

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2021

Eliška Štumrová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Elektrochemické chování vybraných aromatických látek  
a jejich voltametrické stanovení ve vzorcích koření

Diplomová práce

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Eliška Štumrová**  
Osobní číslo: **C19572**  
Studijní program: **N1407 Chemie**  
Studijní obor: **Analytická chemie**  
Téma práce: **Elektrochemické chování vybraných aromatických látek a jejich voltametrické stanovení ve vzorcích koření**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

### Zásady pro vypracování

1. V teoretické části se zaměřte na biologické vlastnosti aromatických látek, jež bývají obsaženy v koření a popište možnosti jejich izolace. Dále se pokuste nalézt popis elektrochemického chování pro konkrétní příklady látek – eugenol, anetol a myristicin a přitom sestavte i přehled instrumentálních metod, vyvinutých k jejich stanovení v přírodním koření.
2. V praktické části se věnujte studiu elektrochemického chování vybraných aromatizujících látek na uhlíkových pastových elektrodách a vývoji voltametrické metody, která by našla uplatnění k jejich stanovení.
3. Dosažené výsledky diskutujte a na závěr kriticky zhodnoťte.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **prof. Ing. Ivan Švancara, Dr.**  
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Milan Sýs, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2021**

Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Ing. Karel Ventura, CSc.**  
vedoucí katedry

**Prohlašuji:**

Práci s názvem Elektrochemické chování vybraných aromatických látek a jejich voltametrické stanovení ve vzorcích koření 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 9. 7. 2021

Eliška Štumrová v.r.

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala prof. Ing. Ivanu Švancarovi, Dr., za pomoc a připomínky během vypracování této diplomové práce. Dále můj dík patří Ing. Milanu Sýsovi, Ph.D. za pomoc při měření i zpracování výsledků a textu práce. Nakonec bych ráda poděkovala své rodině za podporu a trpělivost.

## **Anotace**

Diplomová práce se zabývá elektrochemickým chováním vybraných aromatických látek v koření. Jmenovitě šlo o anethol, eugenol a myristicin, přičemž předmětem zájmu byly i možnosti jejich stanovení na elektrodě ze skelného uhlíku. Elektrochemické chování uvedených látek bylo studováno pomocí cyklické voltametrie, zatímco k jejich analýze v modelových a reálných vzorcích se osvědčila square-wave voltametrie.

Klíčová slova: anethol, eugenol, myristicin, voltametrická studie a analýza, koření

**Title:** Electrochemical behaviour of selected flavouring substances and their voltammetric determination in spice samples

## **Annotation**

This diploma thesis deals with the electrochemical behaviour of selected flavouring substances in spices; namely, anethol, eugenol, and myristicine, followed by interest in possibilities of their determination at the glassy carbon electrode. Electrochemical behaviour of the respective substances was investigated by cyclic voltammetry, whereas their analysis in model and real samples was performed with the aid of square-wave voltammetry.

Key words: anethole, eugenol, myristicin, voltammetric study and analysis, spices

# Obsah

<b>0</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>12</b>
<b>1</b>	<b>AROMATICKÉ LÁTKY V KOŘENÍ.....</b>	<b>13</b>
1.1	Vlastnosti anetholu, eugenolu a myristicinu .....	13
1.1.1	Anethol.....	13
1.1.2	Eugenol .....	16
1.1.3	Myristicin .....	19
<b>2</b>	<b>INSTRUMENTÁLNÍ TECHNIKY V ANALÝZE KOŘENÍ .....</b>	<b>21</b>
2.1	Chromatografické techniky .....	21
2.1.1	Tenkovrstvá chromatografie.....	21
2.1.2	Plynová chromatografie .....	21
2.1.3	Kapalinová chromatografie .....	22
2.1.4	Elektroforetické metody.....	22
2.2	Spektrální techniky .....	22
2.2.1	UV/VIS spektrometrie .....	22
2.2.2	Infračervená a Ramanova spektrometrie.....	23
2.2.3	NMR spektrometrie .....	23
2.2.4	MS spektrometrie.....	23
2.3	Elektrochemické techniky .....	23
<b>3</b>	<b>ELEKTROCHEMIE A ELEKTROANALÝZA VYBRANÝCH AROMATICKÝCH LÁTEK .....</b>	<b>25</b>
3.1	Elektrochemie a elektroanalýza anetholu.....	25
3.2	Elektrochemie a elektroanalýza eugenolu.....	26
3.3	Elektrochemie a elektroanalýza myristicinu.....	28
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>29</b>
4.1	Použité chemikálie .....	29
4.2	Použité přístroje a zařízení .....	29
4.3	Příprava roztoků.....	30
4.3.1	Britton-Robinsonův pufr.....	30
4.3.2	Roztoky kyselin .....	31
4.3.3	Roztoky standardů .....	31
4.4	Parametry elektrochemických metod.....	31
4.5	Pracovní postupy.....	31
4.5.1	Cyklická voltametrie.....	31
4.5.2	Square-wave voltametrie.....	32
4.5.3	Extrakce.....	32



<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>33</b>
5.1	Elektrochemické chování vybraných aromatických látek.....	33
5.1.1	Anethol.....	33
5.1.2	Eugenol .....	35
5.1.3	Myristicin .....	37
5.1.4	Poloha píků vybraných látek .....	39
5.2	Vývoj voltametrické metody .....	40
5.2.1	Výběr pracovní elektrody.....	40
5.2.2	Výběr pracovního elektrolytu.....	40
5.2.3	Výběr voltametrické techniky .....	42
5.2.4	Validace vyvinuté metody.....	47
5.3	Analýza koření.....	54
5.3.1	Úprava vzorku k analýze.....	54
5.3.2	Výsledky analýzy.....	55
	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>60</b>
	<b>POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>61</b>

## Zkratky a značky

BDDE	bórem dotovaná diamantová elektroda („boron-doped diamond electrode“)
CPE	uhlíková pastová elektroda („carbon paste electrode“)
CV	cyklická voltametrie („cyclic voltammetry“)
DPV	diferenčně-pulsní voltametrie („differential pulse voltammetry“)
GC	plynová chromatografie („gas chromatography“)
GCE	elektroda ze skelného uhlíku („glassy carbon electrode“)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie („high-performance liquid chromatography“)
IR	infračervené („infrared“)
LD <sub>50</sub>	dávka v mg/kg, která do 24 hodin od podání usmrtí 50 % testovaných jedinců („lethal dose 50 %“)
LOD	mez detekce („limit of detection“)
LOQ	mez stanovitelnosti („limit of quantification“)
MS	hmotnostní spektrometrie („mass spectrometry“)
NMR	nukleární magnetická rezonance („nuclear magnetic resonance“)
PGE	tužková grafitová elektroda („pencil graphite electrode“)
SCE	nasycená kalomelová elektroda („saturated calomel electrode“)
SWV	voltametrie čtvercových vln („square-wave voltammetry“)
UV	ultrafialové („ultraviolet“)
VIS	viditelné („visible“)

## Seznam obrázků

<b>Obr. 1</b> Titulní stránka referátu k jubileu elektrod z uhlíkových past na Univerzitě Pardubice a přebal monografie, která je věnována CPE [1; 2] .....	12
<b>Obr. 2</b> Chemická struktura anetholu ( <i>trans</i> -izomer).....	13
<b>Obr. 3</b> Anýz.....	14
<b>Obr. 4</b> Badián .....	15
<b>Obr. 5</b> Chemická struktura eugenolu.....	16
<b>Obr. 6</b> Hřebíček .....	17
<b>Obr. 7</b> Nové koření .....	18
<b>Obr. 8</b> Chemická struktura myristicinu.....	19
<b>Obr. 9</b> Muškátový oříšek .....	20
<b>Obr. 10</b> Třielektrodová měřicí cela .....	30
<b>Obr. 11</b> Elektrochemická oxidace anetholu [53].....	33
<b>Obr. 12</b> Elektrochemická oxidace eugenolu .....	35
<b>Obr. 13</b> Oxidace myristicinu .....	37
<b>Obr. 14</b> Extrakty koření .....	54

## Seznam tabulek

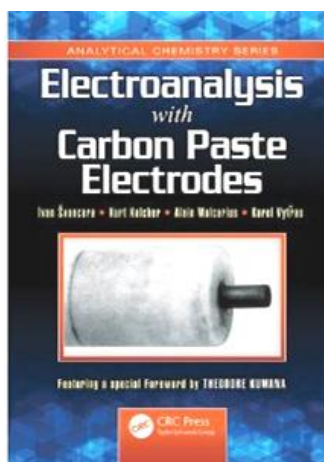
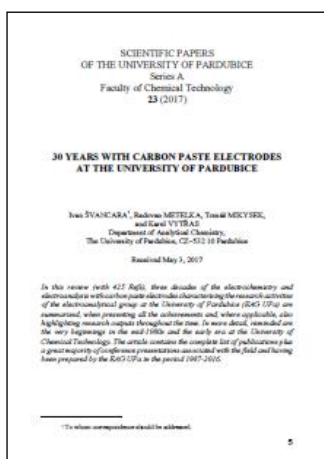
<b>Tab. 1</b> Výsledky měření pro modelové vzorky.....	47
<b>Tab. 2</b> Porovnání této metody s již dříve použitými metodami.....	53
<b>Tab. 3</b> Vzorky koření.....	55

## Seznam záznamů a grafů

Záznam 1	Cyklická voltametrie anetholu [53] .....	25
Záznam 2	Cyklická a diferenčně-pulsní voltametrie eugenolu [60].....	27
Záznam 3	Voltametrická analýza eugenolu, thymolu a karvakrolu [61] .....	28
Záznam 4	Cyklická voltametrie anetholu (dva cykly).....	33
Záznam 5	Závislost oxidace anetholu na hodnotě pH .....	34
Záznam 6	Cyklická voltametrie eugenolu (dva cykly) .....	35
Záznam 7	Závislost oxidace eugenolu na hodnotě pH .....	36
Záznam 8	Cyklická voltametrie myristicinu (dva cykly).....	37
Záznam 9	Závislost oxidace myristicinu na hodnotě pH .....	38
Záznam 10	Poloha píků vybraných látek .....	39
Záznam 11	Přídavek anetholu a myristicinu.....	39
Záznam 12	Cyklická voltametrie vybraných kyselin .....	40
Záznam 13	Square-wave voltametrie vybraných kyselin .....	41
Záznam 14	Vliv koncentrace $\text{HClO}_4$ na separaci píků.....	41
Záznam 15	Opakovatelnost měření pro signály u jednotlivých látek.....	43
Záznam 16	Optimalizace amplitudy u SWV-rampy .....	44
Záznam 17	Optimalizace frekvence u SWV-rampy .....	45
Záznam 18	Průběh adsorpce na elektrodu .....	46
Záznam 19	Studium vlivu počátečního potenciálu .....	46
Záznam 20	Analýza modelových vzorků.....	48
Záznam 21	Kalibrace anetholu (záznam a výsledný graf) .....	49
Záznam 22	Kalibrace eugenolu (záznam a výsledný graf) .....	50
Záznam 23	Kalibrace myristicinu (záznam a výsledný graf) .....	51
Záznam 24	Záznamy z kalibrace eugenolu za přítomnosti anetholu a myristicinu .....	52
Záznam 25	Záznamy z kalibrace anetholu za přítomnosti eugenolu a myristicinu .....	52
Záznam 26	Analýza extraktu anýzu.....	56
Záznam 27	Analýza extraktu hřebíčku.....	57
Záznam 28	Analýza extraktu muškátového oříšku .....	57
Záznam 29	Kalibrace eugenolu z absolutní výšky (záznam a výsledný graf) .....	58
Záznam 30	Kalibrace myristicinu s přídavky eugenolu (záznam a výsledný graf).....	59

## Úvod

Elektrochemická a elektroanalytická měření s uhlíkovými pastovými elektrodami (CPE) mají na Katedře analytické chemie Univerzity Pardubice (UPa) více jak třicetiletou tradici a téměř stejnou dobu představují poznávací značku elektro-analytické skupiny jak u nás, tak i ve světě. Velmi rozmanité aktivity při výzkumu a využití CPE dokládá i nedávno uveřejněný referát [1], který zahrnuje na čtyři stovky odkazů na odborná sdělení, zahrnující původní publikace, konferenční příspěvky, ale i souhrnné referáty a v neposlední řadě vůbec první monografii, vydanou v prestižním nakladatelství v USA [2], na níž mají zásadní podíl právě pardubičtí elektroanalytici. Oba spisy (viz obr. 1) citují i několik desítek diplomových prací z UPa; jinými slovy, i naši diplomanti mají na výsledcích a věhlasu pardubické elektrochemické školy na poli elektroanalýzy s CPE svůj podíl.



**Obr. 1** Titulní stránka referátu k jubileu elektrod z uhlíkových past na Univerzitě Pardubice a přebal monografie, která je věnována CPE [1; 2]

Na počátku třetí dekády nového tisíciletí, ve složitém období pandemie koronaviru COVID-19, vědecko-výzkumná práce s CPE pokračuje, a to společně s příbuznými uhlíkatými konfiguracemi typu elektrody ze skelného grafitu (GCE) nebo s litograficky tištěnými senzory a články (SPE), v posledních letech se stále výraznější orientací na klinickou, farmaceutickou a potravinářskou analýzu biologicky důležitých látek. A opět řešení konkrétních problémů z této oblasti — v současnosti preferované — jsou věnovány četné diplomové práce, namátkou z těch nedávných třeba příspěvky k vývoji metod ke stanovení některých přírodních alkaloidů, sloučenin ze skupiny přírodních olejů, vitamínů či vybraných léčiv a potravinových doplňků.

Nejnovejším příspěvkem v tomto směrování je tato diplomová práce, věnovaná studiu elektrochemického chování vybraných aromatických látek a eventuálnímu návržení příslušných metod pro jejich voltametrické stanovení ve vzorcích koření.

# 1 Aromatické látky v koření

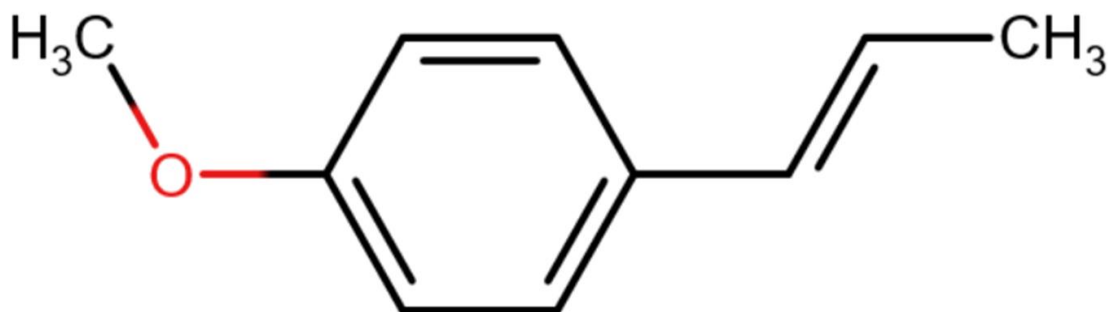
Koření lze definovat jako sušené části aromatických rostlin. Různá koření obsahují mnoho různých aromatických látek. Tato práce se bude zabývat pouze třemi vybranými. Do experimentální části této práce byly vybrány anethol, eugenol a myristicin. Anethol můžeme nalézt například v anýzu, fenyklu nebo estragonu. Eugenol se vyskytuje v novém koření, skořici, manioku či hřebíčku. Myristicin se nachází hlavně v muškátovém oříšku [3].

## 1.1 Vlastnosti anetholu, eugenolu a myristicinu

Koření, a tedy i aromatické látky v něm obsažené, se používá hlavně pro dochucování jídel, má však i jiné funkce. Koření obsahuje antioxidanty, je tedy možné ho použít ke zvýšení trvanlivosti potravin. Antioxidanty mají také dobrý vliv na lidský organismus, pomáhají bránit tělo před kardiovaskulárními onemocněními, určitými druhy rakoviny či astmatem [3].

### 1.1.1 Anethol

Anethol, neboli 1-methoxy-4-(1-propenyl)benzen (viz. obr. 2), je aromatická látka s molekulovou hmotností 148,2 g/mol. Vyskytuje se ve dvou modifikacích, a to buď jako cis- nebo jako trans-izomer. Jako hlavní izomer se vyskytuje trans-. Jedná se o krystalickou látku s vůní anýzu a sladkou chutí. Jeho hustota je 0,9883 g/l, bod tání 21,5 °C a bod varu 234 °C (101,7 kPa). Je málo rozpustný ve vodě, rozpustný v chloroformu a etheru. Anethol lze oxidovat na anisaldehyd (pomocí  $H_2CrO_4$ ), případně až na kyselinu anisovou, nebo dehydrogenovat na 1-methoxy-4-propylbenzen [4; 5; 6].



