

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

**Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie**

Iontová mobilita a hmotnostní spektrometrie v analýze barviv

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Štěpán Dostál
Studijní obor:	Analytická chemie
Vedoucí práce:	prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D.
Konzultant práce:	Mgr. Lucie Borovcová, Ph.D.

Olomouc 2020

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Bc. Štěpán Dostál

Název práce: Iontová mobilita a hmotnostní spektrometrie v analýze barviv

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra analytické chemie

Vedoucí práce: prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Lucie Borovcová, Ph.D.

Rok odevzdání práce: 2020

Anotace: Přidávání barviv do potravin může mít negativní vliv na zdraví konzumentů, a proto je sledováno státními orgány. Nepostradatelným nástrojem při kontrole barviv v potravinách jsou metody analytické chemie. Ta využívá zavedených technik a schválených postupů. Méně běžnou, ale ne méně zajímavou technikou, je iontová mobilita ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Tato práce se zaměřuje na její využití při analýze barviv. Na teoretickou část pojednávající o zmíněné problematice navázaly experimenty analýzy standardů barviv, reálných vzorků a srovnání získaných dat mezi přístroji Waters SYNAPT G2-S a Waters SELECT SERIES Cyclic IMS. Toto porovnání má obecnější význam. Prokázána byla dobrá přenositelnost hodnot CCS mezi přístroji s různým designem mobilitní cely, což je významné pro identifikaci látek.

Klíčová slova: hmotnostní spektrometrie, iontová mobilita, barviva, srážkový průřez

Počet stran: 76

Počet příloh: 1

Jazyk: Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Bc. Štěpán Dostál

Title: Ion mobility and mass spectrometry in analysis of dyes

Type of thesis: Master's

Department: Department of Analytical Chemistry

Supervisor: prof. RNDr. Karel Lemr Ph.D.

Consultant: Mgr. Lucie Borovcová Ph.D.

The year of submission: 2020

Annotation: Added colorants in food products may negatively affect consumer's health and is therefore controlled by state authorities. Indispensable tool in a food additives control are methods of analytical chemistry, which uses conventional techniques and approved approaches. Less utilized, but still interesting technique is ion mobility coupled with mass spectrometry. This work aims at its potential in analyses of dyes. After the theoretical part describing the mentioned topic, analyses of dye standards and real samples were done. The procedure was executed on two mass spectrometers Waters SYNAPT G2-S and Waters SELECT SERIES Cyclic IMS in order to obtain data for comparison of these instruments. Good transmission of CCS values has been proved for instruments with different mobility cell design. That is important for identification of substances.

Keywords: mass spectrometry, ion mobility, dye, collision cross section

Number of pages: 76

Number of appendices: 1

Language: Czech

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani 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

.....

Podpis

Děkuji svému vedoucímu diplomové práce prof. RNDr. Karlovi Lemrovi, Ph.D. za jeho vstřícnost, cenné rady a čas, který věnoval mé práci. Dále děkuji Mgr. Lucii Borovcové, Ph.D. za konzultace a kladný přístup při zpracovávání experimentální části. Děkuji M.Sc. Marianně Nytko za obětavý přístup a pomoc při provádění experimentů. Poděkování patří rovněž mé rodině za trpělivost a podporu po celou dobu studia.

Za finanční podporu mé výzkumné práce děkuji Univerzitě Palackého (projekty IGA_PrF_2019_028 a IGA_PrF_2020_030).

OBSAH

1	SEZNAM ZKRATEK	1
2	ÚVOD.....	3
3	TEORETICKÁ ČÁST	4
3.1	Barviva a barevnost.....	4
3.2	Barviva v potravinářství.....	6
3.3	Syntetická barviva	7
3.4	Barviva v umění	12
3.5	Analýza barviv v potravinářství	14
3.6	Iontová mobilitní spektrometrie.....	17
3.7	Provedení iontové mobilitní spektrometrie.....	19
3.8	Použití iontové mobilitní spektrometrie.....	24
3.9	Srážkový průřez	27
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
4.1	Přístroje a chemikálie	29
4.2	Pracovní postup	33
4.2.1	Příprava zásobních roztoků barviv	33
4.2.2	Příprava kalibrantů	33
4.2.3	Příprava reálných vzorků.....	33
4.2.4	Průběh měření.....	33
4.2.5	Zpracování dat v programu DriftScope.....	34
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	36
5.1	Analýza standardů barviv.....	36
5.2	Iontová mobilita	44
5.3	Analýza reálného vzorku.....	52
6	ZÁVĚR.....	58
7	LITERATURA	60

8	PŘÍLOHY	68
8.1	Hmotnostní spektra standardů barviv v negativním módu	68

1 SEZNAM ZKRATEK

ACN – acetonitrile, acetonitril

ADI – acceptable daily intake, akceptovatelný denní příjem

CCS - collision cross section, účinný srážkový průřez

CD – corona discharge, korónový výboj

DMA - differential mobility analyzer, diferenční mobilní analyzátor

DTIMS – drift tube ion mobility spectrometry, iontová mobilní spektrometrie s využitím driftové trubice

EFSA – European Food Safety Authority, Evropský úřad pro bezpečnost potravin

ESI - electrospray ionization, ionizace elektrosprejem

FAIMS – high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry, iontová mobilní spektrometrie s vysokonapěťovou asymetrickou vlnou

FDA – Food and Drug Administration, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv

GC-MS - gas chromatography-mass spectrometry, spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie

HPLC - high performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IMS – ion mobility spectrometry, iontová mobilní spektrometrie

IM-MS – ion mobility-mass spectrometry, hmotnostní spektrometrie s iontovou mobilitou

IP-HPLC – ion pair high performance liquid chromatography, ion párová vysokoúčinná kapalinová chromatografie

LLE – liquid-liquid extraction, extrakce kapalina-kapalina

MALDI-TOF – matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight, desorpce/ionizace laserem za účasti matrice s analyzátozem doby letu

NOAEL – no observed adverse effect level, dávka, při které ještě nebyl pozorován škodlivý účinek

PTFE – polytetrafluorethylene, polytetrafluorethylen

RASFF – Rapid Alert System for Food and Feed, Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva

SEM-EDX - scanning electron microscopy with energy dispersive X-Ray detector, skenovací elektronový mikroskop s energiově disperzním detektorem rentgenového záření

SIMS-TOF - secondary ion mass spectrometry- time of flight, hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů s analyzátozem doby letu

SPE – solid phase extraction, extrakce na pevné fázi

TLC – thin layer chromatography, chromatografie na tenké vrstvě

TIMS - trapped ion mobility spectrometry, iontová mobilitní spektrometrie se záchytem iontů

TWIMS - travelling ion mobility spectrometry, iontová mobilitní spektrometrie s využitím putující vlny

UV – ultraviolet, ultrafialové

VIS – visible, viditelné

2 ÚVOD

Barva je základní vlastností lidského vnímání a je všude kolem nás. Často nás ovlivňuje, aniž bychom si to uvědomili. Červenější maso považujeme podvědomě za čerstvější, oranžovější džus za zdravější. Tohoto se využívá v potravinářském průmyslu, kdy výrobci přidávají barviva do svých produktů, aby buď maskovali horší estetický vjem nebo vyvolali představu o čerstvosti. V konečném důsledku to vede k vyšším prodejům. Uměle přidané látky, tzv. aditiva, v potravinách však mohou mít negativní vliv na zdravotní stav spotřebitelů. Z tohoto důvodu je jejich používání regulováno a kontrolováno příslušnými státními autoritami. Důležitou roli hraje v kontrole aditiv v potravinových výrobcích analytická chemie. K nejpoužívanějším technikám patří kapalinová chromatografie či hmotnostní spektrometrie. Iontová mobilita je separační technika, která je však v analýze barviv velmi málo používaná. Její hlavní výhodou je poskytnutí nové charakteristiky látek, tzv. srážkový průřez. Ten může sloužit jako komplementární údaj například k hmotnostním spektrům a sloužit k průkaznější identifikaci analytu. V této práci byla použita iontová mobilita s putující vlnou s hmotnostní spektrometrií pro analýzu potravinářských barviv. Měření byly nejprve příslušné standardy za účelem zjištění srážkových průřezů látek. Následně získané hodnoty byly využity při analýze reálného vzorku, bonbónů Skittles. Celý postup byl proveden na hmotnostních spektrometrech Waters SYNAPT G2-S a Waters SELECT SERIES Cyclic IMS. V této souvislosti bylo cílem porovnat oba přístroje z hlediska preciznosti měření driftových časů a přenositelnosti hodnot CCS mezi nimi, což je důležité pro využívání CCS při identifikaci látek

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Barviva a barevnost

Společným jmenovatelem světla, předmětu a lidského vnímání je barva. Rozlišujeme tři základní barvy – modrá, červená, zelená. To je dáno přítomností tří druhů receptoru v sítnici lidského oka. Jejich kombinací vzniká základní paleta dvanácti barev[1].

Z hlediska psychologie mají jednotlivé barvy různé významy. Červená například značí emoce, lásku, aktivitu, sílu. Modré odpovídá vyrovnanost, klid, uvolnění. Zelená evokuje bohatost a regeneraci[2]. Těchto vlastností se využívá i v marketingu. Barvou lze upoutat pozornost zákazníka a ovlivnit jeho rozhodnutí. Role barvy je důležitá nejen u samotného produktu, ale i u značky prodejce. Vhodně zvoleným logem může firma dosáhnout silné pozice na trhu[3]. Produkty s lákavým vzhledem pak zapůsobí na smysly spotřebitele. Například u potravin je jejich barva jedním z nejdůležitějších atributů. Je obecně spojena s kvalitou a podle některých studií může ovlivňovat i chuť. Rocío Fernández-Vázquez s kolektivem zkoumal vliv barvy na sensorické vnímání pomerančového džusu. Jako kontrolní vzorek posloužil běžný pomerančový džus. Barevné vzorky byly připraveny obarvením kontrolního džusu červeným a zeleným potravinářským barvivem, které neovlivňovalo chuť. Třicet dobrovolníků bylo testováno za účelem sledování souvislostí mezi barvou a sladkostí, kyselostí a intenzitou chutě. Výsledky testů ukázaly, že změna barvy neovlivnila u respondentů vnímání sladkosti a intenzity chutě džusu, ale zelená barva znatelně zvýšila vnímání kyselosti[4].

S barevností souvisí několik základních pojmů. Za barviva označujeme organické látky, které jsou běžně rozpustné ve vodě. Pigmenty značí látky, které jsou nerozpustné ve vodě a dalších rozpouštědlech, například olejích. K použití pigmentů je třeba jejich smíchání s pojivou, což jsou látky, které zadrží částice pigmentu na naneseném povrchu (oleje, pryskyřice aj.) [5].

Případy přidávání barviv do potravin se datují již kolem roku 1500 př.n.l., kdy ve starém Egyptě vylepšovali vzhled vína a cukrovinek. Od té doby se začala používat barviva získaná z přírodních zdrojů, kupříkladu petržele, špenátu, papriky. Jako barviva se také používaly sloučeniny kovů. Některé však byly toxické, jako třeba suřík Pb_3O_4 a rumělka HgS , a jejich požití způsobovalo otravy a úmrtí[6]. V roce 1856 Sir William Henry Perkin připravil náhodou syntetické barvivo mauvein, když se snažil o syntézu chininu jako léku na malárii[7]. To odstartovalo „barevnou revoluci“, kdy se začala hojně syntetizovat nová barviva pro průmyslové použití. Umělá barviva si našla své místo i v potravinářství

především kvůli jednodušší výrobě, nižším nákladům, vyšší stabilitě a lepším barevným vlastnostem oproti jejich přírodním protějškům[8].

Barevný vjem je velmi důležitý ve výtvarném umění. Lze pozorovat, že každé historické období mělo svou vlastní technologii přípravy a použití barviv, což platí dosud. Za jeden z nejrannějších příkladů výtvarného umění se považují nástěnné malby ve Španělsku a Francii. Jejich stáří se odhaduje na více než 30 tisíc let. Používaly se např. saze ze spáleného zvířecího tuku[9].

Ve starém Egyptě se rozšířilo používání barviv kolem roku 4000 př.n.l. Kolem roku 3000 př.n.l. byla poprvé připravená známá Egyptská modř. Jedná se o velmi stabilní pigment složený z podvojného křemičitanu vápenato-měďnatého $\text{CaCuSi}_4\text{O}_{10}$. Mezi další používané pigmenty patřil například zelený malachit či modrozelený azurit. Oba jsou chemicky podobné, jelikož obsahují uhličitan měďnatý CuCO_3 , a vyskytují se v přírodě jako minerály[9, 10].

V Číně se kolem roku 2000 př.n.l. objevuje nový červený pigment vermilion, který vzniká drcením, promytím a zahřátím cinabaritu HgS . Řekové připravili olovnatou bělobu, která patřila k nejpoužívanějším bílým pigmentům do konce 19. století a dodnes patří k nejbělejší bílobám. Chemickým složením se jedná o zásaditý uhličitan olovnatý $2\text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$. Dámy v Řecku a Římě si jej z kosmetických důvodů nanášely na obličej, což mělo kvůli toxickému olovu negativní dopad na jejich zdraví. Olovnatá běloba se vyráběla vložením olovených pásků do sklenice s octem, která se následně zaházela hnojem, kvůli urychlení procesu teplem. Tento technologický postup se používal až do 60. let 20. století[9].

Pro období renesance bylo charakteristické využívání sytých, jasných barev. Ačkoli se hnědá barva používala velmi zřídka, v 15. století vzniká nový hnědý pigment zvaný umbra. Jedná se o hydratované oxidy železa a manganu. Jako alternativa k jedovaté olovnaté bělobě se nejčastěji používá běloba z kostí. Zahřátím olovnaté běloby vzniká jasně červená barva zvaná minium. Zástupcem používaných rostlinných barviv je například červené barvivo získané z mořeny barvířské, která obsahuje alizarin. Jako zdroje modré se například používal lazurit[9].

Za první moderní pigment se považuje Pruská modř, kterou připravil Johann Jacob Diesbach v roce 1704. Nová barviva se syntetizují dodnes. Současní umělci používají směsi moderních umělých pigmentů a přírodních organických i anorganických barviv či pigmentů[9].

Analyzování složení barviv z uměleckých děl je důležité například pro odhalení falzifikátu, avšak z důvodů rozsáhlé skupiny barviv je náročné.

3.2 Barviva v potravinářství

Dle definice Food and Drug Administration (FDA) jsou barviva všechny látky, které dodávají zbarvení jídlu, lékům či kosmetickým produktům. Mohou být syntetického původu nebo získané z přírodních zdrojů. Barvicí aditiva v potravinářství zvyšují přirozenou barevnost, dodávají barvu bezbarvým produktům nebo také podněcují chuťové vjemy[11]. Mimo barviva jsou mezi nejpoužívanější aditiva dále řazeny antioxidanty, emulgátory, stabilizátory, želírující a zpevňující látky, konzervanty a sladidla[12]. Za aditiva se nepovažují například extrakční rozpouštědla použitá při výrobě produktu, látky používané k úpravě vody pro lidskou spotřebu nebo látky používané v krycích nebo potahových materiálech, které nejsou určeny ke konzumaci s uvedenými potravinami [13].

V České republice mají na starost kontrolu celého potravinářského procesu od samotné výroby produktu po prodej dozorové orgány Ministerstva zemědělství (Státní veterinární zpráva, Státní zemědělská a potravinářská inspekce, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský a Ústav pro kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv) a Ministerstva zdravotnictví (orgány ochrany veřejného zdraví – Krajské hygienické stanice, Státní zdravotní ústav, Česká inspekce životního prostředí)[13,14].

Právním předpisem pro přidané látky v potravinářství je nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008, v platném znění. Nařízení Komise (EU) č. 231/2012, v platném znění, stanovuje specifikace pro potravinářské přídatné látky uvedené v přílohách II a III nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008. Nařízení (ES) č. 1333/2008 také uvádí základní podmínky, za kterých je možné zařadit přídatnou látku na seznam povolených aditiv v Evropské unii. V České republice bezpečnost potravin zajišťují zákony 110/1997 Sb., 166/1999 Sb., 258/2000 Sb. Při výrobě potravin lze použít jen přídatné látky, které byly schváleny k tomuto účelu výše uvedenými autoritami a jsou v souladu s právními předpisy. Pro jednotlivé potraviny a přídatné látky jsou stanovena maximální povolená množství. U některých látek není stanovena přesná číselná hodnota a jejich použití se pak řídí zásadou *quantum satis*, tedy nezbytně nutné množství, které je potřebné k dosažení požadovaného efektu a neklame zákazníka. V Evropské unii má každá přídatná látka své E číslo. Aditiva se musejí vždy uvádět ve složení potraviny. Etikety musejí

obsahovat jak funkci aditiva v produktu, tak i odpovídající E číslo nebo svůj název[11,12,15].

Evropská autorita EFSA (European Food Safety Authority) má v kompetenci bezpečnost aditiv. Jejich komerčnímu použití předchází série nezávislých testů. Nejprve jsou posouzena všechna toxikologická data. Požadovaná toxikologická data obsahují například informace o metabolismu, chronické toxicitě, karcinogenitě, genotoxicitě, potenciálním vlivu na reprodukci. Za použití vícegeneračních studií a studií zaměřených na spotřebu potravin v průběhu života je nastaven nejvyšší přípustný limit aditiva, který nemá toxický účinek – tzv. NOAEL (No Observed Adverse Effect Level). Jedná se o množství přídavné látky, která nebude mít nežádoucí vliv na zdraví testovacího jedince (nejčastěji krysy nebo králíka) v případě dlouhodobé expozice. Dalším parametrem je ADI (Acceptable Daily Intake) hodnota. Jedná se o přípustný denní příjem potravinářské přídavné látky (vyjádřené v mg na kg tělesné hmotnosti), které lze konzumovat denně bez vystavení se nežádoucím účinkům na zdraví. ADI hodnota se získá podělením NOAEL hodnoty bezpečnostním faktorem, obvykle číslem sto. Bezpečnostní faktor zahrnuje rozdíly mezi zvířaty a lidmi i rozdíly mezi lidmi jako například různý zdravotní stav, věk. ADI nepředstavuje toxickou dávku, ale hladinu bezpečného příjmu dané přídavné látky[16,17].

V roce 1979 byl v rámci Evropské unie zaveden tzv. RASFF, (Rapid Alert System for Food and Feed), systém rychlého varování pro potraviny a krmiva. Jeho účelem je ohlašování rizikových potravin a krmiv, které jsou následně staženy z evropského trhu nebo je u nich včas zamezeno uvedení do oběhu. Jedná se o výrobky na trhu Evropské unie nebo výrobky zadržené na hranicích při vstupu do Evropské unie. Za Českou republiku je v kontaktu s tímto systémem Státní zemědělská a potravinářská inspekce. Ročně pak vydává zprávu shrnující činnost systému RASFF na území České republiky[19]. Ze zprávy za rok 2018 vyplývá, že nejvíce se vyskytujícím nebezpečím ve výrobcích byla kontaminace patogenními a nepatogenními mikroorganismy, nejčastěji bakterie rodu *Salmonella* a *Listeria*[20].

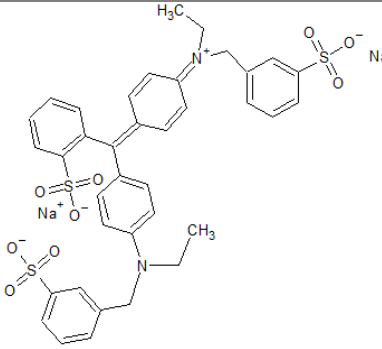
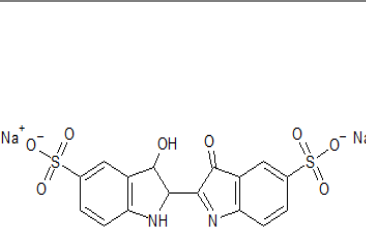
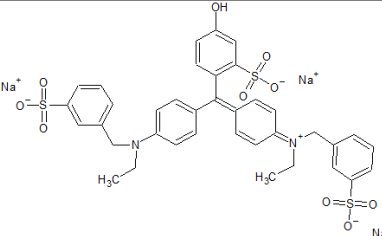
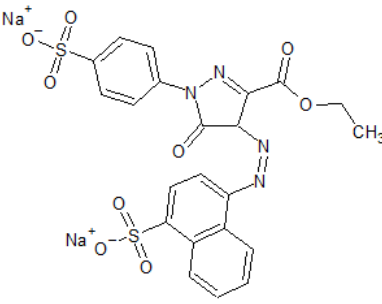
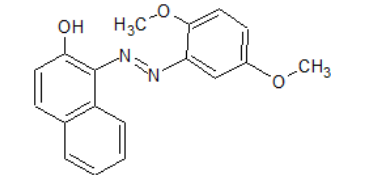
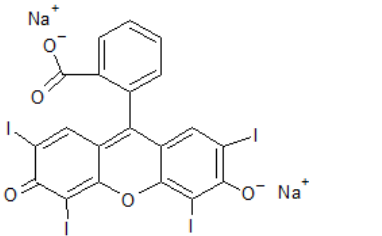
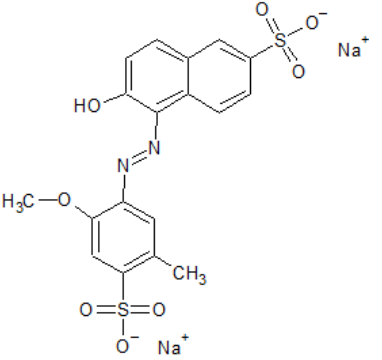
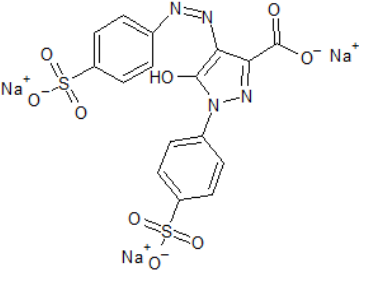
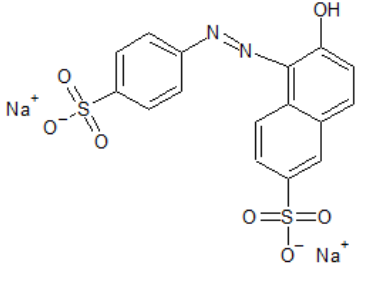
3.3 Syntetická barviva

Syntetická barviva jsou obvykle složité organické látky, které bývaly původně získávány z dehtu, ale v dnešní době se vyrábějí z ropy. V potravinářském průmyslu jsou syntetická barviva používaná z několika důvodů – jsou levnější, stabilnější a poskytují sytější barvy než většina jejich přírodních protějšků. Na druhou stranu však mají řadu

nežádoucích vlivů na zdraví. Za posledních sto let se objevila zdravotní rizika u více látek ze skupiny barviv než u jakékoli jiné skupiny aditiv. Syntetická barviva vykazují z hlediska chemického složení značnou strukturní rozdílnost. Mezi nejvíce používaná barviva patří azo deriváty, deriváty antrachinonu, indiga, trifenylmethylu, ftalokyaninu a látky obsahující síru[21].

Americká agentura FDA schvaluje k 1. 8. 2018 používání devíti syntetických barviv: FD&C Modř č. 1, FD&C Modř č. 2, FD&C Zeleň č. 3, oranž B, citrusová červeň č. 2, FD&C Červeň č. 3, FD&C Červeň č. 40, FD&C Žluť č. 5 a č. 6. Jejich struktury jsou uvedeny v tabulce 1.[22]

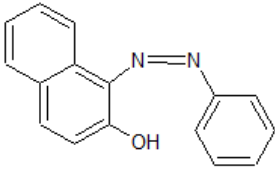
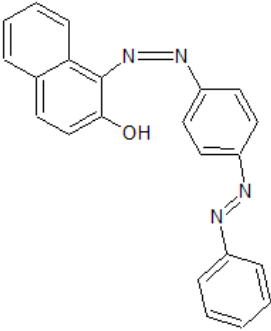
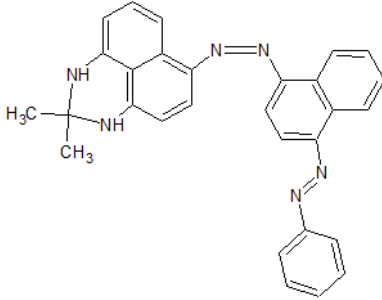
Tabulka I Struktury devíti syntetických barviv povolených v USA, čerpáno z cit.[22]

		
FD&C Modř č. 1	FD&C Modř č. 2	FD&C Zeleň č. 3
		
Oranž B	Citrusová červeň 2	FD&C Červeň 3
		
FD&C Červeň 40	FD&C Žluť 5	FD&C Žluť 6

FD&C Modř č. 1 se používá nejčastěji v cukrářských výrobcích, nápojích a nanucích. FD&C Modř č. 2 nalezneme v pečených výrobcích, zmrzlinách, cukrářských produktech a jogurtech. FD&C Zeleň č. 3 se vyskytuje například ve zmrzlinách, sorbetu či pečených výrobcích. Oranž B je povolena pouze v párcích. Citrusová červeň č. 2 je schválen pouze pro barvení slupek pomerančů. FD&C Červeň č. 3 se nejvíce používá v cukrářství ve zmrzlinových kornoutech, nanucích a nápojích. FD&C Červeň č. 40 se vyskytuje zejména v nápojích, želatinových produktech či pudincích. FD&C Žlut' č. 5 se vyskytuje v dresincích a omáčkách, nápojích, pečených výrobcích, jogurtech. FD&C Žlut' č. 6 se používá v pečených výrobcích, želatinových produktech, nápojích[11].

Mezi syntetická barviva, která jsou zakázána, patří například Červeň 2, E123, známý jako amaranth. Od roku 1976 jej FDA přidala na seznam nepovolených barviv jakožto potenciální karcinogen. V Evropské unii je jeho používání schváleno. Dalším příkladem zakázaných barviv jsou sudan 1, 2, 3 (Tab. II). Jedná se o azo a diazo sloučeniny, které se používaly pro barvení potravin, kosmetických přípravků či textilií. V současné době jsou zakázána, jelikož se v těle savců metabolizují na amino sloučeniny, které jsou potenciálními karcinogeny [23,24].

Tabulka II Struktury syntetických barviv Sudan 1, 2, 3, čerpáno z cit.[24]

		
Sudan 1	Sudan 2	Sudan 3

Ve Spojených státech amerických jsou povolena čtyři barviva, která jsou v Evropské unii zakázána. Jedná se o tři syntetická barviva oranž B, citrusová červeň č. 2, zeleň č. 3 a jedno přírodní, upravená bavlníková semena. Naproti tomu je v Evropské unii povoleno šestnáct barviv, která jsou v USA zakázána. Devět z nich jsou syntetického původu (chinolinová žlut', azorubín, amaranth, ponceau 4R, patentní modř, zeleň S, brilantní čern', hněd' HT, litholrubin) a sedm přírodního (lutein, uhlík z rostlinné suroviny, hliník, stříbro,

zlato, chlorofyl a chlorofylin patřící pod stejné E140, uhličitan vápenatý). Přehled všech povolených barviv v EU a USA je uveden v tabulce III[25].

Tabulka III Přehled povolených barviv s E čísly v Evropské unii a Spojených státech amerických, převzato z cit.[25], upraveno. České názvy sepsány z cit.[26]

EU		USA
E číslo	Název	Název
E 100	Kurkumin	Kurkuma Kurkuma oleoresin
E 101	Riboflaviny S (zahrnující riboflavin-5'-fosfát)	Riboflavin
E 102	Tartrazin	FD&C Žlut' č. 5 (Tartrazin)
E 104	Chinolinová žlut'	
E 110	Žlut' SY FCF/Oranžová žlut' S	FD&C Žlut' č. 6 (Žlut' SY FCF) Oranž B
E 120	Karmínová kyselina, karmíny	Košelinový extrakt, karmín
E 122	Azorubin	
E 123	Amaranth	
E 124	Ponceau 4R, Košelinová červeň A	
E 127	Erythrosin	FD&C Červeň č. 3 (Erythrosin)
E 129	Allura červeň AC	FD&C Červeň č. 40 (Allura red AC) Citrusová červeň č. 2
E 131	Patentní modř V	
E 132	Indigotin, Indigokarmín	FD&C Modř č. 2 (Indigotin)
E 133	Brilantní modř FCF	FD&C Modř č. 1 (Brilantní modř FCF)
E 140	Chlorofyly a chlorofyliny	
E 141	Měďnaté komplexy chlorofylů a chlorofylinů	Sodno-měďnatá sůl chlorofylinu
E 142	Zeleň S	FD&C Zeleň č. 3 (Fast green FCF)
E 150a-d	Karamel, kaustický sulfitový karamel, amoniakový karamel, amoniak sulfitový karamel	Karamel
E 151	Brilantní čern BN	
E 153	Uhlík z rostlinné suroviny	
E 155	Hněď HT	
E 160a	Karoteny	β-Karoten, mrkvový olej
E 160b	Annatto, bixin, norbixin	Annatto extrakt
E 160c	Paprikový extrakt, kapsanthin, kapsorubin	Paprika, Paprika oleoresin
E 160d	Lykopen	Extrakt lykopenu z rajčat, koncentrát rajčatového lykopenu

E 160e	β -Apo-8'-karotenal	β -Apo-8'-karotenal
E 161b	Lutein	
E 161g	Kanthaxantin	Kanthaxantin (nesyntetický)
E 162	Betalainová červeň, betain	Dehydratovaná řepa (řepný prášek)
E 163	Anthokyany	Grapefruitový extrakt
E 170	Uhličitany vápenaté	
E 171	Oxid titaničitý	Oxid titaničitý
E 555	Hlinitokřemičitan draselný	MICA perleťové pigmenty
E 172	Oxidy a hydroxidy železa	Syntetické oxidy železa
E 173	Hliník	
E 174	Stříbro	
E 175	Zlato	
E 180	Litholrubin BK	
E 579	Glukonan železnatý	Glukonan železnatý
E 585	Mléčnan železnatý	Mléčnan železnatý

Některá syntetická barviva nejsou sice karcinogenní, mají ale negativní vliv na psychické zdraví lidí. McCann s kolektivem v roce 2007 publikovali studii zaměřenou na vztah mezi konzumací syntetických aditiv (barviv a konzervačních látek) a hyperaktivitou u dětí. Testované subjekty byly podle věku rozděleny do dvou skupin na tříleté děti a 8 až 9-ti leté děti. Jako zkoumaná barviva byla použita žlutá SY (E110), azorubin (E122), tartrazin (E102), ponceau 4R (E124), allura červeň AC (E129) a benzoát sodný. Jednalo se o aditiva běžně se vyskytující v dětských potravinách. Závěrem studie bylo konstatování, že konzumace použitých aditiv zvyšuje hyperaktivitu dětí[27].

