

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

Rychlá úprava vzorků potravin pro detekci ambientními technikami

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Bc. Dominik Mosler

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí práce:

Mgr. Lucie Borovcová, Ph.D.

Olomouc 2020

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Bc. Dominik Mosler

Název práce: Rychlá úprava vzorků potravin pro detekci ambientními technikami

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra analytické chemie

Vedoucí práce: Mgr. Lucie Borovcová, Ph.D.

Rok odevzdání práce: 2020

Abstrakt:

Diplomová práce se zabývá identifikací konzervačních látek v potravinách pomocí sondy pro analýzu vzorku za atmosférického tlaku (ASAP). Teoretická část je věnována vybraným konzervačním látkám a ambientním ionizačním technikám, zejména technice ASAP. Další část práce se zabývá použitím ambientních technik v oblasti analýzy potravin. Poslední kapitola pak pojednává o různých metodách stanovení konzervačních látek.

Ve výsledcích je shrnuto nastavení parametrů analýzy, při kterých bylo dosaženo nejlepších signálů sledovaných látek, jejichž identita byla následně potvrzena provedenou fragmentací. Technika byla dále aplikována při analýze modelového vzorku (směs standardů) a rovněž při analýzách reálných vzorků. Ze získaných výsledků vyplývá, že technika ASAP je velice dobře využitelná pro identifikaci konzervačních látek v potravinách.

Klíčová slova: ambientní ionizační techniky, ASAP, konzervační látky, kyselina sorbová, kyselina benzoová, parabeny

Počet stran: 62

Jazyk: Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Bc. Dominik Mosler

Title: Fast pretreatment of food samples for ambient mass spectrometric detection

Type of thesis: Master's

Department: Department of Analytical Chemistry

Supervisor: Mgr. Lucie Borovcová, Ph.D.

The year of submission: 2020

Annotation:

Thesis deals with the identification of food preservatives by atmospheric solids analysis probe (ASAP). The theoretical part is devoted to selected food preservatives and ambient ionization techniques, especially ASAP technique. The next part deals with use of ambient techniques in food analysis. Last part introduces various methods for determination of preservatives.

The results summarize setting of analysis parameters at which was achieved best signals of monitored substances. Identity of these substances were successfully confirmed by their fragmentation. The technique was further applied in the analysis of a model sample (mixture of standards) as well as in the analysis of real samples. The obtained results show good usability of technique for the identification of preservatives in food.

Keywords: ambient ionization techniques, atmospheric solids analysis probe (ASAP), food preservatives, benzoic acid, sorbic acid, parabens

Number of pages: 62

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....
Vlastnoruční podpis

Děkuji Mgr. Lucii Borovcové, Ph.D. za její ochotu, vstřícnost, cenné rady a čas, který věnovala při zpracování mé práce. Dále bych chtěl poděkovat prof. RNDr. Karlovi Lemrovi, Ph.D. za odborné rady při konzultaci mé práce, a také Marianně Nytce, M.Sc. která mi byla k dispozici při provádění experimentů.

Poděkování patří rovněž mé rodině za jejich podporu po celou dobu mého studia. Za finanční podporu mé výzkumné práce děkuji Univerzitě Palackého (projekty IGA_PrF_2019_028 a IGA_PrF_2020_030).

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1 Konzervační látky	2
2.1.1 Kyselina benzoová.....	3
2.1.2 Kyselina sorbová.....	3
2.1.3 Parabeny.....	4
2.2 Ambientní ionizační techniky	5
2.2.1 Sonda pro analýzu vzorku za atmosférického tlaku	7
2.2.2 Použití sondy.....	9
2.2.3 Využití ambientních ionizačních technik v analýze potravin.....	12
2.3 Metody stanovení konzervačních látek v potravinách	20
2.3.1 Kapalinová chromatografie.....	20
2.3.2 Plynová chromatografie	23
2.3.3 Elektromigrační metody	25
2.4 Analýza konzervačních látek ambientními ionizačními technikami	27
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
3.1 Chemikálie	29
3.2 Přístroje a nastavení parametrů	29
3.3 Pracovní postupy	30
3.3.1 Příprava pracovních roztoků a reálných vzorků	30
3.3.2 Předúpravy reálného vzorku	31
3.3.3 Příprava experimentů ASAP.....	31
4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	33
4.1 Kyseliny sorbová a benzoová.....	33
4.2 Parabeny	35
4.3 Směsi konzervačních látek.....	40
4.4 Reálné vzorky.....	44
5. ZÁVĚR.....	53
POUŽITÁ LITERATURA	55
SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	61

1. ÚVOD

Hmotnostní spektrometrie je dnes velice výkonnou a široce využívanou analytickou technikou, která však bývá většinou spojena s časově náročnou úpravou vzorků před samotnou analýzou. Je však možné využít ambientní ionizační techniky spadající do oblasti hmotnostní spektrometrie, které umožňují přímou analýzu vzorků po malé, či žádné úpravě. Často kombinují výhody desorpčních kroků s již známými ionizačními technikami, a díky své jednoduchosti, rychlosti a nízkým provozním nákladům nacházejí uplatnění v mnoha oblastech analýzy. Jednou z nich je i oblast analýzy potravin, které je věnována předložená diplomová práce.

Práce se zabývá identifikací vybraných konzervačních látek (konkrétně kyseliny sorbové, benzoové a parabenů) v potravinách pomocí ambientní ionizační techniky ASAP, což je sonda pro analýzu vzorku za atmosférického tlaku. Pro jednotlivé látky byla provedena optimalizace parametrů analýzy a následně byly tyto látky identifikovány v modelových a reálných vzorcích.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Konzervační látky

Potraviny, zejména mastné výrobky, jsou rychle se kazícími produkty a jedním z hlavních činitelů jejich degradace jsou mikroorganismy. Mikroorganismy způsobují nutriční a smyslové zhoršení potravin, omezují jejich trvanlivost a mohou být odpovědné za řadu onemocnění. Existují různé konzervační postupy omezující rychlost a rozsah degradačních procesů v potravinách. V minulosti se konzervace prováděla tepelným zpracováním – vařením či chlazením, nebo uzením. Dalšími způsoby konzervování bylo nakládání potravin do soli, cukru, octa či alkoholu [1].

V dnešní době se využívá fyzikálních, chemických a mikrobiálních metod konzervace. Konzervování chemickými prostředky je založeno na použití přísad známých jako konzervační látky. Chemické konzervační látky jsou sloučeniny, které po přidání do potravin potlačují, zpomalují nebo zabraňují aktivitě a růstu mikroorganismů. Jejich hlavním účelem je prodloužit trvanlivost potravin a zvýšit tím jejich bezpečnou konzumaci. V dnešní době se používá okolo 30-ti různých konzervantů, které se označují kombinací písmene E a specifického čísla [1]. Tato práce se zabývá vybranými konzervačními látkami, konkrétně kyselinou benzoovou, kyselinou sorbovou a estery parahydroxybenzoové kyseliny (obecně známé pod názvem parabeny).

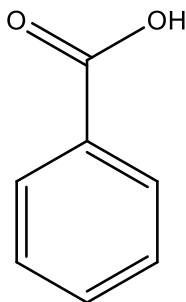
Kontrola a regulace používání konzervačních látek je důležitým předmětem moderní potravinářské technologie. Je nezbytná jak pro zajištění jejich účinnosti, tak, že při nevhodném použití mohou mít tyto přísady nepříznivé účinky na zdraví. Používání konzervačních látek proto podléhá přísným právním předpisům na ochranu spotřebitelů, kteří si stále více všimají složení a obsahu potravin, zejména přítomnosti přísad. Legislativní požadavky týkající se používání konzervačních látek upravuje Evropská unie. Ve Spojených státech amerických se použití řídí Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). Regulačními orgány jsou např. Světová zdravotnická organizace (WHO) či Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) [2, 3].

Konzervační látky se nevyužívají pouze k prodloužení trvanlivosti potravin, běžně se totiž přidávají do různých léčiv a lékových přípravků pro zabránění mikrobiální kontaminace. Dále se používají v kosmetických a hygienických prostředcích a výrobcích, ve kterých pomáhají zabránit růstu plísní, kvasinek a bakterií. Antioxidační konzervační

látky také zabraňují a potlačují reakce, ke kterým může dojít při vystavení těchto výrobků kyslíku, světlu či teple [3].

2.1.1 Kyselina benzoová

Kyselina benzoová je první zástupce v homologické řadě jednosytných aromatických kyselin. Strukturální vzorec této kyseliny je uveden na obr. 1. Přirozeně se vyskytuje v mnoha potravinách, zejména v ovoci, ale také v pivě, víně či koření [4].

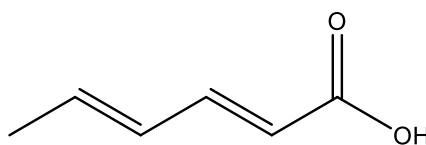


Obr. 1: Strukturální vzorec kyseliny benzoové.

Díky svým schopnostem inhibovat růst bakterií se řadí mezi jednu z nejstarších konzervačních látek používaných ve farmaceutickém, kosmetickém a hlavně potravinářském průmyslu. Mezi její další významné vlastnosti patří nízká cena, absence zbarvení a poměrně nízká toxicita, což z této kyseliny dělá jednu z nejvíce používaných konzervačních látek. Účinnost této konzervační látky je silně ovlivněna použitým pH. Maximální účinnost je při pH 3,5, kdežto při pH 8 je již 100x menší. V seznamu konzervantů ji nalezneme pod zkratkou E210. Její sůl, benzoan sodný (E211), byla vůbec první potravinářskou konzervační látkou schválenou Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv. Uplatnění nachází i další sůl - benzoan draselný (E212). Používají se ke konzervaci nápojů, šťáv, hořčice, omáček, marmelád, nakládaného ovoce, čokolády aj. Kromě potravin je nalezneme také v různých mastích, parfémecích či ústní vodě [2, 5].

2.1.2 Kyselina sorbová

Kyselina sorbová je nenasycená karboxylová kyselina. Její struktura je zobrazena na obr. 2.



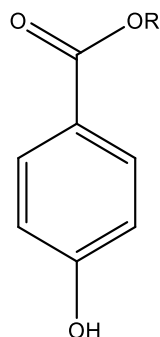
Obr. 2: Strukturální vzorec kyseliny sorbové.

Kyselina sorbová a její soli – sorbany jsou látky aktivní proti kvasinkám, plísním a řadě bakterií. Běžně se používají jako konzervační látky v různých potravinách, jako jsou nealkoholické nápoje, sušené ovoce nebo ovocné či zeleninové přípravky. Své uplatnění nachází také v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Kyselinu sorbovou jako konzervační látku nalezneme pod označením E200 a její soli – sorban sodný E201 a sorban draselný E202 [6, 7, 8].

Světová zdravotnická organizace a Organizace pro zemědělství a výživu označily kyselinu sorbovou jako bezpečnou pro lidské zdraví a doporučují ji jako konzervační látku. V tomto se liší od kyseliny benzoové, u které studie [9, 10] naznačují potenciální škodlivost pro spotřebitele při jejím nadměrném použití, které může vést ke vzniku dermatitidy, alergií či křečí.

2.1.3 Parabeny

Parabeny jsou sloučeniny odvozené od p-hydroxybenzoové kyseliny. V experimentální části této práce se budu podrobněji zabývat methyl (E218), ethyl (E214), propyl (E216) a butyl parabeny. Na obr. 3 je znázorněn obecný strukturní vzorec parabenu, ve kterém substituent R představuje alkyl.



Obr. 3: Obecný strukturní vzorec parabenu.

Parabeny jsou využívány pro své baktericidní a antimikrobiální vlastnosti nejen v potravinářství, ale především ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Zubní pasty, krémy, šampóny či deodoranty jsou pouze malým výčtem kosmetických přípravků, ve kterých lze tyto látky nalézt. K širokému rozšíření parabenů přispívají jejich žádoucí vlastnosti. Jedná se o látky bezbarvé, bez zápachu a s vynikající chemickou stabilitou ve vztahu k pH (účinnost v rozmezí pH 4,5 – 7,5) a také teplotě. Jejich toxicita je obecně nízká, a to díky rychlé hydrolyze na původní kyselinu, která je následně vylučována. Mezi

další vlastnosti můžeme uvést široké spektrum aktivity, inertnost či nízké náklady. Jako konzervační látky se využívají více než 70 let [11, 12].

Antimikrobiální aktivita parabenů narůstá se zvyšující se délkou alkylového řetězce, ale v praxi se obvykle používají nejkratší skupiny - zejména methylparabeny, protože jejich rozpustnost ve vodě je vyšší než u delších alkylových řetězců. Často se používají společně s propylparabeny pro jejich synergické účinky. Směrnice Evropského hospodářského společenství (EHS) povoluje obsah parabenů v kosmetických přípravcích 0,4 % pro použití jednotlivě a 0,8 % při použití jejich směsi [11, 13]. Časté použití konzervačních látek právě v kosmetickém průmyslu vede podle studií k potenciálním zdravotním rizikům. Většina konzervačních látek může být pro spotřebitele škodlivá z důvodu jejich schopnosti vyvolat dermatitidu. Nedávné studie uvádějí, že parabeny vykazují estrogenní aktivitu [3, 11].

2.2 Ambientní ionizační techniky

Hmotnostní spektrometrie (MS) se stala výkonnou a široce používanou technikou v analytické a bioanalytické chemii. Ve většině analýz hmotnostní spektrometrií vzorky obvykle procházejí předúpravou před samotnou analýzou. V dnešní době se standardně používají separační techniky v podobě kapalinové či plynové chromatografie, které umožňují přímé spojení s hmotnostně spektrometrickou detekcí. Analýza většího množství vzorků spojením těchto technik je však časově náročnější. Pro dosažení rychlé detekce za současného snížení časových i finančních nákladů se v posledních desetiletích stále více uplatňuje alternativa v podobě ambientní ionizační hmotnostní spektrometrie (AIMS) [14].

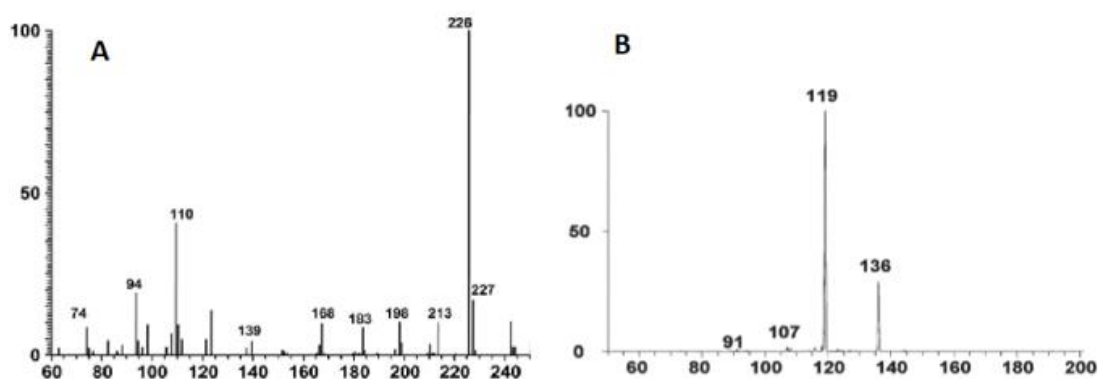
Ambientní ionizační techniky umožňují přímou analýzu vzorků v otevřeném prostoru, či v jejich přirozeném prostředí. Tyto techniky obvykle vyžadují malou nebo žádnou úpravu vzorku [15].

Od doby, kdy byly představeny techniky DESI (**D**esorption **e**lectrospray **i**onization, desorpční elektrosprej) [Z. Takats a kol. 2004] [15] a DART (**D**irect **a**nalysis in **r**eal **t**ime, přímá analýza v reálném čase) [R. B. Cody a kol. 2005] [15] dochází na poli ambientních ionizačních technik k rychlému rozvoji. Tyto nové techniky kombinují desorpční kroky (např. přenos hybnosti, rozpouštění do kapek nebo tepelná desorpce) s principy již známých ionizačních technik (ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)). Jedná se např. o DAPCI (**D**esorption **a**tmospheric **p**ressure **c**hemical **i**onization, desorpce chemickou ionizací za atmosférického tlaku) [16] nebo DAPPI (**D**esorption **a**tmospheric **p**ressure **p**hoto**i**onization, desorpční fotoionizace za atmosférického tlaku) [17]. Jako další

používanou techniku můžeme uvést ASAP (**A**tmospheric solids **a**nalysis **p**robe, sonda pro analýzu vzorku za atmosférického tlaku) [18], které je věnována větší pozornost v další části této práce. Vznikají také techniky kombinující dva ionizační zdroje, např. MALDESI (**M**atrix-assisted **l**aser **d**esorption **e**lectrospray **i**onization, matricí asistovaná laserová desorpce s ionizací elektrosprejem) [19], která využívá vlastnosti MALDI a ESI, či LAESI (**L**aser **a**blation **e**lectrospray **i**onization, laserová ablace s ionizací elektrosprejem), která kombinuje výhody laserové ablace a ESI [20]. V dnešní době existuje již přes třicet různých ambientních ionizačních technik [14].

Aplikovatelnost těchto technik je široká, své uplatnění nacházejí v oblastech forenzní chemie a kriminalistiky [21], medicíny [22], farmacie [23], životního prostředí [24], potravin [25] nebo analýzy živočišných a rostlinných vzorků [26].

Ambientní ionizační techniky se využívají ve forenzní analýze k detekci drog [21] a výbušnin [27]. Techniky DAPPI a DAPCI byly použity k detekci látek jako trinitrotoluen (TNT) [27], hexogen (RDX) [17] či peroxidových výbušnin [16]. Heroin, kokain nebo deriváty amfetaminů mohou být detekovány pomocí DESI a ASAP přímo z kontaminovaných povrchů, jako jsou bankovky, zavazadla nebo také z moči [28]. Obr. 4 ukazuje hmotnostní spektra vybrané drogy a výbušniny, která byla získána těmito technikami.

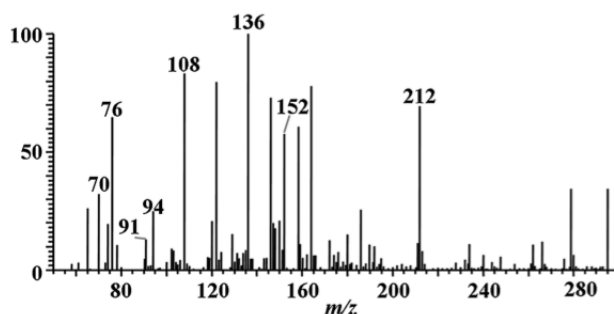


Obr. 4: Hmotnostní spektrum trinitrotoluen (TNT; m/z 228) (A) získané technikou DAPCI a amfetaminu (m/z 136) (B), které bylo získáno technikou DESI (převzato z cit. [16, 21] a upraveno).

Dalšími oblastmi využívající ambientní ionizační techniky jsou medicína a farmacie. DESI byla aplikována k identifikaci nádorových tkání pomocí profilování lipidových frakcí [22], ale i k rychlému získání hmotnostních spekter běžných léčiv jako je ibuprofen, paracetamol či kodein [23]. DAPCI byla například aplikována při identifikaci a odlišení

ledvinových kamenů vyvolaných melaminem nebo kyselinou močovou [29]. K zobrazování proteinů v tkáních [30] byla použita technika nanoDESI.

Zajímavé uplatnění nacházejí tyto techniky i při ověření pravosti dokumentů. DAPCI umožňuje skenování povrchů dokumentů a jiných písemných vzorků a na základě procesu rozkladu inkoustu tak určit jejich pravost [31]. Záznam z analýzy inkoustů je na obr. 5.



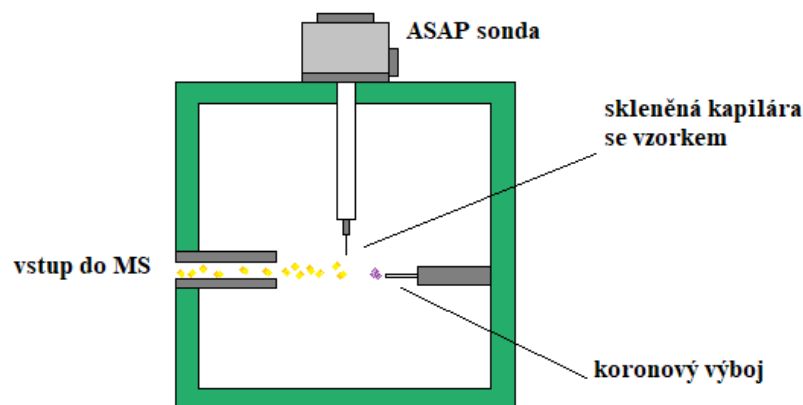
Obr. 5: Hmotnostní spektrum inkoustu získané technikou DAPCI. Signál při m/z 136 odpovídá majoritní sloučenině z modrého inkoustu (převzato z cit. [31] a upraveno).

V neposlední řadě se ambientní ionizační techniky využívají při analýze potravin, které je věnována kapitola 2.2.3.

2.2.1 Sonda pro analýzu vzorku za atmosférického tlaku

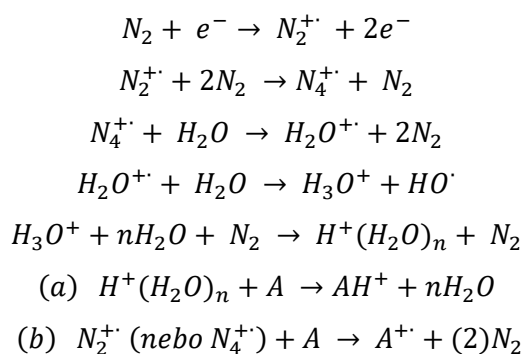
Sonda pro analýzu vzorku za atmosférického tlaku (ASAP) byla představena *McEwenem* a spolupracovníky v roce 2005 [18] a vychází z principu chemické ionizace za atmosférického tlaku. Jedná se o techniku, pomocí které mohou být analyzovány vzorky přímo nebo s minimální předúpravou s možností ionizace jak polárních, tak i malých nepolárních molekul.

Princip je založen na ponoření konce skleněné kapiláry, která je upevněna v ASAP sondě, do vzorku a následně je tato sonda zavedena do hmotnostního spektrometru [18, 32]. Obr. 6 znázorňuje schéma techniky ASAP.



Obr. 6: Schéma techniky ASAP.

Vzorek je z ASAP sondy odpařován pomocí proudu horkého dusíku s následnou ionizací prostřednictvím korónového výboje, podobně jako je tomu u APCI [33]. Obr. 7 znázorňuje schéma vzniku iontů v pozitivním módu.



Obr. 7: Schéma vzniku iontů v pozitivním módu (převzato z cit. [34] a upraveno).

Z uvedeného schéma vyplývá, že k ionizaci může dojít dvěma způsoby. Nejprve dochází k ionizaci plynu N_2 a poté molekul H_2O . V dalších krocích je ionizován samotný analyt. V případě, že je příslušný analyt bazičtější než voda (a), tak dochází k jeho ionizaci prostřednictvím přenosu protonu z H_3O^+ . Je-li ionizační energie analytu nižší než ionizační energie N_2 (15,6 eV) (b), může být tento analyt ionizován přenosem náboje z $N_2^{+\cdot}$ [34]. Uvedené děje si mohou konkurovat.

Tato technika byla pro experimentální část diplomové práce vybrána na základě výsledků z mé bakalářské práce, ve které jsem testoval 3 různé ambientní ionizační techniky – nanoESI, nanoDESI a ASAP. ASAP se při testování osvědčila jako nejvhodnější technika při analýze konzervačních látek v reálném vzorku.

2.2.2 Použití sondy

V následující kapitole budou představeny vybrané aplikace techniky ASAP. Množství publikací, ve kterých byla tato technika použita, je značné. Do této práce byla vybrána zajímavá použití z různých oborů a oblastí analýz tak, aby demonstrovala široké využití této techniky.

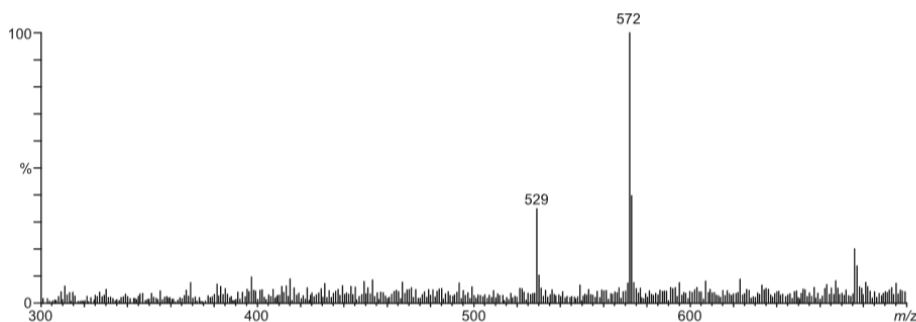
Amfetaminové stimulanty patří mezi často zneužívané nelegální drogy, a proto jsou kladeny nároky na vývoj rychlých metod umožňujících jejich detekci za současné minimální úpravy vzorku. *E. J. Crevelin a kol.* uvádí modelovou analýzu vzorku moči obsahující amfetamin, metamfetamin, efedrin, sibutramin a fenfluramin pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie ve spojení s iontovým zdrojem ASAP (ASAP-MS/MS) [33]. První vzorek moči byl od dárce neužívajícího žádné látky amfetaminového typu. Do tohoto vzorku moči byly přidány výše zmíněné standardy v koncentračním rozmezí od 0,5 ng/ml do 100 ng/ml jako simulace jejich přítomnosti. Druhý vzorek (moč i sliny) byly odebrány od dárce, který užíval sibutramin k léčbě obezity. Mez detekce standardů přítomných v moči se pohybovala mezi 0,002 a 0,4 ng/ml. Naměřené signály látek byly následně použity v MS/MS módu sledování reakce. ASAP-MS/MS poskytla výsledky s vynikající citlivostí a specificitou a umožnila detekci sibutraminu ve vzorku moči a slin bez nutnosti předúpravy vzorku [33].

