

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta  
Katedra analytické chemie



Využití plynové chromatografie v analýze  
fotoiniciátorů

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Autor:	Mgr. Radka Pechancová
Studijní obor:	Analytická chemie
Konzultant práce:	RNDr. Tomáš Pluháček, Ph.D.

2019 Olomouc

## **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora:	Mgr. Radka Pechancová
Název práce:	Využití plynové chromatografie v analýze fotoiniciátorů
Typ práce:	Rigorózní
Pracoviště:	Katedra analytické chemie
Konzultant:	RNDr. Tomáš Pluháček, Ph.D
Rok odevzdání práce:	2019
Anotace:	

Předložená práce se zabývá vývojem a validací metody pro analýzu fotoiniciátorů v obalových materiálech pomocí plynové chromatografie ve spojení s vakuum-ultrafialovým detektorem (GC-VUV) a jejím srovnáním s rutinně využívanou plynovou chromatografií ve spojení s hmotnostním detektorem (GC-MS). Teoretická část se věnuje obalovým materiálům určeným pro potraviny, jsou zde uvedeny typy fotoiniciátorů a způsoby jejich migrace do potravin. Další část popisuje instrumentaci a aplikace GC-VUV, součástí je i rešerše zaměřená na analýzu fotoiniciátorů pomocí jiných technik. Náplní experimentální části byl vývoj dvou metod pro separaci a detekci fotoiniciátorů využívající plynovou chromatografii s VUV nebo MS detekcí. Obě metody byly validovány, kdy validace zahrnovala ověření meze detekce, meze stanovitelnosti a linearity a následně aplikovány na stanovení 9 vybraných fotoiniciátorů v 7 komerčně dostupných obalech potravin. Oběma technikami bylo dosaženo srovnatelných výsledků, relativní rozdíl mezi naměřenými koncentracemi byl -15 až 18 %. Ve všech obalech byl nalezen benzofenon v rozmezí 0,31–4,23 mg/kg. Dokonce byl překročen i specifický migrační limit pro tento fotoiniciátor. V obalech vyrobených z plastu byl stanoven hlavně 2-hydroxy-2-methylpropiofenon, v papírových obalech pak 2-ethylhexyl-4-(dimethylamino)benzoát a ethyl-4-(dimethylamino)benzoát. Vyvinutá a validovaná GC-VUV metoda je vhodná pro stanovení fotoiniciátorů v obalech a lze ji tak použít jako alternativní metodu k GC-MS.

Klíčová slova: extrakce, fotoiniciátory, GC-MS, GC-VUV, migrace, obal, plynová chromatografie

Počet stran: 64

Počet příloh: 2

Jazyk: čeština

**Bibliographical identification:**

Author's first name and surname: Mgr. Radka Pechancová  
Title: The utilization of gas chromatography in photoinitiators analysis  
Type of thesis: Rigorous  
Department: Department of Analytical Chemistry  
Consultant: RNDr. Tomáš Pluháček, Ph.D  
The year of submission: 2019  
Annotation:

The presented thesis is focused on development and validation of the method for analysis of photoinitiators in packaging materials by gas chromatography with vacuum-ultraviolet detection (GC-VUV) and on its comparison with routinely used gas chromatography-mass spectrometry method (GC-MS). The theoretical part involves various materials designated for food packages, photoinitiators types and ways of their migration into food. Another part describes the instrumentation and application of GC-VUV, the overview dealing with photoinitiators analysis using different techniques is mentioned as well. Experimental part is devoted to the development of two methods enabling the separation and detection of photoinitiators by gas chromatography with VUV or MS detection. Both methods were validated in terms of limit of detection, limit of quantification and linearity and subsequently applied to the determination of 9 chosen photoinitiators in 7 commercially available food packages. The found concentrations showed good agreement, the relative difference between results obtained from GC-VUV and GC-MS was -15 up to 18%. Predominantly benzophenone was found in all analysed samples in the range of 0.31–4.23 mg/kg. Even the specific migration limit of this photoinitiator was exceeded. In samples from plastic materials, mainly 2-hydroxy-2-methylpropiophenone was detected, whereas 2-ethylhexyl-4-(dimethylamino)benzoate and ethyl-4-(dimethylamino)benzoate were present merely in food packages consisting of paper. The developed and validated GC-VUV method is suitable for the determination of photoinitiators in food packages and could be a useful alternative to GC-MS.

Keywords: extraction, gas chromatography, GC-MS, GC-VUV, migration, packaging, photoinitiators

Number of pages: 64

Number of appendices: 2

Language: Czech

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla veškeré informační zdroje a použitou literaturu. Tato práce ani jiná její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci 17.5.2019

.....

Podpis

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala konzultantovi mé rigorózní práce RNDr. Tomáši Pluháčkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a čas, který mi při vypracování práce věnoval.

Dále bych ráda poděkovala prof. Kevinu Schugovi, Ph.D. a M.Eng. Changling Qiu, Ph.D. za poskytnutí prostoru, přístrojů a chemikálií pro vypracování mé rigorózní práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Karlu Lemrovi, Ph.D. za možnost absolvování odborné stáže na University of Texas in Arlington.

# Obsah

<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>1</b>
<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>2</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>3</b>
2.1 Materiály určené pro styk s potravinami – obalové materiály .....	3
2.1.1 Materiály používané na výrobu obalů potravin .....	3
2.1.2 Rizika vyplývající z používání obalových materiálů – migrace .....	4
2.2 Fotoiniciátory .....	6
2.2.1 Typy fotoiniciátorů a riziko migrace .....	8
2.2.2 Nové trendy ve vývoji a aplikaci fotoiniciátorů .....	9
2.2.3 Legislativa, specifické migrační limity .....	10
2.3 Analýza fotoiniciátorů .....	13
2.4 Plynová chromatografie ve spojení s VUV detektorem .....	21
2.4.1 VUV detekce .....	22
2.4.2 Zpracování dat .....	24
2.4.3 Možnosti spektrálního rozlišení .....	25
2.4.4 Aplikace GC-VUV .....	26
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>31</b>
3.1 Chemikálie, přístroje a pomůcky .....	31
3.1.1 Chemikálie .....	31
3.1.2 Přístroje .....	32
3.1.3 Pomůcky .....	33
3.1.4 Analyzované vzorky obalových materiálů .....	34
3.2 Pracovní postup .....	34
3.2.1 Příprava standardů a kalibračních roztoků .....	34
3.2.2 Příprava vzorků obalů .....	34
<b>4. VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>36</b>

4.1 Stanovení pomocí GC-VUV .....	36
4.1.1 Optimalizace GC-VUV metody .....	36
4.1.2 VUV spektra fotoiniciátorů .....	40
4.1.3 Analýza směsi 2-ITX a 4-ITX .....	45
4.2 Stanovení pomocí GC-MS .....	48
4.3 Validace metod (v omezeném rozsahu) .....	49
4.4 Stanovení fotoiniciátorů nalezených v obalových materiálech.....	51
<b>5. ZÁVĚR .....</b>	<b>58</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>60</b>
<b>7. PŘÍLOHY .....</b>	<b>64</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2-ITX	2-isopropyl-9H-thioxanten-9-on
2-MBP	2-methylbenzofenon
3-MBP	3-methylbenzofenon
4-ITX	4-isopropyl-9H-thioxanten-9-on
4-MBP	4-methylbenzofenon
BP	Benzofenon
CPK	1-hydroxycyklohexyl fenyl keton
DAD	Detektor diodového pole
DART	Přímá analýza v reálném čase
DVB	Divinylbenzen
EDMAB	Ethyl-4-(dimethylamino)benzoát
EHDAB	2-ethylhexyl-4-(dimethylamino)benzoát
EI	Elektronová ionizace
GC	Plynová chromatografie
GC-FID	Plynová chromatografie s plamenově-ionizačním detektorem
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
GC-MS/MS	Plynová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-DAD	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole
HPLC-MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HPLC-MS/MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez stanovitelnosti
MS	Hmotnostní spektrometrie
PDMS	Polydimethylsiloxan
PTFE	Polytetrafluorethylen
SNR	Poměr signálu k šumu
UV	Ultrafialové záření
VUV	Vakuum-ultrafialové záření



# 1. ÚVOD

Obaly potravin slouží zejména k ochraně uchovávaných výrobků před různými fyzikálními, chemickými či biologickými vlivy. Dále informují zákazníka o složení výrobků, nutričních hodnotách a zvyšují i jejich celkovou atraktivitu. Jednou z hlavních složek inkoustů používaných pro potisk obalů jsou fotoiniciátory. Tato skupina chemických sloučenin má ve struktuře funkční skupiny citlivé na dopad světla, které působením UV záření iniciují polymerizační reakci zodpovědnou za tzv. vytvrzování tisků (zasychání barev). Nicméně nezreagované fotoiniciátory mohou být stále přítomny v obalových materiálech a za určitých podmínek (teplota, vlhkost, světlo, slabá bariéra mezi obalem a potravinou, aj.) dochází k jejich migraci do balených potravin. Tato migrace ale může vést ke kontaminaci uchovávaných výrobků a následnému negativnímu dopadu těchto cizorodých sloučenin na lidské zdraví. Z tohoto důvodu je žádoucí sledovat jejich obsah jak v potravinách, tak i v samotných obalech.

Nejčastěji byly fotoiniciátory analyzovány technikami jako jsou plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) či vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS), které pouze v omezených možnostech umožňují identifikaci izomerních fotoiniciátorů (např. izomerů methylbenzofenonu). Z tohoto důvodu byla tato práce zaměřena na vývoj inovativní metody pro stanovení fotoiniciátorů (a to i těch izomerních) v obalových materiálech pomocí spojení plynové chromatografie s vakuum-ultrafialovým detektorem (GC-VUV). Pro účely porovnání získaných výsledků byla rovněž vyvinuta i referenční GC-MS metoda. Obě metody byly optimalizovány v několika parametrech, validovány, a nakonec aplikovány na analýzu 9 fotoiniciátorů v 7 reálných vzorcích. Výsledky shrnuté v rigorózní práci byly publikovány v odborném časopise Journal of Separation Science (Příloha č.2).

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Materiály určené pro styk s potravinami – obalové materiály

Pojmem materiály určené pro styk s potravinami („*food contact materials*“) se označují takové materiály, které záměrně přicházejí do styku s potravinami či vstupními surovinami, a to v jakémkoliv stupni výrobního procesu (výroba, balení, skladování, přeprava, prodej) [1]. Nejčastěji diskutované jsou ale samotné obaly používané pro dlouhodobé uchovávání potravin (plastové či papírové obaly, konzervy atd.) [2]. Používání potravinových obalů má několik významných funkcí [1]:

- *Ochranná:*
  - Ochrana výrobku během jeho oběhu před různými mechanickými, klimatickými, biologickými a společenskými vlivy prostředí (prach, teplota, světlo, vlhkost, působení mikroorganismů, manipulace atd.), ale i zabránění nežádoucího účinku samotného výrobku na okolí.
- *Komunikační:*
  - Prostředek vizuální komunikace mezi výrobcem na jedné straně a dopravou, obchodem a spotřebitelem na straně druhé.
  - Obal informuje zákazníka (udává nutriční složení, použité suroviny, informace o výrobci atd.).
- *Ekonomická:*
  - Vytvoření a aplikace optimálního obalu pro daný výrobek (snížení plýtvání a ztrát potravin, prodloužení doby trvanlivosti).
- *Ekologická:*
  - Používání především ekologických a recyklovatelných obalových materiálů.

Dále je nutné brát v potaz to, že samotné obalové materiály a z nich vyrobené obaly musí být zdravotně nezávadné a neměly by být zdrojem látek kontaminujících potraviny a životní prostředí.

#### 2.1.1 Materiály používané na výrobu obalů potravin

Správný výběr materiálů a technologií na výrobu obalů má vliv zejména na kvalitu a čerstvost potravin během distribuce a skladování [3]. Mezi obecně používané materiály

patří sklo, kov, papír a plast. Výroba, použití a vlastnosti těchto materiálů jsou shrnuty v Tabulce I. V dnešní době se využívají i vrstvené či kombinované obaly vyrobené z několika různých materiálů (např. papírové obaly potažené vrstvičkou plastu či kovu), které se vyznačují různými fyzikálními, chemickými a estetickými vlastnostmi. Navíc díky neustálému vývoji v oblasti výroby narůstá používání ekologičtějších a recyklovatelných materiálů, což vede ke snížení dopadu použitých obalových materiálů na životní prostředí.

**Tabulka I** Srovnání materiálů používaných na výrobu potravinových obalů [3]

Materiál	Výroba	Použití	Výhody	Nevýhody
Sklo	Tavení oxidu křemičitého, uhličitanu sodného, vápence a oxidu hlinitého (1500 °C), tvarování	Nápoje, sterilizované potraviny	Odolný, nepropouští pachy a plyny, průhledný (vnější kontrola), barevný (uchovávání látek citlivých na světlo), recyklovatelný	Váhově těžký (dražší přeprava), křehký materiál
Kov	Tvarování hliníkových a ocelových plechů	Konzervy, tácky, uzávěry lahví, papírové obaly s hliníkovou fólií (nápoje, koření)	Fyzikálně odolný, tvarovatelný, recyklovatelný	Snadná koroze, vysoká cena
Plast	Kondenzační polymerizace (polykondenzace) nebo adiční polymerizace	Kelímky, jednorázové nádoby, lahve, sáčky	Levný, lehký, chemicky odolný	Propustnost plynů, pachů, světla, nízkomolekulárních látek
Papír	Zpracování buničiny různých rostlinných materiálů pomocí papírenských strojů	Obaly na suché potraviny (cukr, mouka atd.), kartonové obaly (nápoje, mražené potraviny)	Levný, lehký, recyklovatelný	Slabá bariéra mezi obalem a potravinou, nízká odolnost

### 2.1.2 Rizika vyplývající z používání obalových materiálů – migrace

I když obalové materiály chrání potraviny před kontaminací z vnějšího prostředí, mohou být i samotným zdrojem jejich nežádoucí kontaminace. Některé chemické sloučeniny v obalech jsou totiž schopny přecházet do potravin procesem známým jako migrace [1]. Migraci látek lze obecně rozdělit do dvou skupin, a to dle způsobů, kterým k ní dochází [4]. **Vyvolaná („set-off“)** migrace většinou nastává v případě přímého

přenosu látek z vnější strany obalu na stranu vnitřní, k čemuž dochází například při skladování prázdných obalů [1, 4]. Naopak u tzv. **permeační migrace** dochází k přenosu látek z vnější strany do vnitřní díky dostatečné propustnosti (pórovitosti) materiálu [4].

Migraci podléhají zejména nízkomolekulární chemické látky (molekulová hmotnost nižší než 1000 Da) a její rozsah závisí na několika faktorech:

- fyzikálně-chemických vlastnostech migrující látky (polarita, bod varu, molekulová hmotnost)
- použitím obalu, typu a chemických vlastnostech potraviny
- skladovacích podmínkách (teplota, světlo, vlhkost atd.)
- poměru plochy obalu k množství balené potraviny

Škála chemických látek migrujících z obalu do potravin je široká a závisí hlavně na použitím obalovém materiálu. Z relativně inertních materiálů jako je sklo a kov mohou migrovat jen látky nacházející se na vnitřním povrchu obalu, zatímco chemická difúze barviv či adheziv, které se používají na úpravu vnější strany, je zanedbatelná (prakticky nemožná). Mimoto u kovových materiálů je nejpravděpodobnější migrace kovových iontů vlivem koroze, proto jsou tyto obaly nejčastěji impregnovány epoxidovou pryskyřicí [5]. Naopak k velmi snadné migraci látek dochází u obalů vyrobených z papíru [1]. Tento materiál se používá buď jako sekundární obal, anebo jako primární obal v případě suchých potravin. Ke kontaminaci potravin může docházet převážně z vnitřního povrchu obalu, tedy ve finálním výrobku je pak žádoucí sledovat obsah formaldehydu, fenolu, primárních aromatických aminů, těžkých kovů, polycyklických aromatických aminů či benzopyrenu používaných při výrobě papíru. Navíc vzhledem k velké pórovitosti tohoto materiálu mohou chemické látky snadno migrovat i z vnější strany (např. tiskové barvy). Avšak používáním vrstvených (kombinovaných) materiálů (papír s hliníkovou či plastovou fólií) lze kontaminaci potravin významně redukovat. Příklady chemických látek potenciálně migrujících z papírových obalů jsou uvedeny v Tabulce II.

Posledním materiálem jsou plastové obaly, které se sice řadí k velmi odolným materiálům ale s vysokou propustností chemických látek. Většinou se skládají z několika typů plastů (polyethylen, polyvinylchlorid atd.), navíc jsou často obohaceny látkami, které zlepšují jejich vlastnosti jako jsou například UV filtry, antioxidanty nebo barviva [5]. Tyto aditiva jsou pak potenciálními migranty, aniž by byly v přímém styku s potravinou.

**Tabulka II** Přehled kontaminantů migrujících z papírových a kartonových obalových materiálů [1]

Typ obalového materiálu	Vrstva v kontaktu s potravinou	Migrující látky	Použití
Papír	Papír	Tiskové barvy, minerální oleje	Balení suchých potravin (mouka, cukr)
	Polyethylen	Polyoleofiny	
	Nepřilnavý nátěr	Perfluorované uhlovodíky	
	Karton	Tiskové barvy, minerální oleje, ftaláty	Kartonová balení (rýže, cereálie, kojenecká výživa)
Karton	Polyethylen	Polyoleofiny, UV stabilizátory	Balení nápojů, mražených výrobků, dětské výživy
	Hliník	Hlinité ionty	Pochutiny
	Polypropylen	Polyoleofiny, antioxidanty, benzofenon	Tašky v krabicích

Migrace chemických sloučenin z obalů do potravin je v současné době celosvětovým problémem, neboť velké množství penetrujících látek vykazuje toxické vlastnosti a negativně ovlivňuje zdraví spotřebitelů [5]. Byla potvrzena mnoha studiemi a je dokonce považována za sto až tisíc krát horší zdroj kontaminace potravin v porovnání s pesticidy z životního prostředí [6]. Z tohoto důvodu jsou nutná přísná opatření, která by omezila používání takových chemických sloučenin a nastavila i akceptovatelné limity pro jejich maximální množství v potravinách a obalech.

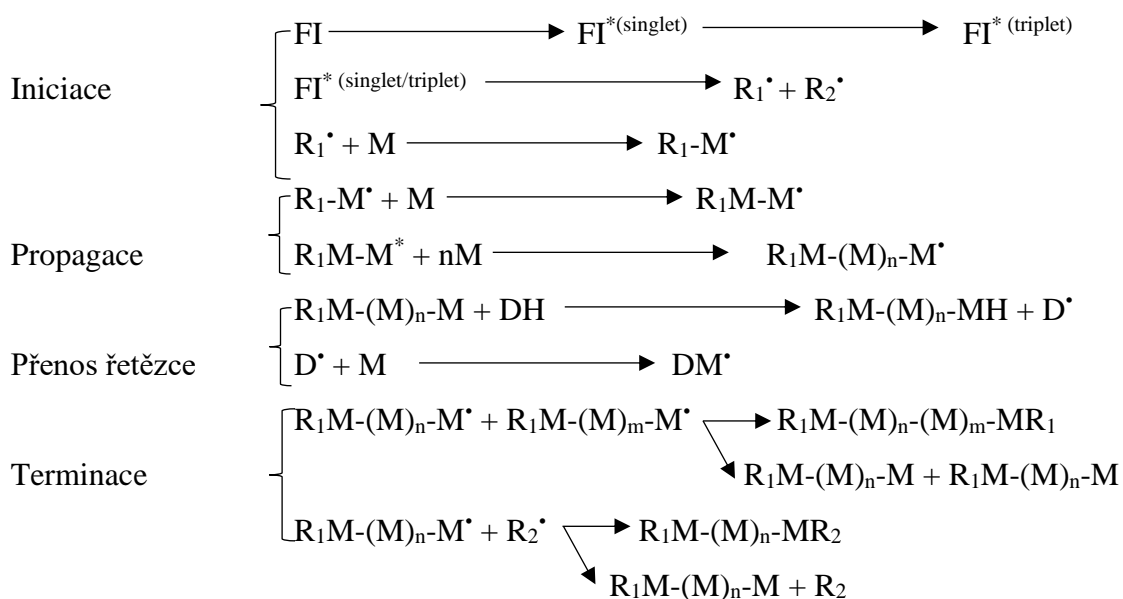
## 2.2 Fotoiniciátory

Chemické složení barev a laků používaných pro potisk potravinových obalů je rozmanité a liší se v závislosti na dodavateli a příslušné aplikaci [7]. Mezi základní složky inkoustů patří barviva a fotoiniciátory. Fotoiniciátory jsou jakožto vysoce fotoaktivní sloučeniny součástí především UV vytvrzovacích tiskových barev a laků [8]. Tyto látky se absorpcí UV záření štěpí na reaktivní sloučeniny (radikály), které iniciují polymerizační reakci, při níž se spojují (polymerují) monomery barviva za vzniku makromolekulárních řetězců. Tento proces je označován také jako vytvrzování, protože barvy a laky přilnuté k potiskovanému materiálu při nich ztrácejí svou tekutou formu a vysychají. Celkový proces vytvrzení má 4 kroky: iniciaci, propagaci, přenos řetězce a terminaci (Obr. 1). Správná volba fotoiniciátoru pak ovlivňuje vlastní polymerizační proces. Jeho specifické

fotochemické a fotofyzikální vlastnosti jsou extrémně důležité, neboť určují strukturu konečného produktu, charakter a množství meziproductů. Obecně by měly splňovat následující aspekty:

- vysoké absorpční schopnosti v místě aktivace, a to v závislosti na aplikaci a zdroji světla
- vysoká výtěžnost tvorby volných radikálů
- rozpustnost v použité barvě nebo laku
- vysoká stabilita během skladování
- bez zápachu, stálost barevného odstínu
- nízká cena, zanedbatelná toxicita a jednoduchá manipulace

Hlavními výhodami používání fotoiniciátorů je rychlost vytvrzovacího procesu, který lze uskutečnit za laboratorní teploty, přičemž ve většině případů dochází ke spotřebě všech reaktantů bez zbytku.



**Obrázek 1** Princip vzniku polymeru po absorpci UV záření fotoiniciátorem (FI: fotoiniciátor, M: monomer, D: donor, R: zbytek), převzato z práce od Laga a kol. [8]

### 2.2.1 Typy fotoiniciátorů a riziko migrace

Fotoiniciátory lze obecně dělit do dvou velkých skupin podle typu produktů vznikajících při štěpení po absorpci UV záření. Nejčastěji vznikají volné radikály (radikálové fotoiniciátory) nebo kationty (kationtové fotoiniciátory) [7-9].

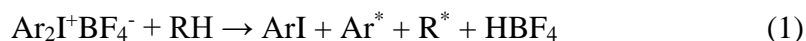
#### Radikálové fotoiniciátory

Absorpcí energie UV záření vznikají volné radikály, které iniciují adiční polymerizační reakci [7, 8]. Jedná se o nejčastěji používané fotoiniciátory a to i přesto, že výtěžnost této reakce může být negativně ovlivněna množstvím kyslíku v okolním vzduchu. Do této skupiny patří hlavně sloučeniny s aromatickými karbonylovými skupinami, které vytvářejí volné radikály štěpením.

