

**UNIVERZITA KARLOVA**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Studijní program: Analytická chemie



## **DISERTAČNÍ PRÁCE**

### **RYCHLÉ METODY ANALÝZY MIGRANTŮ Z MATERIÁLŮ VE STYKU S POTRAVINAMI**

Vypracoval:

Ing. Adam Vavrouš

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Radomír Čabala, Dr.

Prohlašuji,

že jsem disertační práci zpracoval samostatně za použití uvedených literárních zdrojů. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného akademického titulu.

v Praze dne 10.4.2020

Adam Vavrouš

Tato práce vznikala v letech 2013–2020 během mého studia na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Centru toxikologie a zdravotní bezpečnosti Státního zdravotního ústavu v Praze. Výsledky experimentální části byly průběžně publikovány v mezinárodních odborných časopisech formou následujících studií:

**Studie 1:**

Vavrouš A, Sosnovcová J, Kejlová K, Vápenka L, Jírová D, Vrbík K (2016)  
Method for analysis of 68 organic contaminants in food contact paper using gas and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry  
Food Control 60: 221–229, doi: 10.1016/j.foodcont.2015.07.043.

**Studie 2:**

Vápenka L, Vavrouš A, Votavová L, Kejlová K, Dobiáš J, Sosnovcová J (2016)  
Contaminants in the paper-based food packaging materials used in the Czech Republic  
Journal of Food and Nutrition Research 55(4): 361–373,  
url: <http://www.vup.sk/en/download.php?bullID=1914> (1.4.2020)

**Studie 3:**

Vavrouš A, Pavloušková J, Ševčík V, Vrbík K, Čabala R (2016)  
Solution for blank and matrix difficulties encountered during phthalate analysis of edible oils by high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry  
Journal of Chromatography A 1456: 196–204, doi: 10.1016/j.chroma.2016.06.014

**Studie 4:**

Vavrouš A, Ševčík V, Dvořáková M, Čabala R, Moulisová A, Vrbík K (2019)  
Easy and inexpensive method for multiclass analysis of 41 food contact-related contaminants in fatty food by liquid chromatography-tandem mass spectrometry  
Journal of Agricultural and Food Chemistry 67: 10968–10976,  
doi: 10.1021/acs.jafc.9b02544

Výzkum byl financován **Interní grantovou agenturou Ministerstva zdravotnictví ČR** (projekty č. NT 14375-3/2013 a NT 14182-3/2013), **Ministerstvem zdravotnictví ČR** v rámci koncepčního rozvoje výzkumné organizace („Státní zdravotní ústav – SZÚ, 75010330“) a **Univerzitou Karlovou v Praze** (projekt SVV).

Rád bych poděkoval **Radomíru Čabalovi**, svému školiteli za vedení a podnětné rady při finalizaci publikací a této práce, **Jitce Sosnovcové**, ředitelce Státního zdravotního ústavu a **Dagmar Jírové**, vedoucí Centra toxikologie a zdravotní bezpečnosti, za materiální a přístrojové zázemí, **Lukáši Vápenkovi**, studentovi Vysoké školy Chemicko-technologické, za jeho podíl na experimentální části projektu NT 14375-3/2013 a publikaci výsledků, **Karlu Vrbíkovi**, **Václavu Ševčíkovi**, **Janě Pavlouškové a Aleně Moulisové**, **Kristině Kejlové a Markétě Dvořákové** kolegům ze Státního zdravotního ústavu, za konzultace při realizaci experimentů a jejich podíl na publikacích.

# OBSAH

Abstrakt .....	6
Abstract (AJ) .....	7
1 Úvod .....	8
1.1 Cíl práce .....	9
2 Teoretická Část.....	11
2.1 Migranty .....	11
2.1.1 Aromatické uhlovodíky.....	12
2.1.2 Ftaláty.....	12
2.1.3 Bisfenoly a jejich epoxyderiváty .....	14
2.1.4 Fotoiniciátory tiskařských barev.....	15
2.1.5 Poly- a perfluoralkylové sloučeniny (PFAS).....	16
2.2 Analytická chemie migrantů.....	17
2.2.1 Separace a detekce .....	17
2.2.2 Techniky přípravy vzorku .....	19
2.2.3 Problematika slepých pokusů .....	22
2.3 Validace analytických metod .....	23
2.3.1 Pravdivost.....	23
2.3.2 Přesnost.....	24
2.3.3 Mez detekce (LOD) a mez kvantifikace (LOQ).....	24
3 Experimentální část – komentáře k publikacím .....	26
3.1 Podmínky GC–EI–MS/MS .....	26
3.2 Podmínky HPLC–ESI–MS/MS.....	28
3.3 Podmínky HR-TOF-MS.....	30
4 Výsledky a diskuse – komentáře k publikacím.....	31
4.1 Podmínky GC–EI–MS/MS .....	31
4.2 Podmínky HPLC–ESI–MS/MS.....	32
4.3 Nečistoty rozpouštědel .....	35
4.4 Analýza matričních koextraktů .....	37
4.5 Příprava vzorku – papír .....	38
4.6 Příprava vzorku – tučné potraviny .....	40
4.7 Aplikace metod .....	44
5 Závěr .....	47
Seznam symbolů a zkratk .....	48
Literatura .....	50
Přílohy .....	59

# ABSTRAKT

Materiály ve styku s potravinami představují zdravotní riziko díky široké paletě škodlivin, které se z nich mohou uvolňovat do potravin. Mezi tyto látky, migranty, patří aromatické uhlovodíky, dialkyl-ftaláty, bisfenoly, fotoiniciátory tiskařských barev a perfluoralkylové sloučeniny. Stanovení všech těchto látek může být nákladné a časově náročné, protože v současné době chybí univerzálně použitelné analytické přístupy. Tato práce se pokusila vyvinout metody pro současné stanovení migrantů ze všech zmíněných skupin v materiálech ve styku s potravinami na bázi papíru a v tučných potravinách.

V papírových výrobcích bylo studováno celkem 68 potenciálních škodlivin pomocí kapalinové chromatografie a plynové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí. Všechny analyty se podařilo izolovat současně použitím modifikované metody „QuEChERS“. Ve validační studii tato metoda prokázala přijatelnou výtěžnost a opakovatelnost pro většinu analytů; LOQ se pohybovaly v rozmezí 1,3–220 µg/kg. Analýza 132 reálných papírových výrobků potvrdila výskyt téměř všech studovaných analytů, které byly mnohdy přítomny v komplexních směsích a v koncentracích až 628 mg/kg.

Celkem 41 potenciálních škodlivin bylo sledováno v tučných potravinách pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí. Hlavní úskalí kapalinové chromatografie spočívá v kontaminaci mobilní fáze některými analyty. Podařilo se ovšem zoptimalizovat několik preventivních opatření, které tento problém eliminují, z nichž nejdůležitější je použití předkolony (filtru mobilní fáze). Analyty byly z tučných potravin extrahovány nemísitelným rozpouštědlem. Pro odtučnění extraktu byla v první fázi experimentů úspěšně zoptimalizována technika extrakce na tuhou fázi (SPE). V pozdějších experimentech byly tyto výsledky konfrontovány s dalšími metodami přečištění, z nichž některé představovaly jednoduchou, nenákladnou a srovnatelně účinnou alternativu k SPE. Validace studie ukázala, že většina analytů byla stanovena s vyhovující výtěžností, opakovatelností a LOQ v rozmezí 1,0–42 µg/kg. Při analýze 60 reálných tučných potravin bylo identifikováno 17 analytů s koncentracemi až 33 mg/kg.

**Klíčová slova:** materiály ve styku s potravinami, tučné potraviny, papír a lepenka, migranty, kapalinová chromatografie, plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, extrakce na tuhou fázi, QuEChERS, lipidy, pokles citlivosti způsobený methanolem

## ABSTRACT (AJ)

Food contact materials pose a risk to human health due to a variety of contaminants which they can release into food. These compounds, migrants, include aromatic hydrocarbons, dialkyl phthalates, bisphenols, printing ink photoinitiators, and perfluoroalkyl compounds. The determination of all these substances can be expensive and time-consuming since universally applicable analytical approaches are not available nowadays. This work attempted to develop methods for the simultaneous determination of migrants from all of the mentioned groups in paper-based food contact materials and fatty food.

A total of 68 contaminants were studied in paper products using liquid chromatography and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry detection. All analytes were isolated simultaneously using the modified "QuEChERS" method. This method demonstrated acceptable recovery and repeatability for most analytes in the validation study; LOQs ranged from 1.3 to 220  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Analysis of 132 real paper products confirmed the occurrence of almost all studied analytes, which were often present in complex mixtures and at concentrations up to 628  $\text{mg}/\text{kg}$ .

A total of 41 potential contaminants were monitored in fatty foods by liquid chromatography with tandem mass detection. Contamination of the mobile phase by some analytes represents the main drawback of liquid chromatography. However, several preventive measures to eliminate this problem were developed, of which the use of the precolumn (mobile phase filter) was the most important. The analytes were extracted from fatty foods using the immiscible solvent. Solid phase extraction (SPE) technique was successfully optimized for defatting the extract during the first experiments. In later experiments, these results were confronted with other purification methods, some of which represented a simple, inexpensive and comparatively effective alternative to SPE. The validation study showed that most analytes were determined with satisfactory recovery, repeatability, and LOQs in the range of 1.0–42  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . During the analysis of 60 real fatty foods, 17 analytes were identified at concentrations up to 33  $\text{mg}/\text{kg}$ .

**Keywords:** food contact materials, fatty food, paper and cardboard, migrants, liquid chromatography, gas chromatography, mass spectrometry, solid phase extraction, QuEChERS, lipids, methanol-associated sensitivity loss

# 1 ÚVOD

Termín materiály ve styku s potravinami označuje materiály a předměty, které jsou určeny pro styk s potravinami, již ve styku s potravinami jsou, nebo do kontaktu s potravinami mohou přijít. V praxi se jedná o širokou paletu materiálů s různým chemickým složením a různou funkcí, např. kontejnery pro transport potravin, techniku v potravinářském průmyslu, obalové materiály, nádobí atd. Na všechny tyto materiály se vztahuje požadavek dostatečné stability a inertnosti. Z materiálů se do potravin nesmí uvolňovat (migrovat) chemické látky, které by mohly ohrozit lidské zdraví, způsobit nepříjemnou změnu ve složení potravin nebo zhoršit jejich senzorycké vlastnosti (Evropský parlament a rada 2004). Tento dokument dále definuje celkem 17 skupin materiálů, které mohou podléhat specifickým legislativním požadavkům. Pro 4 oblasti tyto specifické předpisy skutečně existují – konkrétně se jedná o aktivní a inteligentní materiály (Evropská komise, EC 2009), regenerovanou celulózu (EC 2007), keramiku (Rada Evropy 1984) a plasty (EC 2011a). Ostatní skupiny materiálů, které nemají harmonizovanou legislativu na úrovni EU (dále jen neharmonizované materiály), mohou podléhat regulacím v jednotlivých členských státech EU.

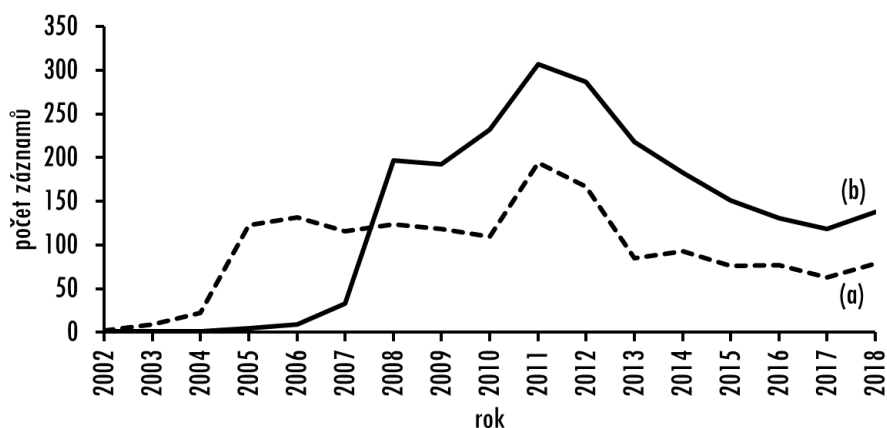
Princip evropské regulace spočívá ve stanovení pozitivních seznamů surovin, které mohou být použity pro výrobu jednotlivých typů materiálů. Surovinám (látky nebo směsi) nebo nezáměrným přísadám (např. olovo a kadmium) jsou přiřazeny buď maximální limity pro obsah v materiálu, nebo SML (specifické migrační limity) pro přenos látky z materiálu do potravin při plánovaném použití. K ověření shody se SML slouží tzv. migrační zkouška, kdy je materiál vystaven kontaktu s potravinou nebo potravinovým simulantem. Koncentrace látky zjištěná následnou analýzou potravin se porovná s SML (EC 2011a).

Rozlišujeme tzv. přímý a nepřímý kontakt s potravinou. Při přímém kontaktu se látky obsažené v materiálu mohou do potravin vyluhovat, zatímco při nepřímém kontaktu do potravin přechází jen dostatečně těkavé látky přes parní fázi. K migraci látek může docházet i uvnitř samotného materiálu. Tímto způsobem se např. komponenty tiskářských barev dostávají z vnější strany obalu do balené potravin. Při výrobě materiálu rovněž hrozí nebezpečí otisku nebo jiného způsobu přenosu látek z potištěné strany na vnitřní stranu (např. materiály skladované v rolích) (Aparicio a Elizalde 2015). Pokud je potřeba migraci látek z materiálu omezit, používají se tzv. funkční bariéry. Jedná se o vrstvy s nižší propustností pro danou látku, které oddělují potravinu od problematické části materiálu (Feigenbaum a kol. 2005).

O významu problematiky zdravotní bezpečnosti materiálů ve styku s potravinami svědčí cca 1600 záznamů v Systému RASFF (Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva) od roku 2002 v souvislosti s migrací látek do potravin (Obrázek 1). Materiály ve styku s potravinami jako typ výrobku (>2200 záznamů) se v systému RASFF objevují např. i z důvodu chybného značení, mechanických závad atd., nicméně migrace látek je nejčastějším typem neshody s legislativou. Existuje také hypotéza, že řada výrobků se schopností uvolňovat potenciálně



nebezpečné látky do potravin zůstává kontrolními orgány nezachycena z důvodu neexistence specifické legislativy. EFSA (Evropský úřad pro bezpečnost potravin) dokonce soudí, že jsou to právě neharmonizované materiály jako papír a lepenka, laky a materiály pro povrchovou úpravu, tiskařské inkousty, adhezivní látky, pryž a elastomery, které představují významný zdroj zdravotního rizika (EFSA 2012a). Na Evropské úrovni existují koordinované snahy monitorovat látky migrující z různých typů materiálů (EC 2019). Tyto snahy se neobejdou bez moderních analytických metod.



Obrázek 1. Počet záznamů v systému RASFF, které se týkají (a) migrace chemických látek do potravin (typ rizika) a (b) materiálu ve styku s potravinami (typ produktu) (RASFF 2019).

## 1.1 Cíl práce

Existuje mnoho látek schopných migrace (migrantů) s toxikologickým potenciálem a moderní analytické metody představují nutnou podmínku pro jejich sledování. Tato práce se věnuje studiu celkem 83 významných analytů v papírových materiálech pro styk s potravinami a v tučných potravinách. Hlavním cílem bylo vyvinout analytické metody, které by splnily následující požadavky: 1. univerzální použitelnost pro organické látky s různými vlastnostmi, 2. nízké limity kvantifikace, resp. vysoký záchyt pozitivních vzorků, 3. minimální časová náročnost, 4. přijatelné náklady.

První matrice, papír a lepenka, se často používá k balení potravin, filtraci (např. kávové filtry) nebo pečení (např. pečící papíry). Protože zatím neexistuje harmonizovaná evropská legislativa pro papír a lepenku, je nutné tyto materiály zkoumat z hlediska chemické bezpečnosti. Za účelem sběru pilotních dat o výskytu co možná nejširšího spektra škodlivin v papírových výrobcích bylo nutné zavést novou analytickou metodu. Podobná metoda zatím v odborné literatuře chybí, protože dostupné studie se obvykle zabývají pouze stanovením několika homologů nebo látek s podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi.

Existuje předpoklad, že řada migrantů bude díky svým lipofilním vlastnostem migrovat z různých materiálů do matric s významným obsahem tuku. Tučné potraviny se tudíž staly druhou oblastí zájmu této práce. Protože v literatuře opět chybí analytické studie, které by pokrývaly širší spektrum migrantů, jedná se o další oblast s potenciálem pro vývoj nových analytických metod. Nové metody mohou sloužit nejen k přímému monitoringu migrantů v potravinách, ale také pro účely zkoušení materiálů stykem s potravinovým simulantem D2, tedy rostlinným olejem, dle EC (2011a).

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Migranty

Existuje velmi mnoho látek, které se mohou uvolňovat z materiálů ve styku s potravinami. Představu o počtu potenciálních migrantů z plastových výrobků poskytuje seznam asi 900 povolených surovin (EC 2011a). Pro výrobu papíru je v ČR povoleno asi 300 různých surovin (MZ ČR 2001). Bossuyt a kol. (2016) uvádí, že potištěný papír a lepenka může obsahovat kolem 6000 různých komponent, z nichž 77 % dosud nebylo toxikologicky zhodnoceno. Celkový počet chemických individuí v neharmonizovaných materiálech se na základě oficiálních pozitivních seznamů v členských státech EU odhaduje na cca 8000 (Simoneau a kol. 2016).

Tyto odhady stále nemusí být úplné, protože z materiálů se může uvolňovat řada sloučenin, které na pozitivních seznamech nejsou. Jedná se o tzv. NIAS (nezáměrně přidané sloučeniny), mezi které patří reakční nebo rozkladné produkty výchozích látek nebo materiálu samotného, nečistoty vstupních surovin apod. (Koster a kol. 2015). Základním kritériem pro hodnocení NIAS je molekulová hmotnost. EFSA (2008a) považuje za toxikologicky rizikové látky s molekulovou hmotností pod 1000 Da, neboť se nepředpokládá, že by se těžší molekuly vstřebávaly v trávicím traktu. Některé práce však tuto hypotézu zpochybňují (Bjarnason a kol. 1995).

Mezi typické zástupce NIAS patří oligomery, tj. látky s variabilním počtem monomerních jednotek, které vznikají jako vedlejší produkty polymerace nebo rozkladem polymeru. Schopnost migrace byla potvrzena např. u cyklických a lineárních oligomerů ethylen-tereftalátu z PET (polyethylentereftalátu), cyklických dimerů a lineárních dimerů až heptamerů bisfenol A diglycidyletheru z epoxidových pryskyřic, nebo dimerů a trimerů styrenu (Hoppe a kol. 2016). Další rozkladné produkty jsou reprezentovány např. C<sub>1</sub>–C<sub>10</sub> karbonylovými sloučeninami, které mohou migrovat z PET (Nawrocki a kol. 2002). V recyklovaném papíru a lepence se můžeme setkat s rezidui tiskařských barev, komponentami speciálních typů papíru, látkami používanými pro zpracování papíru apod., které jsou přítomny jako nečistota ve vstupní surovině – recyklovaných papírových vláknech. Biedermann a Grob (2013) identifikovali v reálných vzorcích nepotištěného recyklovaného papíru celkem >250 organických látek schopných migrace. Autoři upozornili také na 51–63 látek, které se nepodařilo identifikovat kvůli absenci hmotnostního spektra v knihovně. Nedostupnost hmotnostních spekter a analytických standardů představuje základní úskalí kvalitativní i kvantitativní analýzy NIAS. Z toho důvodu pravděpodobně mnoho NIAS zatím neznáme. V některých případech však na přítomnost látek s toxikologickým potenciálem, které se nepodařilo identifikovat analytickou metodou, ukazují *in vitro* metody (Bengtström a kol. 2016).

Následující text shrnuje významné skupiny migrantů, které byly vybrány jako modelové cílové látky pro experimentální část této práce.

### 2.1.1 Aromatické uhlovodíky

V materiálech ve styku s potravinami se setkáváme s uhlovodíky ve formě směsí petrogenního původu, které se označují jako minerální oleje. Tyto směsi se typicky skládají z lineárních a větvených alkanů, alkyl-substituovaných cykloalkanů, aromatických uhlovodíků (často rovněž alkyl-substituovaných) a malého podílu S- a N-substituovaných uhlovodíků. Komplexnost těchto směsí obvykle nedovoluje ani moderním analytickým metodám rozlišit v nich všechna chemická individua. Odborná literatura tudíž v souvislosti s minerálními oleji zmiňuje MOSH (nasyčené uhlovodíky minerálních olejů) a MOAH (aromatické uhlovodíky minerálních olejů), které lze preparativní chromatografickou metodou oddělit jako dvě frakce a dále charakterizovat např. počtem atomů uhlíku v molekule. Frakci MOAH je věnována zvýšená pozornost, neboť obsahuje toxikologicky problematické PAU (polycyklické aromatické uhlovodíky) a jejich alkyl-substituované kongenery. Zastoupení MOAH v minerálním oleji se pohybuje mezi 15 a 35 % (EFSA 2012b).

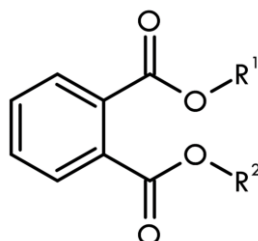
Vollmer a kol. (2011) a Lorenzini a kol. (2010) upozornili na nálezy minerálních olejů s obsahem 10–28 % MOAH v kartónových obalech potravin i samotných balených potravinách. Předpokládá se, že hlavním zdrojem této kontaminace byly tiskařské inkousty a jejich rezidua v recyklovaném papírovém materiálu. Moret a kol. (1997) identifikovali C<sub>13</sub>–C<sub>23</sub> MOSH i MOAH v rýži, čokoládě a jedlých olejích. V tomto případě se jednalo o kontaminaci z jutových pytlů, kde se minerální olej používá k impregnaci proti škůdcům. Výrobky na bázi uhlovodíků určené pro styk s potravinami, např. lubrikanty, bývají záměrně zbaveny své aromatické složky. Uematsu a kol. (2016) v komerčně dostupných lubrikantech pro styk s potravinami MOAH nenalezli. Upozornili však na výskyt MOAH v množství až 13 % v lubrikantech reálně používaných potravinářskými provozovny, což svědčí o faktu, že v praxi do kontaktu s potravinou ne vždy přichází vyhovující materiály. S minerálním olejem potravinářské kvality se také můžeme setkat v roli přídatné látky s číslem E905, která musí splňovat kritéria stanovená legislativou (Evropský parlament a rada 2008). Byly ale popsány i případy výskytu minerálního oleje s obsahem MOAH v potravinách, např. slunečnicovém oleji na Ukrajině (Biedermann a Grob 2009).

MOSH i MOAH vykazují nízkou akutní toxicitu. Zatímco u MOSH se nepředpokládá riziko toxických efektů ani při chronické expozici, MOAH a zejména v nich obsažené PAU jsou zodpovědné za mutagenní, genotoxické a karcinogenní účinky (EFSA 2012b). Evropská komise (EC 2002) definovala seznam 15 toxikologicky prioritních PAU, které se staly předmětem regulace v potravinách (EC 2006). Omezení PAU ani MOAH v materiálech ve styku s potravinami na úrovni EU nicméně v současné době neexistují.

### 2.1.2 Ftaláty

Diestery kyseliny ftalové (ftaláty) jsou intenzivně průmyslově využívané látky, jejichž chemickou strukturu uvádí Obrázek 2. Mezi nejběžnější zástupce patří dimethyl-, diethyl-,

di-*n*-butyl-, diisobutyl-, benzyl-butyl- a bis(2-ethylhexyl)-ftalát. V praxi se rovněž setkáváme s izomerickými směsmi dialkyl-ftalátů s nasycenými rozvětvenými primárními alkyly C<sub>9</sub> a C<sub>10</sub>, které se souhrnně označují pojmem diisononyl-, resp. diisodecyl-ftalát (EC 2011 a).