L. V. Tose a kol. použili ASAP-MS k analýze standardů kondenzovaných aromatických látek, ropy a parafínových frakcí. Touto problematikou se zabývá obor zvaný petroleomika. Hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením umožňuje charakterizovat organické sloučeniny v surové ropě a ropných frakcích, a tím kontrolovat chemické složení při produkci, extrakci a rafinaci ropy [35]. Ve výše zmíněné publikaci byly vzorky standardů benz[a]anthracenu, koronenu a směsi polyaromatických uhlovodíků měřeny v pozitivním módu při použití dvou metod – jedné s gradientem teploty 150 až 650 °C a druhé s konstantními teplotami 300 °C a 400 °C. Byly použity také dva reálné vzorky – surová ropa a uhlovodíková frakce. Standardy, vzorek ropy a nasycené frakce byly snadno ionizovány a technika ASAP poskytovala úplnější chemické složení ve srovnání s jinými iontovými zdroji (APCI, ESI, DART, DESI). Z teplotního gradientu (150 až 650 °C) aplikovaného na ASAP sondu byl získán chemický profil poskytující informace jak o procesu rafinace, tak o produktech a kvalitě ropy [35].

V případě farmaceutického průmyslu jsou klíčovými identifikace a profilování nečistot v meziproduktech vyvíjených či vyráběných léčiv. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) je standardně používána v oblasti profilování nečistot. Samotné LC analýzy jsou časově náročné a vzorky je nutné před

analýzou upravit. *H. Pan a G. Lundin* [36] uvádějí použití ASAP ve spojení s hmotnostní spektrometrií s iontovou mobilitou a analyzátozem doby letu (IM-MS-TOF) při profilování nečistot deseti vzorků 2-naftalenaminů s různou kombinací jejich *-R* a *-S* diastereomerů. Výsledky získané technikou ASAP-IM-MS byly následně porovnány s profily získanými kapalinovou chromatografií spojenou s hmotnostní spektrometrií, kde byl použit jako iontový zdroj elektrosprej (LC-ESI-MS). Veškeré nečistoty na úrovni 0,1 % plochy a více, s výjimkou jedné, poskytovaly oběma technikami srovnatelné výsledky. Díky kombinaci technik ASAP-IM-MS bylo dosaženo zkrácení doby analýz z 25 minut (LC-MS) na méně než 3 minuty [36].

Nukleosidy jsou polárními molekulami obecně považovanými za netěkavé, tudíž se ionizace elektrosprejem jeví jako vhodná technika pro jejich analýzu. Avšak *J. Rozenski* ve své publikaci aplikoval pro ionizaci nukleosidů techniku ASAP. Měřenými standardy v tomto případě byly adenosin, 2-deoxyadenosin, 1-methyladenosin, 2-deoxy-3-trityl-N-benzoylcitidin, uridin a 2-deoxyuridin. Uridin a 2-deoxyuridin byly měřeny v negativním módu, ostatní ze standardů v módu pozitivním. Také byla provedena měření zaschlých roztoků z TLC destiček. Charakteristické skvrny látek byly z povrchu destičky seškrábnuty a následně suspendovány v acetonitrilu [37]. Hmotnostní spektrum jednoho z nukleosidů je na obr. 8.



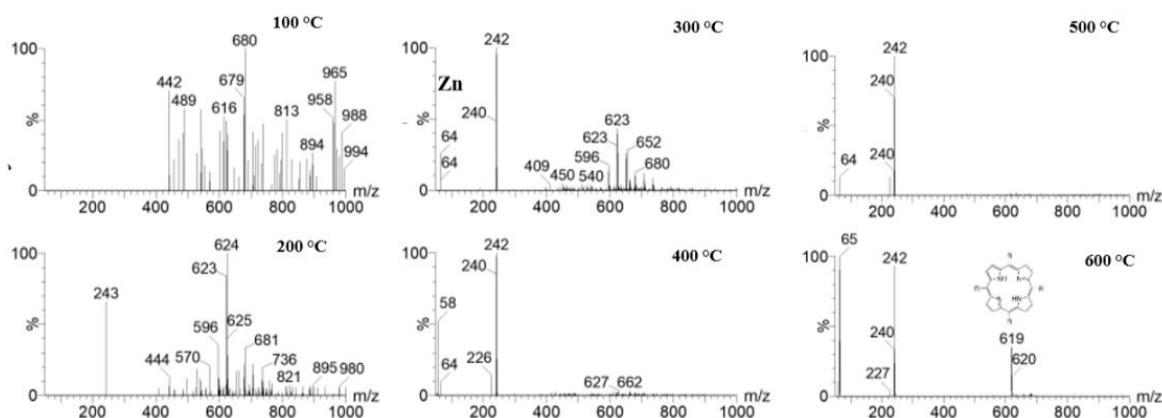
Obr. 8: Hmotnostní spektrum 2-deoxy-3-trityl-N-benzoylcitidinu měřeného v režimu negativních iontů (převzato z cit. [37] a upraveno).

Technika ASAP se prokázala jako vhodná při analýze nukleosidů, přičemž fragmentační spektra naměřená touto technikou jsou srovnatelná s fragmentačními spektry získanými elektrosprejovou ionizací [37].

Zajímavým využitím této techniky je identifikace nanočástic porfyrinu. Porfyriny jsou životně důležité pigmenty zapojené do procesů transdukce biologické energie. Nedávná studie ukázala, že nanočástice porfyrin-oxid křemičitý mohou selektivně ničit nádorové

buňky, ale detekce nanočástic byla omezena na zobrazovací mikroskopii. Ve studii *C. Karlera a kol.* byla vyvinuta nová metoda pro rychlou identifikaci nanočástic na bázi porfyrinu pomocí ASAP-MS. K experimentům byly využity HeLa buňky, které byly inkubovány v prostředí nanočástic. HeLa buňky jsou nádorové buňky izolované roku 1951 z nádoru pacientky Henrietty Lacksové, po které jsou pojmenovány. Používají se téměř po celém světě a pomáhají ve výzkumu a léčbě nádorových onemocnění. Po inkubaci následoval důkladný oplach zbytků nanočástic a buněčné suspenze byly nanášeny na ASAP kapiláru. Po zahřátí byly kompozitní nanočástice porfyrin-oxid křemičitý z buněk uvolněny a následně byly odpařeny za použití desolvatačního plynu a analyzovány [38].

Ve studii bylo také provedeno měření komplexu porfyrin-kov, kde byl sledován teplotní profil a vliv teploty na hmotnostní spektrum. Na obr. 9 je znázorněno hmotnostní spektrum komplexu porfyrin-Zn(II) [38].



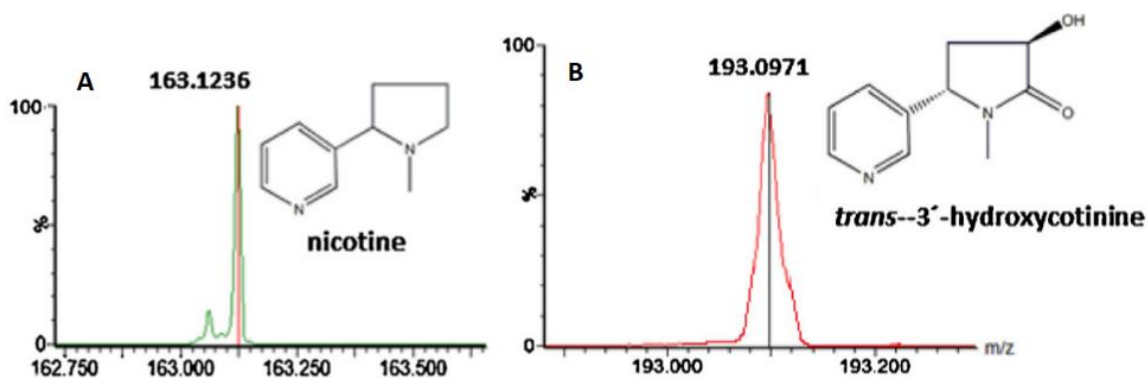
Obr. 9: Vliv teploty na hmotnostní spektra komplexu porfyrin-Zn(II). Zn pík byl detekován při 300 °C a při 600 °C byl detekován pouze porfyrin bez kovu (převzato z cit. [38] a upraveno).

Užívání tabákových výrobků je příčinou nemocí a úmrtí po celém světě. V současné době tabák zabíjí více než pět milionů lidí ročně. Kouření tabáku je vysoce návykové, což je způsobeno vysokou koncentrací nikotinu přítomného v cigaretách. Nikotin a jeho hlavní metabolit kotinin, používaný jako tabákový biomarker, lze nalézt po expozici tabákem v moči, krvi, slinách nebo i v jiných biologických matricích, jako jsou např. vlasy. Ačkoli koncentrace těchto biomarkerů jsou velmi vysoké u těžkých kuřáků, mohou být také detekovány u pasivních kuřáků i nekuřáků [39].

D. Carrizo a kol. [40] zkoumali novou metodu screeningu pro přímou analýzu biomarkerů tabákového kouře. ASAP s analyzátozem doby letu (ASAP-MS-TOF) byl využit

pro přímou analýzu vzorků moči a slin. Ty byly poskytnuty dobrovolníky, kteří vykouřili 20 a více cigaret denně. Vzorkování probíhalo tak, aby bylo možné sledovat časový průběh a rozmanitost biomarkerů v různých fázích dne. Ve slinách i moči bylo nalezeno mnoho metabolitů. Nikotin, kotinin a trans-3-hydroxykotinin byly nalezeny ve vzorcích slin, zatímco vzorek moči obsahoval navíc i nikotin-N-glukuronid. Hodnoty koncentrací metabolitů se liší podle času odběru. Podle očekávání nejvyšší koncentrace nikotinu ve slinách byly nalezeny ve vzorku odebraném ihned po vykouření první cigarety. Stejně to bylo u kotininu. V moči, kterou je kotinin vylučován, byly nalezeny nižší koncentrace v důsledku naředění. Další metabolit nikotinu trans-3-hydroxykotinin byl nalezen hlavně v moči a v nižších koncentracích také ve slinách. Nejvyšší koncentrace tohoto metabolitu byla zjištěna ve vzorku moči odebraného ihned ráno a souvisí s jeho kumulací v těle [40].

Za účelem prozkoumání možností techniky ASAP byl proveden široký screening s mnoha dalšími tabákovými biomarkery, jako jsou hydroxylové metabolity polycyklických aromatických sloučenin (např. hydroxypyren nebo hydroxyfenanthren), anatabin nebo methyladenin, specifické nitrosaminy či benzen. Obr. 10 znázorňuje hmotnostní spektra vybraných látek získaná ze vzorku slin [40].



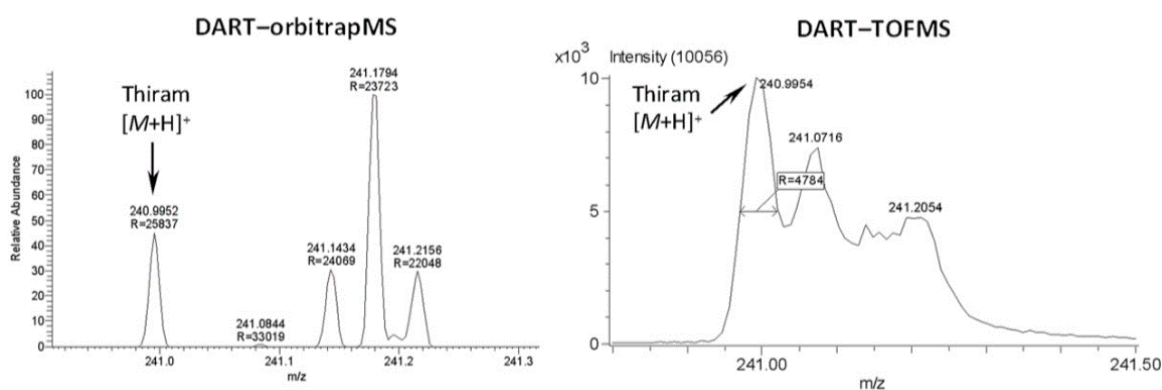
Obr. 10: Hmotnostní spektra nikotinu (A) a trans-3-hydroxykotininu (B) ze vzorku slin (převzato z cit. [40] a upraveno).

2.2.3 Využití ambientních ionizačních technik v analýze potravin

V následující kapitole jsou představeny příklady sloučenin, které byly ve vzorcích potravin sledovány prostřednictvím hmotnostní spektrometrie s využitím ambientních ionizačních technik.

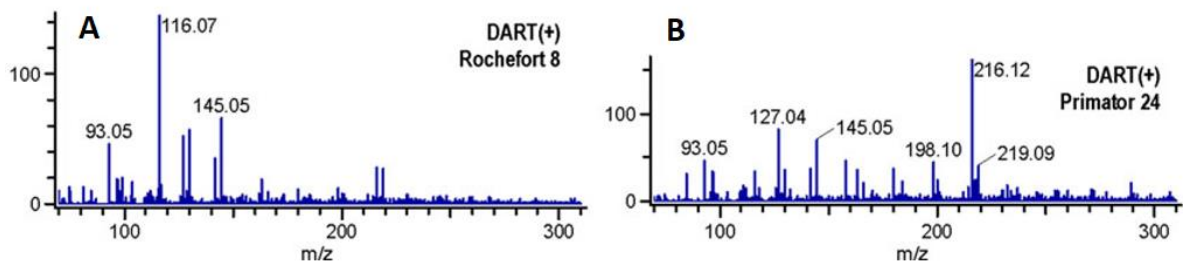
Prvním z příkladů těchto látek jsou dithiokarbamáty (DTC), které jsou používány jako fungicidy. Studie *T. Čajky a kol.* se zabývala použitím hmotnostní spektrometrie pro stanovení jednotlivých DTC, konkrétně thiramu a ziramu v ovoci [25]. Pro jejich rychlou analýzu byly využity dva iontové zdroje - přímá analýza v reálném čase (DART)

s hmotnostním analyzátozem doby letu (TOF) nebo Orbitrapem a desorpční elektrosprej (DESI) v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) s analyzátozem lineární iontovou pastí. Pro měření DESI i DART byly vzorky získány povrchovou extrakcí neporušeného produktu acetonitrilem. Oběma technikami bylo možné přímo detekovat jak thiram, tak v případě techniky DART byla rovněž detekována i druhá sloučenina ziram. Limit detekce thiramu byl pomocí DART-Orbitrap MS stanoven na 0,1 mg/kg a na 1 mg/kg pomocí DESI-MS/MS. Hmotnostní spektrum thiramu získané technikou DART je uvedeno na obr. 11. Experiment DART-TOF umožnil detekovat také ziram v koncentraci 0,5 mg/kg. Detekovatelnost obou DTC byla prokázána na úrovni maximálních legálních hladin (MRL) povolených v hruškách. V porovnání obou technik by byla DART preferovanější kvůli vyšší výtěžnosti a použitelnosti [25].



Obr. 11: Hmotnostní spektrum thiramu získaného DART s analyzátozem Orbitrap a TOF (převzato z cit. [25] a upraveno).

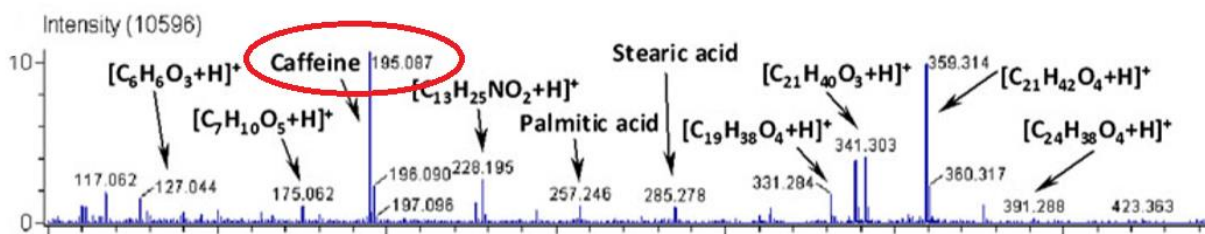
T. Čajka a kol. se ve své další studii [41] zaměřili na použití techniky DART-MS s analyzátozem doby letu (TOF) pro určení původu pív. Autoři v prvním kroku nejdříve optimalizovali experimentální podmínky DART-TOF-MS tak, aby dosáhli co nejširší škály ionizovatelných sloučenin vyskytujících se ve vzorcích pív. Konkrétně se jednalo o kyselinu propionovou, mléčnou a maleinovou, dále o glukózu, prolin, maltol aj. Následně byla získána hmotnostní spektra pív různých značek a naměřená experimentální data byla poté analyzována pomocí statistických metod s cílem rozlišit trapistická a jiná piva. Trapistická piva jsou speciálně kvašené druhy piva vyráběné v kláštorech zejména v Belgii. Jsou velice žádaná a řadí se mezi jedny z nejlepších druhů pív na světě. Hmotnostní spektrum rozlišující dva druhy pív znázorňuje obr. 12. Tato piva se od sebe liší variabilitou látek nalezených ve spektrech. Signály při m/z 116 a 127 odpovídají protonovaným molekulám prolinu a maltolu [41].



Obr. 12: Hmotnostní spektra piv Rochefort 8 (A) – trapistické a Primator 24 (B) – netrapistické (převzato z cit. [41] a upraveno).

Studie provedená na vzorcích piv prokázala, že DART-TOF-MS je výkonná analytická technika, která umožňuje provádět monitorování kvality a ověřování pravosti vzorků potravin [41].

H. Daňhelová a kol. také svojí prací potvrdili využitelnost techniky DART-TOF-MS při analýze kofeinu v různých vzorcích kávy. Navržená metoda zahrnovala jednoduchou extrakci testovaných vzorků horkou vodou. Byla provedena nejen detekce kofeinu, ale rovněž i jeho kvantifikace, přičemž množství kofeinu se pohybovalo v rozmezí od 16,9 – 26,9 mg/ml pro vzorky mleté kávy, 22,4 – 51,7 mg/ml pro vzorky instantní kávy a 0,5 – 2,2 mg/ml pro kávy připravené z kapslí. Obr. 13 ukazuje hmotnostní spektrum jednoho ze vzorků kávy [42].



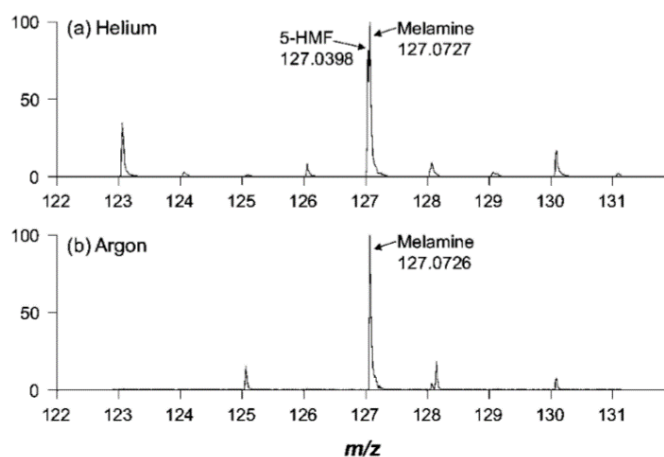
Obr. 13: Hmotnostní spektrum vzorku kávy Arabica získané v pozitivním módu (převzato z cit. [42] a upraveno).

Autoři provedli taktéž porovnání výsledků DART analýzy s výsledky získanými metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Hlavní předností techniky DART oproti HPLC byla především její rychlost, jednoduchost a nízké náklady [42].

V roce 2008 byla v Číně odhalena velká aféra s pančováním mléka a mléčných výrobků, určených zejména pro děti. Do těchto výrobků byl výrobcí uměle přidáván melamin, což je průmyslová chemická látka využívající se v plastech. Má velký obsah dusíku a byla do potravin přidávána za účelem maskování nízkého obsahu proteinů. Přidání

této chemikálie do potravin způsobilo zejména onemocnění ledvin desetitisíců dětí a bohužel došlo i k několika úmrtím [43]. 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) je sloučenina vytvářející se zahříváním sušeného mléka. Protonovaný 5-HMF má stejné m/z jako protonovaný melamin, tedy 127 a může interferovat s přímou analýzou melaminu v sušeném mléce [44].

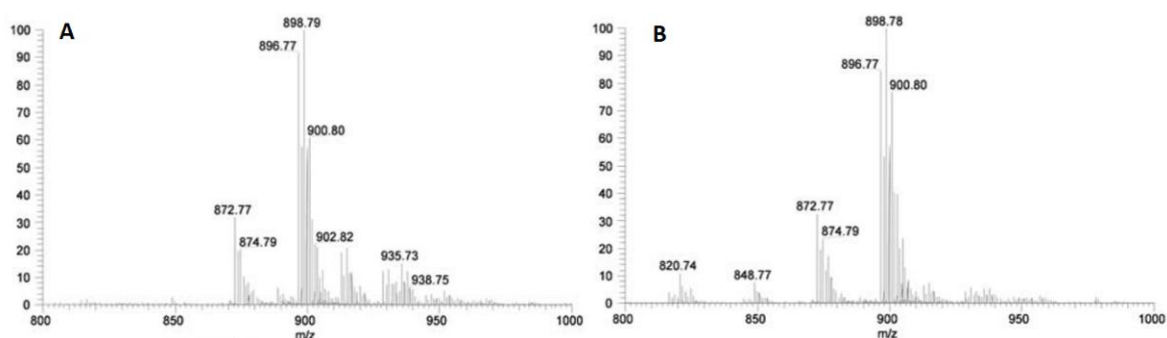
Publikace *A. J. Dane a R. B. Codyho* uvádí metodu přímé analýzy pomocí DART-MS pro selektivní ionizaci melaminu a odstranění interference 5-HMF. K ověření eliminace 5-HMF a potvrzení přítomnosti melaminu byly použity údaje nasbírané hmotnostní spektrometrií s vysokou rozlišovací schopností. Při optimalizaci podmínek byl zvolen argon jako nosný plyn, protože netvoří protonované adukty s vodou, a tím pádem nedochází k tvorbě protonovaného 5-HMF (obr. 14). Předběžné výsledky studie naznačují detekční limit pro melamin odpovídající koncentraci 1 ppm nebo nižší [44].



Obr. 14: Hmotnostní spektrum 10 ppb melaminu v sušeném mléce za použití helia **(a)** a argonu **(b)** jako nosného plynu (převzato z cit. [44] a upraveno).

DART byl také použit v podobné aplikaci *L. Zhang a kol.* pro rychlé stanovení dikyandiamidu (DCD) přítomného v sušeném mléce. Po jednoduchém postupu extrakce vzorku následovalo přímé stanovení dikyandiamidu, který bylo možno detekovat na úrovni pouhých 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [45]. *B. Avula a kol.* uvádí použití DART pro rozpoznání pravé skořice – *Cinnamon verum* na základě měření specifických látek, jako je např. kumarin, od dalších skořicových druhů, které se běžně používají [26]. V publikaci *L. Vaclavíka a kol.* byl zase tento iontový zdroj využit ke kvantitativní analýze mykotoxinů jako deoxynivalenol, zearalenon, alternariol a dalších v pšenici a kukuřici. Metoda byla velice citlivá a nejnižší detekční limit byl stanoven na 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [46]. Velké množství publikací naznačují, že technika DART se řadí mezi jednu z nejpoužívanějších ambientních ionizačních technik právě v oblasti analýzy potravin.

Desorpční elektrosprej (DESI) byl *S. Gerbigem a Z. Takátsem* použit pro analýzu triglyceridového složení a oxidačního chování vzorků jedlých olejů a margarínů [47]. Měření byla prováděna v pozitivním iontovém režimu a triglyceridy byly detekovány jako adukty alkalických kovů nebo amoniaku. Vzorky olejů jako je slunečnicový, olivový, arganový, pistáciový a další byly nanášeny v podobě tenkého filmu na skleněnou podložku a následně analyzovány. Autoři rovněž podrobili analýzám vzorky čokolády. Ve spektrech těchto vzorků byly pozorovány triglyceridové monomery a dimery. K určení struktury triglyceridů byla použita tandemová hmotnostní spektrometrie. Bylo prokázáno, že koncové mastné kyseliny se odštěpují častěji než vnitřní mastné kyseliny. Data triglyceridů byla analyzována metodou analýzy hlavních komponent (PCA). U jednoho ze vzorků oleje, který byl po několik dní vystaven vzduchu a slunečnímu záření, byla pozorována oxidace projevující se nárůstem charakteristických hydroperoxidů v získaných spektrech. Porovnání hmotnostních spekter dvou produktů znázorňuje obr. 15 [47].