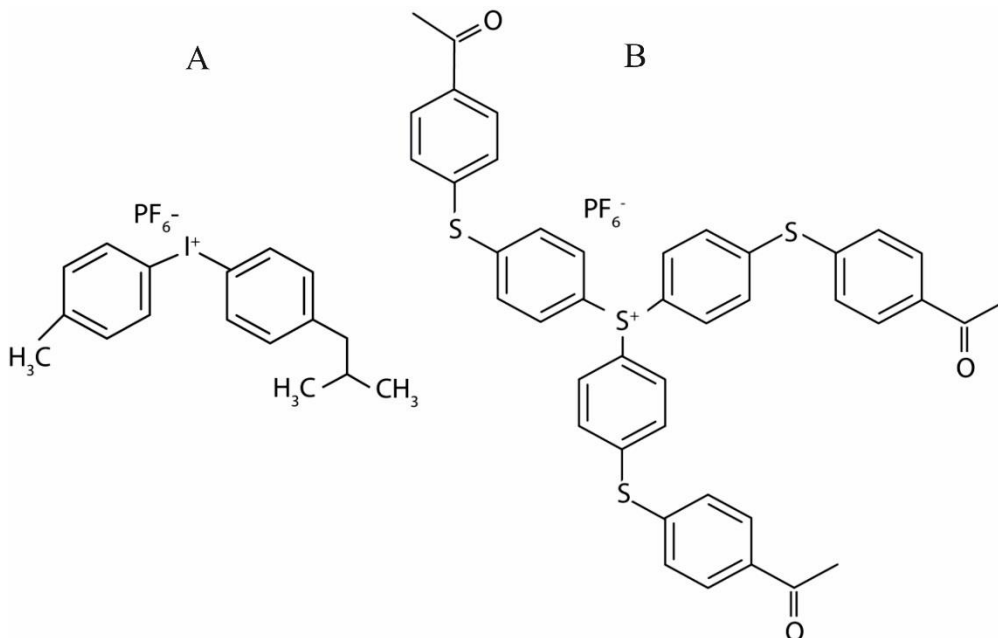
Radikálové fotoiniciátory se pak mohou dále dělit do dvou podskupin, a to na fotoiniciátory I. a II. typu. U fotoiniciátorů I. typu dochází k homolytickému štěpení na  $\alpha$  pozici karbonylové skupiny (méně pravděpodobné je pak  $\beta$ -štěpení). Do této skupiny se řadí benzoínové deriváty, fosfinoxydy, benzylketaly nebo hydroxyacetofenony. Fotoiniciátory II. typu se absorpcí UV záření dostávají do excitovaného stavu, avšak nedochází ke štěpení na radikály. Energie vazby CO-aryl je tak vysoká, že energie UV záření nestačí na její rozštěpení. Fotoiniciátor je tak excitován do tripletového stavu a za použití koiniciátoru dochází ke štěpení za vzniku požadovaného radikálu. Jako koiniciátory lze využít alkoholy, ethery nebo terciární aminy. Mezi fotoiniciátory II. typu patří hlavně aromatické ketony (benzofenon a jeho deriváty, thioxanthony).

#### Kationtové fotoiniciátory

Používání fotoiniciátorů kationtového typu má v současné době rostoucí tendenci, neboť vytváří stabilnější polymery. Obecně lze jejich vzorec vyjádřit jako  $Ar_nX^+Y^-$ , kde Ar značí arylovou skupinu, X je obvykle atom síry, jodu, či fosforu a Y je nejčastěji aniont typu  $BF_4^-$  (tetrafluoroboritanový aniont),  $PF_6^-$  (hexafluorofosforečnanový aniont) a  $AsF_6^-$  (hexafluoroarseničnanový aniont) [7, 8]. Po absorpci UV záření dochází ke štěpení vazby uhlík-síra nebo uhlík-jód a vzniká arylový kationt. Ten společně s aniontem a atomem vodíku vytváří silné Brønstedovy kyseliny podle rovnice:



Tímto způsobem vznikají silné protonové kyseliny, které jsou velmi aktivními iniciátory polymerizačních reakcí. Do této skupiny fotoiniciátorů se řadí triarylsulfoniové soli (např. Irgacure 270) a diaryljodoniové soli (např. Irgacure 250) (Obr. 2).



**Obrázek 2** Chemická struktura fotoiniciátorů Irgacure 250 (A) a Irgacure 270 (B)

Vzhledem k vlastnostem fotoiniciátorů může jednoduše docházet k jejich migraci z obalů do uchovávaných potravin. Nejčastěji k ní dochází dvěma způsoby [8]:

- **Nepřímo** – fotoiniciátor nebo jeho meziprodukt se může dostat do potravin pomocí výparů. Tato migrace je běžná pro těkavé sloučeniny jako je benzofenon a jeho deriváty.
- **Přímo** – k migraci fotoiniciátoru dochází rovnou z potištěné strany obalu do potravin buď pomocí „*set-off*“ (nejčastěji vlivem nedokonalého vytvrzení potisku) nebo permeační migrace.

### 2.2.2 Nové trendy ve vývoji a aplikaci fotoiniciátorů

Poměrně snadná migrace fotoiniciátorů vede v současné době k vývoji nových typů fotoiniciátorů se specifickými vlastnostmi. Jejich používáním by mohla být zcela potlačena samotná migrace či alespoň minimalizován negativní vliv na zdraví spotřebitelů. Mezi nejvíce diskutované fotoiniciátory patří tyto skupiny:



- reaktivnější, levnější a méně toxické fotoiniciátory
- koncept „*Low Migration Inks*“ – inkousty obsahující složky s nižší migrací speciálně navržené pro použití v potravinářském průmyslu
- fotoiniciátory s vyšší molekulovou hmotností (polymerní nebo oligomerní sloučeniny) s minimální pravděpodobností migrace

Dalším řešením by mohlo být omezení či úplné vyloučení jejich používání, což by ale vedlo ke zpomalení a prodražení potisku obalů.

### 2.2.3 Legislativa, specifické migrační limity

Migrace látek do potravin je většinou vyjádřena tzv. specifickým migračním limitem. Tato hodnota definuje maximální množství látky, které může za přesně definovaných podmínek přejít z obalu do potraviny, vztažené na hmotnost balené potraviny [6]. Avšak legislativa týkající se tiskových inkoustů, barev a laků obsahujících fotoiniciátory se ve státech celého světa liší [8]. Z důvodu analýzy potravinových obalů zakoupených v Arlingtonu (USA) je dále diskutována jak legislativa, která platí ve Spojených státech amerických, tak i legislativa platící ve státech Evropské unie.

- **USA:** Inkousty a fotoiniciátory jsou považovány za nepřímá aditiva v potravinách [8]. Neexistuje tu žádná vyhláška regulující jejich specifické migrační limity, nicméně výrobci jsou zodpovědní za vytvoření bariéry bránící jejich migraci do potravin. Za zanedbatelnou migraci je považována koncentrace 50 µg/kg. Pokud je migrace fotoiniciátoru v rozmezí 50 µg/kg až 1 mg/kg, tato látka musí být kvůli následnému prověření toxicity zaznamenána v systému oznámení o látkách, které jsou v kontaktu s potravinami. Migrace vyšší než 1 mg/kg vyžaduje různé toxikologické studie.
- **EU:** V rámci států Evropské unie jsou obecná ustanovení shrnuta ve vyhlášce č. 1935/2004 [6]. Tato vyhláška obsahuje i několik ustanovení, která se týkají konkrétních materiálů:
  - Plastové materiály (č. 10/2011)
  - Recyklované plastové materiály (EU, 2008)
  - Keramika (EU, 1984)

- Aktivní a inteligentní materiály (EU, 2009)
- Celulózové filmy (EU, 2007)

Pouze pro některé fotoiniciátory (benzofenon a jeho deriváty) existuje v Evropské legislativě o plastových materiálech specifický migrační limit. V roce 2009 stanovila Evropská komise pro potravinový řetězec a zdraví zvířat specifický migrační limit pro benzofenon a 4-methylbenzofenon, a to 0,6 mg/kg. V roce 2010 ve Švýcarsku vstoupila v platnost změna nařízení o materiálech v kontaktu s potravinami, byl zaveden seznam povolených látek s jejich specifickými migračními limity, mezi nimiž jsou i fotoiniciátory (část A, příloha 10 tzv. Švýcarské vyhlášky 817.023.21). Pro benzofenon a jeho deriváty (2-, 3- a 4-methylbenzofenon) je uveden specifický migrační limit 0,6 mg/kg. Část B obsahuje látky, které prozatím nebyly podrobeny žádnému toxikologickému testu, a tudíž pro ně prozatím nebyl stanoven specifický migrační limit (v této části lze najít například 1-hydroxycyklohexyl fenyl keton a ethyl-4-(dimethylamino)benzoát). Na základě dostupných informací a studií zabývajících se stanovením 2-isopropylthioxantonu a 2-ethylhexyl-4-(dimethylamino)benzoátu v potravinách označil Evropský úřad pro kontrolu potravin EFSA („*The European Food Safety Authority*“) hodnotu 0,05 mg/kg jako přijatelnou migraci těchto dvou fotoiniciátorů [4]. Prozatím ale pro ně neexistují žádné specifické migrační limity, které by musely být akceptovány.

Fotoiniciátory jsou dále i součástí seznamu látek stanovených EuPIA („*The European Printing Ink Association*“), která se zabývá problematikou inkoustů určených pro potisk obalů potravin [10]. Tato organizace vypracovala pokyny na základě platných evropských právních předpisů obsahujících podrobná doporučení, jak vyrábět a používat inkousty a laky určené pro potisk potravinových obalů. V červnu 2018 vyšel v platnost seznam vhodných fotoiniciátorů pro tiskové inkousty a laky [11, 12]. Fotoiniciátory jsou zde rozděleny do 2 skupin (1 (A-D) a 2) dle vhodnosti použití pro potisk potravinových obalů. Nejméně nebezpečné fotoiniciátory jsou ve skupině 1A, naopak doposud neprostudované fotoiniciátory obsahuje skupina 2.

Konkrétně v České republice platí vyhláška Ministerstva zdravotnictví o hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami a pokrmy č.38/2001 Sb. [9, 13]. Nejdůležitějšími body této vyhlášky jsou suroviny na výrobu jednotlivých materiálů či specifické limity migrujících látek v daných obalech.

Fotoiniciátory jsou zde zmíněny jakožto významná součást inkoustů používaná na potisk papírových či plastových obalů. Nicméně stejně jako v USA i v České republice neexistuje žádná konkrétní legislativa týkající se tiskových inkoustů, barviv, laků a s nimi souvisejících fotoiniciátorů [4, 8].

Následující tabulka shrnuje nejčastěji používané fotoiniciátory v tiskových inkoustech, jejich nežádoucí účinky na lidské zdraví a legislativu v rámci států EU.

**Tabulka III** Přehled kontaminantů nejčastěji migrujících z vytvrzovacích barev [1, 4]

Název	Použití	Legislativa v EU	Specifický migrační limit (mg/kg)	Vliv na zdraví
4,4' - bis(dimethylamino) benzofenon	Vytvrzovací složka barev pro potisk papíru a kartonu	Legislativně neupraveno	-	Studie vlivu na zdraví nejsou dostupné
4,4' - bis(diethylamino) benzofenon	Vytvrzovací složka barev pro potisk papíru a kartonu	Legislativně neupraveno	-	Studie vlivu na zdraví nejsou dostupné
Trifenylfosfát	Vytvrzovací složka barev pro potisk papíru a kartonu	Legislativně neupraveno	-	Nízká akutní toxicita
4-methylbenzofenon	Vytvrzovací složka barev pro potisk papíru a kartonu	Legislativně neupraveno	0,6	Studie vlivu na zdraví nejsou dostupné
Benzofenon	Fotocitlivá látka ve vytvrzovacích barvách	Schválená jako aditivní látka pro potisk a výrobu plastových obalů	0,6	2B karcinogen, dokázaný hepatoxin u potkanů, estrogenní a androgenní aktivita
Methyl 2-benzoylbenzoát	Vytvrzovací složka barev pro potisk papíru a kartonu	Legislativně neupraveno	-	Studie vlivu na zdraví nejsou dostupné
1-hydroxycyklohexyl fenyl keton	Vytvrzovací složka barev pro potisk papíru a kartonu	Legislativně neupraveno	-	Cytotoxické účinky
4-fenylbenzofenon	Vytvrzovací složka barev pro potisk papíru a kartonu	Legislativně neupraveno	-	Studie vlivu na zdraví nejsou dostupné

2-isopropylthioxanton	Vytvrzovací složka barev pro potisk nápojových obalů	Legislativně neupraveno	-	Studie vlivu na zdraví nejsou dostupné
Ethyl-4-(dimethylamino)benzoát	Vytvrzovací složka barvy pro papír a karton	Legislativně neupraveno	-	Studie vlivu na zdraví nejsou dostupné
2-ethylhexyl-4-(dimethylamino)benzoát	Vytvrzovací složka barev pro potisk papíru a kartonu	Legislativně neupraveno	-	Antagonistický účinek na kvasinky
2,2-dimetoxy-2-fenylacetofenon	Vytvrzovací složka barev pro potisk papíru a kartonu	Legislativně neupraveno	-	Váže se na receptory estrogenů u potkanů
4-(4-methylfenylthio)benzofenon	Vytvrzovací složka barev pro potisk papíru a kartonu	Legislativně neupraveno	-	Studie vlivu na zdraví nejsou dostupné

Vzhledem k tomu, že doposud nejsou přesně specifikovány limity fotoiniciátorů v potravinách či obalech (v ojedinělých případech pouze specifické migrační limity), je nutné provádět detailní studie jejich migrace a zejména souvisejících toxických vlastností a účinků na lidské zdraví.

### 2.3 Analýza fotoiniciátorů

Oblast analýzy fotoiniciátorů zaznamenala rostoucí zájem zejména v posledních 20 letech, avšak stále skýtá i mnohá úskalí. Výrobci tiskových inkoustů, barviv či laků udávají často neúplné informace o použitých fotoiniciátorech anebo tyto informace dokonce chybí. Fotoiniciátory patří do velké skupiny chemických sloučenin, z nichž každá má jiné fyzikální i chemické vlastnosti a poskytuje dosud nepopsané meziprodukty. Významným problémem je i identifikace izomerních fotoiniciátorů (např. skupina methylbenzofenonů) [8]. K identifikaci a kvantifikaci této skupiny chemických sloučenin je tedy nutné používat spojení separačních technik s vhodným selektivním detektorem umožňující dosáhnout nízkých detekčních limitů. Vzhledem k výše popsaným komplikacím existuje jen omezené množství publikovaných studií zaměřených na analýzu fotoiniciátorů v různých typech potravin a potravinových obalů. Tyto studie detailně shrnuje Tabulka IV.

Nejčastěji používanými separačními technikami jsou vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a plynová chromatografie (GC) [8]. Pomocí HPLC byly stanoveny fotoiniciátory jak v potravinách, tak i v obalových materiálech [8, 14-20]. Jedná se o velmi

používanou techniku, kdy lze volit mezi různými separačními módy a použitou detekcí. Pro analýzu fotoiniciátorů byl nejčastěji aplikován detektor diodového pole (DAD) [14-16, 18, 19], fluorescenční (FLD) [15], či hmotnostní (MS nebo MS/MS) detektor [17, 20]. HPLC-DAD nebo HPLC-FLD sice umožňují levné a rychlé analýzy, avšak s vysokými mezemi detekce ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Z tohoto důvodu je častěji popsáno spojení HPLC-MS nebo HPLC-MS/MS umožňující detekci a charakterizaci stopových koncentrací fotoiniciátorů. Příklady chromatogramů fotoiniciátorů z HPLC-DAD a HPLC-FLD analýz jsou uvedeny na Obrázku 3. Obrázek 4 pak ukazuje HPLC-MS chromatogram analýzy směšného standardu fotoiniciátorů.

Naopak plynová chromatografie je vhodná pouze pro těkavé nebo polotěkavé fotoiniciátory. V literatuře se lze setkat se spojením s plamenově ionizačním (GC-FID) nebo hmotnostním detektorem (GC-MS a GC-MS/MS) [8, 21-26].

Relativně nově používanou technikou v této oblasti je DART-TOF/MS [27]. Tato technika nevyžaduje téměř žádnou přípravu vzorku, čímž je značně zkrácena doba analýzy. Mezi nevýhody ale patří vyšší meze detekce ( $\text{mg}/\text{l}$ ) a vysoká pořizovací cena, díky čemuž tato technika zatím nenašla uplatnění v rutinní analýze. Obrázek 5 popisuje porovnání barevných oblastí obalu se získanými DART/TOF-MS spektry pro signál fotoiniciátoru 2-methyl-1-[4-(methylthio)fenyl]-2-(4-morfolinyl) propan-1-on.

**Tabulka IV** Přehled studií zaměřených na analýzu fotoiniciátorů (Ref.-reference)

Analyzované fotoiniciátory	Matrice	Příprava vzorku	Analytická technika	Závěr	Ref.
2-ITX	Potraviny a jejich obaly	<b>Obaly:</b> Extrakce pomocí 1-hexafluoro-2-propanolu v ultrazvuku, 45 min. <b>Potraviny:</b> Extrakce acetonitrilem nebo směsí terc-butyl(methyl) etheru a isohexanu (50:50) pomocí vortexu, 1 min.	HPLC-DAD, HPLC-FLD	<b>LOD:</b> 2 µg/l <b>LOQ:</b> 5 µg/l <b>Pravdivost:</b> 94–106 % pro obohacené vzorky s vysokým obsahem tuku, 80-105 % pro obohacené vzorky s nízkým obsahem tuku. <b>Preciznost:</b> RSD ≤ 1,1 % pro obohacené vzorky s vysokým obsahem tuku, RSD ≤ 8,5 % pro obohacené vzorky s nízkým obsahem tuku. <b>Výsledky:</b> 2-ITX byl detekován ve 36 obalech a 27 vzorcích potravin. Nejvyšší obsah byl nalezen ve vzorku obalu od džusu (357 µg/kg). Byla potvrzena migrace této látky do potravin.	[15]
HMPP, CPK, DMPA, DEABP, EHDAB, EDMAB, BP, 4-MBP, 2-HBP, 2-ITX, BBP, MBB, 2,4-DEITX	Obaly potravin (kartony, plastové obaly, plechovky)	Extrakce pomocí acetonitrilu při 70 °C, 24 h.	HPLC-DAD, HPLC-MS/MS	<b>LOD:</b> ≤ 1,56 µg/dm <sup>2</sup> <b>Linearita:</b> R <sup>2</sup> ≥ 0,9998 <b>Preciznost:</b> RSD < 9 % <b>Výsledky:</b> V reálných vzorcích byl nalezen zejména BP (5,92–17,89 µg/dm <sup>2</sup> ) a EHDAB (71,72 a 102,93 µg/dm <sup>2</sup> ). Pozitivní vzorky byly zanalyzovány i metodou HPLC-MS/MS, která nebyla validována.	[14]
CPK, DMPA	Plastové obaly potravin	Tlakem akcelerovaná extrakce acetonitrilem při 100 °C, 1 500 psi po dobu 5 min nebo extrakce acetonitrilem při 40 °C v ultrazvuku, 30 min.	HPLC-DAD	<b>LOQ:</b> 0,1 µg/ml a 0,2 µg/ml <b>Linearita:</b> R > 0,99 <b>Pravdivost:</b> 70–95 % <b>Preciznost:</b> RSD < 6 % <b>Výsledky:</b> Žádný reálný vzorek neobsahoval analyzované fotoiniciátory.	[16]
HMPP, CPK, DMPA, DEABP,	Potraviny a jejich obaly	<b>Obaly:</b> Extrakce pomocí 1-hexafluoro-2-propanolu	HPLC-MS/MS	<b>LOQ:</b> 0,2–710 µg/kg <b>Linearita:</b> R <sup>2</sup> ≥ 0,995 <b>Pravdivost:</b> 83–98 %	[17]

EHDAB, EDMAB, BP, BBP, 2,4-DEITX 2-ITX, 4-ITX		v ultrazvuku, 45 min. <b>Potraviný:</b> Extrakce acetonitrilem nebo směsí terc-butyl(methyl) etheru a isohexanu (50:50) pomocí vortexu, 1 min.		<b>Preciznost:</b> RSD ≤ 10 % <b>Výsledky:</b> Testované obaly obsahovaly 4 až 8 různých fotoiniciátorů, nejčastější byl BP (2–350 ng/cm <sup>2</sup> ). Ve vybraných potravinách pak byly nalezeny maximálně 4 fotoiniciátory, mezi nimi byl opět zejména BP (1,8–40 μg/kg).
CPK, DMPA, BP, MTMP, EHDAB, 2-ITX	Džusy a jejich obaly	<b>Obaly:</b> Extrakce acetonitrilem při 70 °C po dobu 24 h. <b>Džus:</b> Vysušení a rekonstituce v acetonitrilu.	HPLC-DAD, GC-MS	<b>LOD:</b> 0,02–0,03 μg/ml <b>Linearita:</b> R <sup>2</sup> ≥ 0,9999 <b>Pravdivost:</b> 85–93 % <b>Preciznost:</b> RSD: 0,9–2,8 % <b>Výsledky:</b> Ve většině obalů nebyl nalezen žádný fotoiniciátor, v pozitivních vzorcích byl BP (3,6; 4,1 a 12,3 μg/dm <sup>2</sup> ), 2-ITX (64,0 μg/dm <sup>2</sup> ), DMPA (36,0 μg/dm <sup>2</sup> ) a EHDAB (54,2 μg/dm <sup>2</sup> ). Vzorky džusů neobsahovaly žádný fotoiniciátor. [18]
CPK, DMPA, BP, MTMP, EHDAB, 2-ITX	Sušené mléko	Extrakce acetonitrilem pomocí vortexu, 5 min.	HPLC-DAD	<b>LOD:</b> 17–33 ng/ml <b>Linearita:</b> R <sup>2</sup> ≥ 0,9999 <b>Pravdivost:</b> 82–98 % <b>Výsledky:</b> Na základě migračních testů a analýzy vzorků mléka obohacených o testované fotoiniciátory za různých teplot byla potvrzena snadnější migrace do sušeného mléka při vyšší teplotě (40 °C), samotné reálné vzorky analyzovány nebyly. [19]
CPK, MTMP, EHDAB, 2-ITX, BP, TPO, Irgacure 369	Mléko a jeho obaly z plastu a papíru	<b>Mléko:</b> Extrakce acetonitrilem při 25 °C, 30 min v ultrazvuku a následná extrakce tuhou fází. <b>Obaly:</b> Extrakce acetonitrilem pomocí vortexu při laboratorní teplotě 30 h ve tmě.	HPLC-MS/MS	<b>LOQ:</b> 0,1–5,0 μg/kg <b>Pravdivost:</b> 80–111 % <b>Preciznost:</b> RSD < 12 % <b>Výsledky:</b> Množství fotoiniciátorů v reálných vzorcích bylo vyšší u mléka s vyšším obsahem tuku, nejčastěji byl detekován BP (2,8–18,4 μg/kg) a 2-ITX (0,8–8,9 μg/kg). Vyšší obsah byl nalezen u mléka baleného v plastových obalech. [20]
CPK, EHDAB,	Mléko	Deproteinace pomocí	GC-MS	<b>LOD:</b> 0,05–1,4 μg/l (odtučněné mléko), 0,07–2,2 [21]

