

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Nežádoucí látky v kořeni a jejich analýza

Tereza Frenclová

Bakalářská práce

2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Tereza Frenclová**
Osobní číslo: **C16175**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Nežádoucí látky v kořeni a jejich analýza**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. V odborné literatuře vyhledejte, jaké nežádoucí látky či skupiny látek se nejčastěji vyskytují v kořeni. Snažte se vyhledat a popsat co nejširší škálu kořeni z celého světa.
2. Následně se věnujte charakteristice těchto skupin a popište nejvýznamnější zástupce.
3. Nakonec se zabývejte analýzou těchto skupin látek. Popište, jakými analytickými metodami je možné tyto kontaminanty kořeni stanovit. Uveďte i konkrétní výsledky zajímavých studií.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Blanka Švecová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

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

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 28. 6. 2019

.....

Tereza Frenclová

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí práce paní Ing. Blance Švecové Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a podporu při psaní bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za dlouhodobou podporu a trpělivost při studování na vysoké škole.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá přítomností nežádoucích látek v koření a možnostmi jejich analýzy. Konkrétně je pozornost zaměřena na kontaminanty koření jako mykotoxiny, rezidua pesticidů, těžké kovy, přídatná syntetická barviva, cizí složky a jiné nečistoty. Jednotlivé kapitoly se zabývají charakteristikou dané skupiny kontaminantů, dále jsou shrnuty možnosti jejich analýzy a v poslední řadě je pro každou skupinu kontaminantů uvedeno několik konkrétních studií.

KLÍČOVÁ SLOVA

Koření, kontaminanty, mykotoxiny, rezidua pesticidů, těžké kovy, barviva

TITLE

Undesirable substances in spice and their analysis

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with the presence of undesirable substances in spices and the possibilities of their analysis. Specifically, attention is focused on contaminants of spices such as mycotoxins, pesticide residues, heavy metals, accessory synthetic dyes, foreign components and other impurities. The individual chapters deal with the characteristics of the given group of contaminants, the possibilities of their analysis are summarized, and several specific studies for each group of contaminants are listed.

KEYWORDS

Spice, contaminants, mycotoxins, pesticide residues, heavy metals, dyes

Obsah

Úvod	8
1 Mykotoxiny v kořeni	9
1.1 Charakteristika mykotoxinů	9
1.1.1 Aflatoxiny	10
1.2 Analýza mykotoxinů	11
1.2.1 Vybrané konkrétní příklady analýz mykotoxinů v kořeni	12
2 Pesticidy a jejich rezidua	18
2.1 Charakteristika pesticidů	18
2.2 Analýza reziduí pesticidů	19
2.2.1 Vybrané konkrétní příklady analýz reziduí pesticidů v kořeni	21
3 Těžké kovy	25
3.1 Charakteristika těžkých kovů	25
3.2 Analýza těžkých kovů	26
3.2.1 Vybrané konkrétní příklady analýz těžkých kovů v kořeni	27
4 Barviva	32
4.1 Charakteristika barviv	32
4.2 Analýza barviv	33
4.2.1 Vybrané konkrétní příklady analýz syntetických barviv v kořeni	35
5 Ostatní cizí složky v kořeni	39
Závěr	42
Zdroje	44

Úvod

Koření je využíváno už od starověkých dob. Je používáno především v kulinářství. Koření, jako přírodní potravinářská přídatná látka, slouží jako ochucovadlo nebo i jako barvivo. Kvalitu koření můžeme poznat podle jeho chuti, barvy nebo vůně. Ačkoliv jsou tyto látky přítomné v malém množství, patří mezi nejvšestrannější a široce používané složky k přípravě a zpracování potravin.

Některé druhy koření jsou používány i pro konzervační nebo insekticidní účely (nové koření, hřebíček, kmín, fenykl atd.), či dokonce jako léčiva. Koření neobsahuje žádné živiny, ale bylo prokázáno, že má antimikrobiální, protizánětlivé, antirevmatické, hepatoprotektivní, nefroprotektivní, gastroprotektivní, antimutagenní, protinádorové účinky a některé snižují hladinu cholesterolu v krvi. Koření může mít různé formy. Může se vyskytovat ve formě aromatických semínek, kořenů, pupenů, kůry, oddenků, lusků, květů nebo bobulí. [1]

Koření musí projít určitými procesy, než se dostane do rukou spotřebitele a během těchto kroků je koření vystaveno riziku kontaminace. Pěstování, metody sklizně, posklizňová ošetření a skladování – všechny tyto procesy mají své podmínky a měly by být pravidelně kontrolovány kvůli prevenci riziku znečištění koření. S rostoucí spotřebou roste i důraz na bezpečnost a kontrolu kvality. Světová zdravotnická organizace vynesla obavy o kontaminaci životního prostředí, což vede ke kontaminaci koření a jiných rostlinných či živočišných produktů, a obavy o falšování komerčního koření, protože dnes se vyskytuje čím dál více záměrně padělaných koření. [2]

Mezi nejčastější kontaminanty koření patří mykotoxiny, rezidua pesticidů a těžkých kovů, přídatné znehodnocující látky (azobarviva a jiná syntetická barviva), popel, materiály cizích rostlin atd. Tyto nežádoucí látky mohou mít následky na lidské zdraví – způsobují jak akutní, tak i chronické potíže. Všechny tyto kontaminanty mohou být analyzovány pomocí moderních instrumentálních technik. V tomto odvětví dochází k neustálému rozvoji, který vede ke zvýšení citlivosti a selektivity stanovení, a umožňuje tak spolehlivé analýzy stopových množství kontaminantů.

1 Mykotoxiny v koření

1.1 Charakteristika mykotoxinů

Koření se pěstuje nejčastěji v tropických a subtropických pásech. Během produkce je koření vystavováno obrovskému riziku kontaminace mykotoxiny, které jsou produkovány plísněmi. Nejčastější patogeny obsažené v koření jsou plísně rodů *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*. Tyto plísně produkují mykotoxiny, které jsou vysoce toxické. Mezi nejčastější mykotoxiny patří aflatoxiny, ochratoxin A, fumonisiny a patulin. Mykotoxiny mají hepatotoxické, teratogenní a mutagenní účinky na lidské zdraví. Způsobují hepatitidy, krvácení, poruchy ledvin a jater nebo imunosupresi, což je stav snížené imunity, kdy organismus není zcela schopen odpovídat na antigenní podněty (tvorbu protilátek). Ve vážných případech mohou způsobit až rakovinu jater nebo ledvin. Kontaminace koření mykotoxiny může způsobit mnoho nemocí nebo úmrtí u lidí i zvířat, i když je konzumováno v malém množství. [2-5]

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity plísní. Plísně jsou schopné produkovat různé enzymy a díky tomu jsou schopné se adaptovat v nejrůznějších podmínkách. Mykotoxiny jsou sloučeniny nebílkovinné povahy s nízkou molekulovou hmotností (cca 700 g/mol). Jsou to komplexní organické sloučeniny, které se liší strukturou. Je odhadováno, že existuje asi 450 mykotoxinů. Z toho je známo 20 druhů, které způsobují zdravotní problémy. [6]

Mykotoxiny je možné rozdělit podle různých kritérií. Mohou se dělit podle toxických účinků na cílové orgány, podle způsobu biosyntézy (z aminokyselin, izoprenoidů či polyketidů), podle míry toxicity (silně toxické, středně toxické a slabě toxické) nebo podle účinku na buněčné úrovni. Nejčastější dělení je podle toxických účinků. Dělí se na hepatotoxiny (aflatoxiny), nefrotoxiny (citrinin, ochratoxin A), neurotoxiny (fumonisiny), imunotoxiny (patulin, ochratoxin A, aflatoxiny), genotoxiny (patulin, aflatoxiny, zearalenon, trichotheceny atd.). [6,7]

Každá skupina mykotoxinů je produkována v různých krocích procesů ve zpracování koření, proto jsou třeba důkladné kontroly. Aflatoxiny a ochratoxin A jsou nejčastěji produkovány při samostatném zpracování nebo při uskladnění. V polních podmínkách před sklizní je nejčastěji produkován zearalenon. Aflatoxin B₁ a ochratoxin A jsou nejtoxičtější sloučeniny, které byly nalezeny především v muškátovém oříšku, paprice a kurkumě. Mykotoxiny jsou obsaženy nejenom v koření, ale také v bylinách, obilninách,

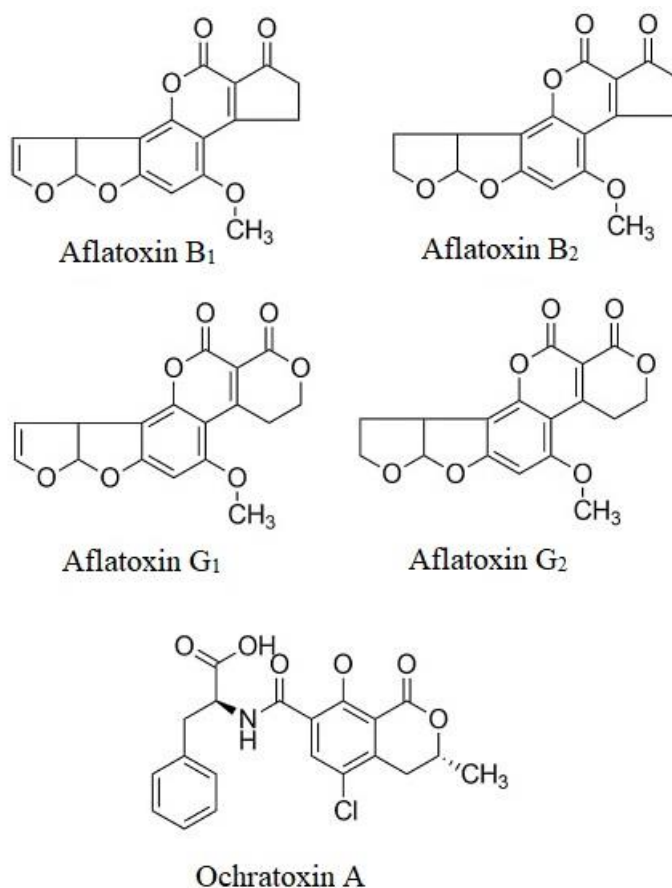
v sušeném ovoci, v jablečných produktech nebo ve víně či kávě. Kontaminace těmito látkami je jednou z nejzávažnějších výzev pro potravinářskou bezpečnost, o čemž svědčí neustálá mezinárodní pozornost a kontroly, vzhledem k jejich škodlivému dopadu na lidské zdraví a hospodářství. [2,8,9]

Ochratoxiny jsou produkovány především plísněmi *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus* ze sekce *Circumdati* (zde se řadí až 27 druhů) a *Aspergillus nigri*. Ochratoxin A je nejtoxičtější z ochratoxinů a podle IARC (International Agency of Research on Cancer) je klasifikovaný jako pravděpodobný karcinogen, který se řadí do skupiny 2B. Podle nařízení Evropské unie č. 594/2012 je maximální tolerovaná koncentrace ochratoxinu A v koření 15 µg/kg. Toto nařízení platí pro mletou papriku, chilli, černý a bílý pepř, muškátový oříšek, zázvor, kurkumu a směsi koření. [4,8,10,11]

1.1.1 Aflatoxiny

Název aflatoxiny je odvozen od plísně, která je produkuje, a to *Aspergillus flavus* – *Aspergillus flavus* **toxins**. *Aspergillus flavus* produkuje pouze aflatoxiny B, kdežto *Aspergillus parasiticus* a *nomius* produkuje aflatoxiny B i G. Na obrázku č. 1 jsou chemické vzorce vybraných aflatoxinů a ochratoxin A. Dosud bylo identifikováno 20 různých typů aflatoxinů. V přírodě se volně vyskytují pouze 4 typy, které jsou i hlavní aflatoxiny – aflatoxin B₁, B₂, G₁ a G₂. Aflatoxiny, jako aromatické sloučeniny vykazující intenzivní fluorescenci. Aflatoxiny se vyskytují především v tropických a subtropických oblastech, kde je optimální vlhkost a teplota pro produkci toxinů. [6,10]

Aflatoxiny způsobují poškození jater a v extrémních případech může dojít i k jejich selhání. Při chronickém vystavení aflatoxinům dochází k cirhóze jater nebo k výskytu karcinomu. Aflatoxin B₁ je nejvíce hepatotoxický aflatoxin u savců a je řazen do první skupiny karcinogenů podle IARC. Nařízení Evropské unie č. 1881/2006 udává maximální obsahy některých kontaminujících látek v potravinách včetně vybraných mykotoxinů. Maximální obsah aflatoxinů B₁ ve vybraném koření (celé nebo mleté chilli, černý a bílý pepř, mleté formy paprik, muškátový oříšek, zázvor a kurkuma) je 5 µg/kg. Celkový obsah aflatoxinů (suma aflatoxinu B₁, B₂, G₁ a G₂) v tomto koření nesmí přesáhnout 10 µg/kg. Nařízení Evropské unie č. 165/2010 upravuje maximální limity aflatoxinů v potravinách. [4,12,13]



Obrázek 1 - Chemické vzorce hlavních aflatoxinů a ochratoxinu A [2]

1.2 Analýza mykotoxinů

Analýza mykotoxinů je náročná z důvodu velmi nízkých koncentrací těchto kontaminantů v komplexních maticích. Současné analytické techniky pro kvalitativní stanovení aflatoxinů a ochratoxinu A v kořeni představuje tenkovrstvá chromatografie nebo imunoafinitní chromatografie. Kvantitativní analýzy mykotoxinů se provádí za pomoci imunoenzymové analýzy (ELISA), plynové chromatografie (GC), vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) nebo ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC). Mezi nejčastější způsoby detekce po separaci látek pomocí kapalinové chromatografie patří fluorescenční a hmotnostní spektrometrie. [2,14,15]