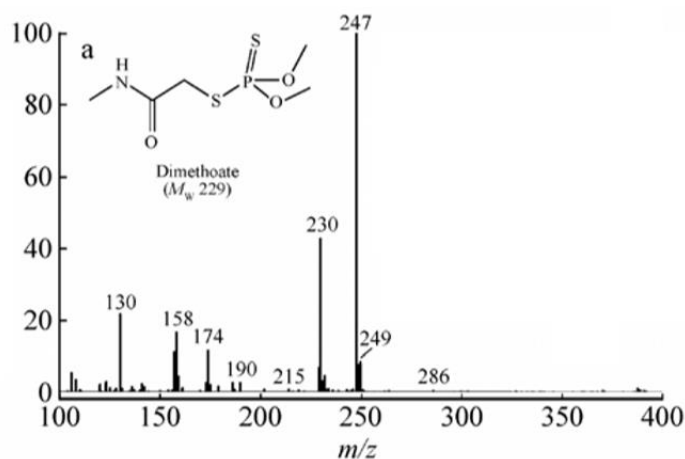
Obr. 15: Porovnání hmotnostních spekter slunečnicového oleje (A) a margarínu (B) získané DESI v pozitivním módu (převzato z cit. [47] a upraveno).

Technika DESI se osvědčila v aplikacích pro kontrolu bezpečnosti a kvality v potravinářském průmyslu. Původ, druh a jakost olejů a tuků lze určit jak u přísad, tak u připravených pokrmů. Lze také odhalit možné padělání a ochuzování potravin o nutriční hodnoty. Popsaná technika může být využita ale i při identifikaci triglyceridů v otiscích prstů a nalézt tak potenciální použití ve forenzní chemii [47].

Další použití desorpčního elektrospreje uvádí publikace *H. W. Chen a kol.*, ve které byla technika DESI použita pro rychlou a přímou detekci sudanových barviv Sudan I, Sudan II, Sudan III a Sudan IV v různých potravinách, konkrétně v mletém chilli, rajčatové omáčce, klobásách a smaženém vejci. Všechny analyty poskytovaly dominantní signály při m/z 249, 277, 353, 381, které odpovídaly protonovaným molekulám sudanových barviv. Struktury protonovaných molekul byly potvrzeny MS/MS experimenty poskytujícími charakteristické

fragmenty zmíněných látek. Autoři také navrhli spojení zdroje DESI pro miniaturní hmotnostní spektrometr umožňující rychlou analýzu vzorků bez jejich předúpravy [48].

Organofosfátové pesticidy jsou široce používanou skupinou účinných insekticidů. Avšak jejich použití vzbuzuje v posledních letech velké obavy kvůli jejich potenciálním rizikům pro lidské zdraví. Pro stanovení stopového množství dimethoátu v džusu představili *J. Wang a kol.* rychlou analytickou metodu založenou na analýze pomocí povrchové desorpce chemickou ionizací za atmosférického tlaku (SDAPCI-MS). Analyzovaným vzorkem byl pomerančový džus, který byl pro analýzu použit bez jakékoliv předchozí úpravy. Ke vzorkování byl použit v laboratoři vyrobený nanolitrový vzorkovač. Minimální objem vzorku byl 0,11 nl. Naměřený signál m/z 230 odpovídá iontu $[M+H]^+$ dimethoátu (obr. 16) [49].

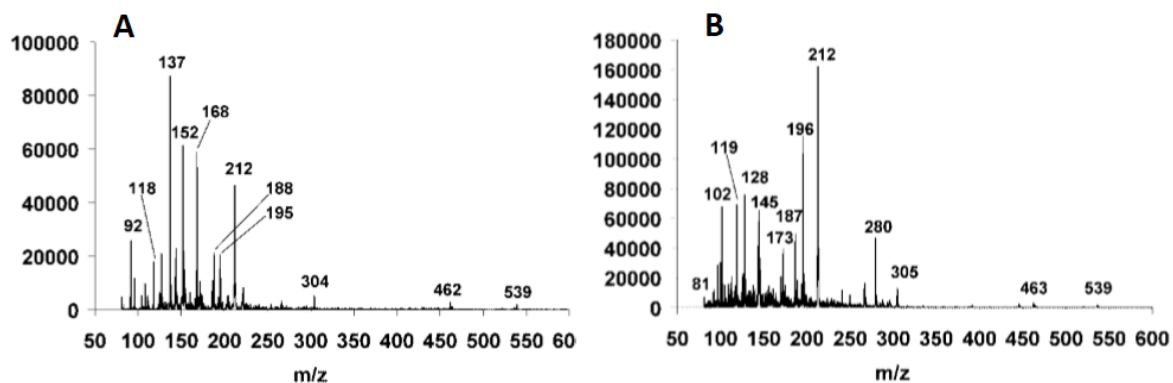


Obr. 16: Hmotnostní spektrum dimethoátu získané pomocí SDAPCI v pozitivním režimu (převzato z cit. [49] a upraveno).

Na základě experimentálních výsledků byl detekční limit dimethoátu stanoven na $1,2 \cdot 10^{-11}$ mg/kg. Výsledky této studie ukázaly, že vyvinutá analytická metoda umožňuje rychlou detekci reziduí pesticidů v matričně složitých vzorcích za současné spotřeby minimálního objemu vzorku [49].

Dalším příkladem využití desorpce chemickou ionizací za atmosférického tlaku (DAPCI-MS) je studie *H. Chena a kol.*, kteří tuto techniku aplikovali při rychlé analýze různých vzorků čaje [50]. V rámci provedených experimentů autoři analyzovali celkem 40 vzorků čaje, včetně zeleného, jasmínového a čaje oolong. Každé měření bylo provedeno s 500 mg čajových lístků, které byly analyzovány přímo bez dalšího zpracování. V naměřených hmotnostních spektrech byly identifikovány unikátní markery, které byly pro daný typ vzorku čaje charakteristické, což bylo využito při statistickém zpracování pomocí

analýzy hlavních komponent. Na obr. 17 je znázorněno porovnání hmotnostních spekter vybraných čajů. Ve spektrech byly shodně nalezeny signály při m/z 195 a 118, které odpovídají protonovaným molekulám kofeinu a indolu [50].

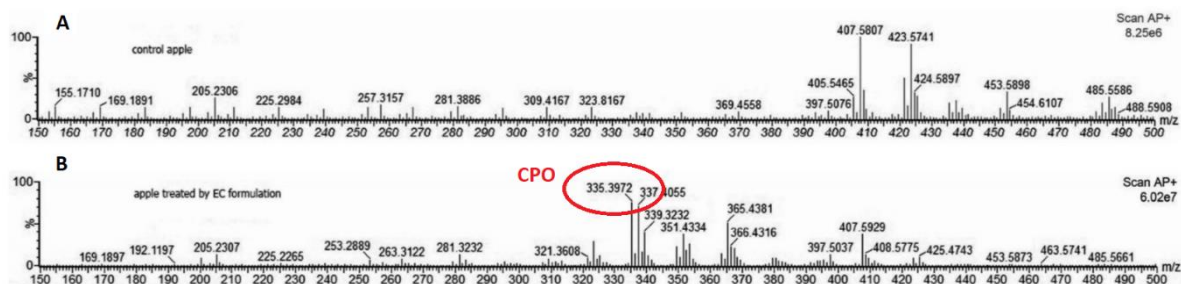


Obr. 17: Hmotnostní spektrum jasmínového (A) a zeleného čaje (B) (převzato z cit. [50] a upraveno).

Chlorpyrifos (CPS) je organofosfátový insekticid používaný jak v zemědělských přípravcích, tak ve vojenství. V České republice se řadí mezi jeden z nepoužívanějších insekticidů. V lednu 2020 však byl spolu s dalšími dvěma insekticidy Evropskou unií zakázán.

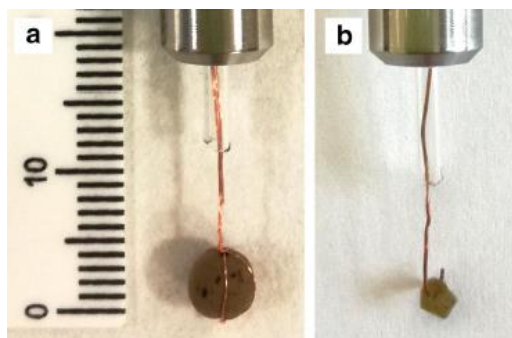
CPS může být detekován v ovoci, zelenině, vodě, půdě a tělních tekutinách, dokonce i měsíce až roky po jeho aplikaci. K tomu dochází zejména po neprofesionální aplikaci zemědělských přípravků. Degradací proces CPS vede ke vzniku látek, které jsou pro člověka velmi toxické a způsobují těžká onemocnění s desítkami tisíc úmrtí ročně na celém světě. Rizikovými faktory jsou způsob aplikace tohoto pesticidu, nedodržení čekací doby mezi ošetřeními a používání vyšších dávek, než které jsou povoleny. Koncentrace CPS a jeho degradačních produktů v matricích jako jsou potraviny, voda, zemědělské výrobky, krev či moč by měly být pravidelně monitorovány, což klade vysoké nároky na použité analytické techniky z hlediska citlivosti a rychlosti. Příkladem lze uvést studii *M. R. Cvijoviće a kol.* [51], kteří použili ASAP-MS pro detekci CPS a jeho degradačního produktu (chlorpyrifos-oxonu; CPO) v jablkách. Autoři získané výsledky rovněž porovnali a potvrdili validovanými technikami UPLC-PDA a GC-MS. Koncentrace CPS a CPO stanovené ASAP-MS a UPLC-PDA vykazovaly přijatelné rozdíly (v průměru o 10–20 %), což prokazuje, že ASAP-MS může být nástrojem pro semikvantitativní analýzu těchto sloučenin. Na obr. 18 je porovnání hmotnostních spekter jablka (A) a jablka ošetřeného

roztokem aktivní substance CPS a H₂O₂ (B), což simulovalo degradaci CPS a produkci CPO [51].



Obr. 18: Hmotnostní spektra z analýzy jablka (A) a jablka ošetřeného roztokem CPS a H₂O₂ (B) s jasně viditelným signálem při 335 *m/z*, který odpovídá degradačnímu produktu CPO (převzato z cit. [51] a upraveno).

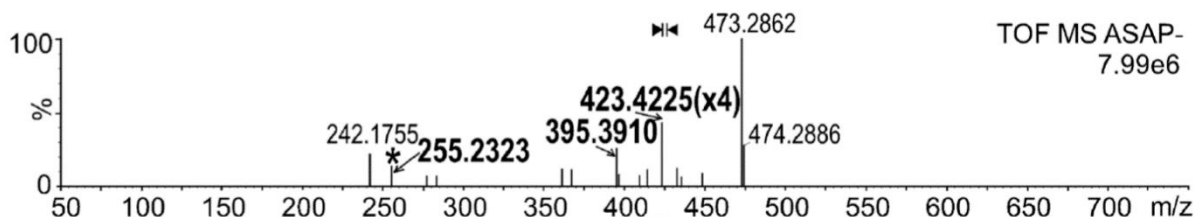
Technika ASAP byla aplikována rovněž na Katedře analytické chemie PřF UP v Olomouci k povrchové analýze rostlinného materiálu, konkrétně se jednalo o dva genotypy semen hrachu setého. Tato studie se zabývala profilováním mastných kyselin přítomných na jejich povrchu, přičemž v kombinaci s vícerozměrnou statistikou umožňovala klasifikaci genotypů hrachu. Semena byla analyzována jak v neporušené formě (celá semena), tak po preparaci na malé části. Komerční ASAP skleněná tyčinka byla pro měření upravena tak, aby udržela analyzovaný materiál (viz obr. 19). Pro analýzu celých semen byla také vytvořena drátěná klec [52].



Obr. 19: Úprava skleněné kapiláry – drátěná klec pro analýzu celých semen (a) a háček pro analýzu preparovaných kousků (b) (převzato z cit. [52] a upraveno).

Experimenty ukazují, že pomocí ASAP je možné snadno uvolnit a ionizovat nasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem - kyselinu hexakosanovou a oktakosanovou ze standardních roztoků, z výtažků z hrachových semen, ale i přímo z jejich povrchu. Obr. 20 znázorňuje hmotnostní spektrum neporušeného semene hrachu. Signály při *m/z* 395 a 423

odpovídají kyselinám hexakosanové a oktakosanové. Intenzita signálu celého neporušeného semena byla vyšší než intenzita malých preparovaných částí [52].



Obr. 20: Hmotnostní spektrum neporušeného semene hrachu (genotyp L100) získané technikou ASAP v negativním módu (převzato z cit. [52] a upraveno).

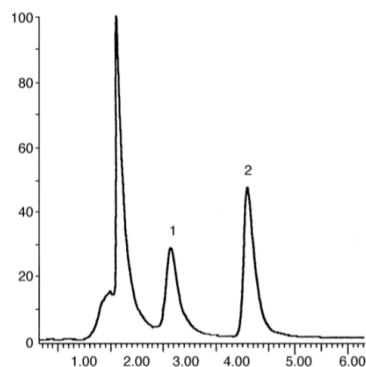
ASAP-MS poskytovala vyšší selektivitu a lepší signál mastných kyselin ve srovnání s technikou MALDI-MS, se kterou byl tento experiment porovnáván. Metoda navržená v této publikaci včetně získaných výsledků může nalézt své uplatnění nejen v biologickém, ale i potravinářském a zemědělském výzkumu [52].

2.3 Metody stanovení konzervačních látek v potravinách

Ke stanovení konzervačních látek v potravinách se v dnešní době využívají zejména chromatografické metody. Nejvíce využívanou technikou je podle množství publikací jednoznačně kapalinová chromatografie. V této kapitole je stanovení konzervačních látek rozděleno podle použité techniky.

2.3.1 Kapalinová chromatografie

I. Ferreira a kol. se ve své studii zabývali isokratickou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií pro stanovení kyseliny benzoové a kyseliny sorbové v průmyslově vyráběném kdoulovém džemu. Pro předúpravu vzorků bylo navrženo několik postupů, přičemž za nejvhodnější byla zvolena extrakce ethanolem a methanolem. Další úprava vzorku byla provedena jeho rozpuštěním v kyselině chlorovodíkové, filtrací přes vatou a následným prolitím roztoku přes SPE kolonu. Eluce kyselin zadržovaných v SPE kolonce byla provedena methanolem. Poté byly vzorky centrifugovány, filtrovány a analyzovány. Chromatografická separace byla provedena na koloně C18 s použitím acetátového pufru a methanolu (65/35; v/v) jako mobilní fáze. Obě kyseliny byly detekovány v UV oblasti při 235 nm pomocí detektoru s diodovým polem (DAD). Účinné separace bylo dosaženo za méně než 7 minut. Detekční limity pro kyselinu benzoovou a sorbovou byly stanoveny na 25, respektive 6,25 mg/kg. Obr. 21 ukazuje chromatografický záznam jednoho ze vzorků [53].



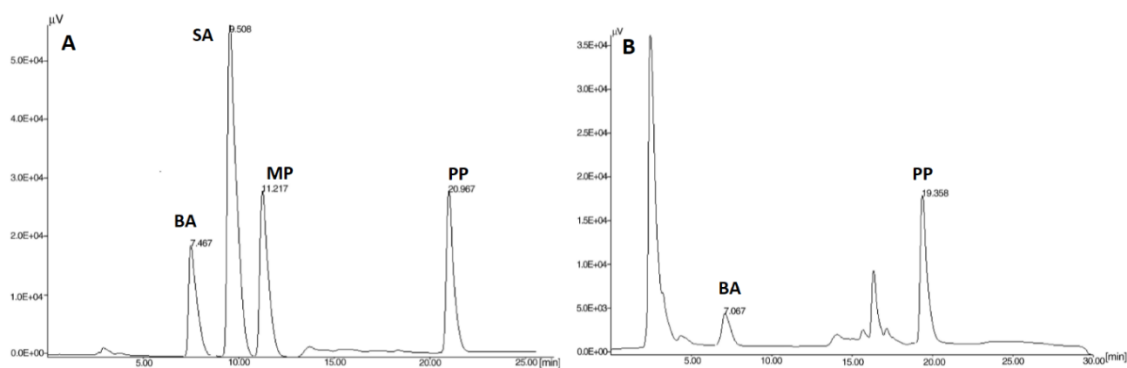
Obr. 21: Chromatogram jednoho ze vzorků džemu s píky kyseliny benzoové (**1**) a sorbové (**2**) (převzato z cit [53] a upraveno).

V případě analýzy reálných vzorků byla testována přítomnost kyseliny benzoové a kyseliny sorbové v celkem 11 kdoulových džemech dostupných na portugalském trhu. Všechny z analyzovaných vzorků obsahovaly kyselinu benzoovou, a to v rozmezí od $413,9 \pm 10,4$ do $1501 \pm 4,2$ mg/kg. Kyselina sorbová byla přítomna pouze ve dvou vzorcích džemu, a to $515,0 \pm 7,0$ a $908,3 \pm 5,3$ mg/kg [53].

Dalšími široce používanými konzervačními látkami jsou parabeny, které se využívají zejména ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Své uplatnění však nachází také v potravinách. Analýza běžně používaných parabenů v různých potravinářských vzorcích byla provedena technikou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi (RP-HPLC). Vzorky byly před analýzou extrahovány methanolem, centrifugovány a poté filtrovány. Nakonec bylo ke každému vzorku přidáno 25 μ l vnitřního standardu esomeprazolu. Separace proběhla na koloně C18 s mobilní fází methanol-voda (57:43, v/v). Látky byly detekovány pomocí detektoru s diodovým polem. Limity detekce parabenů se pohybovaly mezi 0,005 až 0,02 μ g/g. Největší množství bylo nalezeno v pekařských výrobcích, uzeninách, zpracovaných sýrech a džemech [54].

B. Saad a kol. uvádí techniku vysokoúčinné kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi, která umožňuje separaci a současné stanovení konzervačních látek kyseliny benzoové (BA), kyseliny sorbové (SA), methyl- (MP) a propylparabenu (PP) v celkem 67 různých potravinářských vzorcích (nealkoholické nápoje, sušené ovoce, džemy, konzervované ovoce a zelenina). Pevné vzorky byly před extrakčním krokem jemně rozemlety a rozpuštěny v methanolu. Poté byly vzorky sonifikovány a přesunuty do zkumavek. Ty byly následně třepány, jejich obsah zfiltrován a čirý roztok byl odebrán k HPLC analýze. Pro eluci BA, SA a MP byla použita mobilní fáze methanol-acetátový pufr (35:65, v/v). Změnou mobilní fáze na methanol-acetátový pufr (50:50, v/v) bylo možné

eluovat PP. Vlnová délka detektoru byla nastavena na 254 nm. Za těchto podmínek bylo dosaženo separace všech čtyř složek za 23 minut. Retenční časy pro BA, SA, MP a PP se pohybovaly okolo 7,5, 8,5, 11,2, respektive 21,0 min. Porovnání chromatogramů standardu a jednoho ze vzorků je znázorněno na obr. 22 [3].



Obr. 22: Chromatogram standardů BA, SA, MP a PP (A) a chromatogram vzorku konzervované zeleniny s detekovanými píky BA a PP (B) (převzato z cit. [3] a upraveno).

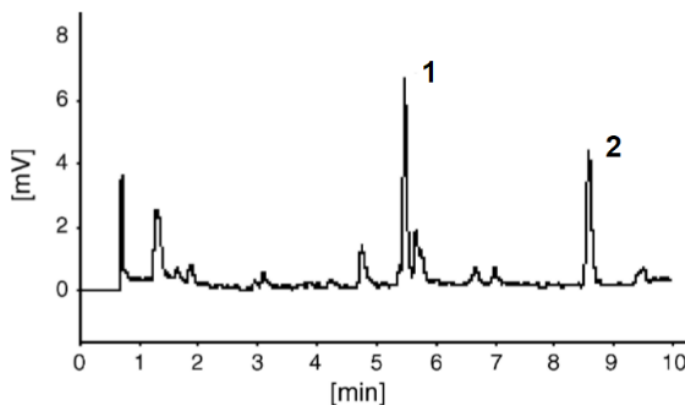
Detekční limity byly 0,5; 0,1; 0,3 a 0,1 mg/l pro BA, SA, MP a PP. Bylo zjištěno, že postup předúpravy vzorku v kombinaci s metodou HPLC je vhodný pro rutinní stanovení těchto konzervačních látek v potravinách [3].

Technika RP-HPLC s UV detekcí byla také použita v práci *C. Guarina a kol.* ke kvantifikaci čtyř konzervačních látek v různých druzích sýrů [55]. Konkrétně se jednalo o kyselinu benzoovou, sorbovou, natamycin a lysozym. Předúprava vzorků byla provedena extrakcí. Nastrouhané vzorky sýrů byly nejprve homogenizovány v 50 ml extrakčního roztoku (1 mol/l NaCl ve směsi 0,1 mol/l acetátového pufru a methanolu (2:1, v/v)). Suspenze byla poté umístěna do ultrazvukové lázně, následně odstředěna a supernatant zfiltrován. Byla použita gradientová eluce 0,1 % trifluoroctovou kyselinou ve vodě a 0,1 % trifluoroctovou kyselinou ve směsi acetonitril/tetrahydrofuran (5:1, v/v). Všechny přítomné konzervační látky byly detekovány při 280 nm. Vzorky sýrů mozzarely, asiaga nebo parmezánu neobsahovaly výše uvedené konzervační látky. Ani jeden z analyzovaných vzorků neobsahoval kyselinu benzoovou. U sýrů typu provolone byla zjištěna kyselina sorbová a natamycin 48, respektive 221 µg/g. Stejně látky byly nalezeny u vzorku kozího sýra 38 a 3,2 µg/g. Dalším sýrem, který obsahoval konzervační látky, bylo grana padano, u kterého byl stanoven lysozym 176 µg/g [55].

2.3.2 Plynová chromatografie

Simultánní detekce kyseliny benzoové a sorbové v dresincích pomocí plynové chromatografie s plameno-ionizačním detektorem (GC-FID) v kombinaci s headspace mikroextrakcí tuhou fází (HS-SPME) byla popsána v publikaci *C. Dong a kol.* Dresink Tisíc Ostrovů, Hellmann's salátový dresink a rajčatový kečup byly před samotnou analýzou upraveny. Vzorky byly smíchány s 1 ml NaOH (1 mol/l), doplněny na definovaný objem destilovanou vodou a po promíchání zfiltrovány. Head space mikroextrakce byla provedena smícháním alikvotního dílu 10 μ l standardního roztoku kyseliny sorbové a benzoové, 2,5 ml kyseliny sírové, 2,5 ml destilované vody (nebo roztoku vzorku) a 2,5 g bezvodého síranu sodného do 12 ml vialek. Takto připravené roztoky byly za stálého míchání zahřívány na vodní lázni. Následně bylo do prostoru nad roztokem ponořeno vlákno, na jehož povrchu se látky sorbovaly po dobu 40 minut při teplotě 70 °C. Po ukončení procesu extrakce bylo vlákno vloženo do GC nástřiku, kde bylo vystaveno teplotě 260 °C a sorbované analyty byly uvolněny do plynového chromatografu [56].

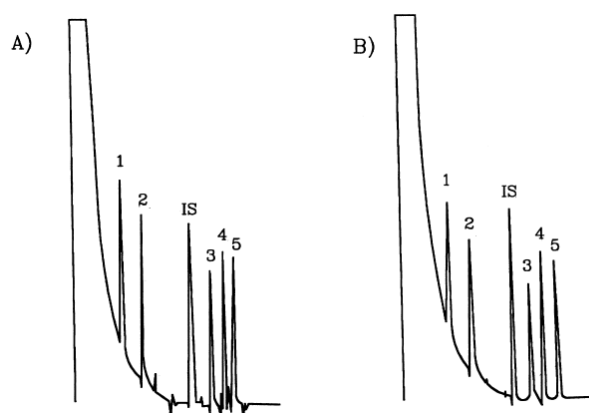
Meze detekce byly 2,00 μ g/l pro kyselinu sorbovou a 1,22 μ g/l pro kyselinu benzoovou. Metoda vykazovala dobrou linearitu s korelačními koeficienty 0,9986 pro kyselinu sorbovou a 0,9994 pro kyselinu benzoovou. Praktická použitelnost byla prokázána současným stanovením kyseliny sorbové a benzoové ve třech komplexních vzorcích. Záznam analýzy jednoho ze vzorků je na obr. 23 [56].



Obr. 23: Chromatogram z analýzy vzorku dresinku Tisíc Ostrovů s přítomností píku kyseliny sorbové (1) a benzoové (2) (převzato z cit. [56] a upraveno).