Obrázek 2. Chemická struktura ftalátů.

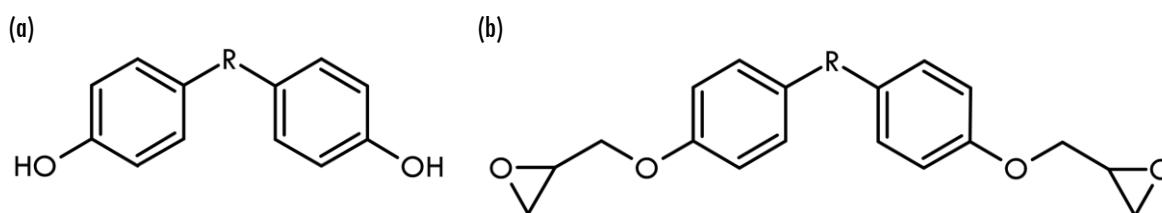
Ftaláty se používají zejména jako změkčovadla v měkčeném PVC (polyvinylchloridu). Z tohoto materiálu může být vyrobena řada výrobků, které přichází do styku s potravinami, např. hadice, těsnění a elastické fólie. Mezi další zdroje ftalátů v potravinách patří např. papír a tiskařské inkousty (Cao 2010). Hadice z měkčeného PVC určené k transportu čerstvého mléka v mlékárnách mohou do mléka uvolnit ftaláty na koncentracích v řádu 0,1 mg/kg (Feng a kol. 2005). Těsnění víček z měkčeného PVC uvolňuje ftaláty např. do konzervovaných omáček, pesta a potravin naložených v rostlinném oleji (Fankhauser-Noti a Grob 2006). Protože ftaláty slouží také jako aditiva lepidel a tiskařských inkoustů, Aurela a kol. (1999) zjistili, že z lepidel papírových sáčků může za normálních podmínek skladování do baleného cukru migrovat 57 až 74 % obsažených ftalátů. Rezidua lepidel a tiskařských inkoustů jsou zároveň zodpovědná za výskyt ftalátů v recyklovaném papíru. Migrace ftalátů z recyklovaných papírových obalů do potravin byla popsána např. u krabic na pizzu (Bononi a Tateo 2009). Protože potravina během své výroby, skladování a transportu přichází do styku s řadou různých materiálů, ne vždy se podaří prokázat souvislost mezi konkrétním typem materiálu a nálezem ftalátů. Bi a kol. (2013) např. soudí, že ke kontaminaci olivového oleje ftaláty dochází zejména během výroby a skladování, zatímco spotřebitelské obaly mají zanedbatelný vliv. Nálezy ftalátů v tučných potravinách, jako např. jedlé oleje (Pereira a kol. 2019), mléko (Li a kol. 2011) a maso (Guo a kol. 2010) jsou poměrně časté.

Do současnosti bylo 10 ftalátů zařazeno mezi látky vzbuzující mimořádné obavy v důsledku jejich reprodukční toxicity a/nebo vlastností narušujících endokrinní systém (ECHA 2018). Endokrinní změny u lidí po expozici některým ftalátům průběžně potvrdila řada studií, např. Kim a kol. (2018). TDI (tolerovatelný denní příjem) se v závislosti na konkrétní látce a skupině obyvatel pohybuje v rozmezí 0,02–0,37 mg/kg tělesné hmotnosti/den (Heudorf a kol. 2007). Několik ftalátů a jejich izomerních směsí je v EU povoleno pro výrobu plastových materiálů pro styk s potravinami a mají definovaný specifický migrační limit: dibutyl-ftalát (0,30 mg/kg), benzyl-butyl-ftalát (30 mg/kg), bis(2-ethylhexyl)-ftalát (1,5 mg/kg), diallyl-

ftalát (nedetekovatelný) a dialkyl-ftaláty s nasycenými rozvětvenými primárními alkyly C<sub>8</sub> až C<sub>11</sub> (9 mg/kg) (EC 2011a). Obsah ftalátů v potravinách zatím na úrovni EU regulován není.

### 2.1.3 Bisfenoly a jejich epoxydetiváty

Bisfenoly jsou látky s chemickou strukturou (Obrázek 3a). Nejznámější a průmyslově nejpoužívanější látkou z této skupiny je bisfenol A. Díky přibývajícím zákazům používání bisfenolu A v EU se dlouhodobě předpokládá, že bude stále více nahrazován strukturně příbuznými látkami – dalšími bisfenoly (Chen a kol. 2002).



Obrázek 3. Chemická struktura (a) bisfenolů a (b) bisfenol diglycidyletherů. Příklady běžných bisfenolů: bisfenol A (R = C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), B (R = C(CH<sub>3</sub>)C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>), E (R = CHCH<sub>3</sub>), F (R = CH<sub>2</sub>), S (R = SO<sub>2</sub>)

Bisfenol A a fosgen jsou výchozí látky při výrobě polykarbonátu. Z tohoto materiálu se vyrábí různé typy nádobí a obalů, z nichž se může nezreagovaný bisfenol A vyluhovat. Koncentrace 689–710 µg/kg bisfenolu A byly např. nalezeny v potravinovém simulantu B (3% kyselině octové) po kontaktu s polykarbonátovými šálky (Spagnuolo a kol. 2017). Santillana a kol. (2013) zdokumentovali migraci bisfenolu A z polykarbonátových kojeneckých lahví do dětské výživy a potravinových simulantů za různých podmínek. Nejvyšší nálezy se pohybovaly v jednotkách mg/kg potravin nebo simulantu.

Bisfenoly hrají důležitou úlohu při termotisku, a proto bývají často obsaženy v papíru účtenek apod., kde se tato technologie tisku používá. Bisfenol může v těchto aplikacích tvořit až jednotky % hmotnosti papíru (Babu a kol. 2015). K expozici bisfenolům z účtenek však nedochází pouze dermální cestou, ale také skrze potraviny. Přítomnost účtenek ve sběrovém papíru vede k výskytu bisfenolů ve výrobcích z recyklovaného papíru (Pérez-Palacios a kol. 2012), které dále kontaminují potraviny.

V kopolymerech bisfenolu s epichlorhydrinem, tj. epoxidových materiálech, se dále setkáváme s bisfenol-diglycidylethery (Obrázek 3b). Ve vodném prostředí potravin a potravinových simulantů se epoxidová vazba v těchto molekulách může hydrolyzovat za vzniku dalších produktů. V epoxidových materiálech je tedy s každým bisfenol-diglycidyletherem asociováno několik dalších příbuzných migrantů. Epoxidové materiály se v současné době často používají jako vnitřní nátěry kovových konzerv, a tudíž odpovídající bisfenoly bývají detekovány právě v konzervovaných potravinách. Fattore a kol. (2015) upozornili na nálezy bisfenolu A, B, bisfenol A- a bisfenol F diglycidyletheru o koncentraci 19–187 µg/kg v konzervovaných rybách.

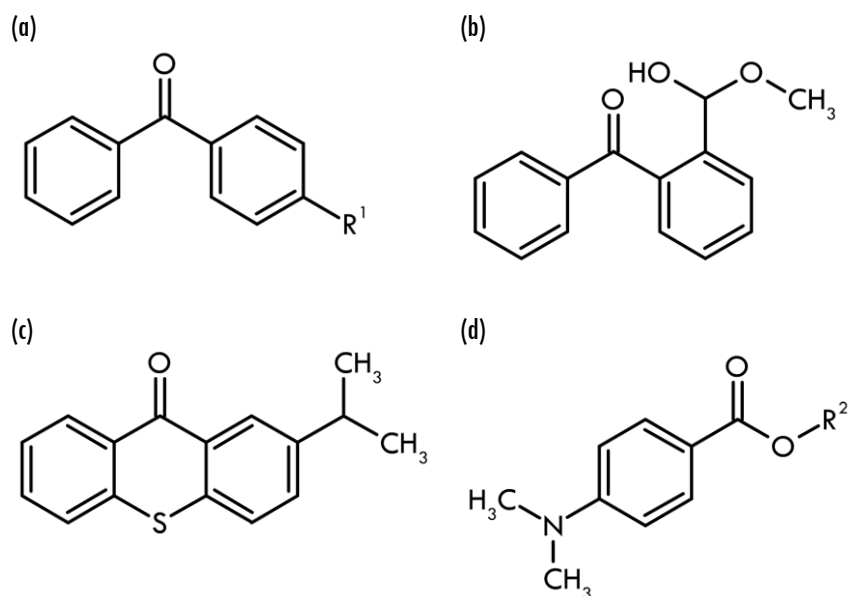
Bisfenol A měl v této studii nejvyšší frekvenci výskytu a zároveň nejvyšší nálezy. Zou a kol. (2012) monitorovali bisfenol A-, bisfenol F diglicidylether a jejich hydrolytické produkty v různých konzervovaných potravinách, přičemž nejvyšší nález 88 µg/kg odpovídal bisfenol A-diglicidyletheru.

Bisfenolu A jsou přisuzovány různé toxické účinky, např. podíl na rozvoji metabolických poruch, hepatotoxicita, neurotoxicita a imunotoxicita (Michalowicz 2014), a z toho důvodu byl zařazen na seznam látek vzbuzujících mimořádné obavy (ECHA 2018). TDI bisfenolu A byl stanoven na 4 µg/kg tělesné hmotnosti/den (EFSA 2015). Nedávná studie (Dvořáková a kol. 2016) odhalila endokrinní aktivitu u 14 strukturálních analogů bisfenolu A. Pro migraci bisfenolu A z plastových materiálů je stanoven limit 0,6 mg/kg (EC 2011a), nicméně v materiálu kojeneckých lahví je použití bisfenolu A zakázáno úplně (EC 2011b). Limity pro bisfenol A diglycidylether a zákaz výskytu bisfenol F- a novolac diglycidyletheru ve všech typech materiálů pro styk s potravinami stanovuje nařízení EC (2005).

#### 2.1.4 Fotoiniciátory tiskařských barev

Fotopolymerace je děj, při kterém dochází k iniciaci polymerizační reakce UV zářením. Kompozice vytvrzovaného materiálu musí obsahovat fotoiniciátor, tj. látku, která po absorpci záření iniciuje polymerizaci dalších složek. Tento děj našel své uplatnění při vytvrzování laků, lepidel, tmelů a mj. i tiskařských inkoustů, které se používají při potisku materiálů pro styk s potravinami (Lago a kol. 2015). Fotoiniciátory obsažené v tiskařských barvách (Obrázek 4) mohou migrovat do potravin a představovat bezpečnostní riziko.

První zmínky o možnosti migrace fotoiniciátorů do potravin se objevily v roce 2005 v systému RASFF, kdy bylo zahájeno masivní stahování kontaminovaných potravin z trhu (RASFF 2019, Aparicio a Elizalde 2015). Fotoiniciátory se často vyskytují v papírových obalech. Např. Koivikko a kol. (2010) identifikovali benzofenon (59 % pozitivních vzorků) a jeho methylované deriváty v potištěných papírových obalech. Nicméně ty samé analyty se vyskytovaly i v nepotištěných obalech z recyklovaného papíru, což svědčí o tom, že rezidua fotoiniciátorů z tiskařských barev při recyklačním procesu zůstávají v papírových vláknech. Bugey a kol. (2013) upozornili na koncentrace benzofenonu 3,9–7,6 mg/kg v cereálních potravinách. Analýza kartónových obalů těchto potravin odhalila koncentrace benzofenonu v rozmezí 250–500 mg/kg, což odpovídá přenosu 1–2 % původního množství benzofenonu z obalu do potravin. Biedermann a kol. (2013) a Gallart-Ayala a kol. (2011) identifikovali v kartónových obalech potravin, resp. potravinách celkem 9, resp. 11 fotoiniciátorů, z nichž benzofenon se vyznačoval nejvyšší frekvencí výskytu a zároveň největší schopností přenosu do potravin.



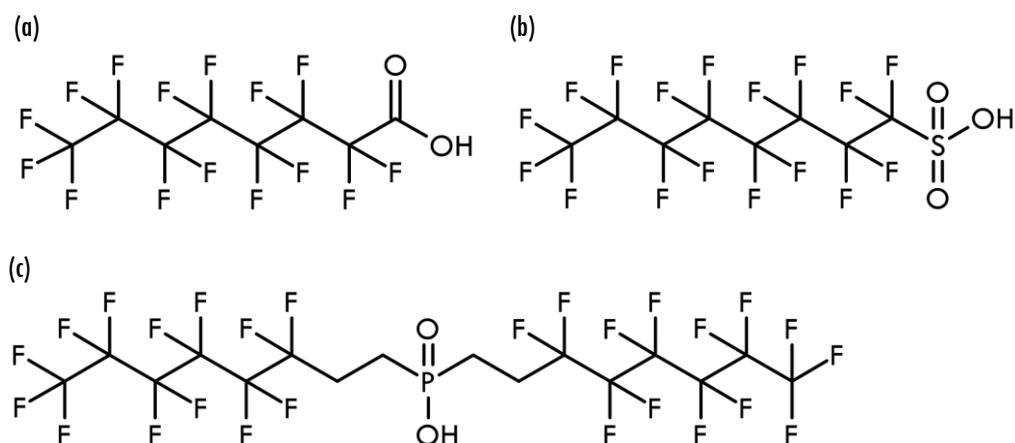
Obrázek 4. Příklady běžných fotoiniciátorů: (a) benzofenon ( $R^1 = H$ ) a jeho substituční deriváty ( $R^1 = CH_3, OH$ ), 4-benzoylbifenyl ( $R^1 = \text{fenyl}$ ), (b) methyl-2-benzoylbenzoát, (c) 2-isopropylthioxanton, (d) ethyl-4-(dimethylamino)benzoát ( $R^2 = C_2H_5$ ), 2-ethylhexyl-4-(dimethylamino)benzoát ( $R^2 = CH_2CH(C_2H_5)(CH_2)_3CH_3$ ).

Benzofenon vykazuje hepatotoxické a nefrotoxické účinky, genotoxický potenciál prokázán nebyl. TDI pro tuto látku byl stanoven na 0,03 mg/kg tělesné hmotnosti/den (EFSA 2009). U 2-isopropylthioxantonu a 2-ethylhexyl-4-(dimethylamino)benzoátu nebyla prokázána genotoxicita a díky nedostatku toxikologických dat žádné další toxické účinky nejsou známy (EFSA 2005). Některé studie naznačují existenci endokrinních efektů způsobených fotoiniciátory (Morizane a kol. 2015). Jelikož zatím v EU neexistuje harmonizovaná regulace tiskařských inkoustů ani papíru a lepenky, fotoiniciátory zatím nemají stanovené legislativní limity.

### 2.1.5 Poly- a perfluoralkylové sloučeniny (PFAS)

Molekuly PFAS obsahují fluorovanou alifatickou část a polární skupinu. Některé PFAS vznikají jako vedlejší produkty průmyslové výroby fluoropolymerů a do potravin se dostávají jako environmentální kontaminanty. Některé díky své povrchové aktivitě a schopnosti odpuzovat vodu i olej (polyfluorované surfaktanty) nachází uplatnění jako impregnace textilu, papíru a kůže, jako součást barev, čisticích prostředků a insekticidních přípravků EFSA (2012b). Trier a kol. (2011) podrobili analýze průmyslově používané směsi polyfluorovaných surfaktantů, kde identifikovali více než 115 různých chemických látek patřících do těchto skupin: polyfluoralkylfosfonáty, -ethoxyláty, -akryláty, -aminokyseliny, -sulfonamidfosfáty a -thio kyseliny. Obrázek 5 uvádí reprezentativní zástupce PFAS, které byly studovány v této práci.





Obrázek 5. Příklady PFAS: (a) perfluoroktanová kyselina (PFOA), (b) perfluoroktansulfonát (PFOS), (c) bis(1H,1H,2H,2H-perfluoroktyl)fosfinát.

Schaider a kol. (2017) Zabaleta a kol. (2016) identifikovali PFAS v různých materiálech pro styk s potravinami na bázi papíru. Still a kol. (2013) prokázali schopnost polyfluorovaných látek migrovat z papírového obalu do másla během skladování. K migraci může docházet rovněž z papírových sáčků na popcorn při jeho přípravě v mikrovlnné troubě Begley a kol. (2008). Ryby, mořské plody a maso patří dle EFSA (2012b) k nejčastěji kontaminovaným typům potravin. Na pozitivní nálezy bylo dále upozorněno např. v mléce (Capriotti a kol. 2013), mléčných výrobcích (Still a kol. 2013), nebo rostlinném oleji (Yang a kol. 2015).

Perfluorooktanová a perfluordekanová kyselina jsou v EU považovány za látky perzistentní a toxické se schopností bioakumulace (ECHA 2018). U perfluorooktanové kyseliny byla v epidemiologických studiích a studiích *in vivo* prokázána řada toxických účinků, např. hepatotoxicita, reprodukční toxicita a karcinogenní účinky (EPA 2005). Některé studie potvrdily také toxické (Tichý a kol. 2010) a endokrinní (Chaparro-Ortega a kol. 2018, Shah-Kulkarni a kol. 2016) účinky dalších PFAS.

## 2.2 Analytická chemie migrantů

### 2.2.1 Separace a detekce

V analýze diskutovaných skupin látek mají dominantní postavení GC (plynová chromatografie) a HPLC (vysokoučinná kapalinová chromatografie). Následující text rozebírá možnosti separace a detekce jednotlivých skupin analytů pomocí zmíněných chromatografických technik.

**Minerální olej.** Doporučená strategie analýzy minerálních olejů se zakládá na spojení preparativní HPLC s analytickou koncovkou GC-FID (GC s plamenově-ionizační detekcí). Vzhledem k velkému množství potenciálních interferentů musí být laboratoř dále vybavena řadou pomocných preparativních metod (Bratinova a Hoekstra 2019). Tato problematika klade

značné nároky na přístrojové zázemí laboratoře a zkušenosti operátorů, proto byla pro účely této práce zredukována na stanovení PAU.

**PAU.** V této práci bylo studováno celkem 16 PAU od naftalenu ( $C_{10}H_8$ ) po benzo[ghi]perylen ( $C_{22}H_{12}$ ) a jejich 11 alkyl-substituovaných derivátů. Mezi analyty je řada izomerů, z nichž zejména benzofluorantheny jsou považovány za problematické z hlediska separace. Bordajandi a kol. (2008) tyto analyty rozdělili pomocí kapilární kolony pro GC se středně polární stacionární fází DB-17. Různí výrobci nabízí GC i HPLC kolony optimalizované pro separaci PAU, které se prodávají pod komerčním označením např. „PAH“ nebo „EUPAH“. Zatímco v oblasti GC se používá MS (hmotnostní spektrometrie) jako výhradní způsob detekce, v HPLC je možná volba mezi MS a FLD (fluorescenční detekcí). FLD poskytuje nižší limity detekce pro většinu analytů, nicméně některé analyty mají odezvu horší (benzo[*j*]fluoranthen, indeno[1,2,3-*c,d*]pyren) a cyklopenta[*c,d*]pyren vůbec nefluoreskuje (Hollosi a Wenzl 2011). MS naproti tomu nabízí možnost analyzovat všechny PAU současně a oproti FLD je tato technika robustnější vůči matričním interferencím při analýze komplexních vzorků. Ionizace PAU v HPLC může být dosaženo technikou APPI (fotoionizace za atmosférického tlaku) za použití post-kolonových činidel, tj. např. toluenu (Shi a kol. 2015) nebo anisolu Hollosi a Wenzl (2011). Takino a kol. (2001) popsali možnost stanovení PAU technikou HPLC–MS/MS s ionizací elektrosprejem (ESI) v přítomnosti dusičnanu stříbrného jako post-kolonového činidla.

**Ftaláty.** Celkem 4 ftaláty a 2 izomerní směsi ftalátu jsou v EU povoleny pro výrobu plastových výrobků pro styk s potravinami (EC 2011a), nicméně v současnosti publikované studie se zabývají monitoringem i více než 20 různých ftalátů (Xu a kol. 2014, Sun a kol. 2012, Fan a kol. 2012). K analýze těchto látek obvykle slouží techniky GC–MS a HPLC–MS/MS, nicméně existují také aplikace GC–FID (Yan a kol. 2011) nebo HPLC–DAD (HPLC s detektorem diodového pole) (Xie a kol. 2014) založené na velkém zkoncentrování analytů před analýzou. Mezi ftaláty existuje několik izomerů, např. di-*n*-butyl- a diisobutyl-ftalát, nebo di-*n*-oktyl- a bis(2-ethylhexyl)-ftalát, které se uspokojivě dělí použitím běžných nepolárních stacionárních fází, jako např. 5 % fenyl- 95 % dimethylpolysiloxan pro GC (např. Bradley a kol. 2013), nebo C18 pro HPLC (např. Xu a kol. 2014). U izomerních směsí diisononyl- a diisodecyl-ftalátu je situace opačná: chromatografickými metodami není možné dosáhnout dostatečné separace všech izomerů, které jsou tudíž kvantifikovány dohromady. Za podmínek separace kapilární GC–MS izomerní směsi vytváří shluk částečně oddělených signálů, které se eluují v rozmezí několika minut (např. Liu a kol. 2013). Z důvodu dosažení požadované selektivity se pro kvantifikaci izomerních směsí používají ionty s relativně nízkou intenzitou (Lin a kol. 2003), proto mají tyto analyty zpravidla vyšší LOD než ostatní ftaláty (Ierapetritis a kol. 2014). Tento problém odpadá při použití HPLC–MS, kdy směs izomerů vytváří jednotlivý signál a k její kvantifikaci slouží selektivní a dostatečně intenzivní ion  $[M+H]^+$  (Lin a kol. 2003). Alternativní přístup založený na stanovení sumy ftalátů po transesterifikaci na dimethyl-ftalát, kde odpadá problematika separace, vyvinuli Ostrovský a kol. (2011).

**Fotoiniciátory tiskařských barev** lze analyzovat pomocí technik GC–MS (Gil-Vergara a kol. 2007), HPLC–MS (Shen a kol. 2009), HPLC–DAD nebo HPLC–FLD (Jung a kol. 2010). Řada analytů, mezi které patří např. benzofenon, isopropylthioxanton a 2-ethylhexyl-4-(dimethylamino)benzoát, jsou kompatibilní se všemi zmíněnými technikami. Ve výše uvedených publikacích figurují kolony stacionární fázi s fází 5% fenyl- 95 % dimethylpolysiloxan (GC) nebo C18 (HPLC). Gallart-Ayala a kol. (2011) popsali současnou analýzu 11 fotoiniciátorů technikou HPLC–MS/MS na koloně Discovery HS F5. Kritickou úlohu při separaci 2- a 4-isopropylthioxanthonu hrála teplota termostatu kolony, jejíž optimální hodnota byla 5 °C. Izomery methylbenzofenonu je možné separovat pomocí GC×GC (komprehenzivní plynová chromatografie) na kolonách VF-5MS×VF-17MS (Bugey a kol. 2013).