Analýza extraktů mykotoxinů může být provedena pomocí kapalinové chromatografie s elektrosprejovým ionizačním tandemovým hmotnostním spektrometrem (LC-ESI-MS/MS) nebo hmotnostním spektrometrem s maticí asistovanou laserovou desorcí s analyzátozem doby letu (LC-MALDI-TOF). Elektrosprejový ionizační zdroj patří mezi měkké ionizační techniky, při které je ionizované molekule dodán malý energetický přebytek a fragmentuje makromolekuly na menší nabitě částice. Z tohoto důvodu je tato měkká ionizační

technika vhodná zejména pro stanovení molekul s velkou hmotností, jako např. peptidů, proteinů a jiných biologických makromolekul. Při iontovém zdroji MALDI musí být vzorek smíchán s velkým množstvím matrice. Tato matrice absorbuje UV světlo, které dodává přítomný dusíkatý laser při vlnové délce 337 nm a předává tak tepelnou energii. Malá část této matrice se rychle zahřeje a odpařuje se spolu se vzorkem, který je dále detekován průletovým analyzátozem (TOF). K rozdělení iontů dochází na základě jejich odlišné doby letu z iontového zdroje do detektoru. Metoda MALDI-TOF je vysoce citlivá a lze ji použít nejen pro analýzu stopových množství mykotoxinů, ale i peptidů, pesticidů, proteinů a jiných biomolekul. [16-20]

Extrakci mykotoxinů z matrice vzorku lze provést pomocí imunoafinitních kolonek, extrakce rozpouštědlem nebo extrakce na tuhou fázi (SPE). Jedna z novějších metod pro extrakci mykotoxinů je metoda QuEChERS. Název znamená zkratku pro **Q**uick (rychlou), **E**asy (snadnou), **C**heap (levnou), **E**ffective (efektivní), **R**ugged (robustní) and **S**afe (bezpečnou) metodu. Tato metoda byla vyvinuta vědci z USA v roce 2003 pro analýzu veterinárních léčiv v živočišných tkáních. Metoda QuEChERS měla velký potenciál při extrakci polárních sloučenin a to vedlo k úspěchu pro extrakci reziduí pesticidů v rostlinných materiálech. V posledních letech pracovalo s metodou QuEChERS mnoho výzkumných skupin a byl velmi rozšířen rozsah použitelnosti této extrakční metody – například pro extrakci přírodních kontaminantů, antibiotik, akrylamidů nebo právě mykotoxinů. Tato metoda byla vyvinuta s cílem nahradit extrakční metody, které jsou náročné na vybavení a finančně náročné. Stačí malé množství vzorku (10–15 g) a rozpouštědla (10–15 ml), a odstraňuje sacharidy, organické kyseliny, lipidy, steroly, barviva, proteiny a vodu. Nejčastěji používané sorbenty pro čištění jsou na bázi PSA (primární sekundární amin), C18 (oktadecylsilikagel) a GCB (grafitizované saze). Obecně poskytuje dobré výsledky. [1,14,21,22]

1.2.1 Vybrané konkrétní příklady analýz mykotoxinů v koření

1.2.1.1 Analýza mleté papriky, chilli, kmínu, fenyklu a anýzu

V letech 2010 a 2013 byly provedeny analýzy na výskyt aflatoxinů, ochratoxinu A a zearalenononu v mleté paprice a chilli, které byly volně prodejně v katalánských a pekingských obchodech [5,8]. V katalánských obchodech bylo pořízeno 64 vzorků mleté papriky a 35 vzorků mletého chilli, a z Číny bylo k dispozici 10 vzorků anýzu, kmínu a fenyklu. Mykotoxiny byly v tomto případě analyzovány pomocí HPLC s fluorescenční

detekcí. Jako stacionární fáze byl použit oktadecylsilikagel (C18). Pro každý typ mykotoxinu byla využita jiná mobilní fáze a také jiné vlnové délky excitačního a emisního záření.

Jeden z nejdůležitějších kroků, předcházející vlastnímu stanovení je extrakce a čištění extraktů. Vzorky koření byly smíchány s desetinou množství chloridu sodného a směs byla extrahována roztokem metanol – voda v poměru 8:2. Jako mobilní fáze pro chromatografickou analýzu aflatoxinů v katalánském koření byla použita směs voda – acetonitril – metanol v poměru 12:5:3. Jako mobilní fáze pro analýzu čínského koření byla využita směs metanolu a 0,5% roztoku kyseliny octové. Na fluorescenčním detektoru byly nastaveny vlnové délky pro aflatoxiny 360 nm excitační záření a 440 nm emisní záření.

Pro extrakci ochratoxinu A ze vzorků papriky a chilli byl použit 1% roztok hydrogenuhličitanu sodného. Po 20 minutovém třepání se roztok zfiltraval a do výluhu byl následně přidán PBS s 0,1% Tweenem 20. Směs acetonitrilu, vody a kyseliny octové byla použita jako mobilní fáze. Vzorky koření pro stanovení zearalenonu byly smíchány se 75% metanolem a po míchání a filtraci byl přidán roztok PBS s 0,01% Tweenem 20. Roztok byl upraven na pH 7,4. Jako mobilní fáze pro analýzu zearalenonu byl použit roztok metanol-voda v poměru 3:2. Vlnové délky detekce byly pro ochratoxin A $\lambda_{ex} = 333$ nm a $\lambda_{em} = 460$ nm, a pro zearalenon $\lambda_{ex} = 270$ nm a $\lambda_{em} = 455$ nm.

Ve výsledku všechny katalánské vzorky obsahovaly širokou škálu mykotoxinů. Z 64 vzorků mleté papriky bylo kontaminováno 59 % aflatoxiny, 39 % zearalenonem a 98 % ochratoxinem A. Z 35 vzorků chilli bylo kontaminováno 40 % aflatoxiny, 46 % zearalenonem a všech 35 vzorků bylo kontaminováno ochratoxinem A. Významně vyšší koncentrace aflatoxinů obsahovaly vzorky paprik v porovnání s chilli. Chilli obsahuje rostlinný alkaloid kapsaicin, který dodává pálivou chuť. Kapsaicin může inhibovat produkci aflatoxinů, proto chilli neobsahovalo velké koncentrace aflatoxinů. Všechny vzorky obsahovaly méně než 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ celkových aflatoxinů a méně než 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aflatoxinu B₁. Dle nařízení EU tato koření splňovala dané limity. V roce 2010 bylo podle nařízení EU maximální povolené množství ochratoxinu A 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Dnes je tato hodnota stanovena na 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pro tento mykotoxin. Ve 37 % vzorcích papriky a 44 % vzorcích chilli bylo větší množství ochratoxinu A než je povoleno. Po porovnání s dnes platným nařízením jsou opět tato analyzovaná koření v normě. Mykotoxin zearalenon byl obsažen nad 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ve 3 % vzorcích papriky a 9 % vzorcích chilli. Maximální obsah 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ zearalenonu je nařízen EU v nezpracovaných obilninách. Nejvyšší obsah zearalenonu byl stanoven ve vzorku papriky, kde ho bylo 131 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Při analýze čínského koření byla zaměřena pozornost na detekci aflatoxinů B₁, B₂, G₁, G₂ a ochratoxin A. Tři koření z deseti obsahovala jeden z pěti sledovaných mykotoxinů. Aflatoxin B₁ byl detekován v jednom analyzovaném koření, aflatoxin G₂ byl detekován v anýzu a fenyklu, kde byl v obou případech analyzován i ochratoxin A. Aflatoxiny B₂ a G₁ nebyly v žádném koření detekovány.

1.2.1.2 Analýza chilli

Pálivé chilli pochází se sušených chilli papriček. Pikantní chuť chilli přitahuje velkou řadu spotřebitelů po celém světě. Indie, Čína a Pákistán jsou hlavní tři země, kde se pěstuje chilli. Vysoká teplota, časté srážky a relativní vlhkost v těchto oblastech vysoce přispívá k proliferaci hub a produkci mykotoxinů. Chilli je navíc vysoce hygroskopické, což ho činí citlivým na kontaminaci mykotoxiny. Analýza chilli (mleté, celé papričky a kousky chilli) se prováděla v roce 2014 v Belgii [9]. Vzorky byly pořízeny v obchodech na Srí Lance (86 vzorků) a v Belgii (35 vzorků). Použita byla vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

Jako hlavní mykotoxin převažoval aflatoxin B₁, který kontaminoval téměř 77 % vzorků ze Srí Lanky. Až 67 % vzorků přesáhlo maximální limit, stanoven Evropskou unií pro aflatoxin B₁ (5 µg/kg). Druhý nejčastější mykotoxin byl aflatoxin B₂. Ale jeho podíl s aflatoxiny G₁ a G₂ na celkovém obsahu aflatoxinů byl velmi malý v porovnání s aflatoxinem B₁. Ochratoxin A byl v tomto chilli další nejčastější mykotoxin po aflatoxinech. Téměř 41 % vzorků bylo kontaminováno ochratoxinem A. Při této analýze byly sledovány i jiné mykotoxiny, jako fumonisin B₂, citrinin a sterigmatocystin. Fumonisin B₂ obsahovalo 15 % vzorků, 8 % vzorků bylo kontaminováno citrininem a 38 % chilli obsahovalo sterigmatocystin. Celkově bylo kontaminováno 87% vzorků ze Srí Lanky alespoň jedním mykotoxinem.

Až 63 % vzorků chilli zakoupených v Belgii bylo kontaminovaných alespoň jedním mykotoxinem. U 44 % vzorků byl překročen maximální povolený limit celkových aflatoxinů nařízený EU (10 µg/kg). Devět belgických vzorků z jedenácti pozitivních přesahovalo nařízený maximální limit Evropskou unií pro aflatoxin B₁. Tyto vzorky chilli byly libanonského a thajského původu. Ochratoxin A byl nalezen asi u poloviny vzorků chilli, ale jeho koncentrace nepřesahovaly normy EU.

1.2.1.3 Analýza pepře a chilli papriček

Na istanbulské univerzitě byla provedena studie [23], která stanovovala aflatoxiny pomocí technik ELISA a HPLC. ELISA je analytická metoda, která kvantifikuje různé antigeny a je

založena na specifické interakci antigenu a protilátky. Na istanbulských trzích bylo pořízeno celkem 84 vzorků černého a červeného pepře i chilli papriček. Černý pepř je jedním z nejpoužívanějších koření na světě, který je známý svou štiplavou a pronikající složkou piperin. Piperin je alkaloid a bioaktivní sloučenina, o které se uvádí, že má antikarcinogenní, antiastmatické, protizánětlivé a protivirové účinky. Zkoumané koření bylo extrahováno do 70% metanolu, následně byl extrakt zfiltrován a naředěn vodou a Tweenem 20. S takto připraveným extraktem bylo provedeno stanovení aflatoxinů pomocí metody ELISA, a pro kontrolu a porovnání obsahů aflatoxinů byla provedena srovnávací analýza pomocí HPLC s fluorescenční detekcí. Před extrakcí byl přidán ke vzorkům chlorid sodný a extrahovalo se roztokem metanol voda v poměru 8:2. Po míchání a filtraci byl extrakt naředěn PBS pufrům a analyzován. Byla využita imunoafinitní kolona se stacionární fází C18 a mobilní fáze byla směs acetonitrilu s metanolem a vodou v poměru 17:54:29. Vlnová délka pro excitaci byla nastavena na 333 nm a vlnová délka pro emisi byla nastavena na 460 nm.

Z 84 vzorků bylo celkem 36 vzorků kontaminováno aflatoxiny v rozmezí 0,3 – 46,8 µg/kg. Normy pro maximální obsahy celkových aflatoxinů překročilo 9 vzorků chilli papriček, 3 vzorky červeného pepře a 2 vzorky černého pepře. Maximální povolený limit pro aflatoxin B₁ podle norem EU překročilo 8 vzorků chilli papriček a 3 vzorky červeného pepře. Statistické porovnání výsledků metod ELISA a HPLC ukázalo dobrou korelaci mezi oběma metodami. Techniku ELISA, díky její jednoduchosti, rychlosti, spolehlivosti a nízkým nákladům, lze použít při rutinních analýzách pro kontaminaci koření aflatoxiny a jinými mykotoxiny.

1.2.1.4 Analýza koření z libanonských obchodů

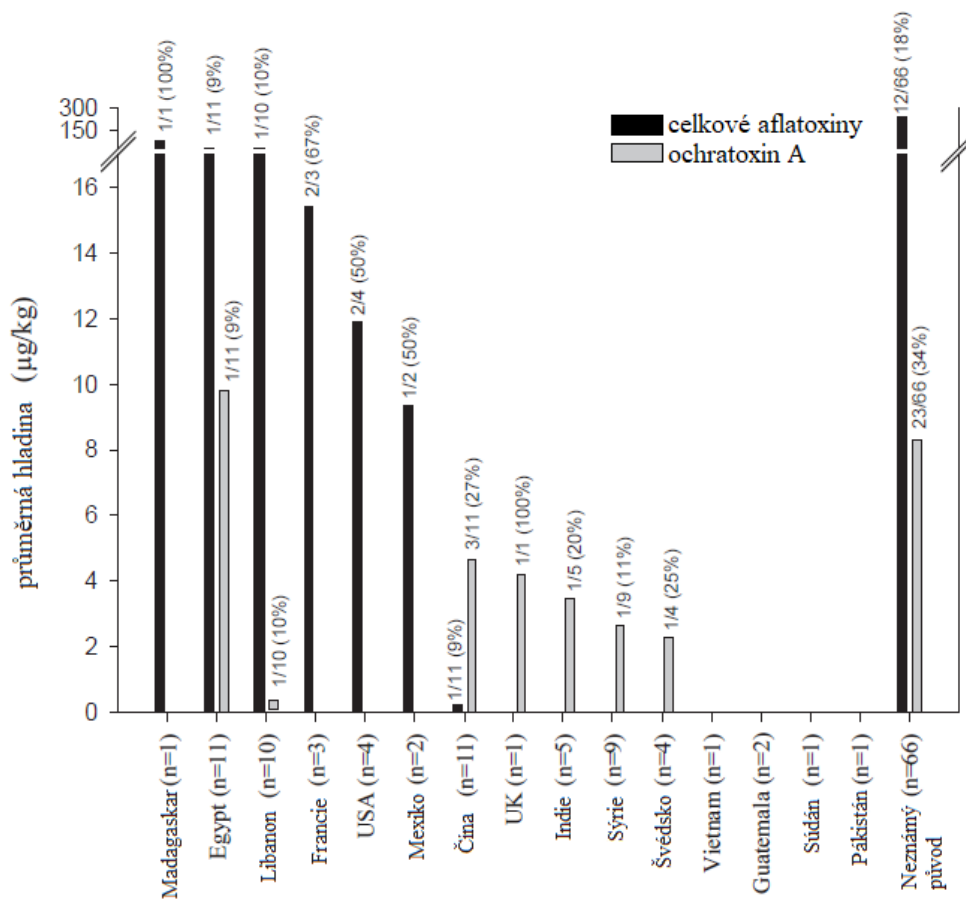
V roce 2018 byla provedena analýza [4], která byla zaměřena na koření, které byla pořízena v libanonských obchodech. Analyzovaly se mykotoxiny různých druhů. K dispozici bylo 94 vzorků samostatných koření – černý a bílý pepř, chilli, mletá paprika, skořice, česnekový prášek, zázvor, kmín, anýz atd. Další 38 vzorků byly různé směsi koření – koření na hamburgery, steakové koření, koření na kuře a jiné. Analýza byla provedena pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí. V tomto rozboru se nezaměřili pouze na aflatoxiny a ochratoxin A, ale byly sledovány i jiné mykotoxiny, jako fumonisiny B₁, B₂, zearalenon, mykotoxin T-2 a HT-2, nivalenol nebo deoxynivalenol.