M. González a kol. se rovněž zabývali stanovením kyseliny sorbové a benzoové v různých potravinových vzorcích pomocí plynové chromatografie s plameno-ionizační detekcí (GC-FID) a on-line extrakcí tuhou fází (SPE). Vzorky nealkoholických nápojů byly před analýzou odplyněny v ultrazvukové lázni. Poté k nim byl přidán vnitřní standard 2-tert-

butyl-4-methylfenol a nakonec zředěny 25 ml 0,1 M HNO₃. Alikvotní díl 5 ml byl následně zaveden do průtočného SPE systému, ve kterém došlo k izolaci a zakoncentrování konzervačních látek. K dalším vzorkům jako jogurty, omáčky a džemy byl přidán vnitřní standard a směs se v oddělovací nálevce smísila s 25 ml HCl a 2 ml chloristanu draselného. Vodná fáze byla dvakrát extrahována 10 ml diethyletheru. Následně byla ethyletherová fáze odpařena do sucha a rezidua rozpuštěna v 25 ml 0,1 M HNO₃. Alikvotní díl 5 ml byl zakoncentrován v SPE systému a následně přes on-line spojení zaveden do plynového chromatografu, přičemž samotné separace všech analytů bylo dosaženo za méně než 5 minut. Chromatogramy z analýzy standardů konzervační látek na dvou různých chromatografických kolonách znázorňuje obr. 24 [57].



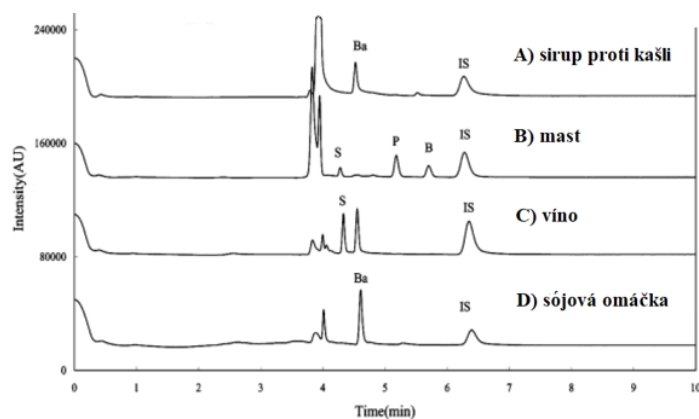
Obr. 24: Chromatogramy standardů z analýzy na kolonách HP-50 (A) a HP-5 (B) – kys. sorbová (1), kys. benzoová (2), vnitřní standard (IS) a směs parabenů (3, 4, 5) (převzato z cit. [57] a upraveno).

Limity detekce pro obě kyseliny se pohybovaly mezi 0,1 – 0,2 mg/l. Současně byly detekovány pouze ve vzorku kečupu a švestkového džemu. Pálivý kečup obsahoval 280 mg/kg kyseliny sorbové a 255 mg/kg kyseliny benzoové. Ve švestkovém džemu bylo nalezeno 225 mg/kg kyseliny sorbové a 190 mg/kg kyseliny benzoové. V nealkoholických nápojích, které obsahovaly pouze jednu kyselinu, se koncentrace pohybovaly mezi 120 – 190 mg/kg. Vzorky jogurtů obsahovaly pouze kyselinu sorbovou, a to v koncentracích 175 – 280 mg/kg. Největší množství konzervační látky bylo nalezeno ve vzorku klasického kečupu, kde bylo detekováno 485 mg/kg kyseliny benzoové. Navržené spojení plynové chromatografie s on-line extrakcí tuhou fází a použití velmi nízkých hodnot pH při zpracování vzorku umožnilo vysoce citlivou a selektivní detekci vybraných konzervačních látek v různých potravinových vzorcích [57].

Pro současné stanovení sorbanů, benzoanů a parabenů v potravinách a nápojích byla v práci *C. De Luca a kol.* popsána technika plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Metoda monitorování vybraných iontů (SIM) umožnila jednoznačné stanovení sledovaných sloučenin. Použití této metody umožnilo eliminovat vliv interferujících látek přítomných v komplexní matici potravin, které jinak negativně ovlivňují většinu běžně používaných analytických technik. K analýze bylo vybráno 249 vzorků potravin a nápojů běžně dostupných v obchodech a trzích v okolí Říma. Ke každému vzorku (0,1 – 0,3 g) bylo přidáno 20 µg vnitřního standardu a destilované vody. Vzorky byly třikrát extrahovány diethyletherem a nadbytečné rozpouštědlo odpařeno. Takto upravené vzorky byly třepány s acetonitrilem a následně odstředěny. Alikvotní díl byl odpařen a ke zbytku bylo přidáno 50 µl bezvodého pyridinu. Následně byla provedena silanizace vzorků 50 µl *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu (BSTFA). Trimethylsilan-etherové deriváty byly analyzovány pomocí GC-MS. Detekční limity pro všechny stanovované látky se pohybovaly v rozmezí 100-200 pg. Mezi potraviny s největším obsahem konzervačních látek patřily potraviny obsahující majonézu (např. tuňákový salát), dále různé pekařské výrobky (zákusky a croissanty), ovocné džusy, šťávy nebo výrobky z mořských plodů [58].

2.3.3 Elektromigrační metody

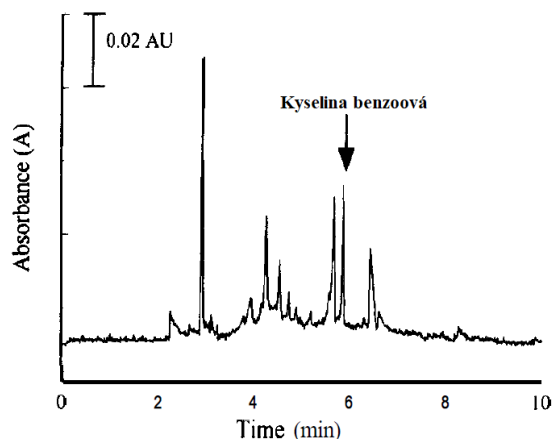
Využitím kapilární elektrochromatografie k analýze konzervačních látek se zabývali *H. Huang a kol.* [59]. Pět běžně používaných konzervantů (kys. sorbová a benzoová, ethyl-, propyl- a butylparaben) bylo úspěšně separováno a detekováno na monolitických kapilárách na bázi methakrylátového esteru. Za optimální podmínky pro analýzu byla zvolena mobilní fáze složená z fosfátového pufru a acetonitrilu (35:65 v/v). Jako vnitřní standard byl použit 4-dihydroxybenzofenon, který byl přidán ke každému roztoku standardu i reálnému vzorku v koncentraci 500 µg/ml. Komerčně dostupné vzorky byly před samotnou analýzou upraveny. Sirup proti kašli a hydratační přípravek na bázi vody byly zředěny methanolem na příslušný objem. Asi půl gramu hydratačního přípravku na bázi oleje a masti bylo smícháno s 1,5 ml methanolu. Takto vzniklá směs byla 10 minut sonifikována, centrifugována a čirý roztok byl odebrán k analýze. Pro sójovou omáčku a víno bylo odebráno 10 ml vzorku a upraveno extrakcí tuhou fází. Obr. 25 znázorňuje analýzu vybraných vzorků.



Obr. 25: Elektrochromatogram vybraných vzorků s identifikací píků – kys. benzoová (Ba), kys. sorbová (S), propylparaben (P), butylparaben (B), vnitřní standard (IS) (převzato z cit. [59] a upraveno).

V sirupu proti kašli byla nalezena pouze kyselina benzoová o koncentraci 280,5 $\mu\text{g/ml}$. Vzorek masti již obsahoval více konzervačních látek, konkrétně kyselinu sorbovou, propylparaben a butylparaben, a to 3,2, 3,1 a 2,2 mg/g . Vzorek vína obsahoval kyselinu sorbovou o koncentraci 117,3 $\mu\text{g/ml}$. V sójové omáčce byla odhalena kyselina benzoová v množství 164 $\mu\text{g/ml}$. Dva hydratační přípravky, jejichž záznam není na obrázku uveden, obsahovaly methylparaben v množství 937,3 $\mu\text{g/ml}$ a 3,15 mg/g . Metoda umožnila úspěšně identifikovat a stanovit vybrané konzervační látky v potravinách, farmaceutických a kosmetických výrobcích [59].

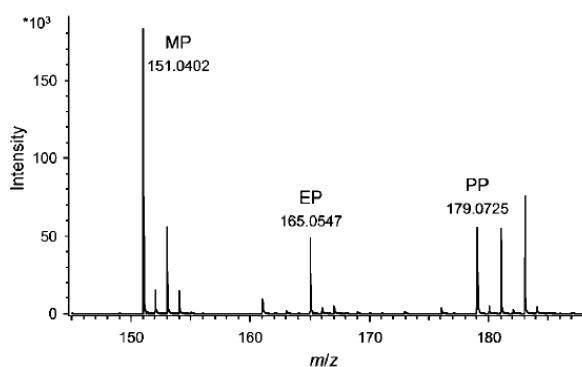
Ke stanovení běžně používaných konzervačních látek v různých vzorcích potravin byla v práci *K. Kua a kol.* využita vysokoúčinná kapilární elektroforéza s UV-VIS detekcí. Látky byly úspěšně separovány a identifikovány během 9 minut za použití borax-NaOH pufru o pH 10 s přidavkem 2 mmol/l α -cyklodextrinu. Tuhé vzorky byly před analýzou rozmělněny a extrahovány. Po extrakčním kroku následovala centrifugace po dobu 5 minut, po které byly vzorky připraveny pro analýzu. Vzorky sójových omáček byly připraveny pouhým smícháním 50 nebo 200 μl vzorku s 200 μl směsi ethanol:voda (1:1, v/v). Takto vzniklý roztok byl analyzován. Konzervační látky byly identifikovány na základě porovnání migračních časů standardů a měřených vzorků. V konzervovaných švestkách byla přítomna kyselina benzoová v množství 430,3 $\mu\text{g/ml}$. Kyselina sorbová v koncentraci 1276,1 $\mu\text{g/ml}$ byla nalezena v sušených fazolových luscích. První vzorek sójové omáčky obsahoval 615,7 $\mu\text{g/ml}$ kyseliny benzoové. Záznam z tohoto měření ukazuje obr. 26. V dalším vzorku sójové omáčky bylo nalezeno 49,3 $\mu\text{g/ml}$ n-butyl p-hydroxybenzoátu [60].



Obr. 26: Elektroferogram vzorku sójové omáčky s identifikací píku kyseliny benzoové (převzato z cit. [60] a upraveno).

2.4 Analýza konzervačních látek ambientními ionizačními technikami

Publikace *M. Haunschmidt a kol.* uvádí analýzu parabenů v kosmetických produktech pomocí DART-MS. Celkem 12 kosmetických produktů (opalovací krémy, mléka, oleje, make-up a rtěnka) bylo přímo analyzováno bez jakýchkoliv úprav. DART-MS umožnil jednoznačnou identifikaci a také kvantifikaci. Ve vzorku opalovacího mléka byly nalezeny běžně používané parabeny (methyl-, ethyl-, propyl- a butylparaben) v koncentracích 1,3; 0,9; 0,5 a 1,0 $\mu\text{g/ml}$. Další vzorky obsahovaly pouze některé z nich a ve většině vzorků nebyly parabeny přítomny. Obr. 27 ukazuje hmotnostní spektrum jednoho ze vzorků. Výsledky získané DART-MS byly srovnatelné s výsledky GC-MS, kterou byl experiment také proveden [61].



Obr. 27: Hmotnostní spektrum opalovacího mléka získané technikou DART v negativním módu. Signály m/z při 151, 165 a 179 odpovídají methyl-, ethyl- a propylparabenu. (převzato z cit. [61] a upraveno).

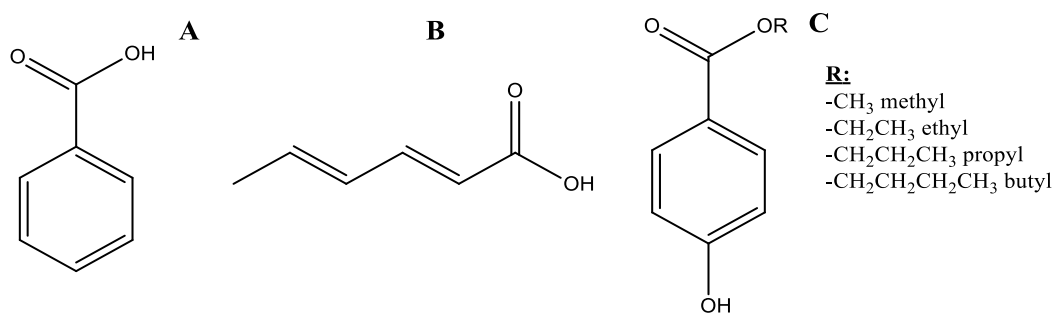
Další z aplikací je analýza konzervačních látek pomocí techniky označované jako papírový sprej (paper spray). Tato technika byla představena v roce 2010 [62] a řadí se rovněž mezi ambientní ionizační techniky. *M. Yu a kol.* ji použili pro rychlou kvantifikaci kyseliny benzoové v nealkoholických nápojích. Vzorky před analýzou byly pouze 10x zředěny methanolem a byl k nim přidán amoniak pro úpravu pH. Ten potlačil vliv matrice vzorku a došlo ke zvýšení intenzity kyseliny benzoové. Limit detekce kyseliny benzoové byl stanoven na 0,1 µg/ml. Paper spray poskytoval téměř totožné výsledky jako technika HPLC, která v publikaci byla použita jako srovnávací metoda [63].

Pro tuto diplomovou práci byla technika ASAP vybrána z důvodu, že podle dostupných publikací nebyla použita k analýze konzervačních látek v potravinách. Již v bakalářské práci se tato technika osvědčila jako vhodná pro tuto oblast analýzy [64]. Oproti bakalářské práci byla rozšířena skupina konzervačních látek a testovány různé úpravy vzorků před samotnou ionizací.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

Methanol HPLC kvality (Fisher Chemical, Pardubice, Česká republika), voda (upravena na přístroji Direct – Q VV Millipore), standardy: kyselina sorbová p.a (Fluka, Praha, Česká republika), benzoová p.a (Lachema Brno, Česká republika), methylparaben p.a (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), ethylparaben p.a (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), propylparaben p.a (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), butylparaben p.a (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Reálné vzorky potravin - Energy drink AH Basic, Mountain Dew, sójová omáčka Pearl River Bridge, Cola Fun a tělové mléko Dove. Obr. 28 zobrazuje struktury analyzovaných konzervačních látek.



Obr. 28: Strukturní vzorce analyzovaných konzervačních látek - kys. benzoová (**A**), kys. sorbová (**B**), parabeny (**C**).

3.2 Přístroje a nastavení parametrů

K měření všech standardů konzervačních látek a reálných vzorků byl použit *hmotnostní spektrometr Xevo TQD* (Waters, Manchester, Velká Británie) s iontovým zdrojem ASAP. Parametry nastavení zdroje ASAP jsou shrnuty v tabulce I, tabulky II a III pak shrnují parametry pro jednotlivé látky v negativním a pozitivním módu.

Tabulka I: Nastavení parametrů pro iontový zdroj ASAP.

Parametry	Hodnoty
Korónový proud	7 μ A
Teplota desolvatačního plynu (N ₂)	50 °C (a); 200 °C (b)
Průtok desolvatačního plynu	50 l/h
Teplota zdroje	100 °C

Pozn. a) 50°C pro kyseliny sorbovou a benzoovou, b) 200°C pro parabeny

Tabulka II: Nastavení parametrů pro jednotlivé látky v **negativním** módu.

#	název látky	sumární vzorec	prekurzorový ion (m/z)	napětí na kónusu (V)	fragmentové ionty (m/z)	kolizní energie (V)
1	Kyselina sorbová	C ₆ H ₈ O ₂	111	40	67	12
2	Kyselina benzoová	C ₇ H ₆ O ₂	121	40	77	12
3	Methylparaben	C ₈ H ₈ O ₃	151	40	136, 92	15
4	Ethylparaben	C ₉ H ₉ O ₃	165	40	137, 93	17
5	Propylparaben	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	179	40	136, 92	17
6	Butylparaben	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	193	40	136, 92	18

Tabulka III: Nastavení parametrů pro jednotlivé látky v **pozitivním** módu.

#	název látky	sumární vzorec	prekurzorový ion (m/z)	napětí na kónusu (V)	fragmentové ionty (m/z)	kolizní energie (V)
1	Kyselina sorbová	C ₆ H ₈ O ₂	113	40	95, 67	12
2	Kyselina benzoová	C ₇ H ₆ O ₂	123	40	105, 77	12
3	Methylparaben	C ₈ H ₈ O ₃	153	40	121, 94	12
4	Ethylparaben	C ₉ H ₉ O ₃	167	40	139, 121, 95	8
5	Propylparaben	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	181	40	163, 139	5
6	Butylparaben	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	195	40	139, 121, 95	8

3.3 Pracovní postupy

3.3.1 Příprava pracovních roztoků a reálných vzorků

Zásobní roztoky pro experimenty ASAP byly připraveny o koncentraci 1 mg/ml rozpuštěním navážky jednotlivých standardů v definovaných objemech směsi rozpouštědel methanol:voda (1:1, v/v). Pro analýzu byly 10x zředěny na výslednou koncentraci 0,1 mg/ml. Pro experimenty byly také připraveny směsi standardů. První směs obsahovala kyselinu sorbovou a benzoovou. Jako druhá byla připravena směs všech čtyř parabenů. Směsi byly připraveny zředěním zásobních roztoků odpovídajícími objemy směsi rozpouštědel methanol:voda (1:1, v/v).

Reálné vzorky byly zakoupeny z důvodu známé přítomnosti stanovovaných konzervačních látek. Složení energy drinku a sójové omáčky deklarovalo obsah benzoanu sodného (E211). V nápoji Mountain Dew byl podle etikety deklarován sorban draselný

(E202). Vzorek Cola Fun pak obsahoval obě výše uvedené látky – benzoan i sorban. Vzorky byly měřeny přímo bez jakýchkoliv úprav, ale i po předúpravách, které jsou popsány dále. Vzorky potravin obsahující parabeny se nepodařilo získat, jelikož nejsou v České republice v potravinách povoleny. K simulaci přítomnosti parabenů v reálném vzorku byly k 1 ml vzorku sójové omáčky přidány standardní roztoky ethyl- a propylparabenu (150 μ l roztoků o koncentraci 1 mg/ml). Směs byla důkladně promíchána a poté zanalyzována. Pro otestování techniky ASAP na reálném vzorku bylo provedeno měření vzorku tělového mléka Dove, ve kterém byly přítomny parabeny.

3.3.2 Předúpravy reálného vzorku

Na vzorku nápoje Cola Fun byly vyzkoušeny různé předúpravy za účelem potlačení vlivu matrice a zvýšení signálu přítomných konzervačních látek. Jako první bylo provedeno zředění vzorku methanolem v různých poměrech (1:4; 2:3 a 1:1). Následně byly vzorky 10 min. centrifugovány při 14000 ot/min (16 800 g). Supernatant byl odebrán a filtrován přes 0,45 μ m polyethersulfonový (PES) filtr. Takto připravené vzorky byly nanесeny na skleněnou kapiláru a analyzovány.

Další úprava vzorku byla provedena pomocí extrakce tuhou fází (SPE), ke které byla použita kolonka Phenomex Strata C18-E (55 μ m, 70 Å). Ta byla aktivována prolitím 2 ml methanolu a 4 ml destilované vody. Vzorek Cola Fun byl 10 min. centrifugován při 4400 ot/min (3000 g) a následně byl odebraný 1 ml supernatantu prolit kolonkou. K pročištění bylo přidáno 4 ml n-hexanu. Látky zadržené v sorbentu kolonky byly nakonec eluovány 3 ml methanolu. Extrakt byl před samotnou analýzou ještě zfiltrován přes 0,45 μ m (PES) filtr.

3.3.3 Příprava experimentů ASAP

Ke vzorkování byla použita 100 mm skleněná kapilára uložená v části ASAP sondy (obr. 29). Tato část byla jednoduše ponořena do roztoku standardu nebo vzorku a následně vložena do zbylé části ASAP sondy spojené s hmotnostním spektrometrem (obr 30). Před každou analýzou byla čistá kapilára uvnitř ASAP sondy vystavena teplotě 500 °C k odstranění možných přítomných interferencí z předchozích měření. Všechny experimenty byly provedeny v kladném i záporném módu. Skutečnost, že iontový zdroj není kontaminován, byla ověřena před každým novým měřením, sledováním hmotnostního spektra při vložení čisté kapiláry.



Obr. 29: Nanášení vzorku na skleněnou kapiláru uloženou v části ASAP sondy.

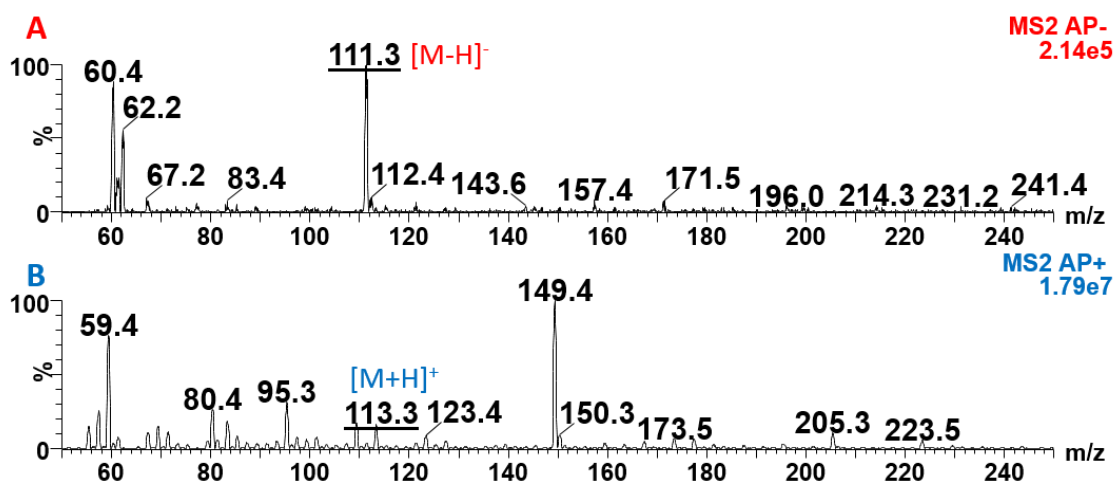


Obr. 30: Hmotnostní spektrometr Xevo TQD s iontovým zdrojem ASAP.

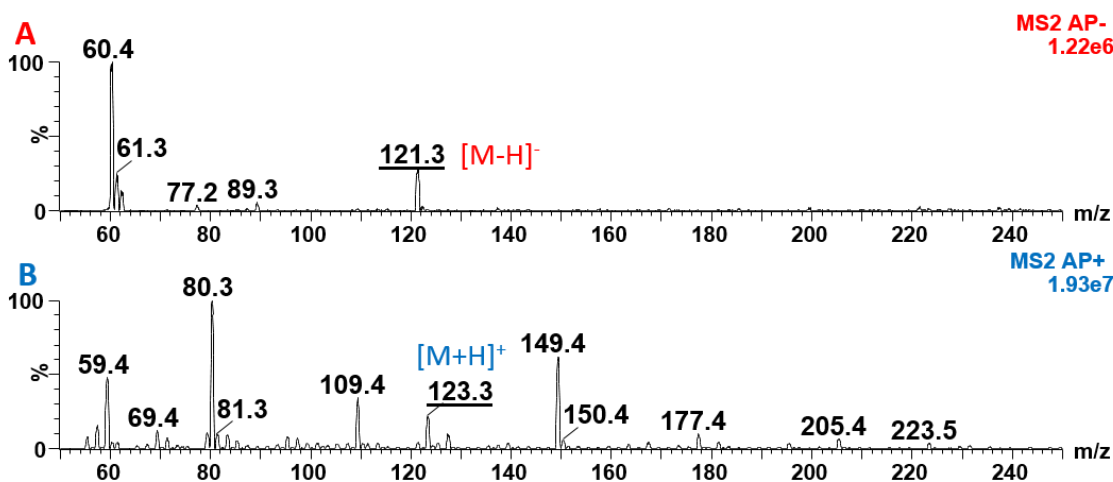
4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Kyseliny sorbová a benzoová

Pro měření kyselin sorbové a benzoové byly použity optimalizované parametry z bakalářské práce. Nejlepších intenzit sledovaných látek bylo dosaženo při použití teploty desolvatačního plynu $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, průtoku desolvatačního plynu 50 l/h a korónového proudu $7\text{ }\mu\text{A}$. Měření bylo provedeno v negativním i pozitivním módu. Kyselina sorbová poskytla ionty $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ m/z 111, respektive $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ m/z 113. Její hmotnostní spektra jsou uvedena na obr. 31. V hmotnostních spektrech kyseliny benzoové (obr. 32) pozorujeme ionty $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ m/z 121 a $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ m/z 123.

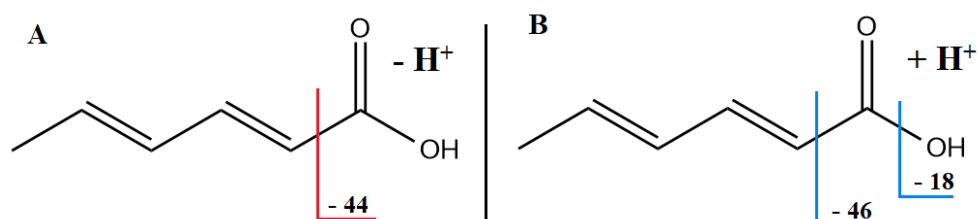


Obr. 31: Hmotnostní spektra kyseliny sorbové v negativním (A) a pozitivním (B) módu.