Obr. 2 Chemická struktura anetholu (trans-izomer)

Anethol můžeme nalézt v anýzovém oleji (80 až 90 %), badiánovém oleji (> 90 %) nebo ve fenyklovém oleji (80 %). Získává se buď izolací z olejů bohatých na anethol pomocí destilace či krystalizace, nebo ho lze syntetizovat z derivátů anisolu. Používá se k výrobě kosmetických produktů, likérů nebo jako stabilizátor u barevných fotografií. Měl by být skladován ve tmě [4; 5].

Na anethol je velmi bohatý anýz (viz. obr. 3). Jedná se o jednoletou rostlinu dorůstající výšky 30 až 50 cm a pokrytou jemnými chlupy. Má drobné bílé květy, ze kterých vznikají šedo zelené až šedohnědé plody podobné semenům. Plody jsou 3 až 5 mm dlouhé, 1,5 až 2,5 mm široké a 2 až 4 mm silné. Rostlina potřebuje teplé a dlouhé vegetační období a horké léto, aby dozrála semena. Anýz se pěstuje v mnoha zemích, například v Turecku, Řecku, Itálii nebo v Indii. Vyváží se především z Turecka, Egypta a Španělska. V obchodech lze koupit anýz obsahující celé plody [7].



**Obr. 3** Anýz

Významné množství anetholu se nachází také v badyánu (viz. obr. 4). Jedná se koření ve tvaru hvězdice, která má nejčastěji osm folikulů. Získává se ze stromu z čeledi šácholanovitých. Badián pochází z Číny. Dnes se komerčně vyrábí pouze v Číně a Vietnamu. Jeho produkce je odhadována na více než 25 Gt ročně. Má charakteristický anýzový zápach. Badyánový olej se získává parní destilací čerstvých plodů [8; 9].



**Obr. 4** *Badián*

Anýz a anethol mají řadu funkčních vlastností, konkrétně jsou antibakteriální, fungicidní či působí jako antioxidant. Anethol vykazuje významnou antifungální aktivitu proti členům rodu *Aspergillus* a inhibuje růst mykotoxinů. Působí kompetitivně s dopaminovými receptory. Často se používá ve směsích proti kašli a může být použit i jako inhalační prostředek při ucpaní dýchacích cest. Můžeme se s ním setkat i v čajích. Průměrná denní dávka anýzu je 3,0 g semene nebo 0,3 g oleje. Nápojový extrakt z anýzu podporuje absorpci železa (testováno ve vázaných střevních segmentech potkanů). Olej se přidává do mastí při bolestech svalů. Další testy na potkanech také prokázaly, že anethol stimuluje regeneraci jater. Strukturou je anethol podobný některých estrogením látkám a lze ho tedy použít ke zvýšení sekrece mléka, usnadnění porodu nebo k podpoře menstruace. Anýz je považován za afrodiziakum a je tedy používán ke zvýšení libida. Olej se dá používat nejen vnitřně, ale i zevně, například pro ošetření svrabu, pomáhá při prevenci vši nebo proti bronchiálním potížím [7].

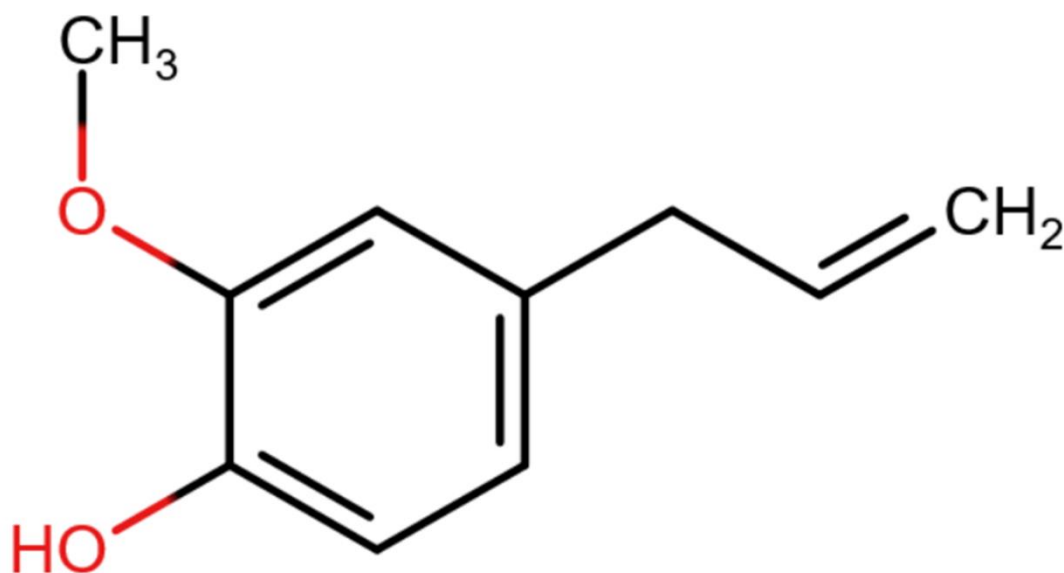
Anethol může způsobit u potkanů hepatotoxicitu. Při běžné konzumaci člověkem se však žádné riziko nepředpokládá, jelikož majoritní izomer je trans-anethol, který je mnohem méně toxický než cis-anethol. Cis-anethol se však může uvolňovat při špatném skladování bez ochrany denního světla. U syntetického anetholu je vyšší zastoupení cis-anetholu než u přírodního, proto je v potravinářství používán pouze přírodní. U anetholu byla zjišťována jeho toxicita pomocí LD<sub>50</sub> při orálním podání u krys. Výsledek pro cis-izomer je 150 mg/kg



a pro trans-izomer 2 090 mg/kg. Může způsobovat i alergie, proto je doporučeno ho nepoužívat v souvislosti se zánětlivými či alergickými stavy pokožky. Alergie na anýz je často spojena s alergií na pyl nebo jiná koření či bylinky. Při nadměrné konzumaci může anethol vyvolávat nevolnost, zvracení, záchvaty nebo plicní edém [4; 7].

### 1.1.2 Eugenol

Eugenol, neboli 2-methoxy-4-(prop-2-en-1-yl)fenol (viz. obr. 5), je aromatická látka s molekulovou hmotností 164,2 g/mol. Jedná se o bezbarvou až nažloutlou kapalinu či olej se štiplavým hřebíčkovým zápachem. Jeho bod tání je  $-10,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ , bod varu  $253,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  a hustota 1,064-1,070 g/l. Je rozpustný v ethanolu a většině organických rozpouštědel a omezeně i ve vodě. Katalytickou hydrogenací lze eugenol převést na dihydroeugenol. Eugenol lze i esterifikovat či etherifikovat, kdy vznikají cenné vonné a aromatické látky, jako například eugenol-acetát nebo eugenol-methylether [10; 11; 12].



Obr. 5 Chemická struktura eugenolu

Eugenol se vyskytuje v mnoha éterických olejích, například v hřebíčkovém oleji (> 80 %), v novém koření a oleji z nového koření (60-90 %) nebo ve skořicovém oleji (80 %). V praxi lze eugenol syntetizovat nebo získat izolací z éterických olejů, zejména z hřebíčkového listového oleje nebo ze skořicového listového oleje. Syntéza se však téměř nepoužívá. Z olejů izolujeme eugenol pomocí extrakce roztokem NaOH a následné destilace vodní parou.

Vzniklý alkalický roztok se okyselí a destilací při nízké teplotě se získá čistý eugenol. Používá se jako vůně do parfémů, jako dezinfekční prostředek, jako ochucovadlo v potravinářství nebo ve farmacii jako analgetikum, anestetikum či antiseptikum, a to zejména ve stomatologii. Měl by být skladován na chladném a suchém místě v těsně uzavřených nádobách, v chladničce pod inertním plynem. Je nutné jej chránit před světlem a teplem [10; 11; 12; 13].

Eugenol se nachází v hřebíčku (viz. obr. 6), který je získáván ze stromu z čeledi myrtovitých. Jedná se o středně velký, vždyzelený strom dorůstající výšky až 20 m. Strom může žít až 100 let. Jsou záznamy o stromech starších 350 let. Květenství jsou složená, skládající se z 15 až 50 květů. Hřebíček pochází z Indonésie. Jako hlavní vývozce je Indonésie, dováží se však i ze Zanzibaru, Madagaskaru a dalších afrických zemích. Koření, které se prodává v obchodech, jsou sušená neotevřená poupata. Kvalitu koření snižuje buď brzký sběr, nebo naopak přezralost. Sušení se provádí nejčastěji na slunci, ale je možné použít i sušičku. Při dlouhodobém skladování hřebíčku se obsah eugenolu ještě zvyšuje [14].



**Obr. 6** *Hřebíček*

Hlavním zdrojem eugenolu je nové koření (viz. obr. 7), které získáváme ze vždyzeleného stromu z čeledi myrtovitých, stejně jako hřebíček. Jedná se o malý dvoudomý strom se štíhlým kmenem, který je na konci hojně rozvětven. Z bílých květů vznikají kulovité zelené bobule, které po usušení zhnědnou. Roste převážně v tropech. Největším producentem a vývozcem nového koření je Jamajka. Nové koření se prodává jako celé sušené plody,

nebo jako mleté. Olej z nového koření získáváme nejčastěji superkritickou extrakcí CO<sub>2</sub> při tlaku 35 MPa a teplotě 50 °C. Další možnost výroby je pomocí destilace. Listový olej je na eugenol bohatší než bobulový olej. Nové koření se používá v potravinářství, ve farmacii a v parfémovém průmyslu [15; 16].



**Obr. 7** *Nové koření*

Eugenol můžeme nalézt i ve skořici. Skořice se získává z tropického vždyzeleného stromu z čeledi vavřínovitých. Pěstuje se v nejmokřejších nížinných oblastech jihovýchodní Asie. Skořice používaná jako koření je sušená část střední části kůry. Prodává se buď jako ostny nebo mletá na prášek. Pro získání eugenolu se skořice moc nepoužívá [17].

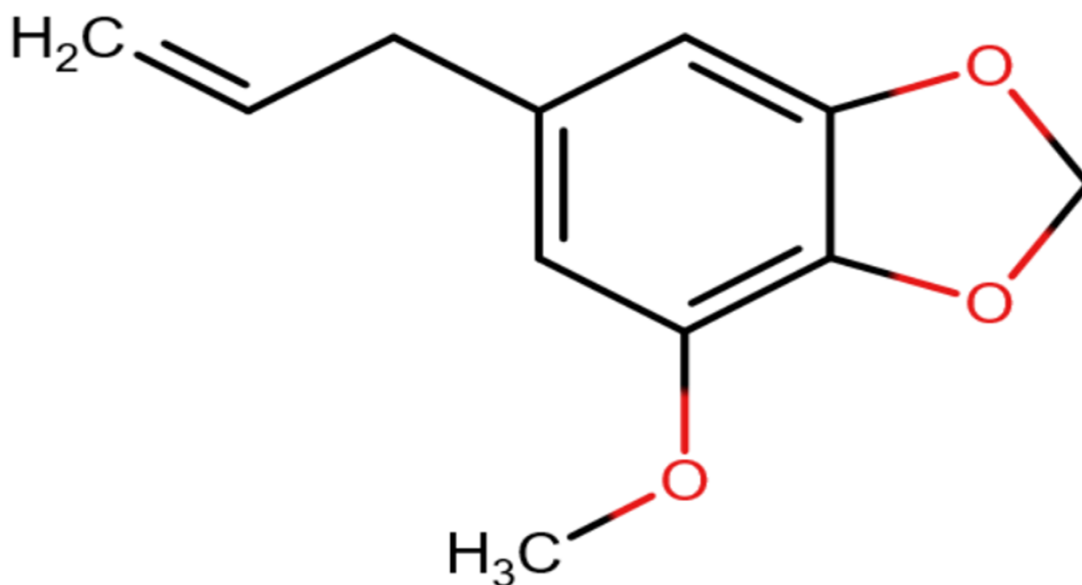
Eugenol má léčivé a antimikrobiální účinky. Používá se k léčbě plynatosti, průjmu, bronchitidy, úplavice, poruchám trávení, depresí a stresu. V malých dávkách může pomoci léčit revmatismus, artritidu či kašel. Má také silný baktericidní účinek například proti *Salmonelle* nebo *Stafylokokovi*. Jeho baktericidní účinek je dokonce silnější než u anetholu. Má také slibnou nematocidní aktivitu, to znamená, že působí proti červům. Eugenol působí jako antioxidant, přesněji zachycuje hydroxylové radikály. Pro své chuťové a antiseptické vlastnosti je eugenol používán pro výrobu mýdel, parfémů nebo zubních past. Maximální obsah eugenolu se pohybuje v řádech setin až desetin procent, protože ve větších množstvích má silné nežádoucí účinky. Často se používá v zubním lékařství jako anestetikum [14; 15; 17].

Eugenol dráždí lidskou pokožku, je potenciální alergen a experimentální karcinogen a mutagen. Toxicita eugenolu byla testována na krysách při orálním podání, kde LD<sub>50</sub> = 1930 mg/kg. Při krátkodobé expozici může eugenol u lidí vyvolat podráždění kůže,

očí či dýchacích cest. Při požití způsobuje zvracení, bolesti břicha, nevolnost, průjem či křeče až v takovém rozsahu, že může dojít k poškození trávicího traktu a jater. Při vdechnutí vyvolává podráždění průdušek, závratě nebo plicní edém. Při kontaktu s kůží často vzniká podráždění či zánět. U dlouhodobé expozice na kůži způsobuje alergickou dermatitidu, je schopen způsobit nevratné poškození ledvin, jater nebo plic [10; 11; 13].

### 1.1.3 Myristicin

Myristicin, neboli 3-methoxy,4,5-methylenedioxy-allylbenzen (obr. 8), je aromatická látka s molekulovou hmotností 192,21 g/mol. Jedná se o olej. Jeho bod tání je  $-19,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ , bod varu  $276,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  a hustota 1,541 g/l. Je rozpustný v ethanolu, etheru a benzenu [18; 19].



Obr. 8 Chemická struktura myristicinu

Vyskytuje se převážně v muškátovém oříšku (viz. obr. 9), kde je zodpovědný za jeho typickou vůni. Dále se s ním můžeme v menší míře setkat také v mrkvi, v anýzovém oleji, celeru nebo černém pepři. Používá se v potravinářském průmyslu do masných výrobků, omáček, polévek a dalších slaných i sladkých pokrmů. Ve farmacii se používá při aromaterapii a proti stresu. Dále se používá do parfémů, pro denaturaci tuků v mýdlovém průmyslu nebo jako výchozí složka pro výrobu jiných chemických sloučenin. Při skladování by měl být chráněn před světlem a vysokou teplotou [18; 20; 21; 22; 23].



**Obr. 9** *Muškatový oříšek*

Muškatový oříšek se získává ze stromu muškátovníku vonného z čeledi muškátovníkovitých. Strom dorůstá výšky 4 až 13 metrů. Jeho plody jsou visící, žluté, hladké, 7 až 10 cm dlouhé. Uvnitř plodu je 2 až 3 cm dlouhé hnědé semínko. Koření muškátový oříšek je sušené jádro semene, muškátový květ je potom sušené okolí semene. Suší se převážně na slunci, někdy i v horkovzdušné troubě. Pěstuje se převážně v západní Indii. Olej se z muškátového oříšku vyrábí destilací vodní parou nebo extrakcí [21; 22].

Myristicin působí jako insekticid. Je také inhibitorem monoaminoxidázy. Ve farmacii jsou používány pro své karminativní a stimulační účinky. Je deodorativní, narkotický, afrodiziakální a užitečný při nadýmání, nevolnosti a zvracení. Je považován za lék na poruchy trávení, dehydrataci způsobenou zvracením a průjmem, na nachlazení a související poruchy. Používá se při léčbě močového měchýře, impotence, nespavosti a kožních onemocnění. Myristicin také vykazuje dobrou antibakteriální a antimikrobiální aktivitu proti některým bakteriím, včetně *Escherichia coli* [18; 21; 22; 24].

Má podobné účinky jako ethanol, přesněji halucinogenní až narkotické. Vyšší dávky vyvolávají příznaky stejné, jako otrava ethanolem, jako je nevolnost, deprese nebo otupělost. Halucinogenní aktivita myristicinu je způsobena jeho metabolizací na aktivní sloučeninu, která má podobný účinek jako LSD. Myristicin ve velkém množství vyvolává narkózu, ospalost, epileptické křeče a dokonce i smrt. Toxicita myristicinu byla testována na kryse při orálním podání, kde  $LD_{50} = 4260$  mg/kg. Myristicin ve velkém množství může způsobit tukovou degeneraci jater [18; 20; 22; 25].

## 2 Instrumentální techniky v analýze koření

Pomocí chemické analýzy koření se zjišťuje hlavně jeho kvalita. Důležité je také zjistit, zda dané koření neobsahuje látky, které by negativně ovlivnily lidský organismus nebo dokonce způsobily smrt. Chemická analýza pomáhá také při odhalování falšování koření. Bylo vyvinuto hned několik technik pro analýzu koření a stále se vyvíjejí další.