Z důvodů rizik spojených s konzumací syntetických barviv v současnosti narůstá trend, kdy zákazník klade větší důraz na přírodní potraviny či potraviny obsahující přírodní barviva. Řada společností na to reaguje a upouští od barvení úplně nebo zavádí užívání přírodních barvicích látek. Některé z přírodních barviv vykazují i další pozitivní vlastnosti, které zahrnují antioxidační vlastnosti či prevenci kardiovaskulárních a neurologických chorob. Klasickými příklady jsou kurkumin, antokyaniny či betain. Tento trend je silnější v Evropě než ve Spojených státech amerických[22,28].

Z výše uvedených informací vyplývá, že analyzování složení potravin je velmi důležité a analytická chemie tak hraje klíčovou roli při ochraně zdraví a někdy i dokonce životů spotřebitelů. Pozornost je nutné věnovat všem aditivům, mezi nimi jistě důležitou roli hrají právě barviva, na něž je zaměřena tato práce. V rámci praktické části této diplomové práce byla analyzována následující barviva:

Tartrazin (E102), sodná sůl kyseliny tartrazinové, používána v potravinářství jako syntetické žluté azo-barvivo.

Zeleň S se pod označením E142 používá v potravinářství jako zelené barvivo.

Indigokarmín (E132) patří mezi používaná barviva v potravinářství pro svou temně modrou barvu.

Červeň 2G se pod číslem E128 používá jako červené barvivo.

Žluť SY (E110) je červeno-žluté barvivo schválené pro používání v potravinářském průmyslu.

Chinolinová žluť (E104), člen skupiny chinolinů, tedy heterocyklické aromatické sloučeniny, se používá jako barvicí látka s jasně žlutým odstínem.

Brilantní čern BN (E151) je používané syntetické diazo-barvivo černé barvy.

Erythrosin (E127), disodná sůl tetraiodofluoresceinu, se v potravinářství používá pro svou třešňově červenou barvu.

Brilantní modř FCF (E133) je syntetické modré barvivo používané v potravinářství.

Kurkumin (E100) je fytopolyfenolický pigment získávaný z rostliny *Curcuma longa* používaný jako barvivo v potravinářství.

Ponceau 4R (E124) je povolené červené barvivo v potravinářství.

Patentní modř V (E131) je syntetické barvivo patřící do skupiny trifenylmetanových barviv, s temně modrou barvou. FDA jeho použití nepovoluje.

Allura červeň AC (E129) je červené syntetické barvivo, povolené k používání v potravinářství.

Litholrubin (E180) je syntetické barvivo nerozpustné ve vodě. Jako sytě červené barvivo se používá v potravinářství, k barvení textilií nebo jako součást inkoustů do tiskáren.

Trans- β -Apo-8'-karotenal (E160) patří mezi přírodní látky nacházející se například v citrusových plodech. Jako barvivo patří mezi povolená aditiva.

3.4 Barviva v umění

Nátěr je složitá směs pojiv spojených s pigmenty, plniv, rozpouštědel a dalších aditiv, jako například UV stabilizátorů či látek ovlivňujících lesk. Nátěry mohou být na olejové bázi, kterou je kupříkladu lněný olej, nebo na vodní bázi, zahrnující vodové barvy, akrylové barvy, vaječné tempery, voskové barvy. Zvláštní skupinou jsou práškové barvy, které se nanášejí elektrostaticky a následně se zahřejí na vysokou teplotu[29].

Pigmenty lze rozdělit do kategorií zemité, tradiční a moderní. Zemité pigmenty zahrnují okry, sieny, umbry a marsové hnědi[9]. Okry jsou souhrnný termín používaný archeology pro sedimenty, hlinky a kameny obsahující minerály Fe_2O_3 nebo $\text{FeO}(\text{OH})$. V závislosti na množství obsaženého železa a přítomnosti jiných minerálů se okry vyskytují v různých odstínech červené, žluté, hnědé[30]. Tradiční pigmenty obsahují kov, například titan, kobalt, kadmium. Do skupiny moderních pigmentů řadíme syntetické organické látky jako ftalokyaniny, peryleny, chinakridony či pyrroly. Pro umělce je důležité, aby použité pigmenty měly vynikající vlastnosti jak v okamžiku malby, tak i za delší dobu, kdy budou jejich díla obdivovat další generace[9].

Obecně lze říci, že malba je druh umění využívající nátěrů k zobrazení tématu. Malby obsahují několik vrstev. Základní vrstvou je podložka, kterou může být kámen, plátno, papír, kov nebo třeba plast. Další vrstvou je podklad, který má za úkol připravit podložku na nanesení nátěru. Nátěr je další vrstva, která obsahuje směs barvicích složek (barviv, pigmentů) a pojiv, a nese informační obsah celého díla. Na barevný nátěr lze nanést lak pro ochranu nebo k zintenzivnění barev v nátěru. Jako lak se používají například pryskyřice[31].

Barevné vrstvy obsahují mnoho organických složek, například syntetické pigmenty a barviva, oleje, pryskyřice nebo polysacharidová pojiva. Pro jejich analýzu se používá plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS), pyrolytická GC-MS, vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) či infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR). Optickou mikroskopii a skenovací elektronový mikroskop s energiově disperzním detektorem rentgenového záření lze použít na analýzy anorganických složek[32].

Další techniky hmotnostní spektrometrie v analýze maleb jsou například hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů s analyzátozem doby letu (SIMS-TOF) a hmotnostní spektrometrie s desorpcí a ionizací laserem za účasti matrice s analyzátozem doby letu (MALDI-TOF)[29]. SIMS-TOF byla použita pro ilustraci k analýze kyseliny močové a jejich solí v kamenných malbách v Africe, čímž bylo prokázáno, že zvířecí moč byla dříve používána jako pigment[33]. MALDI-TOF je citlivá technika, která může sloužit k analyzování proteinů použitých jako pojiva[34].

Pro analýzu uměleckých děl je možné využít i iontovou mobilitu ve spojení s hmotnostní spektrometrií (IM-MS). Iontová mobilita nabízí možnost separace při přímé analýze vzorků, jako je například hmotnostně spektrometrické zobrazování různých vrstev barevného souvrství. Zkušenosti získané z analýzy potravinářských barviv mohou posloužit jako vodítko při analýze uměleckých děl.

3.5 Analýza barviv v potravinářství

Jelikož jsou potraviny často směsí různých komponent, přímá analýza může být problematická. Jedním ze způsobů, jak se vyhnout vlivu složité matrice je extrakce. Častou extrakční metodou je extrakce na pevné fázi (SPE). V případě analýzy azo barviv v potravinách jde o jednu z nejběžněji používaných extrakčních technik díky její jednoduchosti a rychlosti. Další výhodou SPE je možnost zpracování velkého počtu vzorků a vysoká výtěžnost extrakce. Jako nejčastější sorbent se používá chemicky vázaný oktadecyl, v některých speciálních případech analýzy azo barviv se pak používá například styren-divinylbenzenový polymer. Dobrou výtěžnost SPE ovlivňuje také vhodně zvolené rozpouštědlo. Volbu rozpouštědla ovlivňuje zejména složení matrice analyzovaného vzorku. Pro extrakci se nejčastěji používá methanol, kyselina octová, aceton, ethyl-acetát, etanol či tetra-n-butyl amonium fosfát[35].

Další hojně využívanou extrakční technikou je extrakce kapalina/kapalina (LLE). Separace nastává v důsledku relativní rozpustnosti látky ve dvou navzájem nemísitelných kapalinách. Jako rozpouštědla se v případě extrakce azo barviv nejčastěji používá voda, ethanol, methanol, isopropanol, ethyl acetát nebo cyklohexan[35].

V literatuře je popsána řada způsobů provedení LLE při extrakci barviv z potravin. Long s kol. se zaměřil na extrakci šesti azo barviv v chilli produktech. Cílem práce bylo najít vhodnou soustavu rozpouštědel a optimalizovat extrakční proces pro následnou HPLC analýzu. Za nejlepší zvolili směs methanol:kyselina mravenčí (30:70, v/v) a chloroform. Přídavek nasyceného roztoku chloridu sodného do extrační směsi zlepšil extrakci azo barviv do chloroformu, díky oslabení vodíkových vazeb mezi barvivem a kyselinou. Průměrná výtěžnost metody činila 94,1 % až 99,2 %. Navržený postup byl shledán vhodným pro rutinní monitoring zmíněných azo barviv v chilli produktech[36].

Po extrakci barvicích aditiv ze vzorku potravinářského produktu následuje zpravidla samotná analytická technika s cílem identifikace a stanovení obsahu jednotlivých barviv. Vzhledem k tomu, že barviva silně absorbují záření ve viditelné oblasti spektra, jeví se spektrofotometrické techniky jako velmi vhodné. K jejich pozitivům přispívá i fakt, že se jedná o finančně méně náročné techniky s nižším důrazem na kvalifikaci operátora. V některých případech však může být jejich použití omezeno, zejména při analýze směsí barviv, kdy se jednotlivé absorpční pásy mohou překrývat[35]. Turak a Ozgur stanovovali současně dvě barviva, allura červeně a ponceau 4R, v nápojích za použití čtyř derivačních spektrofotometrických metod a následné výsledky porovnali s referenční HPLC metodou.

Závěrem konstatovali, že navržená spektrofotometrická metoda je jednodušší a poskytuje rychlejší a současně stejně kvalitní výsledky jako referenční analýza HPLC. Zároveň spektrofotometrická metoda nepotřebuje náročnější úpravu vzorku, jako tomu je u HPLC techniky[37].

K jednodušším technikám používaných při analýze barviv v potravinách patří bezesporu chromatografie na tenké vrstvě (TLC). Oproti jiným chromatografickým metodám vyniká nízkou cenou a jednoduchostí. Vlajkovic s kolektivem vyvinuli a validovali TLC metodu pro stanovení syntetických potravinářských barviv s použitím reverzních fází. Svou metodu následně porovnali s HPLC. Ačkoli HPLC byla přesnější a poskytovala nižší limity detekce a kvantifikace, TLC metoda byla výrazně levnější, méně náročná, měla nižší spotřebu rozpouštědla a umožňovala analýzu více vzorků najednou[38]. De Andrade a kol. se ve své práci věnovali analýze syntetických barviv v nápojích za použití SPE techniky ve spojení s TLC analýzou. SPE zajistila efektivní extrakci barviv, ale i přečistění a zakoncentrování. TLC pak poskytla rychlé a spolehlivé výsledky, které si autoři ověřili pomocí vlastní validované metody ion-párové HPLC[39].

Jak je patrné, HPLC chromatografie patří mezi oblíbené techniky analýzy barviv v potravinách. Jedná se o náročnější techniku, která ale poskytuje kvalitnější výsledky. Většinou se používá v kombinaci s UV/VIS či MS detektorem. Při analýze azo barviv se typicky používají oktadecylová (C18) nebo oktylová (C8) stacionární fáze. Jelikož jsou azo barviva silně polární látky, eluují se velmi rychle, blízko mrtvému objemu. Jedním ze způsobů, jak zlepšit retenci analytu, je použití ion-párové HPLC (IP-HPLC), kdy se do mobilní fáze přidá například hexadecyltrimetylamoniumbromid[35]. Ansorgová a kol. použili IP-HPLC ve spojení s hmotnostní spektrometri s ionizací elektrosprejem (ESI) k analýze nečistot v sulfonovaných azo barvivech. Ion-párovacím činidlem byl octan triethylamonný. IP-HPLC poskytovala dobrou separaci a kompatibilitu s hmotnostním spektrometrem[40].

Bonan a kol. vyvinuli metodu simultánního stanovení 17 syntetických barviv v potravinách za využití UV/VIS HPLC, kde jako stacionární fázi použili C8 a gradientovou eluci. Barviva z pevných vzorků byla extrahována směsí ethanol:voda, přečištěna na polyamidové SPE kolonce a eluována bazickým roztokem metanolu. Vzorky nápojů byly pouze naředěny deionizovanou vodou (1:1, v/v) a zfiltrány. Metoda poskytla reprodukovatelné, přesné výsledky a protože byla validována v souladu s platnými vyhláškami, je možné její komerční využití[41]. Marco Iammarino spolu s kolektivem navrhl, optimalizoval a validoval metodu současného stanovení dvanácti azo-barviv v

masných produktech. Pro extrakci barviv ze vzorků byla použita směs acetonitril, methanol, voda, vodný roztok amoniaku (28–30%) v poměru 50:40:9:1 (v/v/v/v) v ultrazvukové lázni. Analýza byla provedena vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s UV detektorem. Separace bylo dosaženo na C18 koloně s gradientovou elucí, mobilní fáze byla směs 0,02 mol/l octanu sodného (pH 7) a acetonitrilu. Validace metody byla provedena v souladu s nařízením Evropské komise 657/2002/EC a 2017/625/EU. Dosažené limity detekce v rozmezí 1,4 - 7,5 mg/kg matrice. Autoři představili univerzálnější metodu analýzy barviv v masných výrobcích než jsou běžně používané metody[42]. Kirschbaum s kolektivem analyzoval syntetická barviva v rybích jikrách za pomoci kapalinové chromatografie. Vzorky jiker byly nejprve podrobeny extrakci 1 mol/l vodným roztokem amoniaku. Tuky byly odstraněny přidáním n-hexanu, pH se upravilo na hodnotu 2 a barviva se adsorbovala na polyamidový sorbent, ze kterého byla posléze eluována směsí vodného roztoku amoniaku a metanolu (1:9, v/v). Izolovaná barviva byla následně analyzována kapalinovou chromatografií na reverzní fázi s detektorem s diodovým polem. Gradientová eluce byla provedena binární směsí 0,1 mol/l octanu sodného (pH 7) ve vodě a acetonitrilu. Závěrem studie bylo konstatováno, že některé produkty obsahovaly koncentrace barviv nad limitem stanoveným Evropskou unií nebo naopak neobsahovaly přidaná barviva uvedená na jejich štítku[43].

Ačkoli je kapalinová chromatografie s UV/VIS detektorem nejběžnější technikou při analýze azo-barviv, mnohdy jsou jejich spektra velmi podobná a analytici proto doplňují informace použitím hmotnostně spektrometrického detektoru. Pro detektory UV/VIS může být obtížné poskytnout strukturní informace o analytu, při komplexní matici navíc může být selektivita detekce nedostatečná. Pro azo-barviva se používá nejčastěji iontový zdroj ESI, jelikož se jedná o polární látky. Účinnost ionizace závisí do značné míry na interferencích matrice ve vzorku a v mobilní fázi. Většina azo-barviv se dá dobře ionizovat za použití octanu amonného nebo mravenčanu amonného v negativním módu[35]. Ma s kolektivem ve své práci publikoval současné stanovení syntetických barviv rozpustných ve vodě v nápoji a barviv rozpustných v tucích v chilli koření. K tomuto využili spojení HPLC-PDA-MS vybavené elektrosprejem. K extrakci barviv z pevných vzorků použili dimethylsulfoxid. Kapalinová chromatografie se prováděla s gradientovou elucí. Mobilní fází byla binární směs octanového pufru, obsahující 0,02 mol/l octanu amonného a 1 % octové kyseliny, a methanolu. Lineární rozsah odezvy činil tři řády, limity detekce byly 0,01 ng až 4 ng a limity kvantifikace byly 0,03 ng až 11,2 ng. Nová metoda stanovení syntetických barviv

v potravinách byla pro svou přesnost, reprodukovatelnost, jednoduchost a nízké limity shledána jako vhodná pro případné odhalování pančovaných výrobků[44].

K dalším technikám používaným při analýze barviv v potravinách se řadí kapilární elektroforéza. Tato technika prokazuje univerzálnost, jednoduchost, rychlost, náklady na analýzy patří k nižším a spotřeba vzorku je malá. Prado a kol. vyvinuli a validovali metodu stanovení všech jedenácti v Brazílii povolených syntetických barviv kapilární elektroforézou. Jako vzorky použili alkoholické nápoje. Kapilární elektroforéza probíhala v křemenné kapiláře, základním elektrolytem byla směs fosfátového pufru a dodecylsírany sodného o výsledném pH 11. K detekci byl použit UV/VIS detektor. Výtěžnost metody činila 92,6 až 104 %. Limity detekce se pohybovaly od 0,4 µg/ml do 2,5 µg/ml, limity kvantifikace byly v rozmezí 1,3 µg/ml až 7,1 µg/ml. Tato metodika nevyžadovala úpravu vzorku, což jí dodává na jednoduchosti[45]. K používaným elektroanalytickým metodám analýzy barviv patří například voltametrie na tuhých elektrodách či polarografie[31,33]. Combeau, Chatelut a Vittori publikovali práci, ve které se zabývali analýzou barviv azorubín, allura červeň a ponceau 4R diferenčně pulzní polarografií v nealkoholických nápojích. Jako nejvhodnější elektrolyt se ukázal fosfátový pufr o pH 9,1. Limity detekce byly 31 µg/l pro azorubín, 48 µg/l pro allura červeň a 38 µg/l pro ponceau 4R. Výhodou navržené metody je možnost analýzy přidaných syntetických barviv za přítomnosti neelektroaktivních přírodních barviv. Identifikace a kvantifikace syntetických barviv byla jednoduchá a přesná, nebylo potřeba žádné složité úpravy vzorků[48].

3.6 Iontová mobilitní spektrometrie

Iontová mobilitní spektrometrie IMS je instrumentální metoda, která separuje látky v plynné fázi. Složky vzorku jsou ionizovány a následně jsou ionty v plynné fázi separovány při průchodu mobilitní celou s inertním plynem za působení elektrického pole. Iontová mobilitní spektrometrie byla poprvé představena pod názvem plasmová chromatografie Francisem W. Karasekem, University of Waterloo[49]. Jedná se o techniku dovolující kvantitativní i kvalitativní analýzy různorodých látek s velmi dobrou citlivostí a relativně nízkými náklady[50].

Jako iontové zdroje se v iontové mobilitní spektrometrii nejčastěji používají radioaktivní izotop ⁶³Ni, UV záření a korónový výboj (CD). Ionizace CD je považována za spolehlivou a v současnosti se používá pro detekci mnoha různých látek. Mezi hlavní výhody patří její jednoduchost a zvýšení poměru signál/šum, což vede k zvýšení

dynamického rozsahu a citlivosti[51]. CD-IMS může být použita v negativním i pozitivním módu. V pozitivním módu je analyt ionizován při ion-molekulové reakci. Použitím různých iontů, které způsobují ionizaci analyzovaných látek, lze dosáhnout snížení pozadí či zvýšení citlivosti odezvy[50]. Látky jako amoniak či n-nonylamin se běžně používají jako zdroj těchto iontů[36,37].

Zařízení pro iontovou mobilní spektrometrii se skládá z iontového zdroje, iontové brány, driftové části (mobilní cely) a detektoru. Účelem iontové brány je přivedení iontů z iontového zdroje do driftové části. Mobilní celu může tvořit driftová trubice složená z prstencových elektrod, na kterých je děličem napětí nastaveno elektrické pole (cca 200 V/cm). Vlivem tohoto elektrického pole ionty putují do detektoru, obvykle Faradayova poháru. Z něj zesílený signál je synchronizován s pulzem iontové brány, který vypustil ionty do driftové části. Tímto získáme mobilní spektrum, závislost iontového proudu na čase průchodu iontu (driftový čas)[53]. V současnosti je běžné spojení iontové mobilní spektrometrie s hmotnostní spektrometrií (IM-MS), kombinující výhody obou metod. Techniky poskytují komplementární informace o iontech analytu[54].

Veličina popisující rychlost iontů v IMS se nazývá driftová rychlost v_d . Ionty pohybující se v plynném médiu za přítomnosti elektrického pole E jsou urychlovány a zpomalovány srážkami s molekulami plynu. Ionty se pohybují úměrně intenzitě elektrického pole E dle rovnice 1[55].

$$v_d = KE \quad (1)$$

kde konstanta úměrnosti K se nazývá iontová mobilita, obvykle vyjádřená v $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$. K můžeme získat z rovnice 2, kde t_d je driftový čas, za který ionty urazí vzdálenost L a E značí intenzitu elektrického pole[56].

$$K = \frac{L}{Et_d} \quad (2)$$

Pro výpočet iontové mobility K můžeme použít Mason-Schampovu rovnici 3[55].

$$K = \frac{3q}{16N} \sqrt{\frac{2\pi}{Tk_B}} \sqrt{\frac{m+M}{mM}} \frac{1}{\Omega} \quad (3)$$

kde q je náboj iontu, N počet atomů/molekul driftového plynu v jednotkovém objemu, m hmotnost atomu/molekul driftového plynu, M hmotnost iontu, k_B Boltzmannova konstanta, T termodynamická teplota, Ω srážkový průřez.

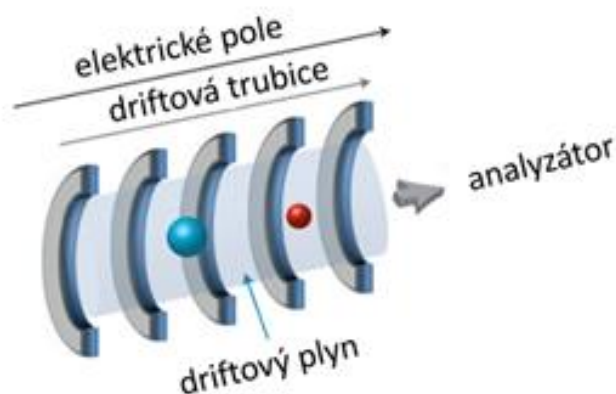
Přepočtem K na teplotu 273 K a tlak 760 torrů dostaneme redukovanou konstantu úměrnosti K_0 4[56].

$$K_0 = \frac{L}{Et_d} \frac{273}{T} \frac{P}{760} \quad (4)$$

kde P je tlak tlumícího plynu, T teplota.

3.7 Provedení iontové mobility spektrometrie

Iontová mobilitní spektrometrie má různá konstrukční zpracování. Nejjednodušší uspořádání je použití lineární driftové trubice (Drift Tube Ion Mobility Spectrometry, DTIMS) zobrazené na obrázku 1. Jde o rovnou trubici složenou z vodivých prstenců, kterými je v jejím vnitřním prostoru udržováno elektrické pole. Před trubicí je iontový zdroj, na konci pak detektor měřící iontový proud. Za iontovým zdrojem je štěrbina přivádějící skupiny iontů v pulzech do driftové části-trubice, kde probíhá separace iontů podle rozdílných hodnot mobilit. Driftovou trubicí proudí driftový plyn, obvykle helium nebo dusík, který klade odpor pohybu iontů. Malé kompaktnější ionty prochází separační částí rychleji a dopadnou na detektor dříve než větší ionty z důvodu nižšího počtu srážek s molekulami plynu (za předpokladu stejného náboje a hmotnosti). Měřením driftového času iontu, určením K (rovnice 2) a jejím následným dosazením do Mason-Schampovi rovnice 3 můžeme získat srážkový průřez (CCS). CCS odpovídá ploše v prostoru, kterou je analyt schopen interagovat s molekulami driftového plynu, zatímco volně rotuje v prostoru[55–57].

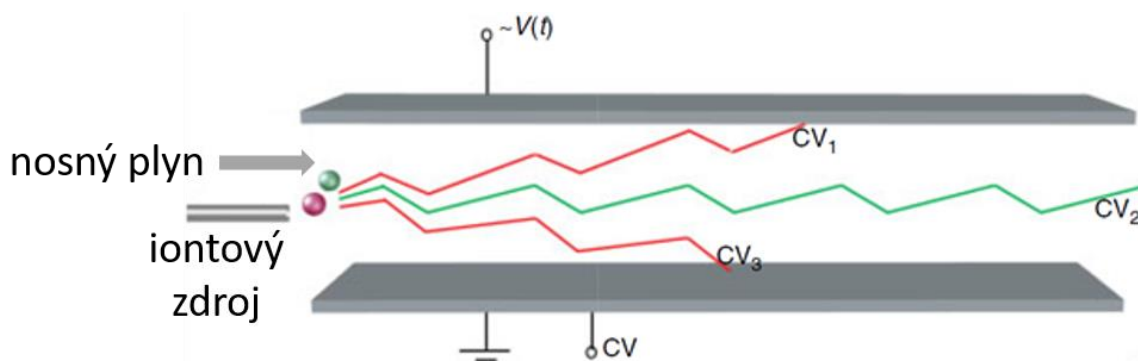


Obrázek 1 Schéma provedení iontové mobility v driftové trubicí, převzato z cit. [54], upraveno. Trubice je naplněna driftovým plynem a ionty se pohybují směrem k hmotnostnímu analyzátoru (pro spojení IM-MS)

Zvýšení rozlišení lze dosáhnout prodloužením dráhy letu iontu, zvýšením intenzity elektrického pole a snížením teploty[58]. Důležitou roli hraje i driftový plyn. Volba

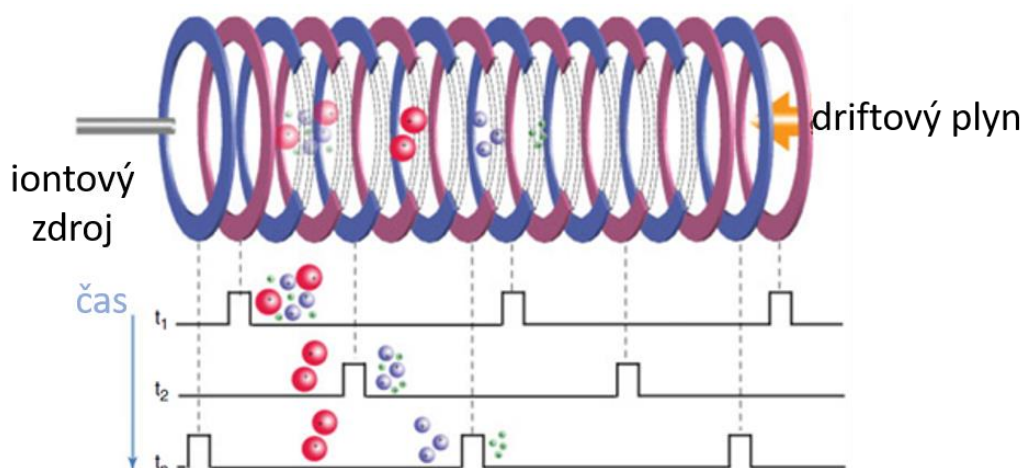
vhodného driftového plynu závisí na polarizovatelnosti a velikosti jeho molekul[59]. Některé nové koncepty se snaží o zvýšení separace prodloužením dráhy letu, avšak bez přílišného zvětšení přístroje. S. I. Merenbloom spolu s kolektivem jako první zkonstruoval víceprůchodovou IMS s cyklickou driftovou trubicí. Elektrické pole je přiváděno na čtyři zakřivené segmenty driftové trubice, kterou mohou ionty opakovaně procházet, což umožňuje zlepšení separace iontů[60].

Iontová mobilita s využitím vysokonapěťové asymetrické vlny (FAIMS) je dalším hojně využívaným typem iontové mobilitní spektrometrie (Obr. 2). Separace iontů je dána rozdílnými hodnotami mobilit při působení silného elektrického pole (20000 V/cm) a slabého elektrického pole (1000 V/cm)[61]. Buryakov a kol. poprvé uvedli techniku FAIMS v roce 1993[62]. Skládá se ze dvou paralelních elektrod, na které se vkládá napětí. Ionty jsou unášeny proudem nosného plynu do prostoru mezi elektrodami směrem k detektoru, který je za elektrodami. Ionty vstupující mezi elektrody jsou vystaveny kolmo působícímu proměnlivému elektrickému poli, které je strhává k elektrodě. Po vložení kompenzačního napětí na elektrodu mohou určité ionty projít do detektoru. Mobilitní spektrum je závislost iontového proudu na kompenzačním napětí[63]. Jestliže jsou elektrody blízko u sebe, lze mezi nimi generovat elektrické pole vyšší intenzity, což v důsledku umožňuje lepší separaci iontů. Tento předpoklad dělá z FAIMS atraktivní techniku pro miniaturizaci. FAIMS můžeme dělit podle uspořádání elektrod na planární a cylindrickou. Planární verze je také nazývána diferenční mobilitní spektrometrie. Analytická mezera mezi elektrodami v planárním uspořádání je v intervalu od 35 μm do 2 mm, pro cylindrickou verzi 1,5 mm až 3 mm. Délky elektrod jsou v rozmezí 300 μm až 50 mm[55].