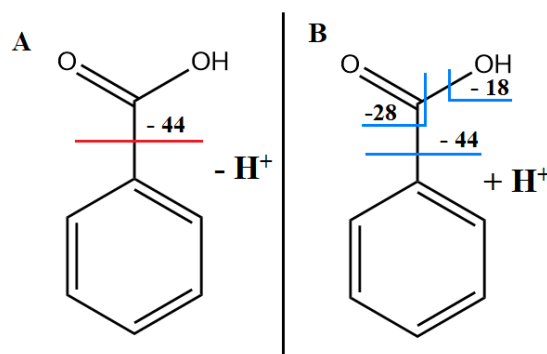


Obr. 32: Hmotnostní spektra kyseliny benzoové v negativním (A) a pozitivním (B) módu.

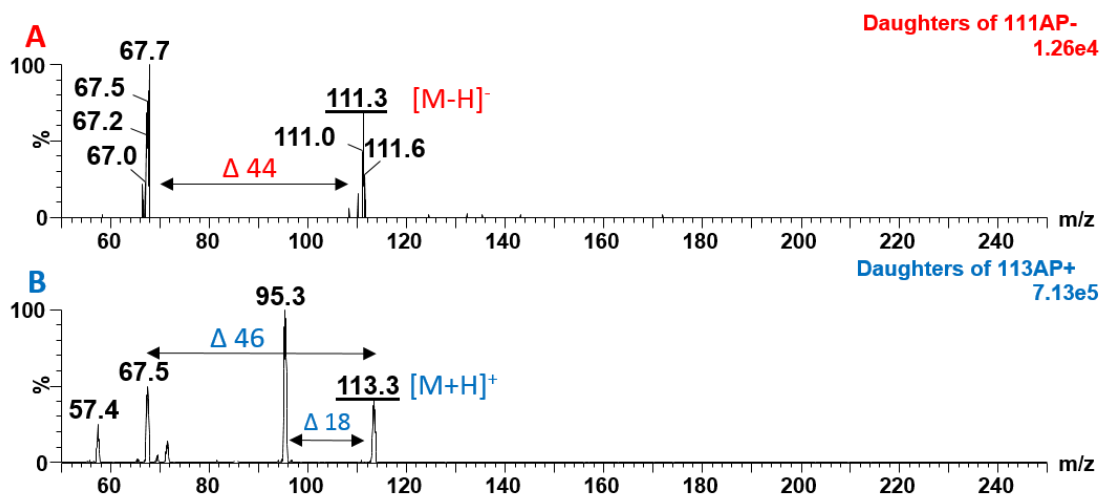
K potvrzení obou kyselin byly provedeny fragmentace, jejichž schémata můžeme vidět na obr. 33 a 34. Hodnoty kolizních energií byly pro obě kyseliny 12 V. Fragmentační spektra kyseliny sorbové znázorňuje obr. 35. V negativním módu (A) došlo k odštěpení karboxylové skupiny, které odpovídá diferenci mezi prekurzorovým a fragmentovým iontem $\Delta 44$. V pozitivním módu (B) dochází k odtržení molekuly H_2O ($\Delta 18$) a karboxylové skupiny, které odpovídá $\Delta 46$.



Obr. 33: Schéma fragmentací kyseliny sorbové v negativním (A) a pozitivním (B) módu.

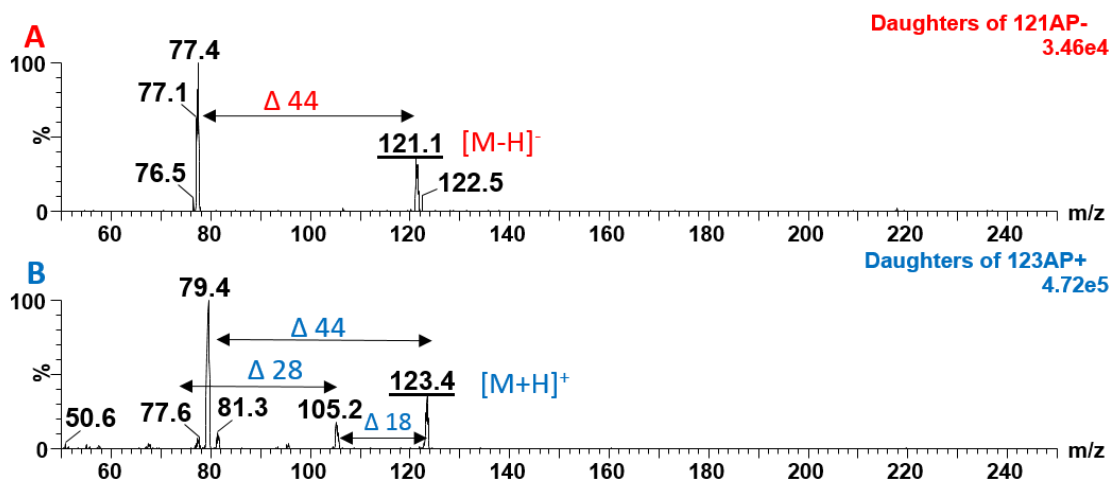


Obr. 34: Schéma fragmentací kyseliny benzoové v negativním (A) a pozitivním (B) módu.



Obr. 35: Fragmentační spektra kyseliny sorbové v negativním (A) a pozitivním (B) módu při hodnotách kolizních energií 12 V.

U kyseliny benzoové, jejíž fragmentační spektra jsou na obr. 36, pozorujeme v negativním módu (A) opět odštěpení karboxylové skupiny ($\Delta 44$). V pozitivním módu (B) nalézáme ion při m/z 79, který odpovídá ztrátě CO_2 ($\Delta 44$). Ve spektru také pozorujeme ionty při m/z 105 a 77, které odpovídají ztrátám H_2O ($\Delta 18$) a $\text{C}=\text{O}$ ($\Delta 28$).

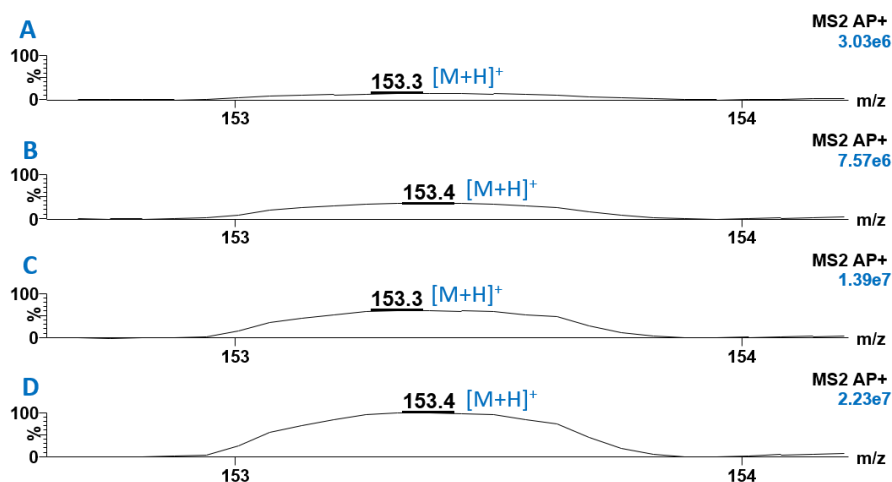


Obr. 36: Fragmentační spektra kyseliny benzoové v negativním (A) a pozitivním (B) módu při hodnotách kolizních energií 12.

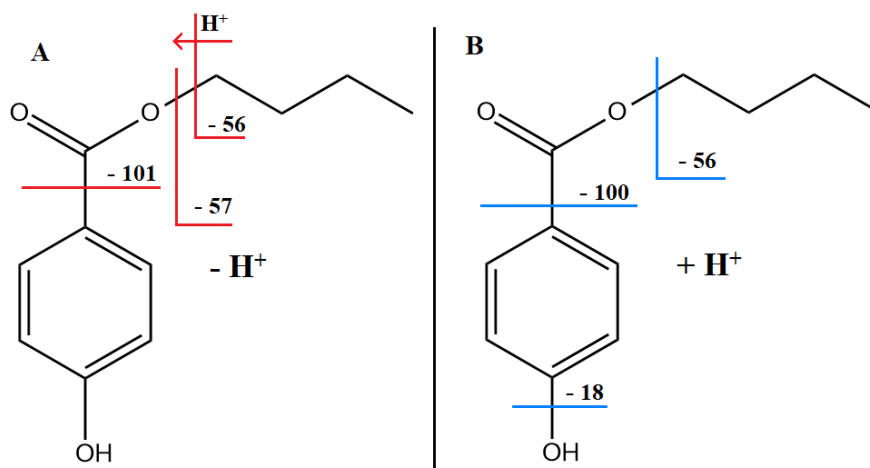
4.2 Parabeny

Na methylparabenu byl v pozitivním módu testován vliv nastavení parametrů teploty desolvatačního plynu. Největší vliv na signál sledovaného methylparabenu měla teplota, která byla testována v rozmezí 50 – 200 °C. Z obr. 37 je parné, že při použití teploty 200 °C dochází oproti teplotě 50 °C ke zvýšení intenzity signálu $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 153 téměř o řád. Za optimální parametry pro analýzu všech parabenů v obou módech byla zvolena teplota desolvatačního plynu 200 °C, průtok desolvatačního plynu 50 l/h a korónový proud 7 μA . Všechny parabeny byly potvrzeny fragmentačními spektry. Podle m/z fragmentových iontů nemůžeme přesně určit, jestli dochází ke štěpení postupně, najednou nebo obojím způsobem. Na obr. 38 jsou pro přiblížení znázorněny fragmentace butylparabenu. V negativním módu může docházet k odštěpení butylového zbytku ($\Delta 57$) nebo ($\Delta 56$), respektive může docházet přímo ke štěpení vazby mezi karboxylovou skupinou a benzenovým jádrem ($\Delta 101$). Může však také docházet k odštěpení butylového zbytku ($\Delta 57$) a až poté k odtržení zbytku karboxylové kyseliny ($\Delta 44$). V pozitivním módu pozorujeme ztráty H_2O ($\Delta 18$), butylového zbytku ($\Delta 56$) a odtržení celé skupiny od benzenového jádra ($\Delta 100$). Také zde může docházet nejprve k odtržení butylového zbytku ($\Delta 56$) a až následně k dekarboxylaci ($\Delta 44$). Tímto způsobem mohou fragmentovat všechny parabeny, ale pozorujeme i výjimky, které

jsou popsány u jednotlivých fragmentací látek. Hodnoty použitých kolizních energií byly voleny zvlášť pro jednotlivé látky i módy, ve kterých byly experimenty prováděny.

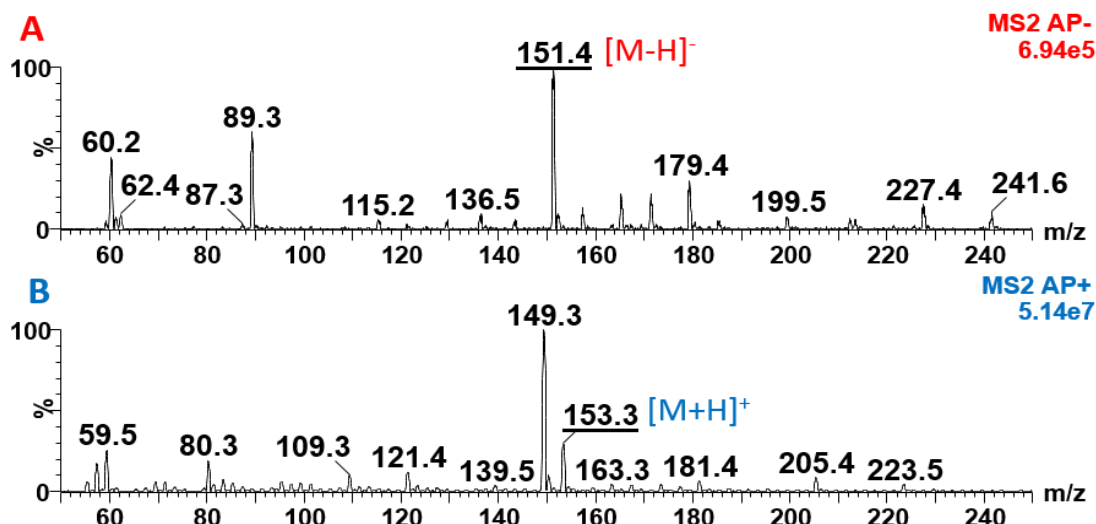


Obr. 37: Hmotnostní spektra **methylparabenu** v **pozitivním** módu při nastaveních teploty **A** 50 °C; **B** 100 °C; **C** 150 °C **D** 200 °C.

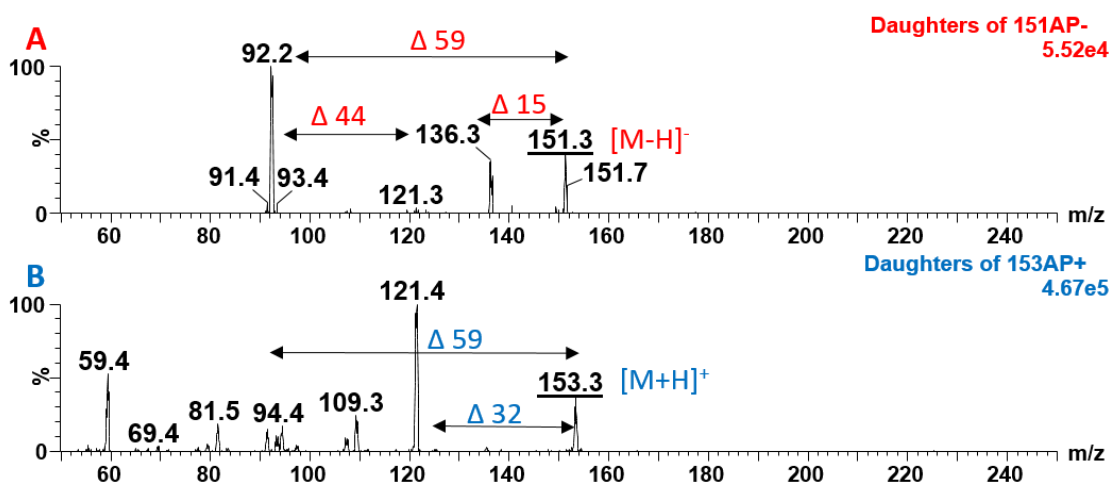


Obr. 38: Schémata fragmentací **butylparabenu** v negativním (**A**) a pozitivním (**B**) módu.

První ze stanovovaných parabenů methylparaben poskytl ve spektrech ionty $[M-H]^-$ m/z 151, respektive $[M+H]^+$ m/z 153 (obr. 39). Ve fragmentačních spektrech (obr. 40) dochází v negativu (A) k odštěpení methylového zbytku ($\Delta 15$) a následné dekarboxylaci ($\Delta 44$), respektive může docházet přímo ke štěpení vazby mezi karboxylovou skupinou a benzenovým jádrem ($\Delta 59$). V pozitivním módu (B) se odštěpuje CH_3OH ($\Delta 32$) a $C_2O_2H_3$ ($\Delta 59$).

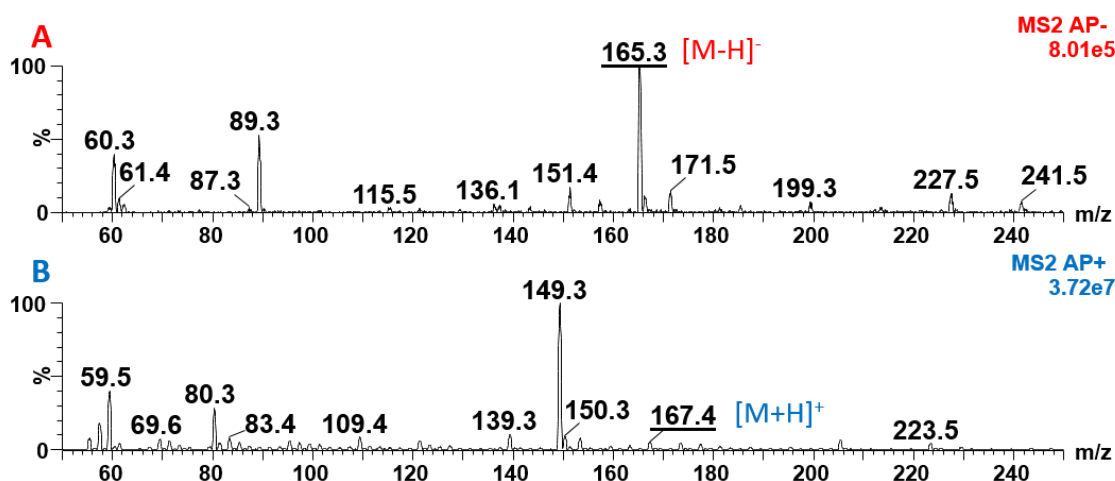


Obr. 39: Hmotnostní spektra **methyparabenu** v **negativním (A)** a **pozitivním (B)** módu.

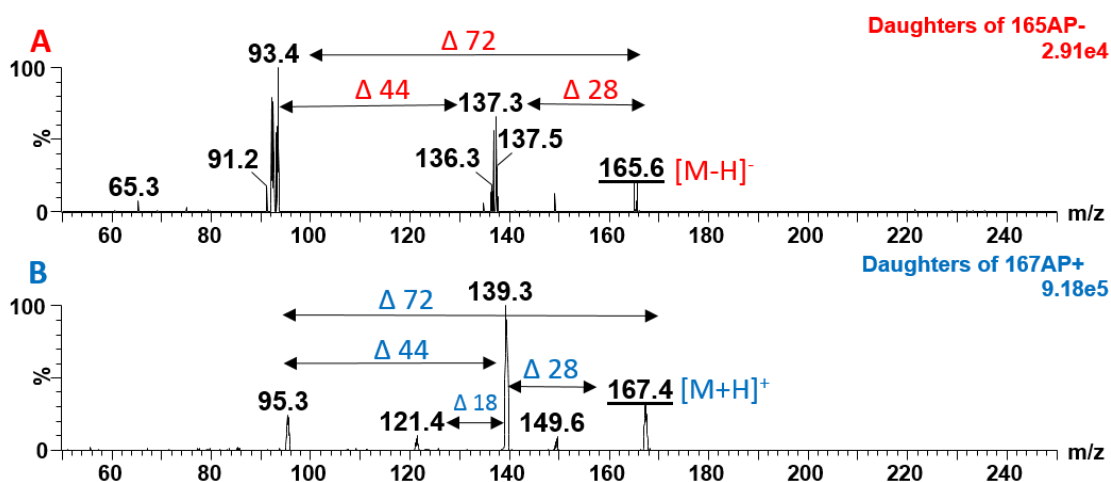


Obr. 40: Fragmentační spektra **methylparabenu** v **negativním (A)** a **pozitivním (B)** módu při hodnotách kolizních energií **15 V** a **12 V**.

U ethylparabenu ve spektrech nalézáme ionty $[M-H]^-$ m/z 165, respektive $[M+H]^+$ m/z 167 (obr. 41). Při fragmentacích (obr. 42) se v negativním módu (A) odštěpuje $CH_2=CH_2$ (Δ 28) a poté dochází k dekarboxylaci (Δ 44), respektive může docházet k odštěpení celé skupiny od benzenového jádra (Δ 72). Ve spektru pozorujeme i ion při m/z 136, kterému by odpovídalo odštěpení ethylového zbytku (Δ 29). V pozitivním módu (B) pozorujeme odštěpení $CH_2=CH_2$ (Δ 28), H_2O (Δ 18) a zbytku karboxylové skupiny (Δ 44), respektive může dojít ke štěpení vazby mezi benzenovým jádrem a karboxylovou skupinou (Δ 72). Fragmentový ion při m/z 121 odpovídá kombinaci ztrát Δ 28 a Δ 18.

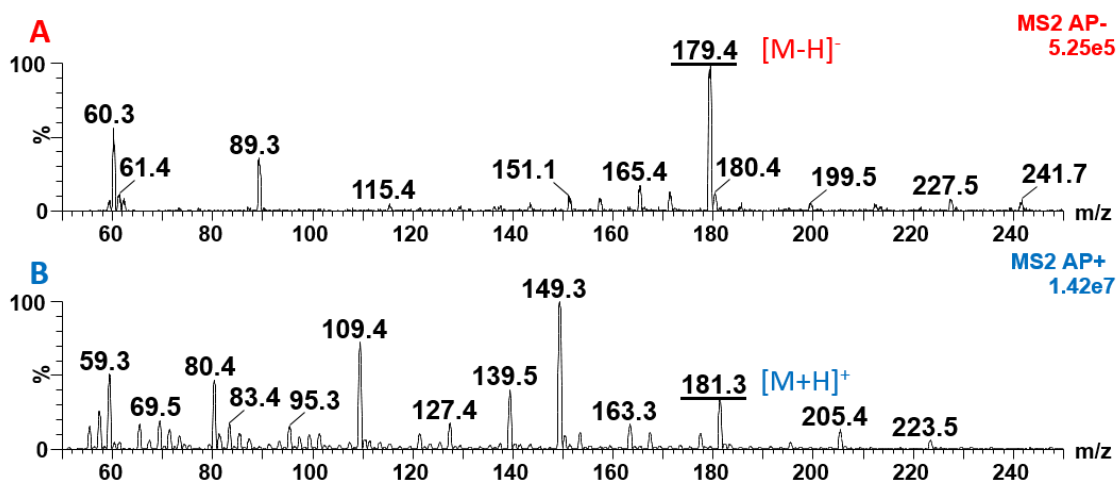


Obr. 41: Hmotnostní spektra ethylparabenu v negativním (A) a pozitivním (B) módu.

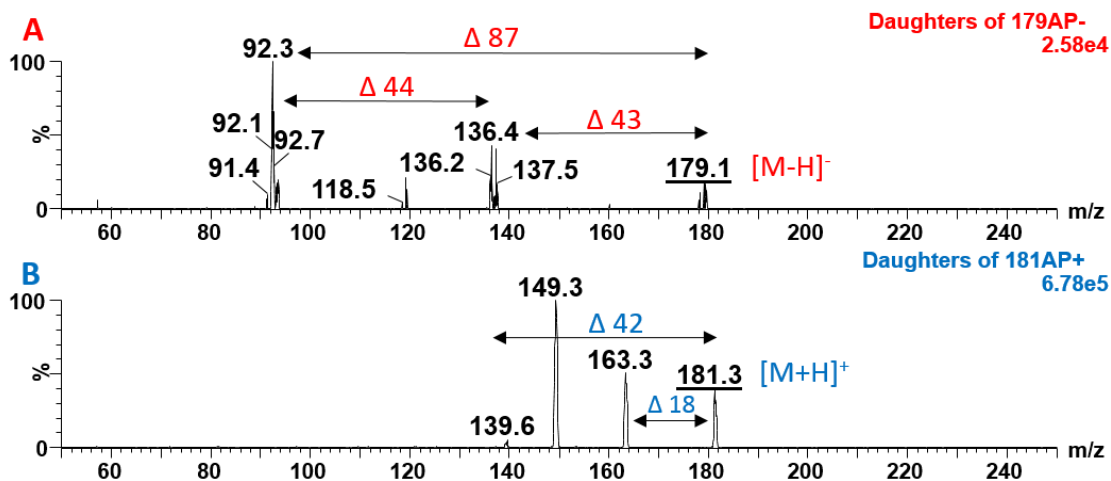


Obr. 42: Fragmentační spektra ethylparabenu v negativním (A) a pozitivním (B) módu při hodnotách kolizních energií 17 V a 8 V.

Další látku propylparaben charakterizují ionty $[M-H]^-$ m/z 179, respektive $[M+H]^+$ m/z 181, které vidíme na obr. 43. Ve fragmentačním spektru (obr. 44) pozorujeme v negativním módu (A) změny, které odpovídají odštěpení propylového zbytku (Δ 43), zbytku karboxylové skupiny (Δ 44), respektive celé skupiny od benzenového jádra (Δ 87). Ve spektru nalézáme i fragmentový ion při m/z 137, kterému by odpovídalo odštěpení $CH_2=CH-CH_3$ (Δ 42). V pozitivu (B) dochází ke tvorbě fragmentových iontů, kterým odpovídají ztráty H_2O (Δ 18) a $CH_2=CH-CH_3$ (Δ 42).



