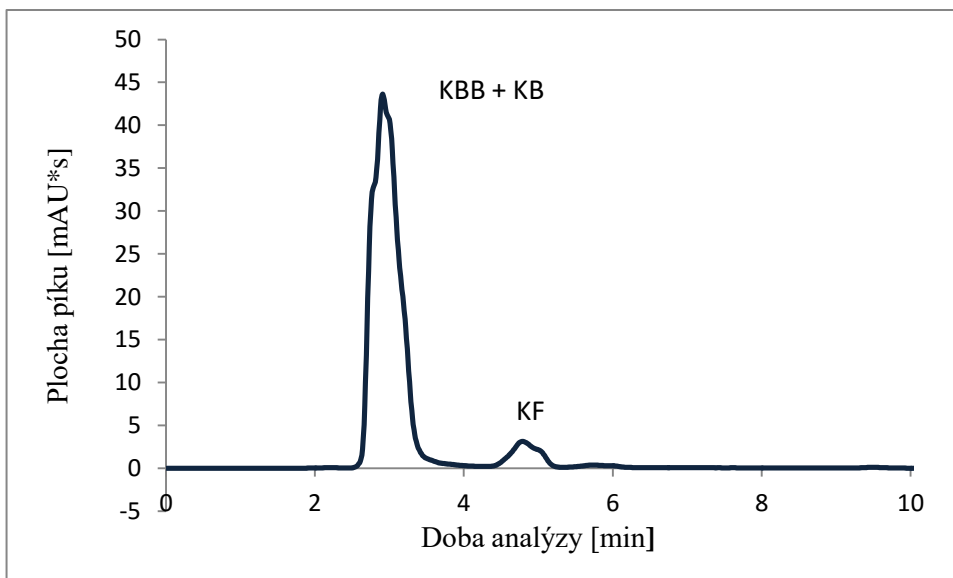
Extrakce dimethylformamidem

Po provedené extrakci a přefiltrování s použitím 0,2 µm stříkačkového filtru byl filtrát téměř bezbarvý. Na záznamu analýzy na koloně Hypersil HILIC GOLD je viditelný pouze pík kyseliny bibarbiturové s intenzitou srovnatelnou s extrakcí směsí AcN:MeOH. Nedošlo k vyextrahování kyseliny barbiturové (obr. č. 44). Pík v oblasti mrtvého objemu kolony neinterferuje se stanovovanými nečistotami. Na záznamu analýzy extraktu na koloně C4 je vidět přítomnost vysoce intenzivního deformovaného píku kyseliny barbiturové a kyseliny bibarbiturové a deformovaný pík kyseliny fталové ($t_r = 2,3 - 5,1$ min, obr. č. 45).



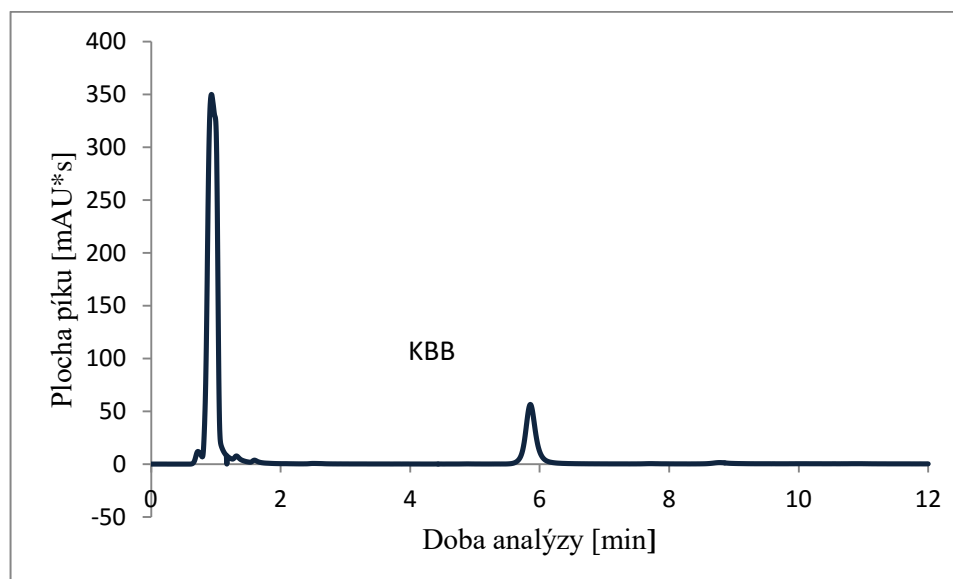
Obr. č. 42: Analýza extraktů vzorku B, rozpouštědlo: AcN : MeOH (1:3)

Kolona: Hypersil HILIC GOLD, rozměry: 150 x 3 mm, velikost částic: 3 µm, mobilní fáze: A: acetonitril, B: 50 mM mravenčan amonný, pH = 5, poměr mobilních fází: A:B = 70 %:30 %, průtok: 1 ml/min, teplota kolony: 35 °C, dávkovaný objem: 5 µl, doba analýzy: 12 minut, detekce: UV; 254 nm.



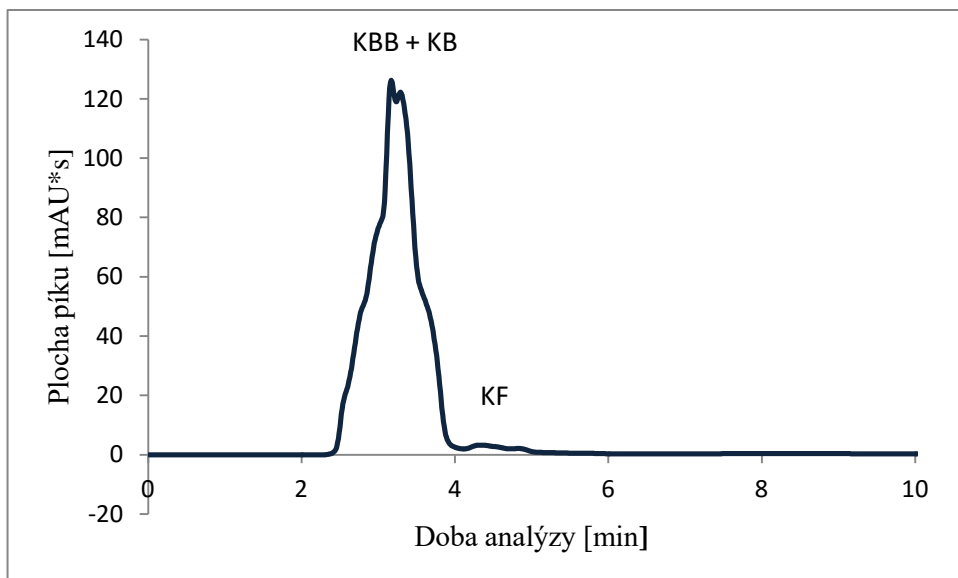
Obr. č. 43: Analýza extraktů vzorku B, rozpouštědlo: ACN : MeOH (1:3)

Kolona ACE C4100A, rozměry: 150 x 4,6 mm, velikost částic: 3 μ m, mobilní fáze: A: AcN:MeOH (1:3), B: voda + 0,1 % (v/v) H_3PO_4 , poměr mobilních fází: A:B = 40 %:60 %, průtok: 0,6 ml/min, teplota kolony: 18 $^{\circ}C$, dávkovaný objem: 5 μ l, doba analýzy: 10 minut, detekce: UV; 254 nm.