Sledované mykotoxiny byly nejprve extrahovány do vody a po deseti minutové centrifugaci bylo odebráno 17,5 ml vodného extraktu A. Zbylá směs se extrahovala do 70%

metanolu stejným způsobem a výsledný extrakt metanol-voda (B) byl smíchán s vodným extraktem A. Tato směs byla přefiltrována a následně byla provedena analýza pomocí HPLC-MS/MS. Při této analýze byla použita fenylová stacionární fáze. Teplota na koloně byla nastavena na 40 °C a rychlost průtoku mobilní fáze byla 250 µl/min.

Z 94 vzorků koření bylo 16 kontaminovaných aflatoxinem B₁ a z toho 13 vzorků přesahovalo maximální povolený obsah 5 µg/kg. Obsah 10 µg/kg celkových aflatoxinů přesáhlo 14 vzorků a u třech vzorků přesahoval ochratoxin A hodnotu 15 µg/kg. Vzorky byly původem z různých zemí – 11 vzorků pocházelo z Číny, 10 vzorků koření pocházelo z Libanonu a dalších 11 vzorků pocházelo z Egypta. Některá koření byla vyráběna a balena v systému HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points = Systém analýzy rizika a stanovení kritických kontrolních bodů). To se ukázalo mít zásadní vliv na obsah mykotoxinů. Koření vyrobené v továrnách provádějící tyto kontroly, většinou splnilo evropské limity pro obsahy aflatoxinů a ochratoxinu A. Bez postupů HACCP byly průměrně hladiny aflatoxinu B₁ a celkových aflatoxinů až 10krát vyšší než koření kontrolované s těmito postupy.

Graf na obrázku č. 2 znázorňuje průměrné hladiny celkových aflatoxinů a ochratoxinu A s procentuálním podílem pozitivního koření (i byliny) ve vztahu k jejich zemi původu. 67 vzorků pocházelo z 15 uvedených zemí, zatímco původ 66 vzorků nebyl znám. Nejvíce kontaminované byly vzorky koření z Madagaskaru, Egypta, Libanonu, Francie, Spojených států amerických nebo Mexika.



Obrázek 2 - Průměrná hladina aflatoxinů a ochratoxinu A v kořeni z různých zemí původu [4]

2 Pesticidy a jejich rezidua

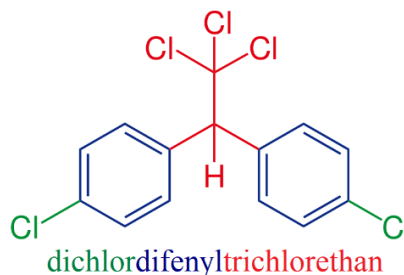
2.1 Charakteristika pesticidů

Pesticidy jsou důležité látky v komerčním zemědělství pro ochranu rostlin proti škůdcům (hmyz, roztoči), plevelům nebo k udržení výnosu plodin a minimalizaci jejich ztrát. Škůdci a plevele mají vliv na růst a kvalitu rostlin. Po použití zůstávají rezidua pesticidů v půdě a rostlinách. Rezidua pesticidů, které se shromažďují v rostlinách, mohou mít potenciální toxické účinky na lidské zdraví. Rozptyl a doba udržení pesticidů v rostlinách závisí na vlastnostech rostliny. Mnoho výzkumů se zabývá návrhem alternativních přístupů v zemědělství s cílem minimalizovat používání chemických pesticidů. Program IPM, zkratka pro integrovanou ochranu rostlin, podporuje snížení používání chemických pesticidů v zemědělství a zajišťuje tak bezpečnější plodiny bez kontaminantů a zachování životního prostředí. [2,24]

Rezidua pesticidů byla zjištěna nejenom v kořeni, ale i v obilninách, mořských plodech nebo čajích. Velké množství těchto kontaminantů je hlavně v ovoci a zelenině. Pesticidy lze dělit podle různých kritérií. Nejčastější dělení je podle cílového působení pesticidů – insekticidy, herbicidy, fungicidy, baktericidy a jiné. Druhé nejčastější dělení je podle chemické struktury – organochlorové pesticidy, organofosfáty, karbamáty, pyrethroidy nebo neonikotinoidy. [24,25]

Ve třicátých letech 20. století započala éra syntetických organických pesticidů. Patřily mezi ně především organofosfáty a organochlorové pesticidy. Nejznámější organochlorový pesticid je aromatická halogensloučenina DDT (dichlordifenyltrichlorethan). Strukturální vzorec DDT je znázorněn na obrázku č. 3. DDT je velmi stabilní látka a jedná se o pravděpodobný karcinogen. Kumuluje se v tukové tkáni, poškozuje játra, reprodukční systém a způsobuje dočasné poškození nervového systému. Po druhé světové válce byla tato látka klíčová v zemědělství proti hmyzu. Již v 60. letech byly nalezeny v ekosystému vysoké hladiny DDT a jiných organochlorových látek. V 70. letech byla analyzována první rezidua pesticidů v kořeni. Vazba chlóru s uhlíkem v organochlorových sloučeninách znesnadňuje biologickou degradaci a jsou perzistentní v půdě. To vedlo k postupnému omezování až k úplným zákazům používání organochlorových pesticidů. V roce 2004 vstoupila v platnost Stockholmská úmluva o perzistentních organických polutantech. Jedná se o mezinárodní dohodu, která celosvětově zakazuje všechny organochlorové pesticidy. I přes tuto úmluvu je dnes DDT používán

jako látka hubící komáry přenášející malárii v afrických i asijských zemí. Mezi další zakázané zástupce organochlorových pesticidů patří toxafen, mirex, endrin nebo chlordan. [2,25]



Obrázek 3 - Strukturní vzorec organochlorového pesticidu DDT [26]

Přítomnost reziduí pesticidů v kořeni i jiných potravinách, je důležitý faktor na lidské zdraví. To vedlo Evropskou unii k nařízení, které stanovuje maximální povolené limity reziduí pesticidů v potravinách. V roce 2005 vydala Evropská unie nařízení č. 396/2005, které pojednává o maximálních povolených koncentracích reziduí pesticidů v potravinách a krmivech rostlinného nebo živočišného původu. Nařízení č. 149/2008 rozděluje kořeni do podskupin na základě části rostlin, ze kterých jsou získány (semena, plody a bobule, kůra, kořeny a oddenky, pupeny a blizny). Maximální tolerované limity reziduí pesticidů (MRL) se pohybují od 0,01 mg/kg až do 400 mg/kg. Tyto hodnoty jsou stanovené pouze pro čerstvá kořeni, nikoli pro zpracované nebo sušené produkty, na kterých se provádí pravidelné kontroly. Doposud nebylo kořeni zařazeno do EU programu koordinovaného monitorování, tím pádem údaje o nejčastěji se vyskytujících pesticidech a údaje o procentech vzorků s rezidui přesahující limity jsou poměrně vzácné. Mezi nejčastěji se vyskytující pesticidy, které jsou monitorovány, patří bifenthrin, DDT, cypermethrin, endosulfan, chlorpyrifos, triazophos, karbendazim, dimethoát, propamocarb, trifluralin nebo tefluthrin. Pesticidy DDT a triazophos jsou na evropském trhu zakázány. [1,2]

2.2 Analýza reziduí pesticidů

Vývoj účinných analytických postupů pro stanovení reziduí pesticidů v kořeni je problém. Přítomnost přírodních látek, sekundárních metabolitů, antioxidantů (kyselina askorbová, karotenoidy, enzymy atd.) a esenciálních olejů může překážet v extrakci a analýze stopového množství pesticidů. V důsledku toho je příprava vzorků (zejména krok čištění) klíčovým problémem v analýze kořeni. Proto se používají vysoce selektivní techniky pro rutinní analýzy v laboratořích pro kontrolu potravin. Mezi tyto techniky řadíme plynovou a kapalinovou chromatografii s tandemovým hmotnostním detektorem. [1]

Koření může obsahovat více reziduí pesticidů najednou, které mají velmi podobné matrice. To může způsobovat komplikace při rutinních analýzách. Vysoce perzistentní nepolární pesticidy (organochlorové a organofosforové sloučeniny) se nejčastěji analyzují pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií a různé polární pesticidy se analyzují především ultra vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií spojenou s hmotnostními spektrometrem. [1,2,27]

Mezi nejčastěji používaná extrakční rozpouštědla pro pesticidy patří acetonitril, hexan, aceton nebo dichlormetan. Extrakt je nutné před chromatografickou analýzou přechistit. Gelová permeační chromatografie (GPC) je vysoce účinná a robustní metoda používaná pro čištění extraktů obsahující širokou škálu vedlejších extrahovaných látek a je založena na velkém rozdílu molekulární hmotnosti mezi cílovými pesticidy a vedlejšími extrahovanými látkami (pigmenty, polysacharidy, alkaloidy). Pesticidy mají menší molekuly, které pronikají malými póry v části stacionární fáze. Nevýhodou této metody je vysoká spotřeba nebezpečných organických rozpouštědel (hexan, cyklohexan, ethyl-acetát). Jiným způsobem přečištění extraktu může být extrakce tuhou fází (SPE). Tato metoda je také účinná, ale v případě komplexních matric je nutné použít více jednotlivých kolonek s různými sorbenty pro odstranění mnoha interferujících látek. Jedna z nejpoužívanějších extrakčních technik pro pesticidy je čistící a extrakční technika QuEChERS. Tato metoda byla ze začátku určena právě pro extrakci reziduí pesticidů (viz kapitola 1.2). Skládá se ze dvou kroků. Při prvním kroku se extrahuje zhomogenizovaný vzorek pomocí vhodného organického rozpouštědla a roztoků solí. Dále se přečišťuje a extrahuje organická vrstva pomocí disperzní SPE techniky se stejným organickým rozpouštědlem z prvního kroku. [1,22]

Dříve byla analýza koření prováděna pomocí plynové chromatografie s použitím různých detektorů – detektor elektronového záhytu (ECD), plamenový ionizační detektor (FID) nebo plamenový fotometrický detektor (FPD). Tyto způsoby detekce však ukázaly omezené a nepřesné využití kvůli interferencím, které se eluují ve stejných retenčních časech jako studované pesticidy. [1]

Plynová a kapalinová chromatografie spojená s trojitým kvadrupólem tandemové hmotnostní spektrometrie je v současné době nejčastěji používaná technika pro monitorování pesticidů v potravinách. I přes dominanci těchto technik, které stanovují více pesticidů najednou, nejsou pro některé komplexní matrice selektivní. Schopnost detekce kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem je omezena, pokud extrakční rozpouštědlo obsahuje isobarické sloučeniny. Tyto sloučeniny mohou způsobit nepřesné analýzy, posunout retenční časy, snížit

citlivost a můžou podat falešně pozitivní nebo negativní výsledky. Proto se začínají častěji používat hmotnostní detektory s vysokým rozlišením (HRMS), které poskytují větší selektivitu a přesnější analýzy. Nedostatek citlivosti ve srovnání s tandemovou hmotnostní spektrometrií však vyžaduje větší množství dávkovaného vzorku, což ale zároveň značně zvyšuje účinek matrice. [1]

2.2.1 Vybrané konkrétní příklady analýz reziduí pesticidů v koření

2.2.1.1 Analýza oregana

Oregano je velmi často používané nejenom pro svou chuť, ale i pro své protizánětlivé účinky. Pochází z rodu *Origanum* (česky dobromysl). Nejčastější zástupce je rostlina dobromysl obecná (*Origanum vulgare*), která je původně ze Středozeří a Malé Asie. Rod *Origanum* má mnoho druhů. Právě *Origanum vulgare* a *Origanum onites* jsou hlavními zástupci na evropském trhu, které mohou obsahovat pouze maximálně 2 % cizího materiálu z celkové hmotnosti. Ve falšovaném oreganu byly nalezeny listy pocházející z olivovníku, myrty nebo citrusové listy. Přítomnost těchto nečistot z různých rostlinných zdrojů nejen ovlivňuje konečný výrobek, ale také může zavést rezidua pesticidů. [28]

V Praze na Vysoké škole chemicko-technologické se prováděla studie [28], která zkoumala potenciální rozdíl reziduí pesticidů ve vzorcích pravého oregana a ve vzorcích oregana znečištěným jinými rostlinami. Bylo analyzováno 76 vzorků suchého oregana se známým původem pomocí kapalinové a plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem. Analyzované vzorky koření pocházely celkem z šestnácti různých zemí světa. Extrakce a čištění vzorků bylo provedeno technikou QuEChERS. Zhomogenizované vzorky oregana byly dány do polypropylenových centrifugačních zkumavek s 1% kyselinou mravenčí, která hydratovala matrice ve vzorku. Po půl hodině se přidal acetonitril a směs se intenzivně ručně třepala jednu minutu. Následně se přidal bezvodý siřičitan hořečnatý a chlorid sodný a okamžitě se se zkumavkou ručně třepalo. Po přidání roztoku trifenylofosfátu (5 µg/ml) jako vnitřního standardu se zkumavka protřepala a nechala se odstředit.