**Bisfenoly.** K přímé analýze bisfenolů slouží reverzní HPLC s detektory MS (Ferrer a kol. 2011), FLD (Grumetto a kol. 2013) nebo UV (Reyes-Gallardo a kol. 2016). Pomocí HPLC je možné analyzovat bisfenoly včetně epoxy-derivátů a jejich rozkladných produktů (Fattore a kol. 2015, Zou a kol. 2012). Naproti tomu GC–MS v případě bisfenolů údajně nabízí lepší chromatografické rozlišení a nižší detekční limity než HPLC–MS, avšak za cenu derivatizace analytů před analýzou (Ballesteros-Gómez a kol. 2009). Z poznatků studie Stuart a kol. (2005) plyne, že LOD bisfenolu A při stanovení pomocí GC–MS se po derivatizaci fenyltrimethylammonium hydroxidem sníží z 0,80 na 0,004 ng. Mezi další běžná derivatizační činidla patří např. acetanhydrid (Cao a kol. 2015). Vinas a kol. (2010) popsali automatizovanou metodu izolace bisfenolů pomocí mikroextrakce na tuhou fázi (SPME) a jejich následnou derivatizaci parami bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamidu.

**PFAS** jsou obvykle analyzovány pomocí HPLC–MS (Zabaleta a kol. 2016, Crimmins a kol. 2014, Capriotti a kol. 2013). Touto metodou lze současně stanovit více než 115 PFAS s různou délkou fluorovaného alifatického řetězce a různou polární skupinou (Trier a kol. 2011). Tito autoři použili vodnou složku mobilní fáze o pH = 9,7, což umožnilo ionizovat jak iontové, tak neiontové PFAS. Chromatografické rozlišení a symetrii signálu perfluorovaných analytů na běžné stacionární fázi (C18) je možné významně ovlivnit přidávkem polyfluorovaných aditiv do mobilní fáze, které údajně interagují se stacionární fází a mění její selektivitu (Haljasorg a kol. 2014). Pro stanovení perfluoralkylkarboxylových kyselin se nabízí alternativa derivatizace na isobutyl-estery a následné GC–MS analýzy (Dufková a kol. 2012). Některé méně polární PFAS, mezi které patří např. fluorotelomerní alkoholy a akryláty, je dokonce možné analyzovat pomocí GC bez derivatizace na stacionární fázi polyethylenglykol (Dorman a Reiner 2012). Pro ostatní skupiny PFAS však zůstává HPLC jedinou alternativou, neboť nejsou známy stabilní deriváty pro GC (Reiner a kol. 2014).

## 2.2.2 Techniky přípravy vzorku

Optimalizace přípravy papírových výrobků a tučných potravin k analýze pomocí chromatografických technik představuje jeden z hlavních cílů této práce a tato kapitola

pojednává o dostupných technikách. Pro izolaci analytů ze vzorku se v současnosti nabízí řada moderních technik, které je možné souhrnně označit pojmem mikroextrakční. Do této skupiny patří např. mikroextrakce na tuhou fázi (SPME), kterou Bononi a Tateo (2009) použili pro izolaci ftalátů z papírového kartonu, Rios a kol. (2010), Feng a kol. (2005) a Holadová a kol. (2007) pro izolaci ftalátů z jedlého oleje nebo kravského mléka a Kumari a kol. (2013) pro izolaci PAU z čokolády. Yan a kol. (2011) izolovali ftaláty z mléka pomocí tetrachlormethanu technikou disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina (DLLME). Mikroextrakci rozpouštědlem (1-oktanol) v dutém vlákne vyvinuli Sanagi a kol. (2013) pro extrakci PAU z mléka. Tyto mikroextrakční techniky nabízí řadu výhod, jako je např. vysoký prekoncentrační faktor analytů, nízká spotřeba organických rozpouštědel a v některých případech také možnost automatizace. Citované zdroje ovšem zároveň poukazují na řadu kritických parametrů, které je v rámci vývoje metody nutné optimalizovat. Bylo by pravděpodobně velmi obtížné najít optimální podmínky některé z mikroextrakčních technik pro izolaci tak širokého spektra analytů, jako je v této práci. Jako izolační metoda proto byla zvolena extrakce organickým rozpouštědlem.

Extrakce rozpouštědlem stále představuje nejběžnější postup pro izolaci analytů ze vzorku. V závislosti na skupenství a složení vzorku se extrakce provádí různými způsoby, např. pomocí mechanické homogenizace vzorku s rozpouštědlem (Guo a kol. 2010, Sungur a kol. 2015) nebo působením ultrazvuku (Wang a Guo 2010, Zableta a kol. 2016). Technika známá pod zkratkou QuEChERS se zakládá na třepání hydratovaného vzorku s acetonitrilem a následném přidavku solí, což extrakt rozdělí na vodnou a organickou fázi (Anastassiades a kol. 2003). Gallart-Ayala a kol. (2011) popsali její využití pro izolaci fotoiniciátorů z papíru; Xu a kol. (2014) stejným způsobem izolovali ftaláty z potravin. Sun a kol. (2012) extrahovali ftaláty z rostlinného oleje methanolem za zvýšeného tlaku, teploty a působení mikrovlnného záření. Existují rovněž automatizované instrumentální techniky extrakce za zvýšeného tlaku a teploty (PLE a ASE), které našly uplatnění např. pro izolaci PFAS z papíru (Poothong a kol. 2012), nebo bisfenolu A ze sušeného mléka (Ferrer a kol. 2011).

Při extrakci vzorků rozpouštědlem jsou kromě analytů izolovány také komponenty matrice. Tyto látky mohou způsobovat matriční efekty, interferovat se stanovením analytu, nebo mít negativní dopad na stabilitu analytického systému. To platí zejména pro lipidy – koextrakty z tučných potravin. Před chromatografickou analýzou proto extrakty obvykle prochází další úpravou, která má za cíl matriční látky eliminovat. Následující techniky a postupy se běžně používají pro přečištění extraktů z tučných potravin.

**Gelová permeační chromatografie (GPC)** je chromatografická technika, která dělí molekuly na základě tzv. hydrodynamického průměru. Protože hydrodynamický průměr analytů a lipidů se v praxi často liší, GPC představuje použitelnou strategii pro odtučnění extraktů. V současné literatuře byly popsány aplikace GPC pro stanovení PAU Wang a kol. (2016), ftalátů Sun a kol. (2012) nebo PFAS Yang a kol. (2015) v jedlých olejích. Ve všech zmíněných studiích bylo dosaženo separace na stacionární fázi Biobeads SX-3.

**Extrakce na tuhou fázi (SPE)** je preparativní separační technika, při které dochází k rozdělení látky mezi tuhý sorbent naplněný v kolonce a kapalnou fází (vzorek/eluent), která kolonkou prochází. Na trhu existuje řada sorbentů s různými retenčními mechanismy. Grumetto a kol. (2013) a Cao a kol. (2015) popsali aplikaci SPE se sorbentem na bázi oktadecylovaného silikagelu (C18) pro zachycení bisfenolů z rozpouštědla/vzorku s vysokým obsahem vody; k eluci bylo použito rozpouštědlo s vyšším podílem organické složky. Příkladem hojně využívaného polárního adsorbentu je florisil. Fattore a kol. (2015), Sungur a kol. (2015) a Li a kol. (2013b) použili tento adsorbent pro zkoncentrování ftalátů a bisfenolů z extraktů tučných potravin v nepolárním rozpouštědle (isooktan, *n*-hexan); analyty byly z kolonek eluovány směsí *n*-hexanu s ethyl-acetátem nebo acetonem. Adsorbenty na bázi aktivního uhlí použili Capriotti a kol. (2013) a Still a kol. (2013) při stanovení PFAS v mléčných výrobcích. Analyty byly ze SPE eluovány organickým rozpouštědlem s přidavkem amoniaku nebo octanu amonného. Molekuly PFAS typicky obsahují kyselou polární skupinu, a proto je možné je zachytit také na slabém anexu. PFAS lze z těchto SPE kolonek eluovat např. pomocí methanolu s přidavkem amoniaku (Chung a Lam 2014), případně frakcionovat na iontové a neiontové PFAS pomocí různých eluentů Gebbink a kol. (2013). V neposlední řadě je nutné zmínit současný trend SPE, a to tzv. *molecularly imprinted polymers*. Jedná se o polymerní sorbenty vyrobené za přítomnosti „templátových“ molekul, které po odstranění ze struktury polymeru zanechávají vazebná místa s vysokou afinitou ke strukturně podobným molekulám. Tato technologie je v současnosti dostupná např. pro bisfenol A (Li a kol. 2013a) nebo PAU (Xu a kol. 2015).

**Disperzní extrakce na tuhou fázi (dSPE)** se zakládá na stejném principu jako SPE, ovšem její provedení je výrazně jednodušší. Tuhý sorbent se přidává ke kapalnému vzorku ve formě prášku a následně se oddělí usazením. Při analýze migrantů v potravinách našla uplatnění řada sorbentů nebo jejich kombinací, např. PSA (primary secondary amine) (Gallart-Ayala a kol. 2011, Xie a kol. 2014), PSA-C18 (Xu a kol. 2014, Fasano a kol. 2015), Envi-Carb (Crimmins a kol. 2014), Envi-Carb-C18 (Yang a kol. 2015, Lacina a kol. 2011). Některé práce popisují syntézu a použití kompozitních sorbentů s obsahem  $Fe_3O_4$ , které je možné od kapalně fáze oddělit v magnetickém poli (Filippou a kol. 2017, Reyes-gallardo a kol. 2016, Zhang a kol. 2017).

**Extrakce rozpouštědlem.** Lipidy se dobře rozpouští v nepolárních rozpouštědlech. Za předpokladu, že cílové látky do nepolárního rozpouštědla přechází jen omezeně, lze použít tato rozpouštědla k eliminaci lipidů ze vzorku. Filippou a kol. (2017) popsali metodu analýzy bisfenolu A v mléce založenou na odtučnění vzorku *n*-hexanem a následné izolaci analytu pomocí dSPE. Bugey a kol. (2013) extrahovali fotoiniciátory z cereálií acetonitrilem a rozpouštěné lipidy ze získaného extraktu následně vytřepali do *n*-hexanu. Fattore a kol. (2015) spojili tento postup do jednoho kroku, když extrahovali bisfenoly a bisfenol-diglycydylethery z ryb pomocí dvoufázového systému acetonitril-*n*-hexan.

**Vymražení.** Při snížení teploty se snižuje také rozpustnost lipidů v některých organických rozpouštědlech natolik, že se sráží a usazují. Na tomto principu je založeno přečištění v publikovaných metodách pro stanovení ftalátů jedlých olejích (Ierapetritis a kol. 2014) a v potravinách (Bradley a kol. 2013). Jako extrakční rozpouštědlo v první zmíněné práci sloužila směs acetonitrilu a tetrahydrofuranu, ve druhém směs acetonitrilu s dichlormethanem.

### 2.2.3 Problematika slepých pokusů

Většina analytů, kterými se zabývá tato práce, jsou látky intenzivně používané v průmyslu. Slouží jako výchozí suroviny pro výrobu např. plastových výrobků, nátěrových a stavebních hmot, které nachází své uplatnění mj. i v laboratoři. Z toho důvodu může snadno dojít ke kontaminaci vzorku během analýzy. Stanovení migrantů tudíž klade zvýšené nároky na čistotu laboratorního prostředí, pomůcek a chemikálií. Nejlépe zdokumentovaná je situace u ftalátů. Existuje řada zdrojů, které mohou ftaláty obsahovat, např. organická rozpouštědla a sorbenty, jednorázové plastové pomůcky i ovzduší laboratoře (Guo a Kannan 2012). Pokud se podaří zdroj kontaminace identifikovat, je nutné do analytického procesu zahrnout taková opatření, která kontaminaci cílovými látkami eliminují nebo alespoň sniží.

Lin a kol. (2003) upozornili na výskyt ftalátů v organických rozpouštědlech, zejména v hexanu. Dvojnásobnou destilací tohoto rozpouštědla se podařilo hladinu kontaminace snížit 2–3násobně. Podle jiné studie (Fankhauser-Noti a Grob 2007) však účinnost destilace není dostatečná k přečištění hexanu s výchozí koncentrací ftalátů v řádu 100 µg/l. Autorům se podařilo kontaminaci snížit pod hladinu 0,2 µg/l pomocí adsorpce kontaminantů na oxid hlinitý. Je však pravděpodobné, že tento postup nebude účinný pro jiná rozpouštědla než uhlovodíky. Rozpouštědla pro kapalinovou chromatografii mohou rovněž obsahovat ftaláty i neftalátová změkčovadla jako kontaminaci. Vaclavíková a kol. (2016) vyřešili tento problém pomocí 50mm analytické kolony se stacionární fází C18 instalované mezi čerpadlo mobilní fáze a autosampler. Tato kolona zadržuje ftaláty z mobilní fáze, a tak dochází k jejich zpoždění oproti signálům stejných látek pocházejících z nástřiku vzorku.

Komerčně dostupné adsorbenty, např. florisil, obsahují ftaláty o koncentracích až 45 ng/g, které se nepodařilo odstranit ani vyžháním při 650 °C (Guo a Kannan (2012)). Z důvodů možné nebo domnělé kontaminace adsorbentů pro SPE ftaláty některé studie zcela upouští od přečištění extraktu před analýzou ftalátů, a to i v případě tučných matric (Li a kol. 2011). Podle Xu a kol. (2014) může být problematický i plastový materiál obalu kolonek pro SPE, a proto tyto autoři doporučují použít kolonky skleněné. Nicméně Fankhauser-Noti a Grob (2007) identifikovali ftaláty i v různých skleněných laboratorních pomůckách. Tento problém se sice podařilo jednoduše vyřešit promytím přečištěným organickým rozpouštědlem, případně vyžháním na 400 °C, avšak po určité době se původní hladiny ftalátů obnovily. Předpokládá se, že v tomto případě dochází ke kontaminaci z laboratorního ovzduší.

Stejní autoři stanovili v laboratorním ovzduší dibutyl- a bis(2-ethylhexyl)-ftalát o koncentraci 0,9–3,0  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  a prokázali jejich schopnost absorbovat se v exponovaných organických rozpouštědlech a jedlém oleji rychlostí 0,13–0,43  $\text{ng}/\text{cm}^2/\text{h}$ , resp. 0,03–0,18  $\text{ng}/\text{cm}^2/\text{h}$ . Marega a kol. (2013) v laboratorním ovzduší identifikovali koncentrace ftalátů 0,35–2,2  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  a zjistili, že z tohoto zdroje dochází ke kontaminaci jehly autosampleru GC. Kontaminovaná stříkačka generovala odezvy odpovídající nástřiku řádově až 10 pg analytů. Použitím nástřikové techniky PTV s malou penetrací jehly a/nebo dekontaminací jehly v nástřikovém modulu GC se podařilo tyto odezvy snížit na 0,07–1,09 pg.

## 2.3 Validace analytických metod

Vhodnost analytické metody pro zvolený účel se ověřuje validací. V rámci tohoto procesu se experimentálně zjišťují pracovní parametry metody, které jsou následně porovnány s kritérii přijatelnosti. Následující text shrnuje nejvýznamnější pracovní parametry, které byly validovány během experimentální části této práce.

### 2.3.1 Pravdivost

Pravdivost analytické metody chápeme jako schopnost poskytovat výsledky shodné se skutečnou hodnotou měřené veličiny, tj. prosté systematické chyby. Skutečnou hodnotu veličiny obvykle neznáme, ale existuje řada ověřovacích postupů, kdy je stanoven její odhad – tzv. dohodnutá referenční hodnota ( $x_{\text{ref}}$ ). Patří sem např. analýza (certifikovaných) referenčních materiálů, mezilaboratorní porovnání, srovnání s referenční metodou nebo referenční laboratoří, analýza vzorků se známým přídatkem analytu (Thompson a kol. 2002, Bratinova a kol. 2009). Při těchto ověřovacích postupech můžeme vyčíslit systematickou chybu skrze výtěžnost nebo odchylku:

$$\text{výtěžnost} = x_{\text{exp}}/x_{\text{ref}}$$

$$\text{odchylka} = (x_{\text{exp}} - x_{\text{ref}})/x_{\text{ref}}$$

kde  $x_{\text{exp}}$  je změřená hodnota studované veličiny. Pomocí Studentova t-testu lze testovat nulovou hypotézu výtěžnost = 1, resp. odchylka = 0. Pokud je tato hypotéza zamítnuta a existuje signifikantní rozdíl mezi  $x_{\text{exp}}$  a  $x_{\text{ref}}$ , připadají v úvahu dva možné scénáře: 1. výsledky metody korigovat na systematickou chybu, 2. zahrnout tuto chybu do nejistoty metody. Některé normy stanovují pro výtěžnost fixní kritéria, např. Bratinova a kol. (2009) pro analýzu materiálů ve styku s potravinami v závislosti na hmotnostním zlomku analytu ve vzorku ( $w$ ): 40–120 % ( $w \leq 10 \text{ ng/g}$ ), 60–110 % ( $w = 10\text{--}100 \text{ ng/g}$ ), 80–110 % ( $w \geq 100 \text{ ng/g}$ ). Za obecně přijatelnou je v analýze reziduí pesticidů považována výtěžnost z intervalu 70–120 % (EC 2017). Stejná norma ovšem připouští i výtěžnosti v rozmezí 30–140 %, a to pokud jsou výsledky konzistentní (nízká směrodatná odchylka) a je dobře objasněn důvod, proč k systematické odchylce dochází.

### 2.3.2 Přesnost

Za přesnou je možné považovat takovou metodu, která generuje nízký náhodný rozptyl paralelních stanovení. V praxi přesnost často závisí na koncentraci analytu (Thompson a kol. 2002) a tuto vlastnost (heteroskedascitu) je v datovém souboru možné detekovat pomocí různých statistických nástrojů (např. Levene 1960). Horwitz a kol. (1980) objevili v kontextu analýzy potravin empirický vztah mezi RSD (relativní směrodatnou odchylkou) a hmotnostním zlomkem analytu ( $w$ ), který vyjadřuje následující rovnice:

$$\text{RSD}_h (\%) = 2^{(1-0,5\log w)} = 2w^{-0,15}.$$

Z této rovnice vychází do současnosti obecně přijímané kritérium pro přesnost, tzv. HorRat:

$$\text{HorRat} = \text{RSD}_{\text{exp}}/\text{RSD}_h$$

kde  $\text{RSD}_{\text{exp}}$  je RSD vypočtená z experimentálních dat a  $\text{RSD}_h$  je hodnota předpovězená Horwitzovou rovnicí. Hodnoty  $\text{HorRat} < 0,5$  indikují nízký náhodný rozptyl, zatímco  $\text{HorRat} > 2$  může znamenat nehomogenitu zkušebních vzorků, potřebu další optimalizace metody nebo školení personálu (Horwitz a Albert 2006). Tímto teoretickým základem se řídí i kritéria přijatelnosti pro přesnost analýzy materiálů ve styku s potravinami (Bratinova a kol. 2009). V některých oblastech, např. v analýze reziduí pesticidů, je kritérium pro přesnost definováno jako  $\text{RSD} \leq 20 \%$  (EC 2017). Ověření přesnosti probíhá obvykle současně s pravdivostí dříve zmíněnými postupy (kap. 2.3.1).

### 2.3.3 Mez detekce (LOD) a mez kvantifikace (LOQ)

Jako LOD chápeme nejnižší koncentraci analytu, která může být spolehlivě odlišena od nuly (Thompson a kol. 2002), nebo na které je možné s přijatelnou jistotou detekovat přítomnost analytu (Bratinova a kol. 2009), což jinými slovy znamená, že může být proveden kvalitativní důkaz analytu. LOQ je nejnižší koncentrace analytu, kterou je možné stanovit kvantitativně.

V analytických metodách, které generují nenulový šum základní linie (např. separační metody) lze LOD a LOQ stanovit na základě poměru signálu analytu k šumu základní linie ( $S/N$ ). Za LOD se považuje taková koncentrace analytu, která poskytuje odezvu  $S/N = 3$ ; pro LOQ analogicky platí požadavek  $S/N = 10$ . Experimentální zjištění LOD a LOQ vyžaduje analýzu  $S/N$  ve standardech se známou nízkou koncentrací analytu a následnou interpolací koncentrace do bodu s požadovaným  $S/N$ . Bratinova a kol. (2009) do tohoto postupu zahrnuje i odečtení hodnoty  $S/N$  slepého pokusu. Desimoni a Brunetti (2015) spatřuje několik úskalí metody  $S/N$ , např. problém definice oblasti šumu, nekonzistentnost šumu v čase, kolísání základní linie, problém definice v případě asymetrických signálů a tzv. vyhlazování chromatogramů.

Alternativně je možné definovat LOD a LOQ jako koncentraci, která dává analytický signál ( $y_{\text{LOD}}$ ,  $y_{\text{LOQ}}$ ) v následujícím vztahu k signálu slepého pokusu ( $y_0$ ) a jeho směrodatné odchylce ( $s_{y0}$ ):



$$y_{LOD}, y_{LOQ} = y_0 + k s_{y_0}$$

Odtud LOD a LOQ lze vyjádřit za podmínky lineární kalibrační závislosti jako

$$LOD, LOQ = (y_0 - a + k s_{y_0})/b$$

kde  $a$  je absolutní koeficient lineární funkce,  $b$  je směrnice. Při hodnotě faktoru  $k = 3,28$  je možné analytický signál odlišit od signálu slepého pokusu s 5% rizikem falešně pozitivního výsledku a stejnou pravděpodobností falešně negativního výsledku (Miller a Miller 2010). Zaokrouhlená hodnota  $k = 3$  se používá pro odhad LOD, zatímco výpočet LOQ vychází z hodnoty  $k = 10$ . Proměnné  $y_0$  a  $s_{y_0}$  se stanovují různými experimentálními postupy, např. opakovanou analýzou slepého pokusu. Pokud slepý pokus neposkytuje měřitelnou odezvu, Bratinova a kol. (2009) doporučuje jako odhad  $s_{y_0}$  použít experimentálně zjištěnou směrodatnou odchylku koncentrace nejnižšího kalibračního bodu. Za předpokladu linearit může být výhodné  $y_0$  extrapolovat z kalibrační přímky jako  $y_0 = a$ . Analogicky lze  $s_{y_0}$  odhadnout z kalibrace jako směrodatnou odchylku absolutního koeficientu ( $s_a$ ) (Bratinova a kol. 2009). Výpočet  $s_a$  nicméně vyžaduje několik nezávislých hodnot  $a$ , tedy několik opakovaných analýz kalibrační přímky. Za předpokladu nezávislosti rozptylu odezvy na koncentraci analytu (homoskedascita) je také možné použít standardní chybu lineární regrese ( $s_{y|x}$ ) pro odhad  $s_{y_0}$  (Miller a Miller 2010). Kritéria přijatelnosti pro LOD a LOQ vzhledem ke specifickému migračnímu limitu uvádí Tabulka 1.

Tabulka 1. Kritéria přijatelnosti pro LOD a LOQ v oblasti analýzy materiálů ve styku s potravinami (Bratinova a kol. 2009). SML – specifický migrační limit,  $U_{LOQ}$  – nejistota na hladině LOQ,  $LOD_{ND}$  – legislativní požadavek LOD pro látky, které nesmí migrovat ve zjistitelném množství,  $n$  – počet analytů.

typ regulace	minimální požadavek	optimální požadavek
SML	$LOQ + U_{LOQ} < SML$	$LOQ \leq SML/5$
skupinový SML*	$\sum LOQ_i + \sum U_{LOQ,i} < SML$	$LOQ \leq SML/5/n$
SML „nedetekováno“	$LOD \leq LOD_{ND}$	–
skupinový SML „nedetekováno“*	$LOD \leq LOD_{ND}/n$	–

\*skupinový SML je stanoven pro sumu  $n$  analytů.