Obr. č. 44: Analýza extraktů vzorku B, rozpouštědlo: dimethylformamid

Kolona: Hypersil HILIC GOLD, rozměry: 150 x 3 mm, velikost částic: 3 μ m, mobilní fáze: A: acetonitril, B: 50 mM mravenčan amonný, pH = 5, poměr mobilních fází A:B = 70 %:30 %, průtok: 1 ml/min, teplota kolony: 35 $^{\circ}C$, dávkovaný objem: 5 μ l, doba analýzy: 12 minut, detekce: UV; 254 nm.



Obr. č. 45: Analýza extraktů vzorku B, rozpouštědlo: dimethylformamid

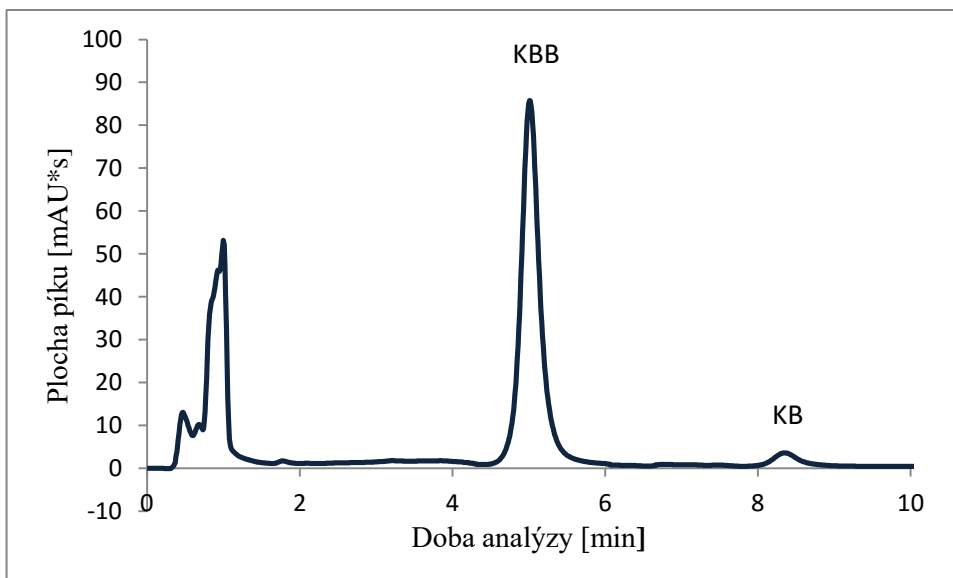
Kolona ACE C4100A, rozměry: 150 x 4,6 mm, velikost částic: 3 μm , mobilní fáze: A: AcN:MeOH (1:3), B: voda + 0,1 % (v/v) H_3PO_4 , poměr mobilních fází: A:B = 40 %:60 %, průtok: 0,6 ml/min, teplota kolony: 18 $^\circ\text{C}$, dávkovaný objem: 5 μl , doba analýzy: 10 minut, detekce: UV; 254 nm.

Extrakce dimethylsulfoxidem

Po provedené extrakci a přefiltrování s použitím 0,2 μm stříkačkového filtru byl filtrát téměř bezbarvý. Na záznamu analýzy na koloně Hypersil HILIC GOLD je viditelný velice intenzivní pík kyseliny bibarbiturové a pík kyseliny barbiturové, který má největší intenzitu z dosud použitých extrakčních rozpouštědel (obr. č. 46). Pík v oblasti mrtvého objemu kolony neinterferuje s potenciálně stanovovanými nečistotami. Na záznamu analýzy extraktu na koloně C4 je vidět přítomnost vysoce intenzivního deformovaného píku kyseliny barbiturové a bibarbiturové a dále deformovaný pík kyseliny ftalové, avšak s menší intenzitou než při použití směsi AcN:MeOH k extrakci (obr. č. 47).

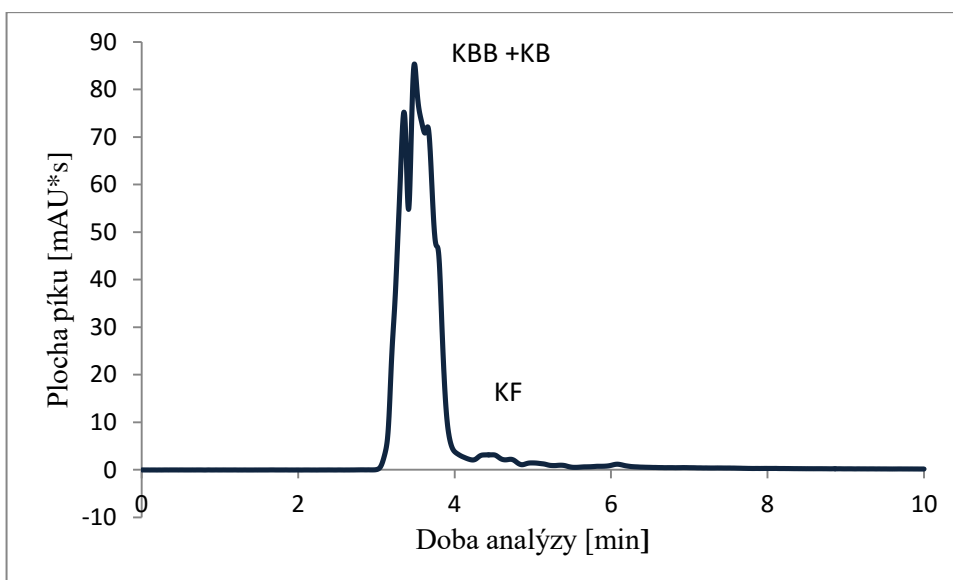
Extrakce dimethylacetamidem

Po provedené extrakci a přefiltrování s použitím 0,2 μm stříkačkového filtru byl filtrát téměř bezbarvý. Na záznamu analýzy na koloně Hypersil HILIC GOLD je viditelný pík kyseliny bibarbiturové s intenzitou srovnatelnou s extrakcí směsí dimethylformamidem a pík kyseliny barbiturové s nízkou intenzitou (obr. č. 48). Pík v oblasti mrtvého objemu kolony neinterferuje s potenciálně stanovovanými nečistotami. Na záznamu analýzy extraktu na koloně C4 je vidět přítomnost vysoce intenzivního deformovaného smíšeného píku kyseliny barbiturové, bibarbiturové a ftalové v oblasti potenciální eluce kyseliny ftalové ($t_r = 3 - 4,5$ min., obr. č. 49).