### 2.1 Chromatografické techniky

Chromatografické techniky jsou nejspíše nejpoužívanější skupinou technik pro analýzu koření. Jejich výhodou je, že účinně oddělují směs složek na jednotlivé části. Tyto metody ale mohou být zdlouhavé a nákladné.

#### 2.1.1 Tenkovrstvá chromatografie

Pro určité analýzy je použitelná i tenkovrstvá chromatografie. Jedná se o barevné vzorky či důkazy přítomnosti barviv. Mezi vzorky patří šafrán, prášky z papriky, kurkumy, chilli nebo kari. Například Schwack W. a spol. [26] vyvinuli metodu pro analýzu přítomnosti azobarviv v koření. Byla použita silikagelová deska impregnovaná kofeinem. Pro analýzu šafránu použili tenkovrstvou chromatografii Sereshti H. a spol. [27] nebo Bhooma V. a spol. [28].

#### 2.1.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS) je asi nejpoužívanější metoda k analýze koření. Tento druh chromatografie slouží k analýze těkavých látek. Oproti jiným metodám má plynová chromatografie vysokou citlivost a rozlišení. Je však nutná vyšší čistota vzorků. Vadivel V. a spol. [29] použili GC-MS k analýze černého pepře a papáji. Byla použita křemičitá kapilární kolona, jako nosný plyn helium a vzorek byl vstříkovan s dělicím poměrem 1:10. Byla zjišťována přítomnost fotochemikálií jako je 2-propyl-1-pentanol, benzylnitril nebo kyselina n-hexadekanová. Farag M. A. a spol. [30] pomocí spojení GC-MS provedli analýzu šafránu. Touto metodou identifikovali přítomnost různých aldehydů (safranal nebo benzaldehyd), ketonů (izoforon nebo 2,6,6-trimethyl-1,4-cyklohexandion), uhlovodíků (n-triadekan, hexadekan nebo 1,4-dimethylnaftalen), fenolů, pyranů, furanů a dalších. GC se hojně využívá nejen k analýze koření, ale i k analýze olejů získaných z koření či bylin [31].

### **2.1.3 Kapalinová chromatografie**

Kapalinová chromatografie, přesněji vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), je vhodná pro separaci a identifikaci jednotlivých složek matrice, jako jsou proteiny, aminokyseliny, pesticidy a další. Kapalinová chromatografie, lze stejně jako tenkovrstvá chromatografie, použít při analýze přítomnosti barviv v kari či kurkumě, jak provedli Sebaei A. S. a spol. [32]. Sahu P. K. a spol. [33] použili kapalinovou chromatografii pro analýzu kurkumy. Byl stanovován kurkumin, bisdemethoxykurkumin, demethoxykurkumin a metanilové žluté barvivo. Pro detekci bylo použito fotodiodové pole při 425 nm. Pro lepší separaci byla použita gradientová eluce. Metoda byla shledána robustní a bez významných odchylek. HPLC je často spojována s hmotnostní spektrometrií.

### **2.1.4 Elektroforetické metody**

Elektroforetické metody jsou založené na identifikaci látek na základě přítomnosti nabitých složek. Do těchto metod řadíme kapilární zónovou elektroforézu, kapilární gelovou elektroforézu, kapilární izoelektrickou fokusaci, izotachoforézu nebo micelární elektrokinetickou kapilární chromatografii. Mezi nevýhody těchto metod patří nepřesná měření a omezení vzorků, které lze analyzovat. Je možné použití pro zjištění přítomnosti efedrinu, kofeinu nebo furosemidu [31]. Byla také použita k analýze šafránu pomocí stanovení neutrálních sloučenin crocinu. Jelikož tyto metody neumí stanovit neutrální látky, byly sloučeniny crocinu převedeny na borátové komplexy [34].

## **2.2 Spektrální techniky**

Spektrální techniky jsou založeny na interakci hmoty s elektromagnetickým zářením. Dělíme je podle použitého záření. Záření používáme ultrafialové (UV), viditelné světlo (VIS), infračervené (IR), fluorescenční a další. Tyto metody jsou rychlé, nedestruktivní a citlivé. Spektrální techniky jsou často spojovány se separačními [31].

### **2.2.1 UV/VIS spektrometrie**

UV/VIS spektrometrie je spojení UV spektrometrie a VIS spektrometrie. Jelikož je získané spektrum těžko interpretovatelné, moc se tato technika nepoužívá. Je nutné, aby analyzované látky měly konjugované násobné vazby [35]. D'Archivio A. A. a Maggi M. A. [36] použili UV/VIS spektrometrii k analýze šafránu. Byly analyzovány vodné extrakty šafránu při několika vlnových délkách.

## 2.2.2 Infračervená a Ramanova spektrometrie

Z oblasti infračerveného záření využíváme hlavně střední a blízké. Tyto techniky studují vibračně-rotální spektra molekul. K využitím těchto technik patří analýza kurkumy [37], skořice [38] nebo papriky [39]. Infračervená spektrometrie se často pojí s Fourierovou transformací, čehož se využívá například k analýze šafránu [35].

## 2.2.3 NMR spektrometrie

NMR spektrometrie, neboli nukleární magnetická rezonanční spektrometrie, je technika s minimálními předúpravami vzorku a vysokou přesností a opakovatelností. Pomocí NMR spektrometrie jsme schopni identifikovat sacharidy, aminokyseliny, aminy, estery a další organické sloučeniny. I tato technika se používá pro analýzu šafránu jako Ordoudi. S. A. a spol. [40] nebo Petrakis E. A. a spol. [41].

## 2.2.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) má vysokou citlivost. Slouží k identifikaci izotopů i pro elementární profilování sloučenin. Je vhodná pro identifikaci a kvantifikaci jak stopových množství určitých prvků, tak i složitých matric, jako je právě většina koření. Pomocí hmotnostní spektrometrie byly analyzovány pepř, chilli, muškátový oříšek, vanilka a další [31]. Nejčastěji se MS používá se spojením se separačními technikami, jako je plynová nebo kapalinová chromatografie. Spojení LC-MS použili například Dong H. a spol. [42]. MS je vhodná i pro analýzu olejů, například Potočnok T. a spol. [43] ji použili k analýze složení mastných kyselin.

## 2.3 Elektrochemické techniky

Elektrochemické techniky se pro analýzu koření příliš nepoužívají. O použití polarografie byly nalezeny pouze 2 práce. Voltametrie je o něco častější. Z elektrochemických technik se nejčastěji používá cyklická voltametrie. Pomocí cyklické voltametrie se často sleduje mechanismus oxidace nebo redukce vybraných elektroaktivních látek. Voltametrie je používána také ke stanovení antioxidační aktivity některých látek, jako například zázvoru [44].

Polarografie pro analýzu koření byla poprvé použita v roce 1997. Blagojevic S. a spol. ji použili pro stanovení peroxidu vodíku ve vybraných druzích koření [45]. V roce 2007 byla polarografie použita pro analýzu fenyklu. Lado K. a spol. stanovovali prvky jako vápník, měď, železo, nikl nebo zinek. V experimentu byly použity 3 směsi kyselin. První směs byla kyselina dusičná s peroxidem vodíku, druhá směs byla kyselina dusičná s kyselinou



chlorovodíkovou a kyselinou fluorovodíkovou, poslední směs byla kyselina dusičná s kyselinou chlorovodíkovou a peroxidem vodíku. Extrakce vzorků byla provedena pomocí mikrovlnného štěpení za nízkého a vysokého tlaku [46].

V roce 2017 Armellini R. a spol. pomocí voltametrie analyzovali šafrán. Bylo stanoveno množství crocinu v šafránu. Jako pracovní elektroda byla vybrána elektroda ze skelného uhlíku. Tato metoda nakonec byla použita k rozlišení vzorků šafránu podle zeměpisného původu [47].

Chan K. K. a spol. v roce 2018 použili voltametrii ke stanovení kapsaicinoidů v chilli papričkách. Pro extrakci byl použit methanol. Linearita byla v rozmezí asi 17 až 1400 ppm. Z reálných vzorků byla zkoumána paprika, tabasko omáčka, kajenský pepř a čerstvé chilli [48].

Pro analýzu koření byl vyvinut i elektrochemický senzor založený na nanokompozitu oxidu kovu s více kovy. Davoudi S. a spol. ho v roce 2019 použili pro detekci nanomolárních  $Pb^{2+}$  a  $Hg^{2+}$  v různých druzích koření. Jako základ byla použita uhlíková pastová elektroda. Pro ionty  $Pb^{2+}$  byl získán lineární rozsah 0,27 až 18,42 nmol/l a limit detekce 0,054 nmol/l. Pro ionty  $Hg^{2+}$  byl získán lineární rozsah 0,42 až 31,30 nmol/l a limit detekce 0,097 nmol/l [49].

V roce 2020 byl publikován článek o použití voltametrie na stanovení kapsaicinu. Ziyatdinova G. a spol. použili jako pracovní elektrodu elektrodu ze skelného uhlíku modifikovanou karboxylovými jednostěnnými uhlíkovými nanotrubicemi dispergovanými v povrchově aktivní látce  $CeO_2$ . Pro kvantifikaci byla použita diferenciálně-pulzní voltametrie. Lineární rozsah byl 0,1 až 500  $\mu\text{mol/l}$  a limit detekce 28 nmol/l. Byl stanoven obsah kapsaicinu v koření červené pálivé papriky [50].

Burc M. a spol. v roce 2020 pomocí voltametrie stanovili kurkumin. Jako pracovní elektroda byla použita platinová elektroda s modifikací poly(vanilin-ko-kávová kyselina). Modifikace byla provedena pomocí cyklické voltametrie, pomocí které bylo následně sledováno i elektrochemické chování kurkuminu. Pro kvantifikaci byla použita diferenciálně-pulzní voltametrie. Lineární rozsah byl stanoven na 0,1 až 1,0 mmol/l a limit detekce na 0,005 mmol/l [51].

Ziyatdinova G. a Budnikov H. použili v roce 2021 voltametrii k analýze karvakrolu v koření oreganu. Jako pracovní elektroda byla použita elektroda ze skelného uhlíku modifikovaná uhlíkovými nanotrubicemi dispergovanými v aniontové povrchově aktivní látce dodecylsulfátu sodném. Oxidace kvakrolu byla studována pomocí cyklické voltametrie, kvantifikace byla poté provedena pomocí diferenciálně-pulzní voltametrie. Jako elektrolyt byl použit fosfátový pufr pH 6,5. Detekční limit byl stanoven na 0,075  $\mu\text{mol/l}$  kvakrolu a lineární rozsah na 0,1 až 150  $\mu\text{mol/l}$  kvakrolu [52].

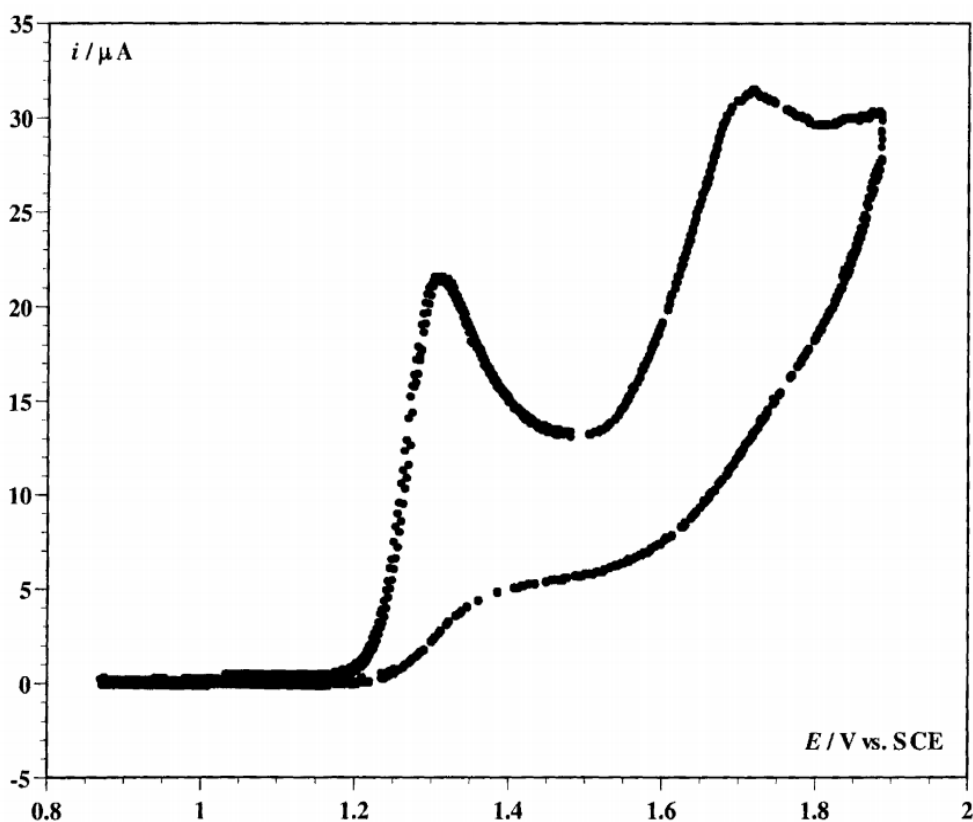
### 3 Elektrochemie a elektroanalýza vybraných aromatických látek

Pokud chceme látku stanovovat pomocí elektrochemie, musí být daná látka elektrochemicky aktivní. Elektrochemicky aktivní látka vykazuje jistou elektrickou vodivost, která je úměrná koncentraci disociovaných látek, a tak lze tyto látky kvantitativně stanovit.

#### 3.1 Elektrochemie a elektroanalýza anetholu

Anethol se oxiduje při potenciálu okolo + 1,0 V. Oxidace je dvouelektronová a probíhá ireverzibilně. Pro analýzu anetholu se elektrochemie příliš nepoužívá. Byla nalezena předešlá měření z roku 1999 Demaillet Ch. and Bard A. J. [53], z roku 2015 Wang L.-H. a spol [54] a z roku 2018 Jakubowska M. a spol. [55].

Nejstarší nalezená práce zabývající se elektroanalýzou anetholu pochází z roku 1999 a jejími autory jsou Ch. Demaillet a A. J. Bard. Pro studii oxidace trans-anetholu byla použita cyklická voltametrie (viz. záznam 1). Koncentrace anetholu byla 1,5 mmol/l. Jako elektrolyt byl zvolen acetonitril. Jako pracovní elektroda byla použita platinová. Jako pomocná elektroda byla použita nasycená kalomelová elektroda (SCE). Anethol se v tomto případě oxidoval při + 1,35 V [53].



Záznam 1 Cyklická voltametrie anetholu [53]

V roce 2015 Wang L.-H. a spol. zkoumali elektrochemické chování vybraných aromatických látek, včetně anetholu či eugenolu. Bylo zjištěno, že v nevodném elektrolytu jsou hodnoty maximálních proudů pro dané látky vyšší než ve vodno-organickém elektrolytu. Je to způsobeno vyšším pozadím. Pro oxidaci jsou vhodnější vodno-organické elektrolyty, proto byly hodnoty potenciálu v těchto elektrolytech nižší než u organických elektrolytů. Celkový počet elektronů byl stanoven pomocí coulometrie s řízeným potenciálem. Jako elektrody byly vybrány platinová a uhlíková pastová (CPE). Dále bylo zjištěno, že s rostoucím pH klesá potenciál, při kterém se dané látky oxidují [54].

V roce 2018 byla publikována práce od Jakubowska M. a spol., která se zabývá použitím různých elektrod pro voltametrickou analýzu anetholu. Nejdříve byla použita cyklická voltametrie pro studium elektrochemického chování a pro následující měření byla použita diferečně-pulzní voltametrie (DPV). Bylo zkoumáno několik elektrod, konkrétně diamantová elektroda dopovaná borem (BDDE), elektroda ze skelného uhlíku (GCE), uhlíková pastová elektroda (CPE) a uhlíkové pastové elektrody dopované  $\text{La}_2\text{O}_3$  a  $\text{CeO}_2$ . U vybraných elektrod byly zkoumány i 2 průměry, 1,5 a 3 mm. Poloha píku anetholu byla mezi 965 a 1155 mV. Elektrody o průměru 3 mm vyšly jako lepší než ty o průměru 1,5 mm. Jako nejlepší byla vybrána uhlíková pastová elektroda dopovaná  $\text{La}_2\text{O}_3$ . Jako elektrolyty byly vybrány acetátový pufr, Britton-Robinsonův pufr, fosfátový pufr a amoniakální pufr v rozmezí pH od 2,0 do 9,0. Jako nejlepší byl vybrán acetátový pufr o pH 6 [55].

### **3.2 Elektrochemie a elektroanalýza eugenolu**

Eugenol se oxiduje při potenciálu v rozmezí od 0,2 do 0,7 V. Oxidace je dvouelektronová a reverzibilní. Navíc vzniká produkt, který je sám také elektrochemicky aktivní. Stanovování eugenolu pomocí elektroanalýzy je v dnešní době velmi rozšířené. Pro analýzu eugenolu bylo vyvinuto již několik biosenzorů, například GCE/CRGO-BCD/ADA-SPE-AuNPs [56]. Eugenol se používá také k modifikaci elektrod pro elektroanalýzu jiných látek.