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST – KOMENTÁŘE K PUBLIKACÍM

Tato práce se zabývá vývojem metod pro stanovení celkem 83 potenciálních migrantů v papírových výrobcích (Studie 1 a 2) a tučných potravinách (Studie 3 a 4). Pro splnění tohoto úkolu byly zvoleny techniky GC–EI–MS/MS a HPLC–ESI–MS/MS s ohledem na jejich citlivost, selektivitu a univerzální použitelnost. V rámci studie 1 a 2 byly analyty rozděleny do dvou skupin podle použité analytické koncovky: 1. PAU, ftaláty, fotoiniciátory tiskařských barev (GC), 2. bisfenoly a PFAS (HPLC). Všechny analyty studované v tučných potravinách (ftaláty, fotoiniciátory tiskařských barev, bisfenoly a PFAS) bylo možné analyzovat současně pomocí HPLC. Podmínky chromatografického stanovení uvádí následující kapitoly.

Všechny nové analytické metody byly ověřeny ve validačních studiích. Výťažnost a opakovatelnost byly stanoveny při opakované analýze vzorků s umělým přídavkem analytů o známé koncentraci. Opakovanou analýzou kalibrační závislosti byla získána průměrná směrnice ( $b$ ) a směrodatná odchylka absolutního koeficientu lineární kalibrační funkce ( $s_a$ ), které byly použity k vyjádření LOQ podle následující rovnice:

$$\text{LOQ} = 10s_a/b$$

#### 3.1 Podmínky GC–EI–MS/MS

Pro stanovení analytů metodou GC–MS/MS sloužil systém složený z plynového chromatografu Trace 1310, autosampleru Triplus RSH a hmotnostního spektrometru TSQ Quantum XLS Ultra triple quadrupole MS (Thermo Scientific). Objem vzorku 5  $\mu\text{l}$  byl nastříkovan do injektoru PTV (programmable temperature vaporizer) s deaktivovaným slekněným linerem vyhřívaným na teplotu 40 °C. Rozpouštědlo vzorku bylo částečně odpařeno průtokem helia 40 ml/min. Teplota injektoru byla následně zvýšena na 280 °C, přičemž analyty byly v režimu *splitless* přeneseny na kolonu Rxi-PAH (30 m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,10  $\mu\text{m}$ ) udržovanou při 50 °C. Po skončení *splitless* periody (2 min) byla teplota kolony gradientem 50 °C/min zvýšena na 150 °C, dále gradientem 10 °C/min na 210 °C, dále gradientem 20 °C/min na 270 °C, dále gradientem 3 °C/min na 285 °C, a nakonec gradientem 20 °C/min na teplotu 325 °C, která byla udržována další 3 min. Separace probíhala za konstantního průtoku nosného plynu helia 1 ml/min. Analyty byly detekovány pomocí MS/MS s elektronovou ionizací (EI). Tabulka 2 uvádí seznam studovaných analytů a parametry jejich stanovení.

Tabulka 2. Seznam látek analyzovaných pomocí GC ve studii 1 a 2. CAS – identifikační číslo látky v registru Chemical Abstracts Service, IS – látka sloužila jako vnitřní standard.

analyt	CAS	MS/MS přechody	LOQ (ng/g)
<b>PAU</b>			
1,2-dimethylnaftalen	573-98-8	156>141, 115	3,7
1,4-dimethylnaftalen	571-58-4	156>141, 115	3,9

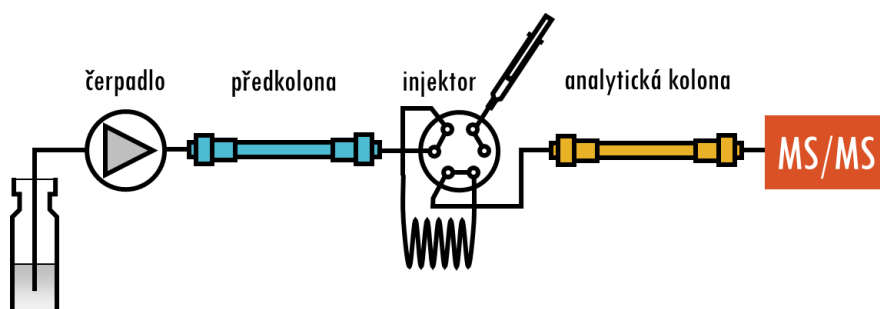
<b>analyt</b>	<b>CAS</b>	<b>MS/MS přechody</b>	<b>LOQ (ng/g)</b>
1,6-dimethylnaftalen	575-43-9	156>141, 115	4,6
1-methylfluoren	1730-37-6	180>165, 178	3,4
1-methylnaftalen	90-12-0	142>115, 141	7,5
2,6-diisopropylnaftalen	24157-81-1	212>197, 155	6,3
2,6-dimethylnaftalen	581-42-0	156>141, 115	3,8
2,7-diisopropylnaftalen	40458-98-8	212>197, 155	8,5
2-methylantracen	613-12-7	192>190, 165	6,1
2-methylnaftalen	91-57-6	142>115, 141	8,7
9-methylantracen	779-02-2	192>190, 165	4,6
acenaften	83-32-9	153>126, 151	7,2
acenaftylen	208-96-8	152>126, 102	4,0
antracen	120-12-7	178>176, 152	5,7
antracen-d <sub>10</sub> (IS)	1719-16-8	188>184, 160	—
benzo[ <i>a</i> ]antracen	56-55-3	228>226, 202	4,2
benzo[ <i>a</i> ]pyren	50-32-8	252>226, 250	7,0
benzo[ <i>b</i> ]fluoranthren	205-99-2	252>226, 250	5,1
benzo[ <i>ghi</i> ]perylene	191-24-2	276>274, 272	8,3
benzo[ <i>k</i> ]fluoranthren	207-08-9	252>226, 250	6,4
dibenzo[ <i>ah</i> ]antracen	53-70-3	278>276, 274	13
fenanthren	85-01-8	178>176, 152	7,6
fluoranthren	206-44-0	202>200, 176	5,3
fluoren	86-73-7	165>163, 139	5,6
chrysen	218-01-9	228>226, 202	6,0
indeno[1,2,3- <i>cd</i> ]pyren	193-39-5	276>274, 272	9,3
naftalen	91-20-3	128>102, 77	29
pyren	129-00-0	202>200, 176	5,1
<b>ftaláty</b>			
bis(2-ethylhexyl)-ftalát	117-81-7	149>65, 93	100
bis(2-ethylhexyl)-ftalát-d <sub>4</sub> (IS)	93951-87-2	153>97, 69	—
diethyl-ftalát	84-66-2	149>65, 93	31
diheptyl-ftalát	3648-21-3	265>149; 149>93	2,3
diisobutyl-ftalát	84-69-5	149>65, 93	110
diisodecyl-ftalát	26761-40-0	307>149, 167	190
diisononyl-ftalát	28553-12-0	293>149, 167	200
dimethyl-ftalát	131-11-3	163>77, 135	6,5
di- <i>n</i> -butyl-ftalát	84-74-2	149>65, 93	190
di- <i>n</i> -oktyl-ftalát	117-84-0	149>65, 93	11
dipentyl-ftalát	131-18-0	149>65, 93	1,8
<b>fotoiniciátory</b>			
2-ethylhexyl-4-(dimethylamino)benzoát	21245-02-3	277>165, 148	5,1
2-isopropylthioxanthon	5495-84-1	254>239, 196	9,5
4-isopropylthioxanthon	83846-86-0	254>239, 196	5,0
4-methylbenzofenon	134-84-9	196>181, 119	7,7
benzofenon	119-61-9	182>105, 77	15
benzofenon-d <sub>10</sub> (IS)	22583-75-1	192>110, 82	—
ethyl-4-(dimethylamino)benzoát	10287-53-3	193>165, 148	4,1
<b>ostatní</b>			
anthrachinon	84-65-1	208>180, 152	18
bis(2-ethylhexyl)-adipát	103-23-1	147>129, 111	220

## 3.2 Podmínky HPLC–ESI–MS/MS

Stanovení analytů metodou HPLC–MS/MS probíhalo na systému složeném z kapalinového chromatografu Agilent 1290 a hmotnostního spektrometru Agilent 6490 vybaveného iontovým zdrojem ESI (Agilent Technologies). Podmínky stanovení v jednotlivých metodách uvádí Tabulka 3. Pro zachycení a zpoždění kontaminantů z mobilní fáze v rámci studie 3 a 4 byla do analytického systému nainstalována předkolona (Obrázek 6). Tabulka 4 uvádí seznam studovaných analytů a parametry jejich stanovení.

Tabulka 3. Podmínky HPLC–ESI–MS/MS v jednotlivých metodách. m.f. – mobilní fáze.

	Studie 1 a 2	Studie 3	Studie 4
předkolona	–	Kinetex C18, 5 µm (50 × 2,1 mm)	Kinetex C18, 5 µm (50 × 2,1 mm)
analytická kolona	Poroshell EC-C18, 2,7 µm (150 × 3,0 mm)	Kinetex Phenyl-hexyl, 2,6 µm (150 × 2,1 mm)	Kinetex Phenyl-hexyl, 2,6 µm (150 × 2,1 mm)
m.f. (A) m.f. (B) aditiva	voda* methanol* *octan amonný, 2 mmol/l	voda* methanol* *octan amonný, 2 mmol/l	voda* methanol *octan amonný, 2 mmol/l
průtok m.f. (ml/min)	0,40	0,35	gradient
gradient m.f.	0 min, 20 % B 2 min, 60 % B 10 min, 100 % B 12 min, 100 % B	0 min, 20 % B 1 min, 60 % B 4 min, 60 % B 5 min, 70 % B 8 min, 75 % B 11 min, 90 % B 13 min, 90 % B 14 min, 90 % B 17 min, 100 % B	0 min, 20 % B, 0,35 ml/min 3 min, 60 % B, 0,30 ml/min 10 min, 75 % B, 0,30 ml/min 11 min, 90 % B, 0,30 ml/min 14.99 min, 90 % B, 0,45 ml/min 15 min, 100 % B, 0,45 ml/min 18 min, 100 % B, 0,45 ml/min



Obrázek 6. Schéma systému pro HPLC analýzu látek s vysokými koncentracemi v mobilní fázi.

Tabulka 4. Seznam látek analyzovaných pomocí HPLC ve studii 1–4. CAS – identifikační číslo látky v registru Chemical Abstracts Service, IS – látka sloužila jako vnitřní standard.

analyt	CAS	MS/MS přechody	LOQ (ng/g) ve studii		
			1 a 2	3	4
<b>ftaláty</b>					
bis(2-ethylhexyl)-ftalát	117-81-7	(+) 391 > 149, 121, 93	–	110	34
butyl-benzyl-ftalát	85-68-7	(+) 313 > 91, 149	–	5,5	3,3

analyt	CAS	MS/MS přechody	LOQ (ng/g) ve studii		
			1 a 2	3	4
diethyl-ftalát	84-66-2	(+) 223>149, 121, 65	–	13	4,4
diethyl-ftalát-d <sub>4</sub> (IS)	93952-12-6	(+) 227>153, 125, 97	–	–	–
diisobutyl-ftalát	84-69-5	(+) 279>205, 149, 121	–	11	8,4
diisodecyl-ftalát	26761-40-0	(+) 447>85, 149, 71	–	14	12
diisononyl-ftalát	28553-12-0	(+) 419>149, 85, 71	–	59	23
di- <i>n</i> -butyl-ftalát	84-74-2	(+) 279>205, 149, 121	–	24	16
di- <i>n</i> -oktyl-ftalát	117-84-0	(+) 391>149, 121, 93	–	7,2	–
<b>bisfenoly</b>					
bisfenol A	80-05-7	(–) 227>212, 133	59	–	9,8
bisfenol A-d <sub>16</sub> (IS)	96210-87-6	(–) 241>223, 142	–	–	–
bisfenol AF	1478-61-1	(–) 335>265, 225, 197	–	–	1,4
bisfenol AP	1571-75-1	(–) 289>274, 273, 195	–	–	2,0
bisfenol BP	1844-01-5	(–) 351>274, 273, 258	–	–	2,3
bisfenol C	79-97-0	(–) 255>147, 239, 107	–	–	42
bisfenol E	80-09-1	(–) 213>198, 197, 119	–	–	11
bisfenol F	620-92-8	(–) 199>93, 105	70	–	37
bisfenol FL	3236-71-3	(–) 349>256	–	–	3,3
bisfenol G	127-54-8	(–) 311>295, 175	–	–	20
bisfenol M	13595-25-0	(–) 345>251, 329, 133	–	–	2,7
bisfenol P	2167-51-3	(–) 345>315, 330, 133	–	–	19
bisfenol S	80-09-1	(–) 249>108, 156, 92	4,2	–	6,8
bisfenol Z	843-55-0	(–) 267>173, 223, 145	–	–	2,9
<b>fotoiniciátory</b>					
2-ethylhexyl-4-(dimethylamino)benzoát	21245-02-3	(+) 278>166, 150, 134	–	–	14
2-isopropylthioxanthon	5495-84-1	(+) 255>184, 213	–	–	5,1
4-benzoylbifenyl	2128-93-0	(+) 259>105, 181	–	–	7,6
4-hydroxybenzofenon	1137-42-4	(+) 215>121, 93, 65	–	–	1,7
4-methylbenzofenon	134-84-9	(+) 197>105, 119, 91	–	–	2,3
benzofenon	119-61-9	(+) 183>105, 77	–	–	6,4
ethyl-4-(dimethylamino)benzoát	10287-53-3	(+) 194>166, 179, 150	–	–	2,1
methyl-2-benzoylbenzoát	606-28-0	(+) 241>209, 152	–	–	1,0
<b>PFAS</b>					
(1H,1H,2H,2H-perfluordecyl)fosfinát	–	(–) 543>97	100	–	–
(1H,1H,2H,2H-perfluoroktyl)fosfinát	–	(–) 443>97	130	–	–
bis(1H,1H,2H,2H-perfluordecyl)fosfinát	–	(–) 989>97	19	–	–
bis(1H,1H,2H,2H-perfluoroktyl)fosfinát	–	(–) 789>443	7,9	–	–
perfluorbutanová kyselina	375-22-4	(–) 213>119, 169	5,3	–	–
perfluorbutansulfonát	375-73-5	(–) 299>80, 99	1,3	–	1,6
perfluordekanfosfonát	–	(–) 599>79	46	–	–
perfluordekanová kyselina	335-76-2	(–) 513>469; 469>219	3,1	–	1,7
perfluordodekanová kyselina	307-55-1	(–) 613>569, 169	3,2	–	2,1
perfluorheptanová kyselina	375-85-9	(–) 363>319; 319>119	3,8	–	2,7
perfluorhexanfosfonát	–	(–) 399>79	31	–	–
perfluorhexanová kyselina	307-24-4	(–) 313>269; 269>119	3,5	–	1,4
perfluorhexansulfonát	3871-99-6	(–) 399>80, 99	3,0	–	1,8
perfluorktylsulfonamid	754-91-6	(–) 498>78, 48	2,7	–	1,9
perfluornonanová kyselina	375-95-1	(–) 463>419; 419>169, 219	4,7	–	2,4
perfluoroktanfosfonát	–	(–) 499>79	38	–	–
perfluoroktanová kyselina	335-67-1	(–) 369>169; 413>369	3,1	–	1,5
perfluoroktanová kyselina- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> (IS)	–	(–) 415>370	–	–	–
perfluoroktansulfonát	1763-23-1	(–) 499>80, 99	5,6	–	1,7
perfluorpentanová kyselina	2706-90-3	(–) 219>69; 263>219	52	–	–

analyt	CAS	MS/MS přechody	LOQ (ng/g) ve studii		
			1 a 2	3	4
perfluorundekanová kyselina	2058-94-8	(-) 563>519; 519>269	3,4	–	1,7
<b>ostatní</b>					
anthrachinon	84-65-1	(+) 209>152, 77	18	–	1,4
ethyl-4-ethoxybenzoát	23676-09-7	(+) 167>95, 121, 77	–	–	6,6

### 3.3 Podmínky HR-TOF-MS

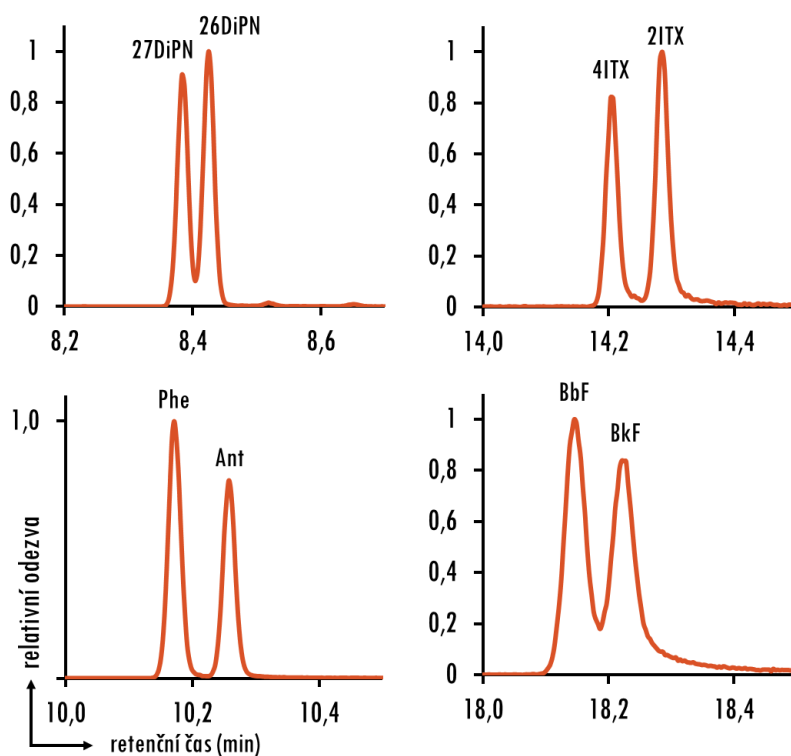
Technika HR-TOF-MS byla použita pro identifikaci a semikvantitativní stanovení matričních látek v extraktech. Měření probíhalo na hmotnostním spektrometru Agilent 6220 (Agilent Technologies). Vzorky byly dávkovány přímo do ESI zdroje pomocí kapalinového chromatografu Agilent 1290 bez instalované chromatografické kolony průtokem 0,5 ml/min methanolu s 2 mmol/l octanem amonným. Během analýzy probíhal sběr plné spektrální informace v rozsahu  $m/z = 100–1700$  za současné online rekalibrace hmotnostní osy pomocí hmotnostního kalibrantu ( $m/z = 121,0509; 922,0098$ ).

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE – KOMENTÁŘE K PUBLIKACÍM

### 4.1 Podmínky GC–EI–MS/MS

Technika GC–MS/MS byla použita pro současnou analýzu ftalátů, fotoiniciátorů tiskařských barev, PAU a jejich alkylovaných derivátů (45 analytů) v papírových výrobcích. V první fázi experimentů byly analyzovány standardy analytů v režimu sběru plného EI spektra za účelem výběru vhodných mateřských iontů. Zvolené mateřské ionty byly následně fragmentovány v kolizní cele MS s různými hodnotami kolizní energie v krocích po 5 eV. Tímto způsobem se podařilo zoptimalizovat 2 MS/MS přechody pro každý analyt (Tabulka 2).

Ve zvoleném výběru analytů je řada izomerů, které vyžadují chromatografickou separaci, přičemž většina z nich patří mezi PAU. Z toho důvodu byla již při prvních experimentech zvolena kapilární kolona Rxi-PAH, pomocí níž se podařilo uspokojivě rozdělit všechny izomery během 21 min analýzy. Separaci neproblematictějších párů analytů ilustruje Obrázek 7.



Obrázek 7. Separace vybraných analytů (100 ng/ml) na koloně Rxi-PAH. 26 a 27DiPN – 2,6- a 2,7-diisopropylnaftalen, 2- a 4ITX – 2- a 4-isopropylthioxanton, Phe – fenantren, Ant – anthracen, BbF a BkF – benzo[*b*]– a [*k*]fluoranthen.

Při analýze reálných vzorků byly často pozorovány neznámé signály (pravděpodobně izomery analytů), které poměrem intenzity MS signálů odpovídaly analytům, od nichž však byly také většinou dobře chromatograficky odděleny. Např. při analýze 2,6- a 2,7-diisopropylnaftalenu v reálných papírových výrobcích bylo pozorováno až 6 signálů

oddělených od zmíněných dvou analytů na základní linii. Tyto výsledky svědčí o vhodnosti zvolené stacionární fáze Rxi-PAH pro danou aplikaci. Zvýšením objemu nástřiku lze v GC vylepšit citlivost. Z toho důvodu byl použit nástřik o objemu 5  $\mu$ l s odvodem par rozpouštědla. Čas odpařování rozpouštědla průtokem helia 40 ml/min při 40 °C byl experimentálně zoptimalizován na následující hodnoty: 0,60 min (acetonitril), 0,50 min (2-propanol) a 0,15 min (aceton). Za optimální byl považován minimální čas, při kterém už nedocházelo ke zhoršení symetrie signálů v důsledku přehlcení kolony rozpouštědlem.

## 4.2 Podmínky HPLC–ESI–MS/MS

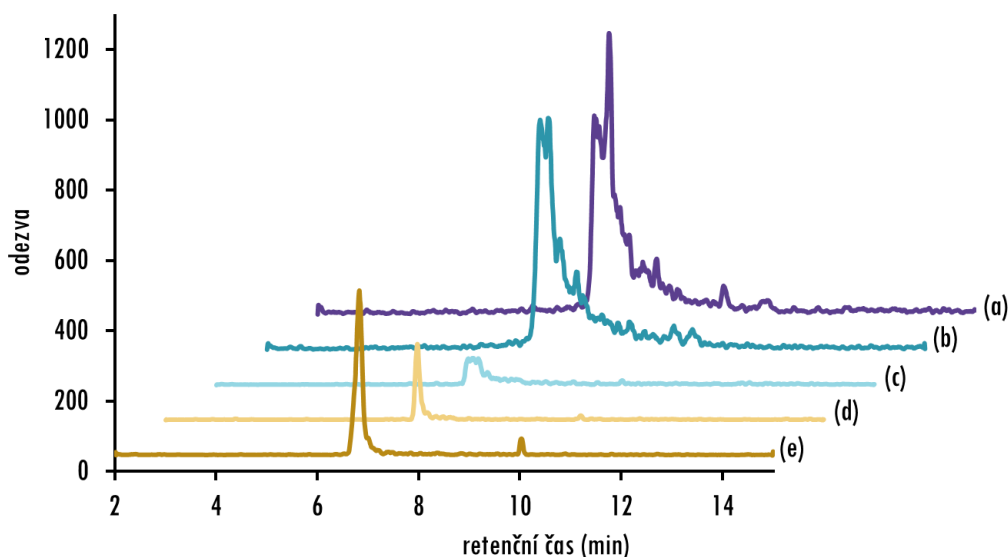
Technikou HPLC–MS/MS byly v různých etapách této práce analyzovány ftaláty, fotoiniciátory tiskařských barev, bisfenoly a/nebo PFAS. Každý analyt při ionizaci v ESI poskytoval v závislosti na polaritě ion  $[M+H]^+$  nebo  $[M-H]^-$ , nicméně v některých případech (perfluoralkylkarboxylové kyseliny) byly zaznamenány také ionty  $[M-COOH]^-$ , tj. fragmenty pravděpodobně vznikající již v iontovém zdroji. Fragmentací těchto mateřských iontů v kolizní cele MS a následným laděním kolizních energií v krocích po 2 eV byly optimalizovány minimálně 2 MS/MS přechody pro každý analyt. Výjimku tvoří perfluoralkylfosfonáty, kde fragmentace iontu  $[M-H]^-$  poskytuje pouze jediný fragment  $m/z = 79$  (Tabulka 4).