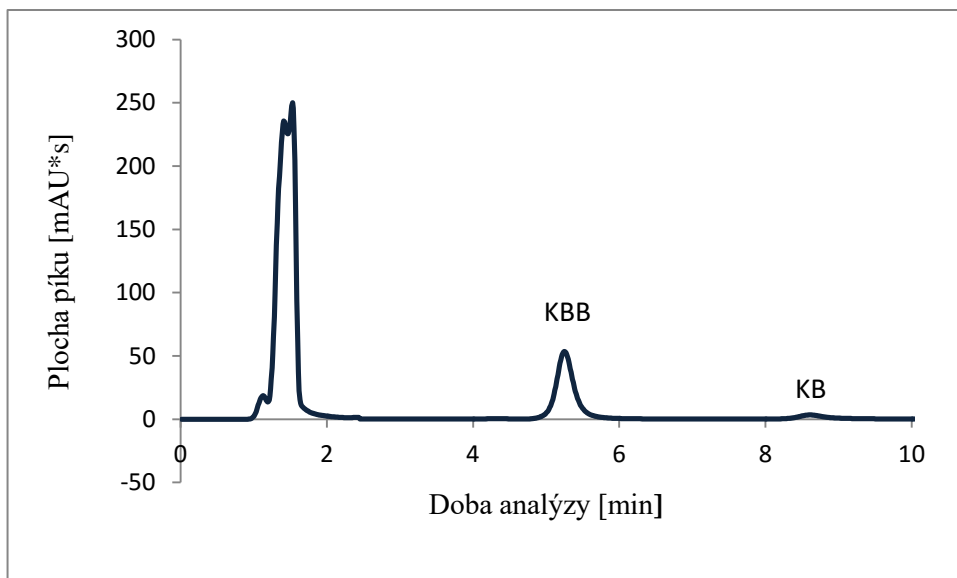
Obr. č. 46: Analýza extraktů vzorku B, rozpouštědlo: dimethylsulfoxid

Kolona: Hypersil HILIC GOLD, rozměry: 150 x 3 mm, velikost částic: 3 μ m, mobilní fáze: A: acetonitril, B: 50 mM mravenčan amonný, pH = 5, poměr mobilních fází A:B = 70 %:30 %, průtok: 1 ml/min, teplota kolony: 35 $^{\circ}$ C, dávkovaný objem: 5 μ l, doba analýzy: 12 minut, detekce: UV; 254 nm, 320 nm.



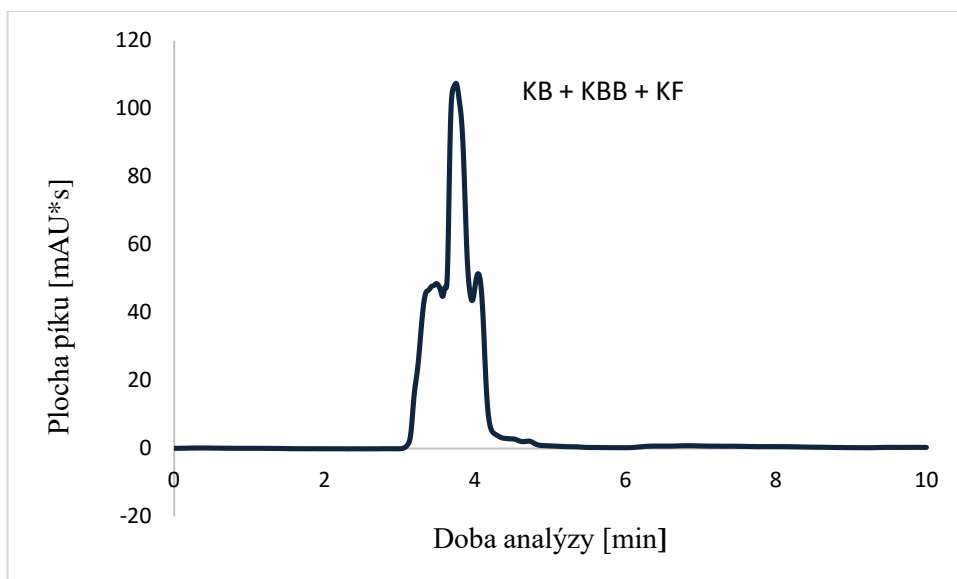
Obr. č. 47: Analýza extraktů vzorku B, rozpouštědlo: dimethylsulfoxid

Kolona ACE C4100A, rozměry: 150 x 4,6 mm, velikost částic: 3 μ m, mobilní fáze: A: AcN:MeOH (1:3), B: voda + 0,1 % (v/v) H_3PO_4 , poměr mobilních fází: A:B = 40 %:60 %, průtok: 0,6 ml/min, teplota kolony: 18 $^{\circ}$ C, dávkovaný objem: 5 μ l, doba analýzy: 10 minut, detekce: UV; 254 nm.



Obr. č. 48: Analýza extraktů vzorku B, rozpouštědlo: dimethylacetamid

Kolona: Hypersil HILIC GOLD, rozměry: 150 x 3 mm, velikost částic: 3 μ m, mobilní fáze: A: acetonitril, B: 50 mM mravenčan amonný, pH = 5, poměr mobilních fází A:B = 70 %:30 %, průtok: 1 ml/min, teplota kolony: 35 $^{\circ}$ C, dávkovaný objem: 5 μ l, doba analýzy: 12 minut, detekce: UV; 254 nm.



Obr. č. 49: Analýza extraktů vzorku B, rozpouštědlo: dimethylacetamid

Kolona ACE C4100A, rozměry: 150 x 4,6 mm, velikost částic: 3 μ m, mobilní fáze: A: AcN:MeOH (1:3), B: voda + 0,1 % (v/v) H_3PO_4 , poměr mobilních fází: A:B = 40 %:60 %, průtok: 0,6 ml/min, teplota kolony: 18 $^{\circ}$ C, dávkovaný objem: 5 μ l, doba analýzy: 10 minut, detekce: UV; 254 nm.

V následujících tabulkách č. 4 a 5 jsou porovnány výsledky extrakcí jednotlivými rozpouštědly u vzorku B, z nichž vyplývá, že žádné z testovaných extrakčních rozpouštědel není vhodné pro extrakci všech potenciálních nečistot současně. Pro analýzu kyseliny ftalové jako nečistoty v pigmentu byl zvolen postup s extrakcí směsí AcN:MeOH (1:3) a separací na koloně ACE C4. Pro analýzu kyseliny bibarbiturové a kyseliny barbiturové jako nečistot byl zvolen postup s extrakcí dimethylsulfoxidem a s následnou analýzou na koloně Hypersil HILIC GOLD.

Tabulka č. 4: Hmotnostní obsah nečistot ve vzorku B extrahovaném různými extrakčními činidly

| Vzorek B | Hmotnostní obsah [g/kg] | | | |
|----------|-------------------------|-------|--------|----|
| | Hypersil HILIC GOLD | | ACE C4 | |
| Extrakce | KBB | KB | KF | FI |
| DMSO | 2,483 | 0,073 | 0,059 | 0 |
| AcN:MeOH | 0,927 | 0,028 | 0,222 | 0 |
| DMAA | 1,561 | 0,083 | 0 | 0 |
| DMF | 1,641 | 0,031 | 0 | 0 |
| AcN | 0 | 0 | 0 | 0 |
| THF | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabulka č. 5: Porovnání jednotlivých extrakčních činidel, extrakce vzorku B

| Extrakční rozpouštědlo | Hypersil HILIC GOLD | | ACE C4 |
|------------------------|---------------------|-----------|-----------|
| | odezva KBB | odezva KB | odezva KF |
| THF | - | - | - |
| AcN | - | - | - |
| AcN:MeOH | + | + | ++ |
| DMF | ++ | - | + |
| DMSO | +++ | ++ | + |
| DMAA | ++ | ++ | + |

- žádná odezva
- + malá odezva
- ++ střední odezva
- +++ vysoká odezva

3.4.3 Vliv velikosti navážky pigmentu na účinnost extrakce nečistot

Dále byl zkoumán vliv velikosti navážky extrahovaného pigmentu na množství vyextrahovaných nečistot. Vzorek extraktů byl připraven standardním postupem, ovšem se čtyřmi různými navážkami: 0,25 g; 0,5 g; 0,75 g a 1 g všech tří analyzovaných pigmentů. Výsledky analýzy vzorku jsou uvedeny v následující tabulce č. 6.