Nejstarší práce zaměřená na elektroanalýzu pochází z roku 1979 a jejími autory jsou Ignuchi M., Nishiyama A., Terada Y. a Yamamura S. [57]. V této práci byla použita cyklická voltametrie s elektrodou ze skelného uhlíku a jako elektrolyt byl použit methanol.

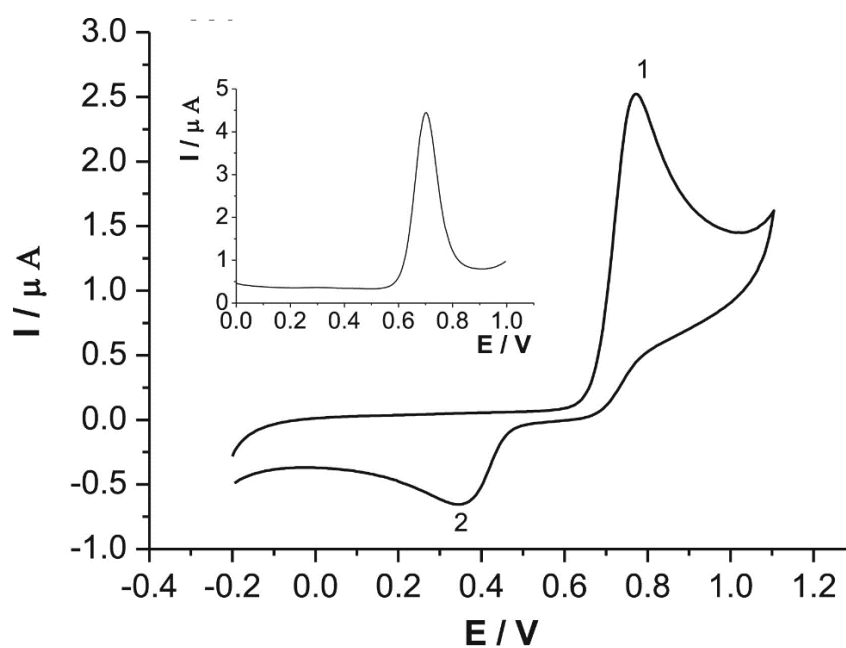
V roce 2007 byla vydána práce autorů Thakur K. a Petre K. S. kde byla pro elektroanalýzu použita polarografie. Jako pracovní elektroda byla vybrána kapající rtuťová elektroda. Jako elektrolyt byl použit vinan amonný a směs HCl a NaOH na úpravu

pH na hodnotu  $6,7 \pm 0,1$ . Byla vykreslena polarografická vlna, jejíž výška byla závislá na koncentraci eugenolu [58].

V roce 2015 Wang L.-H. a spol. zkoumali elektrochemické chování vybraných aromatických látek, včetně anetholu či eugenolu, jak už bylo popsáno v kapitole 3.1 Elektrochemie a elektroanalýza anetholu [54].

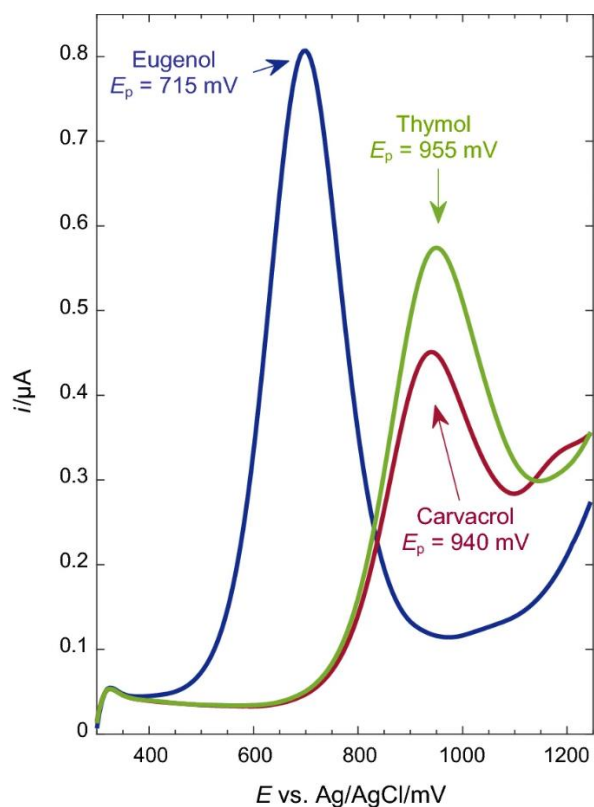
V roce 2016 bylo publikováno mnoho článků o elektroanalýze eugenolu. Například Sağlam Ö. A spol. použili diferenčně-pulzní voltametrii s tužkovou grafitovou elektrodou (PGE). Jako elektrolyt byl vybrán Britton-Robinsonův pufr pH 2 obsahující 0,1 mol/l KCl [59].

V roce 2017 vyšel článek Yildiz G. a spol., ve kterém byla použita uhlíková pastová elektroda modifikovaná grafenem. Pro analýzu byla použita cyklická voltametrie a diferenčně-pulzní voltametrie (viz. záznam 2). Jako elektrolyt byl vybrán Britton-Robinsonův pufr o pH 2 [60].



**Záznam 2** *Cyklická a diferenčně-pulzní voltametrie eugenolu [60]*

Kowalcze M. a Jakubowska M. vydali v roce 2019 článek o použití borem dotované diamantové elektrody (BDDE) pro analýzu eugenolu, thymolu a karvakrolu (viz. záznam 3). Byla použita diferenčně-pulzní voltametrie. Jako elektrolyt byl vybrán 0,1 M octanový pufr pH 6 [61]. Ve stejném roce vyšel i článek Murtada. K. a spol., kde byla použita modifikovaná elektroda CuSe @ rGO / GCE. Jako elektrolyt byl zvolen 0,1 M Britton-Robinsonův pufr o pH 2. Pro analýzu byla použita cyklická voltametrie a poté lineární voltametrie [62].



**Záznam 3** Voltametrická analýza eugenolu, thymolu a karvakrolu [61]

V článku z roku 2020 použili Fadillah G. A spol. cyklickou voltametrii a diferenčně-pulzní voltametrii. Byl použit tříelektrodový článek obsahující SnO<sub>2</sub> / CPE jako pracovní elektrodu, chloridostříbrnou jako referentní elektrodu a Pt drátek jako pomocnou elektrodu. Jako elektrolyt byl použit 0,1 mol/l fosfátový pufr pH 3 [63].

### 3.3 Elektrochemie a elektroanalýza myristicinu

Myristicin se oxiduje při potenciálu okolo + 1,1 V. Oxidace je dvouelektronová a probíhá ireverzibilně. Bylo nalezeno pouze jedno předešlé použití elektrochemie pro analýzu myristicinu. Mikysek a spol. použili pro analýzu uhlíkové pastové elektrody, kde byl ovšem problém s extrakcí myristicinu do elektrody. Při použití elektrody ze skelného uhlíku dochází k adsorpci. Při použití obou elektrod bylo proto nutné před každým měřením obnovit povrch elektrody. Jako elektrolyt byly použity HCl, HClO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KCl, acetátový, fosfátový a borátový pufr a NaOH. Jako nejlepší byl vybrán Britton-Robinsonův pufr, u kterého bylo zkoumáno vliv pH na analýzu. Myristicin je elektroaktivní v celém rozsahu pH, ale jako nejlepší bylo vybráno pH 7 [64].

## 4 Experimentální část

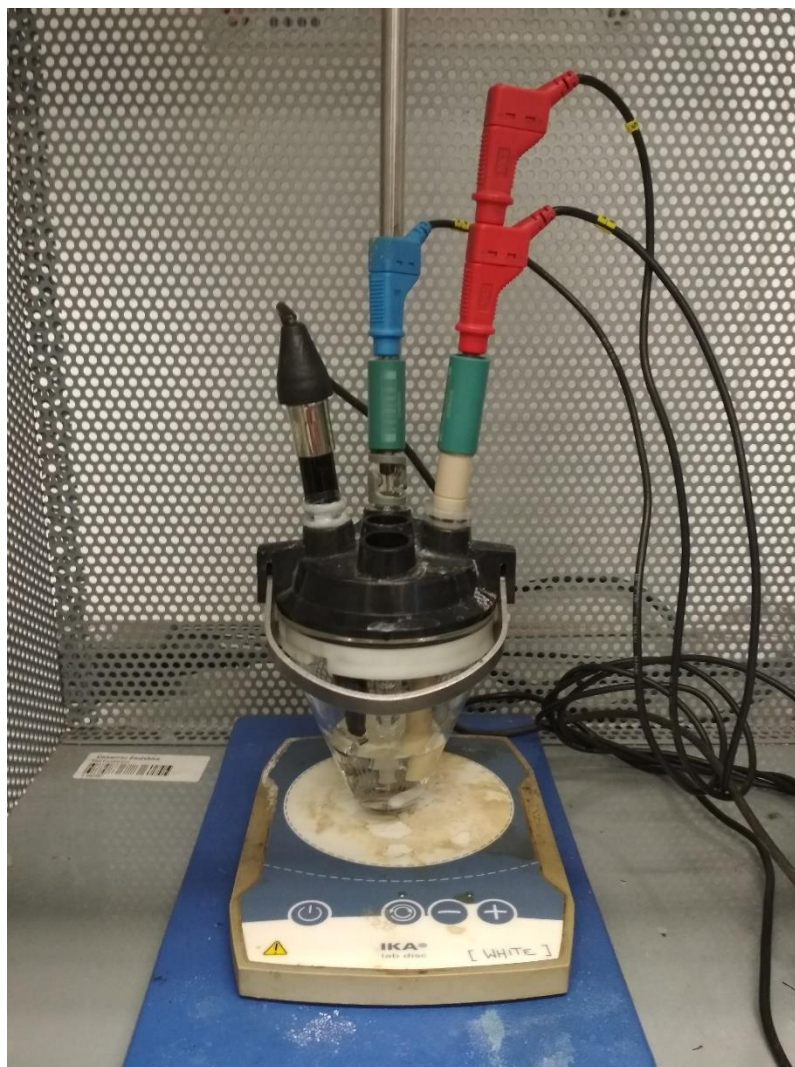
Jako experiment byla provedena analýza vybraných aromatických látek v kořeni. Pomocí cyklické voltametrie byla studována elektrochemie látek. Následně byla optimalizována a validována square-wave voltametrie pro stanovení vybraných látek v kořeni.

### 4.1 Použité chemikálie

- Ethanol 96 % čistoty p. a. (Lach-Ner, Česká republika)
- Eugenol čistoty 99 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- Hydroxid sodný NaOH (Avantor, USA)
- Kyselina boritá  $H_3BO_3$  čistoty p. a. (Chemapol, Česká republika)
- Kyselina dusičná  $HNO_3$  65 % čistoty p. a. (Penta, Česká republika)
- Kyselina chloristá  $HClO_4$  75 % čistoty p. a. (Penta, Česká republika)
- Kyselina chlorovodíková HCl 35 % čistoty p. a. (Lach-Ner, s. r. o., Česká republika)
- Kyselina o-fosforečná  $H_3PO_4$  85 % čistoty p. a. (Penta, Česká republika)
- Kyselina octová  $CH_3COOH$  99,8 % ledová čistoty p. a. (Penta, Česká republika)
- Kyselina sírová  $H_2SO_4$  96 % čistoty p. a. (Penta, Česká republika)
- Myristicin (Sigma-Aldrich, Německo)
- Trans-Anethole čistoty 99 % (Sigma-Aldrich, Německo)

### 4.2 Použité přístroje a zařízení

- Analytické váhy KERN ALJ 120-4 (Kern, Německo)
- AUTOLAB PGSTAT12 (Metrohm, Česká republika)
- Automatické pipety 10-100  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l a 1-5 ml (Fisher Scientific, USA)
- Magnetické míchadlo „lab disc“ (IKA, Česká republika)
- pH metr inoLab 720 (WTW, Česká republika)
- Předvážky KERN EMB 220-1 (Kern, Německo)
- Software NOVA 1.11 (Metrohm, Česká republika)
- Stříkačkový filtr polytetrafluorethylen 0,45 mikronů (Fisherbrand, Česká Republika)
- Ultrazvuková vana K18 (Kraintek, Česká republika)
- Třielektrodová cela (viz. obr. 10)
  - Pomocná elektroda – Pt-plíšek (Elektrochemické detektory s. r. o., Česká republika)
  - Pracovní elektroda – elektroda ze skelného uhlíku „GCE“ (Metrohm, Česká republika)
  - Referentní elektroda – chloridostříbrná elektroda (Metrohm, Česká republika)



Obr. 10 Třielektrodová měřící cela

## 4.3 Příprava roztoků

### 4.3.1 Britton-Robinsonův pufr

Pro přípravu Britton-Robinsonova pufru bylo do 1000 ml odměrné baňky odměřeno 2,2 ml ledové  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 3 ml  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 2,472 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$  a vše bylo doplněno destilovanou vodou po risku a dobře promícháno. Dále byl připraven roztok 0,2 mol/l NaOH rozpuštěním 0,8 g NaOH v destilované vodě. Roztok NaOH byl převeden do 100 ml odměrné baňky, doplněn destilovanou vodou po risku a dobře promíchán.

Smícháním vhodných množství Britton-Robinsonova pufru a roztoku NaOH do plastových nádob byla připravena série pufrů o pH 2, 4, 6, 8, 10 a 12. Hodnoty pH byly určeny experimentálně pomocí pH metru se skleněnou elektrodou.

### 4.3.2 Roztoky kyselin

Roztoky kyselin byly připraveny odměřením určitého množství koncentrovanější kyseliny do 100 ml odměrné baňky a doplněním destilovanou vodou po risku. Pro 0,1 mol/l roztok HCl bylo odměřeno 10 ml 1 mol/l HCl. Pro roztok 0,1 mol/l HNO<sub>3</sub> bylo odměřeno 10 ml 1 mol/l HNO<sub>3</sub>. Pro roztok 0,05 mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bylo odměřeno 5 ml 1 mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Pro roztok 0,05 mol/l HClO<sub>4</sub> bylo odměřeno 5 ml 1 mol/l HClO<sub>4</sub>. Pro roztok 0,075 mol/l HClO<sub>4</sub> bylo odměřeno 7,5 ml 1 mol/l HClO<sub>4</sub>. Pro roztok 0,1 mol/l HClO<sub>4</sub> bylo odměřeno 10 ml 1 mol/l HClO<sub>4</sub>.

### 4.3.3 Roztoky standardů

Roztoky standardů o koncentraci 0,01 mol/l byly připraveny odvážením určitého množství standardní látky a doplněním 96% ethanolem na objem 10 ml. Pro odvážení byly použity automatické pipety. Vypočtená navážka pro trans-anethol byla 0,01482 g, pro eugenol 0,01642 g a pro myristicin 0,01922 g. Skutečné navážky byly zapsány pro pozdější vyhodnocení výsledků. Tyto roztoky byly skladovány v mrazáku.

## 4.4 Parametry elektrochemických metod

Cyklická voltametrie byla měřena v rozmezí -0,6 až 1,4 V se začátkem v 0 V a potenciálovým krokem 0,0025 V. Byly měřeny 2 cykly s rychlostí skenování 0,05 V/s.

Square-wave voltametrie byla původně měřena v rozmezí 0 až 1,6 V, s potenciálovým krokem 0,005 V, amplitudou 0,025 V, frekvencí 20 Hz a rychlostí skenování 0,1 V/s. Jelikož se parametry této metody optimalizovaly, měřilo se s různými počátečními potenciály, s různou amplitudou a s různou frekvencí.

## 4.5 Pracovní postupy

### 4.5.1 Cyklická voltametrie

Pro cyklickou voltametri bylo do nádoby odpipetováno 9,5 ml pufru a 0,5 ml roztoku standardu o koncentraci 0,01 mol/l. Jelikož se anethol v tomto poměru srážel, bylo odpipetováno 9,5 ml pufru, 0,4 ml ethanolu a 0,1 ml roztoku anetholu o koncentraci 0,01 mol/l.

Pro výběr vhodného elektrolytu bylo do nádoby odpipetováno 9,5 ml kyseliny, 0,2 ml ethanolu, 0,1 ml roztoku anetholu, 0,1 ml roztoku eugenolu a 0,1 ml roztoku myristicinu.



### 4.5.2 Square-wave voltametrie

Pro optimalizaci parametrů square-wave voltametrie bylo do nádoby odpipetováno vždy 9,5 ml vybrané kyseliny, 0,2 ml ethanolu, 0,1 ml roztoku anetholu, 0,1 ml roztoku eugenolu a 0,1 ml roztoku myristicinu.