Studie 1 se zabývala současnou analýzou 3 bisfenolů a několika skupin PFAS (23 analytů) v papírových výrobcích. Díky absenci izomerů v tomto výběru bylo dosaženo vyhovující chromatografické separace již při prvních experimentech se 150mm kolonou C18. Chromatografický profil píků polyfluoralkylfosfonátů byl však za těchto podmínek značně asymetrický, tudíž další optimalizace směřovala ke zlepšení jejich symetrie. Během experimentů byly testovány 2 různé organické komponenty mobilní fáze (methanol a acetonitril) a 5 různých aditiv (bez aditiva, kyselina mravenčí a octová, mravenčan a octan amonný) na stejné chromatografické koloně C18.

Přídavek mravenčanu a octanu amonného výrazně zlepšil symetrii u problematických analytů (Obrázek 8), zatímco přídavek kyselin ani volba organické komponenty zásadní vliv neměla. Aditivum mobilní fáze výrazně ovlivňovalo také citlivost stanovení, a to u všech studovaných skupin analytů. Nejdramatičtější rozdíly v intenzitě signálů byly pozorovány u bisfenolů, kde optimální aditivum (octan amonný) poskytl 14krát vyšší odezvu než kyselina mravenčí s nejnižší odezvou. U PFAS se výsledky výrazně lišily podle polární skupiny v molekule. V mobilní fázi o složení voda-methanol bylo možné popsat následující obecný trend: nejintenzivnější signály byly pozorovány bez přídavku aditiva, přičemž na druhém místě z hlediska intenzity se nacházela kyselina mravenčí nebo octan amonný. Výjimkou z tohoto pravidla tvořily pouze monoperfluoralkylfosfonáty, kde kyselina mravenčí poskytla maximální intenzitu. S ohledem na tato zjištění byl zvolen octan amonný, který představuje vhodný kompromis mezi symetrií a intenzitou signálu všech analytů. Eluce analytů ve finální metodě na



150mm koloně Poroshell EC-C18 pomocí optimalizovaného gradientu voda-methanol s přídatkem octanu amonného trvala 15 min.

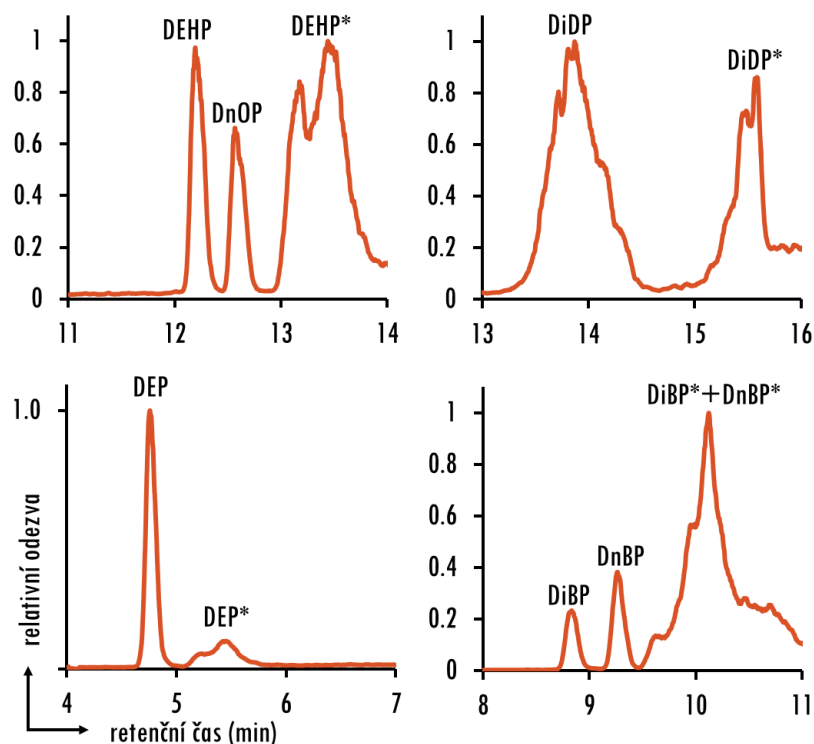


Obrázek 8. Vliv aditiva mobilní fáze o složení voda-methanol na signál mono(1H,1H,2H,2H-perfluoroktyl)fosfonátu. (a) bez aditiva, (b) kyselina mravenčí 0,1%, (c) kyselina octová 0,1%, (d) mravenčan amonný, 2 mmol/l, (e) octan amonný, 2 mmol/l.

Pokus o použití stejného chromatografického systému (150mm kolona C18, m.f. voda/methanol) pro analýzu ftalátů odhalil hned dvě komplikace: 1. požadavek na separaci izomerů (di-*n*-butyl- a diisobutyl-, di-*n*-oktyl- a bis(2-ethylhexyl)-ftalát), 2. problémy s kontaminací systému cílovými látkami (Studie 3). V úvodní fázi experimentů byly při každé analýze na tomto systému pozorovány intenzivní signály celkem 5 z 8 analyzovaných ftalátů, a to včetně analýz bez nástřiku vzorku. Intenzita těchto signálů se zvyšovala s časem ekvilibrace kolony před analýzou, což vedlo k podezření, že tato kontaminace pocházela z mobilní fáze. Po instalaci 50mm předkolony mezi čerpadlo mobilní fáze a injektor (Obrázek 6) došlo ke zpoždění zmíněných signálů.

Vaclavíková a kol. (2016) rovněž použili HPLC systém s předkolonou pro zachycení a zpoždění ftalátů z mobilní fáze, nicméně v této studii se nepodařilo separovat izomery dibutyl-ftalátu. Tyto výsledky svědčí o komplexnosti problému, kdy chromatografický systém musí oddělit nejen analyty navzájem, ale také signály identických analytů ze vzorku a z mobilní fáze. Následující experimenty proto měly za cíl optimalizovat separaci ftalátů v systému dvou kolon. Byly testovány jednak analytické kolony (150 mm) se stacionárními fázemi C18, fenyl-hexyl, a bifenyl, jednak předkolony (50 mm) se stacionárními fázemi C18 a fenyl-hexyl. Celkem tedy bylo testováno 6 různých kombinací předkolona–analytická kolona. Gradienty mobilní fáze byly pro každou analytickou kolonu optimalizovány tak, aby došlo k eluci všech analytů během 17 min.

Ze dvou použitých předkolon docházelo k efektivnější retenci kontaminace na stacionární fázi C18. Z analytických kolon nejlépe dělila kritické páry ftalátů kolona s fází bifenyl, ovšem retence analytů na této koloně byla natolik silná, že se v některých případech (diethyl-, di-*n*-butyl- a diisobutyl- a di-*n*-oktyl-ftalát) analyty překrývaly se signály kontaminace. Kolona s fenyl-hexylovou fází i přes nižší selektivitu pro izomery stále umožnila jejich separaci na základní linii, zároveň díky podstatně nižší retenci analytů oproti C18 předkoloně došlo k oddělení signálů kontaminace. Náznaky separace kritických párů i signálů kontaminace byly patrné i na analytické koloně C18, avšak k uspokojivému výsledku v tomto systému by pravděpodobně bylo nutné zmírnit gradient a prodloužit čas analýzy. Optimální systém pro analýzu ftalátů, jehož separační účinnost ilustruje Obrázek 9, se skládá z C18 předkolony (50 mm) a fenyl-hexylové analytické kolony (150 mm). V rámci studie 4 byl tento systém s úspěchem aplikován pro společnou analýzu ftalátů, bisfenolů, fotoiniciátorů tiskařských barev a PFAS (41 analytů celkem). Použitím optimalizovaného gradientu mobilní fáze bylo dosaženo vyhovující separace všech izomerů včetně páru bisfenolů M a P během 18 min.



Obrázek 9. Separace vybraných ftalátů (100 ng/ml) a kontaminace z mobilní fáze (\*) na předkoloně Kinetex C18 a analytické koloně Kinetex Phenyl-hexyl. DEHP – bis(2-ethylhexyl)-, DnOP – di-*n*-oktyl-, DiDP – diisodecyl-, DEP – diethyl-, DiBP – diisobutyl- a DnBP – di-*n*-butyl-ftalát.

Tyto výsledky demonstrují, že v principu jednoduchým opatřením je možné výrazně omezit důsledky kontaminace mobilní fáze. Signály ftalátů v nulovém nástřiku se po chromatografické separaci kontaminace na předkoloně snížily o několik řádů, avšak nepodařilo se je zcela eliminovat. U di-*n*-butyl- a bis(2-ethylhexyl)-ftalátu se podařilo prokázat, že plocha signálu nulového nástřiku koreluje s plochou signálu kontaminace ( $r \geq 0,85$ ).

Z tohoto pozorování plyne závěr, že kontaminace mobilní fáze se pravděpodobně omezeně přenáší do nástřiku i přes použití předkolony. Nežádoucí důsledek tohoto jevu je možné demonstrovat na di-*n*-oktyl- a bis(2-ethylhexyl)-ftalátu. Jedná se o izomery, které se eluují v podobném retenčním čase a k jejich kvantifikaci se používá stejný MS/MS přechod  $[M+H]^+ > 149$ , tudíž lze předpokládat srovnatelnou citlivost detekce. Přesto se LOQ prvního analytu rovná 7,2 µg/kg, zatímco LOQ druhého analytu je 110 µg/kg (Tabulka 4). Tento rozdíl proporcionálně odpovídá rozdílu v koncentracích naměřených při analýze nulového nástřiku (nedetekováno, resp. 5,7 µg/kg).

Kontaminace mobilní fáze analyty má stále prokazatelný vliv na LOQ stanovení. Za účelem dalšího snížení signálů kontaminace byla před každou sérií vzorků provedena následující preventivní údržba: 1. oba kanály HPLC čerpadla byly promyty 10 ml methanolu; 2. analytický systém včetně obou kolon byl promyt methanolem z obou kanálů; 3. kanál (A) byl promyt 10 ml vodné složky mobilní fáze; 4. systém byl 10 min evkilibrován v počátečním složení mobilní fáze.

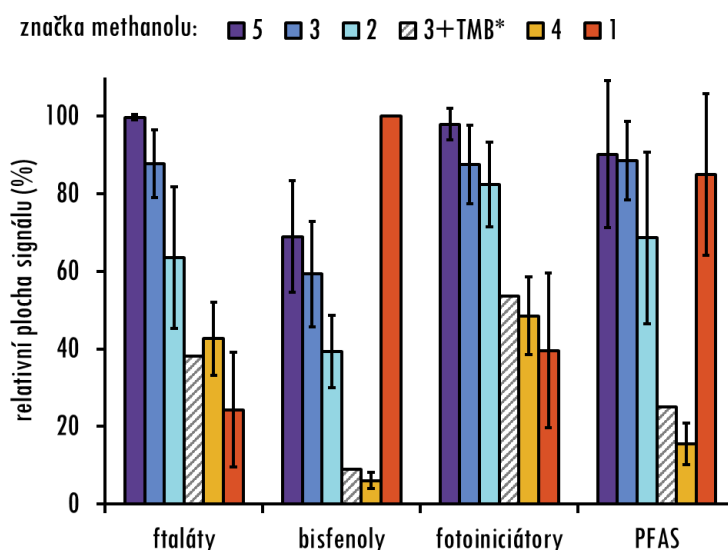
### 4.3 Nečistoty rozpouštědel

Vzhledem k poznatkům uvedeným v kap. 4.2 byl vykonán pokus snížit hladiny ftalátů v jednotlivých složkách mobilní fáze ještě před jejich použitím v HPLC. Obě složky mobilní fáze HPLC teoreticky mohou obsahovat ftaláty jako kontaminaci. Guo a Kannan (2012) před použitím dekontaminovali demineralizovanou vodu pomocí extrakce *n*-hexanem. V této práci byl použit analogický postup, kdy 1 l vodné složky mobilní fáze HPLC byl extrahován 10 ml *n*-hexanu po dobu 1 h. Použitím takto přečištěné vodné složky se odezvy ftalátů v HPLC analýze nulového nástřiku snížily o jednotky %. Stejného efektu bylo dosaženo třepáním 1 l vodné složky s 1 g adsorbentu ENVI-Carb po dobu 1 h. Methanol kvality LC-MS byl před použitím přečištěn dvojnásobnou destilací, což vedlo ke snížení odezvy di-*n*-butyl-ftalátu o 59 % a bis(2-ethylhexyl)-ftalátu o 90 %. Tyto výsledky nasvědčují, že organická složka má dominantní podíl na celkové kontaminaci.

Ačkoli je možné organické rozpouštědlo přečistit destilací, destilační proces je časově náročný a jak bylo zjištěno, jeho opakované provedení může generovat neopakovatelné výsledky. Teoreticky existuje velmi mnoho možných vysvětlení pro toto pozorování, např. kontaminace laboratorního ovzduší nebo destilační aparatury (kap. 2.2.3). Studie 4 se proto pokusila identifikovat methanol s nízkými hladinami ftalátů mezi komerčně dostupnými značkami. Celkem byly testovány 4 různé značky methanolu v kvalitě LC-MS a 1 značka v kvalitě pro gradientovou eluci. Použitím těchto rozpouštědel jako organické složky mobilní fáze byly zjištěny odezvy nulového nástřiku odpovídající koncentracím (extrapolace z kalibrační funkce): 0,14–0,31 ng/ml (diethyl-ftalát), 0–0,40 ng/ml (butyl-benzyl-ftalát), 0,10–1,6 ng/ml (diisobutyl-ftalát), 0,5–1,8 ng/ml (di-*n*-butyl-ftalát) a 1,8–3,7 ng/ml (bis(2-ethylhexyl)-ftalát). Mezi rozpouštědly existovaly dílčí rozdíly, pouze jedna značka se však od ostatních odlišovala

statisticky významně vyššími koncentracemi některých ftalátů. Signál diisodecyl-ftalátu byl identifikován ve dvou rozpouštědlech, a to jednou 2,3 ng/ml, podruhé 43 ng/ml.

Při použití testovaných rozpouštědel pro analýzu směsného standardu analytů (100 ng/ml) se navíc podařilo odhalit, že odezvy analytů se mezi jednotlivými značkami methanolu významně liší. Tyto rozdíly v citlivosti byly pozorovány u všech skupin cílových látek, nicméně v případě bisfenolů byl rozdíl mezi minimální a maximální odezvou v průměru největší – 17násobný. Podobná variabilita citlivosti při použití různých značek methanolu byla v minulosti pozorována např. při analýze léčiv (Annesley 2007). Autor předpokládá, že snížení citlivosti způsobují neznámé stopové nečistoty rozpouštědla supresí ionizace v intovém zdroji HPLC–MS. Během studie 4 bylo zmíněných 5 značek methanolu podrobena rychlé kvalitativní GC–MS analýze s cílem identifikovat neznámé organické nečistoty rozpouštědel. Během těchto analýz byl detekován jediný podezřelý signál v methanolu, který v předchozím experimentu poskytoval nejnižší odezvy bisfenolů a PFAS (značka 4, Obrázek 10).



Obrázek 10. Relativní odezvy analytů standardu (100 ng/ml) při použití různých značek methanolu v mobilní fázi. \* roztok trimethyl-borátu v methanolu značky 3. Chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku jednotlivých látek ve skupinách během 4 nezávislých stanovení.

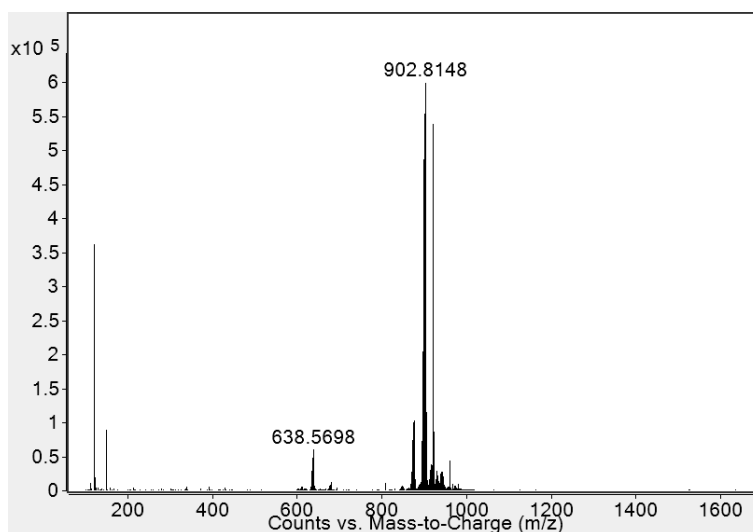
Tento signál byl na základě shody MS spektra s knihovnou NIST identifikován jako trimethyl-borát a jeho koncentrace byla stanovena na 91 µg/ml metodou standardního přidavku. Roztok trimethyl-borátu o koncentraci 91 µg/ml v methanolu, který původně tuto nečistotu neobsahoval (značka 3), snížil odezvy analytů na přibližně srovnatelnou úroveň jako značka 4. Tímto pokusem se podařilo podpořit hypotézu, že trimethyl-borát je zodpovědný za snížení citlivosti.

## 4.4 Analýza matričních koextraktů

Přečištění extraktu představuje v analytickém postupu důležitý krok, který má za cíl ochránit analytický systém před nežádoucími účinky látek z matrice. Během vývoje analytických metod v této práci se vyskytla potřeba objektivně posoudit účinnost dostupných technik pro přečištění, čili jejich schopnost odstranit z extraktu matriční látky. K tomuto posouzení bylo nutné provést rychlou identifikaci a semikvantitativní stanovení matričních látek v přečištěných i nepřečištěných extraktech.

V rámci sběru pilotních dat o složení papírových výrobků (Studie 1) byl vykonán pokus identifikovat neznámé extrahovatelné látky pomocí necílové analýzy GC–MS. Parametry této analýzy se shodovaly s kvantitativním GC–MS stanovením migrantů (kap. 4.1) ovšem v režimu akvizice plné spektrální informace (*scan*). Této analýze bylo po extrakci acetonitrilem podrobena celkem 15 náhodně vybraných papírových výrobků. V jednom ze vzorků byly identifikovány alifatické uhlovodíky  $C_{24}$ – $C_{38}$ , jejichž signály vykazovaly dobrou shodu se spekterem *n*-alkanů v knihovně NIST a retenční časy některých z nich se shodovaly se standardy *n*-alkanů  $n(C) = 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32$  a  $34$  analyzovanými za stejných podmínek. Fakt, že papír může obsahovat alifatické uhlovodíky např. z minerálních olejů, je z literatury běžně známý (např. Lorenzini a kol. 2010).

Během vývoje metody pro analýzu jedlých olejů (Studie 3) se přistoupilo ke sledování lipidů. V praxi se ke stanovení triacylglycerolů, tj. hlavní složky lipidů, používá technika HPLC–MS (Turtygin a kol. 2013), což může být značně časově náročné. Extrakty jedlých olejů byly v této práci analyzovány přímo nebo po naředění technikou HR-TOF-MS, přičemž kapalinový chromatograf sloužil pouze k dávkování vzorku do iontového zdroje tokem mobilní fáze. Získaný signál obsahoval spektrální informaci triacylglycerolů ( $m/z = 840$ – $960$ ), ale také méně intenzivní shluk neidentifikovaných signálů ( $m/z = 570$ – $680$ ) (Obrázek 11).



Obrázek 11. Příklad HR-MS spektra jedlého oleje (řepka).

Kalachová a kol. (2011) na základě měření DART–MS usoudili, že by se mohlo jednat o fragmenty triacylglycerolů. Tato hypotéza nicméně byla později vyvrácena, protože signály  $m/z = 570\text{--}680$  poskytovaly při separaci SPE odlišný eluční profil od triacylglycerolů. Jedná se tudíž o odlišná chemická individua, pravděpodobně diacylglyceroly. Odezvy jednotlivých hmot di- i triacylglycerolů vykazovaly lineární závislost s alikvotem analyzovaného rostlinného oleje v omezeném rozsahu 0,1–30 ng, proto bylo možné tuto metodu použít k semikvantitativnímu porovnání obsahu lipidů v extraktech.

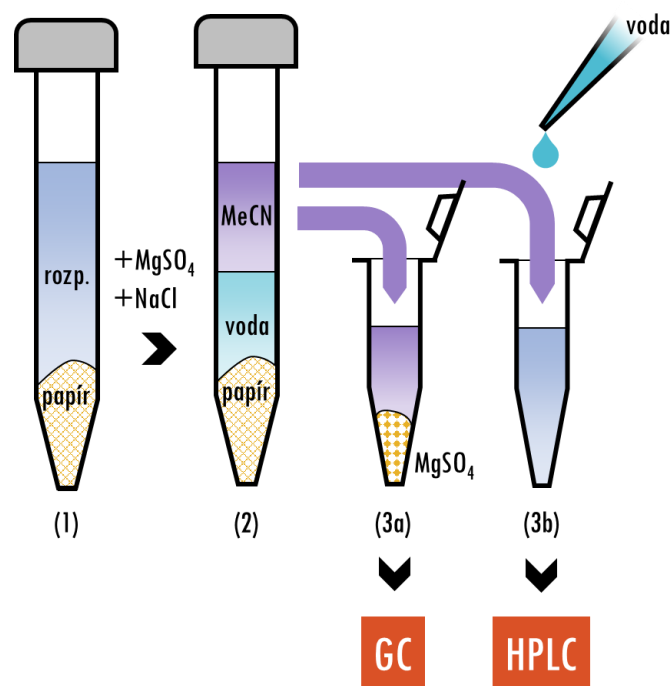
## 4.5 Příprava vzorku – papír

V papírových výrobcích bylo sledováno celkem 68 potenciálních migrantů. Analyty se vyznačují širokým rozpětím polarit, což může být demonstrováno např. na perfluorhexanové kyselině,  $\log K_{OW} < 2$  (Skrottová, 2013) a diisodecyl-ftalátu,  $\log K_{OW} > 8$  (Staples a kol. 1997). Nabízí se otázka, zda je možné takto různorodou skupinu látek ze vzorku izolovat současně. Experimenty popsané v následujícím textu se pokusily tento problém zdokumentovat.

Během prvních experimentů byly vzorky papíru s přídavkem analytů extrahovány 3 různými rozpouštědly (acetonitril, 2-propanol a aceton) za působení ultrazvuku. Výtěžnosti analytů se pohybovaly v rozsahu 0–130 %. Ačkoli mezi jednotlivými rozpouštědly byly zaznamenány jen malé rozdíly lze je následovně seřadit od průměrně nejnižší extrakční účinnosti po nejvyšší: acetonitril, 2-propanol, aceton. Zásadní rozdíly v účinnosti extrakce byly pozorovány mezi jednotlivými skupinami analytů. Nejvíce problematické polyfluoralkylfosfonáty nebyly během těchto experimentů detekovány. Podle práce Esparza a kol. (2011) se pro izolaci polyfluoralkylfosfonátů z čistírenských kalů jeví jako nejvhodnější směsi organického rozpouštědla s vodou. Aby bylo možné i v této práci otestovat směsi organických rozpouštědel s vodou a zároveň extrakty analyzovat pomocí GC–MS/MS, což vylučuje přítomnost vody, extrakční postup byl přizpůsoben podle metody QuEChERS (Anastassiades a kol. 2003): 1. 1 g vzorku byl extrahován 20 ml směsi rozpouštědla s vodou v poměru 1:1 (v/v) za působení ultrazvuku; 2. přídavkem  $MgSO_4$  a NaCl došlo k rozdělení extraktu na vodnou a organickou fázi; 3. organická fáze byla před GC analýzou dosušena pomocí  $MgSO_4$ . Reakce bezvodého  $MgSO_4$  s vodou byla natolik exotermní, že v několika případech došlo k varu acetonu, což vedlo k jeho vyloučení z těchto experimentů. U 2-propanolu použitím tohoto postupu došlo v průměru k mírnému zhoršení výtěžností, zatímco v případě acetonitrilu se výtěžky většiny analytů včetně polyfluoralkylfosfonátů zvýšily na akceptovatelné hodnoty. Během experimentů byl dále zkoumán účinek pufru ( $NaH_2PO_4$ ), který však oproti původnímu předpokladu nezlepšil výtěžnosti analytů s kyselou funkční skupinou.