Tabulka č. 6: Hmotnostní obsah vyextrahovaných nečistot ve vzorku B v závislosti na různé navážce

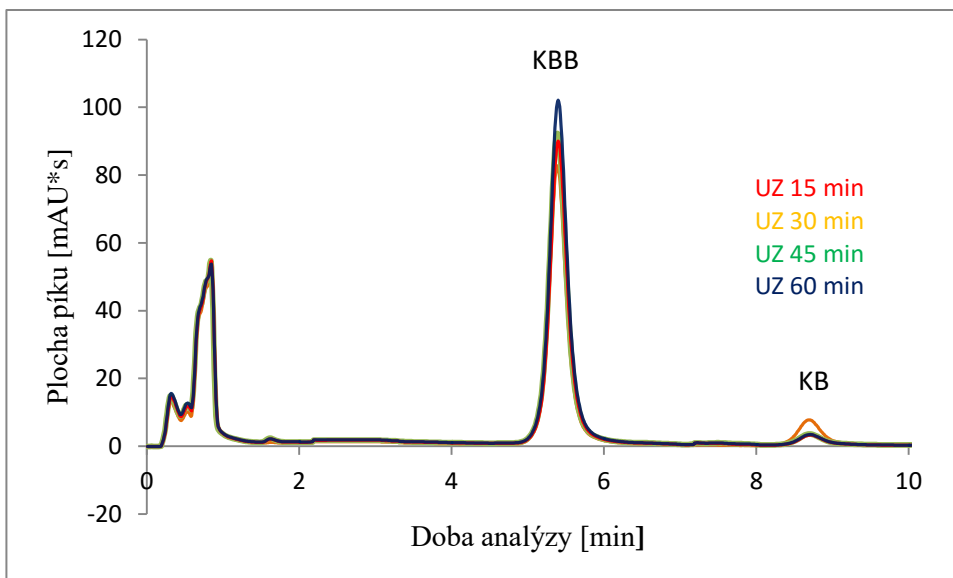
| vzorek B | Hmotnostní obsah nečistot v pigmentu [g/kg] | | | | |
|----------|---|-------|-------------|----|-----|
| | HILIC GOLD/DMSO | | C4/AcN:MeOH | | |
| Navážka | KBB | KB | KF | FI | FDN |
| 0,25 g | 2,326 | 0,067 | 0,202 | 0 | 0 |
| 0,5 g | 2,712 | 0,182 | 0,215 | 0 | 0 |
| 0,75 g | 2,556 | 0,123 | 0,228 | 0 | 0 |
| 1 g | 2,422 | 0,157 | 0,229 | 0 | 0 |

Z výsledků uvedených v tabulce vyplývá, že velikost navážky pigmentu nemá zásadní vliv na vyextrahované množství kyseliny bibarbiturové z pigmentů pomocí dimethylsulfoxidu a kyseliny ftalové pomocí směsi AcN:MeOH. V některých případech účinnost extrakce klesá s navážkou, což může být způsobeno např. omezenou solvatační schopností použitých rozpouštědel, minimální rozpustností pigmentu v rozpouštědlech a silnou vazbou některých nečistot do krystalové struktury pigmentu (vodíkové vazby, $\pi - \pi$ interakce). Proto pro další experimenty byla jako optimální vybrána navážka 0,5 g pigmentu.

3.4.4 Vliv různé doby extrakce v ultrazvukové lázni na účinnost extrakce

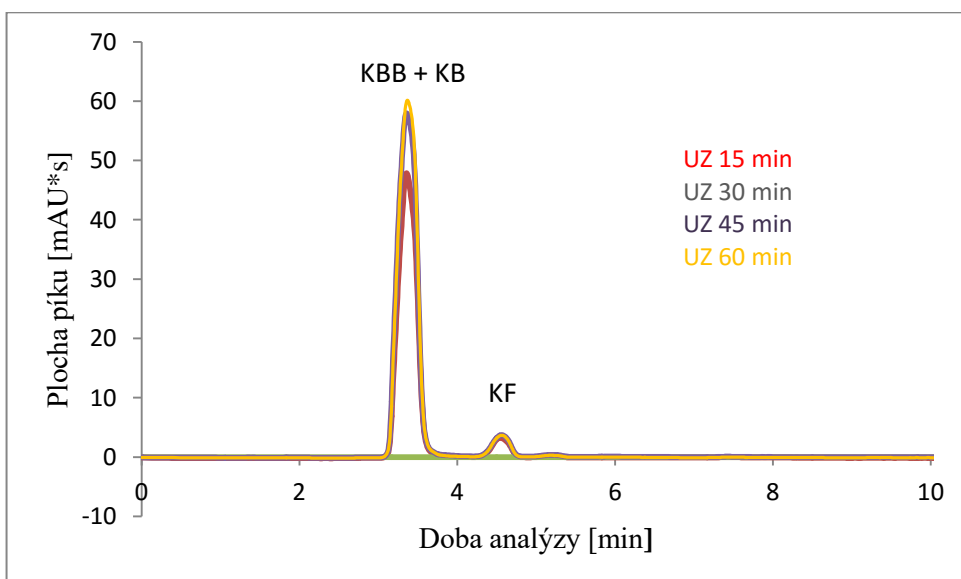
Vedle velikosti navážky je dalším důležitým parametrem ovlivňujícím výtěžek extrakce také doba trvání extrakčního procesu, případně jeho podpoření vhodnými podmínkami urychlujícími extrakční proces. Jako vysoce účinná metoda se osvědčila umístění extrahovaného vzorku do ultrazvukové lázně. Vlivem ultrazvukových vln dochází k rozpadu pevné struktury vzorku a zvyšuje se vzájemná interakce pigmentu s molekulami rozpouštědla.

Vzorek byl připraven standardním postupem s navážkou 0,5 g pigmentu, ovšem s různou dobou extrakce v ultrazvukové lázni: 15, 30, 45 a 60 minut. Ukázky analýz takto připravených extraktů vzorku pigmentu B na obou použitých kolonách jsou na obr. č. 50 a 51.



Obr. č. 50: Analýza extraktů vzorku B extrahovaného v ultrazvukové lázni po různou dobu

Kolona: Hypersil HILIC GOLD, rozměry: 150 x 3 mm, velikost částic: 3 μ m, mobilní fáze: A: acetonitril, B: 50 mM mravenčan amonný, pH = 5, poměr mobilních fází A:B = 70 %:30 %, průtok: 1 ml/min, teplota kolony: 35 $^{\circ}$ C, dávkovaný objem: 5 μ l, doba analýzy: 12 minut, detekce: UV; 254 nm, 320 nm.



Obr. č. 51: Analýza extraktů vzorku B extrahovaného v ultrazvukové lázni po různou dobu

Kolona ACE C4 100A, rozměry: 150 x 4,6 mm, velikost částic: 3 μ m, mobilní fáze: A: AcN:MeOH (1:3), B: voda + 0,1 % (v/v) H_3PO_4 , poměr mobilních fází A:B = 40 %:60 %, průtok: 0,6 ml/min, teplota kolony: 18 $^{\circ}$ C, dávkovaný objem: 5 μ l, doba analýzy: 10 minut, detekce: UV; 254 nm.