Před analýzou kapalinovou chromatografií byl acetonitrilový extrakt uložen do mrazničky alespoň na 2 hodiny. Malé množství bylo dáno do nové zkumavky obsahující sorbent PSA a bezvodý siřičitan hořečnatý (za účelem přečištění extraktu). Po třepání a centrifugaci byl odebrán supernatant pro stanovení pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Pro plynovou chromatografii byl acetonitrilový extrakt přenesen do zkumavky, která obsahovala hexan a 20% roztok chloridu sodného. Zkumavka se směsí

se protřepala a centrifugovala a část horní vrstvy hexanu byla odebrána a analyzována pomocí plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem.

Pomocí plynové chromatografie bylo analyzováno 183 reziduí pesticidů za pomoci trojitého kvadrupólového hmotnostního detektoru. Teplota termostatu byla postupně zvyšována ze 70 °C až na 280 °C. Nosným plynem bylo helium s průtokem 2,1 ml/min a dávkovaný objem byl 2 µl. S trojitým kvadrupólovým analyzátozem byla kombinována i technika ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie, díky které bylo identifikováno dokonce 335 reziduí pesticidů.

V této studii byly vzorky oregana také testovány pro autentičnost za pomoci infračervené spektroskopie. Ve výsledku 34 vzorků obsahovalo podvodné složky – olivové a citrusové listy nebo myrtu. Zbývajících 42 vzorků bylo shledáno autentickým oreganem. Všechny vzorky obsahovaly alespoň jedno reziduum pesticidu. Ve většině z nich (v 98,5 % případů) bylo přítomno více reziduí. V jednom vzorku bylo obsaženo až 16 druhů pesticidů. Hladiny reziduí se pohybovaly od 1 µg/kg až do 7310 µg/kg. Mezi nejčastější pesticidy patřily chlorpyrifos, difenylamin, acetamiprid, deltamethrin, pyriproxifen a cyfluthrin. Chlorpyrifos se vyskytoval ve všech 76 případech. Některé pesticidy, i když byly nalezeny pouze v několika vzorcích, se vyskytovaly v poměrně vysokém množství. Některé překračovaly maximální povolené limity – tebukonazol (až 7310 µg/kg), karbendazim (900 µg/kg) a boscalid (710 µg/kg). Pokud je v oreganu detekován pesticid pyriproxifen nebo pyrethroid, lze konstatovat, že se jedná o falešný produkt. Tento insekticid je povolen pro ochranu olivových listů. Bylo také zjištěno, že ve falšovaném koření je mnohem vyšší četnost pesticidů než u pravého koření. Jeden vzorek falšovaného oregana obsahoval v mediánu 7,5 pesticidů a pravé oregano obsahovalo v mediánu 4 pesticidy na jeden vzorek.

2.2.1.2 Analýza egyptského koření

Studie z roku 2001 [29] se zabývala kořením, které bylo pořízené na egyptských trzích. Díky příznivým klimatickým podmínkám v Egyptě má pěstované koření vysokou kvalitu. To zvyšuje poptávku a podporuje vývoz tohoto koření. Tato studie byla provedena s cílem odhalit a upozornit na velký problém znečištění rezidui pesticidů v koření, které bylo k vývozu z Egypta a zároveň pro kontrolu kvality. Bylo analyzováno 20 druhů koření (černý pepř, fenykl, anýz, kmín, koriandr a další) a celkem bylo 303 vzorků. Analýza byla prováděna pomocí plynové chromatografie s detektorem elektronového záhytu a plamenovým ionizačním detektorem. Byly zkoumány také nezpracované rostliny, které obsahovaly mnoho různých

pesticidů (především organochlorové) – například DDT a jeho deriváty nebo deriváty cyklodienů (aldrin, dieldrin, heptachlor a jiné).

Byly analyzovány a porovnány dva typy extraktů – výluh v deionizované vodě a extrakt do roztoku acetonitrilu a vody v poměru 13:7. Po přefiltrování se výluhy smíchaly s petroletherem, aby se na něj mohla navázat rezidua pesticidů. Po promíslení se extrakt převedl přímo na kapilární kolonu, ve které byla polární stacionární fáze ve formě anorganického sorbentu. Poté byl vymýván směsí diethyletheru a petroletheru. Konečný eluát byl analyzován plynovou chromatografií.

V testovaném koření byly detekovány organochlorové pesticidy i organofosfáty. Úrovně znečištění těmito pesticidy se značně lišily. Minimální hodnoty byly detekovány od 0,005 mg/kg (DDT v bazalce) a maximální hodnota byla zaznamenána v kmíně, který byl kontaminován 1,756 mg/kg malathionem. Organofosfát malathion měl celkově největší zastoupení ve vzorcích. Ve kmíně, anýzu, fenyklu a koriandru byly v malém množství zaznamenány deriváty DDT. Tyto deriváty nebyly zjištěny ve vzorcích černého pepře a kopru. Rezidua chlorpyrifosu, parathionu a diazionu byla ve všech analyzovaných vzorcích pod detekční limit.

Ministerstvo zemědělství v Egyptě doporučilo zemědělcům, aby nepoužívali DDT jako insekticid. Navzdory tomuto doporučení je pravděpodobně tento insekticid stále používán. Kontaminace DDT by mohla být způsobena jeho přítomností v malých koncentracích v zavlažovací vodě, která pochází hlavně z řeky Nil. Nil protéká i přes další země, kde se organochlorové pesticidy stále používají. Pesticidy aldrin a dieldrin jsou insekticidy, které se stále používají v Egyptě. Aldrin není sám o sobě toxický pro hmyz, ale oxidací v biologických systémech (např. organismus hmyzu) se přeměňuje na dieldrin, a proto se předpokládá, že dieldrin se nachází v relativně vyšších hladinách než aldrin.

Vyluhování koření v horké vodě přeneslo rezidua pesticidů do vodného extraktu v různých poměrech. Extrahovaná koncentrace profenofosu ve vodném extraktu byla 2,4 % v kmíně a 9,9 % v anýzu. Ostatní testované pesticidy buď zcela chyběly ve vodném extraktu, nebo byly pod limit detekce. Z těchto výsledků lze vyvodit, že chování reziduí pesticidů je závislé na typu použitého rozpouštědla.

2.2.1.3 Analýza sladké a pálivé papriky

Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií Orbitrap s vysokou rozlišovací schopností je velmi citlivá technika. Byla použita pro analýzu

padesáti vzorků sladké a pálivé papriky sklizené v Brazílii a Číně [27]. Sladká paprika je rozsáhle studovaná pro svůj vysoký obsah bioaktivních látek s antioxidační aktivitou, jako jsou karotenoidy, vitamíny A a C nebo fenolické sloučeniny. Je již experimentálně prokázáno, že snižuje oxidační stres, obsah cholesterolu a působí protizánětlivě.

Koření papriky se kontroluje na vysoce perzistentní nepolární rezidua pesticidů. Z 50 vzorků bylo 36 kusů sladké papriky a 14 kusů pálivé papriky. Pro extrakci organických pesticidů byla použita metoda QuEChERS s typickým postupem, kdy je přidán acetonitril a směs solí, která se skládá ze síranu hořečnatého (MgSO_4), chloridu sodného (NaCl), dihydrátu citronanu sodného ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) a sekvihydrátu hydrogencitronanu sodného ($\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 1,5 \text{H}_2\text{O}$). Po promíchání a třepání se vzorky centrifugovaly a organická fáze byla přenesena do další polypropylenové centrifugační zkumavky, která byla zmražena při teplotě $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ na 30 minut. Následovala další centrifugace a vzorky byly poté odpařeny do sucha a rekonstituovány v roztoku metanol/voda. Po přefiltrování byla směs připravena pro samotnou analýzu.

Separace reziduí pesticidů při v extraktech papriky byla provedena pomocí HPLC v systému s obrácenými fázemi (na koloně C18 (oktadecylsilikagel)). Mobilní fáze byla směs vody, mravenčanu amonného, kyseliny mravenčí a acetonitrilu. Pro detekci byla využita hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací (ESI), která je vhodná i pro detekci vysokomolekulárních látek.

Celkem bylo analyzováno 12 reziduí pesticidů – tři insekticidy (acetampirid, imidacloprid a triazofos) a devět fungicidů (azoxystrobin, karbendazim, difenokonazol, iprovalicarb, metalaxyl, myclobutanil, propamocarb, tebukonazol a thiabendazol). Rezidua všech těchto pesticidů, s výjimkou thiabendazolu, byly ve sladké paprice nalezeny. Koncentrace pesticidů byly většinou nižší než maximální povolené limity pesticidů stanovené EU. Výjimkou byl pesticid iprovalicarb, který překračoval dvojnásobně maximální povolenou koncentraci ve dvou vzorcích pálivé papriky.

3 Těžké kovy

3.1 Charakteristika těžkých kovů

Biochemické a regulační procesy, které ovlivňují produkci koření, jsou závislé na minerálních živinách. Živiny potřebné ve velkém množství jsou makroprvky (např. dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík, síra), a nezbytné živiny, které jsou přijímány v menším množství, se nazývají mikroprvky (např. bor, měď, železo, chlor, mangan, molybden, zinek, nikl). Vysoce toxické nebo středně toxické kovové ionty jsou běžnými kontaminanty v zemědělských rostlinách. Je to důsledek nesprávného nakládání s odpady, rychlé industrializace a urbanizace zemědělských oblastí. To vše vede k akumulaci kovových iontů v koření přes vodu, půdu nebo vzduch. Mezi nejtoxičtější prvky patří těžké kovy, zejména olovo, kadmium, rtuť, arsen, nikl, kobalt a chrom. Tyto prvky mohou způsobovat těžká akutní nebo chronická onemocnění, dokonce i abnormální vývoj u dětí a embryí (Parkinsonova nebo Alzheimerova choroba, autismus, rakoviny atd.). [2,3,30]

Olovo je vysoce bioakumulativní a schopné procházet potravními řetězci. Olovo nemá žádnou fyziologickou úlohu v lidském těle a jeho absorpce závisí na chemické formě. Nejlépe se vstřebávají organokovové sloučeniny a u anorganických forem závisí na místě vstřebávání a na výživě. Vstřebávání olova zpomaluje vápník, železo a vitamin D. Na lačno se olovo absorbuje rychleji. Díky podobnosti s kalciumem se až 95 % olova váže v kosech a nahrazuje tak vápník v kolagenové matici. Zbylé olovo se váže v měkkých tkáních a na erythrocyty. Při akutních účincích způsobuje poškození jater, mozku a ledvin. Chronická expozice olova způsobuje paralýzu pohybového ústrojí a poškození kostní dřeně (anémie, leukémie). Má teratogenní účinky, díky snadnému přechodu placentární bariérou, snižuje IQ u dětí. U mužů má olovo vliv na počet a životaschopnost spermií. [30,31]

Hlavní zdroj kadmia jako kontaminantu jsou fosfátová hnojiva. Tento prvek může způsobovat rakovinu plic, ledvin, prostaty nebo pankreatu. Po zkonsumování potravy, která byla kontaminována kadmiumem, se tento těžký kov kumuluje především v ledvinách. Zde porušuje reabsorpci iontů vápníku a fosforu a jejich vylučování je zvýšené. To vede k odvápnění kostí, poškození nervové a srdeční činnosti. Další těžký kov, který se ukládá v ledvinách, je rtuť, která obecně poškozuje strukturu bílkovin. Organokovové sloučeniny rtuti (dimetylrтуť) jsou extrémně toxické a působí především na nervový systém a smyslové orgány. Způsobuje nespavost, ztráty paměti, bolesti hlavy nebo neschopnost koordinace pohybů. Rtuť má teratogenní účinky díky schopnosti procházet placentou a mozkovou tkání. [30-33]

Stopové hladiny trojmocného chrom jsou nezbytné pro regulaci metabolických reakcí v lidském těle. Jedná se o esenciální prvek, to znamená, že lidské tělo si jej nedokáže vytvořit samo a musíme ho přijímat v potravě. U čtyřmocného chromu byly prokázány mutagenní účinky na lidské zdraví. Vysoce toxická forma chromu je šestimocný chrom, který škodí při dlouhodobém kontaktu s kůží nebo při inhalování. Chrom patří nejen mezi karcinogenní látky, ale také mezi látky teratogenní. [3,31]

Koření obsahuje ionty kovů v širokém koncentračním rozmezí. Předpisy o tolerovatelné koncentraci těžkých kovů se mohou lišit v závislosti na zemi. Většina předpisů je přisuzována Evropskému úřadu pro bezpečnost potravin. Světová zdravotnická organizace (WHO) spolu s Evropskou unií stanovily maximální povolené limity v potravinách. Konkrétní nařízení Evropské unie č. 1881/2006 uvádí maximální tolerované koncentrace těžkých kovů v zelenině a čerstvých bylinkách (Pb – 0,3 mg/kg; Cd – 0,2 mg/kg; As – 5,0 mg/kg). V několika nedávných studiích byla zjišťována kontaminace těžkými kovy v komerčním koření, což naznačuje potřeby pro řádné kontroly. Podle WHO jsou těžké kovy (především kadmium, rtuť, arsen a olovo) zařazeny mezi deset nejvýznamnějších chemických látek, které nepříznivě ovlivňují lidské zdraví, díky jejich hromadění v životním prostředí. Z těchto důvodů je velmi důležité kontrolovat výskyt těžkých kovů nejen v půdě, vodě a v ovzduší, ale i v potravinách. [2,3,30,33,34]