EDMAB, BP, 4-CBP, 2-CTX, 2-ITX, DMPA, MBB		Carrezova činidla, mikroextrakce na pevné fázi 40 min.		µg/l (polotučné mléko) a 0,11–4,4 µg/l (tučné mléko) <b>Linearita:</b> $R > 0,995$ <b>Pravdivost:</b> 72–134 % <b>Preciznost:</b> $RSD < 15 \%$ <b>Výsledky:</b> Ve 3 reálných vzorcích mléka byl nalezen BP (9,9; 16,2 a 8,2 µg/l), v 2 vzorcích 2-ITX (20 a 27 µg/l) a pouze v 1 vzorku EHDAB (26 µg/l). Výsledky analýzy byly ovlivněny obsahem tuku v mléce, extrakce fotoiniciátorů byla účinnější u vzorků s nižším obsahem tuku.
CPK, EHDAB, EDMAB, BP, 4-MBP, 2-ITX, DMPA	Mléko kartonové obaly <sup>a</sup>	<b>Obaly:</b> Extrakce acetonitrem při 70 °C, 24 h, mikroextrakce na pevné fázi. <b>Mléko:</b> Mikroextrakce na pevné fázi.	GC-MS	<b>LOQ:</b> 0,2–1 µg/l <b>Linearita:</b> $R^2 \geq 0,993$ <b>Pravdivost:</b> 89–108 % <b>Preciznost:</b> $RSD < 15 \%$ <b>Výsledky:</b> Ve všech obalech a v některých vzorcích mléka nalezen pouze BP (koncentrace nižší než 1 µg/g). [22]
CPK, EHDAB, EDMAB, BP, 2-MBP, 3-MBP, 4-MBP, 2-ITX, DMPA, MBB	Potravinové obaly z plastu	Extrakce pomocí směsi cyklohexanu a ethylacetátu (1:1) v ultrazvuku 30 min dvakrát za sebou, přečištění pomocí gelové permeační chromatografie.	GC-MS	<b>LOD:</b> 0,03–0,12 µg/dm <sup>2</sup> <b>Pravdivost:</b> 77–121 % <b>Preciznost:</b> $RSD < 14 \%$ <b>Výsledky:</b> V obalech nalezeny 2-MBP (0,77–6,82 µg/dm <sup>2</sup> ), 3-MBP (0,43–1,09 µg/dm <sup>2</sup> ), EHDAB (0,91–2,66 µg/dm <sup>2</sup> ) a CPK (0,23–5,66 µg/dm <sup>2</sup> ). Stanovené koncentrace byly pod jejich specifickým migračním limitem. [23]
2-ITX	Mléko	Deproteinace pomocí alkalické hydrolyzy, prekoncentrace extrakcí tuhou fází.	GC-MS/MS	<b>LOD:</b> 0,1 µg/l <b>LOQ:</b> 0,5 µg/l <b>Pravdivost:</b> 92–102 % <b>Preciznost:</b> $RSD < 2 \%$ <b>Výsledky:</b> 2-ITX byl nalezen ve všech vzorcích mléka v rozmezí 4,0–53,0 µg/l. [24]
BP, 4-MBP	Cereálie	Extrakce směsí hexanu, dichlormethan:acetonitril	GC-MS/MS	<b>LOD:</b> 2 µg/kg <b>LOQ:</b> 6 µg/kg (BP), 8 µg/kg (4-MBP) [25]



		(1:1), acetonitrilu a methanolu v ultrazvuku po dobu 10 min, přečištění extrakcí tuhou fází.		<b>Pravdivost:</b> 74 % (BP), 98 % (4-MBP) <b>Výsledky:</b> Vyvinutá metoda byla aplikována pouze na analýzu reálných vzorků obohacených o fotoiniciátory (300 µg/kg, 600 µg/kg a 1200 µg/kg).
CPK, EHDAB, EDMAB, BP, 2-ITX	Obaly a balené nápoje (mléko, džus, víno)	Extrakce pomocí dichlormethanu při laboratorní teplotě, 24 h s následným přečištěním extrakcí tuhou fází.	GC-MS, HPLC-MS	<b>LOQ:</b> 1–5 µg/l <b>Pravdivost:</b> 42–109 % <b>Výsledky:</b> Ve všech testovaných nápojích byla potvrzena přítomnost BP (5–217 µg/l), v 11 vzorcích byl stanoven EHDAB (0,13–0,8 µg/l) a ve 3 vzorcích 2-ITX (0,2–0,24 µg/l). Dané fotoiniciátory byly ve vyšších koncentracích nalezeny i v obalech. HPLC-MS metoda byla využita pro potvrzení přítomnosti BP. [26]
CPK, MTMP, EDMAB, 2-ITX, BP, BBP, TPO, Irgacure 369, Irgacure 379, Speedcure 7005, Omnipol 910	Obaly potravin	Rozstříhání obalů na kousky dle použitých barev.	DART/TOF-MS, GC-MS	<b>LOD:</b> 1,7-17 µg/dm <sup>2</sup> <b>Výsledky:</b> Většina analyzovaných fotoiniciátorů kromě BBP, TPO, Irgacure 369 a MTMP byla pod stanovenými LOD. Největší množství fotoiniciátorů bylo detekováno v částech s nejtmavšími barvami. [27]

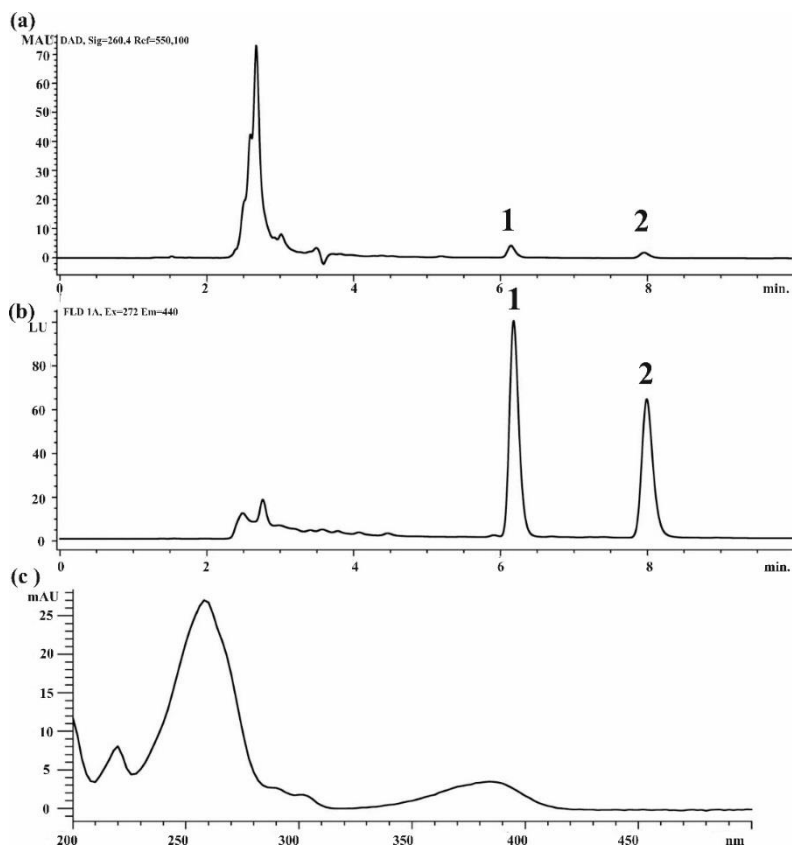
2-CTX: 2-chlorothioxanton, 2-HBP: 2-hydroxybenzofenon, 2-ITX: 2-isopropyl-9H-thioxanten-9-on, 2-MBP: 2-methylbenzofenon, 2,4-DEITX: 2,4-diethylthioxanton, 3-MBP: 3-methylbenzofenon, 4-CBP: 4-chlorobenzofenon, 4-MBP: 4-methylbenzofenon, BBP: 4-benzoylbifenyl, BP: benzofenon, CPK: 1-hydroxycyklohexyl fenyl keton, DEABP: 4,4'-bis(diethylamino)benzofenon, DMPA: 2,2-dimethoxy-2-fenylacetofenon, EDMAB: ethyl-4-(dimethylamino)benzoát, EHDAB: 2-ethylhexyl-4-(dimethylamino)benzoát, HMPP: 2-hydroxy-2-methylpropiofenon, MBB: 2-methyl-2-benzoylbenzoát, MTMP: 2-methyl-4'-(methylthio)-2-morfolinopropiofenon, TPO: difenyl (2,4,6-trimethylbenzoyl) fosfin oxid

LOD – mez detekce

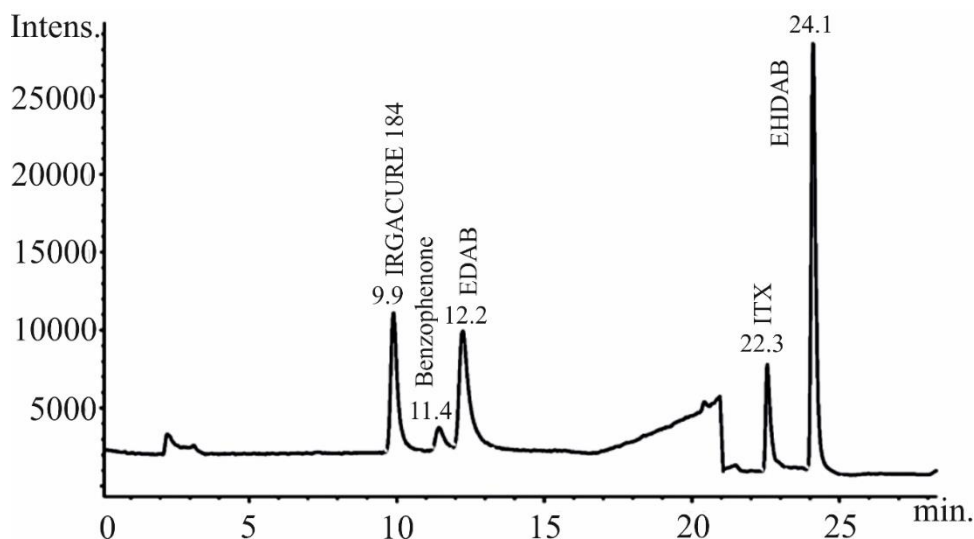
LOQ – mez kvantifikace

R – korelační koeficient

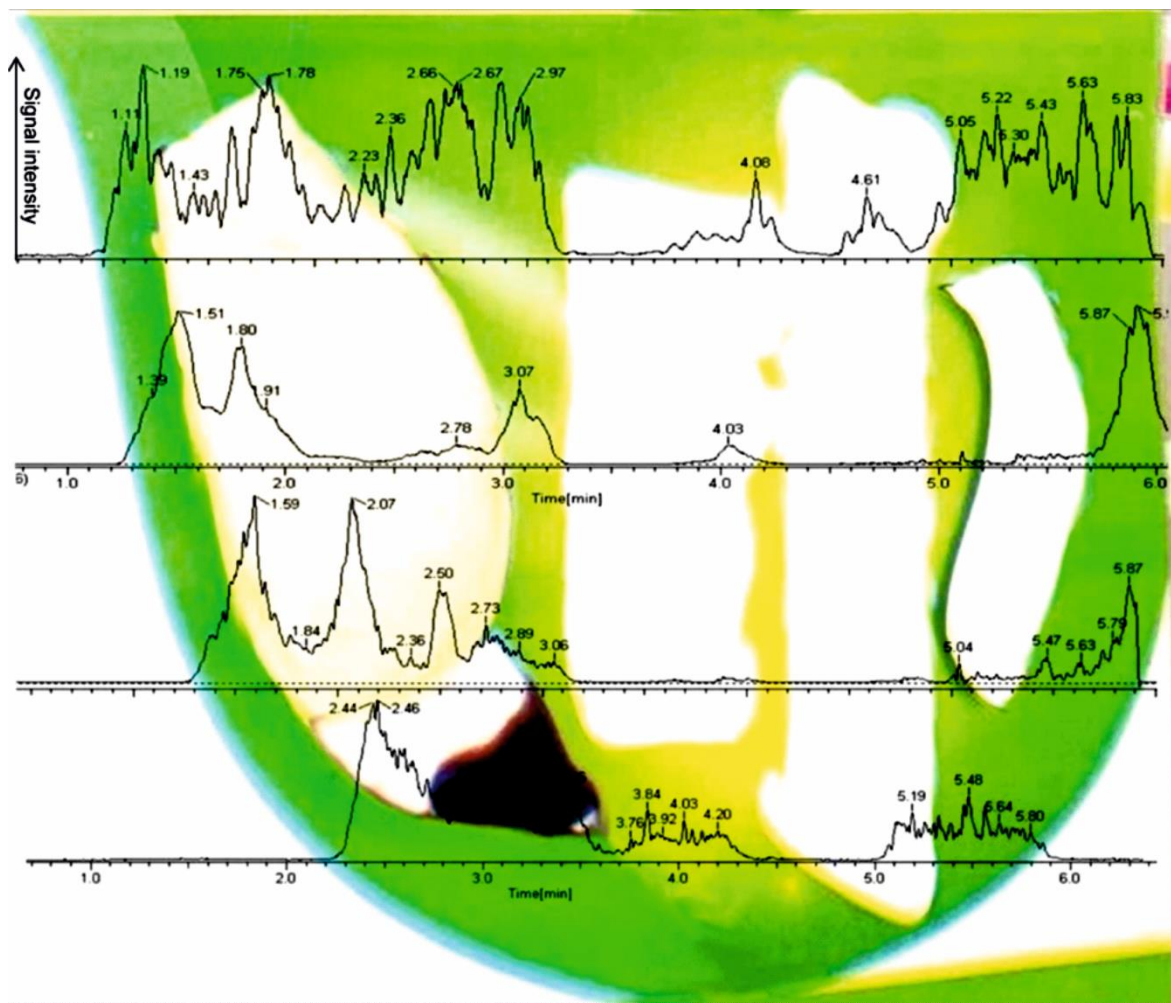
R<sup>2</sup> – koeficient determinace



**Obrázek 3** HPLC separace extraktu olivového oleje obohaceného o 300  $\mu\text{g/l}$  směsi 2-isopropylthioxantonu (**1**) a 2,4-diisopropylthioxantonu (**2**). Chromatogram HPLC-DAD (a), HPLC-FLD (b), UV spektrum 2-isopropylthioxantonu (c) [15]



**Obrázek 4** HPLC/ESI-MS chromatogram standardního roztoku směsi 1-hydroxycyklohexyl-1-fenylketonu (IRGACURE 184), ethyl-4-(dimethylamino)benzoátu (EDAB), 2-isopropylthioxantonu (ITX), 2-ethylhexyl-4-(dimethylamino)benzoátu (EHDAB) o koncentraci 1 000  $\mu\text{g/l}$  [26]



**Obrázek 5** DART/TOF-MS analýza 2-methyl-1-[4-(methylthio)fenyl]-2-(4-morfoliny)propan-1-onu v obalu A poskytnutý firmou Smithers PIRA [27]. Tento vzorek byl složen z polyethylenu a mezi dominantní barvy patřila bílá, světle a tmavě žlutá, zelená a tmavě šedá. Pro porovnání intenzity signálu fotoiniciátoru (280,137  $m/z$ ) a barevnosti potisku obalu je zobrazeno i MS spektrum. Intenzita iontu je závislá na barevnosti obalového materiálu, nejintenzivnější signál se nachází v nejtmašších částech. DART/TOF-MS je vhodnou technikou pro mapování prostorové distribuce fotoiniciátorů na povrchu obalů.

Z uvedených studií vyplývá, že analýza fotoiniciátorů je v současné době velmi aktuální téma. Bohužel se při identifikaci a kvantitativním stanovení fotoiniciátorů autoři setkávají s mnoha problémy, a tak tato oblast analýzy potravin či obalových materiálů není ještě zcela zmapována. Je tedy žádoucí vyvíjet a validovat další pokročilé analytické metody umožňující rychlé analýzy s dostatečně nízkými mezemi detekce. Jejich aplikace

by pak pomohla potvrdit či vyvrátit migraci této skupiny chemických sloučenin z obalů do potravin a případně popsat jejich meziprodukty a možné toxické účinky na zdraví spotřebitelů.

## 2.4 Plynová chromatografie ve spojení s VUV detektorem

Plynová chromatografie je široce rozšířenou separační technikou využívanou zejména pro kvalitativní a kvantitativní analýzu těkavých a polotěkavých sloučenin [28]. Podstata GC spočívá v odpaření vzorku do plynné fáze v dávkovacím prostoru (injektoru), který je následně ve formě par unášen nosným plynem na analytickou kolonu, kde probíhá vlastní separace. Směs analytů ve vzorku je separována na základě jejich interakce mezi stacionární a mobilní fází (nosný plyn). Z analytické kolony jsou rozseparované analyty postupně eluovány do detektoru, kde každá změna koncentrace analytu vyvolá změnu signálu v závislosti na použitém typu detektoru. Identifikace analytu je nakonec realizována na základě retenčních časů standardů a složek ve vzorku. Široká škála používaných kolon, dávkovacích systémů a detektorů poskytuje dostatečnou selektivitu a nízké meze detekce pro výzkum v oblasti životního prostředí, zdravotnictví, farmacie či potravinářského průmyslu.

Jednou z nejdůležitějších součástí GC systému je detektor, jehož volba závisí na povaze stanovovaných látek a cíli aplikace. Ideální detektor by měl poskytovat dostatečně nízké meze detekce, dobrou reprodukovatelnost, robustnost, rychlý sběr dat, jednoduché ovládání a nízkou pořizovací cenu. Mezi nejčastěji používané GC detektory patří tepelně vodivostní detektor (TCD), plamenově ionizační detektor (FID), detektor elektronového záchytu (ECD) a hmotnostní detektor (MS). Nicméně v současné době se v analytické chemii používá hlavně spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) [29]. Tato technika umožňuje nejen univerzální detekci a identifikaci chemických sloučenin, ale i kvantitativní stanovení stopových koncentrací. Avšak toto spojení má i několik nevýhod. GC-MS není vhodná pro analýzu izomerů, izobarů a malých či labilních chemických sloučenin. V případě analýz izomerů je nutné použití speciálních kolon, které mohou poskytnout dostatečné rozlišení pro odlišení takových analytů, avšak to je většinou ekonomicky i časově náročné. Z důvodu tohoto omezení GC-MS byl vyvinut nový způsob detekce nabízející další možnosti a potenciální aplikace. Jedná se o VUV („*vacuum ultraviolet*“) detektor. Analytické parametry tohoto detektoru ve srovnání s běžně používanými GC detektory shrnuje Tabulka V.

**Tabulka V** Srovnání nejčastěji používaných GC detektorů s VUV detektorem (H-Hmotnostní, K-Koncentrační, D-Destruktivní, N-Nedestruktivní)

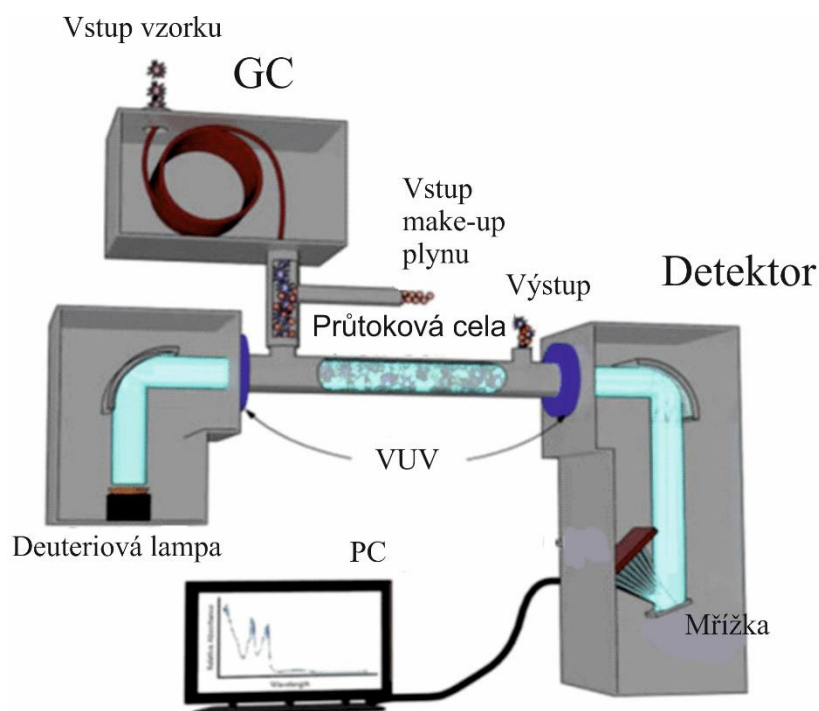
GC detektor	Typ odezvy	Destrukce analytu	Mez detekce (pg/nástřík)	Selektivita	Výhody	Nevýhody
FID	H	D	0,1–10	Sloučeniny s C-H vazbami	Jednoduchá aplikace	Nelze použít pro analyty neobsahující uhlík
ECD	K	N	0,1–1 000	Sloučeniny obsahující halogeny, nitroskupinu a konjugovanou karbonylovou skupinu	Nízké meze detekce, vysoká selektivita	Omezené aplikace
TCD	K	N	1 000–20 000	Univerzální	Jednoduchý a levný	Vysoké meze detekce
MS	H	D	1–10	Univerzální i selektivní	Nízké meze detekce	Drahý, neodliší izomery a izobary
VUV	H	N	20–200	Univerzální i selektivní	Odlišení izomerů, izobarů, koeluuujících píků	Vysoké meze detekce

#### 2.4.1 VUV detekce

Vakuum-ultrafialová absorpční spektroskopie je sice známá několik let, nicméně VUV detektor je komerčně dostupný až od roku 2014 [29]. Jedná se tedy o nový způsob detekce, který ale ihned našel uplatnění v GC analýze široké škály vzorků pocházejících zejména z životního prostředí. VUV detektor je příkladem univerzálního typu detektoru sloužícího ke kvalitativní i kvantitativní analýze těkavých a polotěkavých analytů. Může být spojen s jakýmkoliv standardním GC přístrojem pouze pomocí vyhřívané deaktivované křemenné kapiláry (300 °C), kterou vstupují rozseparované analyty do průtokové cely VUV detektoru. Na konci této kapiláry se eluent mísí s pomocným („*make-up*“) plynem (argon nebo dusík) [28]. Správné nastavení tlaku pomocného plynu má zásadní vliv na tvar (rozlišení) chromatografických píků a na hodnotu poměru signálu k šumu (SNR). K transportu vzorku průtokovou celou (většinou o objemu 80  $\mu$ l a délce 10 cm) se pak používá nosný plyn (He, N<sub>2</sub> nebo H<sub>2</sub>) s nízkou absorptivitou, jehož signál lze jednoduše

odečíst od signálu pozadí. Jak vzorek postupuje dál do průtokové cely, je vystaven UV záření (115–185 nm) produkovaným deuteriovou lampou. Toto záření je fokusováno do průtokové cely s analytem pomocí optiky uzavřené okénky z fluoridu hořečnatého propouštějícího fotony ultrafialového záření. Ty jsou schopny excitovat atomy a chemické vazby analytu v cele (hlavně  $\alpha \rightarrow \alpha^*$ ,  $\pi \rightarrow \pi^*$ ,  $n \rightarrow \alpha^*$  a  $n \rightarrow \pi^*$ ), které nelze měřit klasickou UV-VIS absorpční spektroskopií. Získaný signál je následně detekován pomocí CCD detektoru („*charged coupled devices*“) zaznamenávající úplná spektra podobně jako detektor diodového pole. Z průtokové cely je nakonec zóna analytu vyvedena přes výstupní ventil a získaná data jsou poslána do datové stanice pro zpracování. Rychlost sběru dat je obvykle nastavena nejvýše na 100 Hz, aby bylo měření kompatibilní i s kapilární GC. Obecné schéma uspořádání GC-VUV detailně popisuje Obrázek 6.