V tabulce č. 7 jsou uvedeny nalezené koncentrace nečistot pro různě dlouhou dobu extrakce. Trend závislosti výtěžku nečistot na době extrakce v ultrazvukové lázni není pro jednotlivé nečistoty stejný, proto byla jako kompromis vybrána doba extrakce 15 minut. Aby došlo ke kvantitativnímu vyextrahování všech potenciálních nečistot z analyzovaných pigmentů, byl pro úplnou extrakci zvolen postup s opakovanou extrakcí téhož vzorku čerstvým podílem čistého extrakčního rozpouštědla. Výsledky tohoto postupu jsou uvedeny v následující kapitole.

Tabulka č. 7: Hmotnostní obsah vyextrahovaných nečistot vzorku B v závislosti na různé době extrakce v ultrazvuku

| vzorek B | Množství nečistot v pigmentu [g/kg] | | | | |
|----------|-------------------------------------|-------|-----------------|----|-------|
| | Hypersil HILIC GOLD/DMSO | | ACE C4/AcN:MeOH | | |
| Doba UZ | KBB | KB | KF | FI | FTLDN |
| 15 min | 2,369 | 0,180 | 0,215 | 0 | 0 |
| 30 min | 2,625 | 0,076 | 0,216 | 0 | 0 |
| 45 min | 2,579 | 0,072 | 0,237 | 0 | 0 |
| 60 min | 2,905 | 0,073 | 0,241 | 0 | 0 |

3.4.5 Analýza pigmentů za optimalizovaných podmínek

Pigment P.Y. 139 je díky jeho vlastnostem (H – vazby, π – π interakce) takřka nerozpustný v řadě rozpouštědel. Tyto vlastnosti způsobují i obtížnou extrakci nečistot z jeho krystalových struktur. Na základě optimalizace jednotlivých kroků analýzy pigmentu byl navržen následující postup zpracování a analýzy pigmentu:

A: stanovení kyseliny bibarbiturové a kyseliny barbiturové

- navážit 0,5 g pigmentu do centrifugační zkumavky
- přidat dimethylsulfoxid do celkového objemu 10 ml
- extrahovat 15 min v ultrazvukové lázni
- 5 min centrifugace při 5000 ot/min
- HPLC analýza na koloně Hypersil HILIC GOLD

B: stanovení kyseliny ftalové a dalších případných nepolárních nečistot

- navážit 0,5 g pigmentu do centrifugační zkumavky
- přidat směs AcN:MeOH (1:3) do celkového objemu 10 ml
- extrahovat 15 min v ultrazvukové lázni
- 5 min centrifugace při 5000 ot/min

- HPLC analýza na koloně ACE C4

S použitím tohoto optimalizovaného postupu byla provedena analýza všech tří vzorků pigmentu P.Y. 139. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 8.

Tabulka č. 8: Vyextrahované množství nečistot ze vzorku A, B, C za optimálních podmínek

| 0,5 g/UZ 15 minut | Hmotnostní obsah nečistot v pigmentu [g/kg] | | | | |
|-------------------|---|-------|-----------------|----|-----|
| | Hypersil HILIC GOLD/DMSO | | ACE C4/AcN:MeOH | | |
| Vzorek | KBB | KB | KF | FI | FDN |
| A | 1,627 | 0,067 | 0,415 | 0 | 0 |
| B | 2,483 | 0,180 | 0,222 | 0 | 0 |
| C | 0,648 | 0,093 | 0 | 0 | 0 |

Při optimalizaci extrakční doby bylo zjištěno, že výtěžek extrakce kyseliny bibarbiturové a ftalové mírně stoupá s dobou extrakce v ultrazvukové lázni, proto byl u všech tří vzorků pigmentu ověřen vliv opakované extrakce téhož vzorku novým podílem čistého rozpouštědla. Vzorky pigmentu byly takto extrahovány šesti podíly čistého rozpouštědla. Výsledky těchto následných extrakcí jsou uvedeny v tabulkách č. 9, 10 a 11 a graficky znázorněny na obr. č. 52, 53 a 54. Z nich vyplývá, že zatímco pro kvantitativní extrakci kyseliny barbiturové a ftalové je dostačující extrakce pouze jedním podílem čistého rozpouštědla, v případě extrakce kyseliny bibarbiturové první podíl rozpouštědla vyextrahuje cca 70 – 80 % této nečistoty a pro kvantitativní výtěžek je nutné extrakci opakovat dvakrát až třikrát z důvodu její silné vazby do struktury pigmentu.

Tabulka č. 9: Vyextrahované množství nečistot vzorku A pomocí násobné extrakce

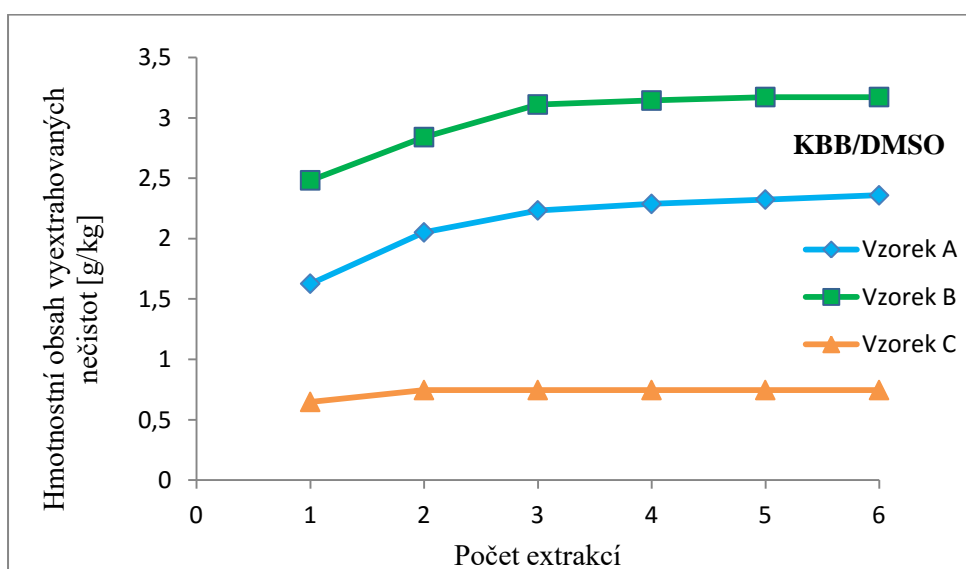
| Vzorek A | Hmotnostní obsah vyextrahovaných nečistot [g/kg] | | | | | | | |
|----------|--|---------|-------|---------|-----------------|---------|----|---------|
| | Hypersil HILIC GOLD/DMSO | | | | ACE C4/AcN:MeOH | | | |
| Extrakce | KBB | podíl % | KB | podíl % | KF | podíl % | FI | podíl % |
| 1. | 1,627 | 69,0 | 0,067 | 100 | 0,415 | 100 | 0 | 0 |
| 2. | 0,425 | 18,0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3. | 0,182 | 7,7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4. | 0,054 | 2,3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5. | 0,036 | 1,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6. | 0,035 | 1,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabulka č. 10: Vyextrahované množství nečistot vzorku B pomocí násobné extrakce