3.2 Analýza těžkých kovů

Hlavní techniky pro vícesložkovou analýzu těžkých kovů v koření jsou techniky indukčně vázané plazmy s hmotnostní a atomovou emisní detekcí. Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) zajišťuje lepší citlivost a přesnost pro spolehlivé porovnání více prvků najednou, zatímco atomová absorpční spektrometrie (AAS) je běžně používána pro hodnocení jednoho prvku. Indukčně vázané plazma s hmotnostním spektrometrem je nepostradatelným zařízením pro řadu laboratoří k analýzám anorganických prvků a tato technika je schopna analyzovat i stopová množství v koření. Jedná se o mimořádně citlivou metodu a o jednu z nejpoužívanějších v prvkové analýze. [3]

Atomová absorpční spektrometrie je kvantitativní metoda, která vyniká velkou citlivostí a je pro daný prvek specifická. Měří se absorpce záření rezonanční spektrální čáry, které dopadá na soustavu měřených atomů v základním energetickém stavu. Základní techniky AAS se dělí podle způsobu převedení látky z roztoku na atomový plyn – buď plamenem, nebo elektrotermicky. Plamenová absorpční spektrometrie (F-AAS) stanovuje pouze těžké

kovy, pokud jsou přítomny ve vzorku ve vysokých koncentracích. Pomocí elektrometrické atomové absorpční spektrometrie (ET-AAS) lze již stanovovat stopová množství některých těžkých kovů. Pro kvalitativní a kvantitativní analýzy pro většinu prvků (zejména kovových) je vhodná i atomová emisní spektrometrie (AES) neboli optická emisní spektrometrie (OES). Metoda je opět rozdělena podle budícího (excitačního) zdroje. Plamenová fotometrie se používá především pro stanovení alkalických kovů a kovů alkalických zemin. Pokud je za excitační zdroj plazmový výboj, jedná se o atomovou emisní spektrometrii s indukčně vázaným plazmatem (ICP-AES nebo ICP-OES). Pomocí ICP-AES lze provést multielementární analýzy a kvantifikace minerálů, které jsou obsažené ve velkých koncentracích. Tato metoda má však velkou spotřebu argonu a tím i vysoké provozní náklady. [35]

3.2.1 Vybrané konkrétní příklady analýz těžkých kovů v koření

3.2.1.1 Analýza skořice, kurkumy a zázvoru

Ve studii [34] bylo cílem zjistit obsah kadmia, rtuti, arsenu a olova v koření za použití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). Bylo analyzováno 7 vzorků koření – 3× skořice, 2× kurkuma a 2× zázvor. Skořice pocházela z Indonésie, Madagaskaru a Vietnamu. Testovaná kurkuma byla původem z Indie a Srí Lanky, a zázvor pocházel také z Indie a Japonska. Každý vzorek byl namlet v teflonovém hmoždíři, aby se zabránilo kontaminaci kovu a byl mineralizován v kyselině dusičné pomocí mikrovlnného rozkladu při 180 °C (1000 W). Po ochlazení na laboratorní teplotu byly vzorky zváženy, zředěny ultračistou deionizovanou vodou a analyzovány.

Rtuť se se podílela třinácti procenty na celkovém obsahu těžkých kovů, kadmium pouze 8 %, arsen 14 % a nejvyšší zastoupení mezi celkovým obsahem těžkých kovů mělo olovo – 65 %. Kadmium bylo obsažené ve všech sedmi vzorcích v rozmezí od 0,029 mg/kg až do 0,294 mg/kg. Nejnižší obsah byl v indickém zázvoru, zatímco ve srílanské kurkumě byla nejvyšší koncentrace kadmia (0,288 mg/kg). Maximální povolený limit podle EU je pro kadmium stanoven do 0,2 mg/kg, takže u srílanské kurkumy byl tento limit překročen. V tomto koření byl prokázán i nejvyšší obsah rtuti (0,837 mg/kg). Pro rtuť v koření a jiných rostlinných potravinách není zatím stanovena maximální povolená koncentrace. Ta je určena jen pro mořské ryby a plody – 1 mg/kg.

Obsah arsenu se pohyboval od 0,007 do 0,701 mg/kg. Skořice z Madagaskaru obsahovala nejnižší koncentraci tohoto těžkého kovu (0,006 mg/kg) a japonský zázvor obsahoval

0,697 mg/kg arsenu, což byla nejvyšší koncentrace. Hladiny arsenu však splňovaly rámce stanovených bezpečnostních limitů (WHO nebo nařízení EU). Rozsáhlé používání olova vyústilo v rozsáhlou kontaminaci životního prostředí tak, že bylo detekováno ve všech testovaných kořenech. Celkový obsah olova se pohyboval od 0,164 až do 2,923 mg/kg. Tato nejvyšší koncentrace olova byla nalezena ve vietnamské skořici. Ve starších studiích, které testovaly koření z Pákistánu, Nigérie a Iráku, však byly zjištěny ještě mnohem vyšší kontaminace olovem (od 6 mg/kg až do 20 mg/kg).

3.2.1.2 Analýza červené papriky

Červená paprika je nejvíce pěstované koření na světě. Jeho celková světová produkce činí až 30 milionů tun. Na různých trzích v Turecku bylo pořízeno 33 vzorků mleté červené papriky. Ty byly zkoumány pro obsah kadmia, olova a arsenu [36]. Osm vzorků bylo zakoupeno na otevřených tržnicích, kde byly prodávány volně bez obalu. Zbylých 25 vzorků bylo v průmyslově uzavřených obalech. Analýza těžkých kovů byla prováděna pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. Příprava vzorku byla provedena mikrovlnou mineralizací v kyselině dusičné a peroxidu vodíku při teplotě 190 °C. V žádném ze vzorků nebyly detekovány arsen a kadmium, zatímco olovo bylo detekováno v 11 vzorcích koření. Koncentrace olova se pohybovala od 0,041 mg/kg až do 0,9 mg/kg. Toto malé množství splňovalo kritéria stanovená EU nebo WHO.

3.2.1.3 Analýza zázvoru

Cílem studie [33] bylo stanovení toxického arsenu, rtuti, olova a kadmia v oddenku zázvoru pomocí AAS. Podzemní část rostliny *Zingiber officinale*, česky zázvor lékařský nebo pravý, je nejvíce kontaminovaná část. Pěstuje se především v Indii, Číně, Bangladéši, Tchaj-wanu, Jamajce a Nigérii. Vyváží se především z Indie a Číny do celého světa. V roce 2007 bylo celkem 25 vzorků zázvoru odebráno z různých míst v západních Himalájích v Indii. Oddenky byly 2 dny sušeny při teplotě 70 °C a rozemlety na jemný prášek, který byl dán do křemenné nádoby spolu s lučavkou královskou. Vzorky zázvoru se nechaly 12 hodin štěpit pomocí mikrovlnné metody při 260 °C. Poté byly zředěny ultračistou vodou a analyzovány.

Arsen byl stanoven ve čtyřech vzorcích v rozmezí od 0,02 µg/g do 0,13 µg/g. Olovo, kadmium a rtuť se vyskytovaly ve všech vzorcích. Rtuť byla stanovena v rozmezí 0,01-0,42 µg/g, kadmium od 0,002 µg/g do 0,03 µg/g a koncentrace olova se pohybovala v rozmezí 0,06-0,64 µg/g. Největší zastoupení jako kontaminant mělo olovo, které zastupovalo

až 76 % celkového obsahu těžkých kovů. Tato studie prokázala, že půda je hlavním (ale nikoliv jediným) zdrojem kontaminantů a hromadění se kovů v rostlinách.

3.2.1.4 Analýza koření z polských a pákistánských trhů

Na Gdaňské univerzitě [37] prováděli analýzu, která se zabývala celkovým množstvím kovů mědi, niklu, železa, zinku a manganu pomocí AAS. Tyto prvky katalyzují mnoho biochemických reakcí v organismu, podílí se na tvorbě erytrocytů či hormonů a jsou důležité v metabolismu, ale v příliš vysokých dávkách mohou být tyto kovy toxické. Mezi polské analyzované koření patřil fenykl, černý pepř, sušený česnek, majoránka, paprika, skořice, bazalka, oregano, petržel či provensálské koření (směs koření). Stejnou metodou prováděli studii na univerzitě Sindh v Pákistánu [38]. Kvantifikovali arsen, kadmium, nikl a olovo ve 26 vzorcích koření (bobkový list, nové koření, černý pepř, kmín, hřebíček, koriandr, zázvor, hořčičné semínko, chilli, kurkuma, anýz nebo muškátový oříšek), které byly pořízeny na místních trzích. Vzorky byly mineralizovány 65% kyselinou dusičnou a 30% peroxidem vodíku za pomoci mineralizačního systému. Po vychladnutí byly mineralizáty doplněny deionizovanou vodou a analyzovány.

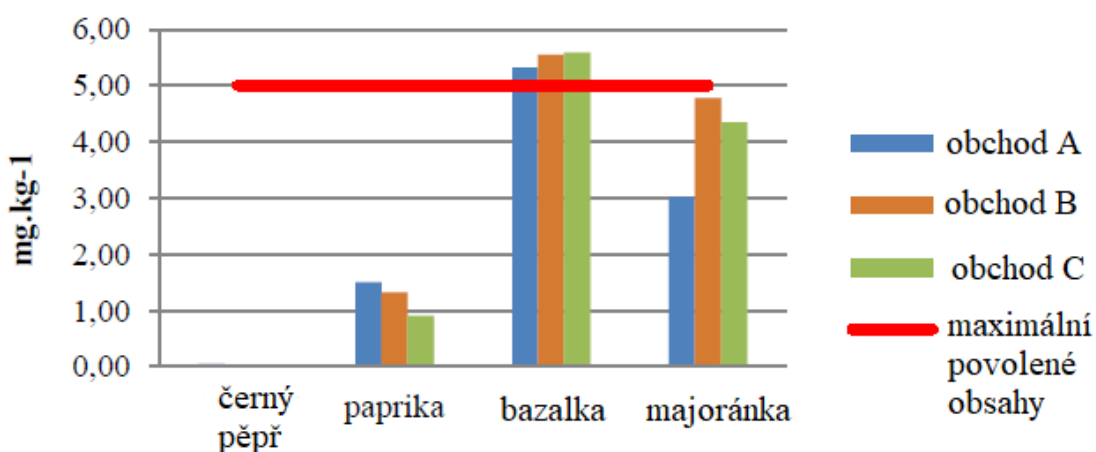
Vlnová délka pro stanovení mědi byla 324,8 nm, niklu 232 nm, železa 248,3 nm, zinku 213,9 nm a manganu 279,5 nm. Obsahy sledovaných kovů v polském koření se vyskytovaly v širokém rozsahu. Minimální množství mědi se nacházelo v sušeném česneku, kde ho bylo 2,7 mg/kg a největší množství se vyskytovalo v paprice (24,2 mg/kg). Doporučená denní dávka mědi je okolo 3 miligramů. Nejvyšší koncentrace niklu se objevila v černém pepři (23,0 mg/kg), kdy doporučená denní dávka se pohybuje od 0,1 – 0,7 mg. Železo bylo obsaženo ve vysokých koncentracích v rozmezí od 20,0 až do 1150 mg/kg. Nejvyšší koncentrace zinku byla 56,3 mg/kg ve fenyklu a největší obsah manganu byl zaznamenán v paprice (206 mg/kg). Celkově nejvyšší koncentrace analyzovaných prvků byly stanoveny ve fenyklu, majoránce a v oreganu.

Pákistánská studie ukázala, že toxické prvky v běžném koření se liší podle regionů pěstování. V analyzovaném koření byla nejvyšší koncentrace arsenu zaznamenána v koriandru (6,39 µg/g). Tento koriandr obsahoval i nejvyšší koncentraci niklu, která činila 14,0 µg/g. Právě koriandr, nové koření, zázvor či muškátový oříšek měly třikrát až šestkrát vyšší koncentrace analyzovaných kovů než přípustné limity stanovené WHO. Tato omezení na obsah kadmia přesáhla i koření anýz, chilli či skořice. Kadmium bylo nejvíce obsaženo v novém koření (4,0 µg/g). Obsah niklu byl ve všech druzích studovaných koření (s výjimkou skořice

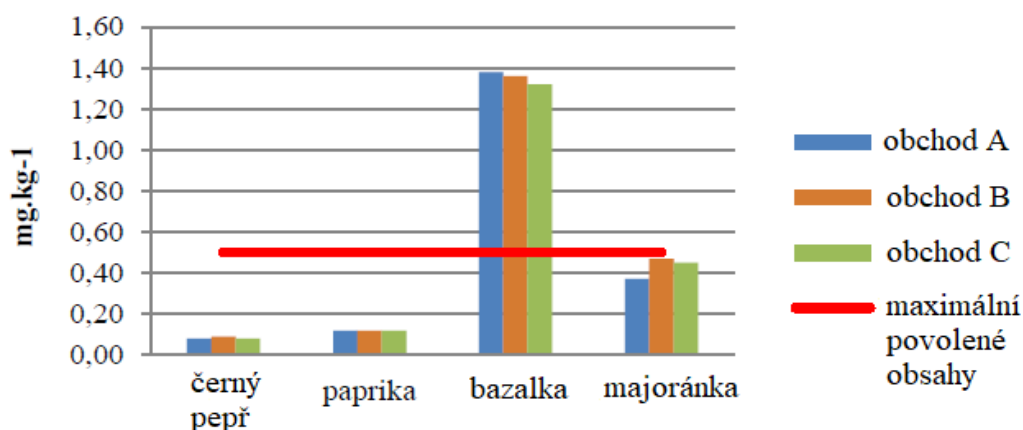
a hřebíčku) vyšší než povolené obsahy WHO. V černém kmíně byla zaznamenána vysoká koncentrace olova a to až 50,0 $\mu\text{g/g}$. Kontaminace olovem byla nejvyšší ze všech těžkých kovů.

3.2.1.5 Analýza vybraného koření ze Slovenska

Na Slovenské zemědělské univerzitě v Nitře stanovovali obsah nebezpečných těžkých kovů ve vybraných kořeních – bazalce, černém pepři, majoránce, sladké červené paprice [30]. 20 vzorků koření bylo zakoupeno v obchodech v Nitře, všechna koření byla vypěstována a sklizena na Slovensku. Analýza byla provedena pomocí AAS. Mineralizace vzorků byla provedena v mikrovlnném digesčním systému v teflonové nádobě v přítomnosti destilované vody a koncentrované kyseliny dusičné v poměru 1:1. Následující grafy znázorňují obsah olova a kadmia ve vybraném koření.