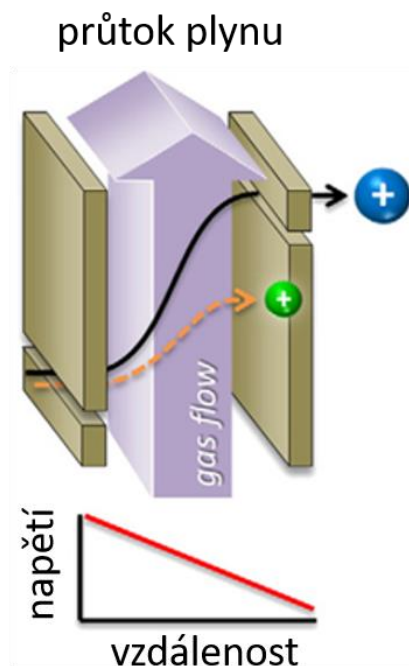
Obrázek 2 Schématické znázornění iontové mobility s využitím asymetrické vlny, převzato z cit. [56], upraveno. Na elektrody se vkládá střídavě silné a slabší elektrické pole, čímž se vytváří asymetrická vlna. Ionty s určitou mobilitou mohou projít po vložení konkrétního kompenzačního napětí (zde CV_2 pro zeleně označené ionty)

Třetí typ iontové mobilitní spektrometrie využívá putující vlny (TWIMS), ve které je řada za sebou jdoucích kruhových elektrod, na které se přivádí symetrická vlna potenciálu putující po celé délce trubice (Obr. 3). Tato vlna unáší ionty rychlostí závislou na jejich hodnotách mobilit a různé ionty dopadají na detektor v nestejném čase. Malé ionty se střetávají s molekulami plynu méně než velké ionty, které tak dopadají na detektor později[55]. TWIMS byla poprvé představena Gilesem a kol. v roce 2004 a komerční uvedení na trh následovalo dva roky poté, v roce 2006, firmou Waters pod názvem SYNAPT HDMS[64]. TWIMS technologie prošla velkou revizí v roce 2009 a byl představen nový přístroj SYNAPT G2. Hlavní změnou bylo zvýšení pracovního tlaku v driftové části použitím nového segmentu zavádění iontů, prodloužení driftové části a zvýšení napětí pro putující vlnu, což umožnilo lepší separaci iontů. Modely SYNAPT G2S a G2Si byly představeny v letech 2011 a 2013 a obsahovaly nový iontový zdroj a iontovou optiku, představují efektivní spojení iontové mobility a hmotnostní spektrometrie[65].



Obrázek 3 Schéma iontové mobilitní spektrometrie s využitím putující vlny, převzato z cit. [56], upraveno. Na kruhové elektrody se přivádí symetrická vlna potenciálu, která putuje po celé délce mobilitní cely a unáší ionty

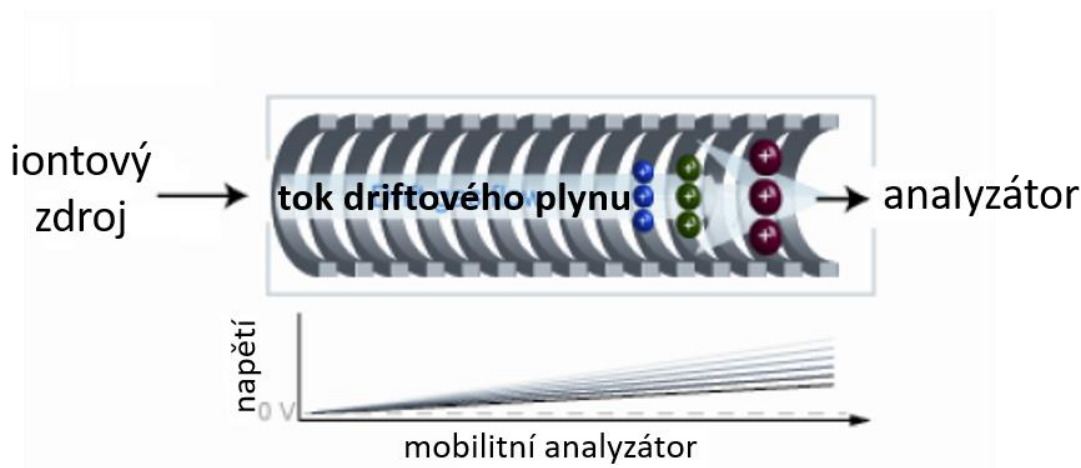
Dalším typem provedení iontové mobility je diferenční mobilitní analyzátor (DMA), ve kterém se ionty s různými iontovými mobilitami dělí v prostoru (Obr. 4). Ionty analytu jsou unášeny proudem plynu kolmo ke dvěma elektrodám. Elektrické pole mezi elektrodami způsobuje pohyb nabitých částic k opačně nabitým elektrodám[55].



Obrázek 4 Schéma diferenčního mobilního analyzátoru, převzato z cit. [66], upraveno

Planární DMA je vhodná pro spojení s hmotnostní spektrometrií s ionizací za atmosférického tlaku. Schéma planárního uspořádání diferenčního mobilního analyzátoru je zobrazeno na obrázku 4. Nosný plyn s ionty analytu vstupuje do DMA, ionty se pohybují vlivem elektrického pole a proudu plynu. Pouze ionty s určitou mobilitou opustí DMA výstupní štěrbinou. Ionty s vyšší mobilitou jsou proudem plynu odchýleny méně než ionty s menší mobilitou[67].

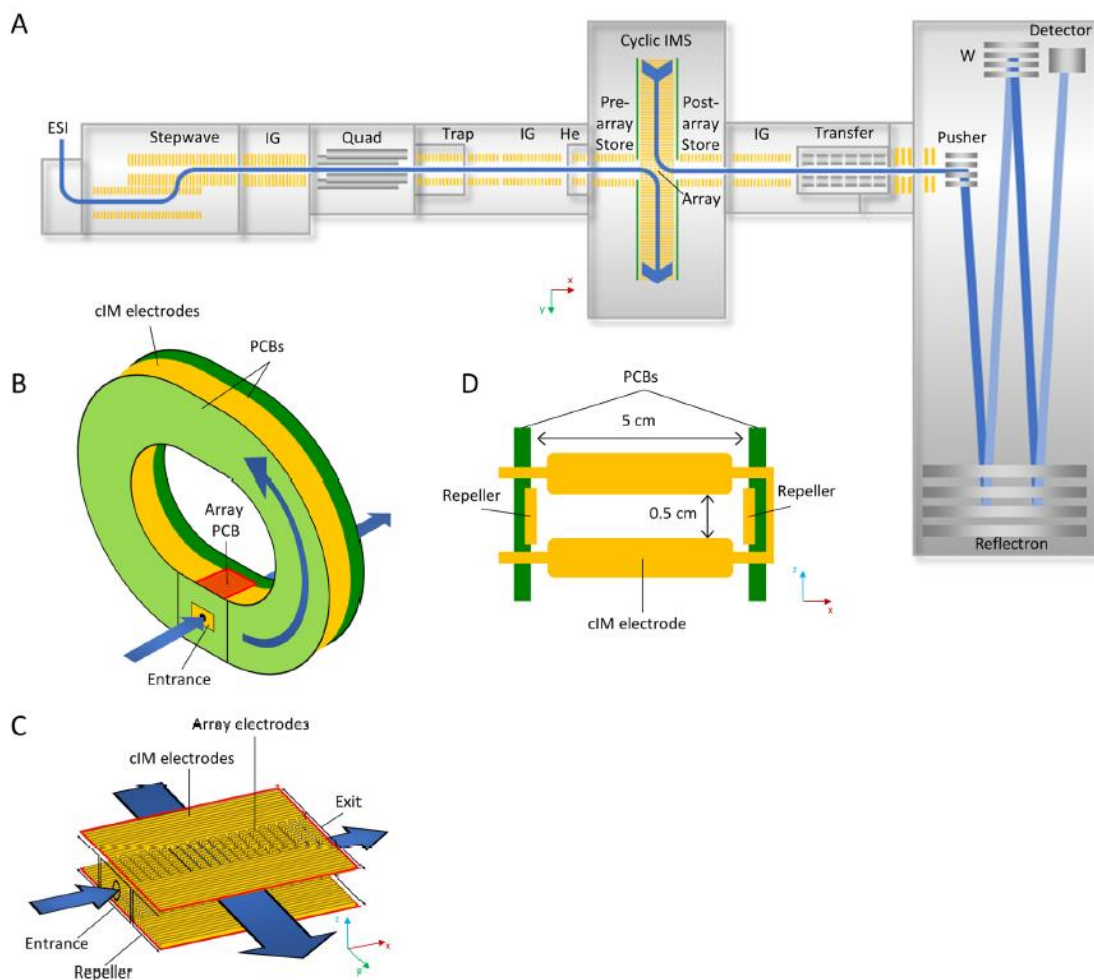
Iontová mobilní spektrometrie se záchytem iontů (TIMS) je posledním typem konvenčních technik IMS (Obr. 5). Skládá se ze tří částí – vstupní „nálevky“, mobilního analyzátoru a výstupní „nálevky“. Ionty jsou obvykle generovány ionizací elektrosprejem a vstupují do mobilní cely. V ní působí slabé elektrické pole proti unášení iontů driftovým plynem. Dojde k vyrovnání působících sil a ionty jsou podélně zachyceny v různých místech. Postupným snížením intenzity elektrického pole ionty opouští mobilní celu[68].



Obrázek 5 Schématické znázornění TIMS, převzato z cit.[69], upraveno

Ačkoli má sama o sobě iontová mobilitní spektrometrie řadu uplatnění, spojením s hmotnostní spektrometrií poskytuje znatelně silnější nástroj pro analýzu složitých směsí látek. Parametr srážkového průřezu napomáhá k identifikaci struktur iontů spolu s hmotnostním spektrem. Iontová mobilita s hmotnostní spektrometrií IM-MS nachází svá uplatnění například při analýze izomerů, které lze rozlišit právě na základě rozdílných CCS hodnot. Kromě toho doba IMS analýzy je výrazně kratší ve srovnání s kapalinovou chromatografií či plynovou chromatografií[70]. Mezi nevýhody lze zařadit horší rozlišení látek oproti chromatografickým technikám a u některých technických řešení nutnost kalibrace pro určování CCS. V některých případech může chybět vhodný kalibrant, typicky při analýzách velkých proteinových komplexů. Limitující může být také proces ionizace, například hydrofobní membránové proteiny se obtížně ionizují většinou ionizačních technik[71]. Některá uspořádání IMS ani neumožňují určení CCS hodnot (např. FAIMS), ale i tak mohou významně zlepšit selektivitu měření při spojení IM-MS.

Ve snaze dále zlepšit rozlišení látek jsou například vyvíjeny již zmíněné cyklické iontové mobility. Kromě cyklické driftové trubice sem patří i cyklické uspořádání pro TWIMS zobrazené na obrázku 6. Ionty jsou pomocí pole elektrod převáděny do cyklického uspořádání TWIMS a mohou jím několikrát projít, což dovoluje zlepšit separaci[70].



Obrázek 6 Schéma cyklické TWIMS převzato z cit. [70]. (A) celkové schéma přístroje cyklické TWIMS ve spojení s hmotnostním spektrometrem; (B) detail na cyklickou část přístroje; (C) oblast vstupu/výstupu iontů, s vyznačením elektrodového pole; (D) složení elektrod cyklické IMS

3.8 Použití iontové mobilní spektrometrie

Mezi oblasti s největší působností iontové mobilní spektrometrie patří bezesporu analýza výbušnin. Aniž si to uvědomujeme, osobně se s ní pravděpodobně potkala většina z nás. Jde o jedno ze zařízení na letištích, kterým se testují osoby a zavazadla na přítomnost výbušných či jiných zakázaných látek, neboť je schopné detekovat i velmi nízké koncentrace. V některých případech používají armádní specialisté přenosné IMS pro analýzu chemických bojových látek[72]. Iontová mobilní spektrometrie je vhodná i pro forenzní účely. J. R. Verkouteren a J. L. Staymates ve své práci z roku 2011 použily iontovou

mobilitní spektrometrii ke stanovení osmi návykových látek, jako například metamfetamin, 3,4-metylendioxymetamfetamin hydrochlorid, kokain či herion. Po získání hodnot mobilit jednotlivých substancí z analýzy standardů provedly analýzu reálných vzorků, drog zadržovaných policií. Metoda byla shledána jako vhodná pro kvalitativní analýzu většiny nejběžnějších návykových látek. Za její hlavní výhody byla považována její rychlost a potřeba minimální úpravy vzorku[73]. T. Khayamian s kolektivem vyvinul metodu analýzy morfinu a noscapinu iontovou mobilitní spektrometrií s ionizací korónovým výbojem. Noscapine je druhý nejzastoupenější alkaloid v opiu. Detekční limity metody byly řádově 10^{-11} g a lineární dynamický rozsah pro obě sloučeniny byl tři řády. Obě látky mohly také být stanoveny současně za použití metody standardního přídatku[74]. Ve forezních vědách lze iontovou mobilitní spektrometrii použít i pro analýzu povýstřelových zplodin. Látky jako nitroglycerin, nitrocelulózu či dusičnany lze detekovat a prokázat tak manipulací se střelnou zbraní. Pro snížení detekčních limitů se využívá mikro-extrakce na tuhé fázi před IMS[75]. Hybridní technika iontová mobilita s hmotnostní spektrometrií IM-MS a její spojení se systémem kapalinové chromatografie nabízí nové možnosti pro analýzy složitějších vzorků. Těchto výhod lze využít například v antidopingové kontrole. Vzorky jsou zde složité biologické směsi a hledané látky mohou být přítomny ve velmi nízkých koncentracích. M. Hernández-Mesa a kol. sledovali ve své práci pomocí této technologie metabolity fáze II steroidů ve vzorcích moči. Spojením iontové mobility a LC-MS systému bylo dosaženo zlepšení poměru signál/šum. Implementace iontové mobility poskytla nový identifikační parametr CCS a umožnila separaci izomerních steroidních párů, jako například glukuronidů 19-noretiocholanolonu a 19-norandrosteronu. Při použité metodice nebyly hodnoty CCS znatelně zatíženy vlivem matrice[76].

Odvětvím, ve kterém se využívá iontová mobilitní spektrometrie, je i zemědělství a analýza složek životního prostředí. V současnosti se při pěstování plodin používá mnoho chemických látek, jako jsou například hnojiva, pesticidy a insekticidy. Ačkoli tyto látky mají pozitivní vliv na úrodu, jejich konzumace spotřebiteli je ze zdravotního hlediska nežádoucí. IMS je pro své vlastnosti používaná analytická technika pro kontrolu jejich obsahu v produktech, půdě či vodách. Tuovinen a kol. použili úspěšně IMS pro identifikaci organofosfátových pesticidů jako diazinon, dimethoat, parathion a karbamátové sloučeniny aldikarb v kapalném vzorku. Pro stanovení použili kladnou polaritu měření. Detekční limity byly v ng až μ g. Při měření byl vliv pozadí minimální. Hlavními výhodami použité metody jsou rychlá odezva, vysoká citlivost, měření par v reálném čase a nízká finanční náročnost[77]. Dusíkatá hnojiva hrají významnou roli v produkci dusičnanů a dusitanů

v přírodě. Reakcí dusitanu a sekundárního aminu, které lze získat z potravy, vzniká v lidském těle zdraví škodlivý nitrosoamin. Dusičnany jsou obecně stabilnější a méně toxické než dusitany, avšak lehce podléhají biodegradaci mikroorganismy a vznikají z nich dusitany. Jafari s kol. publikoval metodu současného stanovení dusitanů a dusičnanů pomocí IMS s ionizací elektrosprejem ve vzorcích brambor a vody. Běžně používané techniky pro analýzu těchto látek jsou HPLC, kapilární elektroforéza, MS-MS, které jsou složitější a nákladnější. Pro IMS stanovení nebyly vzorky derivatizovány. Dosažené detekční limity dusičnanů a dusitanů byly 4,7 $\mu\text{g/l}$ a 3,8 $\mu\text{g/l}$. Lineární dynamický rozsah činil dva řády a RSD pro oba ionty byla pod 5 %. Výhodou nové metody je nenáročná údržba přístroje, rychlost analýzy a nižší finanční náklady. V porovnání s konvenčně používanými technikami poskytuje stejně spolehlivé výsledky[78].

Iontová mobilní spektrometrie ve spojení s hmotnostní spektrometrií nabízí výhody například při analýze izomerů. Ahonen a kol. ve svém článku prezentují iontovou mobilní spektrometrii s putující vlnou ve spojení s MS jako rychlou, spolehlivou metodu poskytující reprodukovatelné výsledky separace derivatizovaných steroidních látek. Tři izomerní páry steroidních látek byly analyzovány v nativní formě a jako p-toluensulfonylizokyanátové deriváty. Nativní látky byly od sebe separovány, avšak nedošlo k separaci izomerů. Separace izomerů byla dosažena pomocí derivatizace, která také zvětšila rozdíly mezi velice blízkými hodnotami CCS. Rozlišení píků bylo blízké základní linii. U všech analytů byly limity detekce pod 25 ng/ml. Autoři se také zabývali vlivem driftového plynu a demonstrovali, že použití dusíku vedlo k lepší separaci derivatizovaných izomerů než použití oxidu uhličitého. Doba TWIM-MS měření je v řádech milisekund, což znamená, že metoda umožňuje téměř okamžitou separaci, charakterizaci a kvantitativní vyjádření steroidních látek. Těchto výhod mohou využít například forenzní laboratoře či antidopingové kontroly[79]. Uvedená rychlost měření však nezahrnuje celkovou dobu analýzy, kde kritickým krokem z hlediska času může být například příprava vzorku.

Sysoev s kol. použil spojení iontové mobility v driftové trubici a hmotnostní spektrometrie s analyzátozem doby letu k rychlé identifikaci trifenylmetanových barviv, která jsou obsažena v inkoustu kuličkových per. Čtyři barviva, různé typy violetí, byla úspěšně prokázána. Jelikož inkousty kuličkových per obsahují iontové sloučeniny, bylo předpokládáno, že analyty budou poskytovat stabilní ionty, což bylo potvrzeno. Všechny látky poskytovaly ionty $[M - Cl]^+$ a rozdílné hodnoty redukovaných mobilit. Vzorek inkoustu byl z papíru extrahován 1 ml acetonitrilu s přidávkem 0,5 % kyseliny mravenčí po dobu 2 hodin za pokojové teploty a následně zaveden přímou infúzí do ESI zdroje. Autoři

se také snažili odhadnout koncentraci barviv ve vzorku a došli k závěru, že barviva byla přítomná řádově v desítkách až stovkách $\mu\text{g/ml}$. Výhodou použité metody je především rychlost samotné analýzy, která je o více než řád vyšší než u konvenčně používané LC/MS techniky, kde jednotlivé analýzy trvají i desítky minut[80]. Jiao s kol. vyvinul metodu současného stanovení tří azo barviv (allura červeň, para červeň a oranž II) iontovou mobilitní spektrometrií s ionizací elektrosprejem v potravinách. Za nejvhodnější k extrakci barviv zvolili autoři po optimalizaci směs methanol:voda 9:1 (v/v). Standardem pro IMS byla kyselina citronová. Dosažené limity detekce byly 0,1; 0,05 a 0,2 $\mu\text{g/ml}$ pro oranž II, allura červeň a para červeň lineární rozsah odezvy činil dva řády. Navržená metoda je rychlá, jednoduchá a finančně nenáročná alternativa k běžně používaným technikám analýzy barviv v potravinách[81]. Sun a kol. použili sorbent na bázi polydopaminu v mikro extrakci na pevné fázi a následnou IMS pro stanovení sudanových barviv v rajčatové omáčce. Optimalizací extrakčních podmínek bylo prokázáno, že testovaný sorbent je vhodný k extrakci sudanových barviv. Analýza iontovou mobilitní spektrometrií s korónovým výbojem úspěšně detekovala všechna barviva. Detekční limity byly v rozsahu 0,05 až 0,25 $\mu\text{g/g}$, výtěžnost metody byla v rozmezí 81 až 91,3 %. Autoři vyvinuli novou spolehlivou screeningovou metodu stanovení sudanových barviv[82]. Midey s kol. vypracoval novou metodu detekce aditiv a nečistot v potravinách vysokoúčinnou iontovou mobilitní spektrometrií s ionizací elektrosprejem. Testované přídatné látky byly ftaláty, povolená a zakázaná barviva (FD&C Modř č. 1, FD&C Žlut č. 5 a č. 6, FD&C Červeň č. 2 a 40, ponceau 4R, rhodamin B, malachitová zeleň a sudan I) a umělá sladidla. Analýza ftalátů byla až třicetkrát citlivější než konvenční metoda kapalinové chromatografie, a to dokonce v reálných vzorcích nápojů, bez použití náročné úpravy vzorků. Limity detekce barviv byly v rozmezí 0,01 až 0,02 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Novou metodu autoři doporučují k rychlé kontrole potravin[83].

3.9 Srážkový průřez

Iontová mobilitní spektrometrie je post-ionizační separační technika schopná separovat ionty různých tvarů, velikostí a konformací podle jejich srážkového průřezu (Collision Cross Section, CCS, Ω). Separace iontů se odehrává v řádech milisekund, což je vhodné pro spojení s TOF MS. CCS je jedinečná fyzikálně-chemická charakteristika molekuly.[84]. Účinný srážkový průřez je dán interakcí iontu s molekulami driftového plynu[85]. Hodnota CCS je závislá na typu použitého driftového plynu. Čím větší jsou molekuly plynu, tím větší bude srážkový průřez[86].

V případě iontové mobility v driftové trubici může být hodnota CCS vypočtena z driftového času dosazením do Mason-Schampovi rovnice 3, jsou-li známy všechny ostatní veličiny. U iontové mobility s putující vlnou je k určení srážkového průřezu nutná kalibrace. Kalibrace se provádí na standardy se známými hodnotami CCS. Také je vhodné, aby kalibrant byl svou strukturou podobný analytu[87], což je však mnohdy obtížné nebo nemožné zajistit. Iontovou mobilitou s využitím vysokonapěťové asymetrické vlny nelze určit CCS. Je to z důvodu, že na rozdíl od DTIMS a TWIMS se během experimentu může mobilita iontu a tedy jeho CCS měnit. Mobility mohou být různé v slabém a silné elektrickém poli[88].

Srážkový průřez může sloužit k určení struktury neznámé látky. Samotné hodnoty CCS avšak nestačí a je třeba je použít jako komplementární informace k nukleární magnetické rezonanci, hmotnostní spektrometrií či rentgenostrukturální analýze[89]

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Přístroje a chemikálie

K měření vzorků syntetických barviv byly použity *hmotnostní spektrometry s iontovou mobilitou* SYNAPT G2-S HDMS a SELECT SERIES Cyclic IMS (oba Waters, Manchester, Velká Británie) oba vybaveny ionizací elektrosprejem. K dávkování reálných vzorků do hmotnostního spektrometru SYNAPT G2-S HDMS byl použit automatický dávkovač kapalinové chromatografie ACQUITY FTN AutoSampler (Waters, Manchester, Velká Británie). Vzorky standardů a kalibrantů se navažovaly na vahách Mettler Toledo (Praha, Česká republika). Reálné vzorky byly připraveny pomocí centrifugy Eppendorf miniSpin plus a ultrazvuku Elmasonic S 60 H. Nastavení parametrů jednotlivých iontových zdrojů je uvedeno v tabulkách IV, V, VI. Ovládání a sběr dat byly zajištěny prostřednictvím software Waters MassLynx V4.1 SCN909. (Waters, Manchester, Velká Británie).

Tabulka IV Parametry nastavení přístroje SYNAPT G2-S pro měření v negativním módu

parametry	hodnoty
napětí na sprejovací kapiláře (kV)	2,0
napětí na kónusu (V)	40
offset zdroje (V)	100
teplota zdroje (°C)	150
průtok desolvatačního plynu (l/hod)	800
teplota desolvatačního plynu (°C)	600

Tabulka V Parametry nastavení přístroje SYNAPT G2-S pro měření v pozitivním módu

parametry	hodnoty
napětí na sprejovací kapiláře (kV)	2,96
napětí na kónusu (V)	100
offset zdroje (V)	80
teplota zdroje (°C)	150
průtok desolvatačního plynu (l/hod)	400
teplota desolvatačního plynu (°C)	400

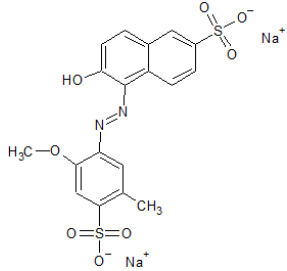
Tabulka VI Parametry nastavení přístroje SELECT SERIES Cyclic IMS pro měření v negativním módu

parametry	hodnoty
napětí na sprejovací kapiláře (kV)	2,0
napětí na kónusu (V)	60
offset zdroje (V)	10
teplota zdroje (°C)	100
průtok desolvatačního plynu (l/hod)	800
teplota desolvatačního plynu (°C)	280

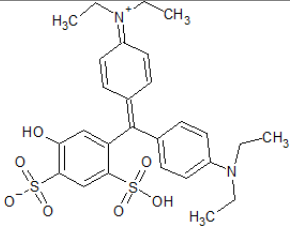
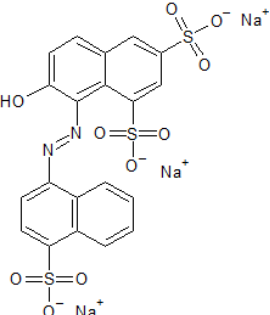
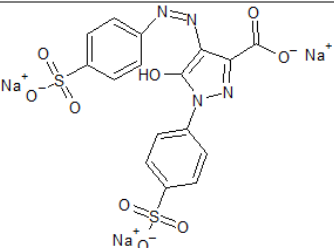
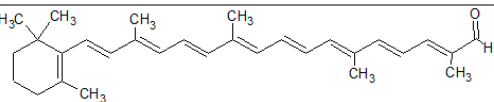
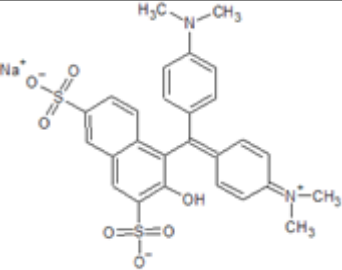
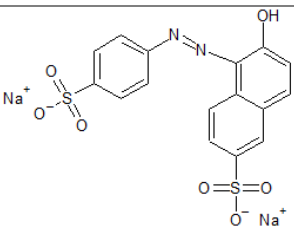
Použité chemikálie: methanol HPLC kvality (Fisher Chemical, Pardubice, Česká republika), voda (upravena na přístroji Direct – Q VV Millipore, Merck, Darmstadt, Německo), kyselina mravenčí p.a. (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika), hydroxid sodný 99 % (Merck Millipore, Praha, Česká republika), acetonitril p.a. (VWR International, Stříbrná Skalice, Česká republika), dimethylsulfoxid HPLC kvality (Merck Millipore), polyalanin (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika).

K analýze byly použity standardy barviv tartrazin, zeleň S, indigo karmín, červeň 2G, žluť SY, chinolinová žluť, brilantní čern BN, erythrosin, brilantní modř, kurkumin, ponceau 4R, patentní modř, allura červeň AC, lithol rubine, *trans*-β-apo-8'-karotenal od výrobce Sigma Aldrich (Praha, Česká republika). Jako reálný vzorek byla použita balení cukrovinek Skittles Fruit, Skittles Sour. Přehled sumárních vzorců, E čísel, monoisotopových relativních molekulových hmotností a struktur analyzovaných barviv je uveden v tabulce VII.

Tabulka VII Přehled sumárních vzorců, E čísel, monoisotopových molekulových hmotností a struktur použitých barviv

Název	Označení	Sumární vzorec	Monoisotopová relativní molekulová hmotnost	Struktura
Allura červeň AC	E 129	C ₁₈ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ S ₂	495,9987	

Brilantní čern BN	E 151	$C_{28}H_{17}N_5Na_4O_{14}S_4$	866,9246	
Brilantní modř FCF	E 133	$C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$	792,1222	
Červeň 2G	E 128	$C_{18}H_{13}N_3Na_2O_8S_2$	508,9939	
Erythrosin	E 127	$C_{20}H_{6}I_4Na_2O_5$	879,6189	
Chinolinová žlut'	E 104	$C_{18}H_{11}NO_2$	273,0790	
Indigokarmín	E 132	$C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$	465,9517	
Kurkumin	E 100	$C_{21}H_{20}O_6$	368,1260	
Litholrubin	E 180	$C_{18}H_{12}N_2CaO_6S$	424,0042	

Patentní modř V	E 131	$C_{27}H_{31}N_2O_7S_2$	559,1573	
Ponceau 4R	E 124	$C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$	603,9269	
Tartrazin	E 102	$C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$	533,9504	
Trans-β-apo-8'-karotenal	E 160	$C_{30}H_{40}O$	416,3079	
Zeleň S	E 142	$C_{27}H_{25}N_2NaO_7S_2$	576,1001	
Žlutý SY	E 110	$C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$	451,9725	

Informace o výše uvedených barvivech byly čerpány z chemické databáze PubChem patřící společnosti National Center for Biotechnology Information ke dni 12.10.2019[90].