VUV detektor získává kompletní absorpční spektra v rozmezí 120–240 nm, jejichž intenzita je závislá na množství analytu [29]. Identifikace látek je obecně realizována na základě porovnání získaných VUV spekter s knihovnou obsahující referenční spektra [28]. Každá látka totiž poskytuje charakteristické VUV spektrum, a tak lze dokonce odlišit i VUV spektra izomerů. Bohužel v současné době nejsou k dispozici dostatečně rozsáhlé databáze charakteristických VUV spekter, které by mohli mít své nezastupitelné místo jako například rozšířené knihovny EI hmotnostních spekter pro GC-MS. Alternativní možností je výpočet teoretických VUV/UV spekter různými metodami od semiempirických přístupů až po sofistikované post-Hartree-Fock metody, které jsou součástí softwarů jako je například Gaussian09 (Gaussian, Inc.). Avšak náročnost a přesnost výpočtů spekter se odvíjí od složitosti a velikosti molekuly, tudíž v některých případech nemusí teoretická VUV spektra odpovídat těm experimentálně získaným.



**Obrázek 6** Schéma instrumentace GC-VUV (nejčastěji používaný je model VGA-100, jehož rozměry jsou 76,2(d) x 33(š) x 43,2(v) cm) [29]

#### 2.4.2 Zpracování dat

Kvantitativní analýza je založena na využití Lamberta-Beerova zákona:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (2)$$

kde  $A$  je absorbance,  $\varepsilon$  je molární absorpční koeficient ( $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ),  $b$  je délka trubice (cm) a  $c$  je koncentrace analytu. Pokud nedochází k interferencím složek ve vzorku, Lambertův-Beerův zákon, a tedy i VUV absorbance jsou aditivní. Ke kvantitativní analýze se obecně využívají standardní roztoky o známé koncentraci sloužící k tvorbě kalibrační křivky. Nicméně je důležité zdůraznit, že absorbance a poloha absorpčních maxim je závislá na struktuře analytu a zejména na obsahujících chromoforech (Tabulka VI).

**Tabulka VI** Příklady sloučenin s různými funkčními skupinami a jejich odpovídající meze detekce (LOD) a rozmezí vlnové délky zahrnující absorpční maxima k integraci [28]

Sloučenina	LOD (pg na koloně)	Rozsah integrace (nm)
Voda	246	130–175
Methanol	169	140–160
Benzen	15	177–182
Oktan	56	140–160
Naftol	30	213–218
Derivatizovaný $\beta$ -estradiol	30	193–198
Nikotin	19	176–181
Kaptan	186	174–179

### 2.4.3 Možnosti spektrálního rozlišení

Jedna z nejdůležitějších výhod VUV detektoru je schopnost rozlišit koelující analyty s odlišnými VUV spektry. Signály takových píků se navzájem překrývají a díky tomu, že je Lambertův-Beerův zákon aditivní, výsledné spektrum odpovídá sumě absorbancí všech analytů. Individuální podíl každé složky lze určit pomocí následujícího algoritmu:

$$A(\lambda) = b \sum_{j=1}^N \varepsilon_j(\lambda) c_j \quad (3)$$

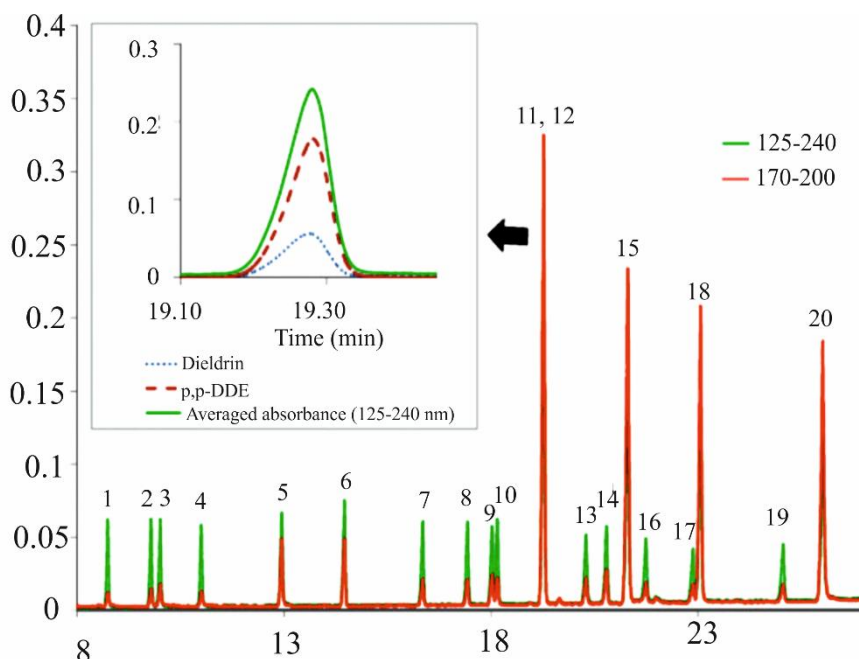
kde  $\lambda$  je vlnová délka a  $\varepsilon$  je molární absorpční koeficient, který je přímo úměrný absorpčnímu průřezu Avogadrovy konstanty. Tato rovnice může být zjednodušena pomocí jednoduchého absorpčního spektra sloužícího k určení relativního průřezu analytu, obvykle jsou využita i referenční absorpční spektra  $A^{ref}$ :

$$\begin{aligned} A(\lambda) &= \sum_{j=1}^N f_j \times A_j^{ref}(\lambda) \\ &= f_1 A_1^{ref} + f_2 A_2^{ref} + \dots + f_n A_n^{ref} \end{aligned} \quad (4)$$

kde  $f_j$  je koeficient reprezentující množství analytu  $j$  přispívající k celkové absorbanci děleno množstvím analytu přispívající k referenční absorbanci,  $A_j^{ref}(\lambda)$  představuje



referenční spektra pro koelující analyty. Je tedy nutné znát referenční spektra koelujících sloučenin, navíc se tyto spektra musí lišit. Příklad rozlišení ukazuje Obrázek 7.



**Obrázek 7** Separace 20 polotěkavých sloučenin, kde **11.** dieldrin a **12.** p, p'- DDE (1,1-dichlor-2,2-bis(4-chlorofenyl)ethylen) koelují [28]

Díky této možnosti není k separaci koelujících sloučenin majících odlišná VUV spektra potřeba speciálních kolon a časově náročné optimalizace chromatografické metody, jak tomu je při použití standardních GC detektorů. GC-VUV analýzy tak umožňují rychlé separace i koelujících analytů.

#### 2.4.4 Aplikace GC-VUV

Inovativní technika GC-VUV poskytuje kvalitativní i kvantitativní informace s mnoha výhodami jako je odlišení izomerních, izobarických nebo koelujících analytů na základě jejich charakteristických VUV spekter. Spojení GC-VUV v současné době nachází široké uplatnění v mnoha oblastech chemických analýz (analýza environmentálních vzorků, vzorků z petrochemického průmyslu atd.) [28]. Díky svým nesporným výhodám je VUV detektor považován za vhodnou alternativu k běžně používaným detekcím jako je například MS detektor. Aplikace spojení GC-VUV jsou shrnuty v Tabulce VII.

**Tabulka VII** Souhrn aplikací GC-VUV (Ref.-reference)

Matrice / analyt	Příprava vzorku	Separace	Tlak pomocného plynu (psi) / rychlost sběru dat (Hz)	Spektrální filtr (nm)	Závěr	Ref.
Buňky bakterií / methylestery mastných kyselin	Extrakce pomocí pentanu a KOH, methylace 2 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> v methanolu při 70 °C, 1 h, následná extrakce pomocí směsi pentanu a vody (3:1).	<b>Kolona:</b> Stabilwax (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; Restek) <b>Teplotně řízený program:</b> 60 °C (po dobu 0,6 min); nárůst o 8 °C/min na 240 °C; 240 °C 6 min <b>Nosný plyn (průtok):</b> He (2 ml/min)	0,25 / 10	125–160	Bylo analyzováno 12 druhů a 15 poddruhů bakterií, pro každou bakterii byl pozorován odlišný obsah mastných kyselin. Spojení GC-VUV bylo využito pro identifikaci různých mikroorganismů, navíc i pro výpočet poměru nasycených a nenasycených mastných kyselin. Kvantifikace nebyla realizována.	[30]
9 komerčně dostupných směsí polychlorovaných bifenyků (PCB) tzv. Aroclor / PCB	Zředění pomocí hexanu.	<b>Kolona:</b> Rtx PCB (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm a 60 m x 0,18 mm x 0,18 µm; obě Restek), <b>Teplotně řízený program pro 30 m kolonu:</b> 80 °C (po dobu 1,5 min); nárůst o 40 °C/min na 180 °C; nárůst o 10 °C/min na 300 °C; 300 °C 3 min <b>Teplotně řízený program pro 60 m kolonu:</b> 80 °C (po dobu 1,5 min); nárůst o 40 °C/min na 180 °C; nárůst o 3 °C/min na 300 °C; 300 °C 3 min <b>Nosný plyn (průtok):</b> He (1 ml/min)	0,15 / 3,6	185–225	<b>LOD:</b> 0,05–0,075 µl/ml <b>Linearita:</b> R <sup>2</sup> > 0,999 <b>Výsledky:</b> Bylo analyzováno 209 polychlorovaných bifenyků, dokonce i izomerů. Díky charakteristickým VUV spektrům byly odlišeny i analyty, které nešlo chromatograficky separovat (koelující píky). GC-VUV bylo využito i ke klasifikaci směsí Aroclor na základě stupně jejich chlorace.	[31]

Letecká a motorová paliva / izomery dimethylnaftalenu	Zředění pomocí dichlometanu.	<b>Kolona:</b> Rtx-1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 $\mu$ m; Restek) <b>Teplotně řízený program:</b> 50 °C (po dobu 2 min); nárůst o 5 °C/min na 270 °C; 270 °C 20 min <b>Nosný plyn (průtok):</b> He (1 ml/min)	0,25 / 10	125–160 a 170–240	<b>Preciznost:</b> RSD < 6 % <b>Výsledky:</b> Odlišení směsí koeluuujících izomerů dimethylnaftalenu smíchaných v různých poměrech (až na poměr 99:1). [32]
Rostlinné oleje / methylestery / kyseliny	Transesterifikace pomocí 2 M HCl v methanolu, zahřívání přes noc při teplotě 50 °C.	<b>Kolona:</b> SLB-IL111 (60 m x 0,25 mm x 0,20 $\mu$ m; Supelco), Stabilwax-DA (30 m x 0,25 mm x 0,25 $\mu$ m; Restek), <b>Teplotně řízený program (SLB-IL111):</b> 100 °C (po dobu 5 min); nárůst o 5 °C/min na 185 °C; 185 °C 18 min <b>Teplotně řízený program (Stabilwax-DA):</b> 100 °C (po dobu 5 min); nárůst o 5 °C/min na 240 °C; 240 °C 20 min <b>Nosný plyn (průtok):</b> He (1 ml/min)	0,25 / -	125–160 a 170–200	<b>LOD:</b> 0,1 mg/g <b>Linearita:</b> R > 0,99 <b>Výsledky:</b> GC-VUV metoda odlišila 37 methylesterů nasycených a nenasycených mastných kyselin a jejich cis/trans izomery. Olivové oleje obsahovaly zejména methyloléát (70 %), za markery pro arašídový olej lze považovat methylester kyseliny behenové (3 %) a lignocerové (2 %). [33]
Motorová paliva / hepta-, oktadekan, pristan, - fytan	-	<b>Kolona:</b> Rxi-1ms (30 m x 0,25 mm x 0,20 $\mu$ m; Restek) <b>Teplotně řízený program:</b> 40 °C (po dobu 0,1 min); nárůst o 6,5 °C/min na 320 °C; 320 °C 5 min <b>Nosný plyn (průtok):</b> He (1,4 ml/min)	0,25 / 2,67	125–155, 170–195, 200–230	GC-VUV je vhodná technika pro charakterizaci složitých směsí paliv a identifikaci biomarkerů zvětralých směsí. Výsledky z GC-VUV byly srovnatelné s výsledky z GC-FID a GCxGC-MS analýz. [34]
Vzorky vod, baterií na bázi lithia / plynné uhlovodíky	Izolace plynů pomocí reakčních komor a sběrných nádob.	<b>Kolona:</b> HP PLOT/Q (30 m x 0,32 mm x 20 $\mu$ m; Agilent) <b>Teplotně řízený program (vzorky vod):</b> 50 °C (po dobu 4 min); nárůst o 15 °C/min na 200 °C; 200 °C 5 min	0,25 / 10	125–160	Pitná voda byla kontaminovaná zejména methanem. Ve vzorcích baterií identifikovány hořlavé plyny (methan, ethylen, propen) a toxické [35]

			<p><b>Teplotně řízený program (vzorky baterií):</b> 40 °C (po dobu 7,85 min); nárůst o 5,7 °C/min na 250 °C; 250 °C 7 min</p> <p><b>Nosný plyn (průtok):</b> He (1,2 ml/min)</p>			<p>plyny (acetaldehyd, 1,3-butadien, chlormethan). Spojení GC-VUV bylo využito pouze k předběžné studii plynů, kvantifikace nebyla realizována.</p>	
Pesticidy / chlorované uhlovodíky (dieltrin), organofosfáty, karbamáty, pyrethroidy	Zředění pomocí dichlormethanu.		<p><b>Kolona:</b> HP-5ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; Agilent) a ZB-5 (15 m x 0,25 mm x 0,25 µm; Phenomenex),</p> <p><b>Teplotně řízený program:</b> 70 °C; nárůst o 40 °C/min na 200 °C; 200 °C 7 min; nárůst o 7 °C/min na 240 °C; nárůst o 10 °C/min na 300 °C; 300 °C 2 min</p> <p><b>Nosný plyn (průtok):</b> He (1,2 ml/min)</p>	0,25 / -	125–240 a 170–200	<p><b>LOD:</b> 0,25–1 µg/ml</p> <p><b>Výsledky:</b> GC-VUV umožnilo odlišení izomerů a koeluuujících analytů, metoda byla ale aplikována pouze na standardy, a tak kvantifikace nebyla cílem studie.</p>	[36]
Léčivé přípravky: Theraflu, Tri-sprintec, Chloraseptic Max Lozenge/mono-, di-, trisacharidy	Methylace pomocí methyljodidu, hydroxylaminu.		<p><b>Kolona:</b> Rtx-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; Restek)</p> <p><b>Teplotně řízený program:</b></p> <p><b>monosacharidy:</b> 70 °C 1 min; nárůst o 20 °C/min na 210 °C; 210 °C 8 min; nárůst o 20 °C/min na 300 °C; 300 °C 10 min,</p> <p><b>disacharidy:</b> 100 °C 5 min; nárůst o 10 °C/min na 300 °C; 300 °C 5 min, <b>trisacharidy:</b> 200 °C 15 min; nárůst o 15 °C/min na 270 °C; nárůst o 1 °C/min na 290 °C; nárůst o 15 °C/min na 330 °C; 330 °C 15 min</p> <p><b>Nosný plyn (průtok):</b> He (1,2 ml/min)</p>	0,25 / 10	125–160	<p>Methylace byla vhodná hlavně na analýzu ketopentóz a léčiv rozpustných v dimethylsulfoxidu. Theraflu a Chloraseptic Max Lozenge obsahovaly sukrozu, Tri-sprintec pak laktózu. Kvantifikace sacharidů opět nebyla realizována.</p>	[37]
Vanilkové extrakty (přírodní i umělé) /	Extrakce pomocí dichlormethanu		<p><b>Kolona:</b> Rtx-5 (5 m x 0,25 mm x 0,25 µm; Restek), Stabilwax (15 m</p>	0,25 / 10	125–160 a 170–200	<p><b>LOD:</b> 0,4–5,3 µl/ml</p> <p><b>Linearita:</b> <math>R^2 \geq 0,997</math></p>	[38]

---

vanilin, ethylvanilin, (4:1).  
kumarin, kofein,  
vanilinová kyselina,  
piperonal, eugenol

x 0,25 mm x 0,25 µm; Restek)  
**Teplotně řízený program Rtx-5:**  
30 °C 2 min; nárůst o 70 °C/min na  
300 °C; 300 °C 6 min, **Stabilwax:**  
40 °C 1,1 min; nárůst o 30 °C/min  
na 240 °C; 240 °C 6 min  
**Nosný plyn (průtok):** He (1,2  
ml/min)

**Výsledky:** Vanillin nalezen  
ve všech vzorcích (824–3421  
µl/ml v přírodních extraktech  
a 108–5817 µl/ml v umělých  
extraktech). Přítomnost  
ethylvanilinu (21–4160  
µl/ml) a piperonalu (1503  
µl/ml) byla potvrzena pouze  
u uměle vyrobených  
extraktů.

---

LOD – mez detekce

R – korelační koeficient

R<sup>2</sup> – koeficient determinace

## 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

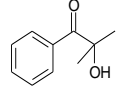
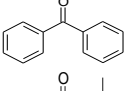
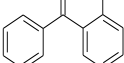
### 3.1 Chemikálie, přístroje a pomůcky

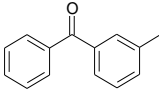
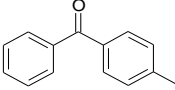
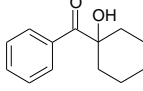
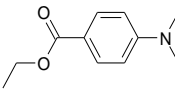
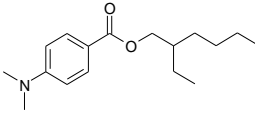
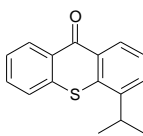
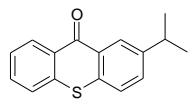
#### 3.1.1 Chemikálie

- Standardy fotoiniciátorů (detailně shrnuty v Tabulce VIII):

- 2-hydroxy-2-methylpropiofenon, > 96 %, Tokyo Chemical Company, Portland, USA
- Benzofenon, > 99 %, Tokyo Chemical Company, Portland, USA
- 2-methylbenzofenon, 98 %, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- 3-methylbenzofenon, 97 %, Alfa Aesar, Haverhill, USA
- 4-methylbenzofenon, 99 %, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- 1-hydroxycyklohexyl fenyl keton, 98 %, Alfa Aesar, Haverhill, USA
- Ethyl-4-(dimethylamino)benzoát, 99 %, Beantown Chemical, Hudson, USA
- 2-ethylhexyl-4-(dimethylamino)benzoát, > 98 %, Tokyo Chemical Company, Portland, USA
- Směs 2-isopropyl-9H-thioxanten-9-onu a 4-isopropyl-9H-thioxanten-9-onu, 97 %, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Methanol, HPLC grade, J. T. Baker, Phillipsburg, New Jersey, USA
- Acetonitril, HPLC grade, J. T. Baker, Phillipsburg, New Jersey, USA

**Tabulka VIII** Informace o analyzovaných fotoiniciátorech

Fotoiniciátor	M <sub>m</sub> (g/mol)	CAS číslo	Struktura
HMPP	164,9	7473-98-5	
BP	182,2	119-61-9	
2-MBP	202,3	131-58-8	

3-MBP	202,3	643-65-2	
4-MBP	202,3	134-84-9	
CPK	204,3	947-19-3	
EDMAB	193,2	10287-53-3	
EHDAB	276,4	21245-02-3	
ITX (2-isopropyl-9H-thioxanten-9-on)	254,4	75081-21-9	
ITX (4-isopropyl-9H-thioxanten-9-on)	254,4	83846-86-0	

$M_m$  – molární hmotnost

### 3.1.2 Pístroje

- VGA-100 VUV detektor, VUV Analytics, Inc., Cedar Park, Texas, USA
- Shimadzu GC-2010 plynový chromatograf, Shimadzu Scientific Instruments Inc., Columbia, Maryland, USA
- TQ8030 GC-MS systém vybavený trojitým kvadrupólem, Shimadzu Scientific Instruments Inc., Columbia, Maryland, USA
- Analytické váhy Sartorius, Sartorius AG, Goettingen, Německo
- Ultrazvuková lázeň Elma, S 40 H, Elmasonic, Elma Hans Schmidbauer, Singen, Německo
- Sušárna BINDER FED 56, BINDER Inc., New York, USA

Během experimentů bylo využito spojení Shimadzu GC-2010 s VGA-100 VUV detektorem. Všechny parametry pro separaci i detekci fotoiniciátorů jsou shrnuty v Tabulce IX.

Pro ověření výsledků získaných pomocí GC-VUV byla využita metoda GC-MS. Experimenty probíhaly na TQ8030 GC-MS s trojitým kvadrupólem, který pracoval v módu

monitorování vybraných iontů („*selected ion monitoring*“). Hmotnostní spektrometr využíval elektronovou ionizaci („*electron ionization*“), ionizační napětí bylo nastaveno na 70 eV a zpoždění sběru dat („*solvent delay time*“) bylo 2 minuty. Ostatní parametry jsou uvedeny v Tabulce IX.

**Tabulka IX** Porovnání parametrů vyvinuté GC-VUV a GC-MS metody

Parametr	GC-VUV	GC-MS
Stacionární fáze	Rtx-1 (30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 $\mu$ m d <sub>r</sub> ; Restek)	SHRXI-5MS (30 m x 0,25 mm id x 0,25 $\mu$ m d <sub>r</sub> ; Restek)
Teplotně řízený program	150 °C (po dobu 3,5 min); nárůst o 10 °C/min na 195 °C; nárůst o 25 °C/min na 300 °C, 300 °C 1 min	70 °C (po dobu 1,5 min); nárůst o 10 °C/min na 300 °C a 300 °C 1 min
Nástřík a dávkování	teplota 280 °C; dávkování bez děliče toku za použití Sky splitless lineru (3,5 mm x 5,0 mm x 95 mm; Restek), dávkovaný objem 0,5 $\mu$ l nebo 1 $\mu$ l dle koncentrace analytu ve vzorku	teplota 280 °C; dávkování bez děliče toku za použití Sky splitless lineru (3,5 mm x 5,0 mm x 95 mm; Restek); dávkovaný objem 0,5 $\mu$ l
Teplota detektoru/ iontového zdroje	300 °C (VUV trubice a průtoková cela)	300 °C (iontový zdroj a interface)
Nosný plyn a průtok	He; 1 ml/min	He; 1 ml/min
Pomocný plyn	N <sub>2</sub> ; 0,15 psi	-
Dávkovací čas	1 min	1 min
Rychlost sběru dat	5 Hz	-

### 3.1.3 Pomůcky

- Automatické pipety Transferpette<sup>®</sup> S (2–20  $\mu$ l, 10–100  $\mu$ l, 100–1000  $\mu$ l, 1–10 ml), BRAND, Německo
- Skleněné laboratorní nádobí – kádinky, odměrné baňky, odměrné válce
- Skleněné lahve s uzávěrem (100 ml), Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
- GC vialky vyrobené z tmavého skla, plastová víčka se septy (2 ml, 20 ml), VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
- PTFE stříkačkové filtry s velikostí póru 0,22  $\mu$ m, VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
- Plastové laboratorní nádobí – pipetovací špičky, kapátka
- Nerezové laboratorní pomůcky – špachtle, lžičky, pinzety



### **3.1.4 Analyzované vzorky obalových materiálů**

K analýzám byly vybrány obaly v přímém kontaktu s potravinami: 4 vrstvené papírové obaly typu Tetra Pak a Combibloc (obaly od broskvového džusu, smetany, kokosové vody a kuřecího vývaru) a 3 plastové obaly vyrobené z polypropylenu (obaly od sýru, jogurtu a ricotty). Všechny vzorky byly zakoupeny v místním supermarketu v Arlingtonu, Texas, USA. V případě broskvového džusu, kokosového mléka a kuřecího vývaru byly zakoupeny tři balení a z každého obalu byl připraven samostatný vzorek pro ověření homogenity distribuce fotoiniciátorů.