Pro měření kalibrací bylo do nádoby odpipetováno nejdříve 9,5 ml kyseliny, 0,3 ml ethanolu a po 0,1 ml roztoků standardních látek, pro které se kalibrace neměřila. Poslední roztok standardu byl přidáván po 20  $\mu$ l až do 200  $\mu$ l. Další série kalibrací byla měřena pro každou látku samostatně. Bylo odpipetováno 9,5 ml kyseliny a 0,5 ml ethanolu. Roztok vybraného standardu byl přidáván po 20  $\mu$ l až do 200  $\mu$ l. Poté byla měřena dvojice kalibrací, kde byl vynechán roztok standardu anetholu. Do nádoby bylo odpipetováno 9,5 ml kyseliny, 0,1 ml roztoku eugenolu nebo myristicinu a 0,4 ml ethanolu. Roztok druhého standardu byl přidáván po 20  $\mu$ l až do 200  $\mu$ l. Nakonec byla měřena kalibrace eugenolu a myristicinu společně, kde bylo odpipetováno 9,5 ml kyseliny a 0,5 ml ethanolu. Byly přidávány roztoky obou standardů po 20  $\mu$ l až do 200  $\mu$ l.

Pro výpočty hodnot LOD a LOQ byla měření provedena vždy pro stejné základní roztoky jako při kalibracích. Pro anethol bylo do roztoku přidáno 20  $\mu$ l roztoku standardu. Pro eugenol a myristicin bylo do roztoku přidáno 10  $\mu$ l roztoku standardu.

Jako modelový vzorek bylo odpipetováno vždy 9,5 ml kyseliny, 0,45 ml ethanolu a 0,05 ml roztoku vybraného standardu. U vzorku anýzu bylo odpipetováno 9,5 ml kyseliny, 0,1 ml extraktu anýzu a 0,4 ml ethanolu. U vzorku hřebíčku bylo odpipetováno 9,5 ml kyseliny, 0,01 ml extraktu hřebíčku a 0,49 ml ethanolu. U vzorku muškátového oříšku bylo odpipetováno 9,5 ml kyseliny a 0,5 ml extraktu muškátového oříšku.

### 4.5.3 Extrakce

Pro analýzu byl vybrán anýz, hřebíček a muškátový oříšek. Muškátový oříšek byl koupen již namletý, anýz a hřebíček byly nadrceny ve třecí misce. Od každého koření byly naváženy cca 2 g a bylo přidáno 50 ml ethanolu. Navážky byly zapsány kvůli pozdějšímu zpracování výsledků. Nádoby s kořením a ethanolem byly dány do ultrazvukové vany na 20 minut na intenzitu 5 a poté ještě na 60 minut na intenzitu 1. Extrakty byly skladovány v lednici až do analýzy.

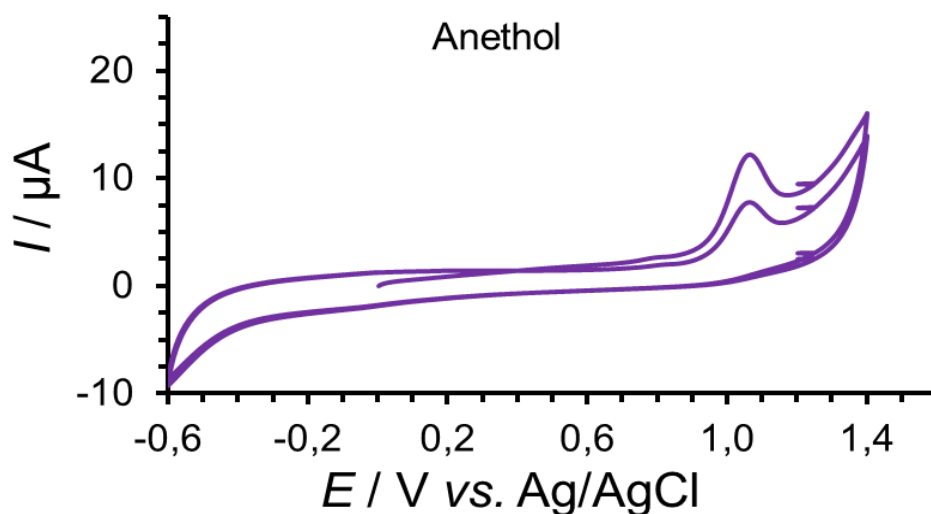
## 5 Výsledky a diskuse

### 5.1 Elektrochemické chování vybraných aromatických látek

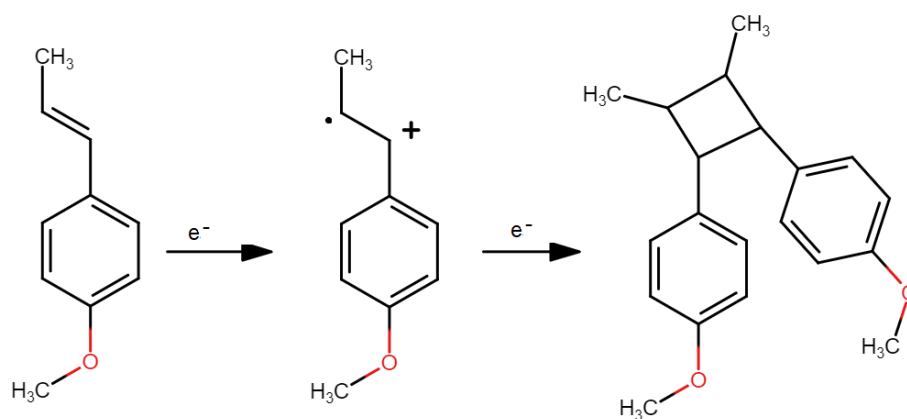
Elektrochemické chování vybraných látek, tedy anetholu, eugenolu a myristicinu, bylo studováno pomocí cyklické voltametrie. U každé látky byly změřeny 2 cykly pro každou vybranou hodnotu pH, tedy pro každou látku 6 měření.

#### 5.1.1 Anethol

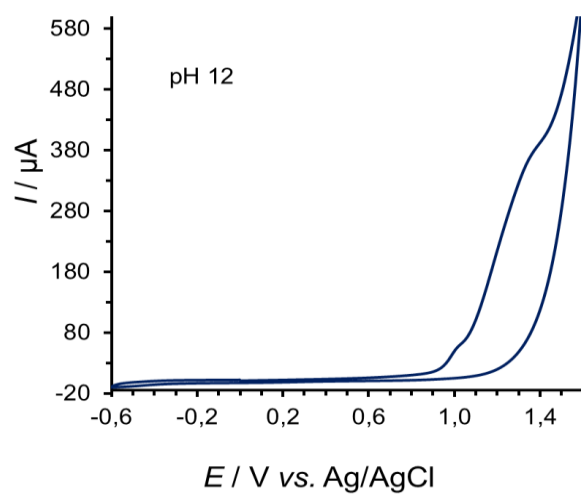
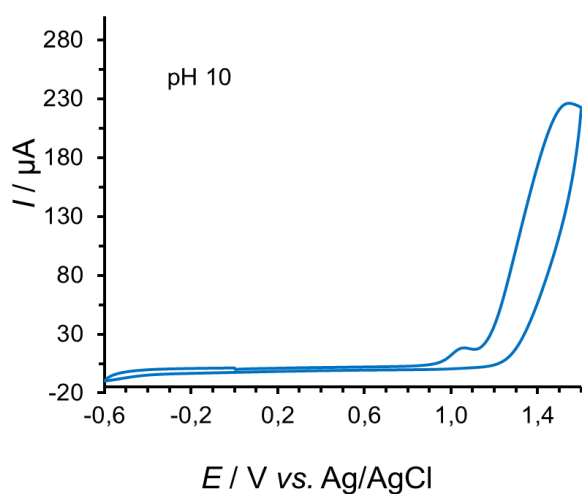
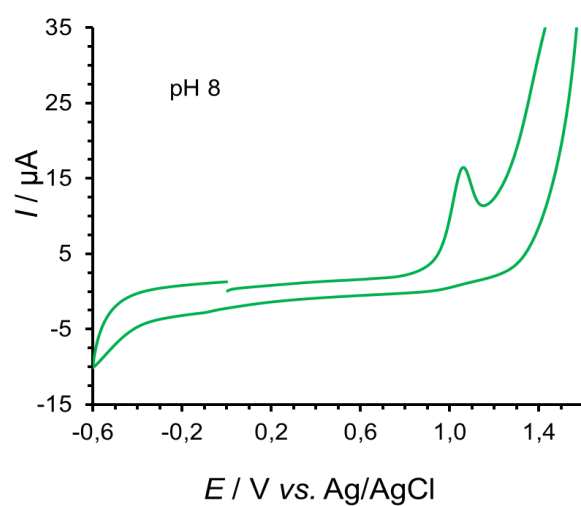
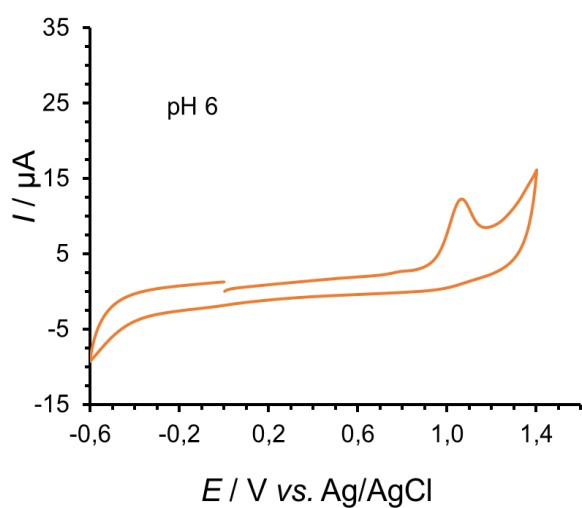
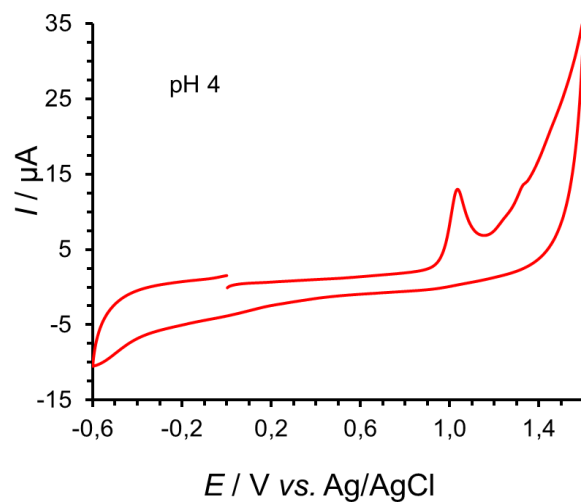
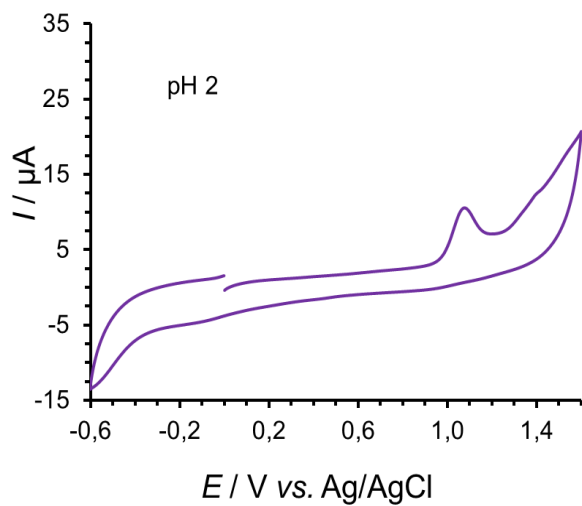
Anethol podléhá ireverzibilní oxidaci při potenciálu okolo 1,0 V (viz. záznam 4) podle reakce na obr. 11. Při analýze vlivu pH na reakci bylo zjištěno, že čím nižší pH, tím byl pík posunut k vyšším hodnotám potenciálu (viz. záznam 5).



Záznam 4 Cyklická voltametrie anetholu (dva cykly)



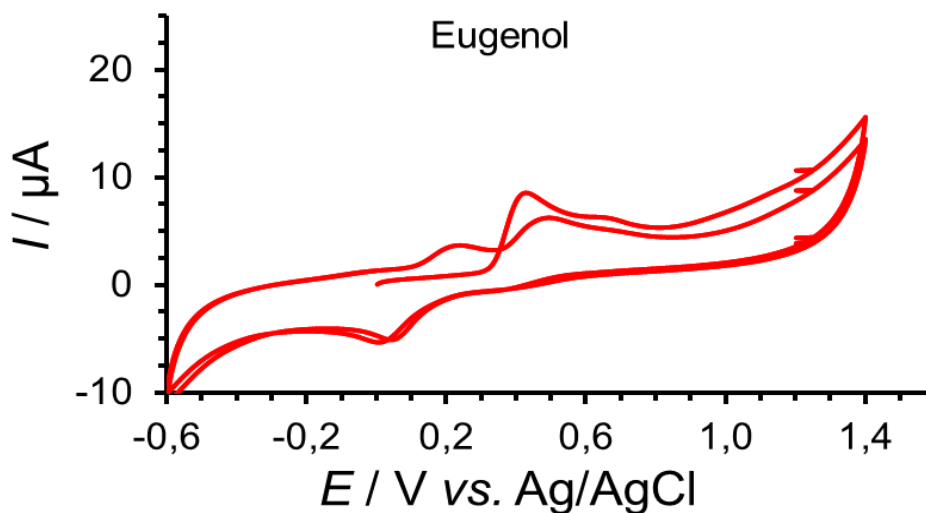
Obr. 11 Elektrochemická oxidace anetholu [53]



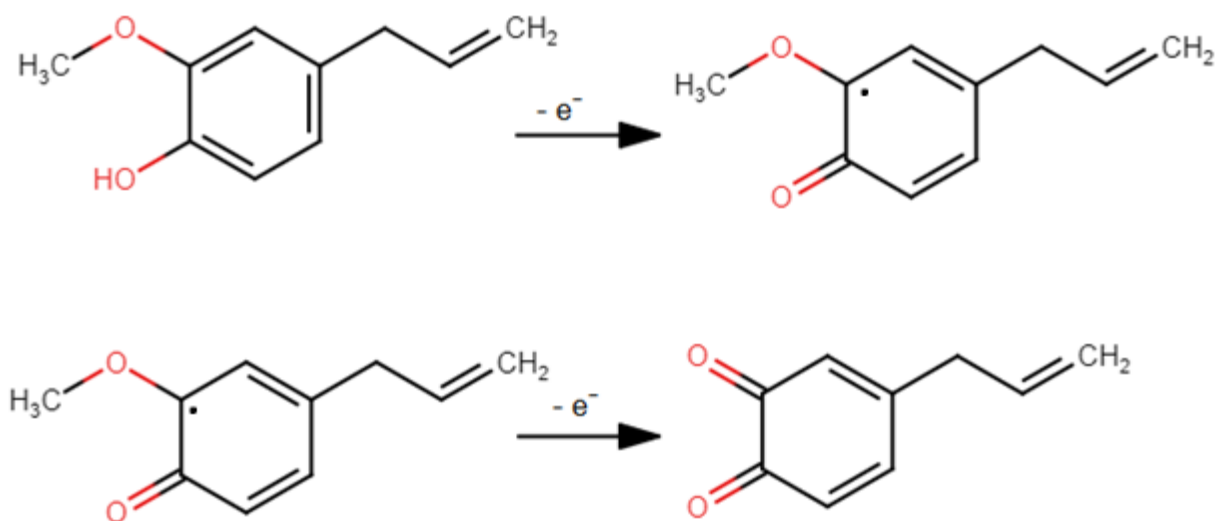
**Záznam 5** Závislost oxidace anetholu na hodnotě pH