4.2 Pracovní postup

4.2.1 Příprava zásobních roztoků barviv

Koncentrace zásobních roztoků barviv byla 0,1 mg/ml. Navážky všech standardů barviv kromě látky Litholrubin byly rozpuštěny v odpovídajícím objemu směsi rozpouštědel methanol:voda (1:1, v/v). Navážka barviva Litholrubin byla rozpuštěna v odpovídajícím objemu rozpouštědla dimethylsulfoxidu. Ředěním směsí rozpouštědel methanol:voda (1:1, v/v) byly připraveny pracovní roztoky o koncentraci 1 µg/ml. Pracovní roztoky byly zfiltrány přes 13 mm PTFE mikrofiltr s velikostí pórů 0,22 µm (Labicom, Olomouc, Česká republika).

4.2.2 Příprava kalibrantů

Nejprve se připravil zásobní roztok polyalaninu o koncentraci 1 mg/ml ve směsi H₂O:ACN (1:1, v/v). Poté bylo připraveno 10 ml pracovního roztoku (2 µg/ml), který obsahoval 20 µl zásobního roztoku polyalaninu, 1 µl 0,1% HCOOH, odměrná baňka se nakonec doplnila po rysku směsí H₂O:ACN (1:1, v/v).

Druhý kalibrační roztok byl mravenčan sodný. Objem 10 ml kalibrantu obsahoval 1 ml 0,1 mol/l NaOH, 1 ml 10% HCOOH a poté byl doplněn po rysku směsí H₂O:ACN (1:4, v/v).

4.2.3 Příprava reálných vzorků

Pro analýzu byly použity bonbóny Skittles Fruit a Skittles Sour. Příprava vzorků bonbónů spočívala v odebrání třech bonbónů stejné barvy z každého balení. Trojice se ponořily do dimethylsulfoxidu a ponechaly v ultrazvuku po dobu 4 min. Odbarvené bonbóny byly vyjmuty a barevné roztoky byly naředěny 50 krát směsí methanol:voda (1:1, v/v). Z naředěných barevných roztoků byly odebrány 2 ml do mikrozkušavek Eppendorf, které byly centrifugovány při 1400 otáčkách za minutu a následně měřeny.

4.2.4 Průběh měření

Měření jednotlivých barviv a polyalaninu (kalibrace pro stanovení CCS) probíhalo v návaznosti za sebou. Nejprve byl proměřen polyalanin, po kterém následovalo šest měření barviva a na závěr byl opět proměřen polyalanin. Všechna měření standardů i kalibrace

probíhaly přímým zaváděním pracovních roztoků do iontového zdroje průtokem 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. U přístroje SELECT SERIES Cyclic IMS muselo být měření kalibrantu opakováno dodatečně. Hmotnostní kalibrace byla prováděna na mravenčan sodný (průtok 10 $\mu\text{l}/\text{min}$).

U přístroje SELECT SERIES Cyclic IMS bylo měření reálných vzorků provedeno přímou infúzí. Měření reálných vzorků na hmotnostním spektrometru SYNAPT G2-S byla provedena ve spojení s automatickým dávkovačem kapalinové chromatografie. Objem 10 μl vzorku byl dávkován do mobilní fáze, kterou byla H_2O , o průtoku 0,4 ml/min. Doba analýzy byla nastavena na 2 min.

4.2.5 Zpracování dat v programu DriftScope

DriftScope je součástí softwaru MassLynx a slouží k vyhodnocení záznamů získaných iontovou mobilitou. Kromě prohlížení dat, odečítání driftových časů, určování CCS je využíván k exportu dat do prostředí MassLynx. Pro určování hodnot CCS byla využita manuální kalibrace a následující postup (nebyl použit Driftscope). Hodnoty m/z , náboje, molekulové hmotnosti a driftového času pro standardy byly zadány do excelovského prostředí „CCS calibration spreadsheet“ (poskytnuto firmou Waters, © Johanna Hofmann, Kevin Pagel, Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft, Berlin), ve kterém byly vypočteny kalibrační závislosti a ty následně aplikovány na měřené látky[91–93]. Kalibrace byla založena na logaritmické závislosti:

$$\ln(\text{CCS}') = x \ln(dt') + \ln A \quad (5)$$

Na základě experimentálních dat pro kalibrant (polyalanin) byly pro Synapt zjištěny hodnoty parametrů $x = 0,4964$, $A = 447,4$. Pro SELECT SERIES Cyclic IMS pak hodnoty nabývají hodnot $x = 0,4317$, $A = 585,2$.

V rovnici 5 jsou hodnoty korigovaného driftového času (dt') a korigovaného srážkového průřezu (CCS') dány rovnicemi 6 a 7.

$$dt' = dt - \frac{\sqrt{\frac{m}{z}} * C}{1000} \quad (6)$$

kde dt' je korigovaný driftový čas v ms, dt experimentálně stanovený driftový čas v ms. C je konstanta pro daný přístroj, pro SYNAPT G2-S $C = 1,41$ ms, pro SELECT SERIES Cyclic IMS $C = 1,50$ ms.

$$CCS' = \frac{CCS}{\left[|z| * \left(\frac{1}{M} + \frac{1}{m}\right)\right]} \quad (7)$$

kde CCS' je korigovaný srážkový průřez, CCS experimentálně zjištěný srážkový průřez, z náboj, M hmotnost iontu, m hmotnost driftového plynu (zde dusíku, tedy 28).

Koeficient determinace byl pro kalibrační závislost větší než 0,99. Aplikací vytvořené kalibrace na mobilitní data barviv byly získány příslušné hodnoty CCS . Určovány byly pro průměrnou hodnotu driftového času získanou ze šesti měření.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

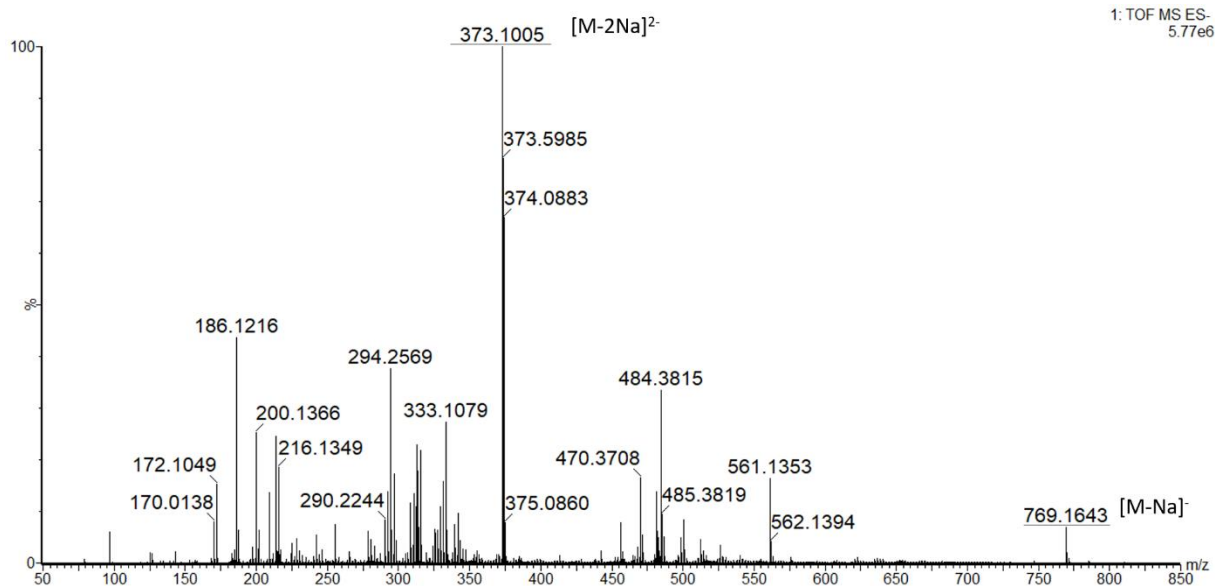
5.1 Analýza standardů barviv

Hmotnostním spektrometrem SYNAPT G2-S byla provedena měření všech standardů barviv v pozitivním i negativním módu s cílem vybrat ionty barviv, na které bude zaměřena iontově mobilitní separace. Samotnému měření předcházela optimalizace za účelem nalezení nejvhodnějších podmínek pro nadcházející analýzy. Použité parametry jsou shrnuty v tabulce IV a V. Sběr dat pro jedno měření trval vždy jednu minutu. Rychlost putující vlny pro mobilitní separaci byla nastavena na 700 m/s, výška vlny na 40 V tak, aby driftové časy iontů analyzovaných látek a iontů standardů (polyalanin) byly v jednom mobilitním okně probíhajícího měření. Pro každou dávku iontů vyslanou do mobilitní cely má přístroj jedno mobilitní okno. V případě dlouhých driftových časů by ionty z této dávky mohly být zaznamenány až v dalším mobilitním okně, které přísluší už jiné dávce iontů. Barviva s výjimkou tartrazinu a *trans*- β -apo-8'-karotenalu byla úspěšně ionizována, a to alespoň v jednom módu. Standardy barviv, které byly úspěšně ionizovány v negativním módu na SYNAPTU G2-S, byly následně analyzovány hmotnostním spektrometrem SELECT SERIES Cyclic IMS za podmínek shrnutých v tabulce VI. Rychlost putující vlny pro mobilitní separaci u tohoto přístroje byla nastavena na 375 m/s, výška vlny na 15 V. Ionty barviv detekované SYNAPT G2-S byly také detekovány hmotnostním spektrometrem s cyklickou iontovou mobilitou. Všechna měření byla provedena šestkrát z důvodu dostatečně reprezentativního porovnávání výsledků mezi přístroji.

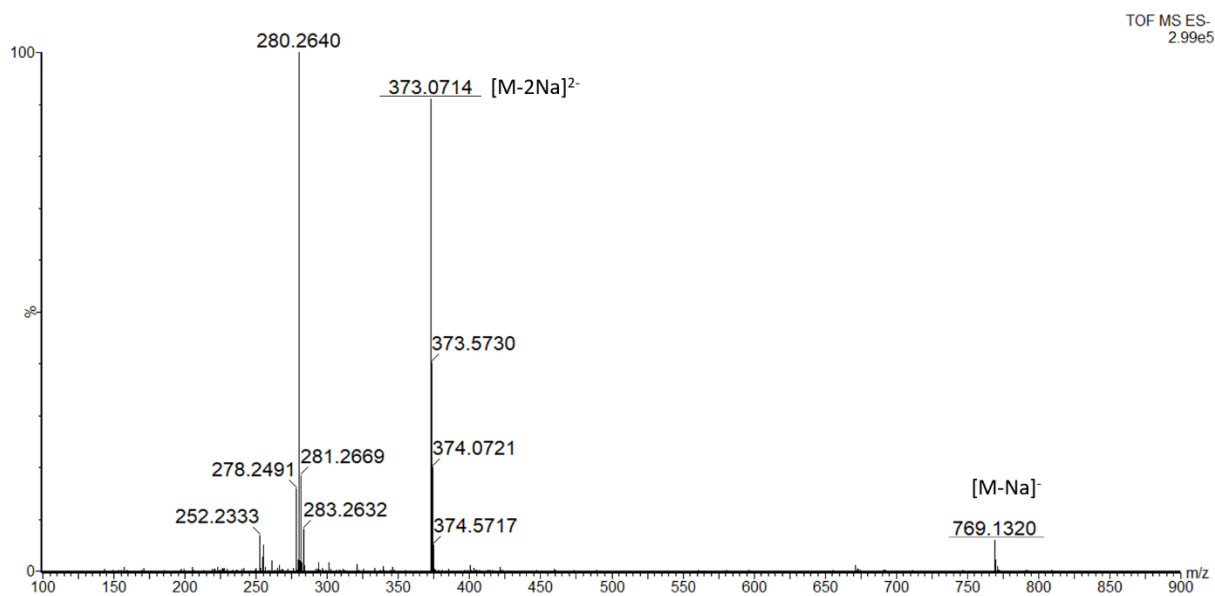
Ilustrační spektra ionizovaných barviv získaných hmotnostním spektrometrem SYNAPT-G2-S jsou uvedena na obrázcích 7, 9, 11, 13. Pro srovnání jsou na obrázcích 8, 10, 12 a 14 zobrazena spektra získaná hmotnostním spektrometrem SELECT SERIES Cyclic IMS. Zbylá spektra jsou uvedena v příloze 8.1. Přehled jednotlivých iontů barviv s hodnotami m/z měřených v negativním a pozitivním módu SYNAPTEM G2-S je shrnut v tabulce VIII. Ionty, které byly detekovány v negativním módu hmotnostním spektrometrem SELECT SERIES Cyclic IMS jsou shrnuty v tabulce IX. Jak je patrné z obou tabulek (Tab. VIII a IX), oba přístroje poskytovaly stejné primární ionty barviv.

Většina barviv byla lépe ionizovaná v záporném módu. Jelikož je většina analyzovaných barviv organickou sodnou solí, v negativním módu byla často pozorována přítomnost iontů odvozených od jejich molekul odebráním sodného iontu, resp. sodných iontů. U některých barviv se také vyskytovaly i ionty bez dvou sodných iontů s jedním protonem $[M-2Na+H]^-$ (např. erythrosin Obr. 9, 10). Analogicky u litholrubinu, který je

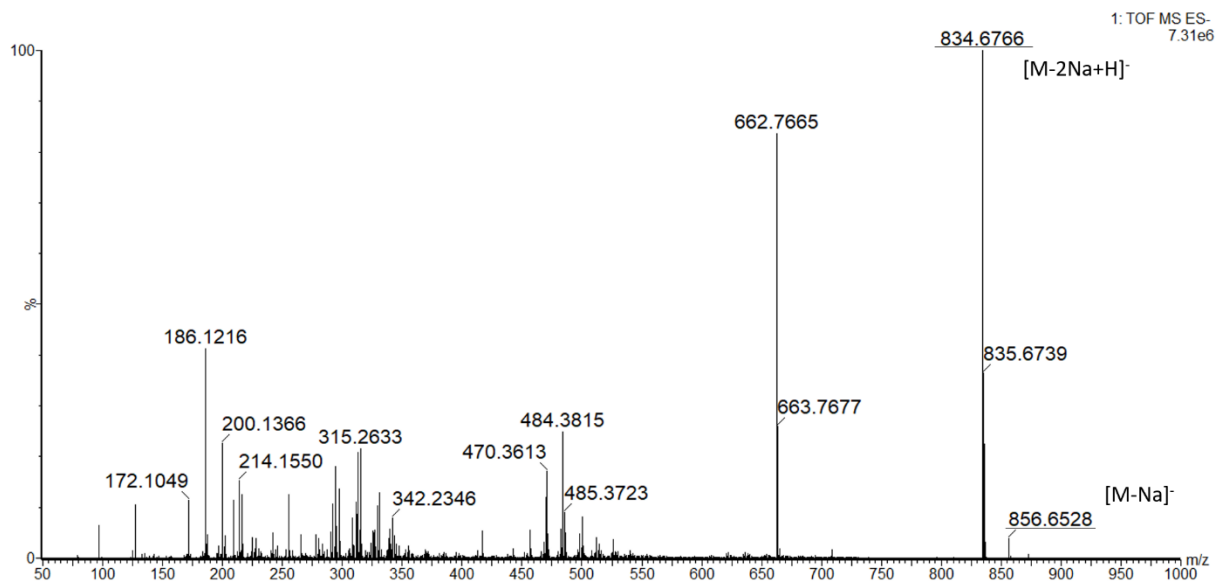
dodán ve formě vápenaté soli, vznikal ion odebráním vápenatého kationtu. Některé ionty jako např. kurkumin poskytovaly deprotonovanou molekulu $[M-H]^-$. V některých případech (např. brilantní modř, obr. 7) byly detekovány vícenásobně nabitě ionty, dvou až třínásobně. Při bližším porovnání SYNAPTEM G2-S v negativním módu brilantní modř poskytovala jednou nabitý ion $[M-Na]^-$ s hodnotou m/z 769,1643 (hodnoty nejsou korigovány na m/z vnitřního standardu) (Obr. 7). Dominantním píkem ve spektru je dvojnásobně nabitý ion $[M-2Na]^{2-}$ s m/z 373,1005. V hmotnostním spektru SELECT SERIES Cyclic IMS nalezneme rovněž tyto ionty brilantní modři $[M-Na]^-$ a $[M-2Na]^{2-}$ (Obr. 8). V hmotnostních spektrech barviva erythrosinu (Obr. 9 a 10) vidíme dominantní ion $[M-2Na+H]^-$ s hodnotou m/z 834,6766 a m/z 834,6507. Ionu $[M-Na]^-$ odpovídá m/z 856,6528 a m/z 856,6316. V případě barviva brilantní černi byl ve spektru detekován pouze ion $[M-4Na+H]^{3-}$ (Obr. 11, 12). Žádný signál v oblasti nad m/z 700, kde by mohly být jednou nabitě ionty, nebyl detekován. Ve spektru SELECT SERIES Cyclic IMS má ion $[M-4Na+H]^{3-}$ nízkou intenzitu (Obr. 12). Porovnávání intenzit iontů však nebylo cílem předložené práce. Obecně lze poznamenat, že o intenzitě nerozhoduje pouze samotná ionizace, ale i transmise iontů. Ke snížení intenzity může vést kolizí indukovaná disociace, která je rovněž ovlivňována nastavením iontové optiky a přítomností plynů/par ve vakuované části přístroje. Všechny podmínky, které by měly být zvažovány pro porovnávání intenzit signálů u obou přístrojů, nebyly testovány a kontrolovány. Na obrázku 13 je zobrazeno hmotnostní spektrum žluti SY ze SYNAPTEM G2-S, ve kterém byly detekovány ionty vzniklé odebráním sodného ionty. Jsou to ionty $[M-2Na+H]^-$ s m/z 407,0154 a $[M-Na]^-$ s m/z 428,9930. Stejně ionty byly také detekovány přístrojem SELECT SERIES Cyclic IMS (Obr. 14).



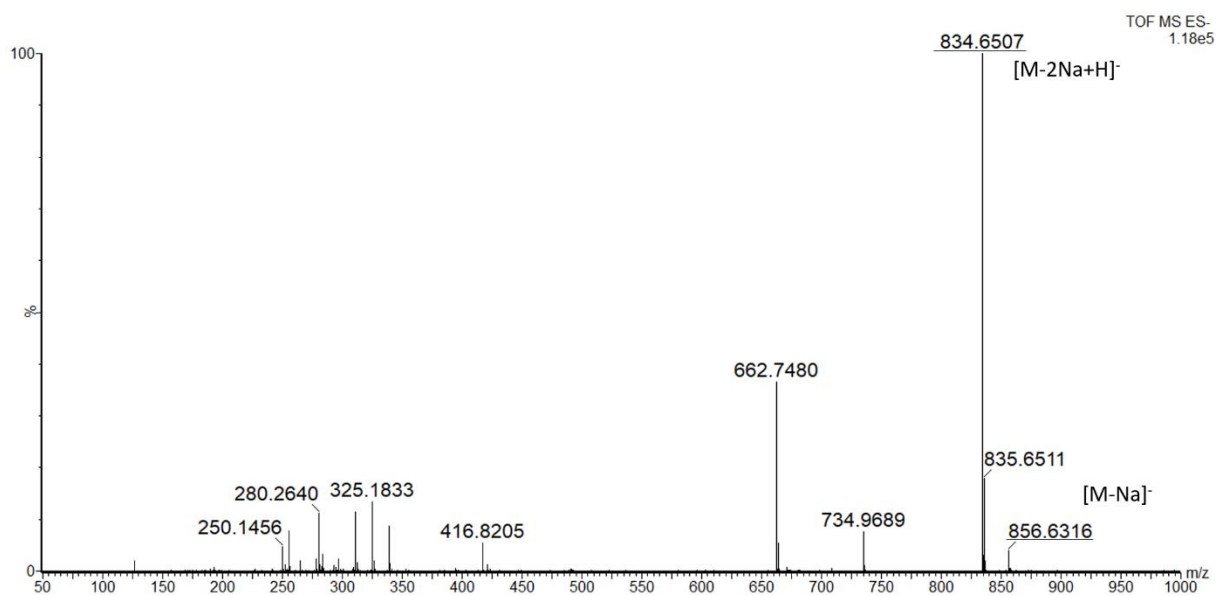
Obrázek 7 Hmotnostní spektrum brilantní modři z hmotnostního spektrometru SYNAPT G2-S v negativním módu



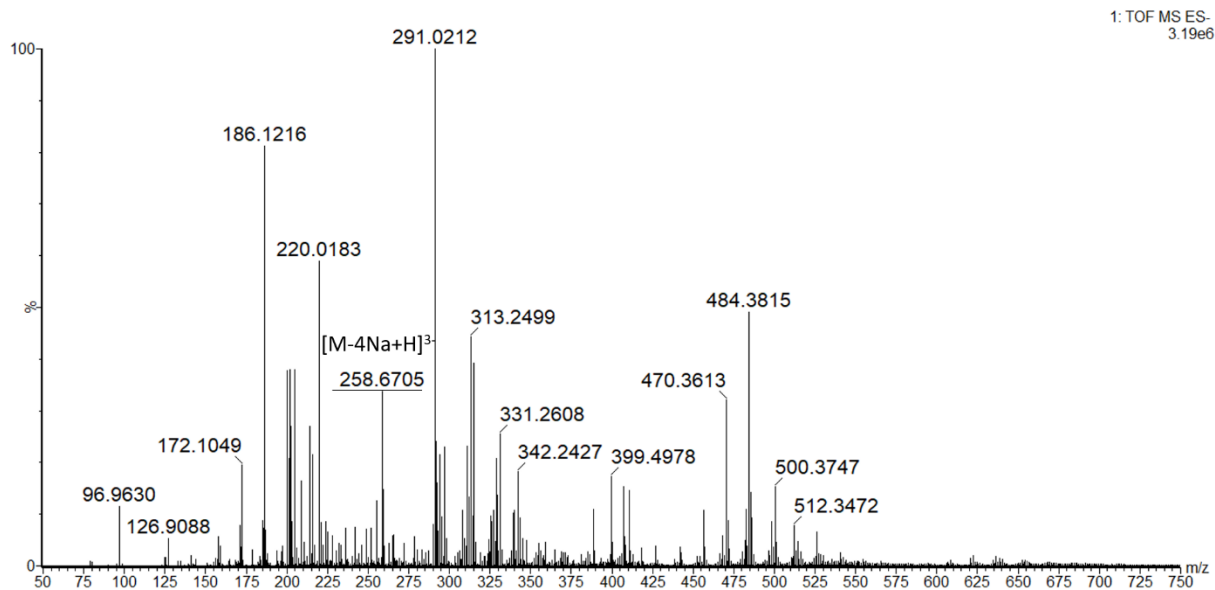
Obrázek 8 Hmotnostní spektrum brilantní modři získané hmotnostním spektrometrem SELECT SERIES Cyclic IMS, měřeno v negativním módu



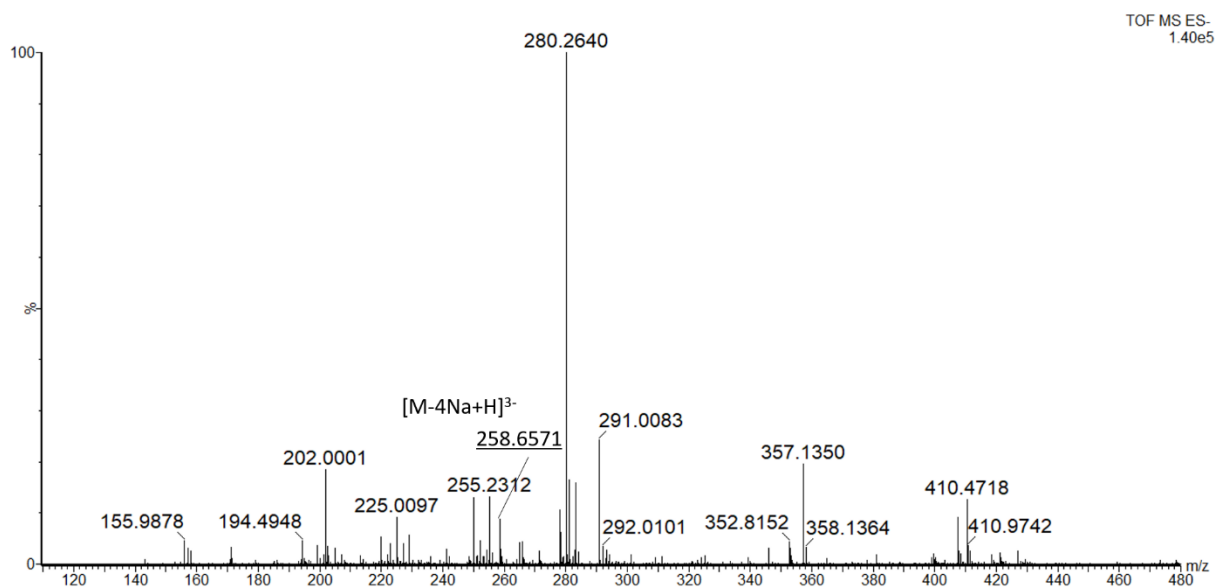
Obrázek 9 Hmotnostní spektrum erythrosinu z hmotnostního spektrometru SYNAPT G2-S
v negativním módu



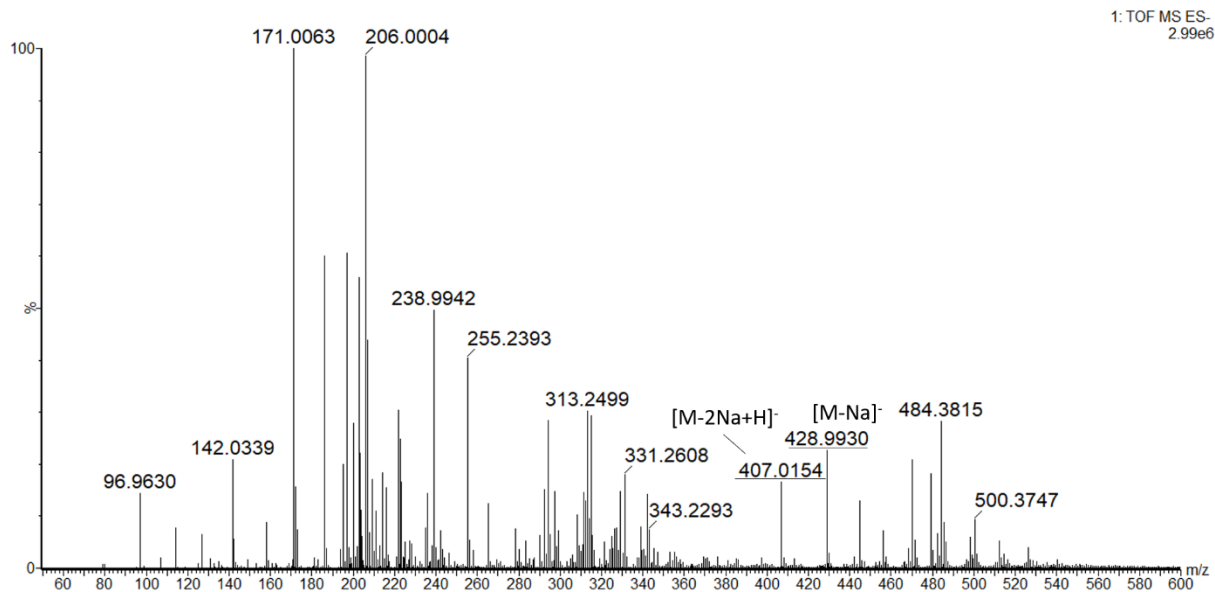
Obrázek 10 Hmotnostní spektrum erythrosinu získané hmotnostním spektrometrem
SELECT SERIES Cyclic IMS, měřeno v negativním módu



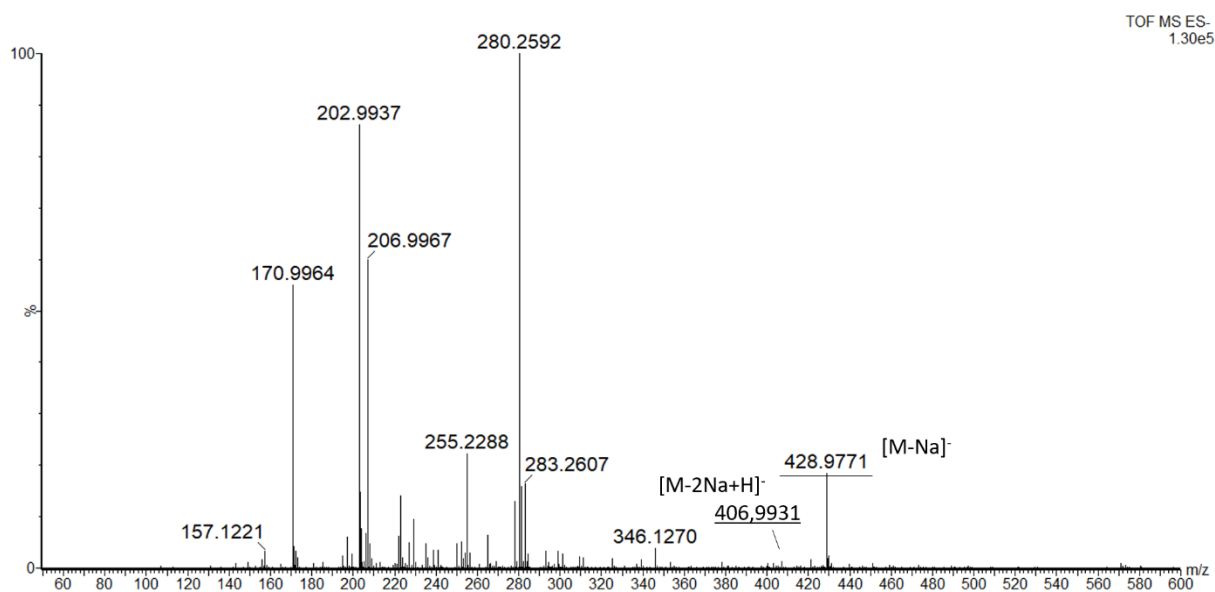
Obrázek 11 Hmotnostní spektrum brilantní černi z hmotnostního spektrometru SYNAPT G2-S v negativním módu



Obrázek 12 Hmotnostní spektrum brilantní černi získané hmotnostním spektrometrem SELECT SERIES Cyclic IMS, měřeno v negativním módu



Obrázek 13 Hmotnostní spektrum žlti SY z hmotnostního spektrometru SYNAPT G2-S v negativním módu



Obrázek 14 Hmotnostní spektrum žlti SY získané hmotnostním spektrometrem SELECT SERIES Cyclic IMS, měřeno v negativním módu

Tabulka VIII Přehled analyzovaných barviv, jejich iontů s průměrnou hodnotou m/z a rozdělení podle módů, měřeno SYNAPT G2-S

Barviva	primární ionty	
	záporný mód	kladný mód
Allura červeně	451,0697 [M-2Na+H] ⁻	-
	225,0398 [M-2Na] ²⁻	
Brilantní černě	258,6705 [M-4Na+H] ³⁻	-
	769,1643 [M-Na] ⁻	-
Brilantní modř	373,1005 [M-2Na] ²⁻	
	464,0336 [M-2Na+H] ⁻	511,2616 [M+H] ⁺
Červeně 2G	231,5170 [M-2Na] ²⁻	-
	834,6745 [M-2Na+H] ⁻	-
Erythrosin	856,6507 [M-Na] ⁻	-
	272,0823 [M-H] ⁻	274,0919 [M+H] ⁺
Chinolinová žluť	-	467,2317 [M+H] ⁺
	367,1460 [M-H] ⁻	-
Indigokarmín	385,0879 [M-Ca+H] ⁻	425,0366 [M+H] ⁺
	559,2071 [M-H] ⁻	561,2054 [M+H] ⁺
Patentní modř	580,9823 [M-Na] ⁻	605,4504 [M+H] ⁺
	Tartrazin	-
<i>trans</i> -β-apo-8'-karotenal	-	-
	553,1254 [M-Na] ⁻	577,1025 [M+H] ⁺
Zeleň S	-	555,1239 [M-Na+2H] ⁺
	407,0154 [M-2Na+H] ⁻	453,21705 [M+Na] ⁺
Žluť SY	428,9930 [M-Na] ⁻	

Tabulka IX Přehled analyzovaných barviv, jejich primárních iontů s průměrnou hodnotou m/z v negativním módu, měřeno SELECT SERIES Cyclic IMS

Barviva	primární ionty
	záporný mód
Allura červeně	451,0265 [M-2Na+H] ⁻
	225,0097 [M-2Na] ²⁻
Brilantní černě	258,6576 [M-4Na+H] ³⁻
Brilantní modř	769,1329 [M-Na] ⁻
	373,1005 [M-2Na] ²⁻
Červeně 2G	464,0248 [M-2Na+H] ⁻
	231,5086 [M-2Na] ²⁻
Erythrosin	834,6502 [M-2Na+H] ⁻
	856,6324 [M-Na] ⁻
Chinolinová žlutě	272,0664 [M-H] ⁻
Kurkumin	367,1147 [M-H] ⁻
Lithol rubine	385,0442 [M-Ca+H] ⁻
Patentní modř	559,1550 [M-H] ⁻
Ponceau 4R	580,9384 [M-Na] ⁻
Zeleň S	553,1001 [M-Na] ⁻
Žlutě SY	428,9771 [M-Na] ⁻
	406,9967 [M-2Na+H] ⁻

Na základě proměření hmotnostních spekter byly pro většinu látek zvoleny pro iontově mobilní spektrometrii jednonásobně nabitě ionty. Pouze u brilantní černě ([M-4Na+H]³⁻) byla mobilní separace prováděna s vícenásobně nabitými ionty.