## **3.2 Pracovní postup**

### **3.2.1 Příprava standardů a kalibračních roztoků**

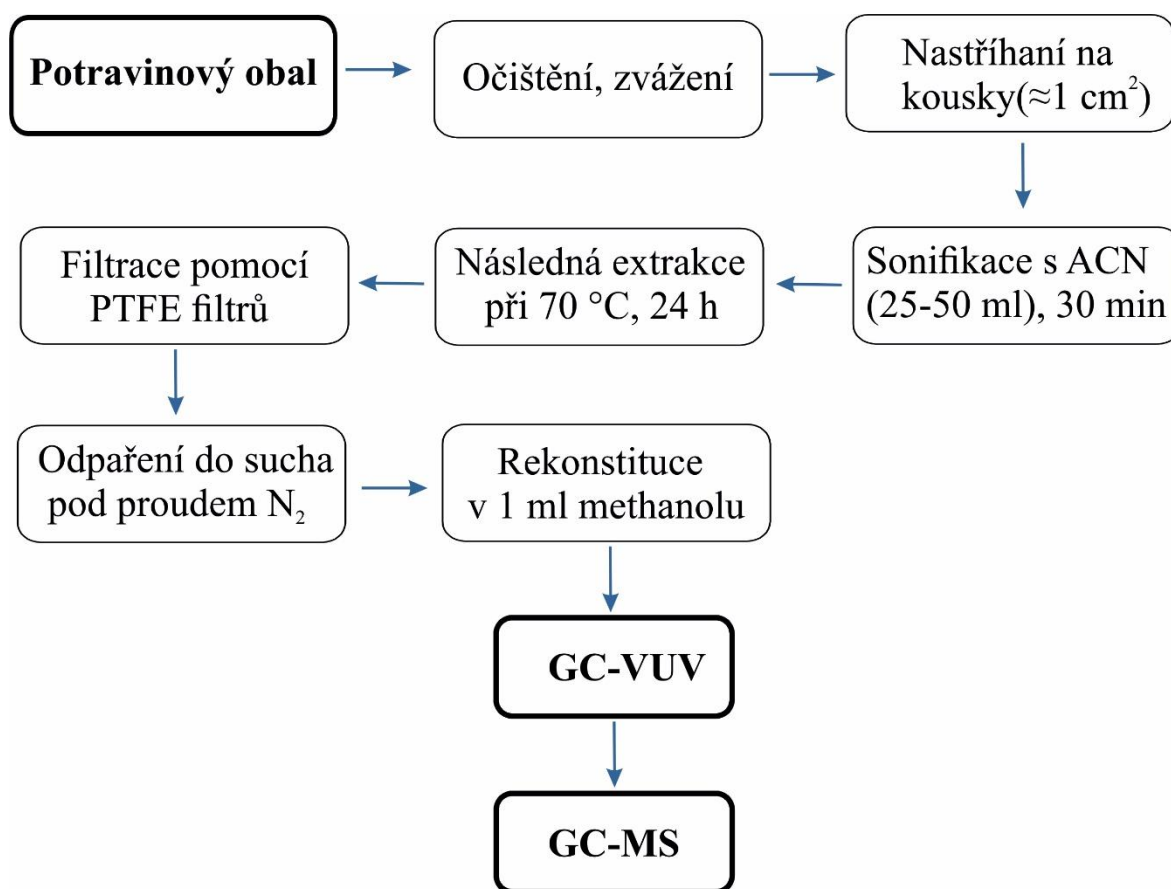
Zásobní standardní roztoky každého testovaného fotoiniciátoru byly připraveny rozpuštěním daného množství fotoiniciátoru v methanolu tak, aby výsledná koncentrace roztoku byla 1000 mg/l. Methanolicke směsné standardní roztoky pak byly připraveny postupným ředěním individuálních zásobních standardních roztoků fotoiniciátorů o koncentraci 1000 mg/l, maximální ředění v jednom kroku bylo 100krát. Ke kalibraci GC-VUV byla použita pětice kalibračních roztoků o koncentraci 3; 6; 30; 60; 300 mg/l pro BP, 2-MBP, 3-MBP, 4-MBP a 15; 30; 150; 300; 1500 mg/l pro zbývající fotoiniciátory. Ke kalibraci GC-MS byly použity kalibrační roztoky o koncentraci 0,5; 1; 5; 10; 50 mg/l pro 2-MBP, 0,8; 1,6; 8; 16; 80 mg/l pro EHDAB a 1,5; 3; 15; 30; 150 mg/l pro ostatní fotoiniciátory.

Všechny směsné standardní roztoky a kalibrační roztoky byly připravovány v den analýzy a pro GC analýzu převedeny do viálek s tmavých sklem.

### **3.2.2 Příprava vzorků obalů**

Všechny vybrané obalové materiály byly zpracovány dle postupu (Obr.8), který popsali ve své studii Lago a kol. [14]. Každý obal byl očištěn (omytí vodou), vysušen při laboratorní teplotě a zvážen (vzorek obalu od broskvového džusu, sýru a kokosové vody vážil cca 10 g, zbytek analyzovaných obalů vážilo cca 35 g). Poté byl obal nastříhán na malé kousky o velikosti kolem 1 cm<sup>2</sup>. Takto upravený vzorek byl podroben dvoukrokové extrakci. Vzorek byl umístěn do skleněné lahve s uzávěrem a k němu bylo přidáno 25–50

ml acetonitrilu (dle navážky obalu). Prvním krokem byla 30-minutová extrakce v ultrazvukové lázni, následovala extrakce v sušárně nastavené na teplotu 70 °C po dobu 24 h. Vzorky se nechaly zchladnout na laboratorní teplotu a získané extrakty byly přefiltrovány pomocí 0,22 µm PTFE filtrů. Nakonec byly extrakty odpařeny do sucha pod proudem dusíku při laboratorní teplotě a následně rekonstituovány v 1 ml methanolu (koncentrační faktor 25–50). Takto připravené vzorky byly před analýzou GC-VUV nebo GC-MS (vzorky měřeny v triplikátech) uchovávány ve vialkách s tmavým sklem při teplotě -4 °C tak, aby byla minimalizována degradace přítomných fotoiniciátorů.



**Obrázek 8** Schéma postupu přípravy vzorků pro analýzu fotoiniciátorů pomocí GC-VUV a GC-MS

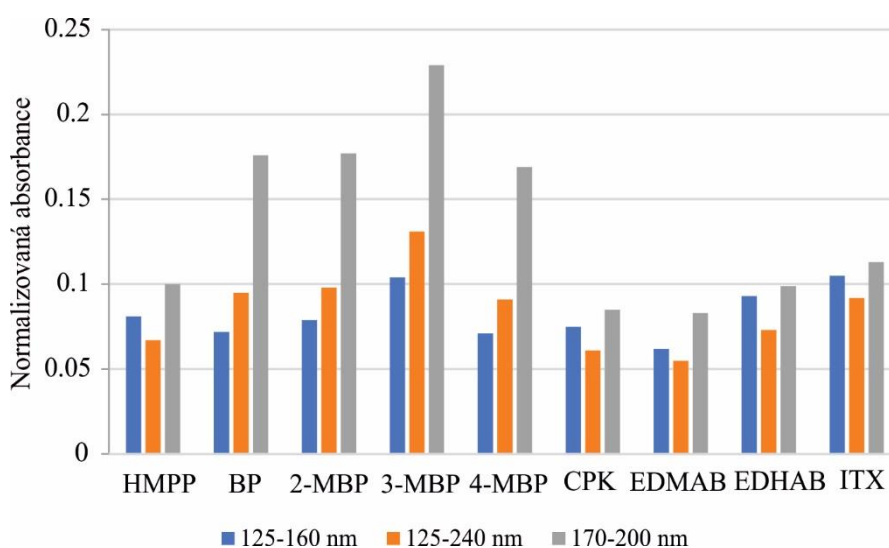
## 4. VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1 Stanovení pomocí GC-VUV

#### 4.1.1 Optimalizace GC-VUV metody

Cílem práce bylo vyvinout metodu pro kvalitativní a kvantitativní stanovení 9 vybraných fotoiniciátorů v reálných vzorcích potravinových obalů. Prvním krokem experimentální práce byla optimalizace separační metody tak, aby bylo dosaženo úplné separace jednotlivých fotoiniciátorů (rozlišení  $R \geq 1,5$ ). V tomto kroku byly testovány různé chromatografické kolony a několik teplotních programů. Zoptimalizované podmínky jsou uvedeny v Tabulce IX. Dalším krokem byla optimalizace parametrů nastavení VUV detektoru, a to z důvodu dosažení co nejnižších mezí detekce. Pro optimalizaci byly vybrány následující parametry: aplikace různých spektrálních filtrů, teplota křemenné kapiláry a VUV průtokové cely, tlak pomocného plynu a rychlost sběru dat. K optimalizaci GC-VUV metody byl použit směsný standard všech fotoiniciátorů o koncentraci 100 mg/l.

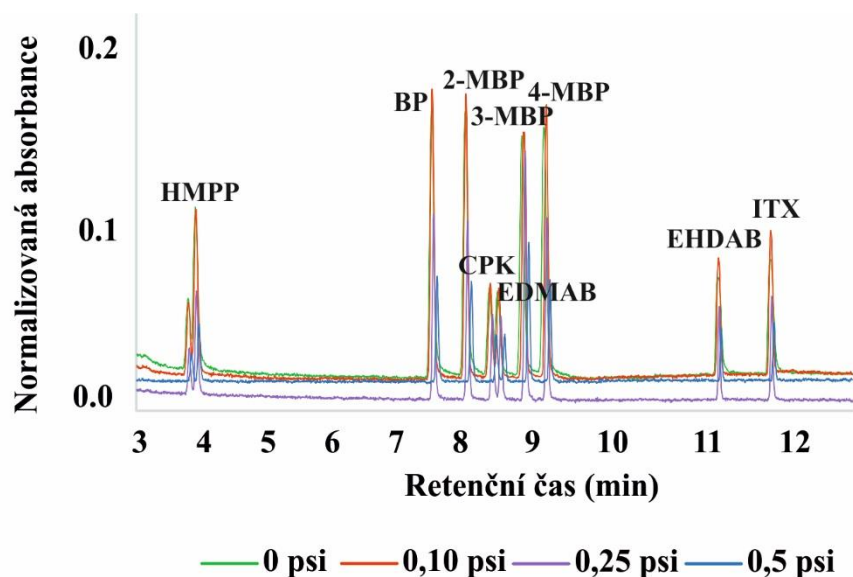
Vzhledem k tomu, že každá chemická sloučenina poskytuje různá absorpční spektra s absorpčními maximy při různých vlnových délkách, bylo nutné zjistit, za použití kterého spektrálního filtru má signál jednotlivých fotoiniciátorů nejvyšší intenzitu. Byl studován efekt 3 spektrálních filtrů: 125–240 nm, 125–160 nm a 170–200 nm. Jako nejvhodnější filtr byl pro tento typ analytů vybrán filtr v rozmezí vlnových délek 170–200 nm, kdy byl signál všech 9 fotoiniciátorů nejintenzivnější (Obr. 9).



**Obrázek 9** Srovnání intenzit píků 9 fotoiniciátorů měřených za použití různých spektrálních filtrů

Dalším optimalizovaným parametrem byla teplota křemenné kapiláry a průtokové cely. Kvůli širokému rozsahu teplot varu testovaných fotoiniciátorů (60–370 °C) může při nastavení různých teplot křemenné kapiláry či průtokové cely docházet ke změně kvality získaných spekter. Byly studovány dvě různé teploty, a to 275 °C a 300 °C (maximální povolená teplota křemenné kapiláry). Použití nižších teplot by mohlo vést k neúplnému vypaření a kondenzaci výše vroucích fotoiniciátorů eulovaných z GC kolony. V případě všech analyzovaných fotoiniciátorů nebyl pozorován vliv změny teploty na kvalitu absorpčních spekter, proto byla pro další analýzy zvolena teplota 300 °C.

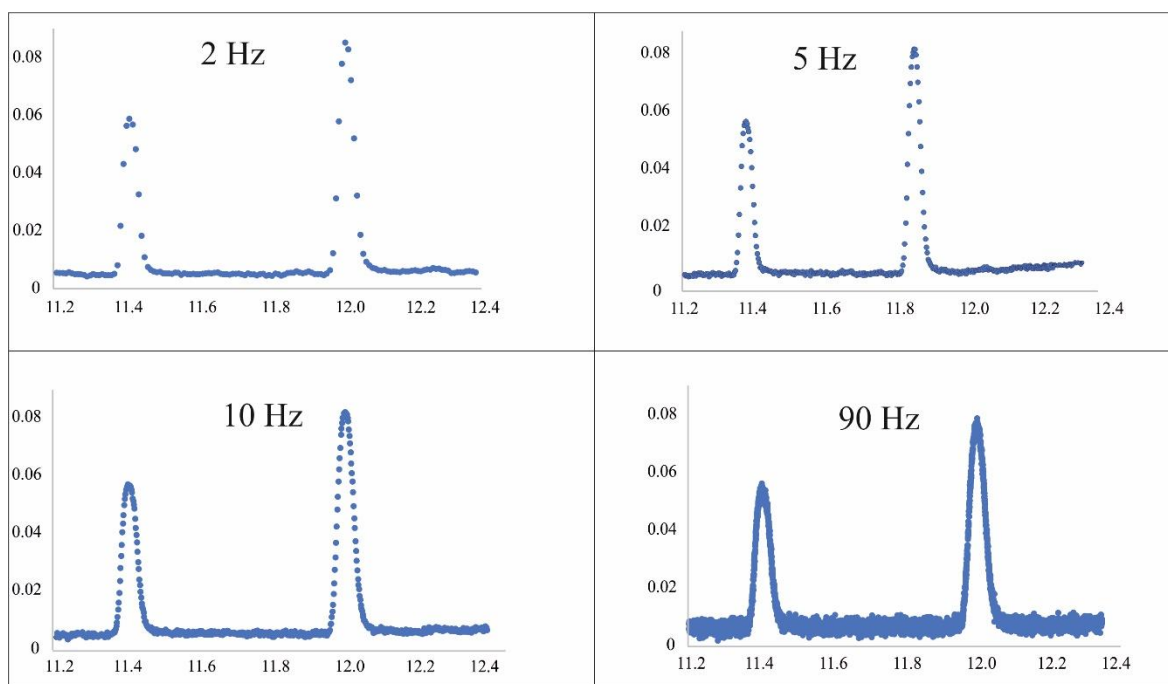
Tlak pomocného plynu obecně slouží k optimalizaci času, který analyt stráví v průtokové cele, což má vliv na tvar píků a hodnotu SNR. Pokud je zvolen nižší tlak, analyt zůstává v cele déle, čímž se díky opakovanému měření zvyšuje hodnota SNR. Na druhou stranu ale dochází ke zhoršení rozlišení z důvodu rozšíření základní linie chromatografického píku. V literatuře se lze obvykle setkat s doporučeným tlakem 0,15 psi [39], avšak pro optimalizaci detekce fotoiniciátorů byly vybrány 4 tlaky pomocného plynu v rozmezí 0–0,50 psi (Obr. 10). Největší rozšíření chromatografických píků bylo samozřejmě pozorováno při tlaku 0 psi, který ovšem není pro aplikace GC-VUV doporučován. Při nulovém tlaku pomocného plynu může docházet k nestabilitě základní linie, kontaminaci vstupu pomocného plynu až ke křížové kontaminaci mezi analyzovanými vzorky. Naopak vysoké hodnoty tlaku obvykle vedou ke snížení signálu všech analytů (snížení SNR). Vzhledem k těmto skutečnostem byl pro další experimenty vybrán tlak 0,1 psi, kdy bylo dosaženo nejvyšších intenzit signálů všech fotoiniciátorů a nejvyšší hodnoty SNR.



Fotoiniciátor	0 psi		0,10 psi		0,25 psi		0,5 psi	
	Intenzita (A)	Šířka píku (min)	Intenzita (A)	Šířka píku (min)	Intenzita (A)	Šířka píku (min)	Intenzita (A)	Šířka píku (min)
HMPP	0,08	0,102	0,09	0,092	0,05	0,076	0,03	0,072
BP	0,15	0,112	0,16	0,094	0,09	0,072	0,06	0,066
2-MBP	0,15	0,112	0,16	0,094	0,09	0,072	0,05	0,068
CPK	0,07	0,105	0,08	0,088	0,04	0,07	0,03	0,065
EDMAB	0,07	0,105	0,08	0,088	0,04	0,065	0,03	0,062
3-MBP	0,2	0,095	0,21	0,083	0,13	0,066	0,08	0,055
4-MBP	0,14	0,095	0,15	0,077	0,09	0,058	0,06	0,055
EHDAB	0,06	0,102	0,07	0,069	0,04	0,046	0,03	0,039
ITX	0,07	0,112	0,08	0,075	0,05	0,052	0,03	0,046

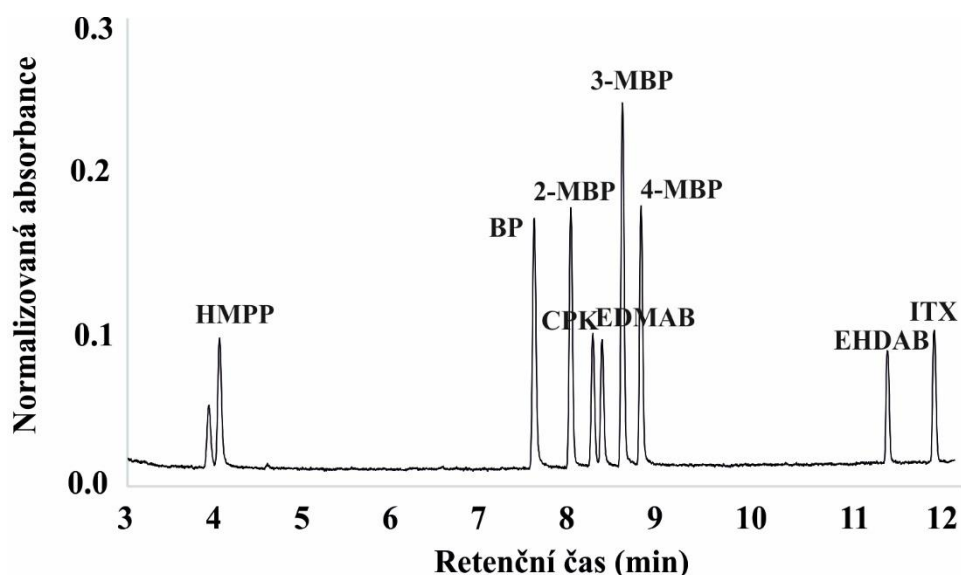
**Obrázek 10** Srovnání chromatogramů měřených za použití různých hodnot tlaku pomocného plynu (v tabulce je uvedeno detailní porovnání intenzit a šířek píků pro jednotlivé fotoiniciátory)

Posledním optimalizovaným parametrem byla rychlost sběru dat definující počet detekovaných spekter za sekundu, která má značný vliv na tvar chromatografického píku (zejména v blízkosti hodnot meze detekce a meze kvantifikace). Pro HPLC a GC je doporučeno optimalizovat rychlost sběru dat tak, aby bylo detekováno minimálně 8–10 bodů přes chromatografický pík. V testovaném rozmezí od 2–90 Hz se retenční časy všech analytů neměnily, i tvar píků zůstal stejný. Různá rychlost sběru dat měla vliv hlavně na hodnotu SNR a samozřejmě na počet bodů přes pík. Při 2 Hz bylo dosaženo pouze 10 bodů. Při nastavení na vyšší rychlost sběru dat byl počet bodů přes pík dostatečný, nicméně se snižovala hodnota SNR. Vzhledem k nejvyššímu dosaženému SNR a 25 bodům přes chromatografický pík byla zvolena rychlost sběru dat 5 Hz (Obr.11).



**Obrázek 11** Detailní chromatogram EHDAB a ITX za použití různé rychlosti sběru dat (spektrální filtr 170–200 nm, podmínky GC-VUV analýzy totožné jako je uvedeno v experimentální části)

Na základě optimalizace těchto VUV parametrů v kombinaci s vhodným teplotním gradientem GC bylo dosaženo separace vybraných fotoiniciátorů s celkovou délkou analýzy 13 minut (Obr. 12). Rozlišení ITX izomerů ve směsném standardu nebylo dosaženo. Součástí Obrázku 12 je navíc tabulka s hodnotami retenčních časů, rozlišení, faktoru asymetrie a tailing faktoru pro jednotlivé píky fotoiniciátorů. Pro výpočet těchto parametrů byly použity následující vzorce: faktor asymetrie  $A_s = b / a$  kde  $b$  je vzdálenost od středu píku k pravému konci měřená v 10% výšky píku;  $a$  je vzdálenost počátku píku ke středu píku měřená opět v 10 % výšky píku; tailing faktor  $T = (x + y) / 2x$  kde  $y$  je vzdálenost od středu píku k pravému konci měřená v 5 % výšky píku;  $x$  je vzdálenost počátku píku ke středu píku měřená opět v 5 % výšky píku [40, 41]. Akceptační kritérium pro  $A_s$  se obecně pohybuje od 0,9 do 1,5 a pro  $T \leq 2$ . Rozlišení  $R$  bylo vypočítáno podle vztahu  $R = 2 (t_{R2} - t_{R1}) / (w_1 + w_2)$  kde  $t_{R1}$  a  $t_{R2}$  jsou retenční časy píků 1 a 2,  $w_1$  a  $w_2$  odpovídající šířky píků při základní linii. Píky jsou rozlišené, pokud je hodnota  $R \geq 1,5$ . Ze získaných hodnot je zjevné, že metoda poskytuje dělení všech píků až na základní linii, hodnoty faktoru asymetrie a tailing faktoru všech píků potvrzují jejich symetrii.



Fotoiniciátor	Retenční čas (min)	Faktor asymetrie As	Tailing faktor T	Rozlišení R
HMPP	4,05	1,3	1,4	50,4
BP	7,71	1,0	1,1	6,0
2-MBP	8,15	1,1	1,0	4,7
CPK	8,41	1,1	1,1	2,4
EDMAB	8,55	1,2	1,2	4,2
3-MBP	8,71	1,0	1,0	3,0
4-MBP	8,95	1,2	1,2	43,2
EHDAB	11,45	1,0	1,1	8,8
ITX	11,81	1,2	1,2	-

**Obrázek 12** GC-VUV chromatogram směsného standardu 9 fotoiniciátorů, v tabulce jsou dále uvedeny retenční časy pro jednotlivé fotoiniciátory, rozlišení mezi sousedními píky a parametry symetrie jednotlivých píků

#### 4.1.2 VUV spektra fotoiniciátorů

Pro vytvoření vlastní knihovny referenčních VUV spekter testovaných fotoiniciátorů byly postupně analyzovány standardní roztoky všech 9 fotoiniciátorů (100 mg/l). Takto vytvořená knihovna absorpčních spekter byla použita pro následnou kvalitativní analýzu (identifikaci) fotoiniciátorů v reálných vzorcích. V rozsahu vlnových délek 120–240 nm poskytovaly všechny analyty charakteristická absorpční spektra, která jsou shrnuta na Obrázku 13.

Obrázek 13A zobrazuje absorpční spektra benzofenonu společně se směsí ITX (později identifikován jakou pouze 2-isopropylthixanton), Obrázek 13B pak spektra polohových izomerů methylbenzofenonu (2-MBP, 3-MBP a 4-MBP). Ve spektrech všech fotoiniciátorů obecně dominuje silná absorpce v rozsahu 185–215 nm, a to díky aromatické

povaze sloučenin (absorpční maximum přibližně 185 nm). Díky silné konjugaci ketoskupiny s benzenovým jádrem lze ve spektrech těchto 5 fotoiniciátorů pak ještě najít druhé absorpční maximum, a to kolem 240 nm. Nejlépe je to vidět v absorpčním spektru ITX, kde je tato konjugační vazba nejsilnější (Obr. 13A). Tato absorpce je v tomto případě dokonce srovnatelná s absorpcí benzenového jádra, a tak by se dalo říci, že má ITX dvě absorpční maxima.