Obrázek 4 - Graf zaznamenávající obsah olova ve vybraném koření [30]



Obrázek 5 - Graf zaznamenávající obsah kadmia ve vybraném koření [30]

Koncentrace olova a kadmia přesáhla povolené množství v bazalce stanovené komisí Codex Alimentarius (Pb – 5 mg/kg, Cd – 0,5mg/kg). Množství kadmia v bazalce (1,38 mg/kg) bylo až osmkrát více, než bylo přítomno v černém pepři. V bazalce byl zaznamenán i nejvyšší obsah mědi (20,11 mg/kg) a zinku (48,65 mg/kg). Nejnižší obsah mědi byl stanoven ve sladké paprice a nejnižší koncentrace zinku byla v černém pepři. Měď a zinek splňovaly normy a byly pod maximálním povoleném limitu. Dále byl analyzován chrom, nikl a kobalt. Chrom a nikl byly nejvíce obsaženy v majoránce a největší obsah kobaltu byl zaznamenán v bazalce. Podle těchto výsledků je doporučeno, aby se inspekce více zaměřila na úroveň těžkých kovů v koření a to konkrétně v bazalce.

4 Barviva

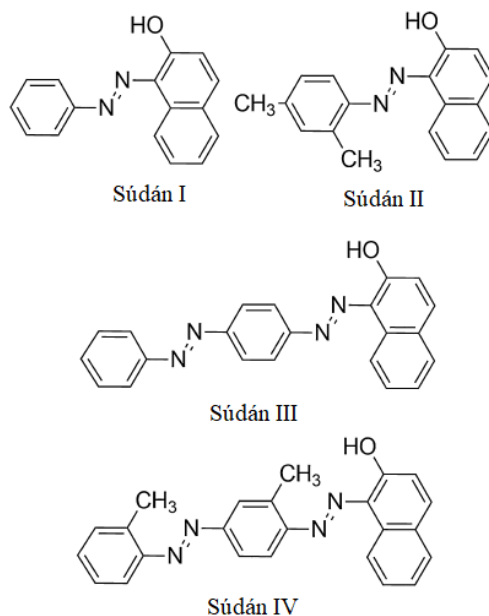
4.1 Charakteristika barviv

Barva je považována za jeden z nejpůsobivějších a nejpříjemnějších atributů koření (spolu s vůní), který ovlivňuje výběr spotřebitelů. Navzdory přírodním barvám koření, mohou mít podmínky skladování a metody zpracování výrazný vliv na jejich konečné zbarvení. Proto jsou potravinářská barviva přidávána do koření, kvůli lepšímu vzhledu a to i přes negativní vlivy na lidské zdraví. Po průmyslovém zpracování si koření, jako je kurkuma či paprika, může zachovat přirozené barvy. Přesto potravinářský průmysl často dává přednost syntetickým barvám pro relativně nižší náklady a stabilitu. Dodnes jsou tato barviva nacházena v koření a mletá paprika má největší riziko obsahu přidaných syntetických barviv. Potravinářské barvivo je v nejširším slova smyslu podle Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv pigment nebo látka, která je schopna po přidání do produktu prostřednictvím reakcí propouštět barvy. [2,39,40]

Používání syntetických barviv v potravinách je v současné době povoleno Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv a Evropským úřadem pro bezpečnost potravin na základě přijatelných denních dávek (ADI). Modrá, žlutá, zelená a bílá barviva jsou méně nebezpečná i při vyšších denních dávkách. Červená a oranžová barviva mají nižší přijatelné denní dávky. Například erythrosin (E127), který se vyskytuje v koktejlových a kandovaných třešních, má přijatelnou denní dávku 0,1 mg/kg. Amarant (E123) se přidává do alkoholických i nealkoholických nápojů a do rybích jiker, a jeho přijatelná denní dávka je 0,8 mg/kg. Tato barviva mohou způsobovat alergické reakce nebo mohou silně ovlivnit chování dětí – hyperaktivita s poruchou pozornosti (ADHD). Mezi další škodlivá barviva patří tartrazin (E102), chinolinová žluť (E104), žluť SY (E110), azorubin (E122), košenilová červeň A (E124) nebo červeň allura AC (E129). [39]

Mezi rozšířená barviva patří azobarviva. Přidávají se do koření nejen pro barevnost, ale i pro zvýšení hmotnosti. Jejich výroba není finančně nákladná a je známo asi 3000 azobarviv, z něhož Súdánská barviva I-IV jsou nejznámější (obrázek č. 6). Súdánská barviva se vyznačují dvojitou vazbou mezi atomy dusíku a dusík mezi aromatickými skupinami. Mají vysoce hydrofobní vlastnosti díky relativně vysoké molekulové hmotnosti a nízké polaritě. Mezi další súdánská barviva patří súdánská oranž G, súdánská čern, súdánská dimetylová žluť, súdánská červeň G a další. Všechna tato azobarviva se používají k průmyslovým materiálům, jako jsou minerální oleje, vosky, kožené výrobky, textil či kosmetické produkty. Mezi kontaminované produkty Súdánskými barvivy je i koření. Súdán I a IV jsou syntetická

červenooranžová azobarviva, která jsou ilegálně používaná v potravinářském průmyslu, zejména chilli, kari, koření paprika, potraviny obsahující palmový olej nebo i potraviny obsahující masné výrobky. Tato azobarviva jsou považována za karcinogeny a teratogeny. Syntetická azobarviva se v těle přeměňují na aromatické aminy, které mohou působit přímo v jaterních buňkách a způsobit toxické jaterní onemocnění nebo mohou indukovat mutaci buněčného genu. U dospělých lidí mohou zapříčinit bolesti hlavy a u dětí způsobují hyperaktivitu a roztržitost. [2,41,42]



Obrázek 6 - Chemické vzorce syntetických barviv Súdán I – IV [2]

4.2 Analýza barviv

Doposud bylo pro stanovení syntetických barviv v koření vyvinuto mnoho analytických metod, jako např. HPLC-MS, která je nejpoužívanější technikou pro kvantitativní stanovení azobarviv v koření. Techniky „otisku prstu“ v instrumentální chemii napomáhají odhalit falšované koření (i jiné potraviny). Jedná se o analytické techniky, které mohou zjistit složení potravin neselektivním způsobem a vytváří typické spektrum jako otisk prstu. Tyto techniky byly úspěšně použity pro autentičnost potravin, kontrolu kvality a sledování výrobků. [2,43]

Pro detekci Súdánských barviv v koření byly použity různé techniky, především však HPLC-MS, kapilární elektroforéza nebo metoda ELISA. Súdánská barviva jsou dnes ve většině zemí zakázána, a proto se dnes dělají pouze analýzy po veřejném oznámení. Pro kontrolu barviva Súdán I ve vysoce barveném koření, byla použita imunoanalytická

technika s názvem imunodetekce v laterálním toku na membráně. Tato technika je založena na interakci specifických protilátek s detekovaným analytem, přičemž jedna látka je barevně označena a druhá látka je zafixovaná na membráně. K interakci analytu s protilátkou dochází při průtoku interagujících látek membránou a poté je analyt možný vizuálně detekovat. Nejčastěji používanou značkou k vizuální detekci je koloidní zlato. Tato metoda je vhodná pro levnou a rychlou detekci Súdánu I v mobilních laboratořích. [44,45]

Analýza syntetických barviv v potravinách může být také provedena pomocí spektroskopických metod, které hrají důležitou roli v nedestruktivních a rychlých technikách pro analýzu syntetických barviv. Ramanova spektrometrie nabízí rychlou analýzu složení vzorku, které lze použít pro kvalitativní i kvantitativní účely. Tato technika vyžaduje minimální přípravu vzorku a měření se může provádět v jakémkoliv skupenství. Mezi další používané spektrometrie pro detekci syntetických barviv patří UV/VIS spektrometrie, blízká infračervená spektrometrie nebo nukleární magnetická rezonance. Přímé stanovení súdánských barviv v koření může být dosaženo pomocí fluorescenčních jevů, které tato barviva mají. Avšak fluorescenční spektrometrie není vhodná pro analýzu komplexních vícesložkových vzorků (jako je právě koření) v důsledku silného spektrálního překrytí. To lze však překonat použitím tzv. synchronní fluorescence, kde jsou excitační i emisní monochromátory snímány současně takovým způsobem, že je udržován konstantní interval vlnové délky mezi emisními a excitačními vlnovými délkami (DI). [2,41,46]

Stanovení nelegálně přídavných barviv obvykle zahrnuje komplexní odstranění matrice a stanovení kontaminantů při nízkých koncentracích. Mezi takovéto předúpravy patří extrakce kapalina-pevná látka, kapalina-kapalina, extrakce na pevnou fázi nebo extrakce tlakovou kapalinou. Proces extrakce může být prováděna off-line, on-line nebo in-line s ohledem na separační nebo detekční systém. V režimu off-line je extrakce prováděna jako nezávislá etapa před separací nebo detekcí. Spojení on-line extrakce-separace a extrakce-detekce zahrnuje nejčastěji ventil. In-line systém využívá extrakční systém umístěný uvnitř systému jako integrovanou součást analytického systému. Pro tuto extrakci-separaci a extrakci-detekci není vyžadována žádná samostatná řídicí jednotka. On-line SPE nabízí řadu výhod, jako je vývoj rychlejší metody se sníženou spotřebou rozpouštědla a menší počet kroků při přípravě vzorku. Tato separace byla použita v kombinaci s UHPLC. Krátké ochranné kolony nebo předkolony jsou vhodné pro rychlou extrakci vzorku při relativně vysokých rychlostech zatížení v systému UHPLC a limity tlaku v systému mohou být nižší. [42,47]

Matricová disperze na pevné fázi (MSPD) patří do jednodušších metod používané pro extrakci pevných nebo polopevných vzorků. Tento způsob zahrnuje smíchání vzorku s pevnou nosičovou hmotou s použitím třecí misky, adsorpce organických sloučenin na vhodný pevný absorbent a desorpce s malým množstvím organického rozpouštědla. Tato metoda nevyžaduje centrifugaci, úpravu pH nebo přenos vzorku a na rozdíl od běžných metod extrakce je relativně rychlá a nenáročná. [47]

4.2.1 Vybrané konkrétní příklady analýz syntetických barviv v koření

4.2.1.1 Analýza koření ze švýcarských trhů

V roce 2018 bylo ve Švýcarsku analyzováno místní koření pomocí ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostním analyzátozem doby letu (UHPLC-QTOF-MS) [40]. Celkem bylo analyzováno 87 vzorků koření – mletá paprika, kurkuma, chilli, muškátový oříšek, kmín a kari. Každé koření bylo extrahováno extrakční směsí, která se skládala z vody, metanolu, acetonitrilu a tetrahydrofuranu. Jako stacionární fáze po separaci barviv byl použit oktadecylsilikagel a jako mobilní fáze byl použit roztok metanolu a octanu amonného. Bylo zjištěno, že 8 vzorků koření bylo kontaminováno nepovolenými barvivými. Súdán IV byl detekován ve čtyřech koření (kari, mletá paprika a ve dvou chilli). Znečištěné kari Súdánem IV obsahovalo i Súdán I. Další dva vzorky pocházející z Turecka a Íránu byly kontaminovány košenilovou červení A (E124). Koncentrace košenilové červení se pohybovala okolo 10 mg/kg v obou vzorcích.

4.2.1.2 Analýza chilli

Chilli se stalo jedním z nejběžnějších koření, které je rutinně monitorováno pro syntetická barviva. Ve studii [43] se zabývali screeningem syntetických barviv rozpustných v oleji v produktech chilli na základě srovnání „otisků prstů“. Testované vzorky byly rozdrceny na prášek a extrahovány do acetonu. Extrakt byl analyzován pomocí HPLC. Mobilní fáze se skládala z 0,1% roztoku kyseliny mravenčí, metanolu a acetonitrilu. Jako standardy bylo použito 16 známých syntetických barviv pro posouzení screeningové kapacity. Pro ověření použitelnosti metody byly použity dva reálné vzorky znehodnocené ilegálním práškovým barvivem Scarlet.

Účinnost extrakce byla hodnocena barevnými změnami extrahovaných vzorků. Pouhýma očima bylo vidět, že barva extrahovaných kousků chilli téměř vybledla, což naznačovalo k téměř kompletní extrakci barviva do extrakční směsi. Celkem bylo analyzováno 55 chilli

koření, u kterých nebylo detekováno žádné syntetické barvivo. Tato technika může najít potenciál v důsledku změn otisků pro analýzu nových barviv, které nebyly ještě evidované.

V Hradci Králové na Karlově univerzitě použili pro analýzu chilli efektivní metodu SPE-UHPLC-UV/VIS [42]. Bylo analyzováno devět nelegálních syntetických barviv – Súdán I, II, III, IV, súdánská červeň 7B a G, súdánská oranž G, červeň 1 a methylčerveň. Byla analyzována směs koření – práškové chilli označené „Mojo“. Toto koření se nazývá i jako kanárské koření a bylo zakoupeno v hradeckých obchodech. Vzorky byly přeneseny do skleněné zkumavky se šroubovacím uzávěrem a extrakce byla provedena dvakrát pomocí tetrahydrofuranu a ultrazvukové sonikace (odstranění biofilmu). Dostatečné výtěžky byly získány touto extrakcí už po 10 minutách.

Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu a vody a jako sorbent SPE pro čištění byl použit oktadecylsilikagel. V prvním kroku čištění pomocí on-line SPE-UHPLC byl vzorek aplikován do SPE kolony pomocí autosampleru a matrice ve vzorku obsahující více polární sloučeniny a nečistoty, byly opláchnuty do odpadu 10% acetonitrem. Sledované analyty byly zachyceny na SPE koloně. Po vypláchnutí se ventil spojil s analytickou kolonou a následovala eluce analytů z SPE kolony pomocí zpětného proplachování. Poté byla provedena vlastní analýza barviv. Teplota kolony byla nastavena na 55 °C a barviva byla detekována při vlnové délce 500 nm. Následně se vlnová délka změnila pro súdánskou oranž G na 420 nm. Výhodou on-line metody SPE-UHPLC bylo stanovení většího počtu nelegálních barviv v kratším čase, přesnost, detekce a kvantifikace. Analyzované koření s chilli neobsahovalo žádná nelegální syntetická barviva.