### 5.1.2 Eugenol

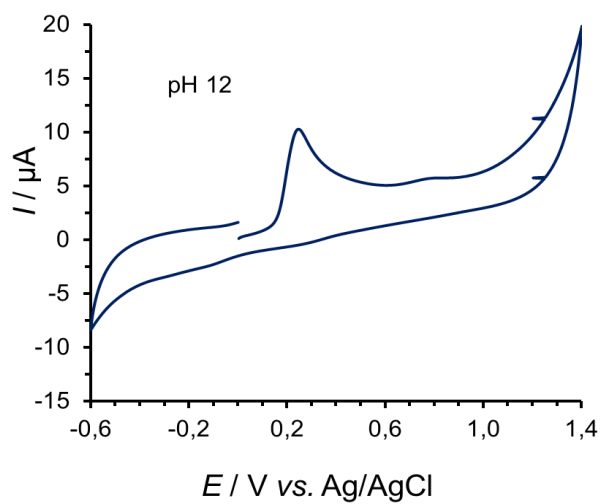
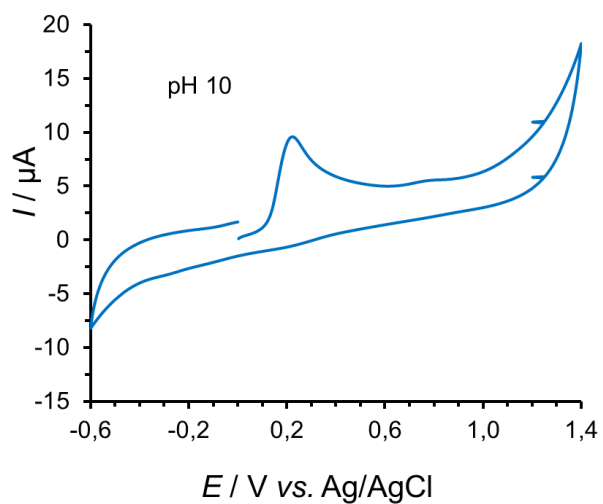
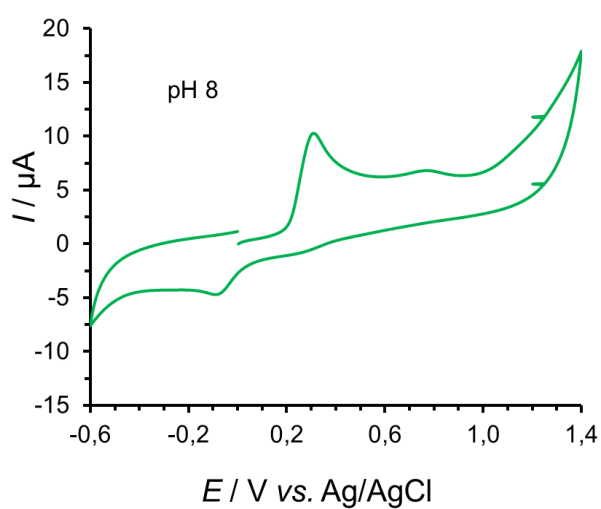
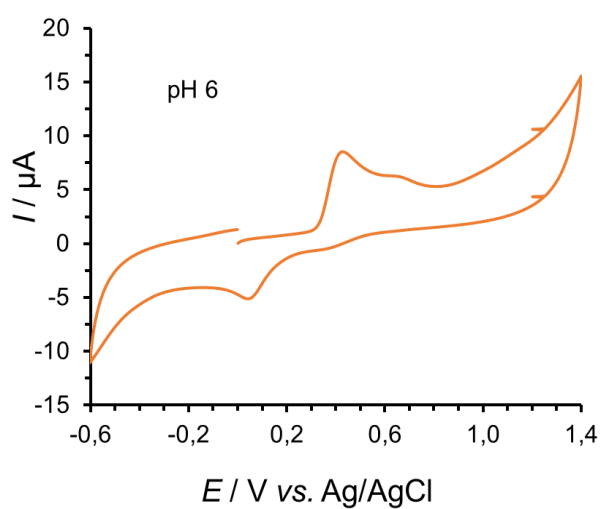
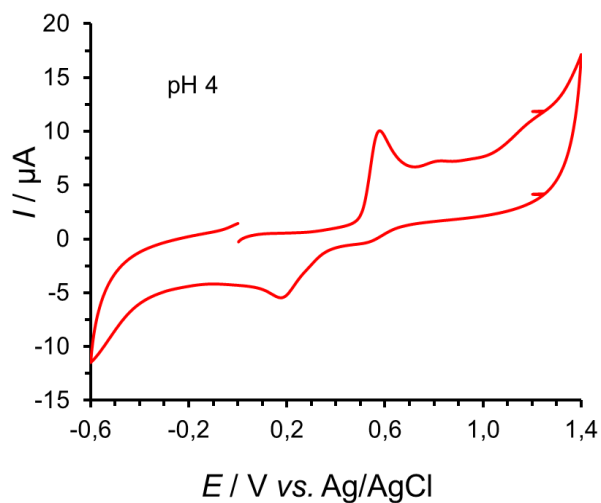
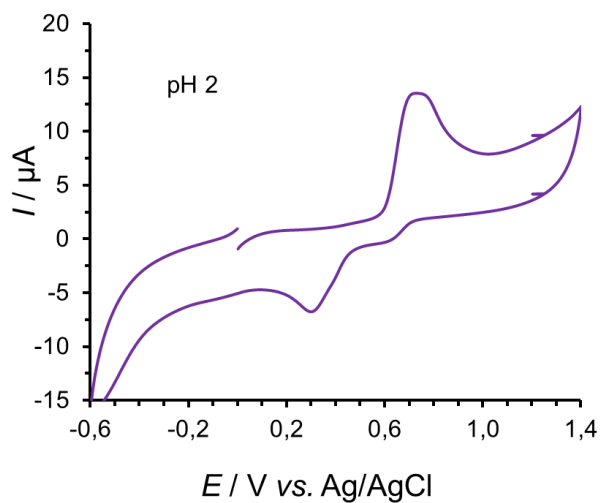
Eugenol podléhá oxidaci při potenciálu mezi 0,2 a 0,7 V (viz. záznam 6) podle reakce na obr. 12. U eugenolu je oxidace reverzibilní, lze tedy pozorovat pík redukce. Při reakci vzniká také elektroaktivní produkt, který také podléhá oxidaci, jak je vidět při druhém cyklu. Při analýze vlivu pH na reakci bylo zjištěno, že čím nižší pH, tím byl pík posunut k vyšším hodnotám potenciálu (viz. záznam 7).



Záznam 6 Cyklická voltametrie eugenolu (dva cykly)



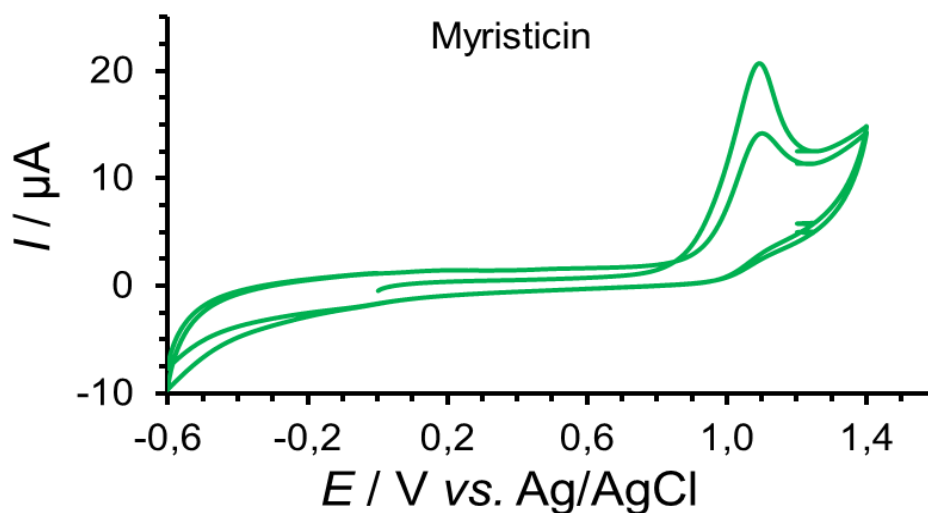
Obr. 12 Elektrochemická oxidace eugenolu



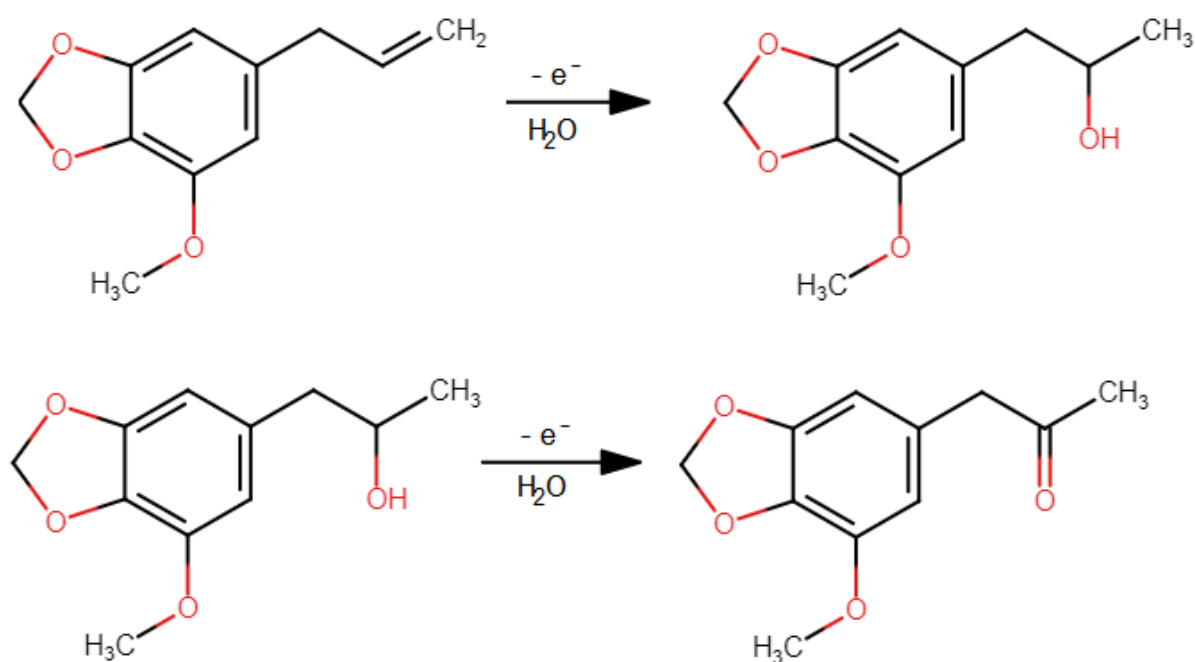
**Záznam 7** Závislost oxidace eugenolu na hodnotě pH

### 5.1.3 Myristicin

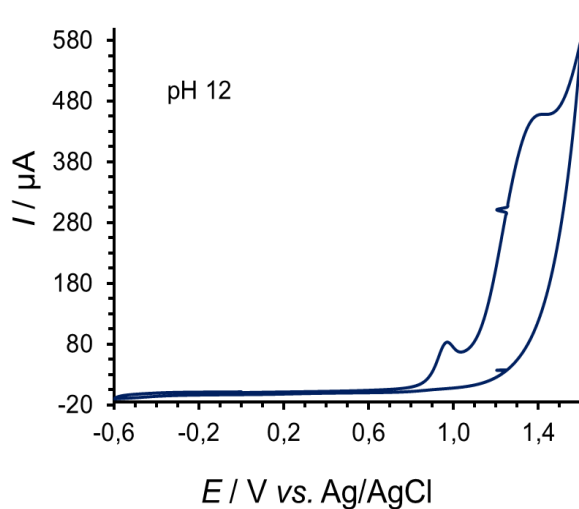
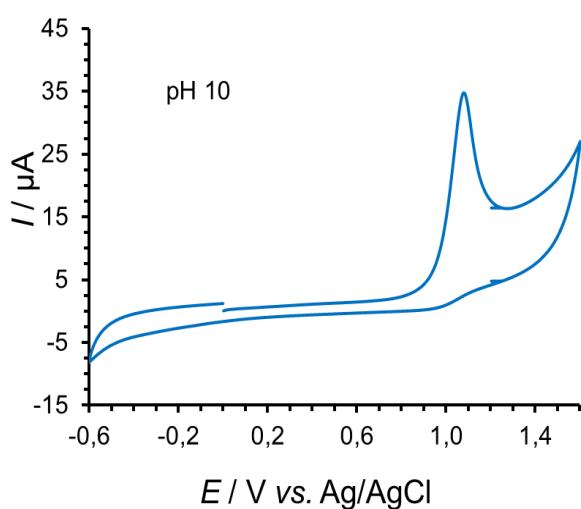
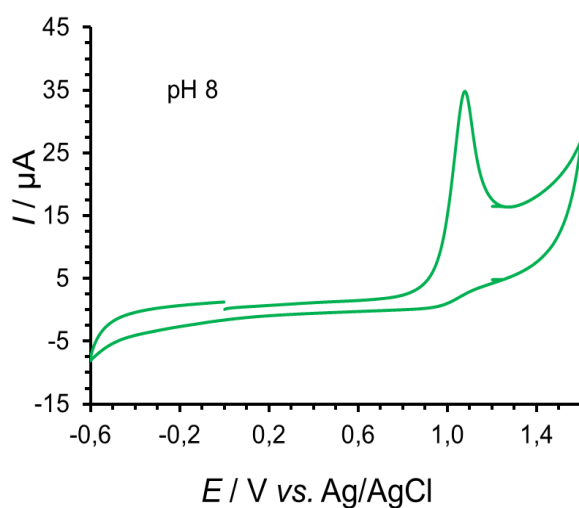
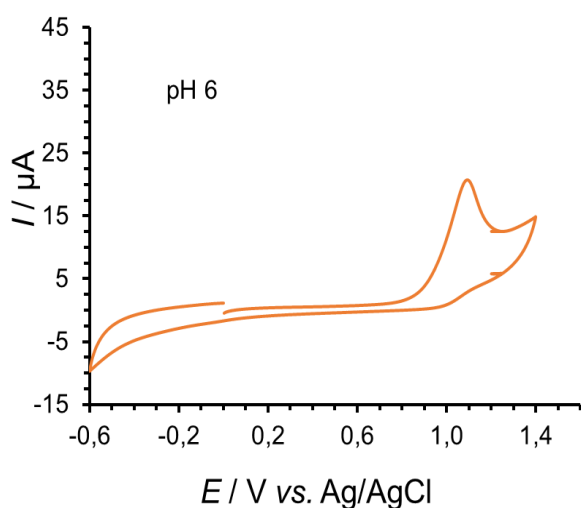
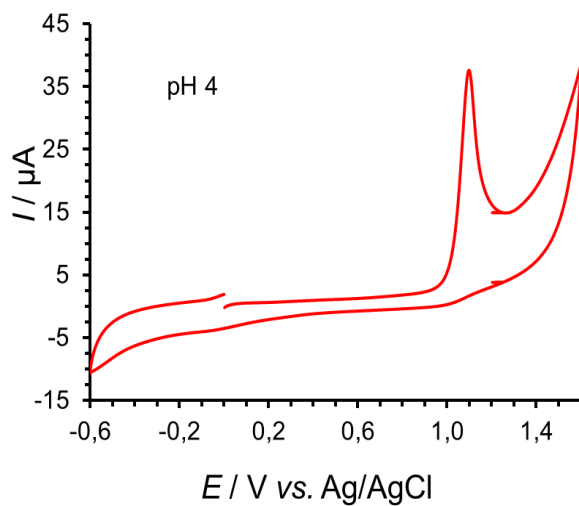
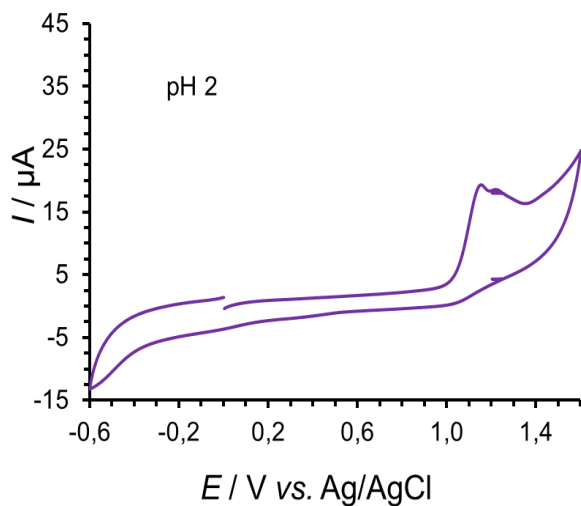
Myristicin podléhá ireverzibilní oxidaci při potenciálu okolo 1,1 V (viz. záznam 8) podle reakce na obr. 13. Při analýze vlivu pH na reakci bylo zjištěno, že čím nižší pH, tím byl pík posunut k vyšším hodnotám potenciálu (viz. záznam 9).