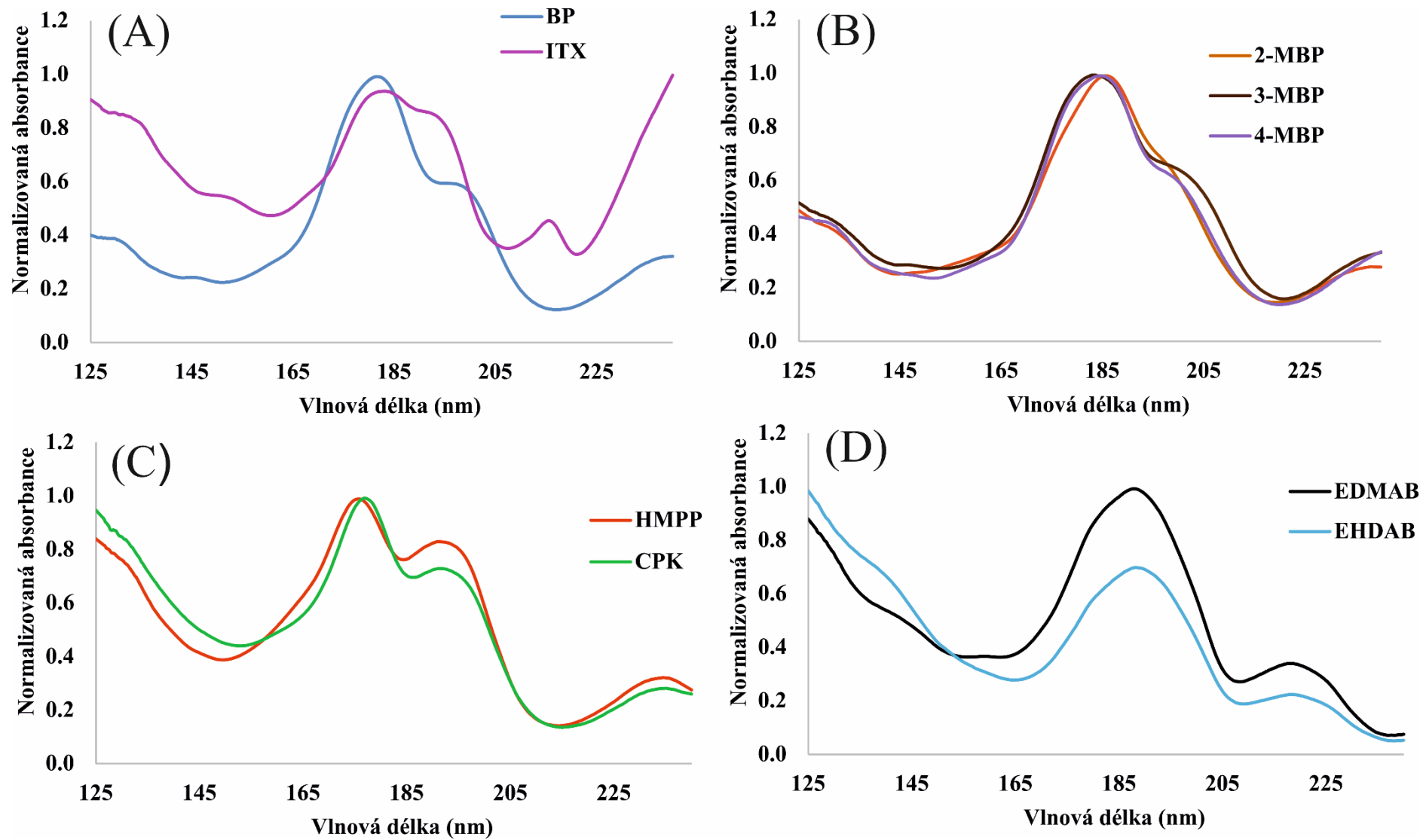
Jak už bylo řečeno, GC-VUV je ideální technikou zejména pro analýzu izomerů jako jsou právě 2-MBP, 3-MBP a 4-MBP. Jak je vidět z Obrázku 13B, tyto izomery mají mírně odlišnou polohu absorpčního maxima. Liší se i šířkou absorpčního maxima, kdy 4-MBP má nejširší absorpční pás. Jejich rozdílnost lze vidět i z několika průsečíků všech tří spekter. Tyto příbuzné sloučeniny lze tedy snadno odlišit na základě tvaru jejich VUV spekter, což má hned několik výhod. Během GC analýzy izomerů často dochází k jejich koeluci, kdy je nutná zdlouhavá optimalizace separace, která ale často nevede k jejich úplnému rozseparování. Navíc vzhledem k ekvivalentním elementárním vzorcům a podobné fragmentaci mají tyto tři deriváty benzofenonu velmi podobná EI spektra (Obr. 14), a tak jsou většinou nerozlišitelné i za použití hmotnostních spektrometrů s vysokou rozlišovací schopností. V takových případech pak aplikace běžně používaného spojení GC-MS selhává. Pokud ale tyto analyty poskytují odlišná VUV spektra, VUV detektor je poměrně snadno rozliší, a to i v případě kdy dochází k jejich koelucii. Další nespornou výhodou je knihovna VUV spekter obsahující také spektra izomerů. Pro další studie tak není nutné k jejich identifikaci kupovat drahé standardy, identifikace v reálných vzorcích by mohla být realizována pouze na základě srovnávání dostupných VUV spekter.

Obrázek 13C popisuje VUV spektra pro HMPP a CPK. Oba fotoiniciátory se řadí k molekulám acetofenonového typu, obsahují hydroxyskupinu vázanou na alfa uhlík u ketoskupiny. Liší se pouze ve funkční skupině na tomto alfa uhlíku: u HMPP to jsou dvě methylskupiny, u CPK pak cyklohexylová skupina. Díky tomu má tento fotoiniciátor intenzivnější absorpenci v oblasti 125–160 nm. Obě spektra se pak liší v absorpenci v rozmezí 176–192 nm, kde se projevuje vliv benzenového jádra. Avšak vzhledem k tomu, že oba fotoiniciátory mají aromatickou skupinu, tento rozdíl nebyl doposud vyjasněn. Konjugaci ketoskupiny s benzenovým jádrem lze pozorovat při vlnové délce kolem 234 nm stejně jako u předchozích fotoiniciátorů.

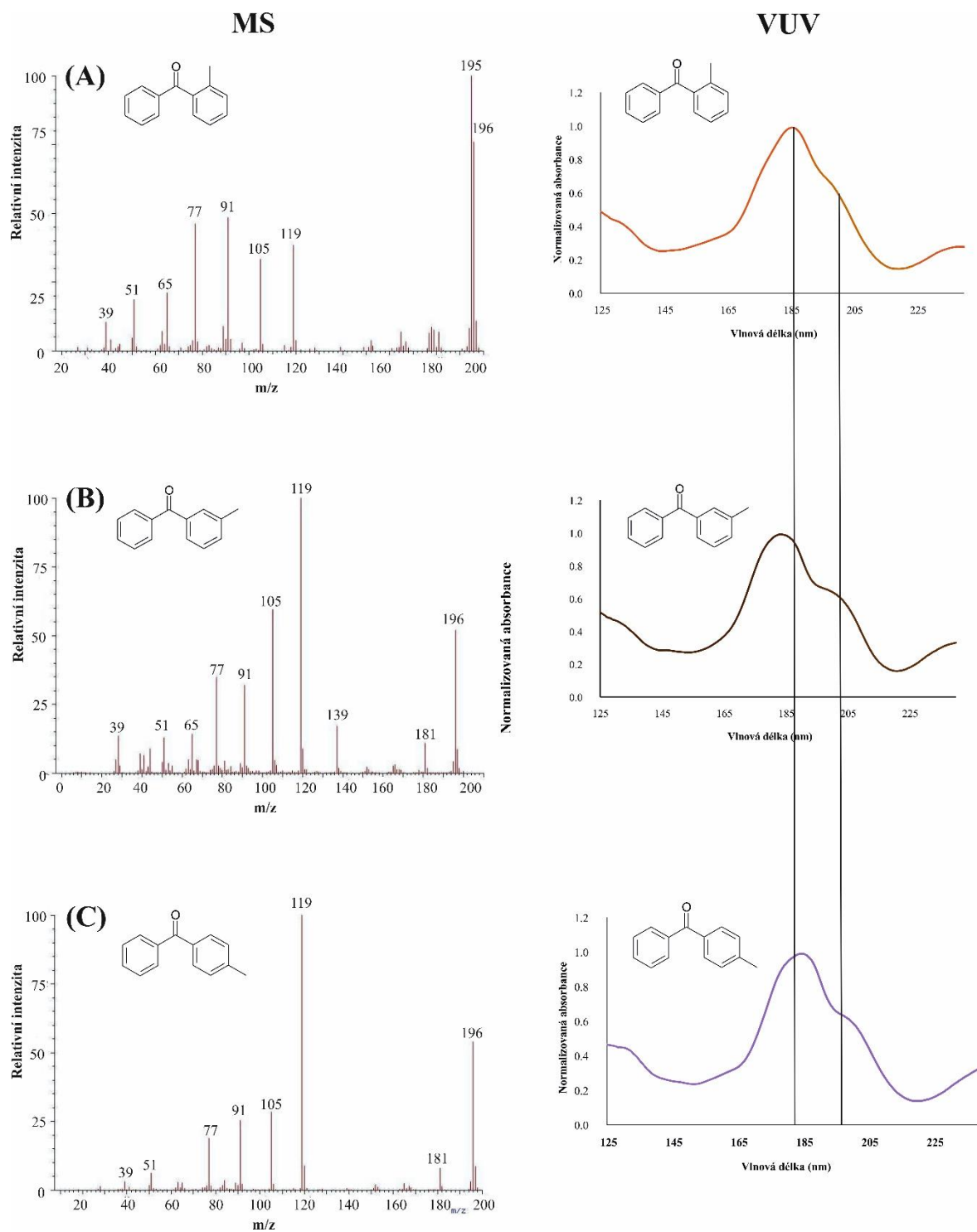
Podobně jako obrázek 13C, i obrázek 13D ukazuje VUV spektra 2 fotoiniciátorů, které se liší pouze jednou funkční skupinou. Absorpční spektra EDMAB a EHDAB lze rozlišit díky různé délce alkylového řetězce na 4-(dimethylamino)benzylové skupině. Díky



tomu má EHDAB silnější absorpci v oblasti 125–160 nm (obsahuje delší alkylový řetězec). Konjugaci s benzoátovou skupinou lze pozorovat kolem 220 nm.



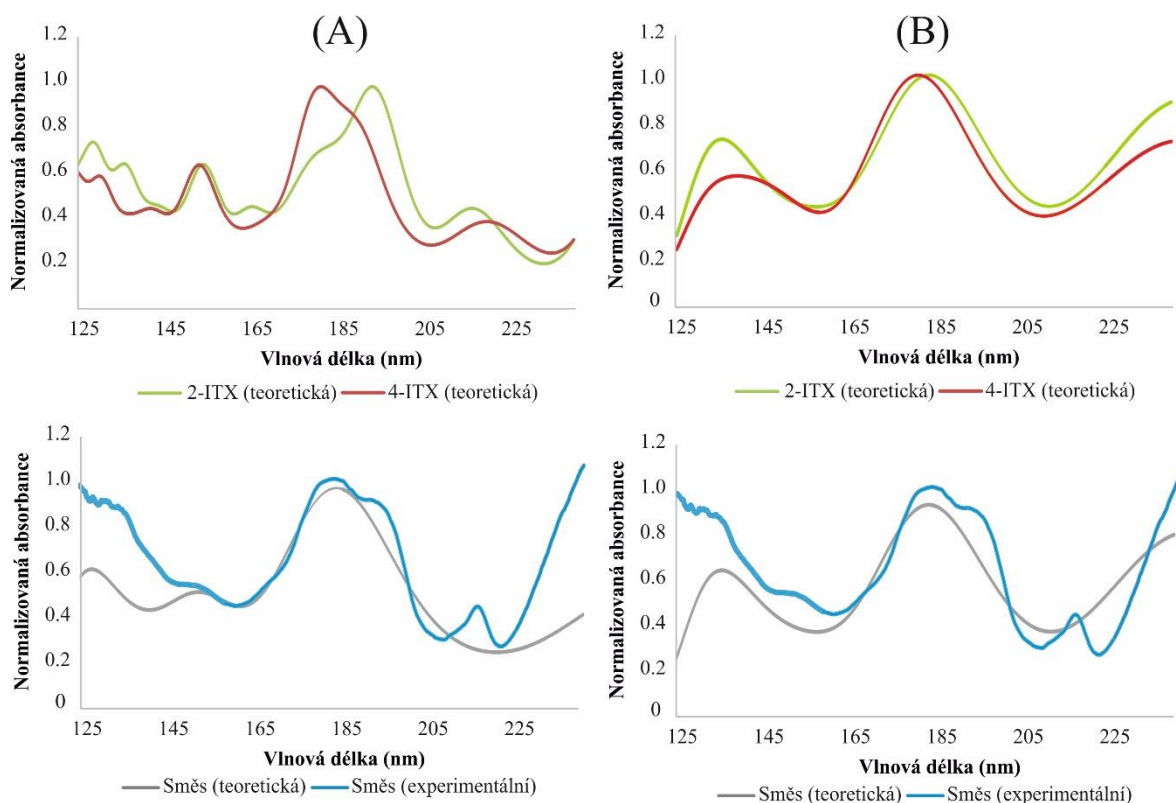
Obrázek 13 VUV spektra analyzovaných fotoiniciátorů: (A) BP, ITX; (B) 2-MBP, 3-MBP, 4-MBP; (C) HMPP, CPK; (D) EDMAB, EHDAB



**Obrázek 14** Srovnání EI (vlevo) a VUV (vpravo) spekter izomerů benzofenonu: (A) 2-MBP (B) 3-MBP (C) 4-MBP, VUV spektra pro každý izomer jsou na rozdíl od EI spekter specifická a liší se v několika znacích (posun polohy absorpčního maxima, jejich počet atd.)

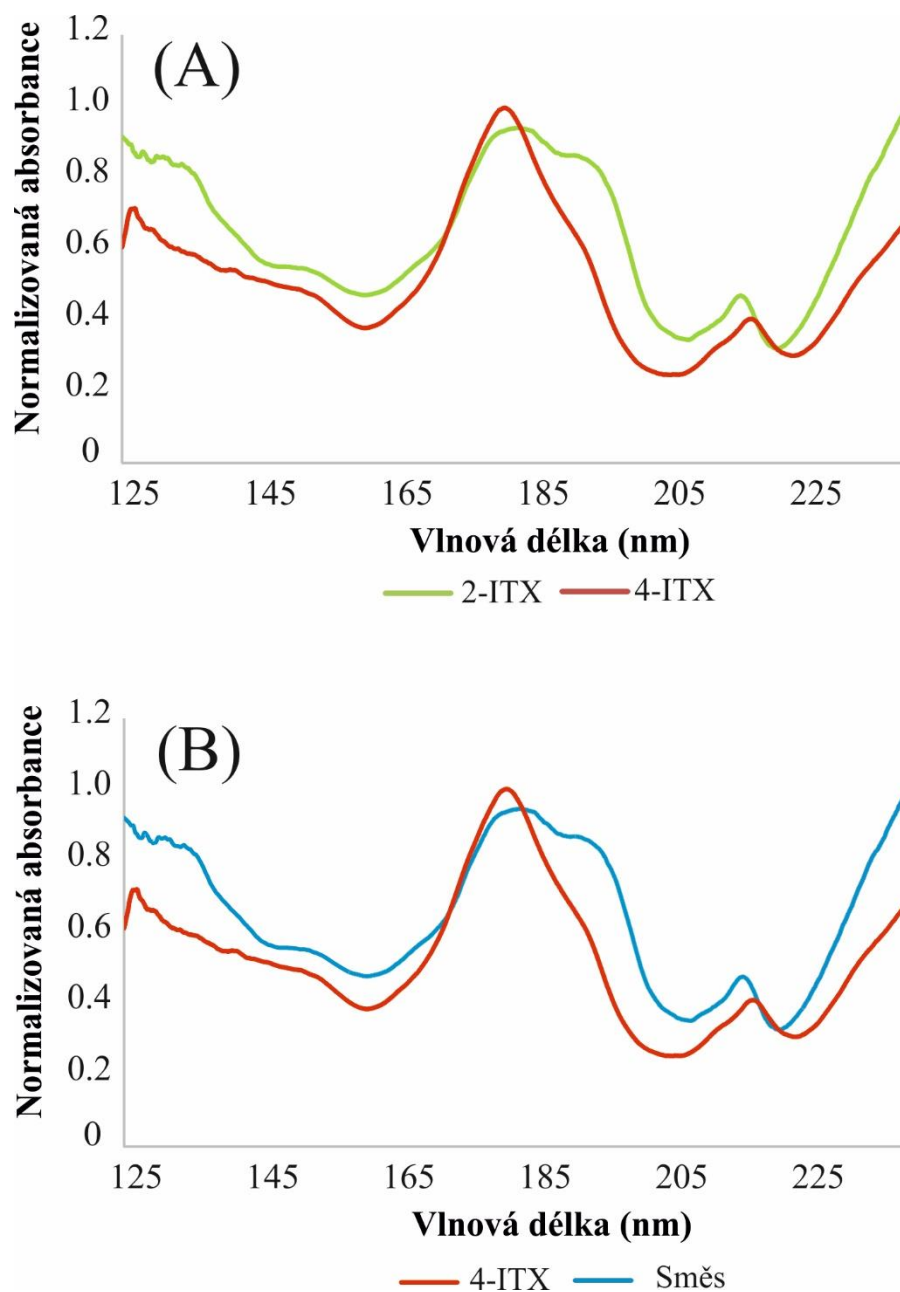
#### 4.1.3 Analýza směsi 2-ITX a 4-ITX

Vzhledem k úspěšné separaci všech izomerů benzofenonu (2-MBP, 3-MBP a 4-MBP) byla optimalizována i separace pro směs 2-isopropylthioxantonu (2-ITX) a 4-isopropylthioxantonu (4-ITX), a to z důvodu, že pro potisk potravinových obalů se běžně používá směs obou izomerů. Během experimentů byla optimalizována řada parametrů GC jako například teplotně řízený program, typ stacionární fáze (Rtx-1, PAH a  $\beta$ -cyklodextrinová kolona), nástřík (s děličem nebo bez děliče toku) a objem dávkovaného vzorku (0,5; 1 a 1,5  $\mu$ l). Nicméně žádný krok nevedl k úplné separaci obou izomerů. Následně byla vypočítána i teoretická VUV spektra 2-ITX, 4-ITX a jejich směsi pro porovnání s experimentálně získaným VUV spektrem standardu (Obr. 15A). Na základě těchto spekter bylo možné odhadnout procentuální zastoupení 2-ITX a 4-ITX ve směsi (92 % 4-ITX a 8 % 2-ITX). Avšak ani jedno z vypočítaných spekter neodpovídalo naměřenému VUV spektru standardu. Na základě této skutečnosti byly detailně studovány práce, kde byl použit totožný standard. Allegrone a kol. zabývající se studiem ITX v mléce dokonce popsali složení tohoto standardu, který podle nich obsahoval v majoritním zastoupení pouze jeden z izomerů (92 % 2-ITX a 8 % 4-ITX) [24]. Tento poměr byl tedy opačný než ten, který byl stanoven z námi vypočítaných teoretických VUV spekter. Takový rozdíl mohl být způsoben vysokým stupněm konjugace fotoiniciátorů, kde k excitaci dochází zejména pomocí přenosu náboje. V těchto případech pak mohou teoretické výpočty selhat, hlavně když nejsou k dispozici VUV spektra čistých izomerů. Následně byly pro výpočet použity jiné funkce, a to funkce přenosu náboje (cam-b3lyp). Tento přístup poskytoval odlišné výsledky, v použitém standardu byla zjištěna přítomnost zejména 2-ITX, což se shoduje s odbornou literaturou. Vypočítaný poměr 2-ITX:4-ITX byl 90:10, nicméně teoretická VUV spektra 2-ITX a 4-ITX ani jejich směsi opět neodpovídala experimentálně získanému VUV spektru standardu (Obr. 15B).



**Obrázek 15** Teoretická VUV spektra 2-ITX, 4-ITX a jejich směsi vypočítaná (A) na základě hodnot excitačních energií a síle oscilace metodou TDDFT („time dependent density functional theory“) (PBE0/6-31+G\*\*) a (B) pomocí funkcí přenosu náboje (cam-b3lyp)

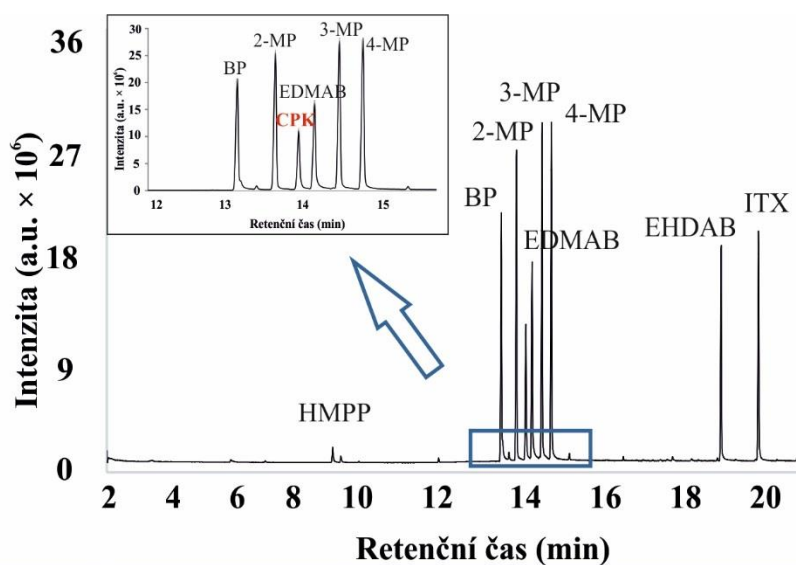
Pro potvrzení složení standardu a získání individuálních VUV spekter obou izomerů byly nakonec zakoupeny a experimentálně studovány čisté standardy 2-ITX a 4-ITX (oba Sigma Aldrich). Jejich analýzou byla získána rozdílná VUV spektra, která byla poté porovnána s VUV spektrem našeho standardu. Těmito experimenty byla potvrzena přítomnost pouze 2-ITX (Obr. 16), jeho VUV spektrum bylo totožné s VUV spektrem našeho standardu. Standard označený jako ITX v celé této práci tedy představuje pouze 2-ITX, eluce jednoho píku je tedy v pořádku a separace nemusela být dále optimalizována.