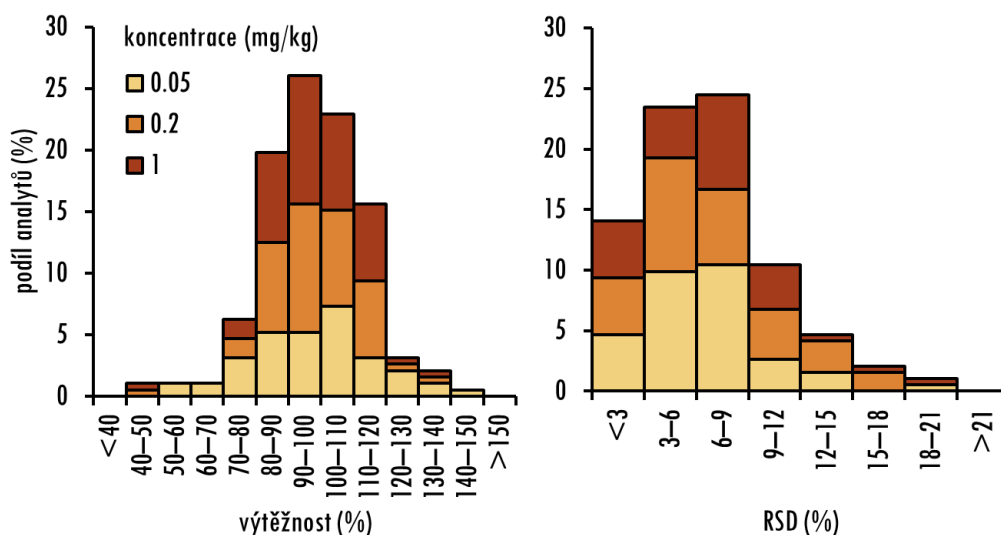
Papírové výrobky mohou obsahovat alifatické uhlovodíky (kap. 4.4). Při opakovaném nástřiku alifatických uhlovodíků do HPLC dochází k negativním jevům, jako je např. nárůst zpětného tlaku kolony a zhoršení opakovatelnosti retenčních časů (Kumar a kol. 2014).

Z preventivních důvodů byl do postupu zařazen následující krok, který měl za cíl eliminovat alifatické uhlovodíky z extraktu před HPLC: k extraktu v acetonitrilu bylo za snížené teploty přidáno ekvivalentní množství vody, čímž se snížila rozpustnost uhlovodíků a došlo k jejich precipitaci. Po odstředění nebyly alifatické uhlovodíky v extraktech vůbec detekovány pomocí GC–MS. Obrázek 12 ilustruje finální podobu optimalizovaného postupu.



Obrázek 12. Schéma přípravy vzorku papíru. (1) extrakce vzorku směsí acetonitril-voda 1:1 (v/v), (2) rozdělení fází přidávkem solí, (3a) vysušení extraktu pomocí MgSO<sub>4</sub>, (3b) naředění vodou. MeCN – acetonitril

Pracovní charakteristiky této nové metody byly ověřeny ve validační studii na vzorcích papíru uměle fortifikovaných analyty na koncentrace 0,05, 0,2 a 1 mg/kg. Od každé koncentrace bylo připraveno a analyzováno 6 paralelních pokusů. Výtěžnost extrakce se pohybovala v rozmezí 46–143 %, z toho 92 % hodnot v intervalu 70–120 % (Obrázek 13). Výtěžnosti mimo meze 70–120 % se vyskytovaly převážně na nejnižší koncentrační hladině, aniž by u stejných analytů byly pozorovány podobné systematické odchylky u vyšších koncentrací. Jedinou výjimku představuje perfluorhexylfosfonát, který byl izolován s výtěžkem 46–59 % na všech koncentračních hladinách. Relativní směrodatná odchylka paralelních stanovení  $\leq 21$  % ( $\text{HorRat} \leq 1,3$ ) ukazuje na dobrou přesnost metody. LOQ uvádí Tabulka 2 a 4.



Obrázek 13. Distribuce pracovních parametrů metody pro analýzu papírových výrobků. RSD – relativní směrodatná odchylka.

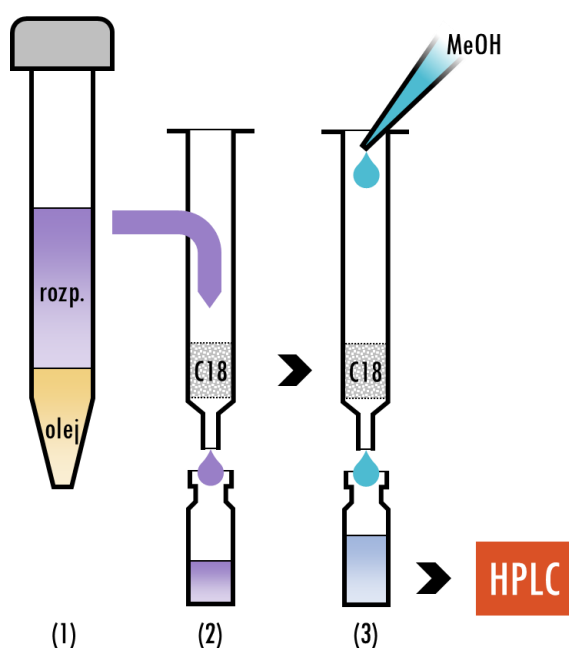
## 4.6 Příprava vzorku – tučné potraviny

Současnou izolaci cílových látek se značně rozdílnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi z papírové matrice je možné realizovat pomocí relativně jednoduchého postupu (kap. 4.5). Poněkud komplikovanější situaci lze očekávat v případě tučných potravin kvůli obsahu matričních látek. Jedlý olej je převážně tvořen lipidy, z nichž di- a triacylglyceroly byly identifikovány pomocí HR-TOF-MS (kap. 4.4). Při extrakci 1 ml rostlinného oleje pomocí 3 ml methanolu, acetonitrilu, 2-propanolu, resp. acetonu přechází do extraktu následující množství matričních látek: 3,4, 4,6, 120, resp. 170 mg/ml (gravimetrické stanovení odparku po odpaření rozpouštědla). Schopnost izolovat lipofilní látky se tedy u testovaných rozpouštědel evidentně liší. Z hlediska extrakce lipidů se tato vlastnost jeví jako nežádoucí, naopak pro izolaci lipofilních analytů (např. diisodecyl-ftalátu,  $\log K_{OW} > 8$ ) je velmi potřebná. Cílem optimalizace metody je tudíž nalézt takové kompromisní podmínky, které zajistí pokud možno co nejvyšší výtěžky lipofilních analytů a zároveň budou co nejvíce diskriminovat lipidy.

Jako metoda první volby pro přečištění extraktů byla testována SPE s reverzní fází (C18). Po nanesení extraktu jedlého oleje na SPE kolonku s náplní 500 mg sorbentu byl sledován eluční profil (1–10 ml v krocích po 1 ml) diisodecyl-ftalátu, di- a triacylglycerolů při použití různých elučních činidel, konkrétně methanolu, acetonitrilu, 2-propanolu, acetonu a směsí aceton-methanol 1:1, 1:2 a 1:3 (v/v). Všechna testovaná rozpouštědla byla schopna kompletně eluovat diisodecyl-ftalát v elučním objemu od 3 ml (2-propanol, aceton) po 8 ml (acetonitril). K eluci triacylglycerolů docházelo při použití 2-propanolu, acetonu a směsi aceton-methanol 1:1; u ostatních slabších rozpouštědel triacylglyceroly zůstávaly kompletně sorbovány v kolonce až do elučního objemu 10 ml. V případě diacylglycerolů byla pozorována většinou kompletní eluce s výjimkou použití methanolu (částečná eluce) a acetonitrilu (kompletní retence).



Z uvedených výsledků vyplývá, že separace diacylglycerolů od diisodecyl-ftalátu představuje obtížný úkol. Pravděpodobně by bylo možné jej splnit použitím acetonitrilu jako elučního rozpouštědla, ale to za cenu výrazného naředění vzorku. Protože diacylglyceroly představují jen minoritní složku jedlých olejů (kap. 4.4), ve finální metodě se upustilo od požadavku jejich kompletní eliminace z extraktu, přičemž majoritní triacylglyceroly je možné separovat snadno. Pro extrakci 1 ml vzorku byly použity 3 ml rozpouštědla o složení aceton-methanol 1:2 (v/v), ze kterého se po nanesení na SPE zachycují lipidy, přičemž analyty kolonu prochází. Zbytkové množství analytů lze eluovat pomocí 2 ml methanolu (Obrázek 14).



Obrázek 14. Schéma přípravy vzorku rostlinného oleje pomocí SPE. (1) extrakce směsným rozpouštědlem aceton-methanol 1:2, (2) zachycení lipidů na SPE, (3) eluce zbytkového množství analytů. MeOH – methanol.

Popsaným postupem se koncentrace di- a triacylglycerolů v extraktu snížily o 60 %, resp. > 99 %. Pracovní parametry této metody byly ověřeny pro 8 dialkyl-ftalátů (diethyl- až diisodecyl-ftalát) na vzorcích jedlého oleje s přidavkem analytů o koncentraci 0,1 a 1 mg/kg. Extrakční účinnost se pohybovala v rozmezí 42–100 %. Za nízké výtěžnosti je pravděpodobně zodpovědný extrakční krok, kdy dochází k rozdělení analytu mezi dvě kapalně fáze, vzorek a extrakční rozpouštědlo. Vzhledem k tomuto vysvětlení a dobré opakovatelnosti (relativní směrodatné odchylky 2,6–16 %) je možné považovat i nízké výtěžnosti za přijatelné (EC 2017).

Hlavní nedostatek této nové metody ovšem spočívá v relativně vysoké ceně a časové náročnosti zpracování vzorků. Je možné SPE nahradit efektivnější a srovnatelně účinnou technikou? Následující odstavce popisují poznatky získané z experimentů s alternativními technikami, které lze souhrnně označit za jednoduché a nenákladné. Tyto techniky byly použity pro přečištění extraktu v acetonitrilu, methanolu a směsích aceton-methanol 2:1, 1:1 a 1:2 (v/v).

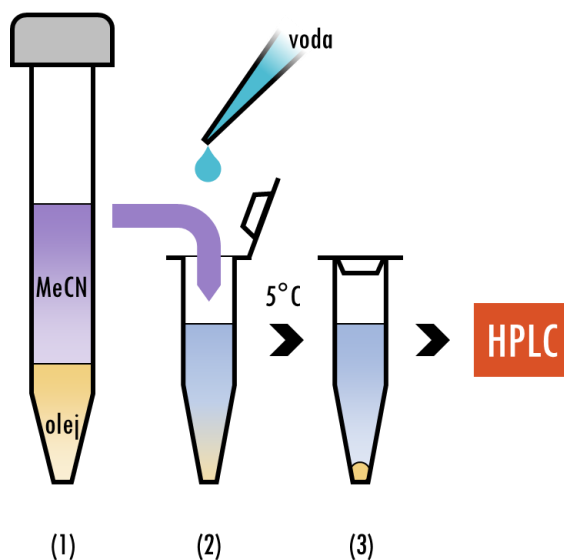
**Disperzní extrakce na tuhou fázi (dSPE).** Po přidavku 50 mg disperzního sorbentu C18 k 1 ml extraktu v rozpouštědle aceton-methanol 1:2 došlo ke snížení hladiny triacylglycerolů o 39 %, přičemž výtěžnost diisodecyl-ftalátu klesla o 22 %. Při použití sorbentů ENVI-carb, Z-Sep a EMR-Lipid za identických podmínek bylo přečištění ještě méně účinné a navíc v některých případech došlo k poklesu výtěžnosti diisodecyl-ftalátu o 77 % (EMR-Lipid), resp. 97 % (ENVI-carb). Z těchto výsledků je patrné, že technika dSPE nemůže konkurovat SPE v účinnosti separace koextraktů od analytů ani při použití identického sorbentu C18. Další optimalizace např. poměru sorbentu a extraktu proto postrádaly smysl.

**Extrakce kapalina-kapalina.** Když se extrakt jedlého oleje v acetonitrilu vytřepe s ekvivalentním objemem *n*-pentanu, vznikne dvoufázový systém. Po odebrání *n*-pentanu byly v acetonitrilové fázi zjištěny koncentrace lipidů 1,7 mg/ml, což odpovídá asi 65% účinnosti přečištění. Přitom ovšem také došlo k výrazným ztrátám diisodecyl-ftalátu, takže výtěžnost celého procesu včetně extrakce se pohybovala kolem 13 %, což činí tento postup nepoužitelným. Ostatní extrakční rozpouštědla se v daném poměru s *n*-pentanem kompletně smísila, proto nebyla testována.

**Vymražení.** Při skladování extraktu jedlého oleje ve zkumavce za snížené teploty -18 °C se v důsledku poklesu rozpustnosti ze všech testovaných rozpouštědel vyloučily lipidy na stěny nádoby. Celkový obsah lipidů v extraktu se tak snížil z 5,0 na 2,6 mg/ml (acetonitril, nejnižší obsah), resp. z 68 na 20 (aceton-methanol 2:1, nejvyšší obsah). Zároveň nebyl zaznamenán významný pokles výtěžnosti diisodecyl-ftalátu (testováno pro acetonitril a methanol).

**Přídavek vody.** Po naředění extraktu jedlého oleje vodou vzniká zákal způsobený vyloučenými lipidy, které je možné odstranit odstředěním. Tento postup byl testován pro všechna extrakční rozpouštědla a různé objemy přidavku vody vztaženého na původní objem extraktu (1:5, 1:10 a 1:20). Reziduální koncentrace lipidů v extraktu se po přečištění pohybovaly od 0,9 mg/ml (methanol, přídavek vody 1:5), přes 2,5 mg/ml (acetonitril, přídavek vody 1:10) po 12 mg/ml (aceton-methanol 2:1, přídavek vody 1:20). Ačkoli množství přidané vody významně ovlivňuje čistotu extraktu (čím větší množství, tím účinnější přečištění), ve ztrátách lipofilních analytů byly zaznamenány relativně malé rozdíly. Výtěžnosti diisodecyl-ftalátu se pohybovaly v rozmezí 32–47 % (extrakce různými rozpouštědly, přídavek vody 1:5 a 1:10).

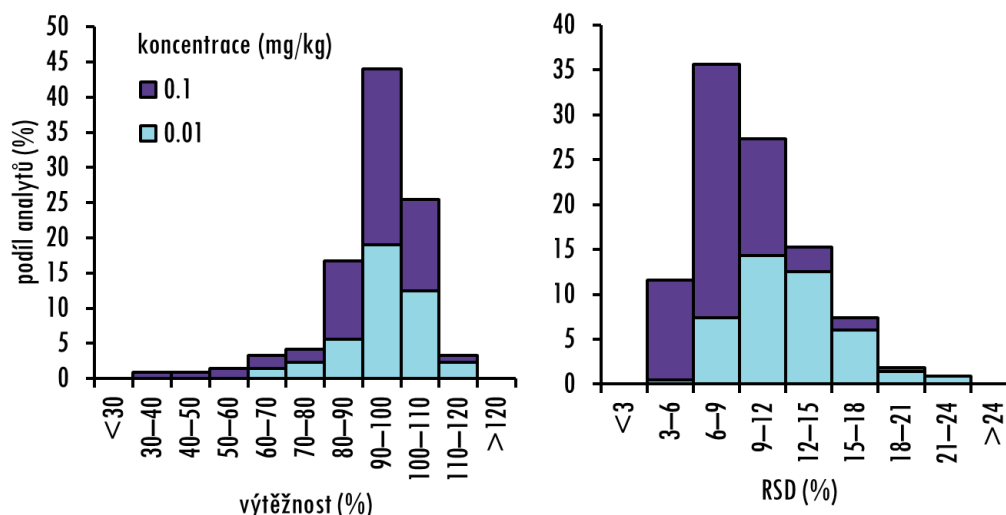
Z výše uvedených dat je zřejmé, že pouze přídavek vody a snížení teploty představuje použitelné alternativy k SPE. Ve finální metodě byl 1 ml oleje extrahován 5 ml acetonitrilu. K 1 ml získaného extraktu bylo přidáno 0,1 ml vody, výsledná směs byla přes noc skladována při 5 °C a odstředěna (Obrázek 15). Teplota 5 °C byla zvolena s ohledem na teplotu skladování vzorků v autosampleru HPLC (8 °C). V takto ošetřeném extraktu byla pozorována reziduální hladina lipidů 2,1 mg/ml.



Obrázek 15. Schéma zjednodušené přípravy vzorku rostlinného oleje. (1) extrakce acetonitrilem, (2) přidavek vody (1:10), (3) skladování při 5 °C, odstředění. MeCN – acetonitril.

Pro další tučné potraviny, máslo a čokoládu, bylo vzhledem k obtížnější homogenizaci vzorků nutné upravit extrakční postup. V případě másla problém s homogenizací odpadá po roztavení vzorku při 40 °C. Zkumavka obsahující rozpouštědlo a vzorek byla vytemperována na 40 °C a následná extrakce probíhala v inkubované třepačce při 40 °C. Vzorek čokolády byl před extrakcí nastrohán pomocí kuchyňského struhadla. Ke směsi vzorku a extrakčního rozpouštědla bylo přidáno několik skleněných kuliček, které během třepání za laboratorní teploty zajistily další homogenizaci. Po prodloužené době extrakce (30 min) byla získána suspenze velmi jemných částiček čokolády v extrakčním rozpouštědle. Extrakty připravené touto metodou s identickým přečištěním jako v případě oleje obsahovaly následující reziduální koncentrace lipidů: 2,5 mg/ml (máslo), 1,7 mg/ml (čokoláda).

Použitelnost této metody pro celkem 41 analytů (ftaláty bisfenoly, fotoiniciátory tiskařských barev a PFAS) byla prověřena na vzorcích rostlinného oleje, másla a čokolády fortifikovaných analyty na koncentrace 0,01 a 0,1 mg/kg. Od každé kombinace matrice-koncentrace bylo připraveno a analyzováno 6 paralelních pokusů. Relativní směrodatné odchylky stanovení se pohybovaly v intervalu 4–22 % (HorRat < 0,7). Výtěžnosti se pohybovaly v rozmezí 37–120 %, z toho 91 % hodnot v intervalu 70–120 % (Obrázek 16). Výtěžnosti < 70 % byly pozorovány u 5 analytů o  $\log K_{OW} > 5,5$  v oleji a másle. V čokoládě byl zaznamenán pouze jeden případ analytu s problematickou výtěžností (bis(2-ethylhexyl)-ftalát). Diisodecyl-ftalát byl izolován z oleje s prakticky identickým výtěžkem 45 % (0,1 mg/kg) jako při použití dříve popsané SPE metody (42 %, 0,1 mg/kg). Hlavním limitujícím faktorem pro výtěžnost lipofilních látek pravděpodobně zůstává rozdělení mezi dvě kapalně fáze při extrakci. LOQ uvádí Tabulka 4.



Obrázek 16. Distribuce pracovních parametrů zjednodušené přípravy vzorků tučných potravin. RSD – relativní směrodatná odchylka.

## 4.7 Aplikace metod

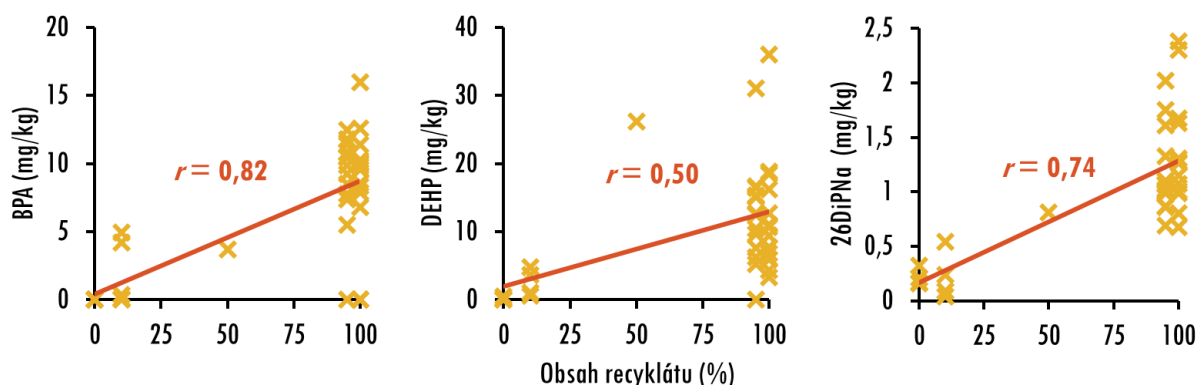
Závěrečná fáze této práce prověřila schopnost výše popsaných nových metod identifikovat a kvantifikovat cílové látky v reálných vzorcích. Pro potřeby této studie bylo pořízeno celkem 132 papírových výrobků a 60 vzorků tučných potravin.

Studované papírové výrobky je možné rozdělit do následujících skupin: papírové sáčky na mouku nebo pekařské výrobky, balicí papír používaný v prodejnách potravin, papírové talíře a šálky, lepenkové krabice na pizzu, sýr, čokoládu apod., kávové filtry, pečící papíry a formičky na pečení. Některé z těchto výrobků byly zakoupeny v obchodních domech ČR, některé byly na vyžádání dodány přímo výrobcem. V případě celkem 42 vzorků výrobce navíc poskytl údaj o obsahu recyklovaných papírových vláken, který se pohyboval v následujících hodnotách: 0 %, 0–20 %, 50 %, 90–100 %, 100 %.

Ve vzorcích papírových materiálů bylo identifikováno 65 z 68 studovaných analytů. Anthrachinon, tj. látka používaná jako katalyzátor při zpracování papírových vláken, byl přítomen v 91 % vzorků. Do druhé nejčastěji zastoupené skupiny kontaminantů patří fotoiniciátory tiskařských barev a většina ftalátů (kromě di-*n*-propyl-ftalátu), které byly identifikovány s frekvencí 52–85 %. Koncentrace některých analytů (benzofenon, di-*n*-butyl-ftalát, diisobutyl-ftalát, bis(2-ethylhexyl)-ftalát) v části vzorků přesahovaly hladinu 100 mg/kg, přičemž vůbec nejvyšší koncentrace jednotlivé látky (di-*n*-butyl-ftalát) 628 mg/kg byla naměřena v jednom papírovém sáčku na mouku. Tyto nálezy svědčí o masivní přítomnosti barev a lepidel, kde se tyto látky používají. Bisfenoly A, F a S byly detekovány s frekvencí 20–56 % v koncentracích  $\leq 25$  mg/kg. PAU a jejich alkylované deriváty také byly identifikovány relativně často, ovšem jejich stopové koncentrace pouze ojediněle přesahovaly 1 mg/kg.

Výjimku z tohoto pozorování tvoří izomery diisopropylnaftalenu, které byly kvantifikovány nad 1 mg/kg u více než poloviny vzorků. Důvod pro jejich masivnější výskyt spočívá pravděpodobně v jejich specifickém využití jako rozpouštědla v bezuhlíkatém kopírovacím papíru, který je pravděpodobně recyklován spolu se sběrovým papírem. PFAS je možné rozdělit na dvě skupiny podle výskytu: 1. perfluoralkylové kyseliny a perfluoralkylsulfonáty, které byly ve vzorcích identifikovány jen ojediněle v koncentracích sotva přesahujících LOQ, 2. polyfluoralkylfosfonáty a bis(polyfluoralkyl)fosfináty přítomné řádově v jednotkách až desítkách vzorků ve stopových koncentracích, pouze ve dvou vzorcích nad 1 mg/kg. PFAS z druhé skupiny patří mezi tzv. polyfluorované surfaktanty, které mohly být použity i v papírových výrobcích.