4.2.1.3 Analýza sladké, pálivé a uzené papriky

V argentinské studii se zabývali stanovením barviva Súdán I ve sladké, pálivé a uzené paprice [46]. K této studii využili synchronní fluorescenci kombinovanou s vícerozměrnými klasifikačními technikami. Celkem bylo k dispozici 30 vzorků paprik, z toho bylo 11 sladkých, 10 pálivých a 8 uzených. Všechna koření byla pořízena na místních trzích. Navážené koření se extrahovalo do isopropylalkoholu a směs se třepala 15 minut. Spektrofluorometr byl vybaven zdrojem světla s xenonovou výbojkou a excitační vlnová délka byla 420 nm. Synchronní spektra byla měřena v pěti intervalech vlnových délek (20 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm a 60 nm). Toto rozmezí bylo vybráno proto, že při volbě nižších intervalů než 20 nm byl fluorescenční detektor nasycen v mnoha spektrálních oblastech, zatímco intervaly větší než 60 nm neumožnily vizuální rozdíly mezi nefalšovanými a falšovanými vzorky.

Analyzované vzorky byly rozděleny do dvou tříd. První třída tvořila nefalšované vzorky a do druhé třídy spadaly falšované vzorky barvivem Súdán I. Spektra zfalšovaných vzorků se jednoznačně lišila od nefalšovaných vzorků ve všech intervalech vlnových délek. Obsah Súdánu I byl zaznamenán v různém počtu vzorků podle intervalu vlnových délek. Při vlnové délce 20 nm, 30 nm a 40 nm bylo zaznamenáno přidané barvivo ve 25 vzorcích, při měření 50 nm bylo zařazeno ve druhé třídě 28 vzorků papriky a v 60 nm byl Súdán I zaznamenán ve všech analyzovaných vzorcích.

4.2.1.4 Analýza sladké a pálivé papriky, kurkumy a kari

UV/VIS spektrometrie je metoda vhodná pro vyšší koncentrace analyzované látky. Právě pomocí UV-viditelného spektra byla analyzována vybraná azobarviva ve sladké a pálivé paprice – Súdán I, II, III a IV [48]. Tato barviva se velmi často vyskytují společně v chilli nebo kořenících směsích. Každé súdánské barvivo má na lidský organismus jiný účinek a mohou se vzájemně ovlivňovat tak, že v současné přítomnosti si mohou zvýšit toxicity nebo si je změnit. Bylo zakoupeno 27 vzorků koření (pálivá a sladká paprika, kurkuma a kari), které bylo extrahováno do acetonitrilu pomocí magnetického míchání. UV/VIS spektrometr byl vybaven diodovým polem a spektra byla snímána v rozmezí vlnových délek 260 až 600 nm.

Pro porovnání byla využita i HPLC metoda s fotometrickou detekcí při 478 nm pro Súdán I a pro Súdán II, III a IV při 510 nm. Jako mobilní fázi použili acetonitril s 16% kyselinou octovou v poměru 7:3. U dvou vzorků byl zaznamenán vyšší obsah Súdánu II. Jednalo se o koření sladké a pálivé papriky označená „De la Vera“ – což je část ve Španělsku. Ostatní koření papriky neobsahovalo žádné súdánské barvivo. Koření kari a kurkuma také neobsahovala žádná syntetická azobarviva.

4.2.1.5 Analýza vybraného koření

V roce 2015 byla provedena analýza súdánských barviv (Súdán I-IV, súdánská oranž G, čern B a červen G) ve vybraném koření (chilli, paprika, šafrán, kurkuma, kari nebo směs sedmi koření) v Iránu [47]. Studie využila metody in-line mikro-matricové disperze v pevné fázi (in-line MMSPD) spojenou s HPLC-UV. Celý tento systém byl využit pro extrakci, separaci a detekci. Do třetí misky se vložil vzorek, florisil a oxid křemičitý a hlinitý. Celá směs se důkladně promíchala a následně byla aplikována do MSPD kolony, která byla umístěná před analytickou kolonou. Jako mobilní fáze byla použita směs metanol-acetonitril v poměru 1:4 a právě její průchod přes MSPD extrahoval analyzovaná barviva, které byly mobilní fází

převezeny do analytické kolony pro separaci. Vlnová délka UV detektoru byla nastavena na 480 nm.

Analyzované chilli, kurkuma, kari, šafrán, paprika a směs sedmi druhů koření pocházely z Íránu. Výsledky ukázaly, že žádné koření neobsahovalo súdánská barviva. In-line MMSPD je rychlá a jednoduchá metoda díky extrakce a separaci v jednom kroku. Vyžaduje velmi malé množství vzorku, materiálů, času, vybavení a energie a není vyžadována příprava vzorku. Tato metoda je vhodná pro analýzu různých súdánských barviv nejen v koření, ale i v jiných potravinách.

5 Ostatní cizí složky v koření

V odvětví koření jsou termíny pravosti a kvality někdy v rozporu. Autenticitu lze definovat jako nepřítomnost cizích látek či těles nebo také že v produktu nejsou přítomny žádné nečistoty. Pro koření je vhodnější termín kvalita (jakost) neboli stav produktu. Hlavní mezinárodní specifikace kvality stanovují dvě normy – normy USA a Evropské. Existují různé typy testů, které tvoří řadu mezinárodních norem – čistota, úroveň popelu, stanovení těkavých olejů, obsah vlhkosti a již zmíněné maximální povolené limity mykotoxinů, pesticidů, těžkých kovů a syntetických barviv. Právě čistota je míra množství cizích látek, jako je kontaminace hmyzem, exkrementy nebo jinými cizími tělesy. Určení čistoty se často provádí fyzikálním stanovením za pomoci mikroskopické analýzy. Úroveň popelu je hladina nečistoty v produktu, které se získají spálením organické hmoty. Prevence proti znehodnocování a znečištění koření cizími složkami je kontrola a hodnocení dodavatelského řetězce koření (dodržování dobrých zemědělských postupů a správná výrobní praxe, dodržování analýzy rizik kritických kontrolních bodů (HACCP)) a kontrola a hodnocení samotného koření. [49]

Zvýšení hmotnosti koření pro větší zisky obchodníkům se provádí nejen přidáváním syntetických barviv, ale i pomocí přidávání nečistot v podobě písku či pilin. V koření se mohou vyskytovat i rezidua cizích rostlin, lístků, stopy hmyzu nebo hlodavčí srsti. Tato znehodnocení mohou být zapříčiněna několika faktory – buď zemí původu, ekologickými podmínkami, skladováním nebo zpracováním. Nařízení Evropské unie stanovuje, které produkty by neměly obsahovat žádné náhražky a cizí složky, které nesmí překročit 1-2 % celkové hmotnosti. Cizí složky mají veliký vliv na kvalitu potravin, chuť nebo aroma. Ve volně prodávaném koření je mnohem větší pravděpodobnost obsahu nečistot, než ve vakuově baleném. Přesto mnoho spotřebitelů dává přednost nákupu volného koření pro finanční úspory, aniž by si uvědomili vážná zdravotní rizika. V posledních letech dochází ke stálému nárůstu počtu lidí trpících onemocněním z kořeněných jídel. Tato onemocnění se často projevují bolestmi žaludku, gastroenteritidami, průjmy nebo i vyrážkami či nevolnostmi. Doposud žádná podrobná studie neprokázala, co přesně tyto zdravotní problémy způsobuje, avšak kontaminanty a cizí složky v koření mají hlavní vliv. [2]

Ochranné obaly přicházející do styku s kořením by měly být z materiálu určeného pro styk s potravinami. Moderní materiály pro balení koření jsou navrženy tak, aby splňovaly více účelů, včetně ochrany před vnějšími zdroji kontaminace, zajištění konzervace, snadnou přepravu a skladování produktu. Zamezení migrace škodlivých chemických látek z obalného

materiálu do koření, je hlavní bezpečnostní podmínka, protože tyto chemické látky mohou nepříznivě ovlivnit kvalitu koření a následně ohrozit zdraví spotřebitelů. Mezi obalné materiály může patřit keramika, korek, sklo, kov, papír, silikon nebo plast. Plasty jsou nejvíce používané materiály pro obaly potravin. [50]

Evropské nařízení č. 10/2011 je založeno na seznamu povolených látek, které mohou být použity ve výrobě plastových obalů a maximální povolené množství dané látky uvolněné z materiálu do potravin. Celkově existují stovky sloučenin, které mohou migrovat z obalů do potravin, ale kontroly jsou nejvíce zaměřené především na organické sloučeniny. Mezi nejčastější organické kontaminanty přenášející se do koření jsou perfluorované sloučeniny, bisfenol A, ftaláty a primární aromatické aminy, které jsou tvořeny degradací azobarviv. Tyto organické kontaminanty byly analyzovány v koření nejčastěji kapalinovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem nebo plynovou chromatografií. V posledních letech se však využívá modernější technika – kapalinová chromatografie s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií (LS-HRMS). [50]

Látka bisfenol A je trvale přítomna v životním prostředí a má schopnost akumulace. Patří do chemických látek narušující endokrinní systém a snaží se napodobit působení hormonů. Tím může narušit homeostázu nebo celkový metabolismus. Zároveň negativně působí na reprodukci nebo může ohrozit vývoj plodu či narozených dětí. U dětí může způsobovat hyperaktivitu. Perfluorované sloučeniny mají podobné účinky. Mohou poškozovat imunitní a endokrinní systém, některé sloučeniny jsou reprotoxické. Dnes jsou plastové materiály nahrazovány biopolymerem. Nedávné inovace vedly ke zlepšení pasivních vlastností biopolymerů v obalech potravin. Jsou pevné, tepelně stabilní a také jejich vlastnosti jsou zohledněny na lidské zdraví. Biopolymerem vznikají kondenzací polysacharidů, proteinů nebo nukleových kyselin. [50]

Mezi další záměrně přidávané cizí složky patří křídový prášek, který byl nalezen např. v indické kurkumě. Kmín je často znehodnocován travním semenem, které je zbarveno prachem z dřevěného uhlí. V šafránu byly nalezeny sušené úponky umělé kukuřice. Všechny tyto znehodnocující látky mají škodlivý dopad na lidské zdraví. [51]

Jeden druh koření může mít odlišný obsah bioaktivních sloučenin dle země původu. Byla provedena studie [52], která stanovovala bioaktivní složky a jiné kontaminanty v mleté paprice pocházející z Bulharska, Číny, Maďarska, Peru, Srbska a Španělska, aby se zjistily nejdůležitější rozdíly v jejich složení a našly se chemické složky, které by odhalily původ

koření. Mezi bioaktivní složky můžeme zařadit karotenoidy (poskytují chuť a barvu papriky), tokoferoly nebo vitamín C. Určení původu koření má velký význam jak z hlediska bezpečnosti potravin, tak i z hlediska komerčního. Ve vzorcích paprik z každé země původu byly zjištěny aromatické složky charakteristické pro danou lokalitu a pomocí těchto látek je možno ověřit pravost původu koření.

Závěr

Tato bakalářská práce se zabývá nejčastěji analyzovanými kontaminanty v koření, mezi které patří mykotoxiny, rezidua pesticidů, těžké kovy a barviva. Koření patří v potravinářském průmyslu mezi nejvíce falšované komodity. Největší rizika vyskytujícího se falšovaného koření pochází především z Indie a Pákistánu. Koření falšují vědomě z důvodu finančního zisku, ale i z nedbalosti a nedostatku řádného hygienického systému zpracování, skladování a přepravy. Rychlá industrializace, neefektivní a nedostatečná kontrola znečištění nebo neuvážené používání chemických látek (hnojiva nebo látky na hubení škůdců, plevelů nebo plísní) – to vše jsou primární zdroje různých kontaminantů v půdě, přes kterou se dostávají do rostlin a tím i do rostlinných produktů. Nejběžnější instrumentální metoda pro analýzu koření je především vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí.

Ke kontaminaci koření mykotoxiny dochází nejčastěji v důsledku nesprávného sklizení a skladování. Tyto látky jsou produkovány plísněmi a mezi nejčastěji sledované mykotoxiny patří aflatoxiny a ochratoxin A, které jsou nejtoxičtější. Obsah mykotoxinů v potravinách je jedna z nejzávažnějších otázek pro potravinářskou bezpečnost a lidské zdraví. Koření se může analyzovat pro kontaminaci mykotoxinů pomocí HPLC spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií či fluorescenční detekcí. Rezidua pesticidů lze analyzovat stejnými způsoby a to zejména organochlorové pesticidy a organofosfáty. Analýzu těchto látek však mohou rušit přítomné přírodní látky (sekundární metabolity, nebo karotenoidy) a proto je potřeba provést správnou extrakci. Pro extrakci pesticidů (i mykotoxinů) byla vyvinuta metoda QuEChERS. Jedná se velmi populární, levnou a rychlou metodu, která využívá extrakci do rozpouštědla (acetonitrilu) se soli a následně se provádí přečištění pomocí disperzní extrakce na tuhou fázi (dSPE).

Těžké kovy nepředstavují pouze riziko pro životní prostředí, ale i pro lidské zdraví. Zemědělská půda je těmito prvky znečištěná díky toxickým odpadům, hnojivům nebo spalováním fosilních paliv. Z půdy se těžké kovy mohou dostat do rostlin, rostlinných produktů (koření) a celkově do celého potravního řetězce. Proto je třeba kontrolovat výskyt těžkých kovů nejen v půdě, ale i v potravinách. Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem je nejpoužívanější metoda pro vícerozložkovou analýzu toxických kovů v koření. Jako další použitelné metody analýzy jsou atomová absorpční spektrometrie (AAS) a atomová emisní spektrometrie (AES).