**Obrázek 16** Porovnání VUV spekter získaných analýzou čistých izomerů (A) a porovnání VUV spektra našeho standardu se spektrem 4-ITX (B)

## 4.2 Stanovení pomocí GC-MS

Pro porovnání získaných výsledků byla vyvinuta i metoda GC-MS využívající trojitý kvadrupól. Tato technika je hojně používána pro stanovení fotoiniciátorů jak v obalových materiálech, tak i v samotných potravinách. Vzhledem k tomu, že použitím totožného teplotně řízeného programu jako u GC-VUV nebylo dosaženo úplné separace fotoiniciátorů (byl použit jiný typ kolony SHRXI-5MS), musela být i GC-MS metoda optimalizována v několika parametrech (teplotně řízený program, teplota iontového zdroje a interface a teplota na vstupu). Poté bylo dosaženo separace všech 9 analytů s celkovou délkou analýzy do 21 minut (Obr. 17). Všechny fotoiniciátory byly eluovány ve stejném pořadí jako za použití GC-VUV, ale samotná analýza byla o 7 minut delší. Pro vyhodnocování byl použit SIM mód (monitorování vybraných iontů), MS parametry jsou uvedeny v Tabulce X.



Fotoiniciátor	Retenční čas (min)	Faktor asymetrie As	Tailing faktor T	Rozlišení R
HMPP	8,38	1,2	1,4	105,8
BP	13,01	0,9	1,2	10,3
2-MBP	13,44	0,9	0,9	6,1
CPK	13,71	1,0	1,1	4,2
EDMAB	13,91	1,0	1,1	6,4
3-MBP	14,19	0,9	0,9	6,1
4-MBP	14,45	0,9	0,9	103,4
EHDAB	19,34	0,9	0,9	21,2
ITX	20,39	0,9	0,9	-

**Obrázek 17** GC-MS chromatogram směsného standardu 9 fotoiniciátorů, v tabulce jsou uvedeny detailní parametry píků jednotlivých fotoiniciátorů (retenční čas, faktor asymetrie, tailing faktor a rozlišení; výpočty těchto parametrů jsou totožné s výpočty pro GC-VUV analýzu uvedené v kapitole 4.1.1)

**Tabulka X** MS parametry 9 fotoiniciátorů pro SIM mód

Fotoiniciátor	Fragmentační energie (eV)	Charakteristický iont (m/z)	Iont pro kvantifikaci (m/z)*
<b>HMPP</b>	70	77, 105	59
<b>BP</b>	70	77,105	181
<b>2-MBP</b>	70	119	195
<b>CPK</b>	70	77, 99	81
<b>EDMAB</b>	70	164, 193	148
<b>3-MBP</b>	70	196	119
<b>4-MBP</b>	70	196	119
<b>EHDAB</b>	70	277	165
<b>ITX</b>	70	254	239

\* nejintenzivnější ion v MS/MS spektru

### 4.3 Validace metod (v omezeném rozsahu)

Obě vyvinuté metody (GC-VUV a GC-MS) byly validovány v omezeném rozsahu zahrnující mez detekce (LOD), mez stanovitelnosti (LOQ) a linearitu. Tabulka XI shrnuje validační parametry a Tabulka XII získané hodnoty LOD, LOQ, kalibračních rozsahů a korelačních koeficientů pro 9 analyzovaných fotoiniciátorů. Pro experimenty byly připraveny standardní roztoky jednotlivých fotoiniciátorů o koncentraci 1000 mg/l, následným zředěním pomocí methanolu byly připraveny směsné standardní roztoky o požadovaných koncentracích.

**Tabulka XI** Validační parametry

Parametr	Akceptační kritérium	Postup
Linearita	Korelační koeficient > 0,99	Kalibrační křivka tvořená z 5 kalibračních roztoků
LOD	-	LOD: S/N=3
LOQ	LOQ ≤ specifický migrační limit (BP, 2-MBP, 3-MBP, 4-MBP ≤ 0,6 mg/kg)	LOQ: S/N=10

Hodnoty LOD odpovídaly koncentraci, kdy je analytický signál významně odlišný od šumu, byl vyjádřen jako trojnásobek šumu základní linie. Naopak hodnoty LOQ byly stanoveny jako desetinásobek šumu základní linie. Po přepočtu na navážky vzorků (35 nebo 10 g) byly pro GC-VUV získané hodnoty LOQ 0,1 a 0,3 mg/kg pro BP, 2-MBP, 3-MBP, 4-MBP a 0,4 a 1,5 mg/kg pro ostatní fotoiniciátory. Nicméně během GC-MS analýz



bylo dosaženo mnohem nižších mezí detekce i stanovitelnosti, téměř až o jeden řád (LOQ: 0,01–0,15 mg/kg). Avšak za použití vhodné prekoncentrace vzorků byly GC-VUV detekční limity dostatečné pro stanovení fotoiniciátorů v reálných vzorcích, navíc díky této metodě byla umožněna GC separace všech forem. Získané meze kvantifikace jsou nižší než známé specifické migrační limity daných fotoiniciátorů, a tak lze tuto metodu aplikovat za účelem zjištění bezpečnosti potravin či potravinových obalů.

Linearita byla určena pomocí analýzy 5 kalibračních roztoků o různé koncentraci. Pro GC-VUV byly testovány rozsahy od LOQ po 300 mg/l (BP, 2-MBP, 3-MBP a 4-MBP) a od LOQ po 1500 mg/l pro zbývající fotoiniciátory. Nicméně pro GC-MS bylo testováno více rozsahů (LOQ–50 mg/l pro 2-MBP, LOQ–80 mg/l pro EHDAB a LOQ–150 mg/l pro ostatní). Tyto rozsahy byly vybrány na základě získaného LOQ pro konkrétní fotoiniciátor. Všechny vypočítané korelační koeficienty (R) pro obě GC-VUV a GC-MS metody byly větší než 0,999. Všechny kalibrační standardy byly analyzovány v triplicátech, relativní směrodatná odchylka se pohybovala v rozmezí 2–9 % u GC-VUV a 1–5 % u GC-MS.

**Tabulka XII** Shrnutí validačních parametrů GC-VUV a GC-MS metod

Fotoiniciátor	LOD <sub>10g</sub> / LOD <sub>35g</sub> (mg/kg)	LOQ <sub>10g</sub> / LOQ <sub>35g</sub> (mg/kg)	Kalibrační rozsah (mg/l)	R
<b>GC-VUV</b>				
<b>HMPP</b>	0,5 / 0,14	1,5 / 0,4	15–1500	0,9999
<b>BP</b>	0,1 / 0,03	0,3 / 0,1	3–300	0,9999
<b>2-MBP</b>	0,1 / 0,03	0,3 / 0,1	3–300	0,9997
<b>CPK</b>	0,5 / 0,14	1,5 / 0,4	15–1500	0,9999
<b>EDMAB</b>	0,5 / 0,14	1,5 / 0,4	15–1500	0,9997
<b>3-MBP</b>	0,1 / 0,03	0,3 / 0,1	3–300	0,9996
<b>4-MBP</b>	0,1 / 0,03	0,3 / 0,1	3–300	0,9999
<b>EHDAB</b>	0,5 / 0,14	1,5 / 0,4	15–1500	0,9998
<b>ITX</b>	0,5 / 0,14	1,5 / 0,4	15–1500	0,9997
<b>GC-MS</b>				
<b>HMPP</b>	0,05 / 0,014	0,15 / 0,04	1,5–150	0,9996
<b>BP</b>	0,05 / 0,014	0,15 / 0,04	1,5–150	0,9997
<b>2-MBP</b>	0,02 / 0,004	0,05 / 0,01	0,5–50	0,9996
<b>CPK</b>	0,05 / 0,014	0,15 / 0,04	1,5–150	0,9996
<b>EDMAB</b>	0,05 / 0,014	0,15 / 0,04	1,5–150	0,9998
<b>3-MBP</b>	0,05 / 0,014	0,15 / 0,04	1,5–150	0,9998
<b>4-MBP</b>	0,04 / 0,011	0,15 / 0,04	1,5–150	0,9999
<b>EHDAB</b>	0,03 / 0,007	0,08 / 0,02	0,8–80	0,9997
<b>ITX</b>	0,05 / 0,014	0,15 / 0,04	1,5–150	0,9996

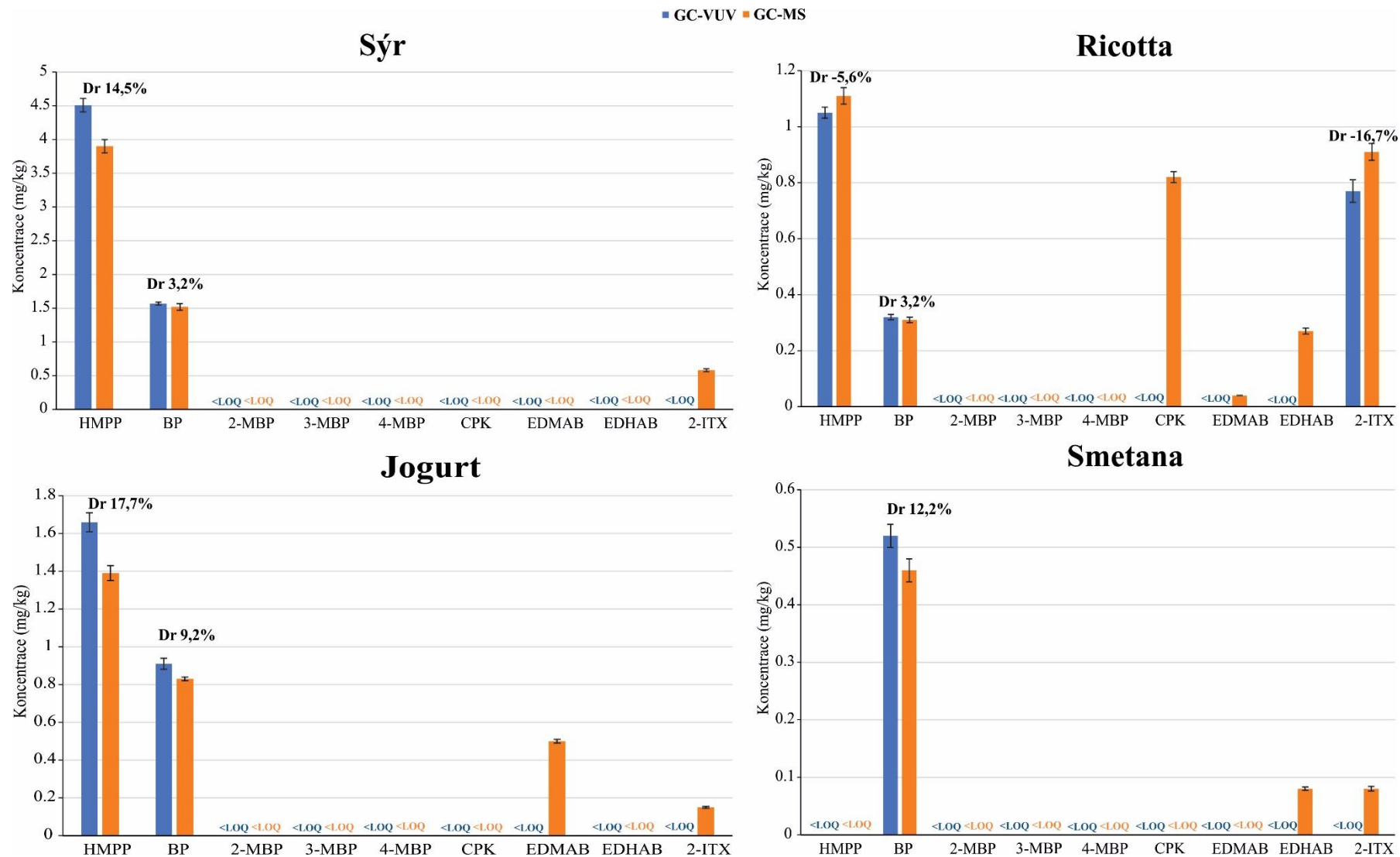
LOD<sub>10g</sub> – LOD pro navážku vzorku 10 g (pro obal od broskvového džusu, sýru a kokosové vody)

LOD<sub>35g</sub> – LOD pro navážku 35 g (pro obal od smetany, jogurty, ricotty a kuřecího vývaru)

#### 4.4 Stanovení fotoiniciátorů nalezených v obalových materiálech

Obě validované metody byly použity pro kvantitativní stanovení 9 fotoiniciátorů v různých obalových materiálech. K analýzám byly vybrány 4 vrstvené obaly z papíru (obaly od broskvového džusu, kokosové vody, smetany, kuřecího vývaru) a 3 plastové obaly (od jogurtu, sýru a ricotty). Získané výsledky jsou shrnuty na Obrázku 18 a 19, detailně pak v Příloze č.1. Každý reálný vzorek byl analyzován třikrát jak pomocí GC-VUV tak i pomocí GC-MS. Obaly od broskvového džusu, kuřecího vývaru a kokosové vody byly navíc zakoupeny v triplikátech, z každého z nich byl připraven separátní vzorek z důvodu určení variability koncentrace přítomných fotoiniciátorů. K porovnání výsledků stanovení fotoiniciátorů v obalových materiálech pomocí GC-VUV a GC-MS byl použit rozdíl mezi naměřenými koncentracemi vyjádřen jako relativní rozdíl ( $Dr$ ).

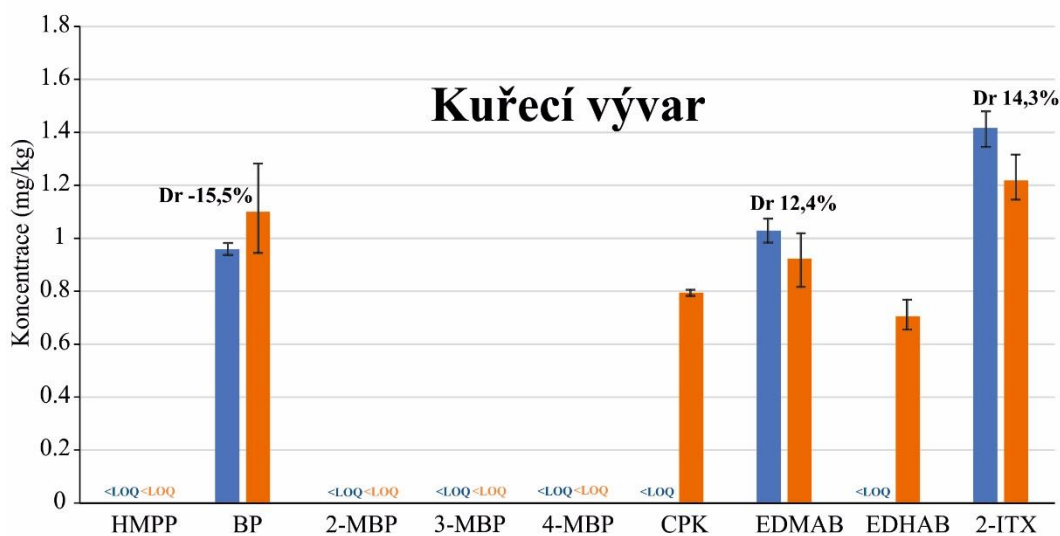
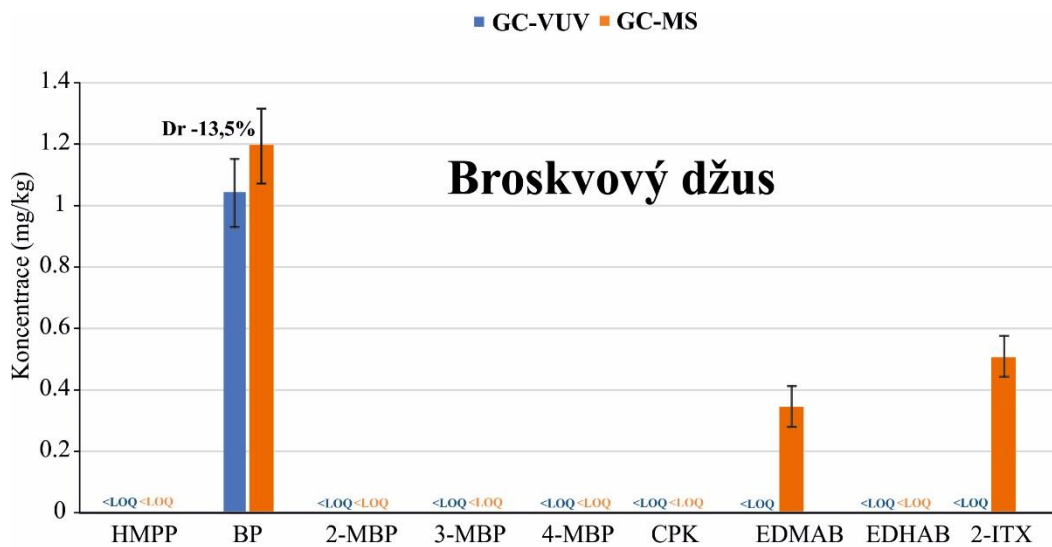
V každém analyzovaném vzorku byl oběma metodami detekován nejméně jeden fotoiniciátor. Obrázek 18 srovnává naměřené koncentrace fotoiniciátorů v obalu od sýru, ricotty, jogurtu a smetany, detailně jsou získané výsledky porovnány v Příloze č.1, Tabulka PI. Pomocí GC-VUV i GC-MS byl ve všech obalech identifikován BP, jeho koncentrace se pohybovala v rozmezí 0,32–1,57 mg/kg (GC-VUV) a 0,31–1,52 mg/kg (GC-MS). Druhým nejčastěji detekovaným fotoiniciátorem byl HMPP. Vzhledem k získaným výsledkům lze konstatovat, že se tento fotoiniciátor používá hlavně na potisk plastových materiálů, protože byl nalezen pouze v plastových obalech od sýru, jogurtu a ricotty. V obalu od sýru jeho množství přesahovalo dokonce 4 mg/kg. V obalu od smetany vyrobeného z papíru nalezen nebyl. Ostatní nalezené fotoiniciátory (CPK, EDMAB, EDHAB, 2-ITX) byly přítomny ve velmi nízkých koncentracích, a tak byly stanoveny pouze pomocí GC-MS metody. Jak je vidět z Obrázku 18, GC-VUV i GC-MS poskytovaly srovnatelné výsledky s  $Dr$  v rozmezí od -16,7 do 17,7 %. Variabilita průměrných výsledků získaných ze 3 analýz stejného vzorku je zobrazena pomocí chybových úseček, které vyjadřují směrodatnou odchylku 0,01–0,1 mg/kg (relativní směrodatná odchylka (RSD) nebyla větší než 5 %).



**Obrázek 18** Srovnání naměřených koncentrací fotoiniciátorů (mg/kg) pomocí GC-VUV (modrá) a GC-MS (oranžová) ve vzorcích obalů od sýru, ricotty, jogurtu a smetany, rozdíl mezi výsledky GC-VUV a GC-MS analýzy totožného vzorku je vyjádřen pomocí Dr ( $Dr = (y - x) / ((x + y) / 2)$ ) kde x je naměřená hodnota pomocí GC-VUV a y je naměřená hodnota pomocí GC-MS)

Na Obrázku 19 jsou porovnávána množství nalezených fotoiniciátorů ve zbývajících obalech (od broskvového džusu, kuřecího vývaru a kokosové vody). Každý z nich byl zakoupen po třech kusech, z každého se následně připravil individuální vzorek za účelem stanovení variability přítomných fotoiniciátorů v daném obalu. Poté byly všechny vzorky analyzovány opět třikrát oběma metodami stejně jako předchozí obaly. Všechny naměřené koncentrace fotoiniciátorů v těchto obalech jsou detailně shrnuty v Příloze č.1 (Tabulka PII). I v těchto obalech byl nejčastěji nalezen BP, v obalu od kokosové vody naměřená koncentrace dokonce přesáhla 4 mg/kg. Mezi dalšími fotoiniciátory byly dále identifikovány EDMAB a EHDAB, které jsou typickými fotoiniciátory používanými na potisk papírových obalů. Ve všech třech obalech byl také přítomen 2-ITX. Nejvíce fotoiniciátorů v porovnání se všemi analyzovanými obaly obsahoval obal od kokosové vody, kde byl nalezen nejvyšší obsah BP, EHDAB a 2-ITX (naměřené koncentrace překračovaly dokonce 7 mg/kg). Relativní rozdíl mezi výsledky z obou metod nebyl větší než 20 %, nicméně metodou GC-MS byl opět stanoven větší počet fotoiniciátorů, a to hlavně v obalu od broskvového džusu (EDMAB a 2-ITX). Směrodatná odchylka koncentrací získaných ze 3 analýz jednoho vzorku nebyla větší než 0,9 mg/kg (RSD menší než 12 %). Jak je vidět z obou Obrázků 18 a 19, zbývajících analyzované fotoiniciátory (2-MBP, 3-MBP a 4-MBP) nebyly metodou GC-VUV ani GC-MS prokázány v žádném z testovaných vzorků.

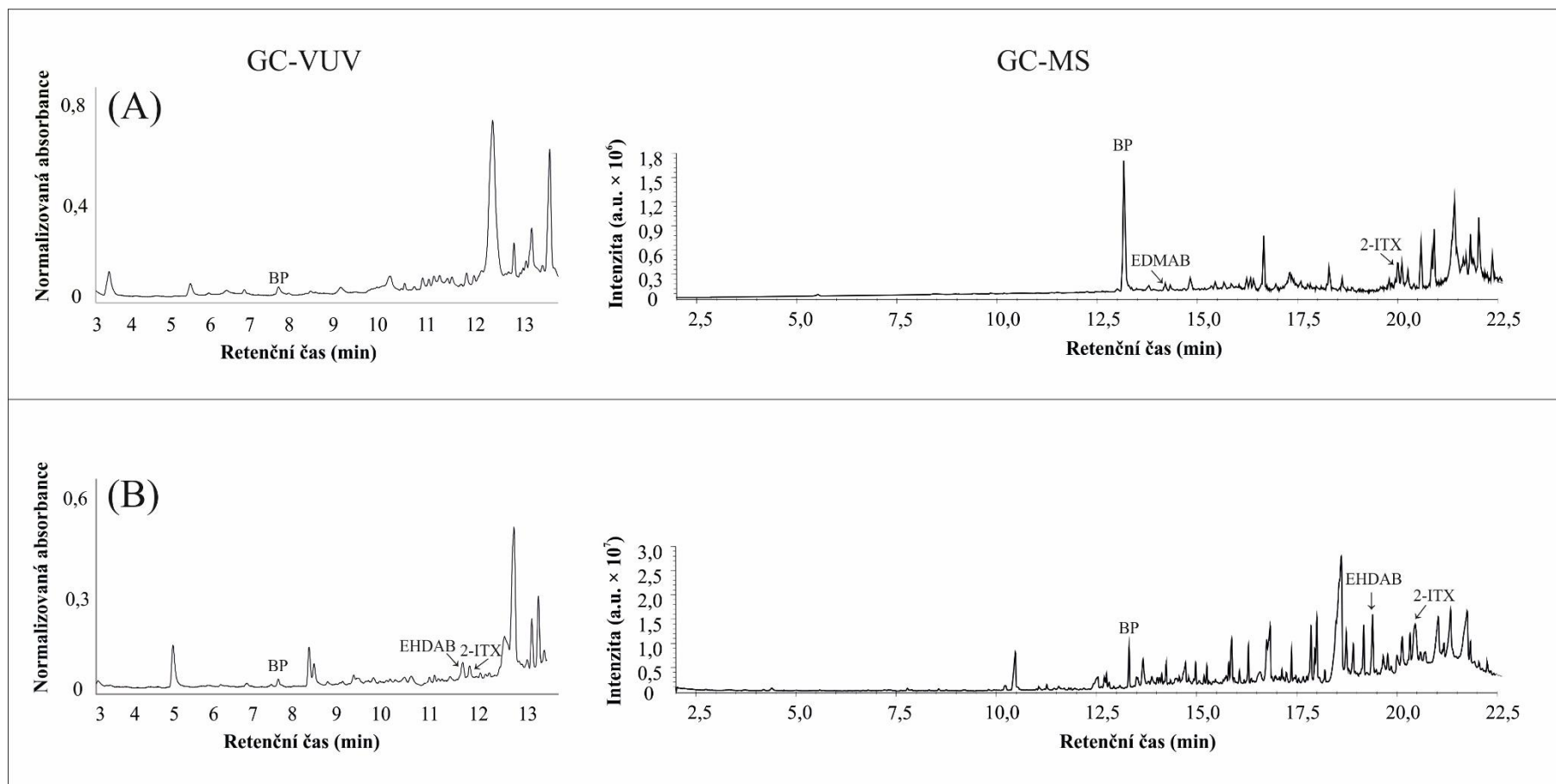
Jak bylo zmíněno výše, homogenita složení inkoustů byla studována pomocí GC-VUV i GC-MS analýzy individuálních vzorků připravených ze 3 separátních obalů od broskvového džusu, kokosové vody a kuřecího vývaru. Směrodatná odchylka se pohybovala v rozmezí 0,01–0,86 mg/kg (RSD menší než 18 %), což znamená, že obsah fotoiniciátorů v jednotlivých obalech stejného druhu byl srovnatelný a složení inkoustů pro potisk obalů bylo homogenní.