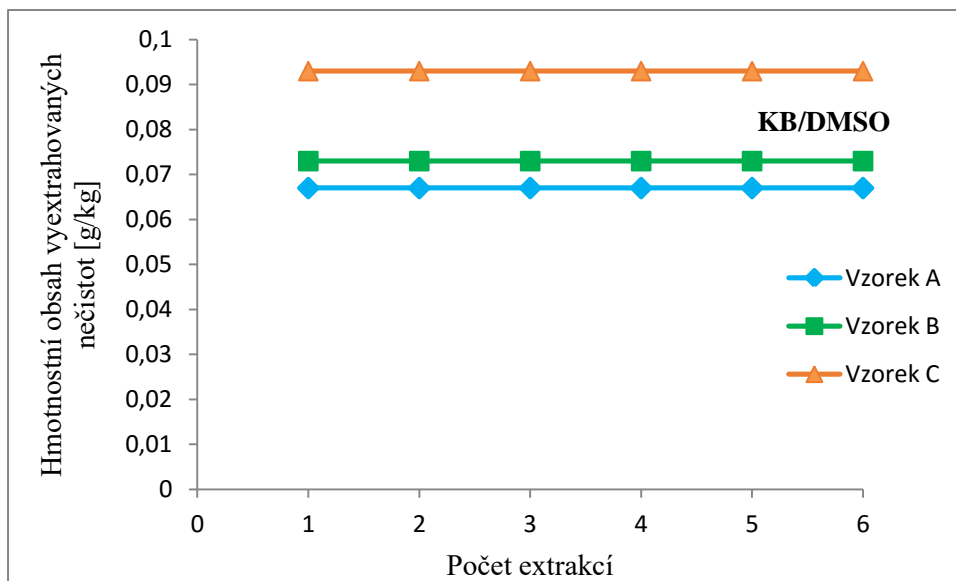
| Vzorek B | Hmotnostní obsah vyextrahovaných nečistot [g/kg] | | | | | | | |
|----------|--|---------|-------|---------|-----------------|---------|----|---------|
| | Hypersil HILIC GOLD/DMSO | | | | ACE C4/AcN:MeOH | | | |
| Extrakce | KBB | podíl % | KB | podíl % | KF | podíl % | FI | podíl % |
| 1. | 2,483 | 78,3 | 0,180 | 100 | 0,222 | 100 | 0 | 0 |
| 2. | 0,358 | 11,3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3. | 0,270 | 8,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4. | 0,033 | 1,0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5. | 0,029 | 0,9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabulka č. 11: Vyextrahované množství nečistot vzorku C pomocí násobné extrakce

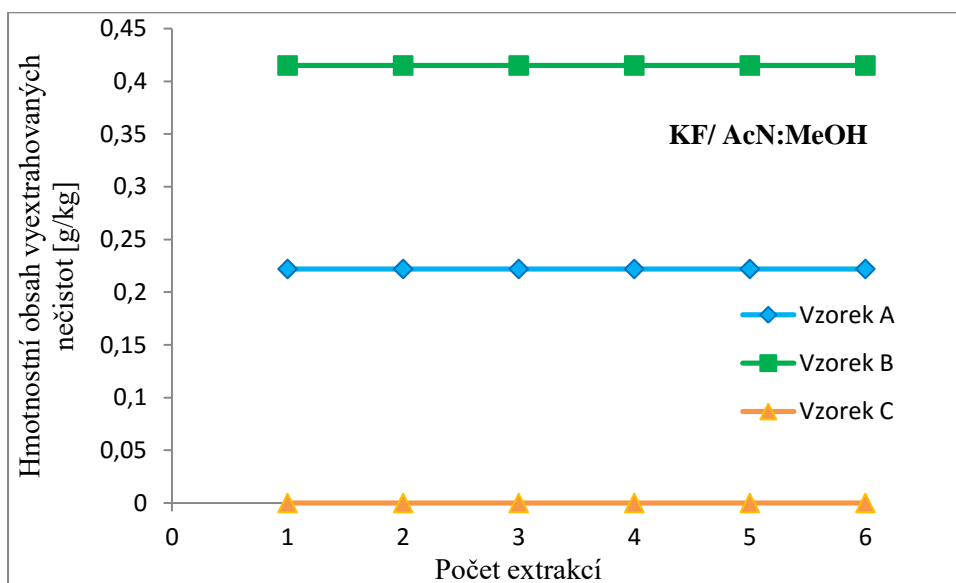
| Vzorek C | Hmotnostní obsah vyextrahovaných nečistot [g/kg] | | | | | | | |
|----------|--|---------|-------|---------|-----------------|---------|----|---------|
| | Hypersil HILIC GOLD/DMSO | | | | ACE C4/AcN:MeOH | | | |
| Extrakce | KBB | podíl % | KB | podíl % | KF | podíl % | FI | podíl % |
| 1. | 0,648 | 86,8 | 0,093 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2. | 0,098 | 13,2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |



Obr. č. 52: Vyextrahované množství kyseliny bibarbiturové pomocí násobné extrakce



Obr. č. 53: Vyextrahované množství kyseliny barbiturové pomocí násobné extrakce



Obr. č. 54: Vyextrahované množství kyseliny ftalové pomocí násobné extrakce

4 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo nalezení optimálních podmínek pro rutinní analýzu pigmentu P.Y. 139. Na základě chemismu reakce byly vytipovány potenciální nečistoty, které se mohou ve finálním výrobku vyskytovat. Jedná se o kyselinu barbiturovou, ftalovou, ftalimid a ftalodinitil. Směs standardů těchto potenciálních nečistot byla analyzována kapalinovou chromatografií nejdříve v systému s obrácenými fázemi na kolonách Inertsil ODS – 3V a Kinetex 100A C18, avšak vzhledem k velikým rozdílům v polaritě analyzovaných látek nedošlo k uspokojivému rozdělení všech analyzovaných látek. V dalších experimentech byla vzhledem k předpokládaným vlastnostem vyextrahovaných nečistot použita kolona s kratším uhlíkovým řetězcem, konkrétně kolona ACE C4. Při analýze na této koloně byl na chromatogramu zaznamenán deformovaný pík s retenčním časem 3,3 minut. Na základě zaznamenaných UV spekter analyzovaných standardů bylo zjištěno, že se v deformovaném píku nachází kyselina barbiturová a neznámá látka. K separaci těchto dvou polárních nečistot byla použita kolona Hypersil HILIC GOLD. Neznámá nečistota byla izolována z pigmentu a na základě interpretace jejích MS/MS a NMR spekter navržena pravděpodobná struktura této nečistoty. Tato nečistota vzniká v procesu výroby pigmentu pravděpodobně kondenzační reakcí dvou molekul kyseliny barbiturové, a proto byla označena jako kyselina bibarbiturová. Analýzou pigmentů bylo zjištěno, že ve vzorcích se nacházejí jako nečistoty kyselina bibarbiturová, kyselina barbiturová a kyselina ftalová; ftalimid ani ftalodinitril nebyly ani v jednom analyzovaném vzorku nalezeny.

Pro kvantitativní analýzu nečistot v pigmentu bylo nutné optimalizovat podmínky zpracování vzorku i analýzy. Z důvodu velice nízké rozpustnosti analyzovaného pigmentu ve většině rozpouštědel a předpokládaného nízkého obsahu nečistot v něm, muselo být zpracováno větší množství vzorku pomocí extrakce do kapaliny. Vedle nutnosti použít k separaci všech potenciálních nečistot dva různé separační systémy bylo ze stejných důvodů (tj. velké rozdíly v polaritě extrahovaných látek) nutné vzorek extrahovat dvěma odlišnými extrakčními rozpouštědly. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití směsi acetonitril:methanol (1:3) pro extrakci kyseliny ftalové a dalších nepolárních látek s následnou analýzou v RP – LC separačním systémem na koloně ACE C4. Pro extrakci kyseliny barbiturové a bibarbiturové ze vzorků pigmentu byl nejvhodnějším extrakčním činidlem dimethylsulfoxid, který poskytoval nejvyšší separační výtěžky polárních nečistot. Následná separace potom probíhala v HILIC systému na koloně Hypersil HILIC GOLD.