Tyto výsledky potvrzují obavu, že papírové výrobky mohou představovat významný zdroj nebezpečí pro lidské zdraví. Toto nebezpečí pravděpodobně úzce souvisí s používáním recyklovaného sběrového papíru, protože nálezy některých kontaminantů koreluje s obsahem recyklátu (Obrázek 17). Vzhledem k vysoké frekvenci záchytu pozitivních vzorků je možné LOQ nové metody pro analýzu papíru považovat za vyhovující pro zvolený účel.



Obrázek 17. Koncentrace vybraných analytů ve vzorcích se známým obsahem recyklátu.  $r$  – pearsonův korelační koeficient, přičemž  $r_{krit} = 0,3$  na hladině významnosti 0,05, BPA – bisfenol A, DEHP – bis(2-ethylhexyl)-ftalát, 26DiPNa – 2,6-diisopropylnaftalen.

Pro ověření metody pro analýzu tučných potravin bylo pořízeno celkem 25 jedlých olejů, 15 vzorků másla, a 20 vzorků čokolády. Všechny vzorky byly zakoupeny v obchodních domech ČR v originálních spotřebitelských obalech. Tyto obaly byly v případě jedlého oleje vyrobeny buď z PET ( $n = 16$ ), nebo ze skla ( $n = 9$ ). Všechny vzorky másla byly zabaleny v papíru laminovaném z vnější strany potištěnou hliníkovou fólií. Vzorky čokolády byly zabaleny v potištěných polypropylenových fóliích ( $n = 14$ ) nebo v hliníkové fólii a potištěné papírové krabici ( $n = 6$ ).

Analýza těchto potravin opět prozradila masivní výskyt ftalátů. Ve všech analyzovaných vzorcích s výjimkou 4 jedlých olejů byl identifikován minimálně jeden ftalát, častěji však směsi až 6 různých ftalátů. Mezi nejčastěji se vyskytující sloučeniny z této skupiny patřil bis(2-ethylhexyl)-, diisononyl- a diisodecyl-ftalát s frekvencí výskytu  $\geq 73$  %. Hladiny diisononyl-ftalátu dosahovaly maximálních hodnot 33 mg/kg jedlého oleje, 13 mg/kg másla a 1,6 mg/kg

čokolády, zatímco koncentrace ostatních ftalátů byly  $\leq 4,7$  mg/kg. Z fotoiniciátorů byl ve vzorcích másla a čokolády nejčastěji obsažen ethyl-4-(dimethylamino)benzoát, jehož koncentrace dosahovaly maximální hodnoty  $4,4 \mu\text{g}/\text{kg}$  (2LOQ). V řádově jednotkách vzorků másla a/nebo čokolády byly dále identifikovány benzofenon, 2-isopropylthioxanthon a methyl-2-benzoylbenzoát v koncentracích  $\leq 52 \mu\text{g}/\text{kg}$ . V jedlém oleji nebyl identifikován žádný z fotoiniciátorů, což ukazuje na absenci kontaktu s tiskařskými barvami. Ze 14 analyzovaných bisfenolů byl identifikován pouze bisfenol A, a to asi v 12 % vzorků v koncentracích  $\leq 85 \mu\text{g}/\text{kg}$ . Zcela negativní byly výsledky všech PFAS. Anthrachinon byl identifikován v jednom vzorku čokolády, kde mohlo dojít k migraci z papírového obalu.

Z těchto výsledků je evidentní výrazný rozptyl koncentrací studovaných látek. Pro ftaláty o koncentracích až  $33 \text{ mg}/\text{kg}$  dosažené LOQ zcela vyhovují, zatímco PFAS s ohledem na předchozí nálezy v řádu  $1 \text{ ng}/\text{kg}$ – $1 \mu\text{g}/\text{kg}$  (Still a kol. 2013, Yang a kol. 2015) těžko mohou být touto metodou detekovány. V praxi je obtížně možné pokrýt takový koncentrační rozsah jedinou metodou. Zkoncentrování extraktu před analýzou v této práci nebylo testováno z důvodů možné kontaminace ftaláty z prostředí, ovšem teoreticky by mohlo být použito před analýzou bisfenolů a PFAS.

## 5 ZÁVĚR

Podarilo se úspěšně vyvinout metodu pro analýzu 68 škodlivin v materiálech určených pro styk s potravinami na bázi papíru. Tato metoda je založena na extrakci vzorku směsným rozpouštědlem acetonitril-voda, rozdělení fází po přidavku solí a analýze acetonitrilové fáze pomocí GC-MS/MS a HPLC-MS/MS. Přítomnost vody v extrakčním rozpouštědle je zcela kritická pro izolaci některých polárních analytů. Při ověření metody na vzorcích s přidavkem analytů byla zjištěna dostatečná přesnost stanovení ( $\text{HorRat} \leq 1,3$ ) a výtěžnost většiny analytů  $> 70 \%$ . Při analýze 132 reálných vzorků bylo identifikováno 65 cílových látek, a proto je možné dosažené LOQ (1,3–220  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) považovat za vyhovující.

Dále se podařilo optimalizovat metodu HPLC-MS/MS pro analýzu 41 migrantů v tučných potravinách. Analyty byly extrahovány středně polárním organickým rozpouštědlem. Pro přečištění získaných extraktů bylo testováno několik postupů, z nichž nejefektivnější je modifikace extraktu vodou a skladování při  $5^\circ\text{C}$ . Tento postup poskytuje srovnatelné výtěžnosti lipofilních analytů i reziduální koncentrace lipidů jako paralelně zavedená SPE metoda. Při ověření této metody na vzorcích s umělým přidavkem analytů byla zjištěna dobrá přesnost stanovení ( $\text{HorRat} \leq 0,7$ ). Většina analytů byla izolována s výtěžností  $> 70 \%$ , jednotlivé případy lipofilních látek měly výtěžnost  $< 70 \%$ . LOQ se pohybovaly v rozmezí 1,0–42  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Při analýze 60 reálných vzorků tučných potravin bylo identifikováno celkem 17 cílových látek. Pro budoucí využití metody se doporučuje otestovat možnost zkoncentrování extraktu za účelem snížení LOQ pro PFAS a bisfenoly.

Během experimentů byla získána řada poznatků s obecnou platností:

Komerční značky methanolu pro LC-MS se výrazně liší v obsahu nečistot. V testovaných rozpouštědlech byly identifikovány ftaláty, některé další analyty a trimethyl-borát. Při použití methanolu s nálezem analytů v mobilní fázi HPLC-MS/MS dochází k dramatickému zvýšení LOQ. Trimethyl-borát v mobilní fázi HPLC výrazně snižuje citlivost u některých analytů, což má opět přímý dopad na LOQ. Jako nejefektivnější způsob prevence těchto jevů se jeví v rámci vývoje metody otestovat a vybrat vhodnou značku rozpouštědla.

Problémy spojené s výskytem analytů v mobilní fázi HPLC je možné účinně zredukovat použitím předkolony, která zachycuje a zpožďuje signály analytů oproti signálům pocházejícím z nástřiku vzorků. V této práci byla s úspěchem použita předkolona s fází C18, která efektivně zpozdila kontaminaci. Fenyl-hexylová analytická kolona prokázala dobrou schopnost separovat strukturní izomery různých látek.

Důležitým aspektem vývoje metody je kontrola matričních koextraktů. V této práci se osvědčila metoda přímého nástřiku do ESI-HR-TOF-MS pro rychlou identifikaci a semikvantitativní stanovení matričních látek v extraktech.

# SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

- a – absolutní člen kalibrační funkce
- APPI – fotoionizace za atmosferického tlaku (atmospheric pressure photoionization)
- ASE – accelerated solvent extraction
- b – směrnice kalibrační funkce
- CAS – Chemical Abstract Service
- DAD – detektor diodového pole (diode array detector)
- DART – přímá analýza v reálném čase (direct analysis in real time)
- DLLME – disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina (dispersive liquid-liquid microextraction)
- dSPE – disperzní extrakce na tuhou fázi (dispersive solid phase extraction)
- EFSA – Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority)
- EI – elektronová ionizace
- EPA – Agentura pro ochranu životního prostředí (U.S. Environmental Protection Agency)
- ESI – ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)
- EU – Evropská unie
- FCM – materiály ve styku s potravinami (food contact materials)
- FID – plamenově-ionizační detektor (flame ionization detector)
- FLD – fluorescenční detektor
- GC – plynová chromatografie (gas chromatography)
- GC×GC – komprehenzivní plynová chromatografie
- GPC – gelová permeační chromatografie
- HorRat – Horwitz ratio
- HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
- HR-TOF-MS – vysokorozlišující hmotnostní analyzátor doby letu (high-resolution time-of-flight mass analyzer)
- $K_{ow}$  – rozdělovací koeficient oktanol-voda
- LC – kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
- LOD – mez detekce (limit of detection)
- LOQ – mez kvantifikace (limit of quantification)
- MeCN – acetonitril
- MeOH – methanol
- MOAH – aromatické uhlovodíky minerálních olejů (mineral oil aromatic hydrocarbons)
- MOSH – nasycené uhlovodíky minerálních olejů (mineral oil saturated hydrocarbons)
- MS – hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
- MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie
- MZ ČR – Ministerstvo zdravotnictví České republiky
- NIAS – nezáměrně přidané sloučeniny (non-intentionally added substances)
- PAU – polycyklické aromatické uhlovodíky
- PET – polyethylentereftalát
- PFAS – poly- a perfluoralkylové sloučeniny
- PLE – pressurized liquid extraction
- PSA – primary secondary amine
- PVC – polyvinylchlorid
- r – pearsonův korelační koeficient
- $r_{krit}$  – kritická hodnota pearsonova korelačního koeficientu
- RASFF – systém rychlého varování pro potraviny a krmiva (Rapid Alert System for Food and Feed)
- RSD – relativní směrodatná odchylka (relative standard deviation)
- $RSD_{exp}$  – experimentálně zjištěná hodnota RSD
- $RSD_h$  – hodnota RSD předpovězená Horwitzovou rovnicí
- S/N – poměr signálu k šumu základní linie
- $s_{y0}$  – směrodatná odchylka odezvy slepého pokusu
- $s_a$  – směrodatná odchylka absolutního členu
- SML – specifický migrační limit
- SPA – primary secondary amine
- SPE – extrakce na tuhou fázi (solid phase extraction)
- SPME – mikroextrakce extrakce na tuhou fázi (solid phase microextraction)
- $s_{y|x}$  – standardní chyba lineární regrese
- TDI – tolerovatelný denní příjem (tolerable daily intake)
- $U_{LOQ}$  – nejistota na koncentraci LOQ
- w – hmotnostní zlomek



WHO — Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

$x_{exp}$  — změřená hodnota studované veličiny

$x_{ref}$  — dohodnutá referenční hodnota studované veličiny

$y_0$  — odezva slepého pokusu

$y_{LOD}$  — odezva na koncentraci LOD

$y_{LOQ}$  — odezva na koncentraci LOQ

# LITERATURA

- Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajbahr D, Schenck FJ (2003) Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile. *Journal of AOAC International* 86(2): 412–431, doi: 10.2478/s11687-011-0011-9.
- Annesley TM (2007) Methanol-associated matrix effects in electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 53(10): 1827–1834, doi: 10.1373/clinchem.2007.090811.
- Aparicio JL, Elizalde M (2015) Migration of Photoinitiators in Food Packaging: A Review. *Packaging Technology And Science* 28: 181–203.
- Aurela B, Kulmala H, Soderhjelm L (1999) Phthalates in paper and board packaging and their migration into Tenax and sugar. *Food Additives & Contaminants* 16(12): 571–577, doi: 10.1080/026520399283713.
- Babu S, Uppu SN, Martin B, Agu OA, Uppu RM (2015) Unusually high levels of bisphenol A (BPA) in thermal paper cash register receipts (CRs): Development and application of a robust LC-UV method to quantify BPA in CRs. *Toxicology Mechanisms and Methods* 25(5): 410–416, doi: 10.3109/15376516.2015.1045661.
- Ballesteros-Gómez A, Rubio S, Pérez-Bendito D (2009) Analytical methods for the determination of bisphenol A in food. *Journal of Chromatography A* 1216(3): 449–469, doi: 10.1016/j.chroma.2008.06.037.
- Begley TH, Hsu W, Noonan G, Diachenko G (2008) Migration of fluorochemical paper additives from food-contact paper into foods and food simulants. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 25(3): 384–390, doi: 10.1080/02652030701513784.
- Bengtström L, Rosenmai AK, Trier X, Jensen LK, Granby K, Vinggaard AM, Driffield M, Højslev Petersen J (2016) Non-targeted screening for contaminants in paper and board food-contact materials using effect-directed analysis and accurate mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 33(6): 1080–1093, doi: 10.1080/19440049.2016.1184941.
- Bi X, Pan X, Yuan S, Wang Q (2013) Plasticizer contamination in edible vegetable oil in a U.S. retail market. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(39): 9502–9509, doi: 10.1021/jf402576a.
- Biedermann M, Grob K (2009) How “white” was the mineral oil in the contaminated Ukrainian sunflower oils? *European Journal of Lipid Science and Technology* 111(4): 313–319, doi: 10.1002/ejlt.200900007.
- Biedermann M, Grob K (2013) Assurance of safety of recycled paperboard for food packaging through comprehensive analysis of potential migrants is unrealistic. *Journal of Chromatography A* 1293: 107–119, doi: 10.1016/j.chroma.2013.04.009.
- Biedermann M, Ingenhoff JE, Zurfluh M, Richter L, Simat T, Harling A, Altkofer W, Helling R, Grob K (2013) Migration of mineral oil, photoinitiators and plasticisers from recycled paperboard into dry foods: a study under controlled conditions. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 30(5): 885–898, doi: 10.1080/19440049.2013.786189.
- Bjarnason I, Macpherson A, Hollander D (1995) Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology* 108(5): 1566–1581.
- Bononi M, Tateo F (2009) Identification of diisobutyl phthalate (DIBP) suspected as possible contaminant in recycled cellulose for take-away pizza boxes. *Packaging Technology and Science* 22(1): 53–58, doi: 10.1002/pts.805.
- Bordajandi LR, Dabrio M, Ulberth F, Emons H (2008) Optimisation of the GC-MS conditions for the determination of the 15 EU foodstuff priority Polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Separation Science* 31(10): 1769–1778, doi: 10.1002/jssc.200700562.
- Bossuyt M Van, Hoeck E Van, Vanhaecke T, Rogiers V, Mertens B (2016) Printed paper and board food contact materials as a potential source of food contamination. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 81: 10–19, doi: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.06.025>.
- Bradley EL, Burden RA, Leon I, Mortimer DN, Speck DR, Castle L (2013) Determination of phthalate diesters in foods. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 30(4): 722–734, doi: 10.1080/19440049.2013.781683.

- Bratinova S, Hoekstra E (Eds.) (2019) Guidance on sampling, analysis and data reporting for the monitoring of mineral oil hydrocarbons in food and food contact materials. JRC115694, doi:10.2760/208879,
- Bratinova S, Raffael B, Simoneau C (2009) Guidelines for performance criteria and validation procedures of analytical methods used in controls of food contact materials. doi: 10.2788/49046.
- Bugey A, Janin Y, Edder P, Bieri S (2013) Targeted multidimensional gas chromatography using a heart-cutting device and cryogenic focusing for the determination of benzophenone derivatives in foodstuffs. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405(12): 4177–4185, doi: 10.1007/s00216-013-6808-2.
- Cao XL (2010) Phthalate Esters in Foods: Sources, Occurrence, and Analytical Methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9(1): 21–43, doi: 10.1111/j.1541-4337.2009.00093.x.
- Cao XL, Perez-Locas C, Robichaud A, Clement G, Popovic S, Dufresne G, Dabeka RW (2015) Levels and temporal trend of bisphenol A in composite food samples from Canadian Total Diet Study 2008–2012. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 32(12): 2154–2160, doi: 10.1080/19440049.2015.1088663.
- Capriotti AL, Cavaliere C, Cavazzini A, Foglia P, Laganà A, Piovesana S, Samperi R (2013) High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of perfluorinated acids in cow milk. *Journal of Chromatography A* 1319: 72–79, doi: 10.1016/j.chroma.2013.10.029.
- Crimmins BS, Xia X, Hopke PK, Holsen TM (2014) A targeted/non-targeted screening method for perfluoroalkyl carboxylic acids and sulfonates in whole fish using quadrupole time-of-flight mass spectrometry and MSe. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406(5): 1471–1480, doi: 10.1007/s00216-013-7519-4.
- Desimoni E, Brunetti B (2015) About Estimating the Limit of Detection by the Signal to Noise Approach. *Pharmaceutica Analytica Acta* 06(04): 1–4. doi: 10.4172/2153-2435.1000355.
- Dorman FL, Reiner EJ (2012) Chapter 28 - Emerging and Persistent Environmental Compound Analysis. In: Poole CF (ed), *Gas Chromatography*. Elsevier, Amsterdam, pp 647–677, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385540-4.00028-6>
- Dufková V, Čabala R, Ševčík V (2012) Determination of C 5-C 12 perfluoroalkyl carboxylic acids in river water samples in the Czech Republic by GC-MS after SPE preconcentration. *Chemosphere* 87(5): 463–469, doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.12.029.
- Dvořáková M, Kejlová K, Bendová H, Rucki M, Kohout P, Tomešová J, Vavrouš A, Jírová D (2016) Alternative methods in vitro for screening of endocrine disruptors. *Neuroendocrinology Letters* 37(December): 123–131.
- EC (2002) Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food (expressed on 4 December 2002) (SCF/CS/CNTM/PAH/29).
- EC (2005) Nařízení Komise (ES) č. 1895/2005 ze dne 18. listopadu 2005 o omezení použití některých epoxyderivátů v materiálech a předmětech určených pro styk s potravinami. *Úřední věstník Evropské unie* L 302/28.
- EC (2006) Nařízení komise (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách. *Úřední věstník Evropské unie* L 364/5.
- EC (2007) Směrnice komise 2007/42/ES ze dne 29. června 2007 o materiálech a předmětech vyrobených z celofánu určených pro styk s potravinami. *Úřední věstník Evropské unie* L 172/71.
- EC (2009) Nařízení komise (ES) č. 450/2009 ze dne 29. května 2009 o aktivních a inteligentních materiálech a předmětech určených pro styk s potravinami. *Úřední věstník Evropské unie* L 135/3.
- EC (2011a) Nařízení komise (EU) č. 10/2011 ze dne 14. ledna 2011 o materiálech a předmětech z plastů určených pro styk s potravinami. *Úřední věstník Evropské unie* L 12/1.
- EC (2011b) Směrnice Komise 2011/8/EU ze dne 28. ledna 2011, kterou se mění směrnice 2002/72/ES, pokud jde o omezení používání bisfenolu A v plastových kojeneckých láhvích. *Úřední věstník Evropské unie* L 26/11.
- EC (2017) Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. SANTE/11813/2017.

- EC (2019) Doporučení komise (EU) 2019/794 ze dne 15. května 2019 o koordinovaném plánu kontrol s cílem stanovit prevalenci některých látek migrujících z materiálů a předmětů určených pro styk s potravinami.
- EFSA (2005) Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to 2-Isopropyl thioxanthone (ITX) and 2-ethylhexyl-4-dimethylaminobenzoate (EHDAB) in food contact materials. *The EFSA Journal* 293: 1–15.
- EFSA (2008a) Food contact materials: Note for guidance for petitioners presenting an application for the safety assessment of a substance to be used in food contact materials prior to its authorisation. *EFSA Journal* 6(7): 1–125.
- EFSA (2009) Scientific Opinion of EFSA prepared by the Panel on food contact materials, enzymes, flavourings and processing aids (CEF) on Toxicological evaluation of benzophenone. *The EFSA Journal* 1104: 1–30.
- EFSA (2012a) Report of ESCO WG on non-plastic Food Contact Materials. Supporting Publications 139.
- EFSA (2012b) Perfluoroalkylated substances in food: occurrence and dietary exposure. *EFSA Journal* 10(6):2743: 1–55.
- EFSA CEF Panel (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids) (2015) Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs: Executive summary. *EFSA Journal* 13(1):3978: 1–621.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) (2008b) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food: Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal* 724: 1–114.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) (2012b) Scientific Opinion on Mineral Oil Hydrocarbons in Food. *EFSA Journal* 10(6):2704: 1–185.
- ECHA (2018). Candidate List of substances of very high concern for Authorisation (published in accordance with Article 59(10) of the REACH Regulation). url: <https://echa.europa.eu/cs/candidate-list-table> (4.11.2018).
- EPA (2005) Draft Risk Assessment of the Potential Human Health Effects Associated with Exposure to Perfluorooctanoic Acid and its Salts.
- Esparza X, Moyano E, Boer J De, Galceran MT, Leeuwen SPJ Van (2011) Analysis of perfluorinated phosphonic acids and perfluorooctane sulfonic acid in water, sludge and sediment by LC-MS/MS. *Talanta* 86(1): 329–336, doi: 10.1016/j.talanta.2011.09.024.
- Evropský parlament a rada (2004) Nařízení evropského parlamentu a rady (ES) č. 1935/2004 ze dne 27. října 2004 o materiálech a předmětech určených pro styk s potravinami a o zrušení směrnic 80/590/EHS a 89/109/EHS. Úřední věstník Evropské unie L 338/4.
- Evropský parlament a rada (2008) Nařízení evropského parlamentu a rady (ES) č. 1333/2008 ze dne 16. prosince 2008 o potravinářských přídatných látkách. Úřední věstník Evropské unie L 354/16.
- Fan JC, Wu L, Wang XF, Huang XH, Jin Q, Wang ST (2012) Determination of the migration of 20 phthalate esters in fatty food packaged with different materials by solid-phase extraction and UHPLC-MS/MS. *Analytical Methods* 4(12): 4168–4175, doi: 10.1039/c2ay25916h.
- Fankhauser-Noti A, Grob K (2006) Migration of plasticizers from PVC gaskets of lids for glass jars into oily foods: Amount of gasket material in food contact, proportion of plasticizer migrating into food and compliance testing by simulation. *Trends in Food Science and Technology* 17(3): 105–112.
- Fankhauser-Noti A, Grob K (2007) Blank problems in trace analysis of diethylhexyl and dibutyl phthalate: Investigation of the sources, tips and tricks. *Analytica Chimica Acta* 582(2): 353–360, doi: 10.1016/j.aca.2006.09.012.
- Fasano E, Cirillo T, Esposito F, Lacorte S (2015) Migration of monomers and plasticizers from packed foods and heated microwave foods using QuEChERS sample preparation and gas chromatography/mass spectrometry. *LWT - Food Science and Technology* 64(2): 1015–1021, doi: 10.1016/j.lwt.2015.06.066.
- Fattore M, Barbato F, Grumetto L, Albrizio S, Russo G (2015) Monitoring of bisphenols in canned tuna from Italian markets. *Food and Chemical Toxicology* 83Elsevier Ltd, : 68–75, doi: 10.1016/j.fct.2015.05.010.