5.2 Iontová mobilita

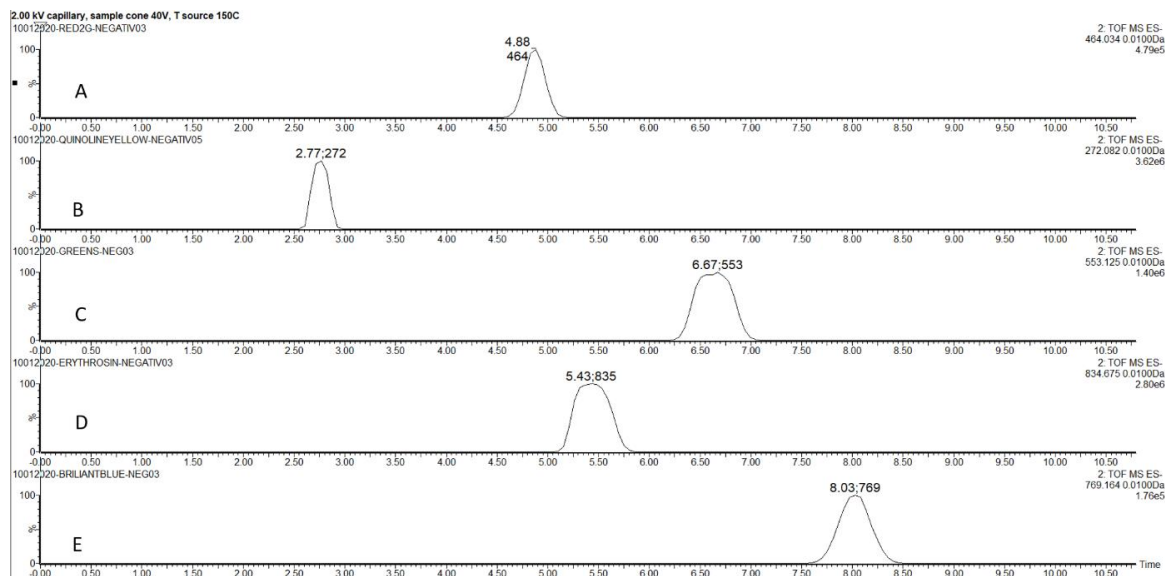
Na obrázcích 15 a 16 jsou zobrazeny mobilogramy pro nejintenzivnější jednonásobně nabitě ionty barviv detekovaných v negativním módu přístrojem SYNAPT G2-S. Mobilogramy pro stejné ionty detekované přístrojem SELECT SERIES Cyclic IMS jsou zobrazeny na obrázcích 17 a 18. Barvivo brilantní černě je jediná výjimka, neboť je sledován trojnásobně nabitý ion $[M-4Na+H]^{3-}$ a příslušné mobilogramy jsou zobrazeny zvlášť na obrázku 20.

V mobilogramu kurkuminu (Obr. 16 D) jsou vidět dva píky s různými driftovými časy. Příčinou je existence iontů kurkuminu ve dvou formách různého tvaru. Obecně přítomnost dvou a více píků může být důsledkem přítomnosti izomerů, lokalizací náboje na různých místech molekuly nebo existencí konformerů. Také v mobilogramu barviva ponceau 4R jsou vidět dva píky s různými driftovými časy (Obr. 16 A). Tento trend je pozorován i v mobilogramech z přístroje SELECT SERIES Cyclic IMS, kdy kurkumin poskytuje dva píky, stejně tak i ponceau 4R (Obr. 18). Zmíněné efekty vedoucí k vícero píkům se mohou projevit i pouhým rozšířením píků (např. zeleň S, erythrosin, patentní modř či litholrubin). Jediný významnější rozdíl mezi mobilogramy obou přístrojů byl pozorován u erythrosinu m/z 856 (Obr. 19). Na mobilogramu přístroje SYNAPT G2-S (Obr. 19 A) je pouze jeden pík s driftovým časem 5,37 ms. Na mobilogramu SELECT SERIES Cyclic IMS jsou zobrazeny píky tři s driftovými časy 27,85 ms; 35,11 ms a 52,60 ms (Obr. 19 B).

V tabulce X jsou pro oba testované přístroje uvedeny následující vypočtené parametry ze šesti měření: aritmetický průměr hodnot driftových časů, směrodatná odchylka a RSD měření. Z uvedených hodnot je zřejmé, že driftové časy získané SELECT SERIES Cyclic IMS jsou delší než je tomu u SYNAPT G2-S, což je dáno konstrukcí mobilitní cely, která je delší (driftové časy lze ovlivnit také nastavením parametrů putující vlny). Nejvyšší hodnota směrodatné odchylky pro SYNAPT G2-S činí 0,04 (v případě patentní modři a erythrosinu) zatímco pro SELECT SERIES Cyclic IMS je 0,01 pro chinolinovou žlutě. Nejvyšší hodnota RSD obou přístrojů byla dosažena u chinolinové žlutě, která pro SYNAPT G2-S činila 1,26 % a pro SELECT SERIES Cyclic IMS 0,03 %. Porovnáním směrodatných odchylek a RSD obou přístrojů lze dojít k závěru, že SELECT SERIES Cyclic IMS poskytuje preciznější výsledky. U obou přístrojů jsou ale uvedené chyby velmi malé a je na nich dosahováno i velmi dobré opakovatelnosti měření driftových časů, kdy i po několika dnech může být rozdíl do 1 binu (přístroje dělí škálu driftového času na 200 binů).

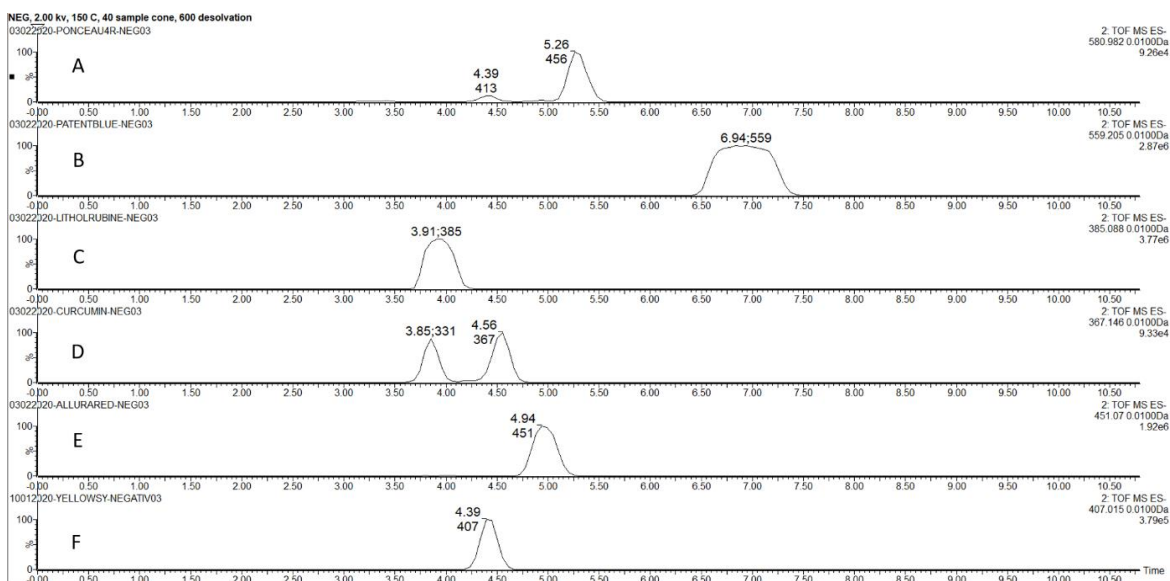
V tabulce XI jsou shrnuty vypočtené CCS hodnoty obou přístrojů pro vybrané jednou nabitě ionty barviv s výjimkou brilantní černi, u které je CCS vypočteno pro trojnásobně nabitý ion. V tabulce jsou také vyznačeny hodnoty m/z (průměrné hodnoty m/z šesti měření), které byly zahrnuty ve výpočtu. V případě kurkuminu, erythrosinu a ponceau 4R byly CCS hodnoty vypočteny pro všechny driftové časy, do grafu korelace ale byly zahrnuty pouze nejvyšší CCS hodnoty.

Porovnání CCS mezi přístroji zobrazuje graf na obrázku 21. Graf byl sestaven pro CCS hodnoty jednou nabitých iontů z tabulky XI. Jelikož se u kurkuminu a ponceau 4R vyskytují dva driftové časy k jedné hodnotě m/z , v grafu je zahrnuta vyšší hodnota CCS. V případě barviva erythrosin byl do grafu zahrnut ion m/z 834. V grafu je vyznačena rovnice přímky proložené body $y = 1,002x$ a koeficient determinace $R^2 = 0,9920$. V grafu je také vyznačený odlehlejší bod patřící CCS hodnotě brilantní černi jejíž ion byl třikrát nabitý. Pro takové ionty by bylo potřeba kalibraci zlepšit např. volbou kalibračních iontů se stejným nábojem. Porovnání přístrojů z hlediska shody hodnot CCS pro vícenásobně nabitě ionty může být námětem dalšího studia. Největší rozdíl mezi hodnotami CCS je u vyšší hodnoty CCS kurkuminu. Z grafu je patrné, že data spolu velmi dobře korelují. Směrnice přímky blízká hodnotě 1 ukazuje i na velmi dobrou shodu naměřených hodnot pro jednotlivé látky. Dosažené výsledky naznačují dobrou přenositelnost hodnot CCS mezi přístroji a v důsledku možnost využít CCS hodnot v identifikaci, i když měření budou prováděna na jednom nebo druhém přístroji. Pozorované odchylky v hodnotách CCS mezi přístroji mohou být zčásti způsobené dodatečnou kalibrací přístroje SELECT SERIES Cyclic IMS, kdy kalibrace byla oproti měření vzorků provedena s časovým odstupem.



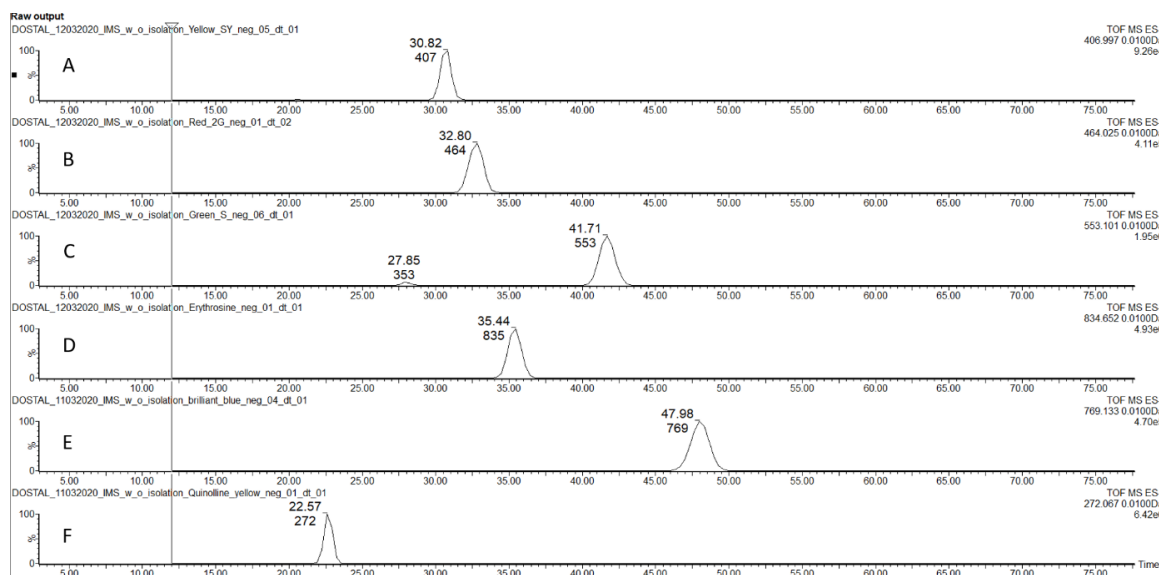
Obrázek 15 Mobilogramy standardů barviv získané na SYNAPT G2-S v negativním módu.

A) červen 2G (m/z 464,034); B) chinolinová žlut' (m/z 272,082); C) zeleň S (m/z 553,125);
D) erythrosin (m/z 834,675); E) brilantní modř (m/z 769,164)

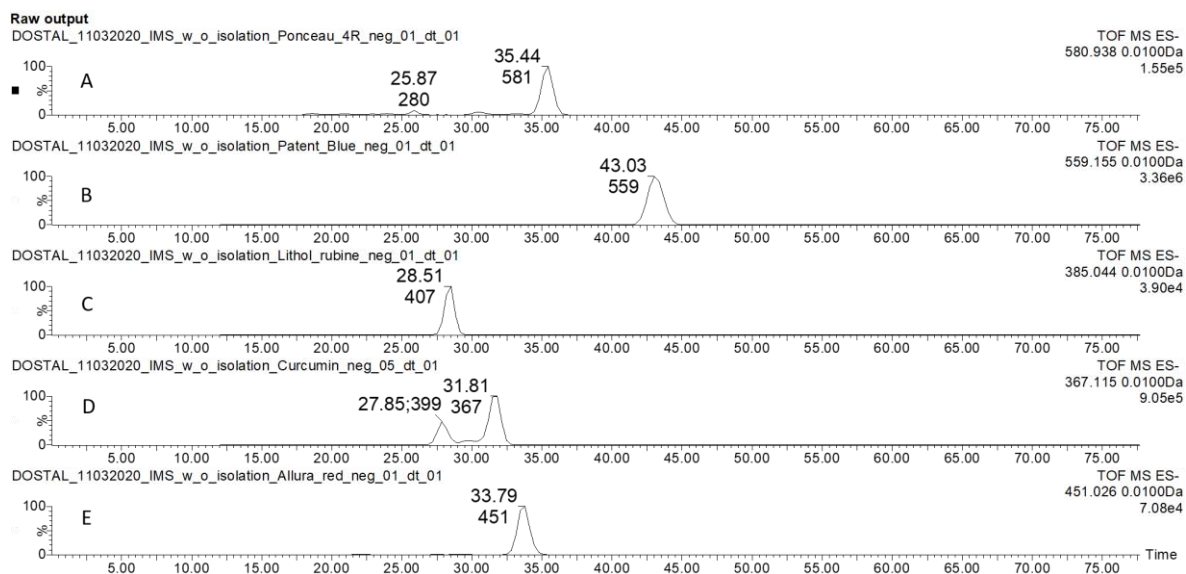


Obrázek 16 Mobilogramy standardů barviv získané na SYNAPT G2-S v negativním módu.

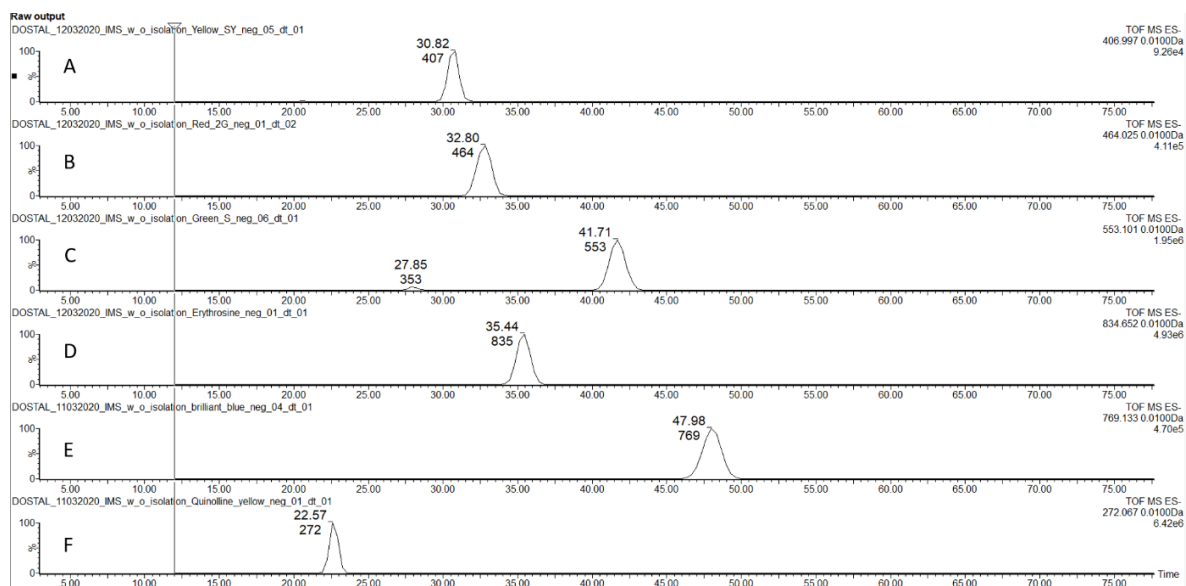
A) ponceau 4R (m/z 580,982); B) patentní modř (m/z 559,205); C) litholrubin (m/z 385,088); D) kurkumin (m/z 367,146), E) allura červen (m/z 451,07), F) žlut' SY (m/z 407,015)



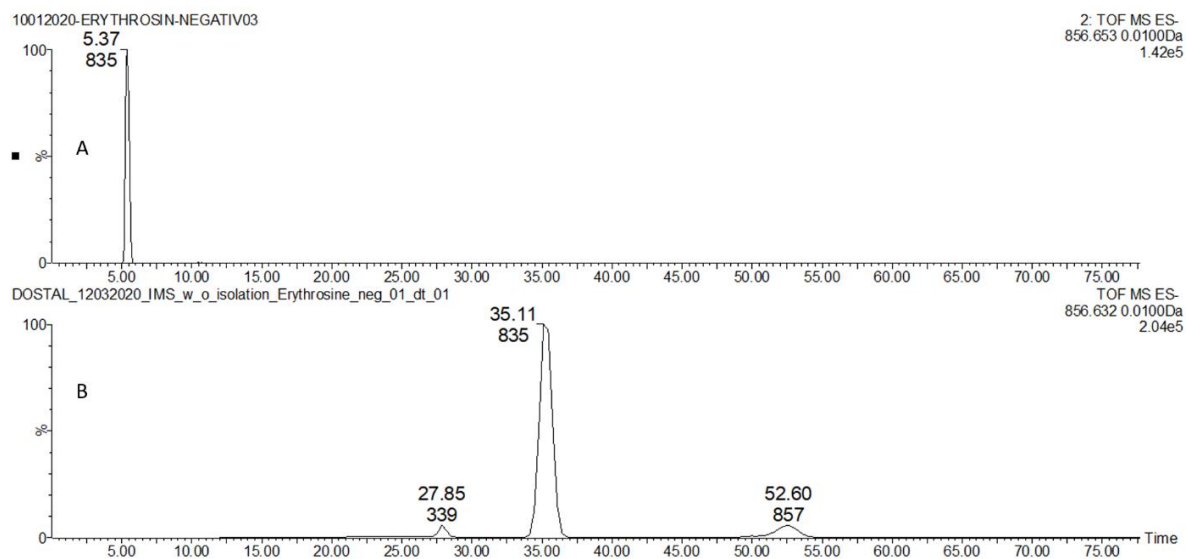
Obrázek 17 Mobilogramy standardů barviv získané na SELECT SERIES Cyclic IMS v negativním módu. A) žlutý SY (m/z 406,997); B) červený 2G (m/z 464,025); C) zelený S (m/z 553,101); D) erythrosin (m/z 834,652); E) brilantní modř (m/z 769,133); F) chinolinová žlutá (m/z 272,067)



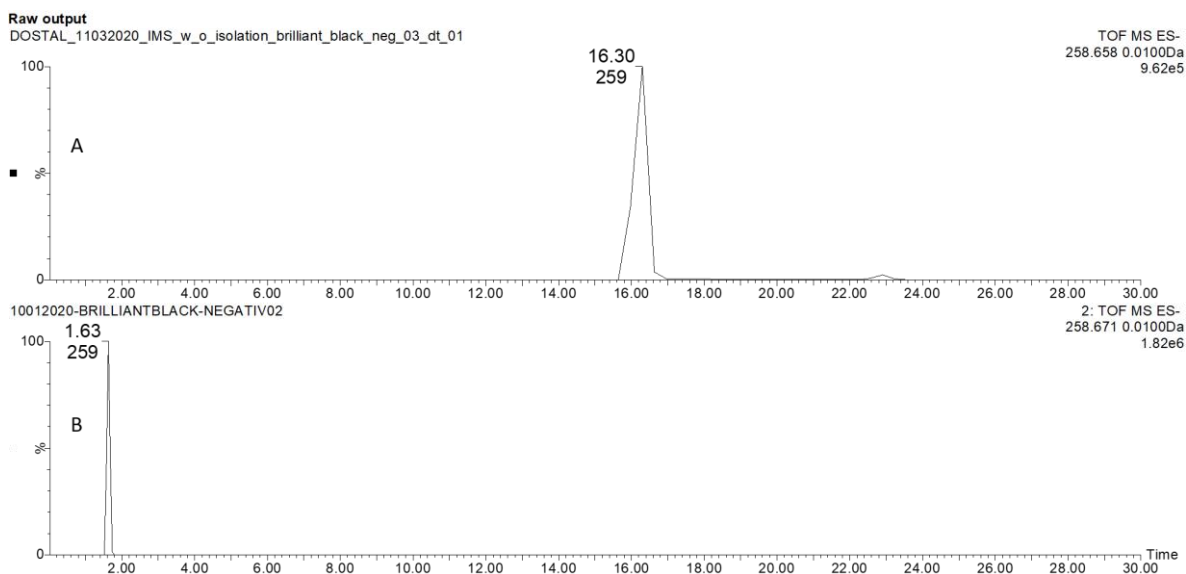
Obrázek 18 Mobilogramy standardů barviv získané na SELECT SERIES Cyclic IMS v negativním módu. A) ponceau 4R (m/z 580,938); B) patentní modř (m/z 559,155); C) litholrubin (m/z 385,044); D) kurkumin (m/z 367,115); E) allura červená (m/z 451,026)



Obrázek 18 Mobilogramy standardů barviv získané na SELECT SERIES Cyclic IMS v negativním módu. A) žluť SY (m/z 406,997); B) červeň 2G (m/z 464,025); C) zeleň S (m/z 553,101); D) erythrosin (m/z 834,652); E) brilantní modř (m/z 769,133); F) chinolinová žluť (m/z 272,067)



Obrázek 19 Mobilogram erythrosinu (m/z 856,6) v negativním módu. A) mobilogram získaný na SYNAPT G2-S; B) mobilogram získaný na SELECT SERIES Cyclic IMS



Obrázek 20 Mobilogram brilantní černi (m/z 258,6) v negativní módu. A) mobilogram získaný SELECT SERIES Cyclic IMS; B) mobilogram získaný SYNAPT G2-S

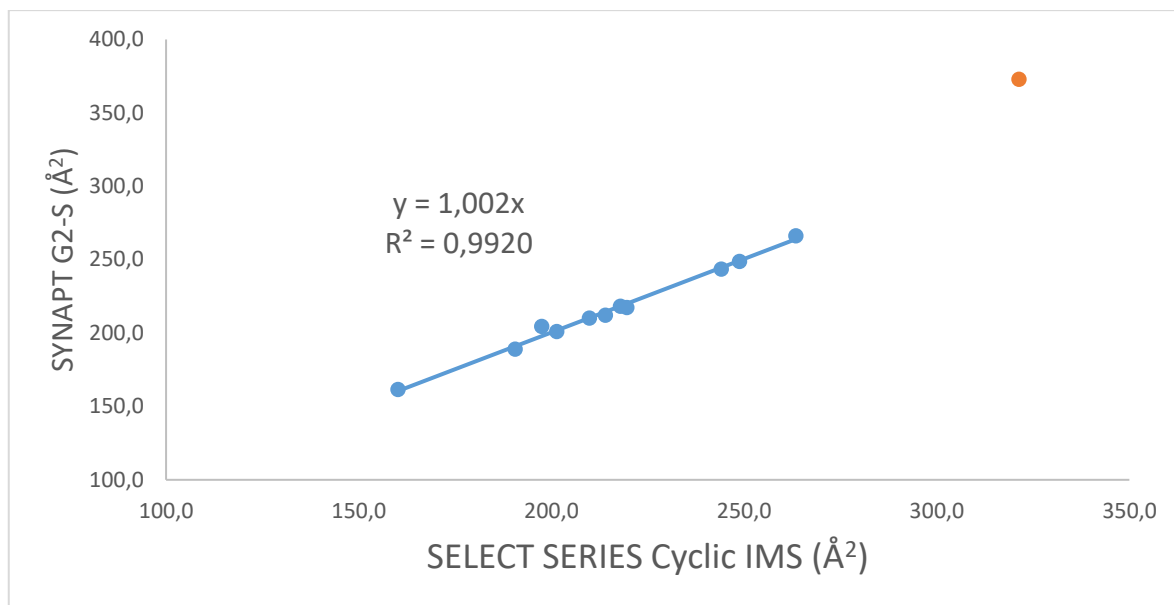
Tabulka X Porovnání naměřených hodnot driftového času t_d (ms) barviv mezi přístrojem SYNAPT G2-S a SELECT SERIES Cyclic IMS