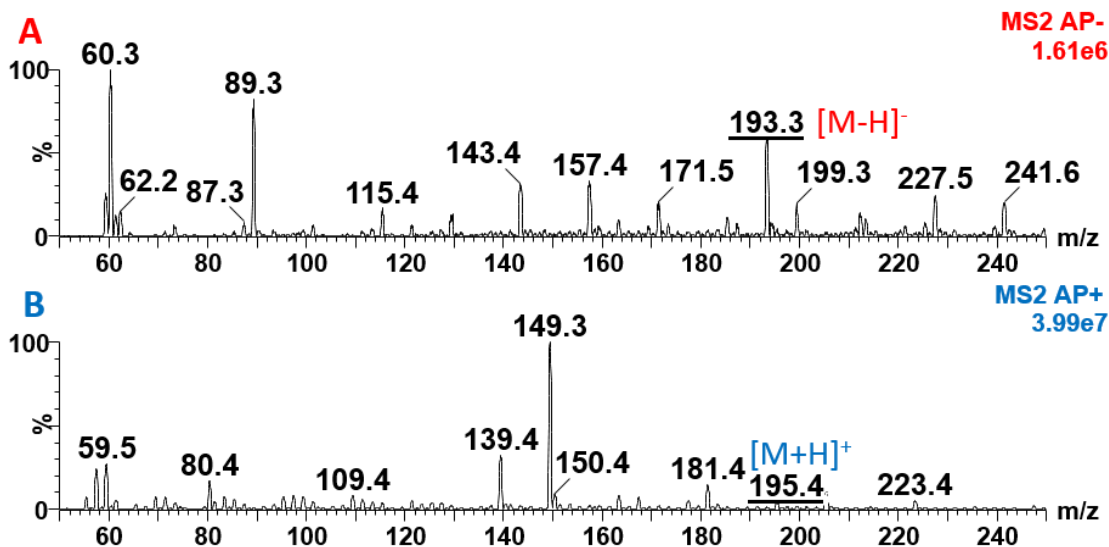
Obr. 43: Hmotnostní spektra **propylparabenu** v **negativním (A)** a **pozitivním (B)** módu.



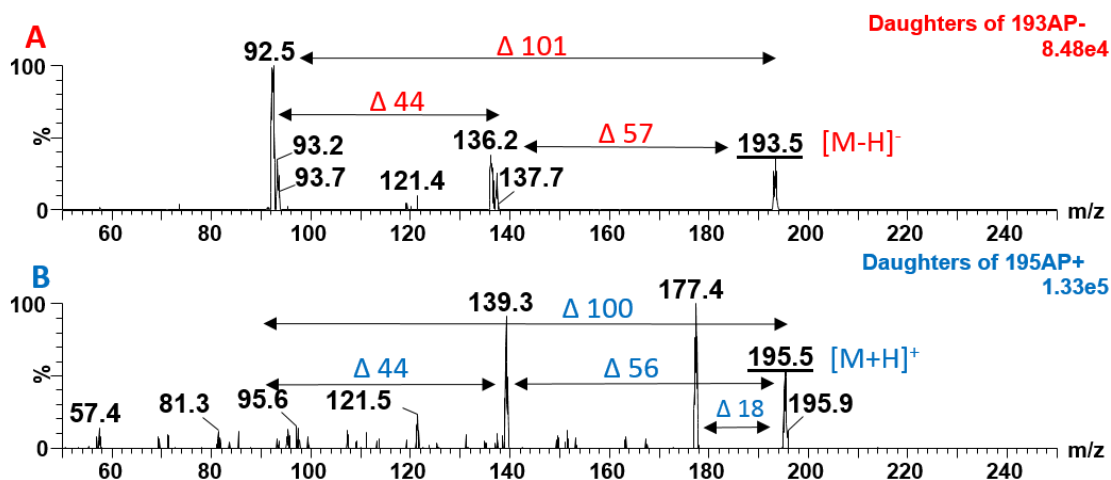
Obr. 44: Fragmentační spektra **propylparabenu** v **negativním (A)** a **pozitivním (B)** módu při hodnotách kolizních energií **17 V** a **5 V**.

Posledním z analyzovaných konzervačních látek je butylparaben, kterému odpovídají ionty $[M-H]^-$ m/z 193, respektive $[M+H]^+$ m/z 195 (obr. 45). Ve fragmentačním spektru (obr. 46) butylparabenu v negativním módu (A) nacházíme fragmentový ion při m/z 136, který odpovídá ztrátě butylového zbytku ($\Delta 57$). Následně dochází k dekarboxylaci, jejíž změna je rovna $\Delta 44$, respektive může dojít přímo ke štěpení vazby mezi karboxylovou skupinou a benzenovým jádrem ($\Delta 101$). Ve spektru opět nacházíme i fragmentový ion při m/z 137, kterému by odpovídalo odštěpení $CH_2=CH-CH_2-CH_3$ ($\Delta 56$). V pozitivním módu (B) nalzáme ionty při m/z 177, 139 a 95 odpovídající ztrátám H_2O ($\Delta 18$), butylového

zbytku ($\Delta 56$) a odtržení celé skupiny od benzenového jádra ($\Delta 100$). Fragmentový ion při m/z 121 pak odpovídá kombinaci ztrát $\Delta 56$ a $\Delta 18$.



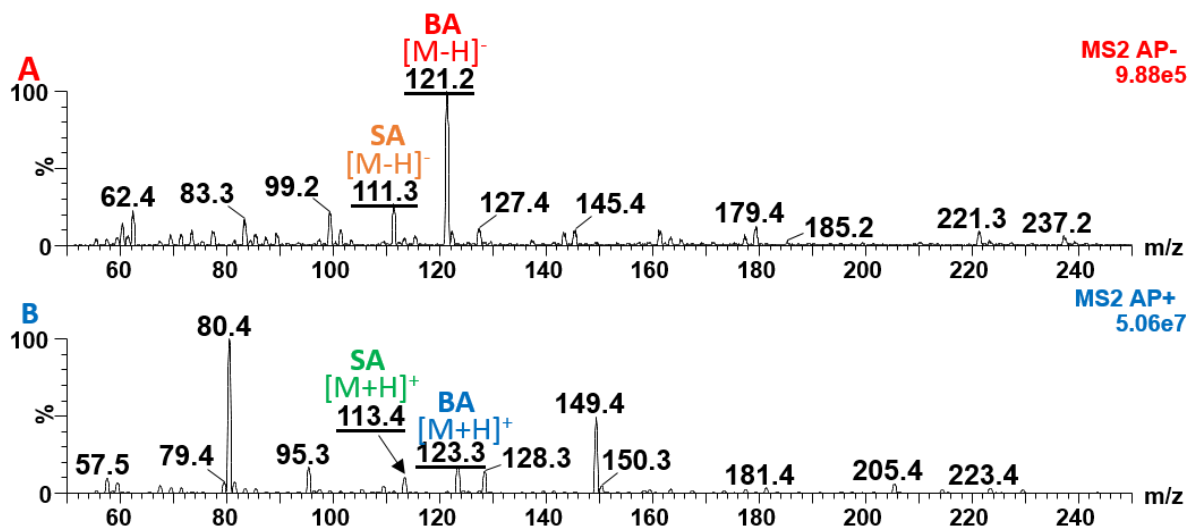
Obr. 45: Hmotnostní spektra butylparabenu v negativním (A) a pozitivním (B) módu.



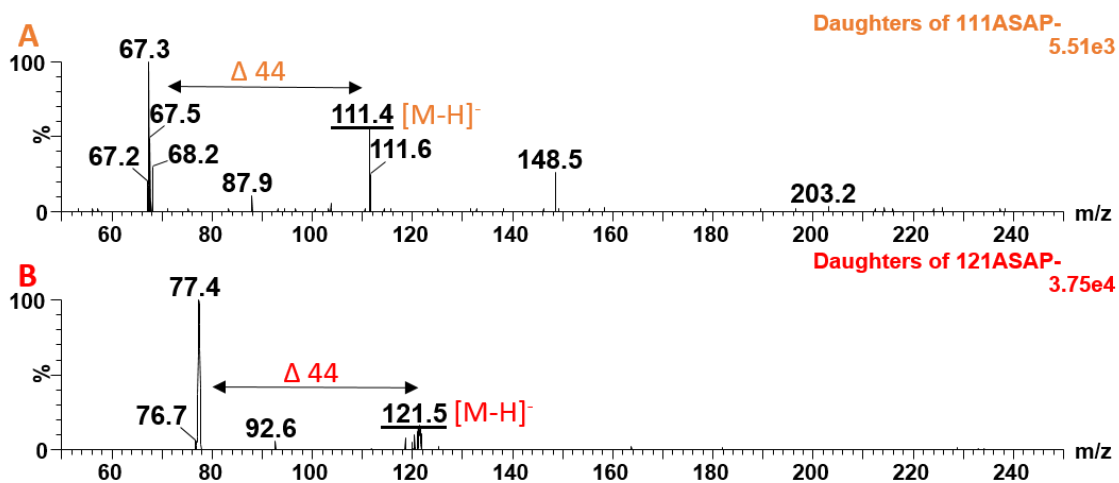
Obr. 46: Fragmentační spektra butylparabenu v negativním (A) a pozitivním (B) módu při hodnotách kolizních energií 18 V a 8 V.

4.3 Směsi konzervačních látek

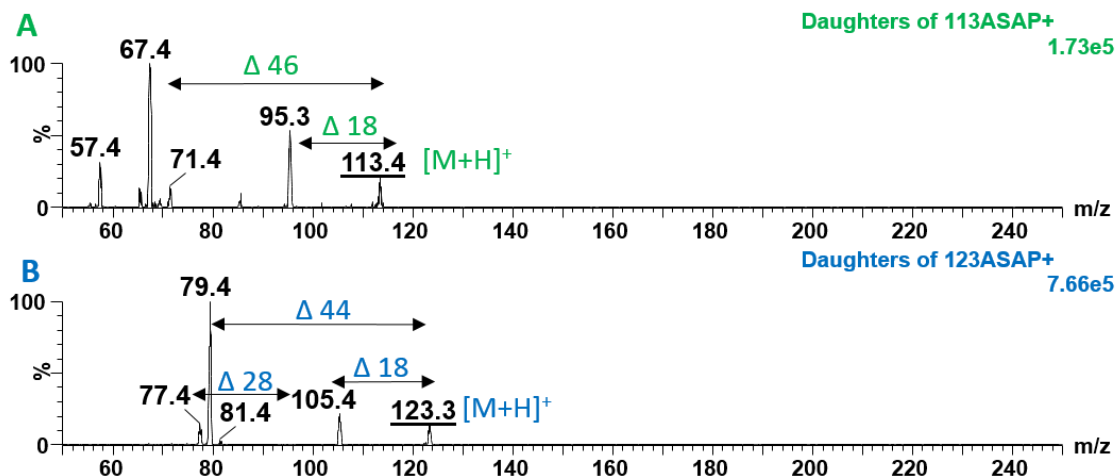
K demonstraci techniky ASAP identifikovat více konzervačních látek současně byly připraveny směsi standardů. První směs se skládala z kyseliny sorbové (SA) a benzoové (BA). Na obr. 47 jsou znázorněny hmotnostní spektra této směsi. Obě kyseliny byly úspěšně potvrzeny fragmentačními spektry (obr. 48 a 49).



Obr. 47: Hmotnostní spektra směsi kyselin sorbov^á (SA) a benzoov^á (BA) v negativním (A) a pozitivním (B) módu.

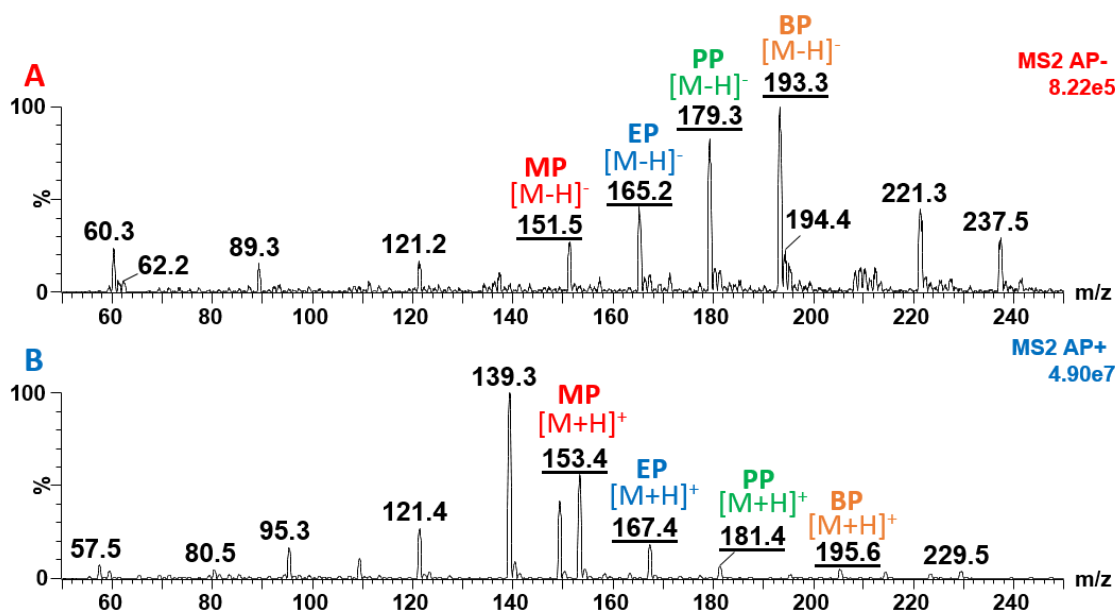


Obr. 48: Fragmentační spektra kyselin sorbov^á (A) a benzoov^á (B) ze směsi v negativním módu.

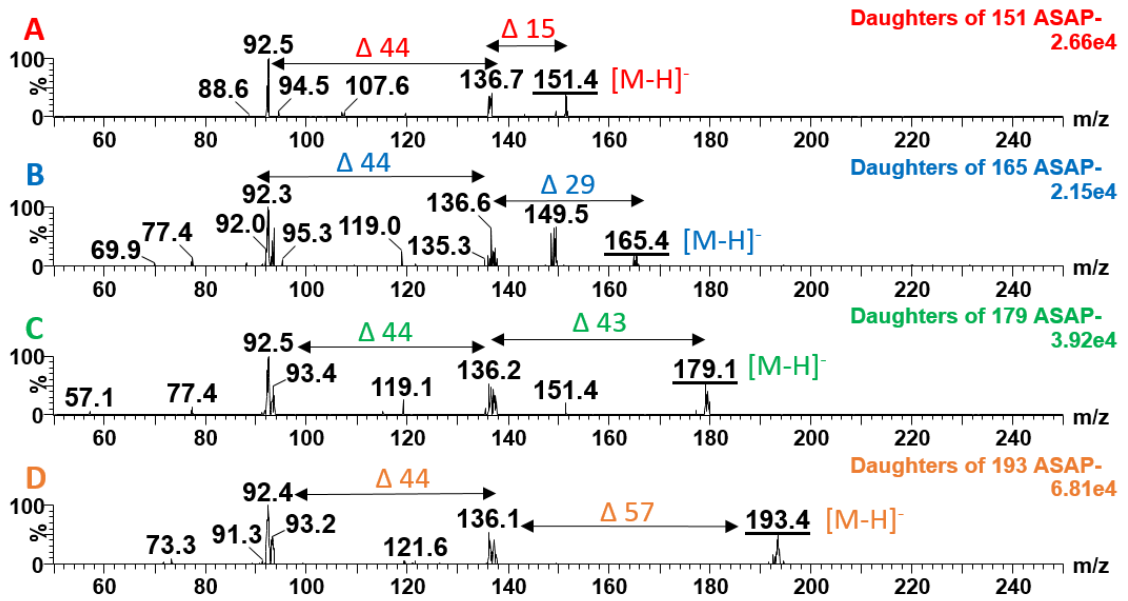


Obr. 49: Fragmentační spektra kyselin **sorbová (A)** a **benzoová (B)** ze směsi v pozitivním módu.

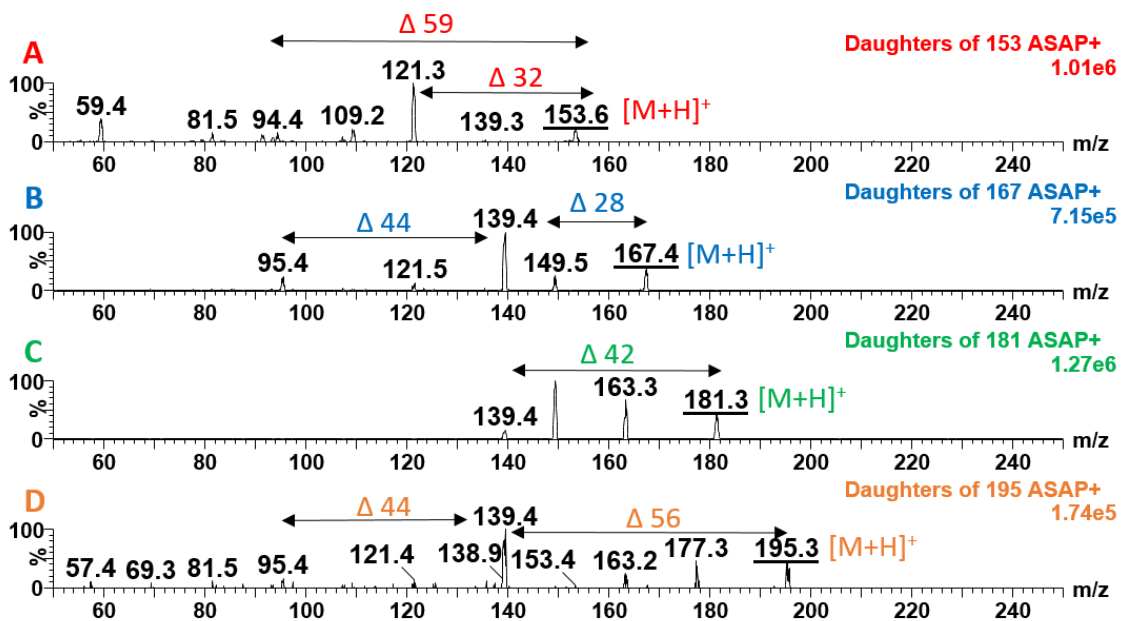
Druhá směs byla připravena ze standardů parabenů (MP – methyl, EP – ethyl, PP – propyl a BP – butylparaben). Hmotnostní spektra této směsi jsou zobrazena na obr. 50. Všechny parabeny byly úspěšně potvrzeny ve fragmentačních spektrech (obr. 51 a 52), kde byly pozorovány typické ztráty jako v případě standardů.



Obr. 50: Hmotnostní spektra **směsi parabenů (MP; EP; PP; BP)** v **negativním (A)** a **pozitivním (B)** módu.



Obr. 51: Fragmentační spektra směsi parabenů (A: MP; B: EP, C:PP; D: BP) v negativním módu.

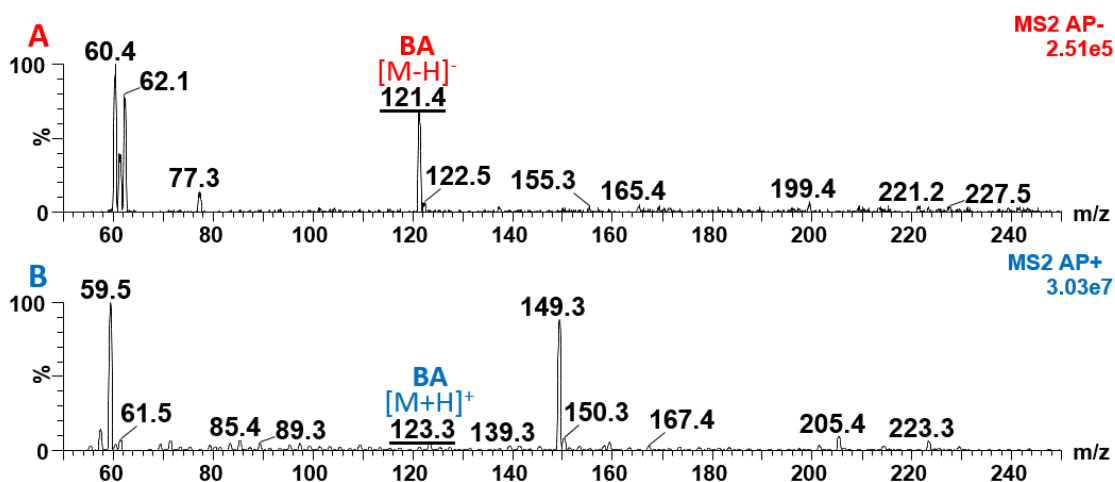


Obr. 52: Fragmentační spektra směsi parabenů (A: MP; B: EP, C:PP; D: BP) v pozitivním módu.

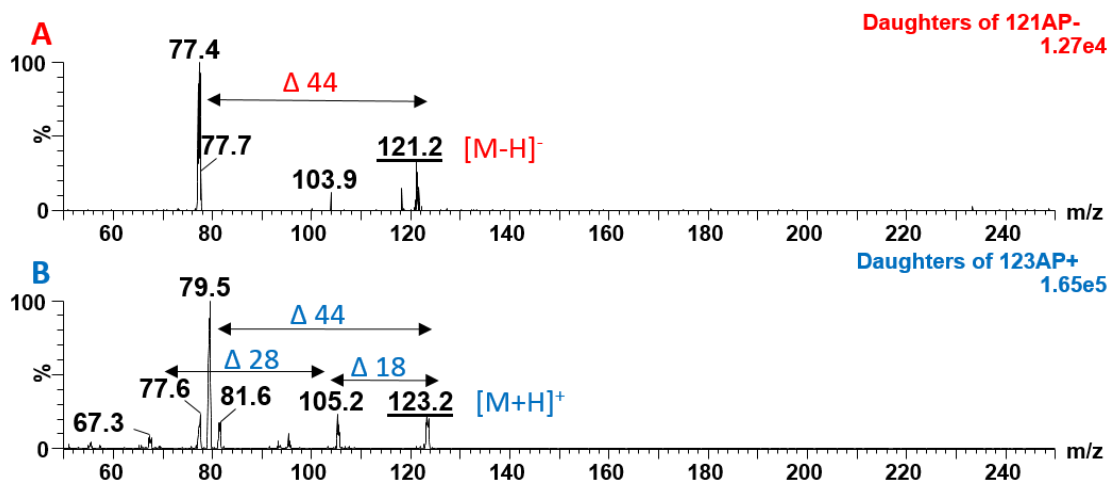
4.4 Reálné vzorky

Pro měření ASAP byly zakoupeny reálné vzorky potravin, které obsahovaly stanovované konzervační látky. Vzorky byly analyzovány bez jakýchkoliv úprav v obou módech.

V hmotnostních spektrech prvního vzorku Energy drinku (obr. 53) byly nalezeny iony $[M-H]^-$ m/z 121 (A) a $[M+H]^+$ m/z 123 (B), které odpovídají deprotonované a protonované kyselině benzoové (BA). Ta byla následně potvrzena fragmentací (obr. 54), které se shodují s fragmentací standardu.

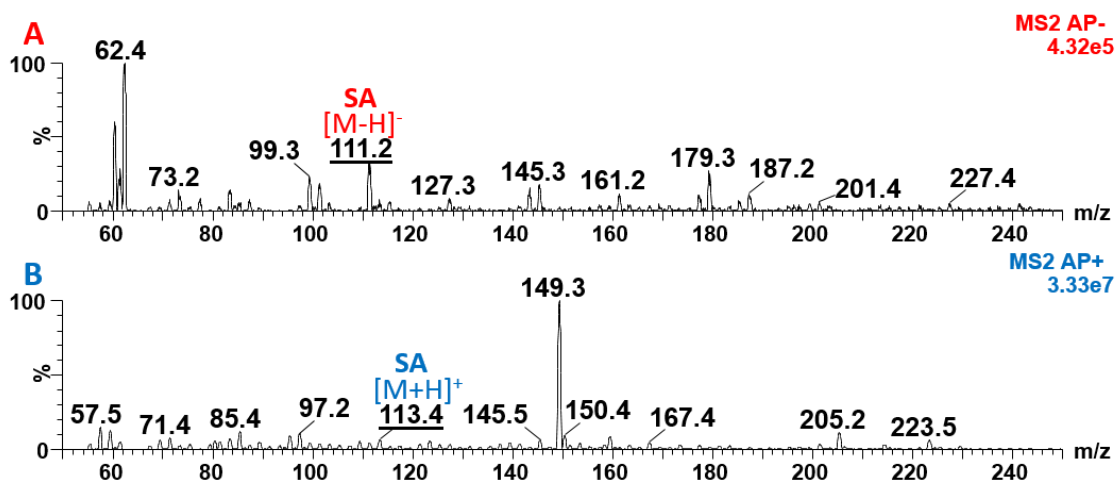


Obr. 53: Hmotnostní spektra nápoje Energy drink v negativním (A) a pozitivním (B) módu.