Díky přírodním pestrým barvám mleté papriky, chilli, kurkumy nebo kari jsou tato koření především kontrolována kvůli obsahu syntetických barviv. Mezi karcinogenní a toxické barvy patří súdánská barviva, která jsou záměrně přidávána do koření, kvůli finančním ziskům. Tato azobarviva se analyzují nejenom chromatograficky s různými druhy spektrometrických detekcí, ale i pomocí elektroforézy či metody ELISA.

Dovážené koření by mělo být pravidelně kontrolováno už jen kvůli stanoveným normám EU. V souvislosti s bezpečností komerčního koření se současné výzkumy zabývají kombinovanými analýzami pro stanovení několik kontaminantů najednou.

Zdroje

- [1] VÁZQUEZ, P. P., FERRER, C., BUENO, M. M. J., FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Pesticide residues in spices and herbs: Sample preparation methods and determination by chromatographic techniques. *Trends in Analytical Chemistry.*, 2019, 115, 13–22.
- [2] REINHOLDS, I., BARTKEVICS, V., SILVIS, I. C. J., RUTH, S. M., ESSLINGER, S. Analytical techniques combined with chemometrics for authentication and determination of contaminants in condiments. *Journal of Food Composition and Analysis.*, 2015, 44, 56-72.
- [3] REINHOLDS, I., PUGAJEVA, I., BAVRINSGALINA, K., KUCKOVSKA, G., BARTKEVICS, V. Mycotoxins, pesticides and toxin metals in commercial spices and herbs. *Food Additives & Contaminants: Pa.*, 2017, 10, 5-14.
- [4] EL DARRA, N., GAMBACORTA, L., SOLFRIZZO, M. Multimycotoxins occurrence in spices and herbs commercialized in Lebanon. *Food Control*, 2019, 95, 63–70.
- [5] KONG, W., WEI, R., LOGRIECO, A. F., WEI, J., WEN, J., XIAO, X., YANG, M. Occurrence of toxigenic fungi and determination of mycotoxins by HPLC-FLD in functional foods and spices in China markets. *Food Chemistry.*, 2014, 146, 320–326.
- [6] MALÍŘ, F., OSTRÝ, V., *Vláknité mikroskopické houby (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka*. Brno: MIKADA, 2003. ISBN 80-7013-395-3.
- [7] Mykotoxiny. *Lékařská fakulta Masarykova univerzita* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2003 [cit. 2019-01-03]. Dostupné z: <http://www.med.muni.cz/predmety/preventivni/MYKOTW/mtobec.htm>
- [8] SANTOS, L., MARÍN, S., SANCHIS, V., RAMOS, A. J. Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in *Capsicum* powder samples available on the Spanish market. *Food Chemistry.*, 2010, 122, 826-830.
- [9] YOGENDRARAJAH, P., JACXSENS, L., SAEGER, S. D., MEULENAER, B. D. Co-occurrence of multiple mycotoxins in dry chilli (*Capsicum annum L.*) samples from the markets of Sri Lanka and Belgium. *Food Control*, 2014, 46, 26–34.
- [10] ZINEDINE, A., BRERA, C., ELAKHDARI, S., CATANO, C., DEBEGNACH, F., ANGELINI, S., DE SANTIS, B., FAID, M., BENLEMLIH, M., MINARDI, V., MIRAGLIA,

M. Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. *Food Control*, 2006, 17, 868–874.

[11] *Nařízení Komise (EU) č. 594/2012 ze dne 5. července 2012, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, pokud jde o maximální limity kontaminujících látek ochratoxinu A, PCB bez dioxinového efektu a melaminu v potravinách*. Brusel, 2012, číslo 594/2012. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=celex:32012R0594>

[12] *Nařízení Komise (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách*. Brusel, 2006, číslo 1881/2006. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=celex:32006R1881>

[13] *Nařízení Komise (EU) č. 165/2010 ze dne 26. února 2010, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, pokud jde o aflatoxiny*. Brusel, 2010, číslo 165/2010. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=celex:32006R1881>

[14] YOGENDRARAJAH, P., VAN POUCKE, Ch., MEULENAER, B. D., SAEGER, S. D. Development and validation of a QuEChERS based liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of multiple mycotoxins in spices. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1297, 1–11.

[15] ROMERA, D., MATEO, E. M., MATEO-CASTRO, R., GÓMEZ, J. V., GIMENO-ADELANTADO, J. V., JIMÉNEZ, M. Determination of multiple mycotoxins in feedstuffs by combined use of UPLC–MS/MS and UPLC–QTOF–MS. *Food Chemistry*., 2018, 267, 140–148.

[16] Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Chemistry Library* [online]. 20. 7. 2018 [cit. 2019-05-15]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumental_Analysis/Mass_Spectrometry/Mass_Spectrometers_\(Instrumentation\)/Electrospray_Ionization_Mass_Spectrometry](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Mass_Spectrometry/Mass_Spectrometers_(Instrumentation)/Electrospray_Ionization_Mass_Spectrometry)

[17] Principles of MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Shimadzu: Excellence in Science* [online]. Copyright, 2019 [cit. 2019-05-15]. Dostupné z: <https://www.shimadzu.com/an/lifescience/maldi/princpl1.html>

[18] POUSTKA, J., Aplikovaná hmotnostní spektrometrie (MS). *Vysoká škola chemicko-technologická, Fakulta potravinářské a biochemické technologie: Ústav analýzy potravin a*

- výživy [online]. [cit. 2019-05-15]. Dostupné z: <https://web.vscht.cz/~poustkaj/AMFA%20JH3%20MS.pdf>
- [19] JEYAKUMAR, J. M. J., ZHANG, M., THIRUVENGADAM, M. Determination of mycotoxins by HPLC, LC-ESI-MS/MS, and MALDI-TOF MS in *Fusarium* species-infected sugarcane. *Microbial Pathogenesis.*, 2018, 123, 98–110.
- [20] ŠTULÍK, K., KOLEKTIV. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [21] *QuEChERS* [online]. Stuttgart, 2011 [cit. 2019-05-15]. Dostupné z: <http://quechers.cvua-stuttgart.de/index.php?nav1o=1&nav2o=0&nav3o=0>
- [22] DSPE (QuEChERS). *Chromservis* [online]. Praha [cit. 2019-05-15]. Dostupné z: <https://www.chromservis.eu/i/dspe-quechers?lang=CZ>
- [23] COLAK, H. Determination of Aflatoxin Contamination in Red-Scaled, Red and Black Pepper by ELISA and HPLC. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2006, 14, 292–296.
- [24] BHANDARI, G., ZOMER, P., ATREYA, K., MOL, H. G. J., YANG, X., GEISSEN, V. Pesticide residues in Nepalese vegetables and potential health risks. *Environmental Research*, 2019, 172, 511–521.
- [25] Pesticidy aneb globální chemická hrozba. *Webchemie* [online]. Praha: Creative Commons, 2010 [cit. 2019-05-15]. Dostupné z: <https://www.webchemie.cz/pesticidy.html>
- [26] File: DDT name explanation. *Wikimedia Commons* [online]. Creative Commons, 2019 [cit. 2019-05-15]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DDT_name_explanation.svg
- [27] REINHOLDS, I., PUGAJEVA, I., BARTKEVICS, V. A reliable screening of mycotoxins and pesticide residues in paprika using ultra-high performance liquid chromatography coupled to high resolution Orbitrap mass spectrometry. *Food Control*, 2016, 62, 683–689.
- [28] DRABOVA, L., ALVAREZ-RIVERA, G., SUCHANOVA, M., SCHUSTEROVA, D., PULKRABOVA, J., TOMANIOVA, M., KOCOUREK, V., CHEVALLIER, O., ELLIOTT, Ch., HAJŠLOVA, J. Food fraud in oregano: Pesticide residues as adulteration markers. *Food Chemistry.*, 2019, 276, 726–734.
- [29] ABOU-ARAB, A. K., ABOU DONIA, M. A. Pesticide residues in some Egyptian spices and medicinal plants as affected by processing. *Food Chemistry.*, 2001, 72, 439–445.

- [30] HARANGOZO, L., ŠNIRC, M., ÁRVAY, J., BAJČAN, D., BYSTRICKÁ, J., TREBICHALSKÝ, P., KOVAROVIČ, J., JANČO, I. The Heavy Metal Content in Selected Kind of Spices. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2018, 8, 760–764.
- [31] POUZAR, Miroslav. Toxikologie těžkých kovů – 2 (Pb a Cd), Presentation presented at: [Toxikologie v HA-C1; 2016 Nov 13; Pardubice; Czechia.]
- [32] RICHARD, K. Toxické prvky v životním prostředí a v potravinách: Úvod, výskyt v životním prostředí a toxicita, toxikologie a výskyt prvků v potravinách [online]. [cit. 2019-05-15]. Dostupné z: https://web.vscht.cz/~koplikr/Toxick%C3%A9%20prvky_4r.pdf
- [33] GUPTA, S., PANDOTRA, P., GUPTA, A. P., DHAR, J. K., SHARMA, G., RAM, G., HUSAIN, M. K., BEDI, Y. S. Volatile (As and Hg) and non-volatile (Pb and Cd) toxic heavy metals analysis in rhizome of Zingiber officinale collected from different locations of North Western Himalayas by Atomic Absorption Spectroscopy. *Food and Chemical Toxicology.*, 2010, 48, 2966–2971.
- [34] GIUSEPPE BUA, D., ANNUARIO, G., ALBERGAMO, A., CICERO, N., DUGO, G. Heavy metals in aromatic spices by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants.*, 2016, 9, 210–216.
- [35] HOLZBECHER, Z., CHURÁČEK, J. Analytická chemie. Praha: SNTL, 1987. ISBN 04-612-87.
- [36] KILIC, S., BURAK CAM, I., TONGUR, T., KILIC, M. Health Risk Assessment of Exposure to Heavy Metals and Aflatoxins via Dietary Intake of Dried Red Pepper from Marketplaces in Antalya, Southern Turkey. *Journal of Food Science.*, 2018, 83, 2675–2681.
- [37] BIELICKA-GIĘLDOŃ, A., RYŁKO, E. Estimation of Metallic Elements in Herbs and Spices Available on the Polish Market. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2013, 22, 1251–1256.
- [38] BAIG, J. A., BHATTI, S., GUL KAZI, T., AFRIDI, H. I. Evaluation of Arsenic, Cadmium, Nickel and Lead in Common Spices in Pakistan. *Biological Trace Element Research.*, 2019, 187, 586–595.
- [39] MARTINS, N., RORIZ, C. L., MORALES, P., BARROS, L., FERREIRA, I. C. F. R. Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agroindustries to ensure consumer expectations and regulatory practices. *Trends in Food Science & Technology.*, 2016, 52, 1–15.

- [40] PÉRIAT, A., BIERI, S., MOTTIER, N. SWATH-MS screening strategy for the determination of food dyes in spices by UHPLC-HRMS. *Food Chemistry: X*, 2019, 1, 1–10.
- [41] DI ANIBAL, C. V., MARSAL, L. F., PILAR CALLAO, M., RUISÁNCHEZ, I. Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) and multivariate analysis as a screening tool for detecting Sudan I dye in culinary spices. *Spectrochimica Acta, Part A*, 2012, 87, 135–141.
- [42] KHALIKOVA, M. A., ŠATÍNSKÝ, D., ŠMIDRKALOVÁ, T., SOLICH, P. On-line SPE–UHPLC method using fused core columns for extraction and separation of nine illegal dyes in chilli-containing spices. *Talanta*, 2014, 130, 433–441.
- [43] ZHU, Y., WU, Y., ZHOU, Ch., ZHAO, B., YUN, W., HUANG, S., TAO, P., TU, D., CHEN, S. A screening method of oil-soluble synthetic dyes in chilli products based on multi-wavelength chromatographic fingerprints comparison. *Food Chemistry.*, 2016, 192, 441–451.
- [44] BERLINA, A. N., ZHERDEV, A. V., XU, CH., EREMIN, S. A., DZANTIEV, B. B. Development of lateral flow immunoassay for rapid control and quantification of the presence of the colorant Sudan I in spices and seafood. *Food Control*, 2017, 73, 247–253.
- [45] GÖSELOVÁ, S., BLAŽKOVÁ, M., HOLUBOVÁ, B., KARAMONOVÁ, L., RAUCH, P. Imunodetekce v laterálním toku na membráně. *Chemické Listy*, 2014, 108, 114–119.
- [46] DI ANIBAL, C. V., RODRÍGUEZ, M. S., ALBERTENGO, L. Synchronous fluorescence and multivariate classification analysis as a screening tool for determining Sudan I dye in culinary spices. *Food Control*, 2015, 56, 18–23.
- [47] RAJABI, M., SABZALIAN, S., BARFI, B., ARGHAVANI-BEYDOKHTI, S., ASGHARI, A. In-line micro-matrix solid-phase dispersion extraction for simultaneous separation and extraction of Sudan dyes in different spices. *Journal of Chromatography A*, 2015, 1425, 42–50.
- [48] DI ANIBAL, C. V., ODENA, M., RUISÁNCHEZ, I., PILAR CALLAO, M. Determining the adulteration of spices with Sudan I-II-III-IV dyes by UV–visible spectroscopy and multivariate classification techniques. *Talanta*, 2009, 79, 887–892.
- [49] CLEMENSON, S., MUGGERIDGE, M., CLAY, M. Handbook of Herbs and Spices. 2nd ed. vol. 1. 2012. 2., Quality specifications for herbs and spices, 25–41.
- [50] SANCHIS, Y., YUSÀ, V., COSCOLLÀ, C. Analytical strategies for organic food packaging contaminants. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1490, 22–46.

[51] SILVIS, I. C. J., RUTH, S. M., FELS-KLERX, H. J. D., LUNING, P. A. Assessment of food fraud vulnerability in the spices chain: An explorative study. *Food Control*, 2017, 81, 80–87.

[52] MOLNÁR, H., KÓNYA, É., ZALÁN, Z., BATA-VIDÁCS, I., TOMOSKOZI-FARKAS, R., SZÉKÁCS, A., ADÁNYI, N. Chemical characteristics of spice paprika of different origins. *Food Control*, 2018, 83, 54–60.