Záznam 8 Cyklická voltametrie myristicinu (dva cykly)



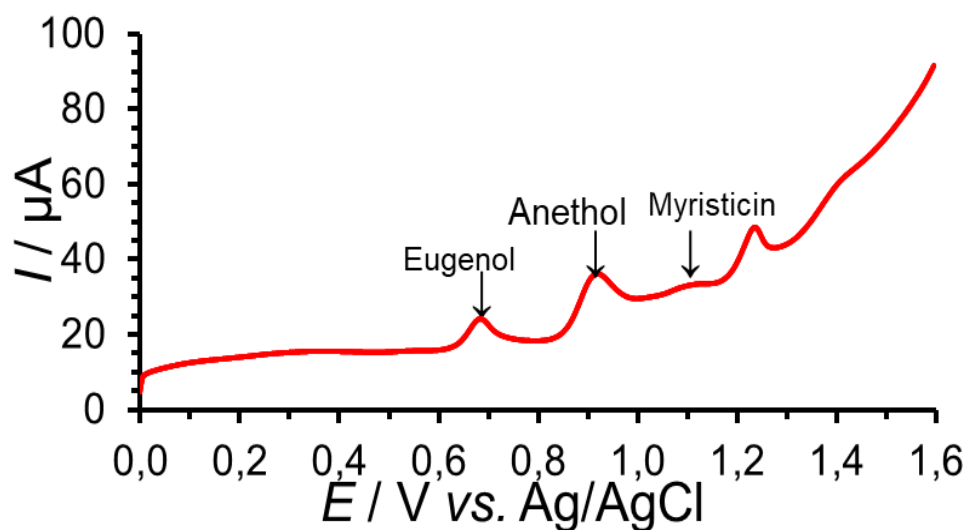
Obr. 13 Oxidace myristicinu



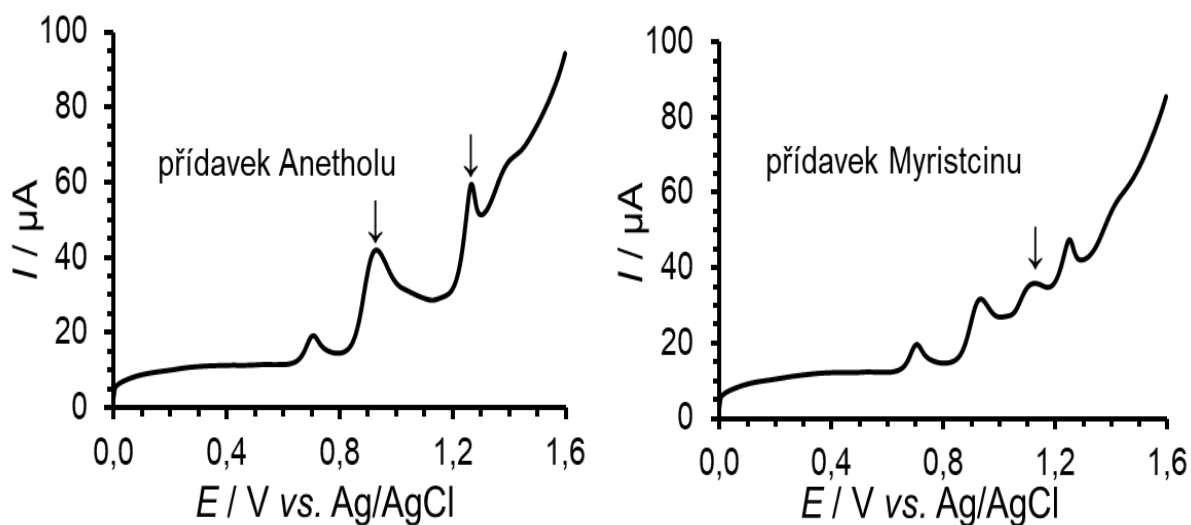
**Záznam 9** Závislost oxidace myristicinu na hodnotě pH

### 5.1.4 Poloha píků vybraných látek

Při square-wave voltametrii všech 3 látek současně byly identifikovány 4 píky (viz. záznam 10). Pomocí měření s přidavky jednotlivých látek (viz. záznam 11) bylo zjištěno, že první pík patří eugenolu, druhý a čtvrtý pík patří anetholu a třetí pík patří myristicinu. Pro vyhodnocení anetholu byl vybrán jako přesnější druhý pík.



Záznam 10 Poloha píků vybraných látek



Záznam 11 Přídavek anetholu a myristicinu



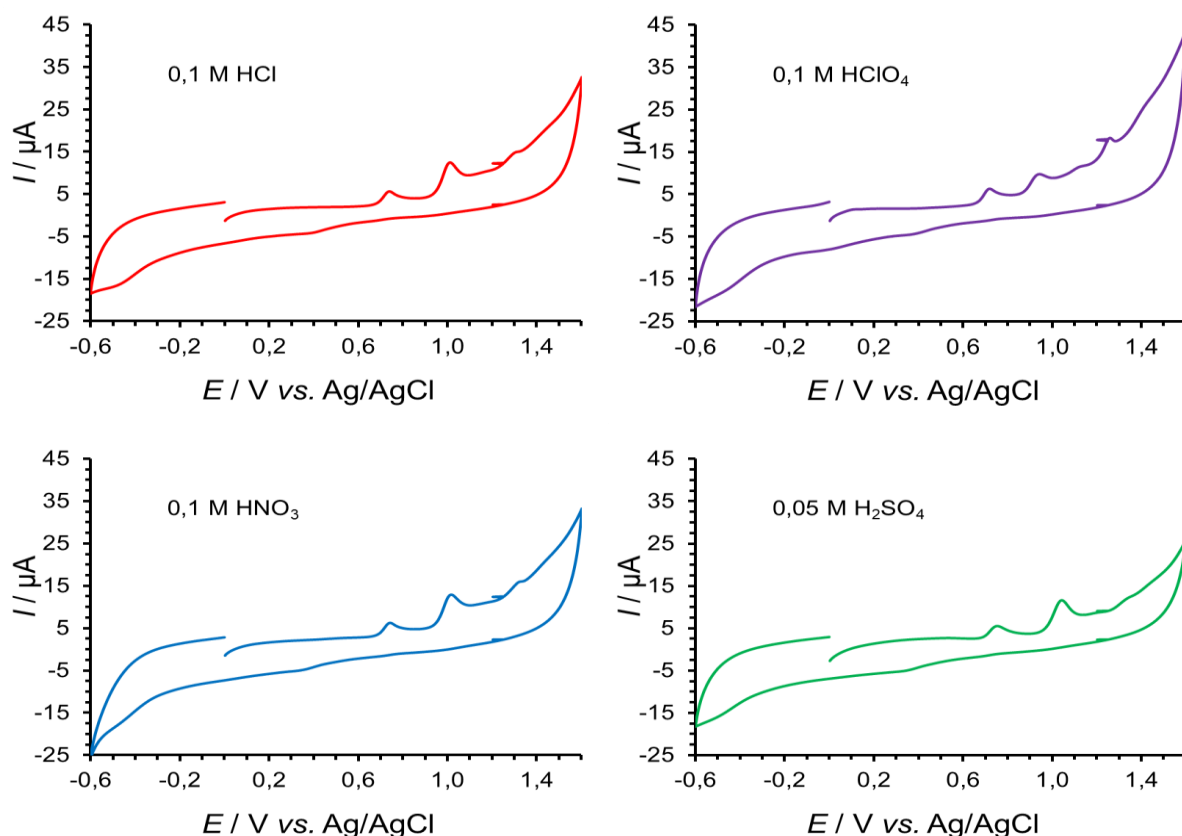
## 5.2 Vývoj voltametrické metody

### 5.2.1 Výběr pracovní elektrody

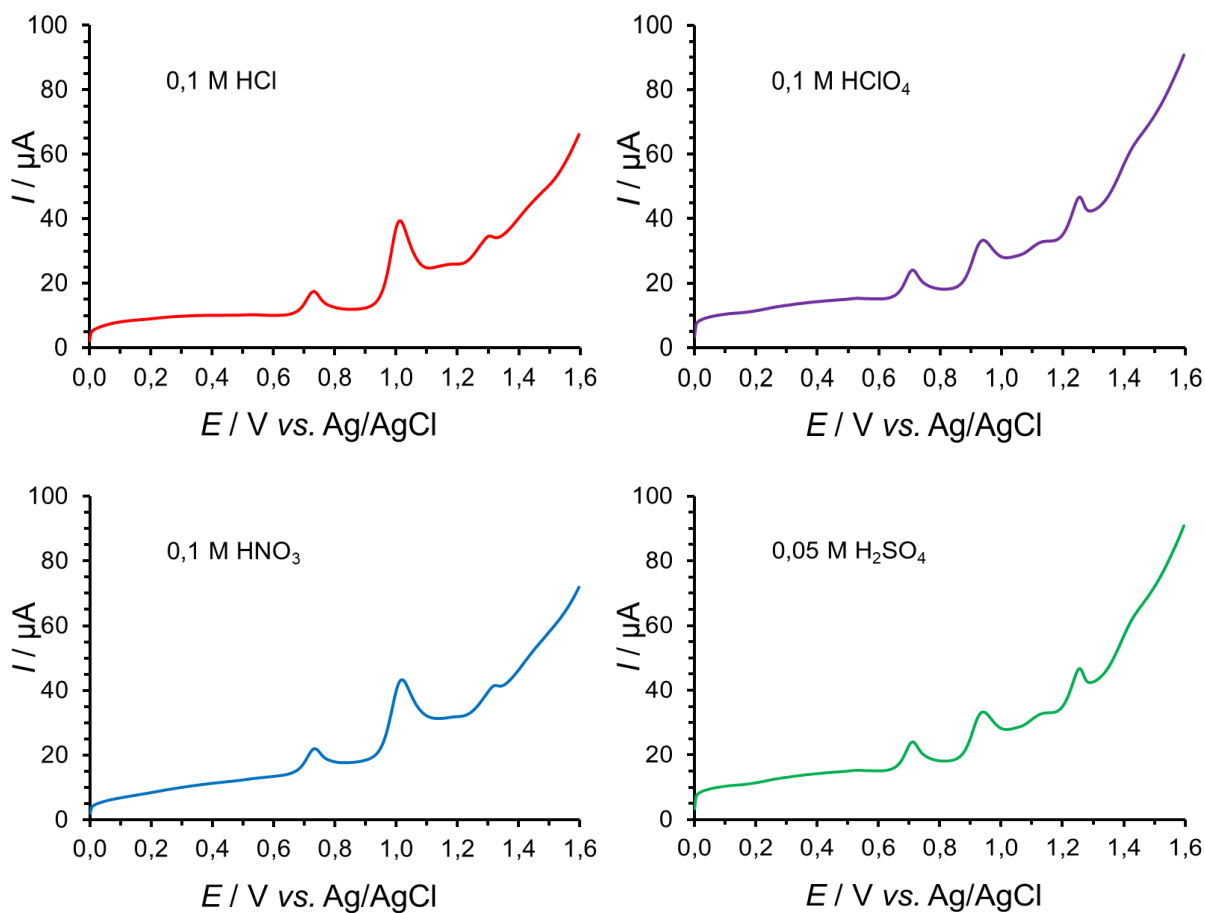
Jako pracovní elektroda byla vybrána elektroda ze skelného uhlíku, tedy GCE (z anglického „glassy carbon electrode“). Elektroda ze skelného uhlíku patří mezi nejčastěji používané uhlíkové elektrody v elektrochemické analýze. Její nevýhodou je deaktivace povrchu vlivem měření či stání na vzduchu. Pro aktivaci povrchu bylo vybráno leštění povrchu.

### 5.2.2 Výběr pracovního elektrolytu

Pro výběr pracovního elektrolytu byly látky měřeny v sérii pufrů s pH od 2 do 12. Čím nižší pH, tím lepší byla separace píků, proto bylo zvoleno pH 1. Byly testovány roztoky 4 kyselin, a to 0,1 mol/l HCl, 0,1 mol/l HClO<sub>4</sub>, 0,1 mol/l HNO<sub>3</sub> a 0,05 mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Elektrolyty byly měřeny cyklickou voltametrií (viz. záznam 12) a poté i square-wave voltametrií (viz. záznam 13).

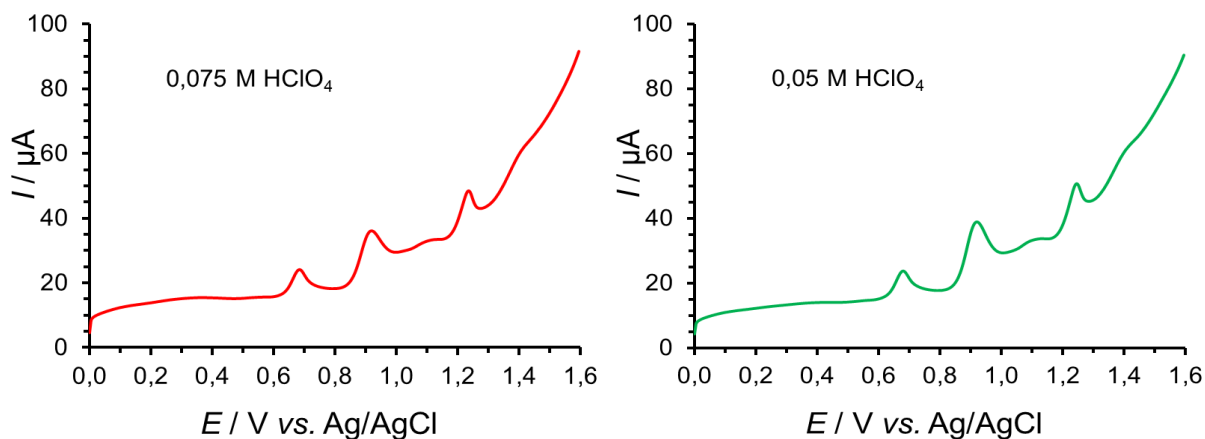


**Záznam 12** *Cyklická voltametrie vybraných kyselin*



**Záznam 13** Square-wave voltametrie vybraných kyselin

Jako nejlepší byla zvolena 0,1 mol/l HClO<sub>4</sub>. Jelikož je pH 1 velmi nízké, byly u vybrané kyseliny zkoumány i nižší koncentrace, konkrétně 0,075 mol/l a 0,05 mol/l (viz. záznam 14). Ukázalo se, že koncentrace 0,05 mol/l je dostačující a není tedy třeba pracovat při tak nízké hodnotě pH. Jako pracovní elektrolyt byla zvolena 0,05 mol/l HClO<sub>4</sub>.



**Záznam 14** Vliv koncentrace HClO<sub>4</sub> na separaci píků

### 5.2.3 Výběr voltametrické techniky

Pro měření byla vybrána square-wave voltametrie, u které bylo optimalizováno několik parametrů. Měření bylo prováděno s různou amplitudou, frekvencí či počátečním potenciálem. Při měření byla také zjišťována možnost adsorpce látek na elektrodu a opakovatelnost měření, tedy jestli je nutné elektrodu před každým měřením leštit.

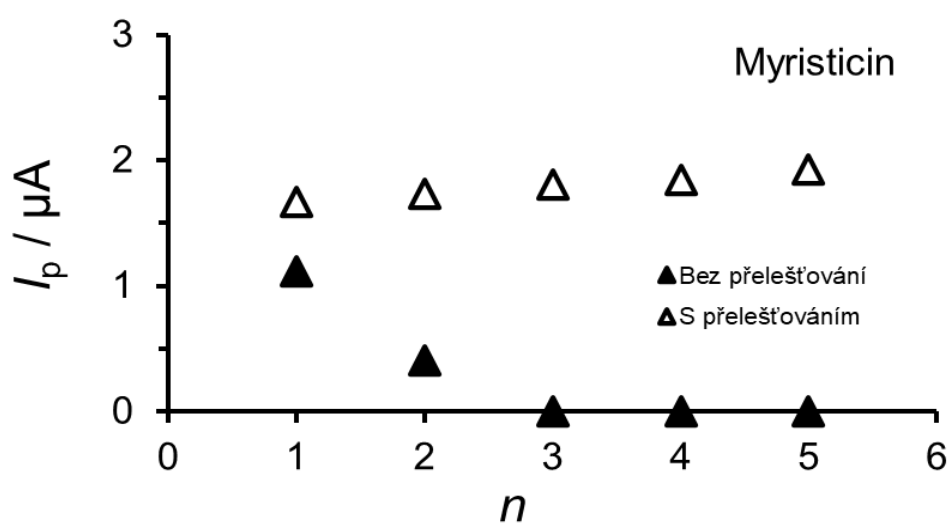
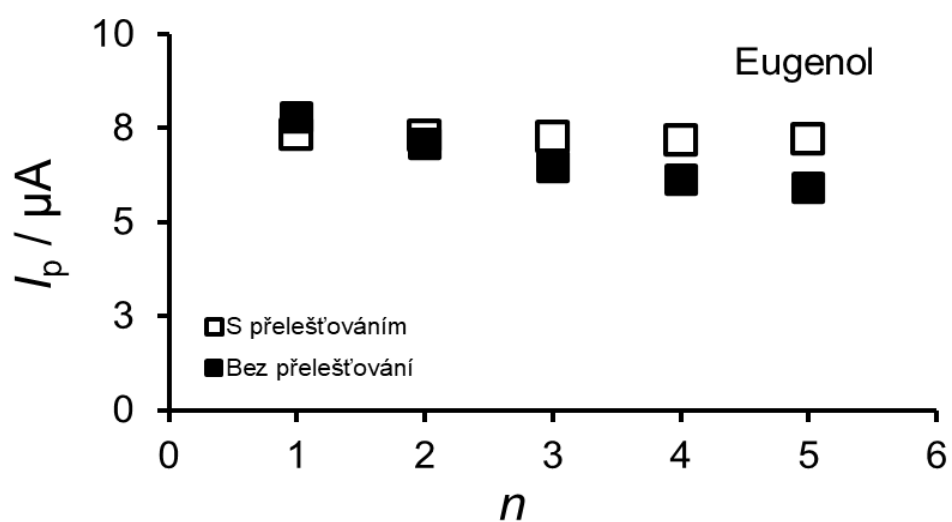
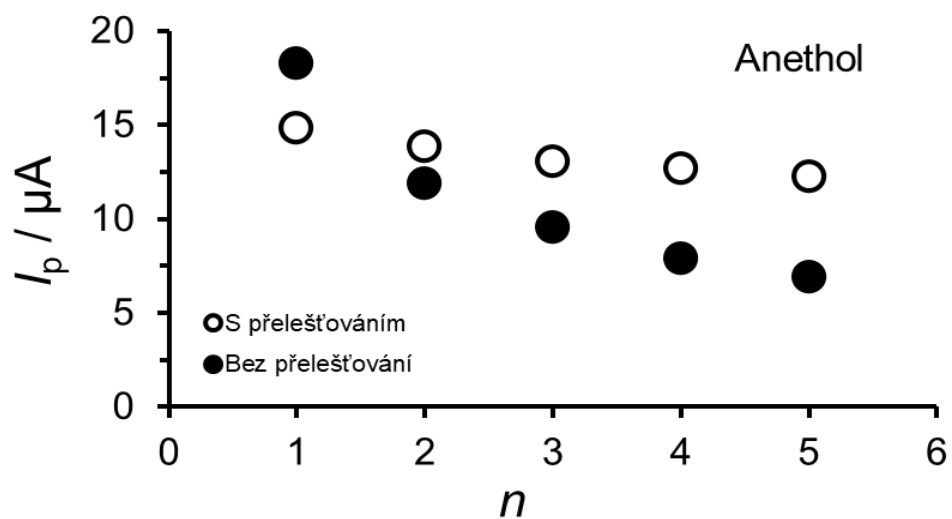
Opakovatelnost měření byla posuzována pomocí výšky píků jednotlivých látek (viz. záznam 15). U všech látek byl pozorován pokles signálu, pokud nebyla elektroda leštěna před každým měřením. U eugenolu byl pokles mírný, ale u anetholu a myristicinu byl pokles velmi značný. Od třetího měření bez přešetřování elektrody nebylo dokonce možné oddělit pík myristicinu od anetholu. Bylo tedy zjištěno, že povrch elektrody se musí před každým měřením znovu leštit.