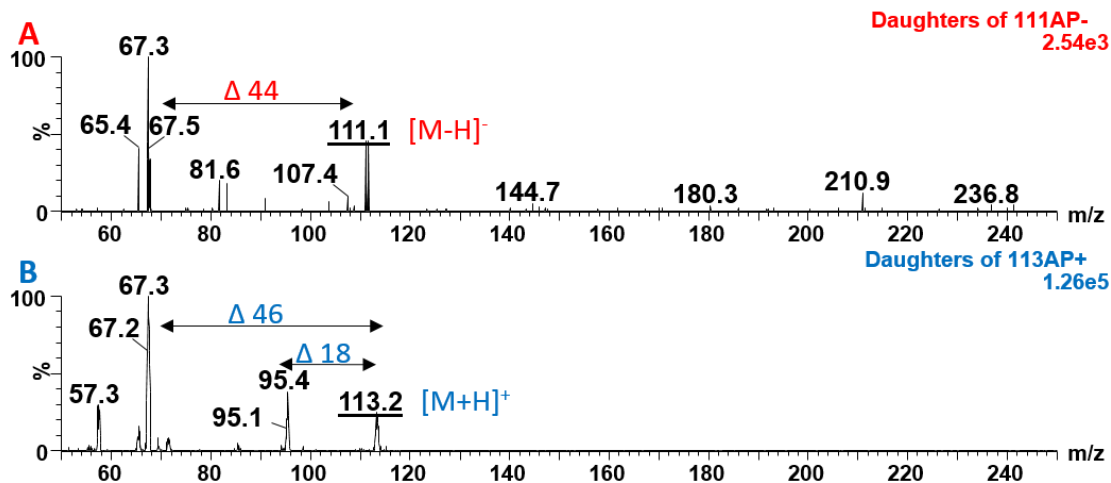


Obr. 54: Fragmentační spektra kyseliny benzoové ze vzorku Energy drinku v negativním (A) a pozitivním (B) módu.

Ve druhém vzorku nápoje Mountain Dew (obr. 55) byla identifikována kyselina sorbová (SA) na základě iontů $[M-H]^-$ m/z 111 (A) a $[M+H]^+$ m/z 113 (B). Ve fragmentačních spektrech (obr. 56) pozorujeme fragmentové ionty při m/z 67, které jsou pro tuto kyselinu charakteristické.

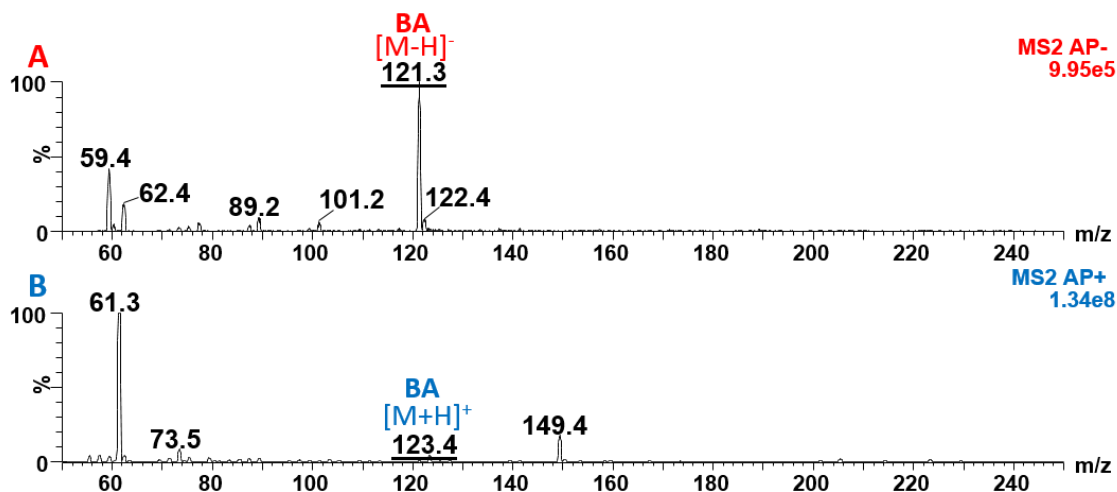


Obr. 55: Hmotnostní spektra nápoje Mountain Dew v negativním (A) a pozitivním (B) módu.

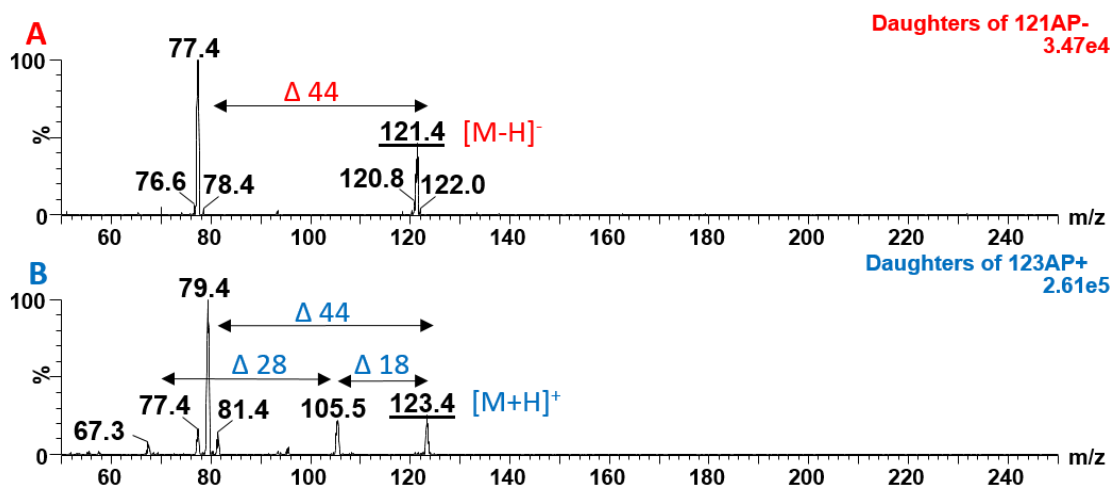


Obr. 56: Fragmentační spektra kyseliny sorbové ze vzorku Mountain Dew v negativním (A) a pozitivním (B) módu.

Dalším analyzovaným vzorkem byla sójová omáčka (obr. 57), která obsahovala kyselinu benzoovou. Její přítomnost byla úspěšně potvrzena fragmentací (obr. 58) na základě odštěpení karboxylové skupiny.

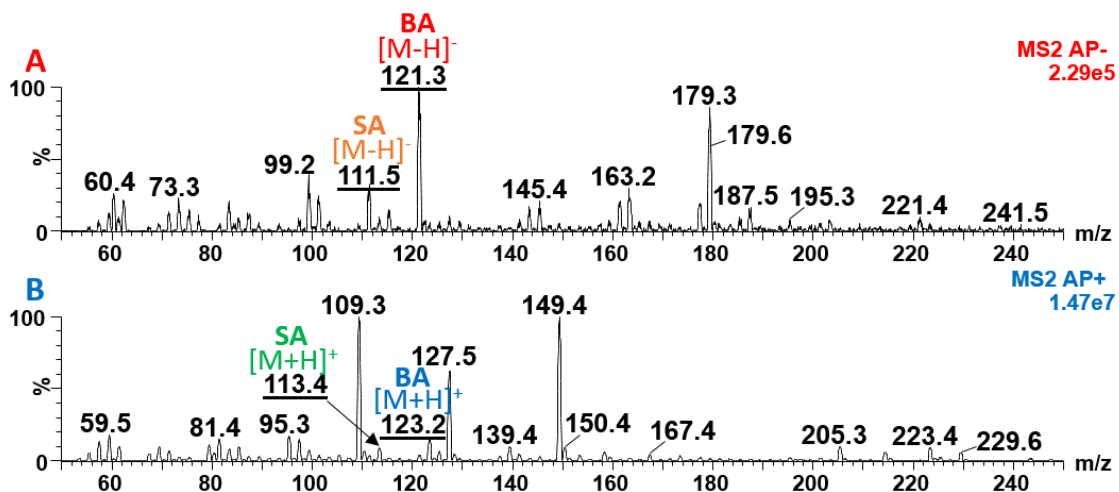


Obr. 57: Hmotnostní spektra vzorku sójové omáčky v negativním (A) a pozitivním (B) módu.

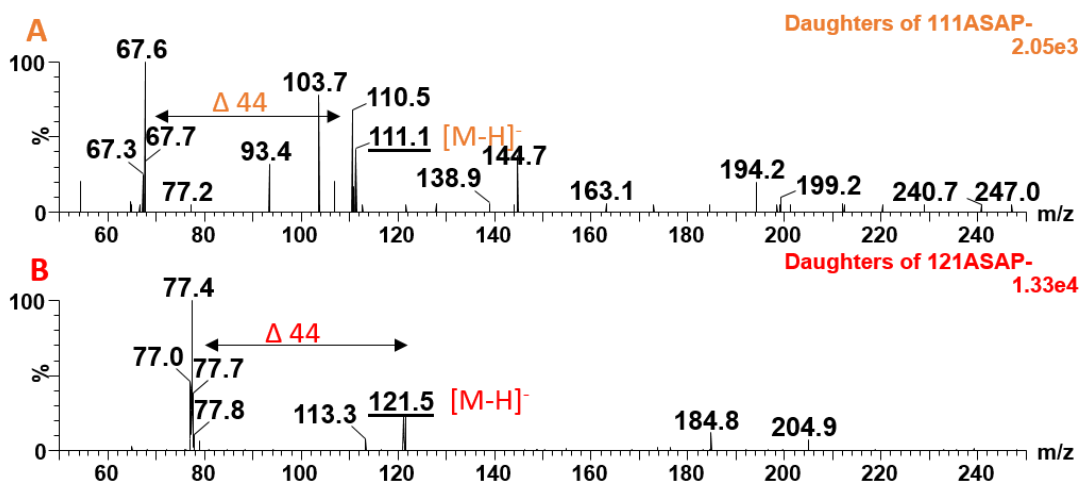


Obr. 58: Fragmentační spektra kyseliny benzoové ze vzorku sójové omáčky v negativním (A) a pozitivním (B) módu.

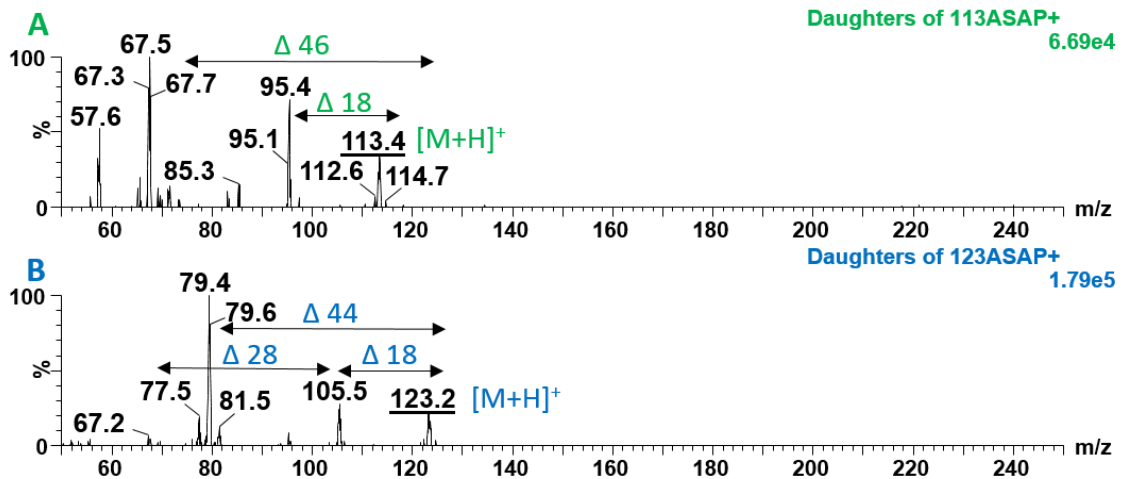
V posledním vzorku nápoje Cola Fun byly identifikovány dvě konzervační látky – kyselina sorbová a kyselina benzoová. (obr. 59). Obě látky byly potvrzeny na základě charakteristických fragmentových iontů (obr. 60 a 61).



Obr. 59: Hmotnostní spektra vzorku Cola Fun v negativním (A) a pozitivním (B) módu.

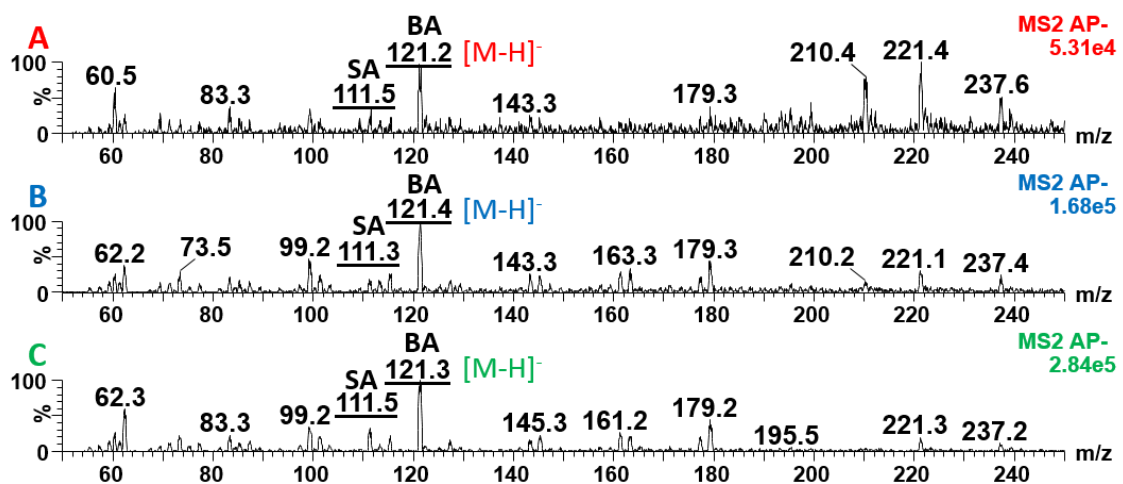


Obr. 60: Fragmentační spektra kyselin sorbové (A) a benzoové (B) ze vzorku Cola Fun v negativním módu.



Obr. 61: Fragmentační spektra kyselin **sorbové (A)** a **benzoové (B)** ze vzorku Cola Fun v pozitivním módu.

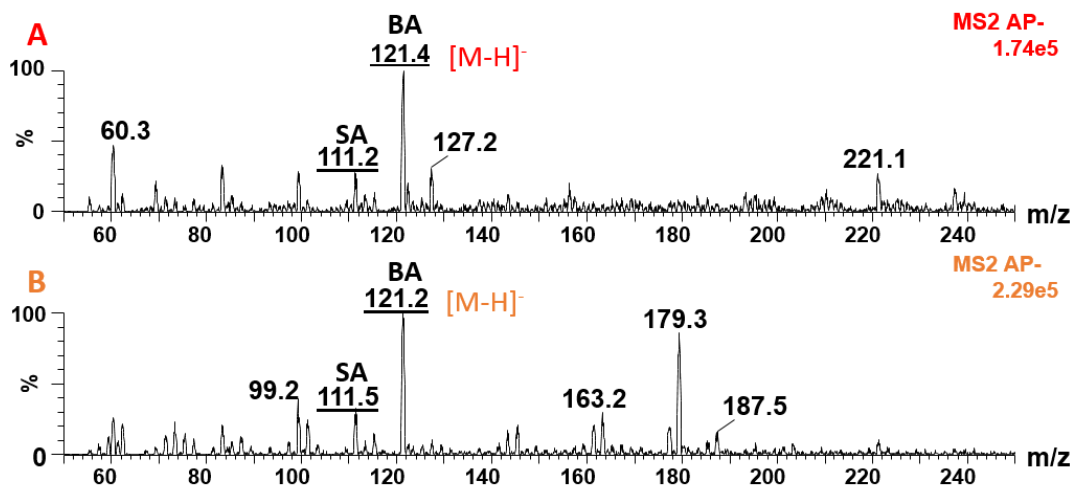
Na tomto vzorku byly také vyzkoušeny předúpravy za účelem zvýšení intenzit sledovaných látek a potlačení vlivu matrice. Vzorek byl nejprve ředěn s různými poměry methanolem (1:4; 2:3 a 1:1). Hmotnostní spektra z této úpravy jsou zobrazeny na obr. 62. Vlivem zvyšujícího se obsahu methanolu dochází k potlačení signálu pozadí a mění se také intenzity signálů sledovaných kyselin sorbové (SA) a benzoové (BA).



Obr. 62: Srovnání hmotnostních spekter vzorku Cola Fun pro provedení ředění s methanolem – **A 1:4**; **B 2:3**; **C 1:1** v negativním módu.

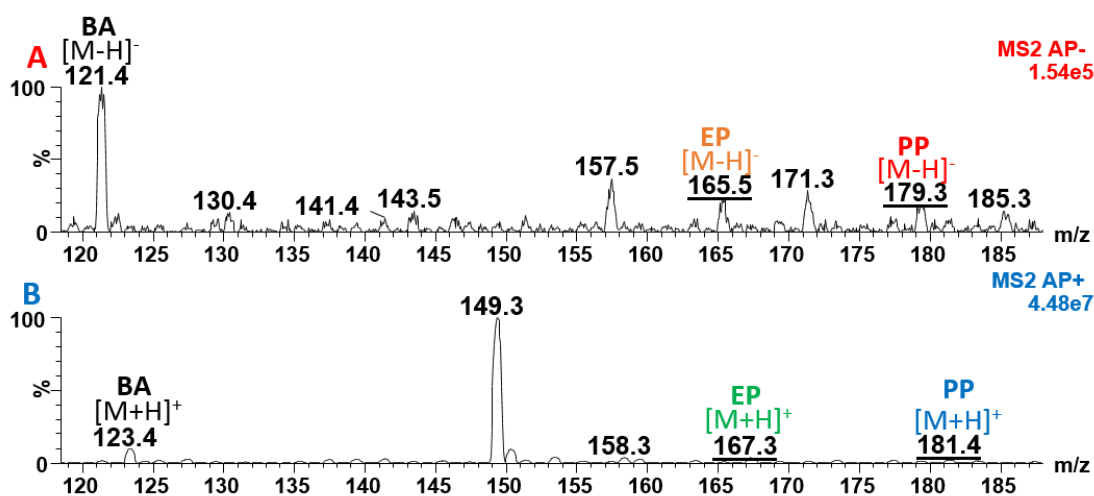
Byla také provedena extrakce tuhou fází (SPE), jejíž hmotnostní spektrum ve srovnání se spektrem napřímo měřeného vzorku ukazuje obr. 63. Z obrázku je patrné, že pomocí SPE došlo k potlačení vlivu matrice. Intenzity přítomných kyselin sorbové a

benzoové jsou však ve srovnání s intenzitami napřímo měřeného vzorku nižší. Je zřejmé, že prodloužení analýzy a větší pracnost nepřinesla patřičný účinek.

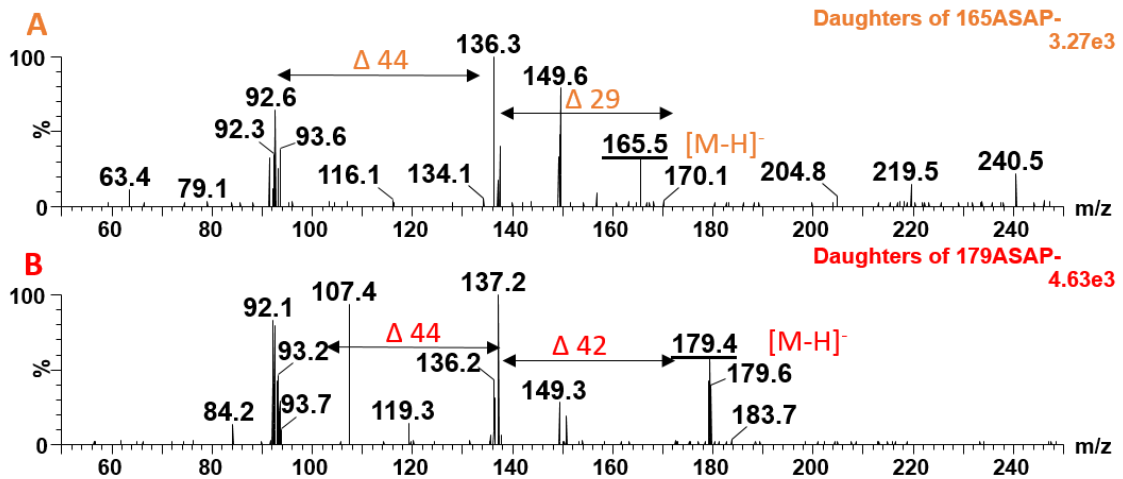


Obr. 63: Srovnání hmotnostních spekter vzorku Cola Fun po **SPE extrakci (A)** a **přímém měření (B)** v negativním módu.

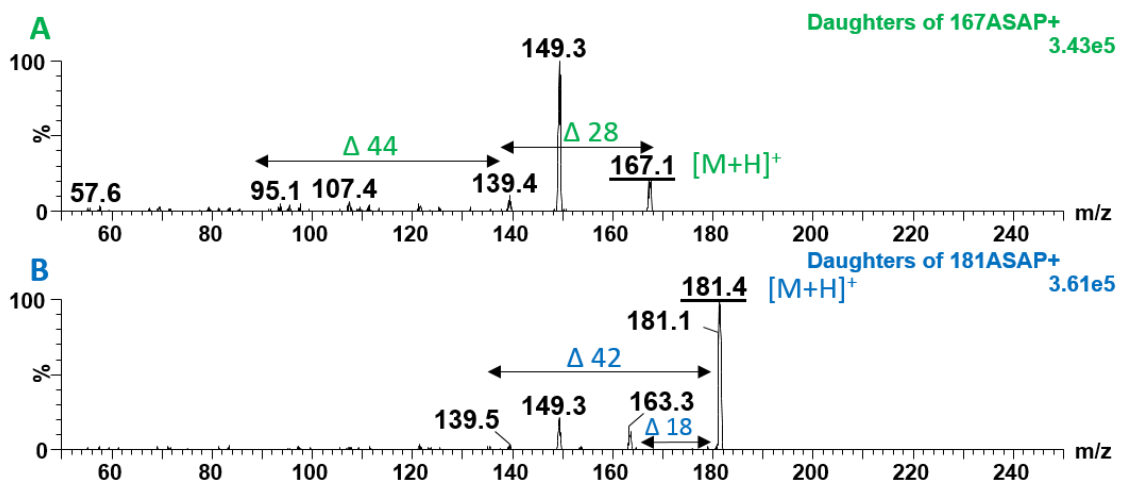
K simulaci přítomnosti parabenů ve vzorku potravin byly k sójové omáčce přidány standardní roztoky ethyl- (EP) a propylparabenu (PP). Hmotnostní spektra z této analýzy jsou znázorněna na obr. 64. Kromě signálů parabenů při $[M-H]^-$ m/z 165 a 179 (A), respektive $[M+H]^+$ m/z 167 a 181 (B) pozorujeme ve spektrech také signál kyseliny benzoové (m/z 121 (A) a m/z 123 (B)). Oba parabeny byly následně potvrzeny ve fragmentačních spektrech, která se shodovala s fragmentačními spektry standardních roztoků (obr. 65 a 66).



Obr. 64: Hmotnostní spektra sójové omáčky s **přídavkem parabenů** v **negativním (A)** a **pozitivním (B)** módu.

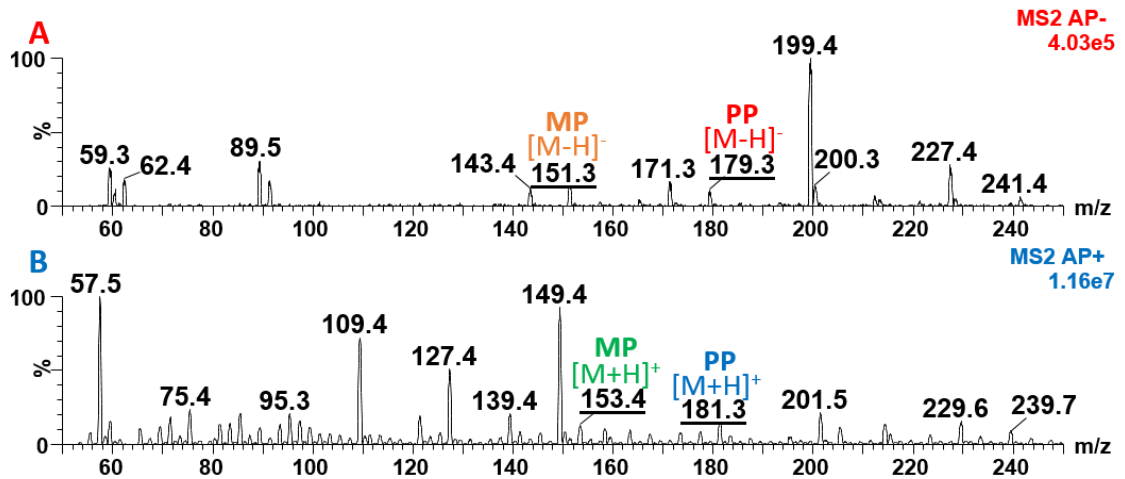


Obr. 65: Hmotnostní spektra **ethylparabenu (A)** a **propylparabenu (B)** ze vzorku sójové omáčky s přidavkem parabenů v negativním módu.