SYNAPT G2-S				Cyklická iontová mobilita		
barvivo	průměrná hodnota t_d (ms)	směrodatná odchylka	RSD (%)	průměrná hodnota t_d (ms)	směrodatná odchylka	RSD (%)
Allura červeň (m/z 451)	4,94	0,00	0,00	33,79	0,00	0,00
Brilantní černě (m/z 258)	1,63	0,00	0,00	16,30	0,00	0,00
Brilantní modř (m/z 769)	8,03	0,00	0,00	47,98	0,00	0,00
Červeň 2G (m/z 464)	4,88	0,00	0,00	32,80	0,00	0,00
Erythrosin (m/z 834)	5,43	0,04	0,75	35,44	0,00	0,00

Erythrosin (m/z 856)	5,37	0,00	0,00	27,85	0,00	0,00
				35,11	0,00	0,00
				52,60	0,00	0,00
Chinolinová žluť (m/z 272)	2,77	0,03	1,26	22,57	0,01	0,03
Kurkumín (m/z 367)	4,56	0,00	0,00	31,81	0,00	0,00
	3,85	0,00	0,00	27,85	0,00	0,00
Litholrubin (m/z 385)	3,91	0,00	0,00	28,51	0,00	0,00
Patentní modř (m/z 559)	6,94	0,04	0,59	43,03	0,00	0,00
Ponceau 4R (m/z 580)	5,26	0,03	0,59	25,87	0,00	0,00
	4,39	0,00	0,00	35,44	0,00	0,00
Zeleň S (m/z 553)	6,67	0,03	0,41	27,85	0,00	0,00
				41,71	0,00	0,00
Žluť SY (m/z 406)	4,39	0,03	0,74	30,82	0,00	0,00

Tabulka XI CCS hodnoty vypočtené z průměrných hodnot driftových časů a m/z, měřeno na SYNAPT G2-S a SELECT SERIES Cyclic IMS

barvivo	SYNAPT G2-S		SELECT SERIES Cyclic IMS	
	m/z	CCS (Å ²)	m/z	CCS (Å ²)
Allura červeň	451,0697	212,1	451,0265	214,0
Brilantní čern	258,6705	372,9	258,6576	321,3
Brilantní modř	769,1643	266,2	769,1329	263,5
Červeň 2G	464,0336	210,1	464,0248	209,8
Erythrosin	834,6745	218,3	834,6497	217,9
Erythrosin	856,6507	217,5	856,6324	217,35
			856,6324	276,71
			856,6324	184,00
Chinolinová žluť	272,0823	161,4	272,0664	160,2
Kurkumín	367,1460	204,5	367,1147	197,5
	367,1460	188,3	367,1147	188,3
Litholrubin	385,0879	189,0	385,0442	190,6
Patentní modř	559,2071	248,8	559,155	248,8
Ponceau 4R	580,9823	198,6	580,9384	198,4
	580,9823	217,36	580,9384	219,61
Zeleň S	553,1254	243,5	553,1001	244,1
			553,1001	186,38
Žluť SY	407,0154	200,9	406,9967	201,4



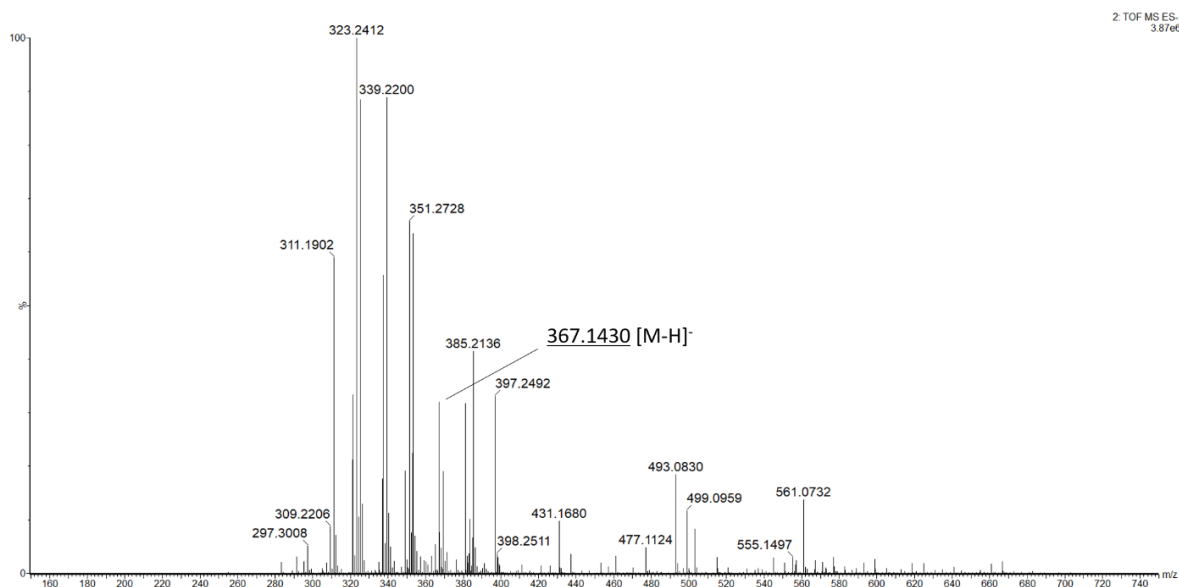
Obrázek 21 Graf porovnání hodnot CCS pro přístroje SYNAPT G2-S a SELECT SERIES Cyclic IMS s vyznačenou rovnicí přímky a koeficientem determinace

5.3 Analýza reálného vzorku

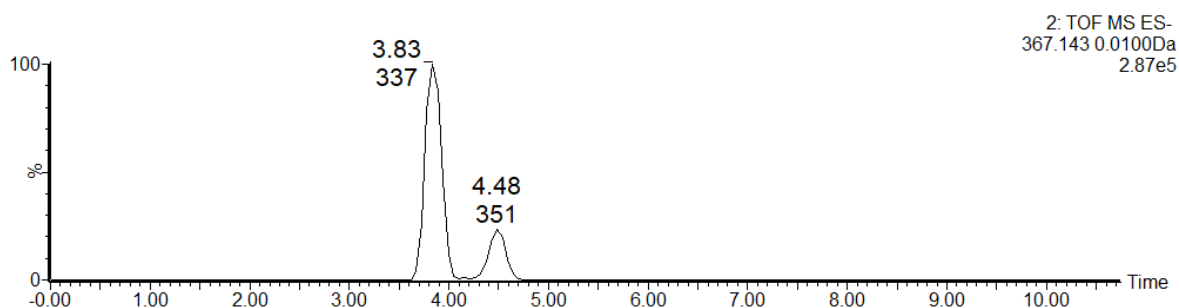
Po přípravě vzorku uvedené v kapitole 4.2.3 byla provedena měření na hmotnostním spektrometru SYNAPT G2-S ve spojení s automatickým dávkovačem kapalinové chromatografie. Délka analýzy byla 2 minuty, průtok rozpouštědla (H₂O) byl nastaven na 0,4 ml/min. Dávkovaný objem vzorku byl 10 µl. Ve vzorcích zelených bonbónů z balení Skittles Fruit a Skittles Sour bylo úspěšně detekováno barvivo kurkumin s hodnotou m/z 367,1430 odpovídající iontu [M-H]⁻ (Obr. 22, 24). Oba vzorky poskytují stejné hodnoty m/z, mobilogramy a driftové časy. Na obrázcích 23 a 25 jsou zobrazeny mobilogramy odpovídající iontu [M-H]⁻ kurkuminu. V mobilogramech jsou zobrazeny dva píky, jako tomu bylo u standardů. Hodnoty driftových časů na mobilogramu reálného vzorku jsou 3,83 ms a 4,48 ms, což naznačuje představuje posun od hodnot 3,85 ms a 4,56 ms standardu, ale pro identifikaci bude navíc využito hodnot CCS.

Vzorky zelených bonbónů z balení Skittles Fruit a Skittles Sour byly také analyzovány hmotnostním spektrometrem SELECT SERIES Cyclic IMS přímou infúzí. Na obrázcích 26 a 28 jsou uvedena hmotnostní spektra, ve kterých byl detekován ion [M-H]⁻ kurkuminu m/z 367,1203. Mobilogramy a driftové časy zmíněného iontu jsou totožné u obou vzorků (Obr. 27, 29). Na mobilogramech jsou zobrazeny dva píky s driftovými časy 27,85 ms a 31,48 ms. Čas 27,85 ms odpovídá driftovému času standardu, který byl stejný. Čas druhého píku 31,48 ms je oproti času standardu (31,81 ms) posunut.

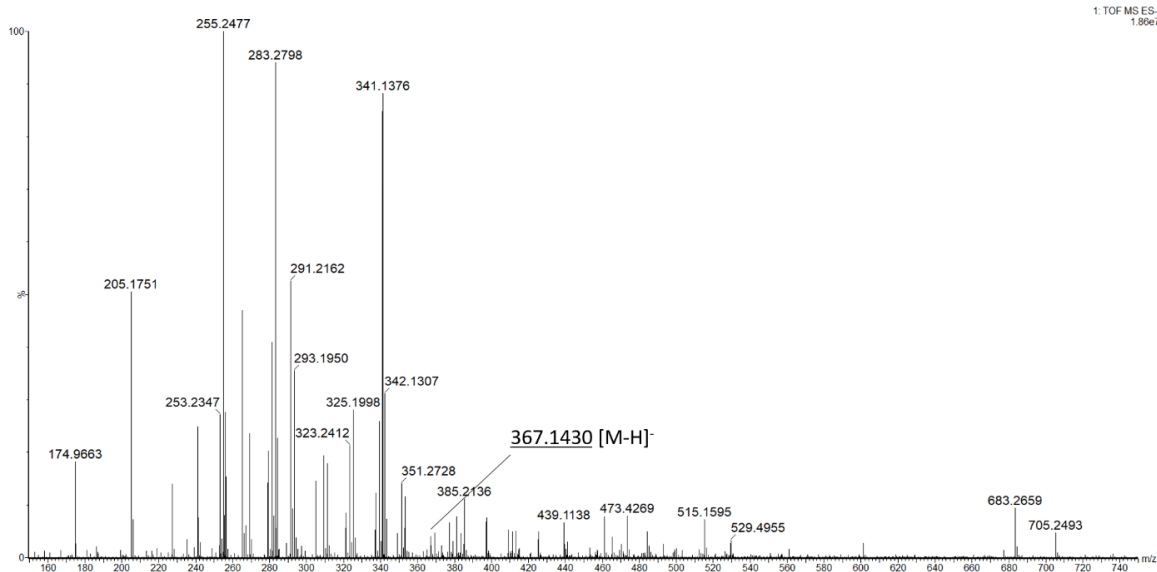
Pro ion kurkuminu m/z 367 byly také vypočteny CCS hodnoty, z průměrných hodnot šesti měření. Výsledky obou přístrojů jsou shrnuty v tabulkách XII a XIII. V tabulkách je také vypočtena procentuální odchylka rozdílů CCS hodnot reálného vzorku a standardu. V případě dat z přístroje SYNAPT G2-S jsou hodnoty CCS velmi blízké hodnotám standardů, odchylky činily 0,11 % pro driftový čas 3,83 ms a 0,35 % pro driftový čas 4,48 ms. U dat SELECT SERIES Cyclic IMS jsou odchylky lehce větší, 0,24 % pro driftový čas 27,85 ms a 4,46 % pro driftový čas 31,48 ms. U obou přístrojů jsou odchylky malé. Větší odchylky u přístroje SELECT SERIES Cyclic mohou být částečně způsobeny dodatečnou kalibrací přístroje, kdy kalibrace byla oproti měření vzorků provedena s časovým odstupem (automatická kalibrace prováděná současně s měřením vzorků neproběhla korektně).



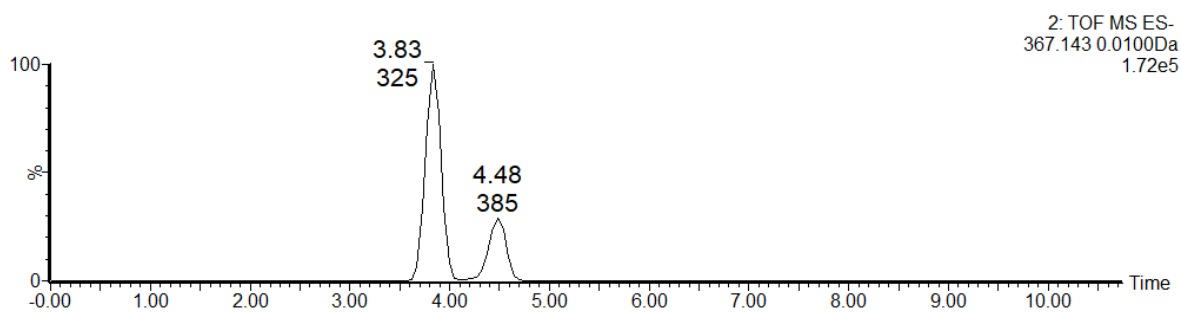
Obrázek 22 Hmotnostní spektrum vzorku zelených bonbónů Skittles Fruit získané hmotnostním spektrometrem SYNAPT G2-S v negativním módu



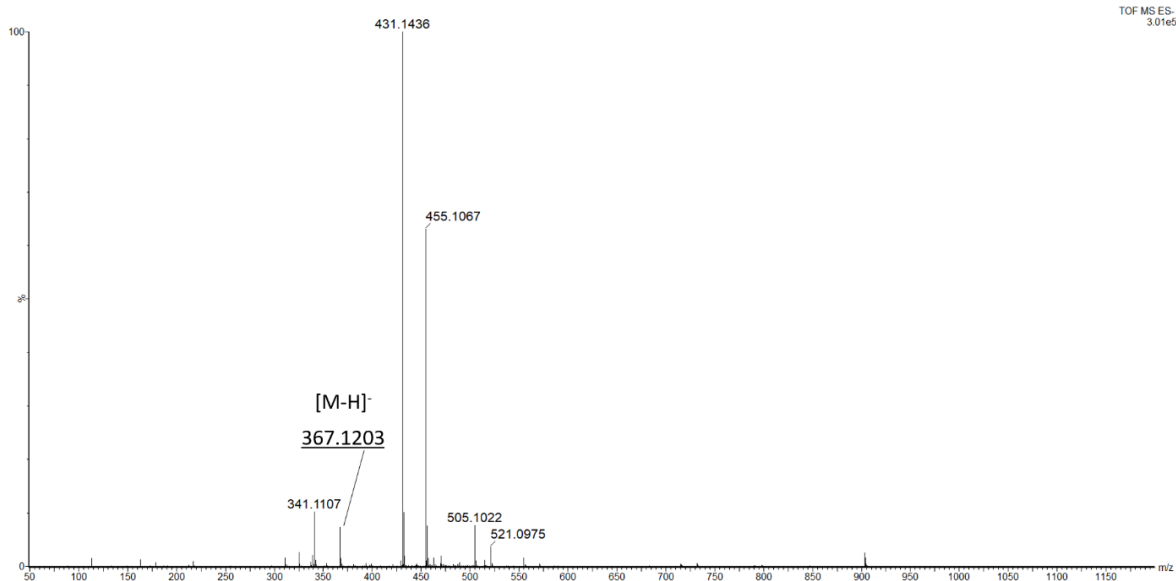
Obrázek 23 Mobilogram pro ion m/z 367,143 z přístroje SYNAPT G2-S, vzorek Skittles Fruit



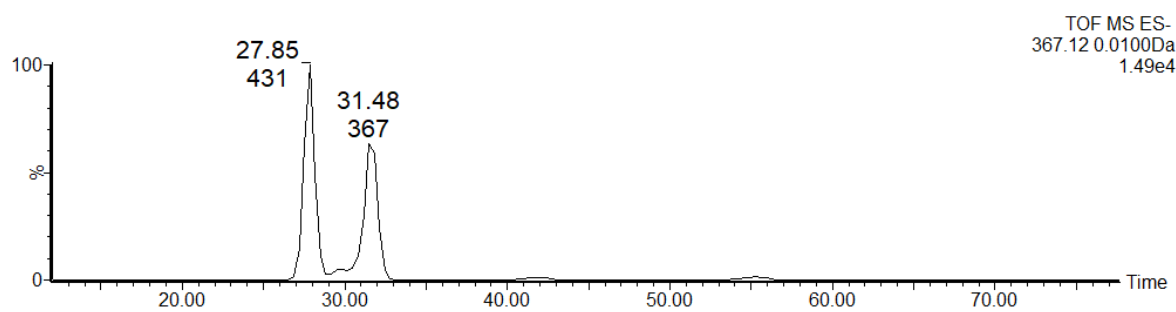
Obrázek 24 Hmotnostní spektrum vzorku zelených bonbónů Skittles Sour získané hmotnostním spektrometrem SYNAPT G2-S v negativním módu



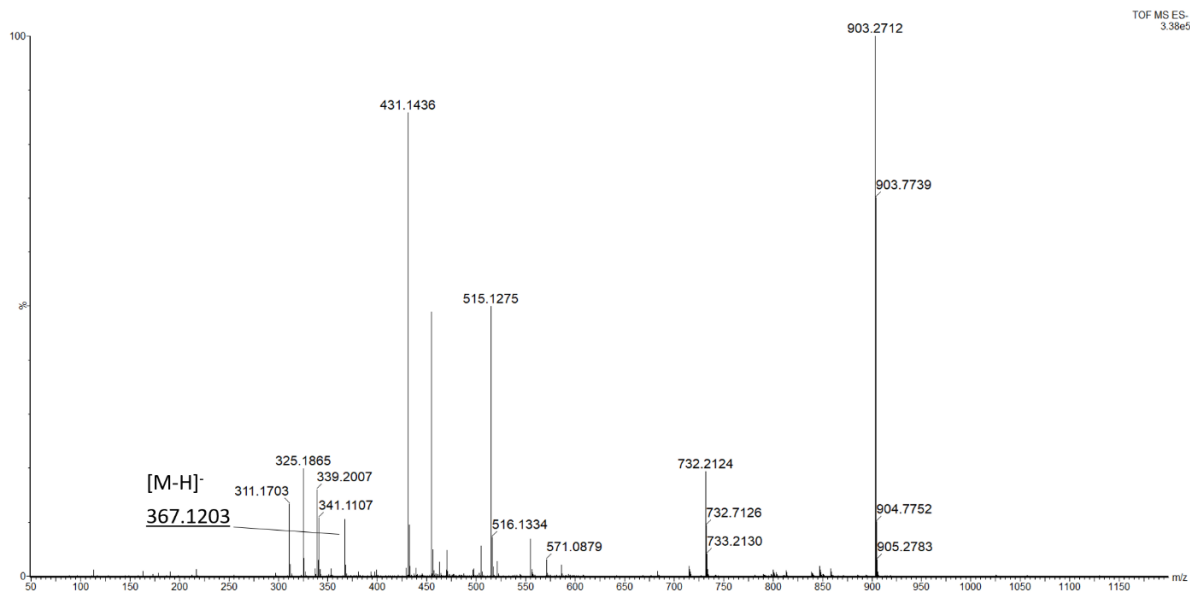
Obrázek 25 Mobilogram pro ion m/z 367,143 z přístroje SYNAPT G2-S, vzorek Skittles Sour



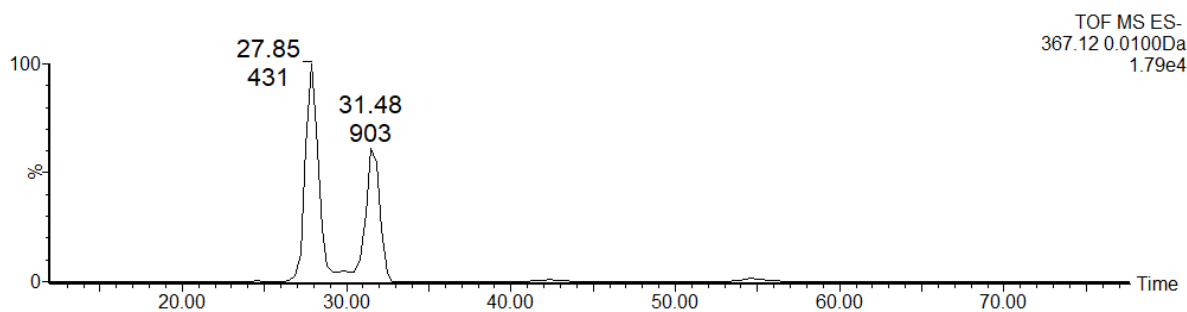
Obrázek 26 Hmotnostní spektrum vzorku zelených bonbónů Skittles Fruit získané hmotnostním spektrometrem SELECT SERIES Cyclic IMS v negativním módu



Obrázek 27 Mobilogram pro ion m/z 367,12 vzorku Skittles Fruit z přístroje SELECT SERIES Cyclic IMS



Obrázek 28 Hmotnostní spektrum vzorku zelených bonbónů Skittles Sour získané hmotnostním spektrometrem SELECT SERIES Cyclic IMS v negativním módu



Obrázek 29 Mobilogram pro ion m/z 367,12 vzorku Skittles Sour z přístroje SELECT SERIES Cyclic IMS

Tabulka XII Vypočtené CCS hodnoty pro reálné vzorky obsahující kurkumin, měřeno
SYNAPT G2-S

SYNAPT G2-S				
vzorek	Skittles Fruit		Skittles Sour	
driftový čas	3,83	4,48	3,83	4,48
CCS (\AA^2)	188,49	203,73	188,49	203,73
odchylka od hodnoty CCS standardu (%)	0,11	0,35	0,11	0,35

Tabulka XIII Vypočtené CCS hodnoty pro reálné vzorky obsahující kurkumin, měřeno
SELECT SERIES Cyclic IMS

SELECT SERIES Cyclic IMS				
vzorek	Skittles Fruit		Skittles Sour	
driftový čas	27,85	31,48	27,85	31,48
CCS (\AA^2)	187,82	206,29	187,82	206,29
odchylka od hodnoty CCS standardu (%)	0,24	4,46	0,24	4,46

Analýzou reálných vzorků bylo detekováno oběma přístroji barvivo kurkumin v bonbónech Skittles Fruit a Skittles Sour. Identifikace byla prokázána m/z hodnotami, driftovými časy a z nich vypočtenými srážkovými průřezy. CCS hodnoty vzorků se nejvíce lišily od hodnot standardů o 4,46 %. CCS hodnoty byly shledány jako vhodný identifikační parametr přidávaných barviv v potravinách.

6 ZÁVĚR

Analýza potravinářských barviv patří k důležitým odvětvím analytické chemie, neboť aditiva v potravinách mohou mít negativní dopad na lidské zdraví. Klasické techniky využívající se k tomuto účelu jsou například kapalinová chromatografie, samotná či ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Méně využívanou separační technikou obecně při analýze barviv je iontová mobilita. Iontová mobilita ve spojení s hmotnostní spektrometrií je zajímavá analytická technika, protože spojením těchto technik lze zlepšit poměr signálu k šumu i selektivitu měření. Obojí může přispět k průkaznější identifikaci látek nebo ke snížení meze stanovitelnosti. Iontová mobilita také poskytuje další identifikační veličinu, kterou je srážkový průřez. V rámci této práce byla technika IM-MS použita k analýze potravinářských barviv z důvodů získání jejich srážkových průřezů pro účely identifikace. V této souvislosti bylo také cílem srovnání dat ze dvou hmotnostních přístrojů SYNAPT G2-S a SELECT SERIES Cyclic IMS (oba Waters, Manchester, Velká Británie), které se liší designem použité iontové mobility (lineární versus cyklická mobilitní cela).

Nejprve bylo provedeno měření standardů barviv hmotnostním spektrometrem SYNAPT G2-S v kladném i záporném módu elektrospreje. Barviva tartrazin a *trans*- β -apo-8'-karotenal nebyla ionizována ani v jednom módu. Zbylá barviva byla úspěšně ionizována alespoň v jednom módu a byly detekovány primární ionty. Jelikož je většina barviv sodnou solí, v negativním módu byly sledovány převážně jednou nabitě ionty vzniklé odebráním sodného kationtu. Výjimkou byla brilantní čerň, u které se nepodařilo detekovat jednou nabitý ion, a tak se dále pracovalo s trojnásobně nabitým iontem. Z mobilitních dat byly vyhodnoceny driftové časy, která kromě porovnání přístrojů umožnily výpočet CCS hodnot vybraných iontů jednotlivých barviv v negativním módu. Srovnáním naměřených dat standardů barviv v negativním módu na obou přístrojích bylo zjištěno, že oba hmotnostní spektrometry poskytují stejné primární ionty. Relativní směrodatné odchylky ukázaly, že měření na přístroji SELECT SERIES Cyclic IMS bylo sice preciznější, ale oba přístroje vykazují nízké RSD (v žádném případě RSD nepřesáhlo 1,26 %). Porovnání CCS hodnot pro oba přístroje ukázalo velmi dobrou korelaci. Koeficient determinace byl $R^2 = 0,9920$. Odlehlým bodem bylo CCS iontu brilantní černi. Příčina v odchylce je pravděpodobně v ne zcela vyhovující kalibraci, neboť pro brilantní čerň bylo CCS počítáno pro trojnásobně nabitý ion, přičemž pro kalibraci byly použity jednou nabitě ionty kalibrantu. Je třeba zdůraznit, že se jedná o pouze jeden vícenásobně nabitý ion a jeden srážkový průřez.

Porovnání pro vícenásobně nabité ionty by mohlo být předmětem dalšího výzkumu. Ostatní CCS byly počítány pro jednu nabitou iontu. Jejich srovnáním bylo zjištěno, že CCS hodnoty jsou dobře přenositelné mezi přístroji, což značí možnost jejich využití v identifikaci, ať už měření bude provedeno na kterémkoli z testovaných přístrojů. Odchytky mezi hodnotami CCS mohou být zčásti způsobeny kalibrací přístroje SELECT SERIES Cyclic IMS provedené s časovým odstupem od měření barviv. K ověření aplikovatelnosti IM-MS v analýze potravinářských barviv byly oběma přístroji analyzovány reálné vzorky bonbónů Skittles Fruit a Skittles Sour. V zelených bonbónech těchto balení bylo oběma přístroji detekováno barvivo kurkumin. Kromě hmotnostních spekter byly pro identifikaci významné srážkové průřezy, kdy i pro ionty barviv s nízkou intenzitou oproti pozadí, lze získat hodnoty CCS podporující identifikaci sledovaných látek. Dosažené výsledky dokladují přínos CCS hodnot k identifikaci látek i jejich přenositelnost mezi přístroji vybavenými mobilitou s putující vlnou, ale s různým designem mobilitní cely.

7 LITERATURA

- [1] V. Barsan, A. Merticariu, Goethe's theory of colors between the ancient philosophy, middle ages occultism and modern science. *Cog. Arts Humanit.* 3 (2016) 1–29.
- [2] V. L. Zammito, The Expressions of Colours. *Digit. Games Res. Conf.* (2005) 1–15.
- [3] L. I. Labrecque, G. R. Milne, Exciting red and competent blue: The importance of color in marketing, *J. Acad. Mark. Sci.* 40 (2012) 711–727.
- [4] F. V. Rocío, I. Fisk, F. J. Mira, D. Vila, I. M. Vicario, J. Hort, L. Hewson, Colour influences sensory perception and liking of orange juice, *Flav.* 3 (2014) 1-8.
- [5] S. H. Abazied, Basics in colors, dyes and pigments chemistry: A review, *Chem. Int.* 2 (2016) 29–36.
- [6] A. Downham, P. Collins, Colouring our foods in the last and next millennium, *Int. J. Food Sci. Technol.* 35 (2000) 5–22.
- [7] T. F. G. G. Cova, A. A. C. C. Pais, J. S. S. De Mello, Reconstructing the historical synthesis of mauveine from Perkin and Caro: Procedure and details, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–9.
- [8] M. Oplatowska-Stachowiak, Ch. T. Elliott, Food colors: Existing and emerging food safety concerns, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57 (2017) 524–548.
- [9] J. R. Barnett, S. Miller, E. Pearce, Colour and art: A brief history of pigments, *Opt. Laser Technol.* 38 (2006) 445–453.
- [10] A. Panagopoulou, K. Karanasios, G. Xanthopoulou, Ancient Egyptian blue (CaCuSi₄O₁₀) pigment by modern solution combustion synthesis method, *Eurasian Chem. J.* 18 (2016) 31–37.
- [11] FDA, Color Additives Questions and Answers for Consumers. <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/color-additives-questions-and-answers-consumers>, staženo 20. března 2019.
- [12] EFSA, Food additives. <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/food-additives>, staženo 21. března 2019.
- [13] SZPI, Přídavné látky. <https://www.szpi.gov.cz/clanek/pridatne-latky-aditiva.aspx>, staženo 25. května 2019.
- [14] [Http://eagri.cz/public/web/mze/potraviny/bezpecnost-potravin/kontrola-potravin-a-krmiv](http://eagri.cz/public/web/mze/potraviny/bezpecnost-potravin/kontrola-potravin-a-krmiv), staženo 22. dubna 2020.
- [15] [Https://zsbozp.vubp.cz/zdravi/317-statni-sprava-v-ochrane-verejneho-zdravi](https://zsbozp.vubp.cz/zdravi/317-statni-sprava-v-ochrane-verejneho-zdravi), staženo 3. dubna 2020.