- Feigenbaum A, Dole P, Aucejo S, Dainelli D, Garcia CDLC, Hankemeier T, N'gono Y, Papaspyrides CD, Paseiro P, Pastorelli S, Pavlidou S, Pennarun PY, Saillard P, Vidal L, Vitrac O, Voulzatis Y (2005) Functional barriers: Properties and evaluation. *Food Additives & Contaminants* 22(10): 956–967, doi: 10.1080/02652030500227776.
- Feng YL, Zhu J, Sensenstein R (2005) Development of a headspace solid-phase microextraction method combined with gas chromatography mass spectrometry for the determination of phthalate esters in cow milk. *Analytica Chimica Acta* 538(1–2): 41–48, doi: 10.1016/j.aca.2005.02.020.
- Ferrer E, Santoni E, Vittori S, Font G, Mañes J, Sagratini G (2011) Simultaneous determination of bisphenol A, octylphenol, and nonylphenol by pressurised liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry in powdered milk and infant formulas. *Food Chemistry* 126: 360–367.
- Filippou O, Deliyanni EA, Samanidou VF (2017) Fabrication and evaluation of magnetic activated carbon as adsorbent for ultrasonic assisted magnetic solid phase dispersive extraction of bisphenol A from milk prior to high performance liquid chromatographic analysis with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A* 1479: 20–31, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.12.002>.
- Gallart-Ayala H, Núñez O, Moyano E, Galceran MT (2011) Analysis of UV ink photoinitiators in packaged food by fast liquid chromatography at sub-ambient temperature coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218(3): 459–466, doi: 10.1016/j.chroma.2010.11.054.
- Gebbink WA, Ullah S, Sandblom O, Berger U (2013) Polyfluoroalkyl phosphate esters and perfluoroalkyl carboxylic acids in target food samples and packaging—method development and screening. *Environmental Science and Pollution Research* 20(11): 7949–7958, doi: 10.1007/s11356-013-1596-y.
- Gil-Vergara A, Blasco C, Picó Y (2007) Determination of 2-isopropyl thioxanthone and 2-ethylhexyl-4-dimethylaminobenzoate in milk: Comparison of gas and liquid chromatography with mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389(2): 605–617, doi: 10.1007/s00216-007-1482-x.
- Grumetto L, Gennari O, Montesano D, Ferracane R, Ritieni A, Albrizio S, Barbato F (2013) Determination of Five Bisphenols in Commercial Milk Samples by Liquid Chromatography Coupled to Fluorescence Detection. *Journal of Food Protection* 76(9): 1590–1596.
- Guo Y, Kannan K (2012) Challenges encountered in the analysis of phthalate esters in foodstuffs and other biological matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404(9): 2539–2554, doi: 10.1007/s00216-012-5999-2.
- Guo Z, Wang S, Wei D, Wang M, Zhang H, Gai P, Duan J (2010) Development and application of a method for analysis of phthalates in ham sausages by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Meat Science* 84(3)Elsevier Ltd, : 484–490, doi: 10.1016/j.meatsci.2009.10.002.
- Haljasorg T, Saame J, Kipper K, Teearu A, Herodes K, Reinik M, Leito I (2014) Alternative Eluent Composition for LC-MS Analysis of Perfluoroalkyl Acids in Raw Fish Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(23): 5259–5268, doi: 10.1021/jf5007243.
- Heudorf U, Mersch-Sundermann V, Angerer J (2007) Phthalates: Toxicology and exposure. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 210(5): 623–634, doi: 10.1016/j.ijheh.2007.07.011.
- Holadová K, Prokūpková G, Hajišlová J, Poustka J (2007) Headspace solid-phase microextraction of phthalic acid esters from vegetable oil employing solvent based matrix modification. *Analytica Chimica Acta* 582(1): 24–33, doi: 10.1016/j.aca.2006.09.005.
- Hollosi L, Wenzl T (2011) Development and optimisation of a dopant assisted liquid chromatographic-atmospheric pressure photo ionisation-tandem mass spectrometric method for the determination of 15+1 EU priority PAHs in edible oils. *Journal of Chromatography A* 1218(1): 23–31, doi: 10.1016/j.chroma.2010.10.015.
- Hoppe M, Voogt P de, Franz R (2016) Identification and quantification of oligomers as potential migrants in plastics food contact materials with a focus in polycondensates - A review. *Trends in Food Science and Technology* 50: 118–130, doi: 10.1016/j.tifs.2016.01.018.
- Horwitz W, Albert R (2006) The Horwitz ratio (HorRat): a useful index of method performance with respect to precision. *Journal of AOAC International* 89(4): 1095–1109.

- Horwitz WJ, Kamps LR, Boyer K (1980) Quality assurance in the analysis of foods and trace constituents. *Journal of Association of Official Analytical Chemists* 63(6): 1344–1354.
- Chaparro-Ortega A, Betancourt M, Rosas P, Vázquez-Cuevas FG, Chavira R, Bonilla E, Casas E, Ducolomb Y (2018) Endocrine disruptor effect of perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) on porcine ovarian cell steroidogenesis. *Toxicology in Vitro* 46: 86–93, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.09.030>.
- Chen MY, Ike M, Fujita M (2002) Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of bisphenol-A and other bisphenols. *Environmental Toxicology* 17(1): 80–86, doi: 10.1002/tox.10035.
- Chung SWC, Lam CH (2014) Development of an ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of perfluorinated compounds in fish and fatty food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(25): 5805–5811, doi: 10.1021/jf502326h.
- Ierapetritis I, Lioupis A, Lampi E (2014) Determination of Phthalates into Vegetable Oils by Isotopic Dilution Gas Chromatography Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods* 7(7): 1451–1457, doi: 10.1007/s12161-013-9770-x.
- Jung T, Simat TJ, Altkofer W (2010) Mass transfer ways of ultraviolet printing ink ingredients into foodstuffs. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 27(7): 1040–1049, doi: 10.1080/19440041003596543.
- Kalachova K, Pulkrabova J, Drabova L, Cajka T, Kocourek V, Hajslova J (2011) Simplified and rapid determination of polychlorinated biphenyls, polybrominated diphenyl ethers, and polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and shrimps integrated into a single method. *Analytica Chimica Acta* 707(1–2)Elsevier B.V., : 84–91, doi: 10.1016/j.aca.2011.09.016.
- Kim DH, Choi SM, Lim DS, Roh T, Kwack SJ, Yoon S, Kim MK, Yoon KS, Kim HS, Kim DW, Lee BM (2018) Risk assessment of endocrine disrupting phthalates and hormonal alterations in children and adolescents. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 81(21): 1150–1164, doi: 10.1080/15287394.2018.1543231.
- Koivikko R, Pastorelli S, Quirós ARB de, Paseiro-Cerrato R, Paseiro-Losada P, Simoneau C (2010) Rapid multi-analyte quantification of benzophenone, 4-methylbenzophenone and related derivatives from paperboard food packaging. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 27(10): 1478–1486, doi: 10.1080/19440049.2010.502130.
- Koster S, Bani-Estivals MH, Bonuomo M, Bradley E, Chagnon MC, Garcia ML, Godts F, Gude T, Helling R, Paseiro-Losada P, others (2015) Guidance on best practices on the risk assessment of non intentionally added substances (NIAS) in food contact materials and articles. *Guidance on best practices on the risk assessment of non intentionally added substances (NIAS) in food contact materials and articles ILSI Europe*.
- Kumar B, Verma VK, Gaur R, Kumar S, Sharma CS, Akolkar AB (2014) Validation of HPLC method for determination of priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) in waste water and sediments. *Pelagia Research Library Advances in Applied Science Research* 5(1): 201–209.
- Kumari R, Patel DK, Chaturvedi P, Ansari NG, Chandra Murthy R (2013) Solid phase micro extraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for the trace analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in chocolate. *Analytical Methods* 5(8): 1946, doi: 10.1039/c3ay26296k.
- Lacina O, Hradkova P, Pulkrabova J, Hajslova J (2011) Simple, high throughput ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry trace analysis of perfluorinated alkylated substances in food of animal origin: Milk and fish. *Journal of Chromatography A* 1218(28): 4312–4321, doi: 10.1016/j.chroma.2011.04.061.
- Lago MA, Rodríguez-Bernaldo de Quirós A, Sendón R, Bustos J, Nieto MT, Paseiro P (2015) Photoinitiators: a food safety review. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 32(5): 779–798, doi: 10.1080/19440049.2015.1014866.
- Levene H (1960) Robust tests for equality of variances. In: Olkin I, et al. (eds.), *Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling*. Stanford University Press. pp. 278–292
- Li J, Zhang X, Liu Y, Tong H, Xu Y, Liu S (2013a) Preparation of a hollow porous molecularly imprinted polymer using tetrabromobisphenol A as a dummy template and its application as SPE sorbent for determination of bisphenol A in tap water. *Talanta* 117: 281–287, doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.09.022>.

- Li X, Xiong W, Lin H, Zhuo L, Lv S, Tang X, Chen M, Zou Z, Lin Z, Qiu B, Chen G (2013b) Analysis of 16 phthalic acid esters in food simulants from plastic food contact materials by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Separation Science* 36(3): 477–484, doi: 10.1002/jssc.201200689.
- Li Z, Xu L, Peng C, Kuang H, Xu C, Wang L, Xue F, Ding T, Sheng C, Gong Y (2011) Simultaneous Determination of Nine Types of Phthalate Residues in Commercial Milk Products Using HPLC-ESI-MS-MS. *Journal of Chromatographic Science* 49(4): 337–343, doi: 10.1093/chrsci/49.4.337.
- Lin ZP, Ikononou MG, Jing H, Mackintosh C, Gobas FAPC (2003) Determination of phthalate ester congeners and mixtures by LC/ESI-MS in sediments and biota of an urbanized marine inlet. *Environmental Science and Technology* 37(10): 2100–2108, doi: 10.1021/es026361r.
- Liu Y, Wang S, Wang L (2013) Development of rapid determination of 18 phthalate esters in edible vegetable oils by gas chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(6): 1160–1164, doi: 10.1021/jf3053884.
- Lorenzini R, Fiselier K, Biedermann M, Barbanera M, Braschi I, Grob K (2010) Saturated and aromatic mineral oil hydrocarbons from paperboard food packaging: estimation of long-term migration from contents in the paperboard and data on boxes from the market. *Food Additives & Contaminants: Part A* 27(12): 1765–1774.
- Marega M, Grob K, Moret S, Conte L (2013) Phthalate analysis by gas chromatography-mass spectrometry: Blank problems related to the syringe needle. *Journal of Chromatography A* 1273: 105–110, doi: 10.1016/j.chroma.2012.11.076.
- Miller JN, Miller JC (2010) *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry* (6th Ed.), Pearson Education Limited, Harlow, UK.
- Michalowicz J (2014) Bisphenol A - Sources, toxicity and biotransformation. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 37(2): 738–758, doi: 10.1016/j.etap.2014.02.003
- Moret S, Grob K, Conte L (1997) Mineral oil polyaromatic hydrocarbons in foods, e.g. from jute bags, by on-line LC-solvent evaporation (SE)-LC-GC-FID. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* 204: 241–246, <https://doi.org/10.1007/s002170050071>.
- Morizane M, Kawasaki Y, Miura T, Yagi K, Esumi S, Kitamura Y, Sendo T (2015) Photoinitiator-Initiated Estrogenic Activity in Human Breast Cancer Cell Line MCF-7. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 78(23–24): 1450–1460, doi: 10.1080/15287394.2015.1094431.
- MZ ČR (2001) Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č 38/2001 ze dne 19. ledna 2001 o hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami a pokrmy.
- Nawrocki J, Dąbrowska A, Borcz A (2002) Investigation of carbonyl compounds in bottled waters from Poland. *Water Research* 36(19): 4893–4901, doi: 10.1016/S0043-1354(02)00201-4.
- Ostrovský I, Čabala R, Kubinec R, Górová R, Blaško J, Kubincová J, Řimnáčová L, Lorenz W (2011) Determination of phthalate sum in fatty food by gas chromatography. *Food Chemistry* 124(1): 392–395, doi: 10.1016/j.foodchem.2010.06.045
- Pereira J, Selbourne M do C, Poças F (2019) Determination of phthalates in olive oil from European market. *Food Control* 98(November 2018): 54–60, doi: 10.1016/j.foodcont.2018.11.003.
- Pérez-Palacios D, Fernández-Recio MÁ, Moreta C, Tena MT (2012) Determination of bisphenol-type endocrine disrupting compounds in food-contact recycled-paper materials by focused ultrasonic solid-liquid extraction and ultra performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Talanta* 99: 167–174, doi: 10.1016/j.talanta.2012.05.035.
- Poothong S, Boontanon SK, Boontanon N (2012) Determination of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid in food packaging using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Hazardous Materials* 205–206: 139–143, doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.12.050.
- Purcaro G, Picardo M, Barp L, Moret S, Conte LS (2013) Direct-immersion solid-phase microextraction coupled to fast gas chromatography mass spectrometry as a purification step for polycyclic aromatic hydrocarbons determination in olive oil. *Journal of Chromatography A* 1307: 166–171, doi: 10.1016/j.chroma.2013.07.068.

- Rada Evropy (1984) Směrnice Rady ze dne 15. října 1984 o sblížení právních předpisů členských států týkajících se keramických předmětů určených pro styk s potravinami (84/500/EHS) Úřední věstník Evropské unie, 13/sv. 7.
- RASFF (2019) url: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/> (14.3.2019).
- Reiner EJ, Jobst KJ, Megson D, Dorman FL, Focant JF (2014) Chapter 3 - Analytical Methodology of POPs. In: O'Sullivan G, Sandau C (eds), *Environmental Forensics for Persistent Organic Pollutants*. Elsevier, Amsterdam, pp 59–139, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59424-2.00003-7>.
- Reyes-Gallardo EM, Lucena R, Cárdenas S, Valcárcel M (2016) Dispersive micro-solid phase extraction of bisphenol A from milk using magnetic nylon 6 composite and its final determination by HPLC-UV. *Microchemical Journal* 124: 751–756, doi: [10.1016/j.microc.2015.10.025](https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.10.025).
- Rios JJ, Morales A, Márquez-Ruiz G (2010) Headspace solid-phase microextraction of oil matrices heated at high temperature and phthalate esters determination by gas chromatography multistage mass spectrometry. *Talanta* 80(5): 2076–2082, doi: [10.1016/j.talanta.2009.11.008](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.11.008).
- Sanagi MM, Loh SH, Wan Ibrahim WA, Hasan MN, Aboul Enein HY (2012) Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Fresh Milk by Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction-Gas Chromatography Mass Spectrometry. *Journal of Chromatographic Science* 51(2): 112–116, doi: [10.1093/chromsci/bms113](https://doi.org/10.1093/chromsci/bms113).
- Santillana MI, Ruiz E, Nieto MT, Rodríguez Bernaldo de Quirós A, Sendón R, Cirugeda ME, Sanchez JJ (2013) Polycarbonate baby bottles: Study of the release of Bisphenol A. *European Food Research and Technology* 236(5): 883–889, doi: [10.1007/s00217-013-1946-5](https://doi.org/10.1007/s00217-013-1946-5).
- Shen DX, Lian HZ, Ding T, Xu JZ, Shen CY (2009) Determination of low-level ink photoinitiator residues in packaged milk by solid-phase extraction and LC-ESI/MS/MS using triple-quadrupole mass analyzer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395(7): 2359–2370, doi: [10.1007/s00216-009-3115-z](https://doi.org/10.1007/s00216-009-3115-z).
- Shi LK, Liu YL, Liu HM, Zhang MM (2015) One-step solvent extraction followed by liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407(13): 3605–3616, doi: [10.1007/s00216-015-8571-z](https://doi.org/10.1007/s00216-015-8571-z).
- Schaider LA, Balan SA, Blum A, Andrews DQ, Strynar MJ, Dickinson ME, Lunderberg DM, Lang JR, Peaslee GF (2017) Fluorinated Compounds in U.S. Fast Food Packaging. *Environmental Science and Technology Letters* 4(3): 105–111, doi: [10.1021/acs.estlett.6b00435](https://doi.org/10.1021/acs.estlett.6b00435).
- Simoneau C, Raffael B, Garbin S, Hoekstra E, Mieth A, Lopes JA, 2016 VR (2016) Non-harmonised food contact materials in the EU: regulatory and market situation. doi: [10.2788/234276](https://doi.org/10.2788/234276).
- Skrottová A (2013) Stanovení rozdělovacího koeficientu (Kow) perfluorovaných kyselin v systému oktán-1-ol/voda. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta.
- Spagnuolo ML, Marini F, Sarabia LA, Ortiz MC (2017) Migration test of Bisphenol A from polycarbonate cups using excitation-emission fluorescence data with parallel factor analysis. *Talanta* 167(February): 367–378, doi: [10.1016/j.talanta.2017.02.033](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.02.033).
- Staples CA, Peterson DR, Parkerton TF, Adams WJ (1997) The environmental fate of phthalate esters: A literature review. *Chemosphere* 35(4): 667–749, doi: [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00195-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00195-1).
- Still M, Schlummer M, Gruber L, Fiedler D, Wolz G (2013) Impact of industrial production and packaging processes on the concentration of per- and polyfluorinated compounds in milk and dairy products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(38): 9052–9062, doi: [10.1021/jf4020137](https://doi.org/10.1021/jf4020137).
- Stuart JD, Capulong CP, Launer KD, Pan X (2005) Analyses of phenolic endocrine disrupting chemicals in marine samples by both gas and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1079(1): 136–145, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.075>.
- Sun H, Yang Y, Li H, Zhang J, Sun N (2012) Development of multiresidue analysis for twenty phthalate esters in edible vegetable oils by microwave-assisted extraction-gel permeation chromatography-solid phase extraction-gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(22): 5532–5539, doi: [10.1021/jf3009603](https://doi.org/10.1021/jf3009603).



- Sungur S, Okur R, Turgut FH, Ustun I, Gokce C (2015) Migrated phthalate levels into edible oils. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance* 8(3): 190–194, doi: 10.1080/19393210.2015.1041065.
- Takino M, Daishima S, Yamaguchi K, Nakahara T (2001) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using silver nitrate as a post-column reagent. *Journal of Chromatography A* 928(1): 53–61, doi: 10.1016/S0021-9673(01)01127-X
- Thompson M, Ellison SLR, Wood R. (2002) Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*. 74(5): 835–855.
- Tichý M, Valigurová R, Čabala R, Uzlová R, Rucki M (2010) Toxicity of perfluorinated carboxylic acids for aquatic organisms. *Interdisciplinary Toxicology* 3(2): 73–75, doi: 10.2478/v10102-010-0014-2.
- Trier X, Granby K, Christensen JH (2011) Polyfluorinated surfactants (PFS) in paper and board coatings for food packaging. *Environmental Science and Pollution Research* 18(7): 1108–1120, doi: 10.1007/s11356-010-0439-3.
- Turtygin AV, Deineka VI, Deineka LA (2013) Determination of the triglyceride composition of pomegranate seed oil by reversed-phase HPLC and spectrophotometry. *Journal of Analytical Chemistry* 68(6): 558–563, doi: 10.1134/s1061934813060142.
- Uematsu Y, Suzuki K, Ogimoto M (2016) Determination of the aromatic hydrocarbon to total hydrocarbon ratio of mineral oil in commercial lubricants. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 33(3): 509–517, doi: 10.1080/19440049.2015.1136434.
- Vaclavikova M, Paseiro-Cerrato R, Vaclavik L, Noonan GO, DeVries J, Begley TH (2016) Target and non-target analysis of migrants from PVC-coated cans using UHPLC-Q-Orbitrap MS: evaluation of long-term migration testing. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 33(2): 352–363, doi: 10.1080/19440049.2015.1128564.
- Viñas P, Campillo N, Martínez-Castillo N, Hernández-Córdoba M (2010) Comparison of two derivatization-based methods for solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometric determination of bisphenol A, bisphenol S and biphenol migrated from food cans. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397(1): 115–125, doi: 10.1007/s00216-010-3464-7.
- Vollmer A, Biedermann M, Grundböck F, Ingenhoff JE, Biedermann-Brem S, Altkofer W, Grob K (2011) Migration of mineral oil from printed paperboard into dry foods: survey of the German market. *European Food Research and Technology* 232(1): 175–182.
- Wang J, Jia L, Wei W, Lang S, Shao P, Fan X (2016) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oil by gel permeation chromatography and ultra-high performance liquid chromatography coupled with diode array detector and fluorescence detector. *Acta Chromatographica* 28 (3): 415–427, doi: 10.1556/1326.2016.28.3.11.
- Wang JH, Guo C (2010) Ultrasonication extraction and gel permeation chromatography clean-up for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oil by an isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217(28): 4732–4737, doi: 10.1016/j.chroma.2010.05.008.
- Xie Q, Liu S, Fan Y, Sun J, Zhang X (2014) Determination of phthalate esters in edible oils by use of QuEChERS coupled with ionic-liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction before high-performance liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406(18): 4563–4569, doi: 10.1007/s00216-014-7814-8.
- Xu D, Deng X, Fang E, Zheng X, Zhou Y, Lin L, Chen L, Wu M, Huang Z (2014) Determination of 23 phthalic acid esters in food by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1324: 49–56, doi: 10.1016/j.chroma.2013.11.017.
- Xu T, Tang H, Chen D, Dong H, Li L (2015) Simultaneous determination of 24 polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oil by tandem solid-phase extraction and gas chromatography coupled/tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International* 98(2): 529–537, doi: 10.5740/jaoacint.14-075.
- Yan H, Cheng X, Liu B (2011) Simultaneous determination of six phthalate esters in bottled milks using ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 879(25): 2507–2512, doi: 10.1016/j.jchromb.2011.07.001.

- Yang L, Jin F, Zhang P, Zhang Y, Wang J, Shao H, Jin M, Wang S, Zheng L, Wang J (2015) Simultaneous Determination of Perfluorinated Compounds in Edible Oil by Gel-Permeation Chromatography Combined with Dispersive Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(38): 8364–8371, doi: 10.1021/acs.jafc.5b03903.
- Zabaleta I, Bizkarguenaga E, Bilbao D, Etxebarria N, Prieto A, Zuloaga O (2016) Fast and simple determination of perfluorinated compounds and their potential precursors in different packaging materials. *Talanta* 152: 353–363, doi: 10.1016/j.talanta.2016.02.022.
- Zhang Y, Zhou H, Zhang ZH, Wu XL, Chen WG, Zhu Y, Fang CF, Zhao YG (2017) Three-dimensional ionic liquid functionalized magnetic graphene oxide nanocomposite for the magnetic dispersive solid phase extraction of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils. *Journal of Chromatography A* 1489: 29–38, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.02.010>.
- Zou Y, Lin S, Chen S, Zhang H (2012) Determination of bisphenol A diglycidyl ether, novolac glycidyl ether and their derivatives migrated from can coatings into foodstuff by UPLC-MS/MS. *European Food Research and Technology* 235(2): 231–244, doi: 10.1007/s00217-012-1734-7.

# PŘÍLOHY

## **Studie 1:**

Vavrouš A, Sosnovcová J, Kejlová K, Vápenka L, Jírová D, Vrbík K (2016)  
Method for analysis of 68 organic contaminants in food contact paper using gas and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry  
Food Control 60: 221–229, doi: 10.1016/j.foodcont.2015.07.043.

## **Studie 2:**

Vápenka L, Vavrouš A, Votavová L, Kejlová K, Dobiáš J, Sosnovcová J (2016)  
Contaminants in the paper-based food packaging materials used in the Czech Republic  
Journal of Food and Nutrition Research 55(4): 361–373,  
url: <http://www.vup.sk/en/download.php?bullID=1914> (1.4.2020).

## **Studie 3:**

Vavrouš A, Pavloušková J, Ševčík V, Vrbík K, Čabala R (2016)  
Solution for blank and matrix difficulties encountered during phthalate analysis of edible oils by high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry  
Journal of Chromatography A 1456: 196–204, doi: 10.1016/j.chroma.2016.06.014.

## **Studie 4:**

Vavrouš A, Ševčík V, Dvořáková M, Čabala R, Moulisová A, Vrbík K (2019)  
Easy and inexpensive method for multiclass analysis of 41 food contact-related contaminants in fatty food by liquid chromatography-tandem mass spectrometry  
Journal of Agricultural and Food Chemistry 67: 10968–10976,  
doi: 10.1021/acs.jafc.9b02544.