Na základě rozdílných výsledků experimentů s velikostí navážky byla jako dostačující zvolena navážka 0,5 g pigmentu extrahovaná do 10 ml extrakčního činidla. Tento jednokrokový postup je dostatečný pro kvantitativní extrakci kyseliny ftalové a barbiturové. Pro kvantitativní výtěžek extrakce kyseliny bibarbiturové je nutno tento extrakční krok opakovat dvakrát až třikrát vždy s novým podílem čistého extrakčního činidla.

Navržený postup analýzy potenciálních nečistot pigmentu P.Y. 139 může přispět k optimalizaci jednotlivých kroků při jeho výrobě ve společnosti Synthesia a.s. a tím ke zlepšení jeho kvality a prodejnosti.

5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] DUŠEK, L.: *Organické pigmenty*. Univerzita Pardubice, fakulta chemicko – technologická, Pardubice, 2004, 240 s.
- [2] JIRÁSEK, J.; VAVRO, M.: *Nerostné suroviny a jejich využití*. Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy ČR & Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava, Ostrava, 2008.
- [3] HERBST, W.; HUNGER, K.: *Industrial organic pigments: production, properties, applications*. Wiley – VCH, Weinheim, 2004, 672 s.
- [4] Oficiální stránky the Colour Index [online], [cit. 2017-05-01]. Dostupné z: <<https://colour-index.com/introduction-to-the-colour-index>>.
- [5] GOTZMANN, R.: Osobní sdělení technologického pracovníka společnosti Synthesia, a.s.
- [6] Obrázek distribuce částic [online], [cit. 2017-05-01]. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/figure/267632290_fig2_Figure-1-Particle-size-distribution-Zetasizer-Nano-ZS-of-magnesium-hydroxide-sample>.
- [7] LOMAX, S.; Q.; LEARNER, T.: A review of the classes, structures, and methods of analysis of synthetic organic pigments. *Journal of the American Institute for conservation*, 2006, 45.2: 107-125.
- [8] GARFIELD, S.: *Mauve: how one man invented a color that changed the world*. WW Norton & Company, New York, 2002, 222 s.
- [9] LEWIS, P., A.: *Organic pigments*. In *Coatings technology handbook, 2nd ed.*, (Satas, D., Tracton, A., eds.). Marcel Dekker, New York, 2001, s. 643-668.
- [10] SPECK, K.; MAGAUER, T.: The chemistry of isoindole natural products. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 2013, 9.1: 2048-2078.
- [11] Oficiální stránky Trust Chem [online], [cit. 2017-04-22]. Dostupné z: <http://trustchem.eu/en/colors/pigment-yellow-139-tcy13902>.
- [12] Oficiální stránky BASF, technické informace [online], [cit. 2017-04-28]. Dostupné z: <https://www.dispersionspigments.basf.com/portal/load/fid620533/low_EDC_331_e_Beileger_PIGM_gen_indcoat_X3.pdf>.

- [13] Oficiální stránky Clariant, produkty [online], [cit. 2017-04-28]. Dostupné z: <<http://www.clariant.com/en/Solutions/Products/2014/03/18/17/10/Graphol-Yellow-H2R>>.
- [14] Oficiální stránky Synthesia, a.s. [online], [cit. 2017-04-28]. Dostupné z: <<http://pigments.synthesia.eu/cze/organicke-pigmenty/pro-naterove-hmoty/versalova-zlut-5rd>>.
- [15] Základní informace o P.Y. 139 [online], [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: <http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7875274.htm>.
- [16] Bezpečnostní list P.Y. 139 [online], [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: <http://www2.basf.us/additives/pdfs/Paliotol_Yellow_K1841.pdf>.
- [17] Oficiální stránky společnosti Synthesia, a.s., informace o společnosti [online], [cit. 2017-05-03]. Dostupné z: <<http://www.synthesia.eu/cze/o-spolecnosti>>.
- [18] Oficiální stránky firmy Agrofert [online], [cit. 2017-05-05]. Dostupné z: <<https://www.agrofert.cz/nase-spolecnosti/118/synthesia-a-s/>>.
- [19] Oficiální stránky VÚOS [online], [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: <<http://vuos.com/cs/o-nas/politika-jakosti-vuos-a-s/>>.
- [20] Základní informace o kyselině barbiturové [online], [cit. 2017-04-21]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/barbituric_acid#section=Chemical-Vendors>.
- [21] LEVI, L.: The barbituric acids, their chemical structure, synthesis and nomenclature. Bulletin on Narcotics, 1957, 9: 30-40.
- [22] FIESLER, L., F.: Organic Chemistry. D.C. Heath and Company, Boston, 1944, p. 247.
- [23] FOX, J., J.; SHUGAR, D.: Absorption spectra and structure of barbituric acid derivatives as a function of pH. Bulletin des Sociétés Chimiques Belges, 1952, 61.1-2: 44-63.
- [24] GRIMAUX, E.: Synthèse des dérivés uriques de la série de l'alloxane. Bulletin de la Société Chimique de France, 1879, 31: 146.
- [25] SKINNER, R. F.; GALLAHER, E., G.; PREDMORE, D., B.: Rapid determination of barbiturates by gas chromatography – mass spectrometry. Analytical chemistry, 1973, 45.3: 574-576.

- [26] GARCÍA-BORREGÓN, P., F.; LORES, M.; CELA, R.: Analysis of barbiturates by micro – high – performance liquid chromatography with post – column photochemical derivatization. *Journal of Chromatography A*, 2000, 870.1: 39-44.
- [27] THORMANN, W.; MEIER, P.; MARCOLLI, C.; BINDERET, F.: Analysis of barbiturates in human serum and urine by high – performance capillary electrophoresis – micellar electrokinetic capillary chromatography with on – column multi-wavelength detection. *Journal of Chromatography A*, 1991, 545.2: 445-460.
- [28] YOU, T.; YANG, X.; WANG, E.: Determination of barbituric acid and 2 – thiobarbituric acid with end-column electrochemical detection by capillary electrophoresis. *Talanta*, 2000, 51.6: 1213-1218.
- [29] ENSAFI, A., A.; MOVAHEDINIA, H.: Spectrophotometric reaction rate method for determination of barbituric acid by inhibition of the hydrochloric acid – bromate reaction. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2003, 59.13: 3159-3164.
- [30] IBRAHEEM, B., B.: Spectrophotometric Determination of Barbituric Acid by Coupling with Diazotized Nitroanilines. *Rafidain Journal of Science*, 2011, 22.1E: 56-71.
- [31] MAIXNER, J.; ROHLÍČEK, J.; FLORIÁN, Č.; VYŇUCHAL, J.; ALAFID, F.: X – ray powder diffraction data for monosodium salt azobarbituric acid dihydrate [C₈H₅N₆O₆Na. 2H₂O]. *Powder Diffraction*, 2014, 29.04: 383-384.
- [32] FAVRE, H., A.; POWELL, W., H.: *Nomenclature of Organic Chemistry: IUPAC Recommendations and Preferred Names 2013 (Blue Book)*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2014. p. 902.
- [33] Chemická struktura ftalodinitrilu [online], [cit. 2017-04-29]. Dostupné z: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.6775.html>>.
- [34] PINNOW, J.; SAMANN, C.: Ueber Derivate des o – Amidobenzonitrils (Derivatives of Orthamidobenzonitrile). *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 1896, 29: 623-632.
- [35] GERBER, F.; KRUMMEN, M.; POTGETER, H.; ROTH, A.; SIFFRIN, CH.; SPOENDLINET CH.: Practical aspects of fast reversed – phase high – performance liquid chromatography using 3µm particle packed columns and monolithic columns in