- [16] <https://www.bezpecnostpotravin.cz/kategorie/pravni-predpisy-cr-zakladni-informace.aspx>, staženo 15. května 2020.
- [17] SZPI, Evaluation of safety and authorisation of additives in the EU. <https://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1085341&docType=ART&nid=11471>, staženo 13. března 2020.
- [18] <https://www.bezpecnostpotravin.cz/kategorie/potravinarske-pridatne-latky.aspx>, staženo 26. dubna 2020.
- [19] <https://www.bezpecnostpotravin.cz/stranka/system-rychleho-varovani-pro-potraviny-a-krmiva-%28rasff%29.aspx>, staženo 26. dubna 2019.
- [20] Ministerstvo zemědělství, Zpráva o činnosti systému RASFF v ČR za rok 2018. <http://eagri.cz/public/web/mze/potraviny/bezpecnost-potravin/zprava-o-cinnosti-systemu-rasff-v-cr-za-3.html>, staženo 21. dubna 2019.
- [21] G. Oros, E. Forgacs, T. Cserha, Removal of synthetic dyes from wastewaters : a review, *Env. Int.* 30 (2004) 953–971.
- [22] S. Kobylewski, M. F. Jacobson, Toxicology of food dyes, *Int. J. Occup. Environ. Health* 18 (2012) 220–246.
- [23] J. König, Food colour additives of synthetic origin. *Col. Add. F. Bev.* 2015, 36–60.
- [24] T. M. Fonovich, Sudan dyes : are they dangerous for human health ? *Dr. Chem. Tox.* 36 (2013) 343–352.
- [25] S. Lehto, M. Buchweitz, A. Klimm, R. Straßburger, C. Bechtold, F. Ulberth, Comparison of food colour regulations in the EU and the US: a review of current provisions. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 34 (2017) 335–355.
- [26] <https://www.ferpotravina.cz/seznam-ecek>, staženo 13. března 2020.
- [27] D. McCann, A. Barrett, A. Cooper, D. Crumpler, L. Dalen, K. Grimshaw, E. Kitchin, K. Lok, L. Porteous, E. Prince, E. Sonuga-barke, J. O. Warner, J. Stevenson, Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8 / 9-year-old children in the community : a randomised , double-blinded , placebo-controlled trial, *Lancet* 370 (2007) 1560-1567.
- [28] T. Esatbeyoglu, K. Ulbrich, C. Rehberg, S. Rohn, G. Rimbach, Thermal stability, antioxidant, and anti-inflammatory activity of curcumin and its degradation product 4-vinyl guaiacol, *Food Funct.* 6 (2015) 887–893.
- [29] A. G. Woods, D. Hutanu, Recent Applications of Mass Spectrometry in Paint Analysis, *Mod. Chem. Appl.* 1 (2013) 10–12.

- [30] E. C. Velliky, M. Porr, N. J. Conard, Ochre and pigment use at Hohle Fels cave: Results of the first systematic review of ochre and ochre-related artefacts from the Upper Palaeolithic in Germany, *Plos one* 13 (2018).
- [31] D. Gavrilov, R. G. Maev, D. P. Almond, A review of imaging methods in analysis of works of art: Thermographic imaging method in art analysis, *Can. J. Phys.* 92 (2014) 341–364.
- [32] S. Kuckova, I. Nemeč, R. Hynek, J. Hradilova, T. Grygar, Analysis of organic colouring and binding components in colour layer of art works, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 275–282.
- [33] V. Mazel, P. Richardin, D. Touboul, A. Brunelle, C. Richard, E. Laval, P. Walter, O. Lapr evote, Animal urine as painting materials in African rock art revealed by cluster ToF-SIMS mass spectrometry imaging, *J. Mass Spectrom.* 45 (2010) 944–950.
- [34] R. Hynek, S. Kuckova, J. Hradilova, M. Kodicek, Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry as a tool for fast identification of protein binders in color layers of paintings, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 1896–1900.
- [35] K. Yamjala, M. Subramania, N. Rao, Methods for the analysis of azo dyes employed in food industry – A review, *Food Chem.* 192 (2016) 813–824.
- [36] Ch. Long, Z. Mai, X. Yang, B. Zhu, X. Xu, X. Huang, X. Zou, A new liquid-liquid extraction method for determination of 6 azo-dyes in chilli products by high-performance liquid chromatography, *Food Chem.* 126 (2011) 1324–1329.
- [37] F. Turak, M. U. Ozgur, Simultaneous Determination of Allura Red and Ponceau 4R in Drinks with the Use of Four Derivative Spectrophotometric Methods and Comparison with High-Performance Liquid Chromatography, *J. AOAC Int.* 6 (2013) 1377–1387.
- [38] J. Vlajkovic, F. Andri, P. Ristivojevic, A. Radoi c, Ź. Tešic, D. Milojkovic-Opsenica, Development and validation of a TLC method for the analysis of synthetic food-stuff dyes, *J. Liq. Chromatogr. R. T.* 36 (2013) 2476–2488.
- [39] F. I. de Andrade, M. I. F. Guedes, I. G. P. Vieira, F. N. P. Mendes, P. A. S. Rodrigues, C. S. C. Maia, M. M. M. Avila, L. de M. Ribeiro, Determination of food dyes in commercial soft drink by TLC and ion-pair HPLC, *Food chem.* 157 (2014) 193–198.
- [40] D. Ansorgova, M. Hol apek, P. Jandera, Ion-pairing high-performance liquid chromatography-mass spectrometry of impurities and reduction products of sulphonated azodyes, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 1017–1027.

- [41] S. Bonan, G. Fedrizzi, S. Menotta, C. Elisabetta, Dyes and Pigments Simultaneous determination of synthetic dyes in foodstuffs and beverages by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector, *Dyes Pig.* 99 (2013) 36–40.
- [42] M. Iammarino, A. Mentana, D. Centonze, C. Palermo, M. Mangiacotti, A. Eugenio, Simultaneous determination of twelve dyes in meat products : Development and validation of an analytical method based on HPLC-UV-diode array detection, *Food Chem.* 285 (2019) 1–9.
- [43] J. Kirschbaum, C. Krause, H. Bruckner, Liquid chromatographic quantification of synthetic colorants in fish roe and caviar, *Eur. Food Res. Technol.* 222 (2006) 572–579.
- [44] M. Ma, X. Luo, B. Chen, S. Su, S. Yao, Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by high-performance liquid chromatography – diode array detection – electrospray mass spectrometry, *J. Chrom. A.* 1103 (2006) 170–176.
- [45] M. A. Prado, L. F. Vilas, M. R. Bronze, H. T. Godoy, Validation of methodology for simultaneous determination of synthetic dyes in alcoholic beverages by capillary electrophoresis, *J. Chrom. A* 1136 (2006) 231–236.
- [46] J. U. Jian, G. U. O. Li-ping, Sensitive Voltammetric Sensor for Amaranth Based on Ordered Mesoporous Carbon, *Chin. J. Anal. Chem.* 41 (2013) 681–686.
- [47] U. T. Yilmaz, F. Ergun, H. Yilmaz, Determination of the food dye carmine in milk and candy products by differential pulse polarography, *J. Food Drug Anal.* 22 (2014) 329–335.
- [48] S. Combeau, M. Chatelut, O. Vittori, Identification and simultaneous determination of Azorubin , Allura red and Ponceau 4R by differential pulse polarography : application to soft drinks, *Talanta* 56 (2002) 115–122.
- [49] F. W. Karasek, Plasma Chromatography, *Anal. Chem.* 46 (1974) 710-720.
- [50] M. Saraji, A. A. H. Bidgoli, T. Khayamian, A. Moradmand, Combination of corona discharge ion mobility spectrometry with a novel reagent gas and two immiscible organic solvent liquid-liquid-liquid microextraction for analysis of clomipramine in biological samples, *J. Chrom. A* 1218 (2011) 8600–8607.
- [51] A. Sheibani, M. Tabrizchi, H. S. Ghaziaskar, Determination of aflatoxins B1 and B2 using ion mobility spectrometry, *Talanta* 75 (2008) 233–238.

- [52] Z. Hashemian, A. Mardihallaj, T. Khayamian, Analysis of biogenic amines using corona discharge ion mobility spectrometry, *Talanta* 81 (2010) 1081–1087.
- [53] R. G. Ewing, D. A. Atkinson, G. A. Eiceman, G. J. Ewing, A critical review of ion mobility spectrometry for the detection of explosives and explosive related compounds, *Talanta* 54 (2001) 515–529.
- [54] F. Lanucara, S. W. Holman, Ch. J. Gray, C. E. Eyers, The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics, *Nat. Chem.* 6 (2014) 281–294.
- [55] R. Cumeras, E. Figueras, C. E. Davis, J. I. Baumbach a I. Gracia, Review on Ion Mobility Spectrometry. Part 1: Current instrumentation, *Analyst.* 140 (2015) 1376–1390.
- [56] W. Jiang, R. A.S. Robinson, Ion Mobility-Mass Spectrometry, *Encycl. Anal. Chem.* 293 (2013) 1-21.
- [57] A. Konijnenberg, A. Butterer, F. Sobott, Native ion mobility-mass spectrometry and related methods in structural biology, *Biochim. Biophys. Act.* 1834 (2013), 1239–1256.
- [58] A. A. Shvartsburg, R. D. Smith, Fundamentals of traveling wave ion mobility spectrometry, *Anal. Chem.* 80 (2008) 9689–9699.
- [59] G. R. Asbury, H. H. Hill, Using different drift gases to change separation factors (a) in ion mobility spectrometry, *Anal. Chem.* 72 (2000) 580–584.
- [60] S. I. Merenbloom, R. S. Glaskin, Z. B. Henson, D. E. Clemmer, High-resolution ion cyclotron mobility spectrometry, *Anal. Chem.* 81 (2009) 1482–1487.
- [61] B. M. Kolakowski, Z. Mester, Review of applications of high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry (FAIMS) and differential mobility spectrometry (DMS), *Analyst.* 132 (2007) 842–864.
- [62] I. A. Buryakov, E. V. Krylov, E. G. Nazarov, U. K. Rasulev, A new method of separation of multi-atomic ions by mobility at atmospheric pressure using a high-frequency amplitude-asymmetric strong electric field, *Int. J. Mass Spectrom.* 128 (1993) 143–148.
- [63] K. E. Swearingen, R. L. Moritz, High-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry for mass spectrometry-based proteomics, *Exp. Rev. Prot.* 9 (2012) 505–517.

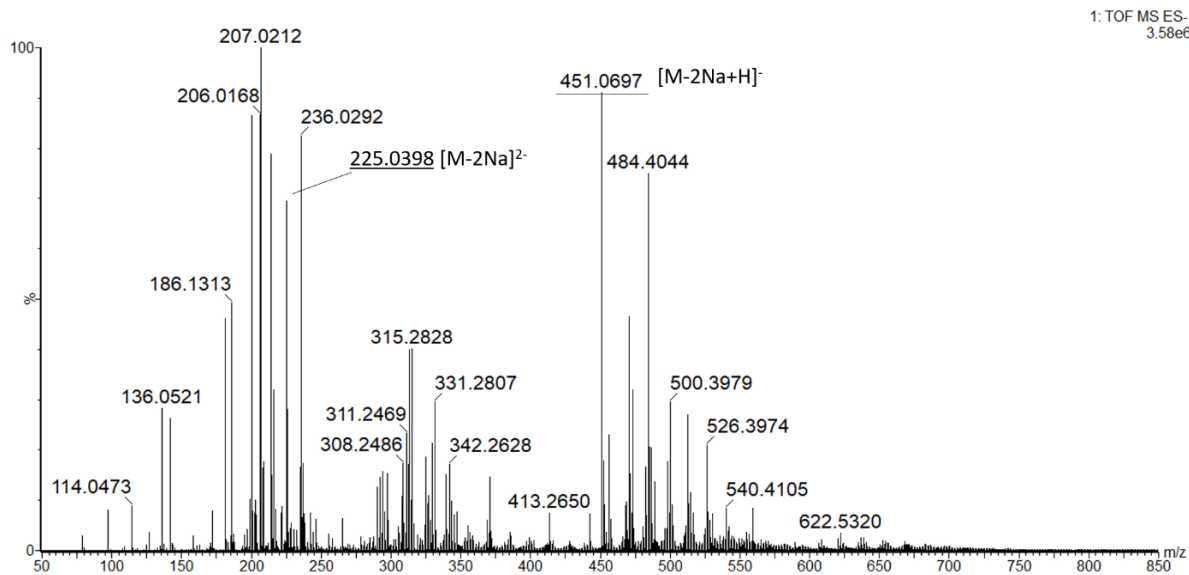
- [64] K. Giles, S. D. Pringle, K. R. Worthington, D. Little, J. L. Wildgoose, R. H. Bateman, Applications of a travelling wave-based radio-frequency-only stacked ring ion guide. *Rap. Commun. Mass Spec.* 18 (2004) 2401–2414.
- [65] J. D. May, J. A. McLean, Ion mobility-mass spectrometry: Time-dispersive instrumentation, *Anal. Chem.* 87 (2015) 1422–1436.
- [66] M. Kliman, J. C. May, J. A. McLean, Lipid analysis and lipidomics by structurally selective ion mobility-mass spectrometry, *Biochim. Biophys. Acta* 1811 (2011) 935–945.
- [67] J. Rus, D. Moro, J. A. Sillero, J. Royuela, A. Casado, F. Estevez-Molinero, J. F. de la Mora, IMS-MS studies based on coupling a differential mobility analyzer (DMA) to commercial API-MS systems, *Int. J. Mass Spectrom.* 298 (2010) 30–40.
- [68] D. R. Hernandez, J. D. de Bord, M. E. Ridgeway, D. A. Kaplan, M. A. Park, F. Fernandez-Lima, Ion dynamics in a trapped ion mobility spectrometer, *Analyst.* 139 (2014) 1913–1921.
- [69] L. Charles, Ch. Chendo, S. Poyer, Ion mobility spectrometry – Mass spectrometry coupling for synthetic polymers, *Rap. Commun. Mass Spec.* 8624 (2019).
- [70] K Giles, J. Ujma, J. Wildgoose, S. Pringle, K. Richardson, D. Langridge, M.artin Green, A Cyclic Ion Mobility-Mass Spectrometry System, *Anal. Chem.* 91 (2019) 8564–8573.
- [71] B. T. Ruotolo, J. L.P. Benesch, A. M. Sandercock, S. J. Hyung, C. V. Robinson, Ion mobility-mass spectrometry analysis of large protein complexes, *Nat. Protoc.* 3 (2008) 1139–1152.
- [72] Z. Karpas, Applications of ion mobility spectrometry (IMS) in the field of foodomics, *Food Res. Int.* 54 (2013) 1146–1151.
- [73] J. R. Verkouteren, J. L. Staymates, Reliability of ion mobility spectrometry for qualitative analysis of complex, multicomponent illicit drug samples, *Forensic Sci. Int.* 206 (2011) 190–196.
- [74] T. Khayamian, M. Tabrizchi, M. T. Jafari, Quantitative analysis of morphine and noscapine using corona discharge ion mobility spectrometry with ammonia reagent gas. *Talanta* 69 (2006) 795–799.
- [75] E. Goudsmits, G. P. Sharples, J. W. Birkett, Recent trends in organic gunshot residue analysis, *Trend. Anal. Chem.* 74 (2015) 46–57.

- [76] M. Hernández-Mesa, F. Monteau, B. le Bizec, G. Dervilly-Pinel, Potential of ion mobility-mass spectrometry for both targeted and non-targeted analysis of phase II steroid metabolites in urine, *Anal. Chim. Acta* X 1 (2019).
- [77] K. Tuovinen, H. Paakkanen, O. Hänninen, Detection of pesticides from liquid matrices by ion mobility spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 404 (2000) 7–17.
- [78] M. T. Jafari, F. Torki, M. Saraji, Simultaneous determination of nitrite and nitrate in potato and water samples using negative electrospray ionization ion mobility spectrometry, *Anal. Sci.* 28 (2012) 391–396.
- [79] L. Ahonen, M. Fasciotti, G. B. af Gennäs, T. Kotiaho, R. J. Daroda, M. Eberlin, R. Kostianen, Separation of steroid isomers by ion mobility mass spectrometry, *J. Chrom. A* 1310 (2013) 133–137.
- [80] A. A. Sysoev, S. S. Poteshin, D. M. Chernyshev, A. A. Sysoev, Rapid identification of triphenylmethane dyes by ion mobility time-of-flight mass spectrometry, *Eur. J. Mass Spectrom.* 22 (2016) 289–296.
- [81] J. Jiao, J. Wang, M. Li, J. Li, Q. Li, Q. Quan, J. Chen, Simultaneous determination of three azo dyes in food product by ion mobility spectrometry, *J. Chrom. B* 1025 (2016) 105–109.
- [82] T. Sun, M. Wang, D. Wang, Z. Du, Solid-phase microextraction based on nickel-foam@polydopamine followed by ion mobility spectrometry for on-site detection of Sudan dyes in tomato sauce and hot-pot sample, *Talanta* 207 (2020).
- [83] J. A. Midey, A. Camacho, J. Sampathkumaran, C. A. Krueger, M. A. Osgood, Ch. Wu, High-performance ion mobility spectrometry with direct electrospray ionization (ESI-HPIMS) for the detection of additives and contaminants in food, *Anal. Chim. Acta* 804 (2013) 197–206.
- [84] R. Lian, F. Zhang, Y. Zhang, Z. Wu, H. Ye, Ch. Ni, X. Lv, Y. Guo, Ion mobility derived collision cross section as an additional measure to support the rapid analysis of abused drugs and toxic compounds using electrospray ion mobility time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Methods* 10 (2018) 749–756.
- [85] J. W. Lee, K. L. Davidson, M. F. Bush, H. I. Kim, Collision cross sections and ion structures: Development of a general calculation method via high-quality ion mobility measurements and theoretical modeling, *Analyst.* 142 (2017) 4289–4298.

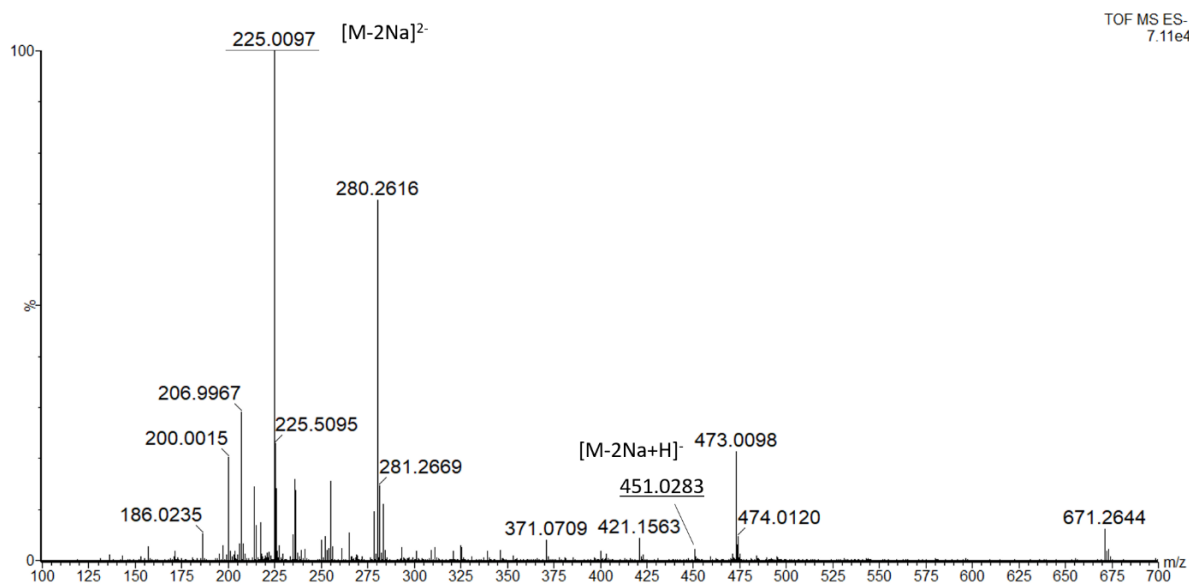
- [86] T. W. Knapman, J. T. Berryman, I. Campuzano, S. A. Harris, A. E. Ashcroft, Considerations in experimental and theoretical collision cross-section measurements of small molecules using travelling wave ion mobility spectrometry-mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom.* 298 (2010) 17–23.
- [87] V. Hinnenkamp, J. Klein, S. W. Meckelmann, P. Balsaa, T. C. Schmidt, O. J. Schmitz, Comparison of CCS Values Determined by Traveling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry and Drift Tube Ion Mobility Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 90 (2018) 12042–12050.
- [88] M. Hernández-Mesa, D. Ropartz, A. M. García-Campaña, H. Rogniaux, G. Dervilly-Pinel, B. Le Bizec, Ion mobility spectrometry in food analysis: Principles, current applications and future trends, *Molecules.* 24 (2019) 1–28.
- [89] C. Laphorn, F. Pullen, B. Z. Chowdhry, Ion mobility spectrometry-mass spectrometry (IMS-MS) of small molecules: separating and assigning structures to ions, *Mass Spectrom. Rev.* 32 (2012) 43-71.
- [90] National Center for Biotechnology Information, PubChem Database. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/>, staženo 19. října 2019.
- [91] B. T. Ruotolo, J. L. P. Benesch, A. M. Sandercock, S. Hyung, C. V. Robinson, *Nat. Protoc.* 3 (2008) 1139-1152.
- [92] M. F. Bush, Z. Hall, K. Giles, J. Hoyes, C. V. Robinson, B. T. Ruotolo, *Anal. Chem.* 82 (2010) 9557–9565.
- [93] K. Thalassinou, M. Grabenauer, S. E. Slade, G. R. Hilton, M. T. Bowers, J. H. Scrivens, *Anal. Chem.* 81 (2009) 248-254.

8 PŘÍLOHY

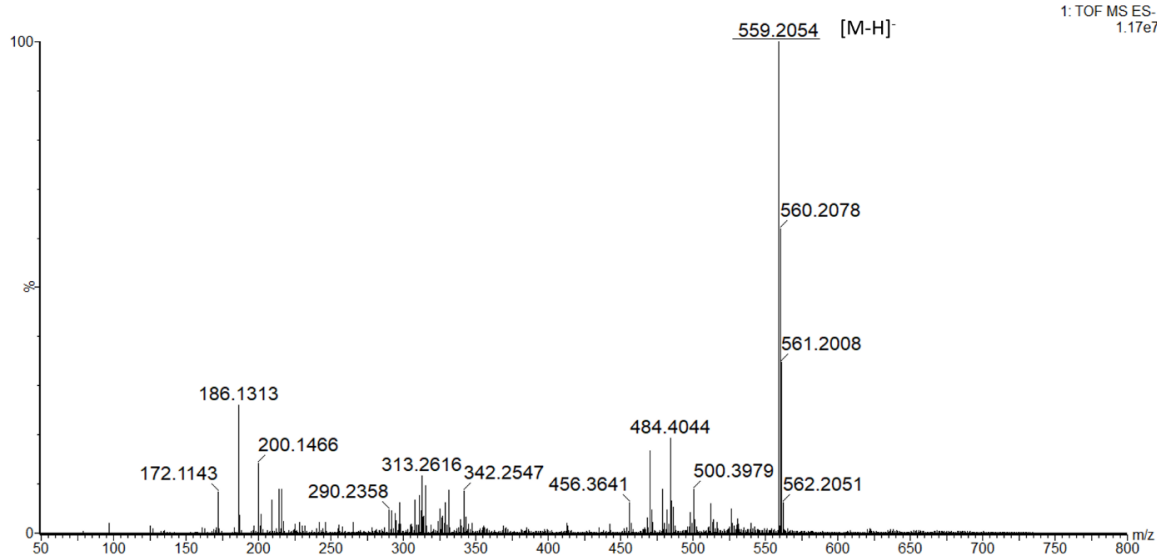
8.1 Hmotnostní spektra standardů barviv v negativním módu



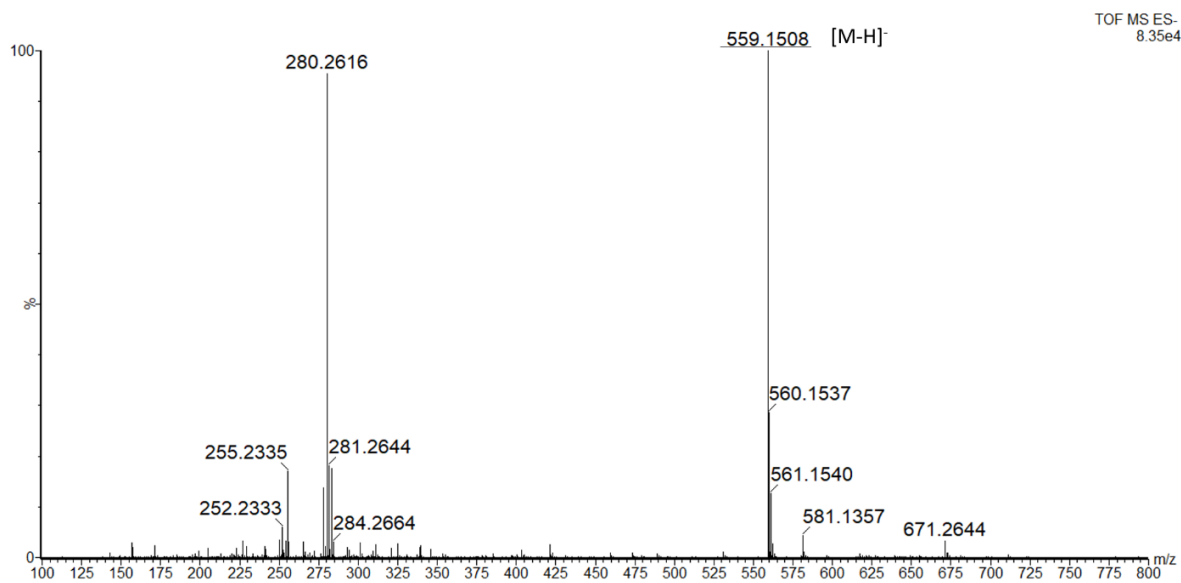
Obrázek 30 Hmotnostní spektrum allura červeně z hmotnostního spektrometru SYNAPT G2-S v negativním módu



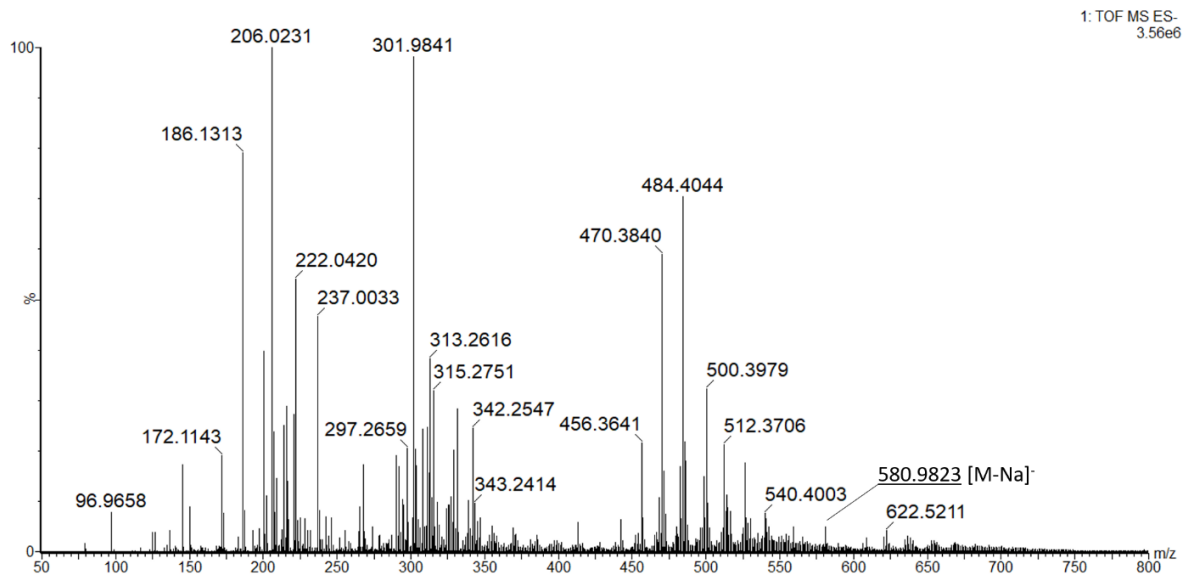
Obrázek 31 Hmotnostní spektrum allura červení získané hmotnostním spektrometrem s cyklickou iontovou mobilitou, měřeno v negativním módu