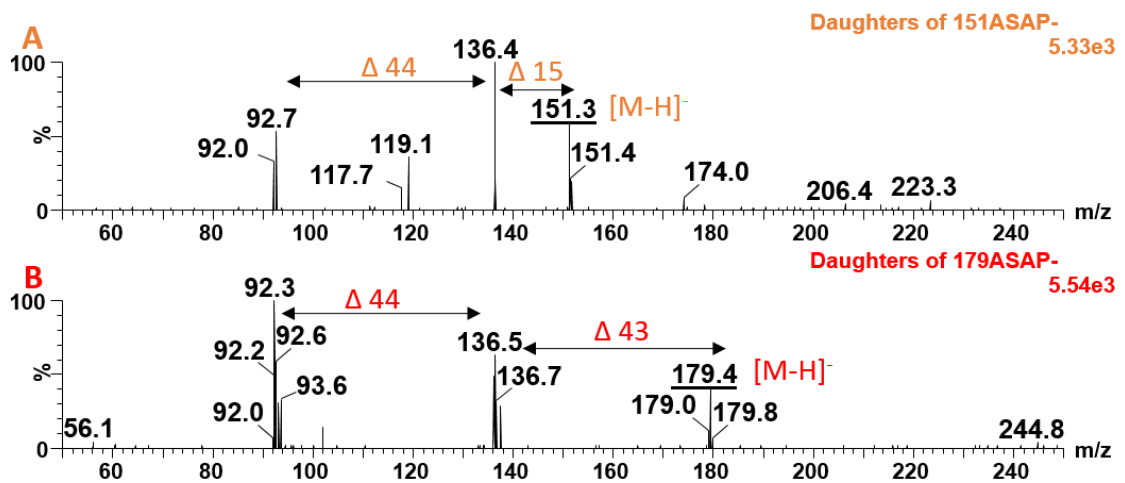


Obr. 66: Fragmentační spektra **ethylparabenu (A)** a **propylparabenu (B)** ze vzorku sójové omáčky s přidavkem parabenů v pozitivním módu.

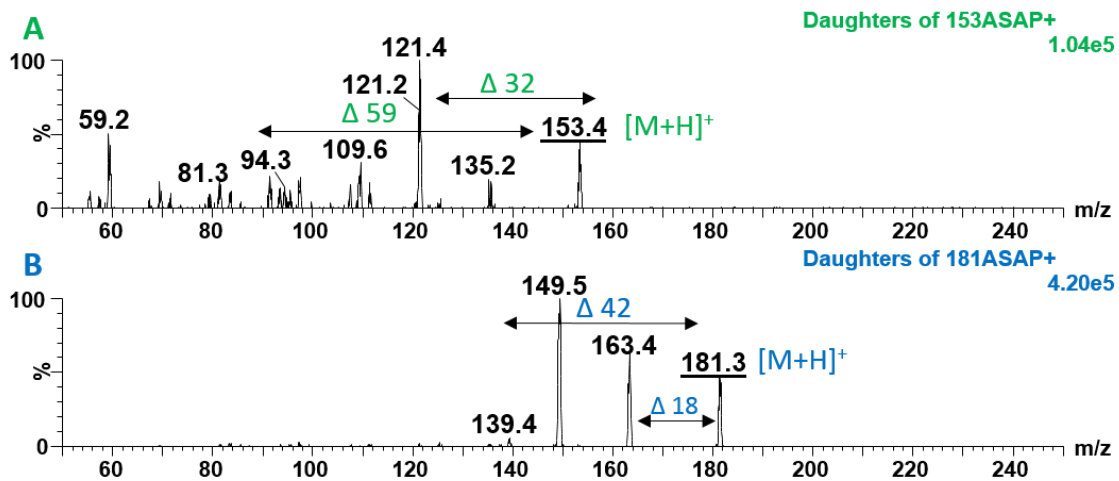
Pro ověření metody na detekci parabenů byla provedena analýza vzorku tělového mléka Dove, ve kterém byly přítomny methyl- a propylparaben. Obr. 67 ukazuje hmotnostní spektra, ve kterém signály při $[M-H]^-$ m/z 151 a 179 (A) a $[M+H]^+$ m/z 153 a 181 (B) odpovídají výše zmíněným parabenům. Potvrzení, že se skutečně jedná o parabeny, poskytla fragmentační spektra, ve kterých pozorujeme stejné fragmenty jako u standardních roztoků (obr. 68 a 69).



Obr. 67: Hmotnostní spektrum tělového mléka Dove v negativním (A) a pozitivním (B) módu.



Obr. 68: Fragmentační spektra **methylparabenu (A)** a **propylparabenu (B)** ze vzorku tělového mléka Dove v negativním módu.



Obr. 69: Fragmentační spektra **methylparabenu (A)** a **propylparabenu (B)** ze vzorku tělového mléka Dove v pozitivním módu.

5. ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo ověření aplikovatelnosti sondy ASAP na širším souboru konzervačních látek, reálných vzorků a dále pak testování vlivu předúpravy vzorku na signál detekovaných látek. Aplikovatelnost ambientních technik v analýze potravin již byla prokázána v řadě prací, ale podle dostupných publikací nebyla technika ASAP doposud použita pro analýzu konzervačních látek.

Teoretická část práce se zabývá vybranými konzervačními látkami, jejich vlastnostmi a použitím. Druhá kapitola je věnována ambientním ionizačním technikám, zejména pak sondě pro analýzu vzorku za atmosférického tlaku – ASAP, jejich použitím v různých oblastech analýzy a zvláště pak při analýze potravin. Následující kapitola pojednává o různých, zejména chromatografických metodách stanovení konzervačních látek. Poslední část práce je věnována analýze konzervačních látek pomocí ambientních ionizačních technik, na kterou navazuje experimentální část.

K identifikaci kyselin sorbové a benzoové byly použity optimalizované parametry teploty a průtoku desolvatačního plynu a korónového proudu z bakalářské práce. Pro parabeny byla provedena optimalizace. Za nejvhodnější parametry byla zvolena teplota 200 °C, průtok 50 l/h a korónový výboj 7 μ A. K prokázání schopnosti metody identifikovat více konzervačních látek současně byly pro analýzu připraveny také směsi standardů.

Následně byla prokázána vhodnost techniky ASAP analýzou reálných vzorků, ve kterých byly úspěšně identifikovány přítomné konzervační látky. Na jednom ze vzorků byly také provedeny předúpravy za účelem zvýšení signálu sledovaných látek a potlačení vlivu matrice. Intenzity látek po úpravách vzorku byly téměř srovnatelné s intenzitami vzorku měřených napřímo. Tyto výsledky vystihují jednu z hlavních předností ambientních technik – přímou analýzu vzorků bez nutnosti úpravy.

Všechny experimenty byly provedeny jak v pozitivním, tak negativním módu a sledované látky byly úspěšně potvrzeny fragmentací. V negativním módu byly signály sledovaných látek prokazatelnější, jelikož v pozitivním módu byly potlačeny dominujícím signálem přítomných ftalátů (m/z 149). Pro fragmentační spektra byl pozitivní mód vhodnější z důvodů, že při fragmentacích zejména kyseliny sorbové v negativním módu docházelo k výskytu interferujících iontů.

Cíle diplomové práce byly úspěšně naplněny. Technika ASAP se osvědčila v oblasti analýzy potravin, kde by mohla najít své uplatnění díky své rychlosti, jednoduchosti a hlavně

přímé analýze vzorků bez úpravy. Další experimenty by mohly být zaměřeny na širší škálu reálných vzorků, ale i konzervačních látek.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] D. V. Parke, D. F.V. Lewis, *Safety aspects of food preservatives*, Food Addit. Contam. 9 (1992) 561–577.
- [2] F. Han, Y. He, L. Li, G. Fu, H. Xie, W. Gan, *Determination of benzoic acid and sorbic acid in food products using electrokinetic flow analysis-ion pair solid phase extraction-capillary zone electrophoresis*, Anal. Chim. Acta 618 (2008) 79–85.
- [3] B. Saad, M. F. Bari, M.I. Saleh, K. Ahmad, M. K. M. Talib, *Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1073 (2005) 393–397.
- [4] J. Wang, J. Gou, L. Jia, *A simple method for the determination of benzoic acid based on room temperature phosphorescence of 1-bromopyrene/ γ -cyclodextrin complex in water*, Talanta 162 (2017) 423–427.
- [5] T. Fujiyoshi, T. Ikami, K. Kikukawa, M. Kobayashi, R. Takai, D. Kozaki, A. Yamamoto, *Direct quantitation of the preservatives benzoic and sorbic acid in processed foods using derivative spectrophotometry combined with micro dialysis*, Food Chem. 240 (2018) 386–390.
- [6] V. Guiliard, V. Issoupov, A.Redl. N. Gontard, *Food preservative content reduction by controlling sorbic acid release from a superficial coating*, Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 10 (2009) 108–115.
- [7] M. Ding, , J. Peng, S. Ma, Y. Zhang, *An environment-friendly procedure for the high performance liquid chromatography determination of benzoic acid and sorbic acid in soy sauce*, Food Chem. 183 (2015) 26–29.
- [8] T. Kokya, K. Farhadi, A. Kalhori, *Optimized Dispersive Liquid–Liquid Microextraction and Determination of Sorbic Acid and Benzoic Acid in Beverage Samples by Gas Chromatography*, Food Anal. Methods 5 (2012) 351–358.
- [9] A. Lahti, V. Pylvanen, M. Hannuksela, *Immediate irritant reactions of benzoic acid are enhanced in washed skin areas*, Contact Dermat. 33 (1995) 177–182.
- [10] J. Anderson, *Allergic reactions to food*, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 36 (1996) 19–38.
- [11] M. Lee, C. Lin, Z. Li. T. Tsai, *Simultaneous analysis of antioxidants and preservatives in cosmetics by supercritical fluid extraction combined with liquid chromatography-mass spectrometry*, J. Chromatogr. A 1120 (2006) 244–251.

- [12] C. Chen, W. Hsu, Y. Lu, J. Weng, C. Feng, *Determination of parabens using two microextraction methods coupled with capillary liquid chromatography-UV detection*, *Food Chem* 241 (2018) 411–418.
- [13] M. Becerra-Herrera, V. Miranda, D. Arismendi, P. Richter, *Chemometric optimization of the extraction and derivatization of parabens for their determination in water samples by rotating-disk sorptive extraction and gas chromatography mass spectrometry*, *Talanta* 176 (2018) 551–557.
- [14] L. Li, H. Hsieh, C. Hsu, *Clinical Application of Ambient Ionization Mass Spectrometry*, *Mass Spectrom.* 6 (2017) 1–12.
- [15] A. Venter, M. Nefliu, R. G. Cooks, *Ambient desorption ionization mass spectrometry*, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 284–290.
- [16] H. Chen, J. Zheng, X. Zhang, M. Luo, Z. Wang, X. Qiao, *Surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for direct ambient sample analysis without toxic chemical contamination*, *J. Mass Spectrom.* 42 (2007) 1045–1056.
- [17] T. Kauppila, A. Flink, J. Pukkila, R. Ketola, *Analysis of nitrogen-based explosives with desorption atmospheric pressure photoionization mass spectrometry*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 30 (2016) 467–475.
- [18] M. Doué, G. Dervilly-Pinel, A. Gicquiau, K. Pouponneau, F. Monteau, B. Le Bizec, *High throughput identification and quantification of anabolic steroid esters by atmospheric solids analysis probe mass spectrometry for efficient screening of drug preparations*, *Anal. Chem.* 86 (2014) 5649–5655.
- [19] J. Sampson, A. Hawkrige, D. Muddiman, *Generation and Detection of Multiply-Charged Peptides and Proteins by Matrix-Assisted Laser Desorption Electrospray Ionization (MALDESI) Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 17 (2006) 1712–1716.
- [20] P. Nemes, A. Vertes, *Atmospheric-pressure molecular imaging of biological tissues and biofilms by LAESI mass spectrometry*, *J. Vis. Exp.* 43 (2010) 2–5.
- [21] T. Kauppila, N. Talaty, T. Kuuranne, T. Kotiaho, R. Kostainen, R. Cooks, *Rapid analysis of metabolites and drugs of abuse from urine samples by desorption electrospray ionization-mass spectrometry*, *Analyst* 132 (2007) 868–875.
- [22] D. Calligaris, D. Caragacianu, X. Liu, I. Norton, C. Thompson, A. Richardson, *Application of desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging in breast cancer margin analysis*, *P. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 15184–15189.

- [23] J. Williams, J. Scrivens, *Rapid accurate mass desorption electrospray ionisation tandem mass spectrometry of pharmaceutical samples*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 3643–3650.
- [24] R. Chen, J. Deng, L. Fang, Y. Yao, B. Chen, X. Wang, T. Luan, *Recent applications of ambient ionization mass spectrometry in environmental analysis*, *Trends Environ. Anal. Chem.* 15 (2017) 1–11.
- [25] T. Čajka, K. Riddellová, P. Zomer, H. Mol, J. Hajšlová, *Direct analysis of dithiocarbamate fungicides in fruit by ambient mass spectrometry*, *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 28 (2011) 1372–1382.
- [26] B. Avula, T. Smillie, Y. Wang, J. Zweigenbaum, I. Khan, *Authentication of true cinnamon (*Cinnamon verum*) utilising direct analysis in real time (DART)-QToF-MS*, *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 32 (2015) 1–8.
- [27] I. Cotte-Rodríguez, Z. Takáts, N. Talaty, H. Chen, R. Cooks, *Desorption electrospray ionization of explosives on surfaces: sensitivity and selectivity enhancement by reactive desorption electrospray ionization*, *Anal. Chem.* 77 (2005) 6755–6764.
- [28] www.asap-ms.com; staženo 6.10.2019.
- [29] B. Jia, Y. Ouyang, R. Sodhi, B. Hu, T. Zhang, J. Li, H. Chen, *Differentiation of human kidney stones induced by melamine and uric acid using surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*, *J. Mass Spectrom.* 46 (2011) 313–319.
- [30] C. Hsu, P. Chou, R. Zare, *Imaging of Proteins in Tissue Samples Using Nanospray Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, *Anal. Chem.* 87 (2015) 11171–11175.
- [31] M. Li, B. Jia, L. Ding, F. Hong, Y. Ouyang, R. Chen, S. Zhou, H. Chen, X. Fanf, *Document authentication at molecular levels using desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry imaging*, *J. Mass Spectrom.* 48 (2013) 1042–1049.
- [32] C. McEwen, R. McKay, B. Larsen, *Analysis of solids, liquids, and biological tissues using solids probe introduction at atmospheric pressure on commercial LC/MS instruments*, *Anal. Chem.* 77 (2005) 7826–7831.
- [33] E. Crevelin, F. Salami, M. Alves, B. de Martinis, A. Crotti, L. Moraes, *Direct Analysis of Amphetamine Stimulants in a Whole Urine Sample by Atmospheric Solids Analysis Probe Tandem Mass Spectrometry*, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 27 (2016) 944–947.

- [34] C. Barrère, F. Maire, C. Afonso, P. Giusti, *Atmospheric solid analysis probe-ion mobility mass spectrometry of polypropylene*, *Anal. Chem.* 84 (2012) 9349–9354.
- [35] L. Tose, M. Murgu, B. Vaz, W. Romao, *Application of Atmospheric Solids Analysis Probe Mass Spectrometry (ASAP-MS) in Petroleomics: Analysis of Condensed Aromatics Standards, Crude Oil, and Paraffinic Fraction*, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 28 (2017) 2401–2407.
- [36] H. Pan, H. Lundin, *Rapid detection and identification of impurities in ten 2-naphthalenamines using an atmospheric pressure solids analysis probe in conjunction with ion mobility mass spectrometry*, *E. J. Mass Spectrom.* 17 (2011) 217–225.
- [37] J. Rozenski, *Analysis of nucleosides using the atmospheric-pressure solids analysis probe for ionization*, *Int. J. Mass Spectrom.* 304 (2011) 204–208.
- [38] C. Karler, K. Parchert, J. Ricken, B. Carson, *Identification of Porphyrin-Silica Composite Nanoparticles using Atmospheric Solids Analysis Probe Mass Spectrometry*, *MRS Adv.* 4 (2019) 2079–2086.
- [39] WHO report on the global tobacco epidemic, 2008: The MPOWER package, World Health Organization, Geneva 2008.
- [40] D. Carrizo, I. Nerín, C. Domeno, P. Alfaro, C. Nerín, *Direct screening of tobacco indicators in urine and saliva by Atmospheric Pressure Solid Analysis Probe coupled to quadrupole-time of flight mass spectrometry (ASAP-MS-Q-TOF-)*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 124 (2016) 149–156.
- [41] T. Čajka, K. Riddellová, M. Tomaninová, J. Hajšlová, *Ambient mass spectrometry employing a DART ion source for metabolomic fingerprinting/profiling: A powerful tool for beer origin recognition*, *Metabolomics* 7 (2011) 500–508.
- [42] H. Daňhelová, J. Hradecký, Š. Přinosilová, T. Čajka, K. Riddellová, L. Václavík, J. Hajšlová, *Rapid analysis of caffeine in various coffee samples employing direct analysis in real-time ionization-high-resolution mass spectrometry*, *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 2883–2889.
- [43] C. Gossner, J. Schlundt, P. Embarek, S. Hird, D. Lo-Fo-Wong, J. Beltran, K. Teoh, A. Tritscher, *The melamine incident: Implications for international food and feed safety*, *Environ. Health Perspect.* 117 (2009) 1803–1808.
- [44] A. Dane, R. Cody, *Selective ionization of melamine in powdered milk by using argon direct analysis in real time (DART) mass spectrometry*, *Anlst* 135 (2010) 696–699.

- [45] L. Zhang, W. Yong, J. Liu, S. Wang, Q. Chen, T. Guo, J. Zhang, T. Tan, H. Su, Y. Dong, *Determination of Dicyandiamide in Powdered Milk Using Direct Analysis in Real Time Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry*, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 26 (2015) 1414–1422.
- [46] L. Václavík, M. Zachariášová, V. Hrbek, J. Hajšlová, *Analysis of multiple mycotoxins in cereals under ambient conditions using direct analysis in real time (DART) ionization coupled to high resolution mass spectrometry*, *Talanta* 82 (2010) 1950–1957.
- [47] S. Gerbig, Z. Takáts, *Analysis of triglycerides in food items by desorption electrospray ionization mass spectrometry*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 2186–2192.
- [48] H. Chen, X. Zhang, L. Mingbiao, *Desorption electrospray ionization mass spectrometry for fast detection of Sudan dyes in foods without sample pretreatment*, *Chinese J. Anal. Chem.* 34 (2006) 464–468.
- [49] W. Jiang, Y. Shui-Ping, Y. Fei-Yan, L. Yan, L. Ming, S. Yu-Hang, Z. Ye-Bing, C. Huan-Wen, *Rapid determination of dimethoate in nanoliter of juice using surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*, *Chinese J. Anal. Chem.* 38 (2010) 453–457.
- [50] H. Chen, H. Liang, J. Ding, J. Lai, Y. Huan, X. Qiao, *Rapid differentiation of tea products by surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*, *J. Agr. Food Chem.* 55 (2007) 10093–10100.
- [51] M. Cvijović, V. Di Marco, S. Stanković, Z. Nedić, L. Joksović, N. Mihailović, *Atmospheric solids analysis probe with mass spectrometry for chlorpyrifos and chlorpyrifos-oxon determination in apples*, *Acta Chim. Slov.* 66 (2019) 70–77.
- [52] M. Cechová, I. Hradilová, P. Smýkal, P. Barták, P. Bednář, *Utilization of atmospheric solids analysis probe mass spectrometry for analysis of fatty acids on seed surface*, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 1169–1180.
- [53] I. Ferreira, E. Mendes, P. Brito, M. Ferreira, *Simultaneous determination of benzoic and sorbic acids in quince jam by HPLC*, *Food Res. Int.* 33 (2000) 113–117.
- [54] H. Maher, N. Alzoman, M. Almehal. H. Alotaibi, N. Alotaibi, H. Al-Showimanm *Quantitative screening of parabens in Ready-to-eat foodstuffs available in the Saudi market using high performance liquid chromatography with photodiode array detection*, *Arab. J. Chem.* 13 (2020) 2897–2911.

- [55] C. Guarino, F. Fuselli, A. Mantia, L. Longo, *Development of an RP-HPLC method for the simultaneous determination of benzoic acid, sorbic acid, natamycin and lysozyme in hard and pasta filata cheeses*, *Food Chem.* 127 (2011) 1294–1299.
- [56] C. Dong, Y. Mei, L. Chen, *Simultaneous determination of sorbic and benzoic acids in food dressing by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography*, *J. Chromatogr. A* 1117 (2006) 109–114.
- [57] M. González, M. Gallego, M. Valcárcel, *Simultaneous gas chromatographic determination of food preservatives following solid-phase extraction*, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 321–329.
- [58] C. De Luca, S. Passi, E. Quattrucci, *Simultaneous determination of sorbic acid, benzoic acid and parabens in foods: A new gas chromatography-mass spectrometry technique adopted in a survey on italian foods and beverages*, *Food Addit. Contam.* 12 (1995) 1–7.
- [59] H. Huang, C. Chiu, I. Huang, J. Yeh, *Analyses of preservatives by capillary electrochromatography using methacrylate ester-based monolithic columns*, *Electrophoresis* 25 (2004) 3237–3246.
- [60] K. Kuo, Y. Hsieh, *Determination of preservatives in food products by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis with multiwavelength detection*, *J. Chromatogr. A* 768 (1997) 334–341.
- [61] M. Haunschmidt, W. Buchberger, Ch. Klampfl, R. Hertsens, *Identification and semi-quantitative analysis of parabens and UV filters in cosmetic products by direct-analysis-in-real-time mass spectrometry and gas chromatography with mass spectrometric detection*, *Anal. Methods* 3 (2011) 99–104.
- [62] J. Liu, H. Wang, N. Manicke, J. Lin, R. Cooks, Z. Ouyang, *Development and Application of Paper Spray Ionization Mass Spectrometry*, *Anal. Chem.* 82 (2010) 2463–2471.
- [63] M. Yu, R. Wen, L. Jiang, S. Huan, Z. Fang, B. Chen, L. Wang, *Rapid analysis of benzoic acid and vitamin C in beverages by paper spray mass spectrometry*, *Food Chem.* 268 (2018) 411–415.
- [64] D. Mosler, *Identifikace konzervačních látek v potravinách ambientními ionizačními technikami*, Olomouc, 2018, Univerzita Palackého v Olomouci, Fakulta přírodovědecká, Katedra analytické chemie.

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

5-HMF – 5-hydroxymethylfurfural, 5-hydroxymethylfurfural

AIMS – ambient ionization mass spectrometry, ambienní ionizační hmotnostní spektrometrie

APCI – atmospheric pressure chemical ionization, chemická ionizace za atmosférického tlaku

APPI – atmospheric pressure photoionization, fotoionizace za atmosférického tlaku

ASAP – atmospheric solids analysis probe, sonda pro analýzu vzorku za atmosférického tlaku

BSTFA – bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid

CE – capillary electrophoresis, kapilární elektroforéza

CPO – chlorpyrifos-oxon, chlorpyrifos oxon

CPS – chlorpyrifos, chlorpyrifos

CZE – capillary zone electrophoresis, kapilární zónová elektroforéza

DAD – diode array detector, detektor diodového pole

DAPCI – desorption atmospheric pressure chemical ionization, desorpce chemickou ionizací za atmosférického tlaku

DAPPI – desorption atmospheric pressure ionization, desorpční fotoionizace za atmosférického tlaku

DART – direct analysis in real time, přímá analýza v reálném čase

DCD – dicyandiamide, dicyandiamid

DESI – desorption electrospray ionization, desorpční elektrosprej

DTC – dithiocarbamates, dithiokarbamáty

ESI – electrospray ionization, elektrosprejová ionizace

FAO – Food and agriculture organization, Organizace pro výživu a zemědělství

FDA – Food and drug administration, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv

FID – flame ionization detector, plameno-ionizační detektor

GC – gas chromatography, plynová chromatografie

HPLC – high-performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IM – ion mobility, iontová mobilita

LAESI – laser ablation electrospray ionization, laserová ablace s ionizací elektrosprejem

LC – liquid chromatography, kapalinová chromatografie

m/z – mass-to-charge ratio, poměr hmoty ku náboji

MALDESI – matrix-assisted laser desorption electrospray ionization, matricí asistovaná laserová desorpce s ionizací elektrosprejem

MALDI – matrix assisted laser desorption/ionization, matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace

MEKC – micellar electrokinetic chromatography, micelární elektrokinetická chromatografie

MRL – maximum residue level, maximální legální limity

MRM – multiple reaction monitoring, sledování více reakcí

MS – mass spectrometry, hmotnostní spektrometrie

MS/MS – tandem mass spectrometry, tandemová hmotnostní spektrometrie

nanoDESI – desorption nanoelectrospray, desorpční nanoelektrosprej

nanoESI – nanoelectrospray ionization, nanoelektrosprej

PCA – principal component analysis, analýza hlavních komponent

PDA – photodiode array detector, detektor s fotodiodovým polem

PTFE – polytetrafluorethylen, polytetrafluorethylen

RDX – hexogen, hexogen

RP – reversed phase, obrácené fáze

SDAPCI – surface desorption atmospheric pressure chemical ionization, povrchová desorpce chemickou ionizací za atmosférického tlaku

SIM – selected ions monitoring, monitorování vybraných iontů

SPE – solid phase extraction, extrakce tuhou fází

SPME – solid phase microextraction, mikroextrakce tuhou fází

TLC – thin layer chromatography, tenkovrstvá chromatografie

TNT – trinitrotoluene, trinitrotoluen

TOF – time of flight, detektor doby letu

UPLC – ultra performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

UV-VIS – ultraviolet-visible spectroscopy, ultrafialovo-viditelná spektroskopie

WHO – World health organization, Světová zdravotnická organizace