- pharmaceutical development and production working under current good manufacturing practice. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1036.2: 127-133.
- [36] CHURÁČEK, J.: *Analytická separace látek*. SNTL, Praha, 1990, 387 s.
- [37] KARGER, B., L.: HPLC: Early and Recent Perspectives. *Journal of Chemical Education*, 1997, 74.1: 45-48.
- [38] Obrázek instrumentace HPLC [online], [cit. 2017-04-29]. Dostupné z: <<https://web.vscht.cz/~schulzov/HPLC/1%20HPLC%202013%20teorie.pdf>>
- [39] Obrázek UV/VIS detektor [online], [cit. 2017-04-06]. Dostupné z: <<https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>>.
- [40] Obrázek DAD detektoru [online], [cit. 2017-04-10]. Dostupný z <<http://hplc.cz/>>.
- [41] JANDERA, P.: Stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts. *Journal of Separation Science*, 2008, 31.9: 1421-1437.
- [42] VACEK, J.; ONOFREJOVÁ, L.; KLEJDUS, B.; KUBÁŇ, V.: Využití kapalinové chromatografie založené na hydrofilních interakcích pro separace polárních látek. *Chemické Listy*, 2009, 103: 381-385.
- [43] YUAN, X., KIM, E., G.; SANDERS, C., A.; RICHTER, B., E.; CUNNINGHAM, M., F.; JESSOP, P., G.; OLESCHUK, R., D.: CO₂ – modified solvents for chromatographic separation. *Green Chemistry*, 2017, 19.7: 1757-1765.
- [44] HSIEH, Y.: Potential of HILIC-MS in quantitative bioanalysis of drugs and drug metabolites. *Journal of separation science*, 2008, 31.9: 1481-1491.
- [45] KAZAKEVICH, Y., V.; LOBRUTTO, R.: *HPLC for pharmaceutical scientists*. John Wiley & Sons, Hoboken, 2007, 1140 s.

PŘÍLOHY

Kalibrační tabulky standardů nečistot

Tabulka č. 12: Kalibrační data standardu kyseliny barbiturové získané měřením na kapalinovém chromatografu

| KYSELINA BARBITUROVÁ | | | | | |
|----------------------|----------------------|-------------------|---------------------|-----------|-----------|
| Kalibrační řada | Množství vzorku [ml] | Koncentrace [g/l] | Plocha píku [mAU*s] | | |
| | | | 1. měření | 2. měření | 3. měření |
| 1. | 0,0025 | 0,00025 | - | - | - |
| 2. | 0,005 | 0,00050 | - | - | - |
| 3. | 0,010 | 0,00100 | 16,798 | 16,980 | 16,790 |
| 4. | 0,015 | 0,00150 | 22,149 | 22,280 | 22,160 |
| 5. | 0,020 | 0,00200 | 32,641 | 32,910 | 32,680 |
| 6. | 0,025 | 0,00250 | 34,378 | 34,490 | 34,330 |
| 7. | 0,050 | 0,00500 | 78,710 | 78,790 | 78,700 |
| 8. | 0,075 | 0,00750 | 100,729 | 100,880 | 100,680 |
| 9. | 0,100 | 0,01000 | 138,567 | 138,660 | 138,510 |
| 10. | 0,150 | 0,01500 | 204,829 | 204,920 | 204,750 |
| 11. | 0,200 | 0,02000 | 326,036 | 326,050 | 326,040 |

Kalibrační roztoky byly připraveny postupem uvedeným v kapitole 2.6.

Tabulka č. 13: Kalibrační data standardu kyseliny bibarbiturové získané měřením na kapalinovém chromatografu

| KYSELINA BIBARBITUROVÁ | | | | | |
|------------------------|----------------------|-------------------|---------------------|-----------|-----------|
| Kalibrační řada | Množství vzorku [ml] | Koncentrace [g/l] | Plocha píku [mAU*s] | | |
| | | | 1. měření | 2. měření | 3. měření |
| 1. | 0,05 | 0,00140 | 12,546 | 12,546 | 12,546 |
| 2. | 0,075 | 0,00210 | 19,165 | 19,165 | 19,165 |
| 3. | 0,1 | 0,00280 | 22,452 | 22,452 | 22,452 |
| 4. | 0,125 | 0,00350 | 27,331 | 27,331 | 27,331 |
| 5. | 0,19 | 0,00532 | 44,893 | 44,893 | 44,893 |
| 6. | 0,25 | 0,00700 | 63,192 | 63,192 | 63,192 |
| 7. | 0,5 | 0,01400 | 129,410 | 129,410 | 129,410 |
| 8. | 0,75 | 0,02100 | 196,269 | 196,269 | 196,269 |
| 9. | 1 | 0,02800 | 221,525 | 221,525 | 221,525 |
| 10. | 2,4 | 0,06720 | 563,173 | 563,173 | 563,173 |
| 11. | 3,7 | 0,10360 | 857,052 | 857,052 | 857,052 |
| 12. | 5 | 0,14000 | 1148,937 | 1148,937 | 1148,937 |
| 13. | 8 | 0,22400 | 1705,883 | 1705,883 | 1705,883 |
| 14. | 10 | 0,28000 | 2434,824 | 2434,824 | 2434,824 |

Kalibrační roztoky byly připraveny postupem uvedeným v kapitole 2.6.

Tabulka č. 14: Kalibrační data standardu kyseliny ftalové získané měřením na kapalinovém chromatografu

| KYSELINA FTALOVÁ | | | | | |
|-------------------------|-----------------------------|--------------------------|----------------------------|------------------|------------------|
| Kalibrační řada | Množství vzorku [ml] | Koncentrace [g/l] | Plocha píku [mAU*s] | | |
| | | | 1. měření | 2. měření | 3. měření |
| 1. | 0,03 | 0,00300 | 17,673 | 17,690 | 17,686 |
| 2. | 0,04 | 0,00400 | 21,831 | 21,974 | 21,889 |
| 3. | 0,06 | 0,00600 | 29,009 | 29,020 | 29,010 |
| 4. | 0,1 | 0,01 | 47,776 | 47,943 | 47,830 |
| 5. | 0,2 | 0,02 | 90,549 | 90,665 | 90,540 |
| 6. | 0,3 | 0,03 | 139,714 | 139,800 | 139,820 |
| 7. | 0,4 | 0,04 | 192,397 | 192,480 | 192,496 |
| 8. | 0,6 | 0,06 | 278,281 | 278,459 | 278,364 |
| 9. | 0,8 | 0,08 | 358,345 | 358,531 | 358,570 |
| 10. | 1 | 0,1 | 452,285 | 452,290 | 452,296 |

Kalibrační roztoky byly připraveny postupem uvedeným v kapitole 2.6.