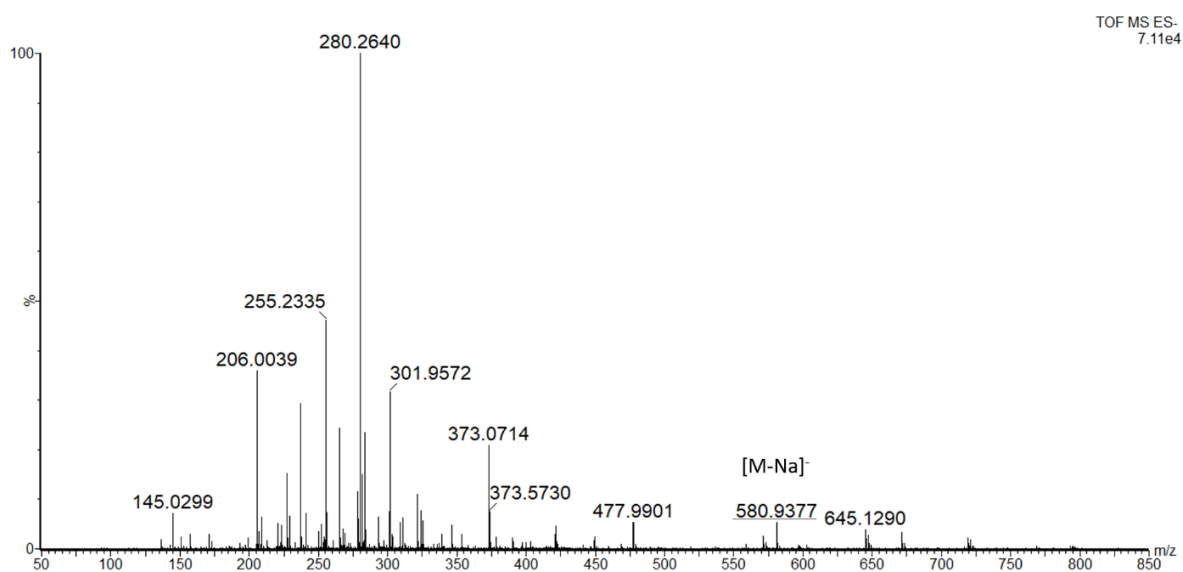
Obrázek 32 Hmotnostní spektrum patentní modři z hmotnostního spektrometru SYNAPT G2-S v negativním módu



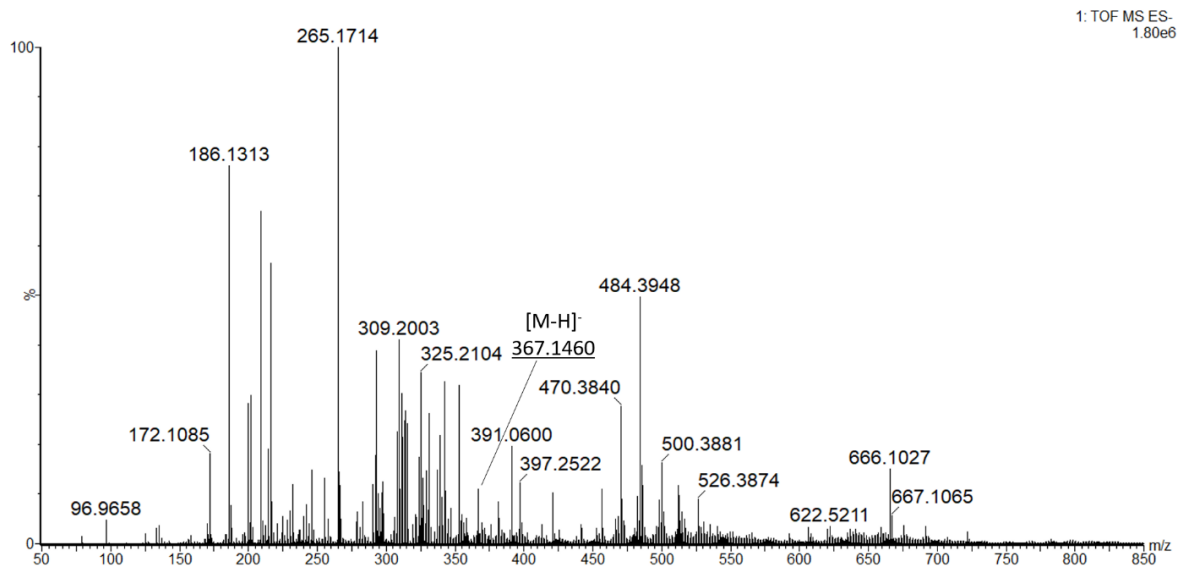
Obrázek 33 Hmotnostní spektrum patentní modři získané hmotnostním spektrometrem s cyklickou iontovou mobilitou, měřeno v negativním módu



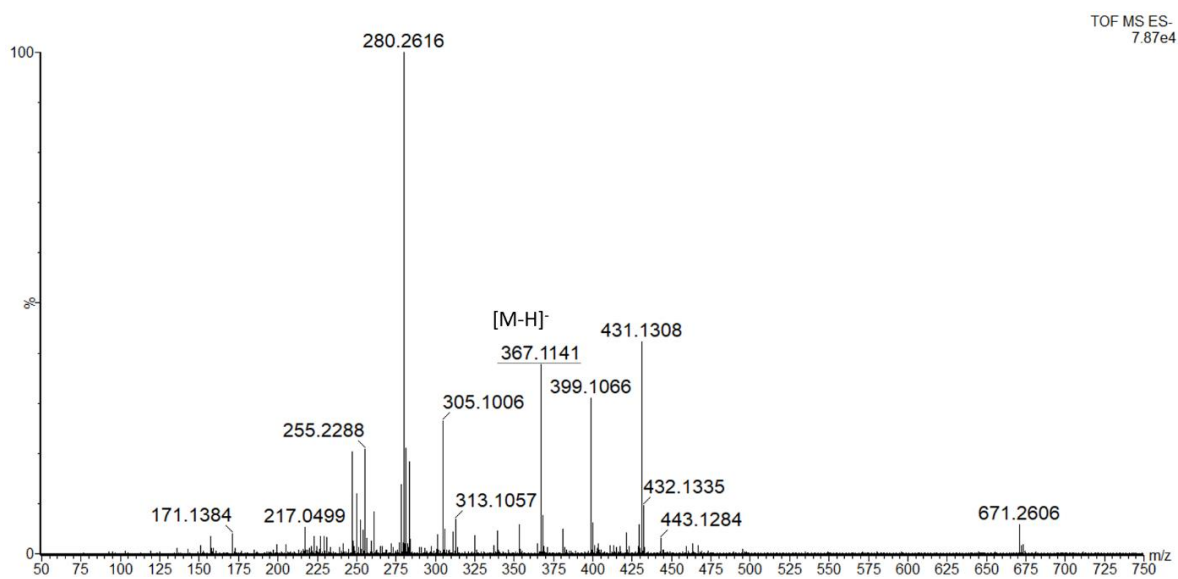
Obrázek 34 Hmotnostní spektrum poncau 4R z hmotnostního spektrometru SYNAPT G2-S v negativním módu



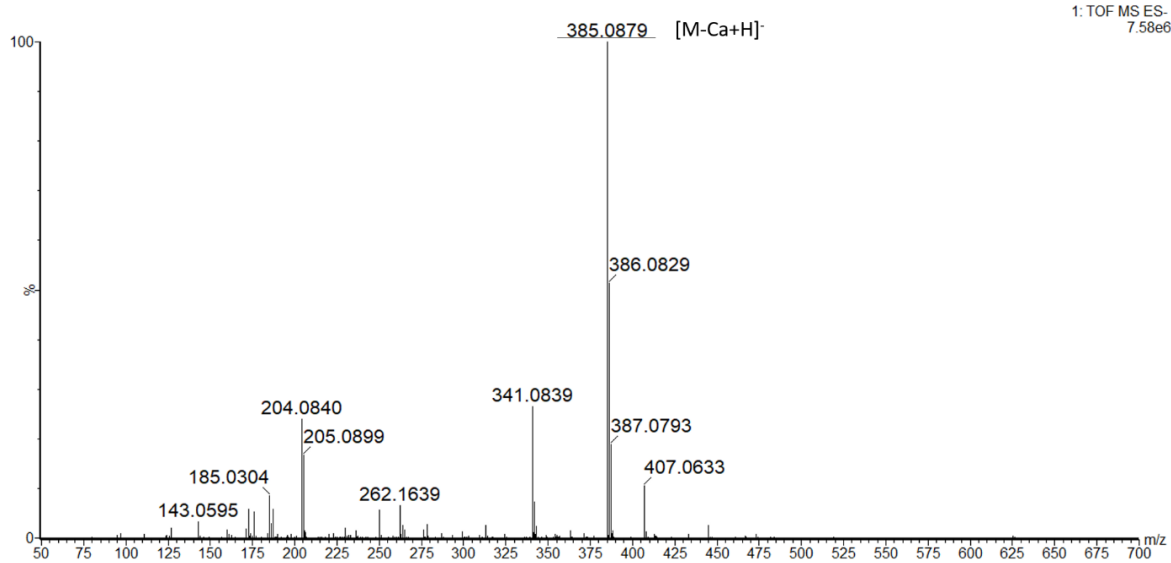
Obrázek 35 Hmotnostní spektrum poncau 4R získané hmotnostním spektrometrem s cyklickou iontovou mobilitou, měřeno v negativním módu



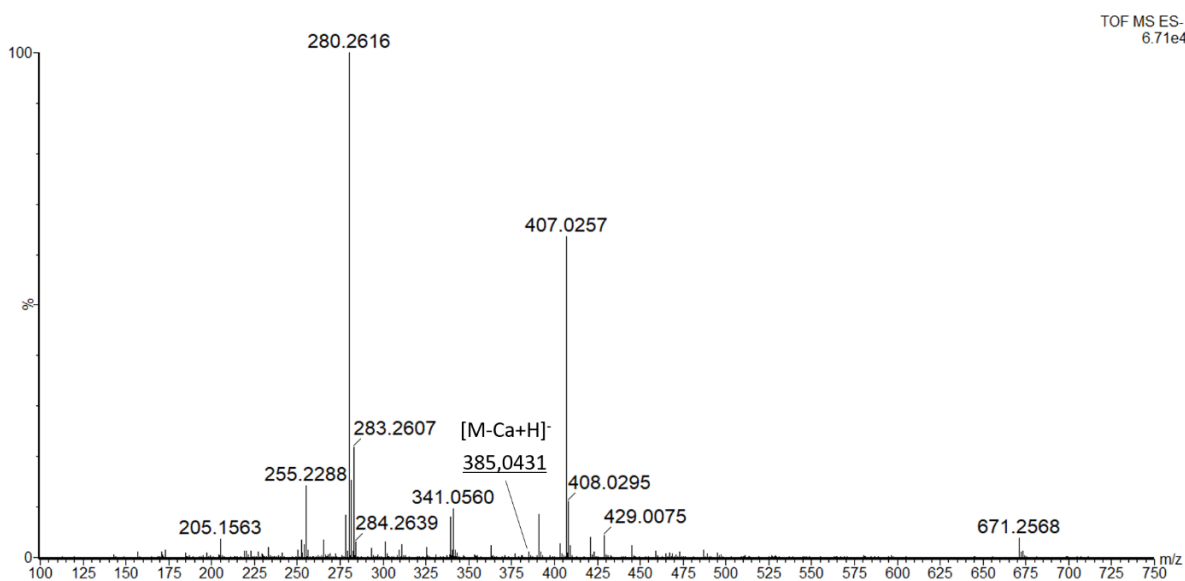
Obrázek 36 Hmotnostní spektrum kurkuminu z hmotnostního spektrometru SYNAPT G2-S v negativním módu



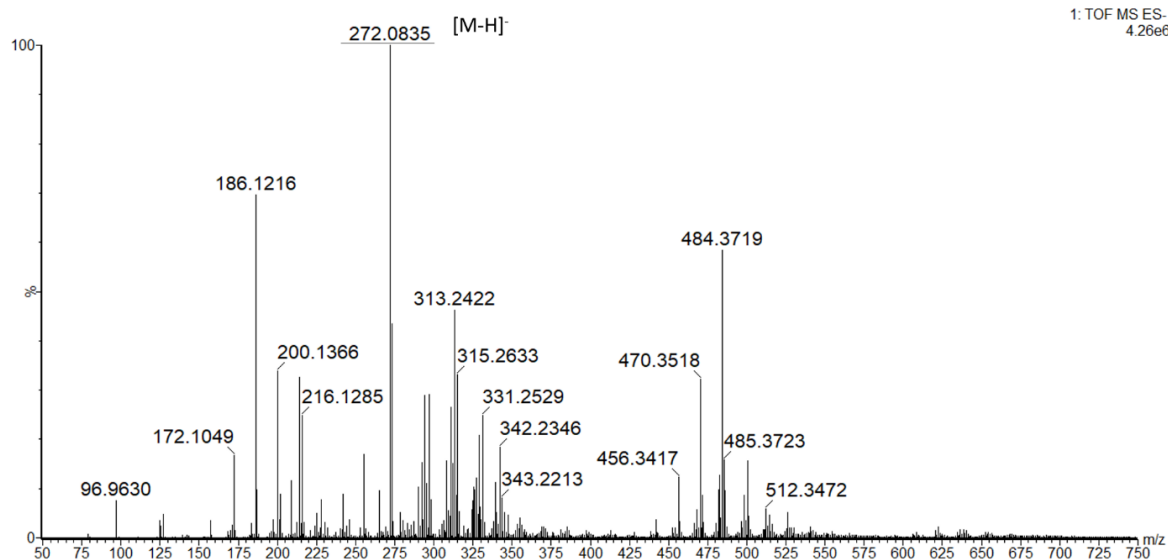
Obrázek 37 Hmotnostní spektrum kurkuminu získané hmotnostním spektrometrem s cyklickou iontovou mobilitou, měřeno v negativním módu



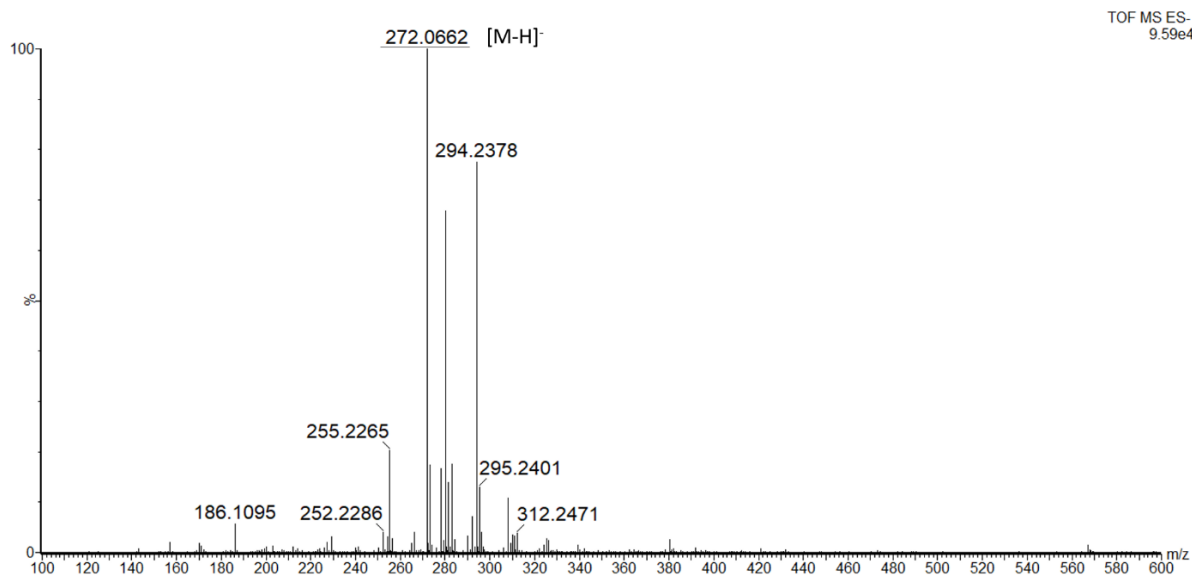
Obrázek 38 Hmotnostní spektrum litholrubinu z hmotnostního spektrometru SYNAPT G2-S v negativním módu



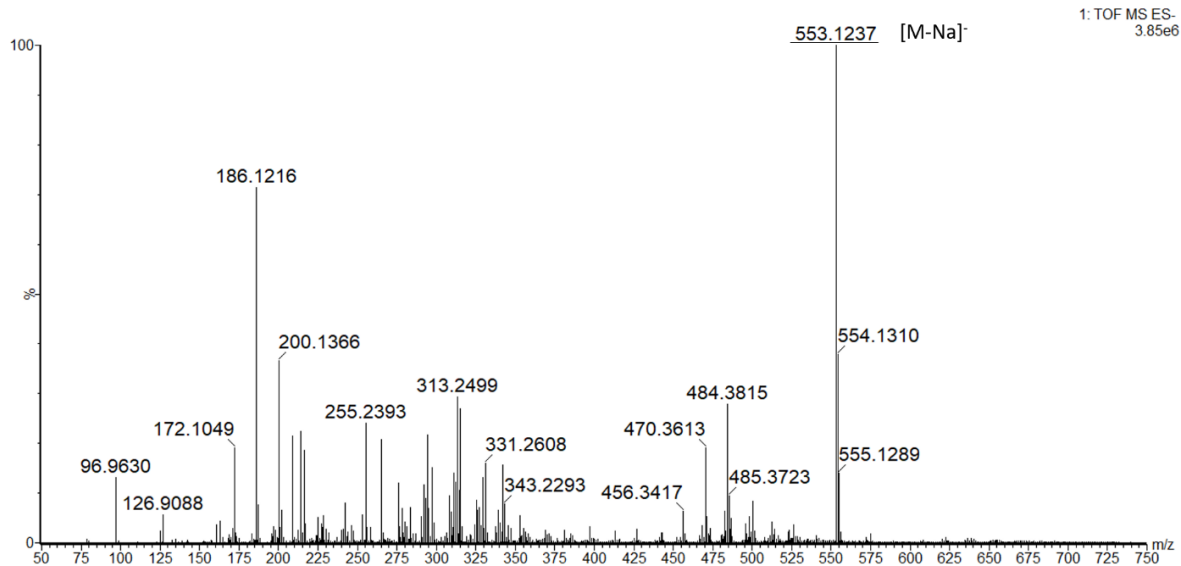
Obrázek 39 Hmotnostní spektrum litholrubinu získané hmotnostním spektrometrem s cyklickou iontovou mobilitou, měřeno v negativním módu



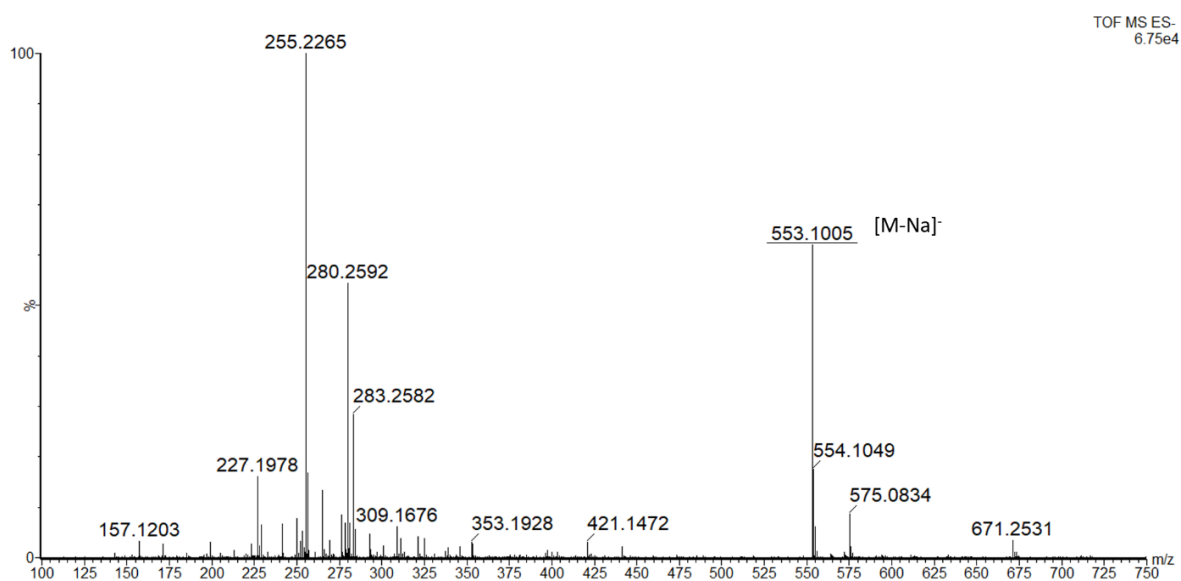
Obrázek 40 Hmotnostní spektrum chinolinové žlutí z hmotnostního spektrometru SYNAPT G2-S v negativním módu



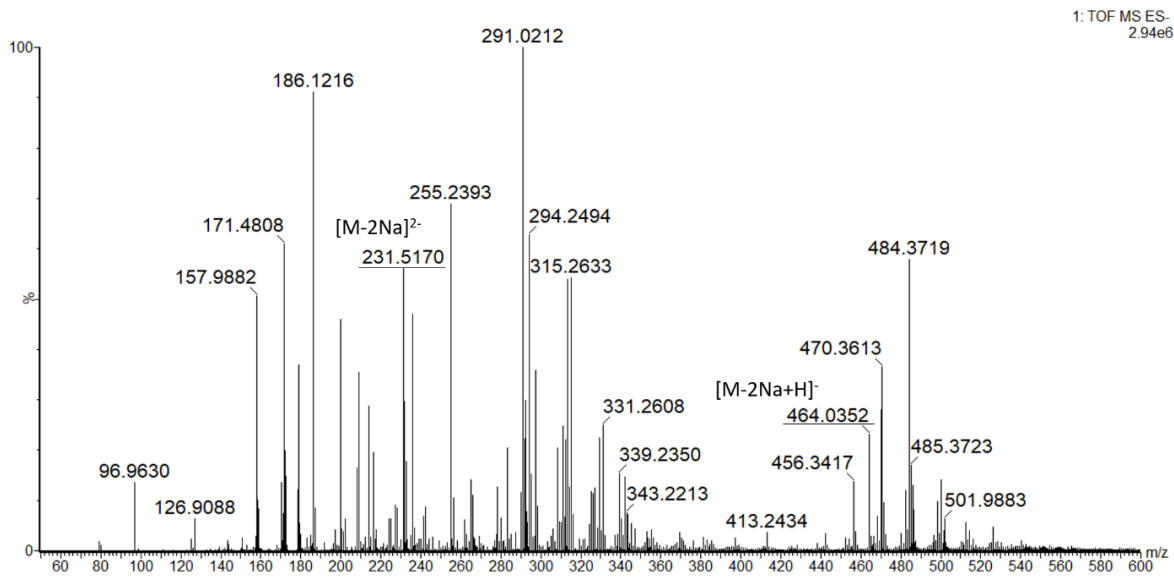
Obrázek 41 Hmotnostní spektrum chinolinové žlutí získané hmotnostním spektrometrem s cyklickou iontovou mobilitou, měřeno v negativním módu



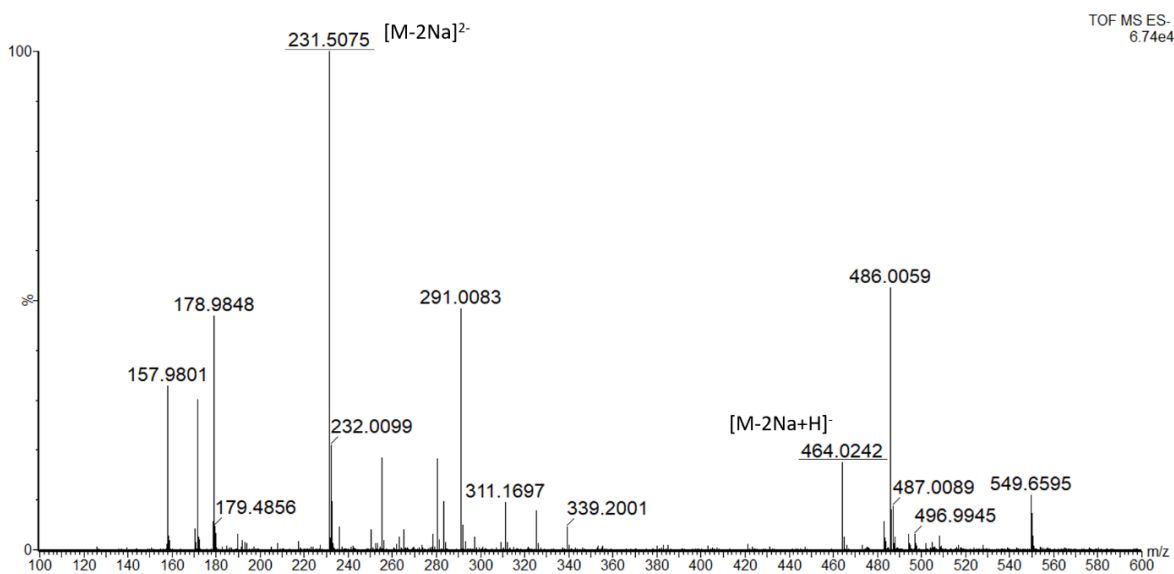
Obrázek 42 Hmotnostní spektrum zeleně S z hmotnostního spektrometru SYNAPT G2-S v negativním módu



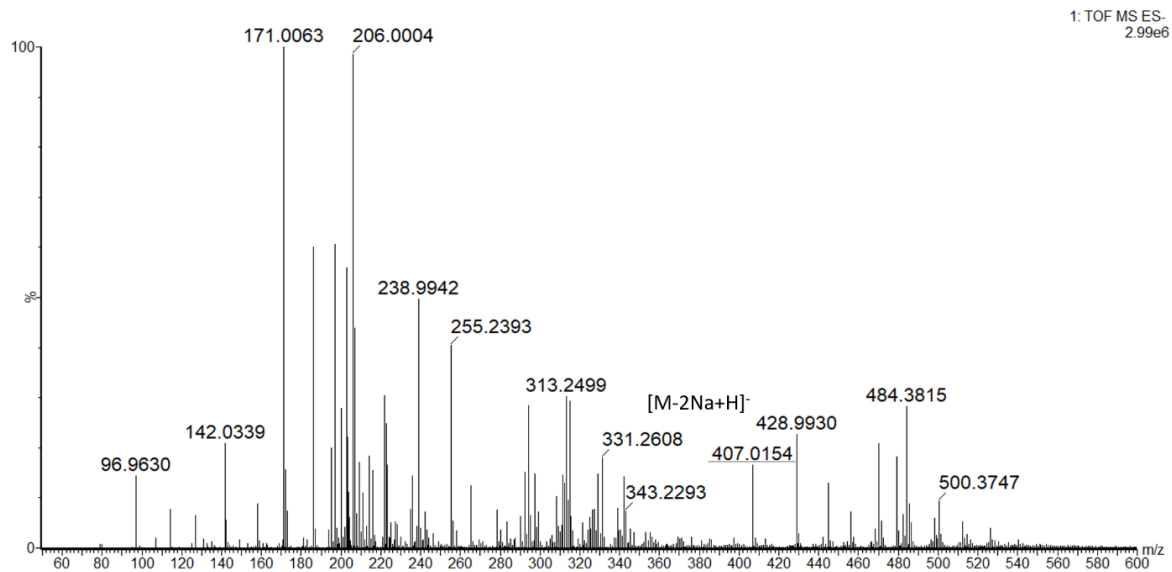
Obrázek 43 Hmotnostní spektrum zeleně S získané hmotnostním spektrometrem s cyklickou iontovou mobilitou, měřeno v negativním módu



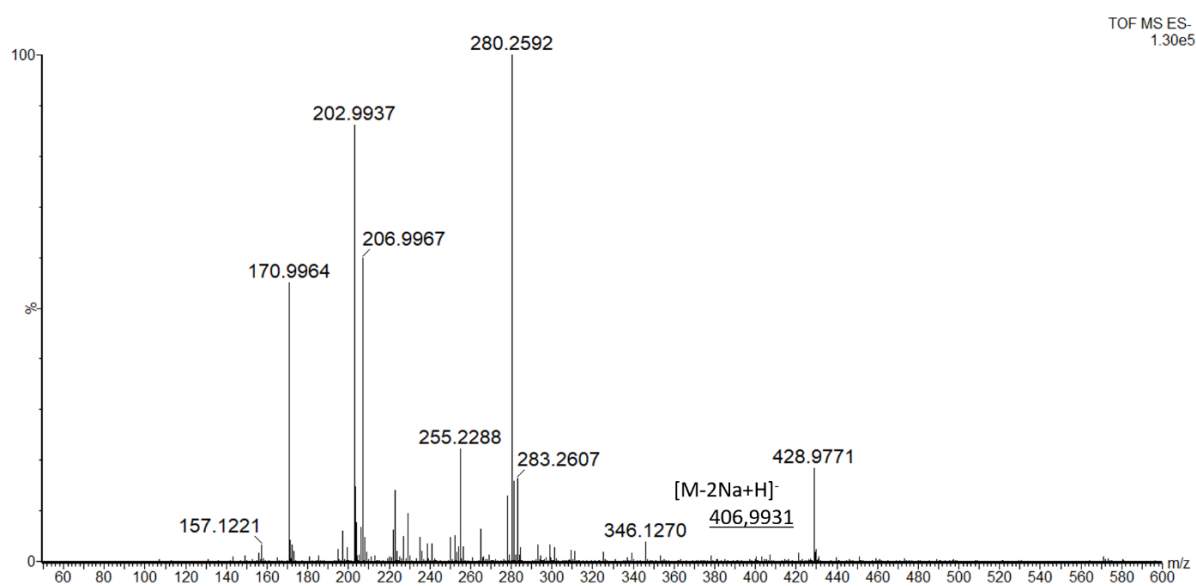
Obrázek 44 Hmotnostní spektrum červeně 2G z hmotnostního spektrometru SYNAPT G2-S v negativním módu



Obrázek 45 Hmotnostní spektrum červeně 2G získané hmotnostním spektrometrem s cyklickou iontovou mobilitou, měřeno v negativním módu



Obrázek 46 Hmotnostní spektrum žluti SY z hmotnostního spektrometru SYNAPT G2-S v negativním módu



Obrázek 47 Hmotnostní spektrum žluti SY získané hmotnostním spektrometrem s cyklickou iontovou mobilitou, měřeno v negativním módu