**Obrázek 19** Naměřené průměrné koncentrace fotoiniciátorů ve 3 vzorcích obalů od broskvového džusu, kuřecího vývaru a kokosové vody, každý vzorek byl pomocí GC-VUV (modrá) a GC-MS (oranžová) změřen třikrát, výpočet Dr byl totožný jako u Obr. 18

Z uvedených výsledků tedy vyplývá, že během analýz GC-VUV a GC-MS bylo dosaženo srovnatelných výsledků (relativní rozdíl mezi získanými hodnotami ze všech analýz byl v rozmezí od -15 do 20 %). Nicméně pomocí GC-MS byly v některých obalech navíc stanoveny další fotoiniciátory. V obalu od broskvového džusu byla potvrzena přítomnost BP, k tomu byl ještě nalezen EDMAB (0,34 mg/kg) a 2-ITX (0,50 mg/kg). Podobně v obalu od kuřecího vývaru byly navíc identifikovány CPK a EHDAB v koncentracích 0,80 mg/kg a 0,71 mg/kg. Díky nižším mezím detekce a stanovitelnosti bylo tedy možné pomocí GC-MS kvantifikovat více fotoiniciátorů, které byly přítomny v nižších koncentracích, než byly stanovené meze stanovitelnosti pro GC-VUV metodu. Spojení GC-MS je tedy vhodné na měření stopových koncentrací, nicméně analýza izomerních či koeluujících fotoiniciátorů je za použití této metody problematická. Na základě zmíněných vlastností obou detekčních technik by v budoucnu mohlo najít uplatnění hlavně unikátní spojení GC/VUV-MS, jehož aplikace by poskytovaly všechny výhody obou spojení.

. Následující obrázek (Obr.20) ukazuje chromatogramy dvou vybraných reálných vzorků pocházející z GC-VUV i GC-MS analýzy.



**Obrázek 20** Chromatogramy obalů od (A) broskvového džusu a (B) kokosové vody získané pomocí GC-VUV (vlevo) a GC-MS (vpravo)

Ve srovnání s doposud publikovanými studii zabývajícími se analýzou fotoiniciátorů v potravinových obalech [14, 15, 18, 23, 26] bylo ve zvolených obalových materiálech z papíru i plastu nalezeno více typů fotoiniciátorů. Nejčastěji detekovaným fotoiniciátorem byl BP a lze ho tedy považovat za běžně používaný fotoiniciátor na potisk potravinových obalů. Přítomnost ostatních fotoiniciátorů se pak odvíjela zejména od zvoleného materiálu (plast, papír). Koncentrace naměřené v této studii byly i mnohem vyšší než ty doposud publikované v různých studiích. Dokonce byl mnohonásobně překročen specifický migrační limit pro BP. Nicméně vzhledem k tomu, že je znám pouze specifický migrační limit této látky do potravin, nelze tyto koncentrace v obalových materiálech označovat za nebezpečné. Není známa přímá souvislost mezi obsahem fotoiniciátorů v obalech a jejich obsahem v potravinách, které uchovávají. Tyto výsledky tedy nepotvrzují škodlivé účinky potravin uchovávaných v obalech obsahujících fotoiniciátory na lidské zdraví. Avšak lze konstatovat, že vyšší koncentrace v obalech by mohly zvyšovat pravděpodobnost jejich migrace do uchovávaných potravin, a tak stanovení jejich množství v obalech by mohlo přispět ke studiu migrace a negativnímu vlivu fotoiniciátorů na lidské zdraví.



## 5. ZÁVĚR

Spojení GC-MS a HPLC-MS patří k nejčastěji používaným metodám sloužícím k analýze fotoiniciátorů v různých maticích. Cílem práce bylo tedy vyvinout a validovat inovativní metodu pro separaci fotoiniciátorů využívající spojení plynové chromatografie s VUV detektorem a její následnou aplikaci na analýzu reálných vzorků potravinových obalů. Další část pak byla zaměřena na porovnání GC-VUV s běžně používaným spojením GC-MS. GC-VUV metoda byla optimalizována v několika parametrech zahrnujících chromatografickou separaci, rozsah spektrálního filtru, teplota křemenné kapiláry a VUV průtokové cely a tlak pomocného plynu, čímž bylo dosaženo dostačujících mezí detekce. Součástí experimentální práce byla i tvorba databáze VUV spekter jednotlivých fotoiniciátorů, která byla využita pro identifikaci fotoiniciátorů v reálných vzorcích. Obdobně i metoda GC-MS byla optimalizována pomocí teplotně řízeného programu nebo MS parametrů. Obě vyvinuté metody pak byly validovány v rozsahu LOD, LOQ a linearity. Všechny parametry vyhovovaly zvoleným akceptačním kritériím, a tak mohly být tyto techniky aplikovány na analýzu 7 reálných vzorků. Vzhledem k vyšším detekčním limitům GC-VUV byla pro přípravu vzorků obalových materiálů zvolena prekoncentrační technika využívající dvoukrokové extrakce s acetonitrilem. Ve všech vzorcích byl detekován alespoň jeden fotoiniciátor, za nejběžněji používaný lze na základě získaných výsledků považovat benzofenon, což bylo potvrzeno i dalšími studii zaměřenými na studium fotoiniciátorů v potravinových obalech. Ve vybraných obalech byl ve srovnání s ostatními studii nalezen vyšší obsah fotoiniciátorů, mimoto byl i překročen specifický migrační limit právě pro benzofenon (v obalu od sýru, jogurtu, broskvového džusu, kuřecího vývaru a kokosové vody). Naopak v žádném obalu nebyla ani jednou z metod potvrzena přítomnost 2-, 3- a 4-methylbenzofenonu.

GC-VUV tedy představuje spolehlivou a selektivní metodu pro stanovení 9 fotoiniciátorů v obalových materiálech z papíru i plastu. Mezi její hlavní výhody patří jednoduchá a efektivní příprava vzorku, rychlá separace a zejména možnost rozlišení a identifikace izomerů a koelujících analytů. Na druhou stranu bylo zjištěno, že GC-MS poskytuje mnohem nižší meze detekce. Pro účely stopové analýzy je tak před vlastní aplikací GC-VUV nutné zařadit vhodnou prekoncentraci vzorků. Tento problém by v budoucnu mohlo vyřešit využití unikátního spojení GC/VUV-MS. VUV detektor není destruktivní, a tak ho lze spojit s MS detektorem, což by se mohlo uplatnit v analýze složitých směsí a zajistit tak správnou identifikaci všech složek, dokonce i složek

přítomných ve stopových koncentracích nebo izomerů. Závěrem lze říci, že GC-VUV je vhodnou alternativou k GC-MS, kterou lze úspěšně aplikovat na analýzu běžně používaných fotoiniciátorů vyskytujících se v obalech potravin.

## 6. LITERATURA

- [1] M. Syčová, Bezpečnosť papierových a kartónových obalov so zameraním na fotoiniciátory, stanovisko, Regionálny úrad verejného zdravotníctva so sídlom v Poprade, Poprad 2013.
- [2] J.W. Han, L. Ruiz-Garcia, J.P. Qian, X.T. Yang, Food Packaging: A Comprehensive Review and Future Trends, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 17 (2018) 860-877.
- [3] K. Marsh, B. Bugusu, Food packaging - Roles, materials, and environmental issues, *J. Food Sci.* 72 (2007) R39-R55.
- [4] J.L. Aparicio, M. Elizalde, Migration of Photoinitiators in Food Packaging: A Review, *Packag. Technol. Sci.* 28 (2015) 181-203.
- [5] C. Nerin, M. Aznar, D. Carrizo, Food contamination during food process, *Trends Food Sci. Technol.* 48 (2016) 63-68.
- [6] M. Van Bossuyt, E. Van Hoeck, T. Vanhaecke, V. Rogiers, B. Mertens, Printed paper and board food contact materials as a potential source of food contamination, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 81 (2016) 10-19.
- [7] N.S. Allen, Photoinitiators for UV and visible curing of coatings: Mechanisms and properties, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 100 (1996) 101-107.
- [8] M.A. Lago, A.R.B. de Quiros, R. Sendon, J. Bustos, M.T. Nieto, P. Paseiro, Photoinitiators: a food safety review, *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 32 (2015) 779-798.
- [9] K. Hejtmánková, Chromatografická analýza fotoiniciátorů v obalových materiálech jako možných kontaminantů potravin, diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2016.
- [10] [http://www.eupia.org/uploads/tx\\_edm/130219\\_corr3\\_EuPIA\\_Suitability\\_List\\_of\\_Photoinitiators\\_for\\_Low\\_migration\\_UV\\_Printing\\_Inks\\_and\\_Varnishes.pdf](http://www.eupia.org/uploads/tx_edm/130219_corr3_EuPIA_Suitability_List_of_Photoinitiators_for_Low_migration_UV_Printing_Inks_and_Varnishes.pdf), staženo 14.4. 2019.
- [11] O.W. Lau, S.K. Wong, Contamination in food from packaging material, *J. Chromatogr. A* 882 (2000) 255-270.
- [12] M.D. Pocas, T. Hogg, Exposure assessment of chemicals from packaging materials in foods: a review, *Trends Food Sci. Technol.* 18 (2007) 219-230.
- [13] Vyhláška č. 38/2001 Sb. Vyhláška Ministerstva zdravotnictví o hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami a pokrmy, únor 2001.

- [14] M.A. Lago, A.R.B. de Quiros, R. Sendon, J. Bustos, M.I. Santillana, P. Paseiro, Simultaneous chromatographic analysis of photoinitiators and amine synergists in food contact materials, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 4251-4259.
- [15] T. Rothenbacher, M. Baumann, D. Fugel, 2-Isopropylthioxanthone (2-ITX) in food and food packaging materials on the German market, *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 24 (2007) 438-444.
- [16] B. Li, Z.W. Wang, Q.B. Lin, C.Y. Hu, Q.Z. Su, Y.M. Wu, Determination of Polymer Additives-Antioxidants, Ultraviolet Stabilizers, Plasticizers and Photoinitiators in Plastic Food Package by Accelerated Solvent Extraction Coupled with High-Performance Liquid Chromatography, *J. Chromatogr. Sci.* 53 (2015) 1026-1035.
- [17] H. Gallart-Ayala, O. Nunez, E. Moyano, M.T. Galceran, Analysis of UV ink photoinitiators in packaged food by fast liquid chromatography at sub-ambient temperature coupled to tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 459-466.
- [18] A. Sanches-Silva, S. Pastorelli, J.M. Cruz, C. Simoneau, P. Paseiro-Losada, Development of a multimethod for the determination of photoinitiators in beverage packaging, *J. Food Sci.* 73 (2008) C92-C99.
- [19] A. Sanches-Silva, S. Pastorelli, J.M. Cruz, C. Sinioneau, I. Castanheira, P. Paseiro-Losada, Development of a method to study the migration of six photoinitiators into powdered milk, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 2722-2726.
- [20] D.X. Shen, H.Z. Lian, T. Ding, J.Z. Xu, C.Y. Shen, Determination of low-level ink photoinitiator residues in packaged milk by solid-phase extraction and LC-ESI/MS/MS using triple-quadrupole mass analyzer, *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 2359-2370.
- [21] P.Y. Liu, C.X. Zhao, Y.J. Zhang, Y.J. Chen, Simultaneous Determination of 10 Photoinitiators in Milk by Solid-Phase Microextraction Coupled with Gas Chromatography/Mass Spectrometry, *J. Food Sci.* 81 (2016) T1336-T1341.
- [22] N. Negreira, I. Rodriguez, E. Rubi, R. Cela, Solid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for the determination of ink photo-initiators in packed milk, *Talanta* 82 (2010) 296-303.
- [23] H.M. Cai, G.Z. Shang, J.Z. Zhang, G.S. Tao, G.J. Chen, X.C. Wan, Determination of 10 photo-initiator residues in food plastic packaging by gel permeation chromatography extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Methods* 7 (2015) 9026-9031.
- [24] G. Allegrone, I. Tamaro, S. Spinardi, G. Grosa, Development and validation of a solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry method for the

determination of isopropyl-9H-thioxanthen-9-one in carton packaged milk, *J. Chromatogr. A* 1214 (2008) 128-133.

[25] E. Van Hoeck, T. De Schaetzen, C. Pacquet, F. Bolle, L. Boxus, J. Van Loco, Analysis of benzophenone and 4-methylbenzophenone in breakfast cereals using ultrasonic extraction in combination with gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MSn), *Anal. Chim. Acta* 663 (2010) 55-59.

[26] G. Sagratini, G. Caprioli, G. Cristalli, D. Giardina, M. Ricciutelli, R. Volpini, Y.T. Zuo, S. Vittori, Determination of ink photoinitiators in packaged beverages by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1194 (2008) 213-220.

[27] K. Bentayeb, L.K. Ackerman, T. Lord, T.H. Begley, Non-visible print set-off of photoinitiators in food packaging: detection by ambient ionisation mass spectrometry, *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 30 (2013) 750-759.

[28] I.C. Santos, K.A. Schug, Recent advances and applications of gas chromatography vacuum ultraviolet spectroscopy, *J. Sep. Sci.* 40 (2017) 138-151.

[29] K.A. Schug, I. Sawicki, D.D. Carlton, H. Fan, H.M. McNair, J.P. Nimmo, P. Kroll, J. Smuts, P. Walsh, D. Harrison, Vacuum Ultraviolet Detector for Gas Chromatography, *Anal. Chem.* 86 (2014) 8329-8335.

[30] I.C. Santos, J. Smuts, W.S. Choi, Y. Kim, S.B. Kim, K.A. Schug, Analysis of bacterial FAMES using gas chromatography - vacuum ultraviolet spectroscopy for the identification and discrimination of bacteria, *Talanta* 182 (2018) 536-543.

[31] C.L. Qiu, J. Cochran, J. Smuts, P. Walsh, K.A. Schug, Gas chromatography-vacuum ultraviolet detection for classification and speciation of polychlorinated biphenyls in industrial mixtures, *J. Chromatogr., A* 1490 (2017) 191-200.

[32] J. Schenk, J.X. Mao, J. Smuts, P. Walsh, P. Kroll, K.A. Schug, Analysis and deconvolution of dimethylnaphthalene isomers using gas chromatography vacuum ultraviolet spectroscopy and theoretical computations, *Anal. Chim. Acta* 945 (2016) 1-8.

[33] H. Fan, J. Smuts, L. Bai, P. Walsh, D.W. Armstrong, K.A. Schug, Gas chromatography-vacuum ultraviolet spectroscopy for analysis of fatty acid methyl esters, *Food Chem.* 194 (2016) 265-271.

[34] L. Bai, J. Smuts, J. Schenk, J. Cochran, K.A. Schug, Comparison of GC-VUV, GC-FID, and comprehensive two-dimensional GC-MS for the characterization of weathered and unweathered diesel fuels, *Fuel* 214 (2018) 521-527.

- [35] L. Bai, J. Smuts, P. Walsh, H. Fan, Z. Hildenbrand, D. Wong, D. Wetz, K.A. Schug, Permanent gas analysis using gas chromatography with vacuum ultraviolet detection, *J. Chromatogr. A* 1388 (2015) 244-250.
- [36] H. Fan, J. Smuts, P. Walsh, D. Harrison, K.A. Schug, Gas chromatography-vacuum ultraviolet spectroscopy for multiclass pesticide identification, *J. Chromatogr. A* 1389 (2015) 120-127.
- [37] J. Schenk, G. Nagy, N.L.B. Pohl, A. Leghissa, J. Smuts, K.A. Schug, Identification and deconvolution of carbohydrates with gas chromatography-vacuum ultraviolet spectroscopy, *J. Chromatogr. A* 1513 (2017) 210-221.
- [38] I.C. Santos, J. Smuts, K.A. Schug, Rapid Profiling and Authentication of Vanilla Extracts Using Gas Chromatography-Vacuum Ultraviolet Spectroscopy, *Food Anal. Methods* 10 (2017) 4068-4078.
- [39] K.A. Schug, I. Sawicki, D.D. Carlton, H. Fan, H.M. McNair, J.P. Nimmo, P. Kroll, J. Smuts, P. Walsh, D. Harrison, Vacuum Ultraviolet Detector for Gas Chromatography, *Anal. Chem.* 86 (2014) 8329-8335.
- [40] M.F. Wahab, D.C. Patel, D.W. Armstrong, Peak Shapes and Their Measurements: The Need and the Concept Behind Total Peak Shape Analysis, *LC GC Eur.* 30 (2017) 670-678.
- [41] J.W. Dolan, Peak tailing and resolution, *LC GC Eur.* 15 (2002) 334-337.

## 7. PŘÍLOHY

**Příloha č.1** Naměřené koncentrace fotoiniciátorů v reálných vzorcích obalů a detailní porovnání výsledků z GC-VUV a GC-MS analýzy

**Příloha č.2** Reprint článku publikovaného v časopisu Journal of Separation Science

## **Příloha č.1**



**Tabulka PI** Srovnání naměřených koncentrací fotoiniciátorů (mg/kg) v obalech (výsledky pro obal od sýru, ricotty a jogurtu uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka, pro obal od broskvového džusu, kuřecího vývaru a kokosové vody vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka z měření 3 vzorků připravených ze 3 obalů, všechny vzorky byly měřeny ve 3 opakováních)

Obal	HMPP			BP			CPK			EDMAB			EDHAB			ITX		
	GC-VUV	GC-MS	Dr (%)	GC-VUV	GC-MS	Dr (%)	GC-VUV	GC-MS	Dr (%)	GC-VUV	GC-MS	Dr (%)	GC-VUV	GC-MS	Dr (%)	GC-VUV	GC-MS	Dr (%)
Sýr	4,51 ± 0,10	3,90 ± 0,10	14,51	1,57 ± 0,02	1,52 ± 0,05	3,23	n.d. <sup>a</sup>	n.d.	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	0,58 ± 0,02	-
Ricotta	1,05 ± 0,02	1,11 ± 0,030	-5,55	0,32 ± 0,01	0,31 ± 0,01	3,17	n.d.	0,80 ± 0,02	-	n.d.	0,04 ± 0,001	-	n.d.	0,27 ± 0,01	-	0,77 ± 0,04	0,91 ± 0,03	-16,66
Jogurt	1,66 ± 0,05	1,39 ± 0,04	17,71	0,91 ± 0,03	0,83 ± 0,01	9,19	n.d.	n.d.	-	n.d.	0,50 ± 0,01	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	0,15 ± 0,005	-
Smetana	n.d.	n.d.	-	0,52 ± 0,02	0,46 ± 0,02	12,24	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	0,08 ± 0,003	-	n.d.	0,08 ± 0,004	-
Broskvový džus	n.d.	n.d.	-	1,04 ± 0,10 <sup>b</sup>	1,19 ± 0,11 <sup>b</sup>	-13,45	n.d.	n.d.	-	n.d.	0,34 ± 0,06 <sup>b</sup>	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	0,50 ± 0,06 <sup>b</sup>	-
Kuřecí vývar	n.d.	n.d.	-	0,96 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,11 ± 0,15 <sup>b</sup>	-14,49	n.d.	0,80 ± 0,01 <sup>b</sup>	-	1,03 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,90 ± 0,09 <sup>b</sup>	12,37	n.d.	0,71 ± 0,05 <sup>b</sup>	-	1,42 ± 0,06 <sup>b</sup>	1,23 ± 0,09 <sup>b</sup>	14,34
Kokosová voda	n.d.	n.d.	-	4,23 ± 0,14 <sup>b</sup>	3,91 ± 0,12 <sup>b</sup>	7,86	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	-	7,31 ± 0,53 <sup>b</sup>	7,07 ± 0,28 <sup>b</sup>	3,34	7,28 ± 0,86 <sup>b</sup>	7,71 ± 0,33 <sup>b</sup>	-5,76

<sup>a</sup>n.d. – nedetekováno

**Tabulka PII** Detailní srovnání koncentrací (mg/kg) naměřených ve 3 individuálních obalech od broskvového džusu, kuřecího vývaru a kokosové vody, výsledky jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka, všechny vzorky byly měřeny ve 3 opakováních

Obal		BP			CPK			EDMAB			EDHAB			ITX		
		GC-VUV	GC-MS	Dr (%)	GC-VUV	GC-MS	Dr (%)	GC-VUV	GC-MS	Dr (%)	GC-VUV	GC-MS	Dr (%)	GC-VUV	GC-MS	Dr (%)
Broskvový džus	1	0,94 ± 0,11	0,98 ± 0,15	-4,17	n.d. <sup>a</sup>	n.d.	-	n.d.	0,31 ± 0,08	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	0,50 ± 0,06	-
	2	1,04 ± 0,16	1,25 ± 0,15	-18,34	n.d.	n.d.	-	n.d.	0,42 ± 0,05	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	0,55 ± 0,05	-
	3	1,14 ± 0,20	1,35 ± 0,11	-16,87	n.d.	n.d.	-	n.d.	0,30 ± 0,04	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	0,45 ± 0,06	-
Kuřecí vývar	1	0,92 ± 0,02	0,98 ± 0,05	-6,32	n.d.	0,80 ± 0,01	-	1,10 ± 0,02	0,91 ± 0,08	18,91	n.d.	0,71 ± 0,02	-	1,48 ± 0,16	1,32 ± 0,15	11,43
	2	1,00 ± 0,05	1,21 ± 0,15	-19,00	n.d.	0,80 ± 0,04	-	1,00 ± 0,03	0,91 ± 0,05	9,42	n.d.	0,75 ± 0,04	-	1,42 ± 0,12	1,14 ± 0,09	18,46
	3	0,95 ± 0,04	1,16 ± 0,09	-19,91	n.d.	0,81 ± 0,03	-	1,10 ± 0,04	0,91 ± 0,04	18,91	n.d.	0,68 ± 0,02	-	1,37 ± 0,10	1,23 ± 0,14	10,77
Kokosová voda	1	4,31 ± 0,21	4,00 ± 0,16	4,91	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	-	7,81 ± 0,51	7,06 ± 0,59	-6,75	8,11 ± 0,55	7,91 ± 0,59	1,66
	2	4,12 ± 0,18	3,94 ± 0,12	2,96	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	-	7,12 ± 0,45	7,11 ± 0,38	0,09	6,80 ± 0,48	7,22 ± 0,47	-4,03
	3	4,25 ± 0,15	3,80 ± 0,11	7,32	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	-	7,00 ± 0,34	7,03 ± 0,38	0,28	6,95 ± 0,42	8,00 ± 0,62	-9,59

<sup>a</sup>n.d. – nedetekováno