Amplituda byla optimalizována pomocí několika měření, kde byla v parametrech měněna její hodnota. Bylo provedeno 10 měření, kde amplituda byla volena v rozmezí od 10 do 100 mV s krokem po 10 mV (viz. záznam 16). Z grafu závislosti výšky píků na hodnotě amplitudy bylo odečteno, že výšky píků rostou do amplitudy zhruba 50 mV a poté se drží kolem dané hodnoty. Pro další měření byla proto vybrána amplituda 50 mV.

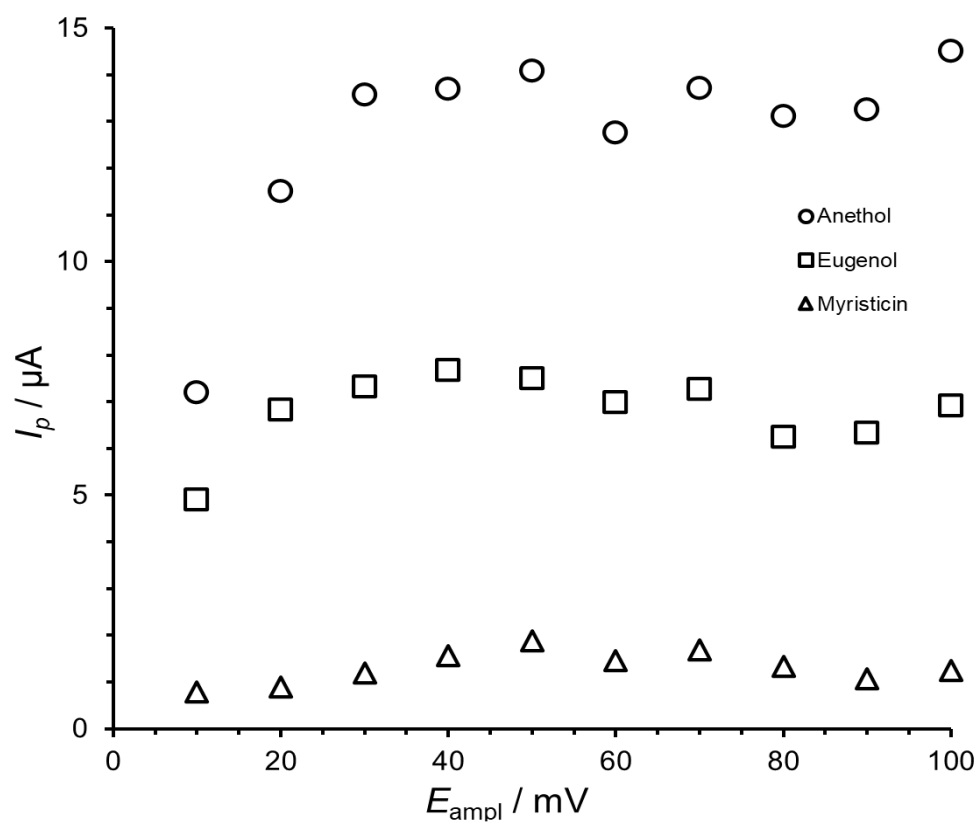
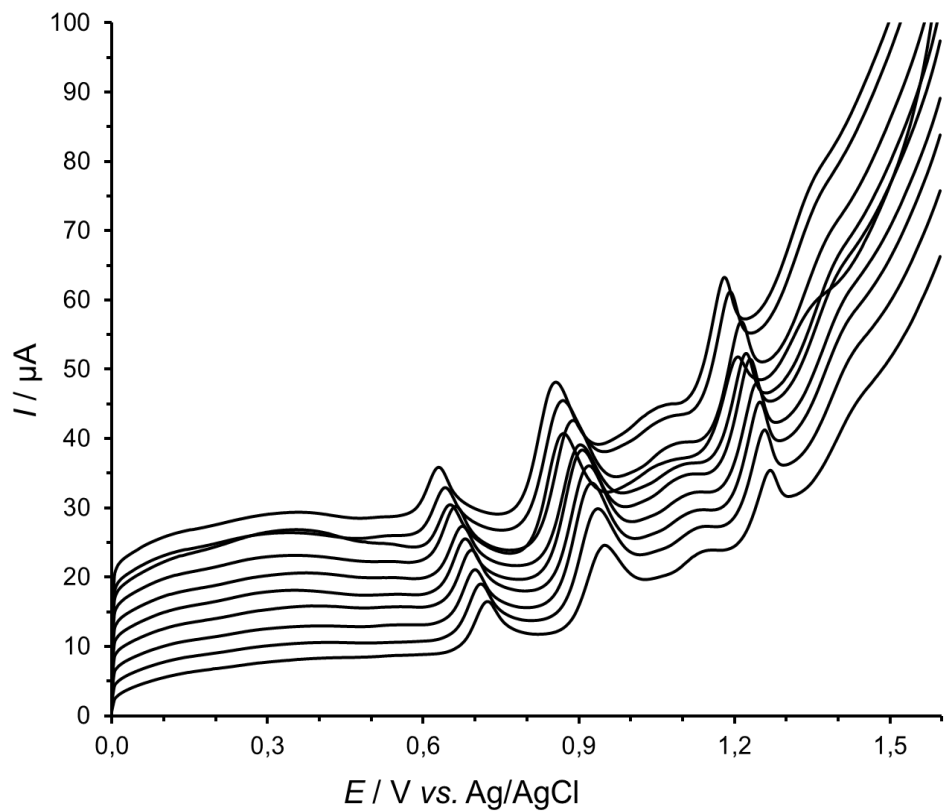
Optimalizace frekvence byla provedena podobně jako u amplitudy. Bylo provedeno 9 měření, kde frekvence byla volena v rozmezí od 10 do 90 Hz s krokem po 10 Hz (viz. záznam 17). Z grafu závislosti výšky píků na hodnotě frekvence bylo viditelné, že výšky píků stále rostou. U výběru frekvence bylo nutno udělat kompromis mezi výškou píků a jejich separací. Byla proto vybírána co nejvyšší frekvence, kde byly píky ještě dobře separované. Nakonec byla pro měření vybrána frekvence 40 Hz.

Dále byla sledována možnost adsorpce vybraných látek na povrch elektrody. Byl připraven měrný roztok, do něho byla vložena elektroda a roztok byl nechán za stálého míchání stát po dobu 0, 1, 2, 5, 10 a 15 minut. Po uplynutí dané doby bylo provedeno měření za již optimalizovaných podmínek (viz. záznam 18). Jak je patrné z grafu, u eugenolu není téměř žádný pokles, zatímco u anetholu je pokles velmi zřetelný. Naproti tomu hodnoty pro myristicin mírně rostou. Z tohoto lze usuzovat, že dochází k adsorpci myristicinu na úkor anetholu.

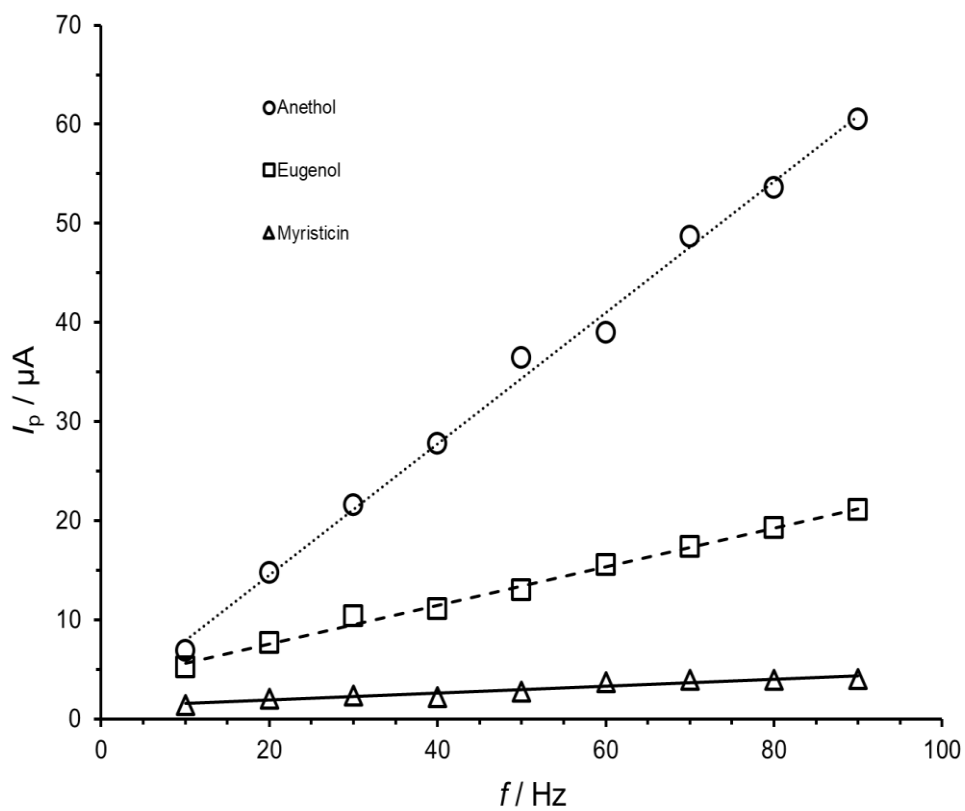
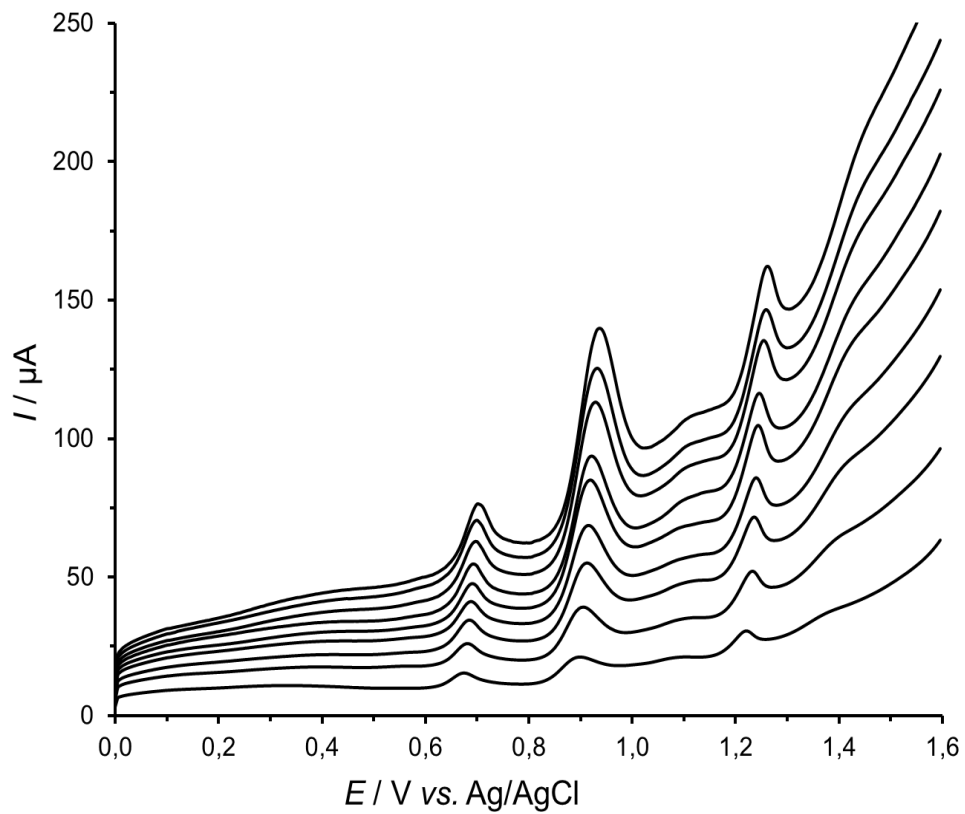
Nakonec bylo sledováno, zda se změní průběh měření při posunu počátečního potenciálu (viz. záznam 19). Počáteční potenciál byl nastaven na hodnoty 0 V, 0,1 V, 0,2 V, 0,3 V a 0,4 V. Naměřená data jsou shodná pro všechny počáteční potenciály, tudíž posun počátečního potenciálu nemá na tuto analýzu vliv.



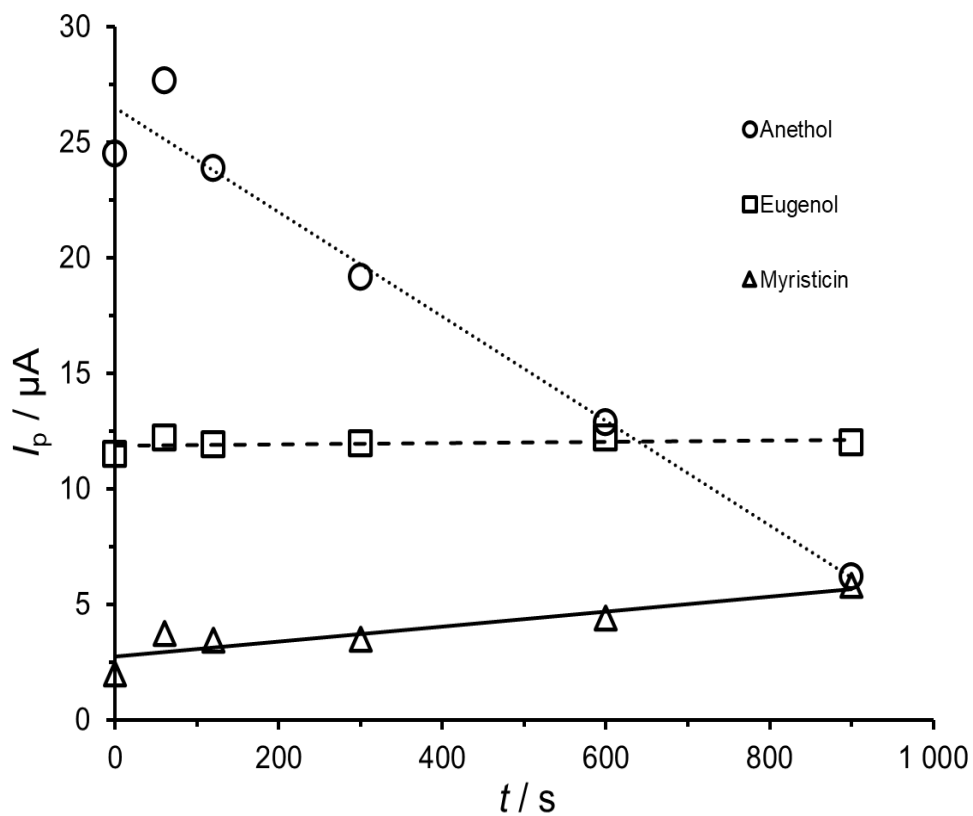
Záznam 15 Opakovatelnost měření pro signály u jednotlivých látek



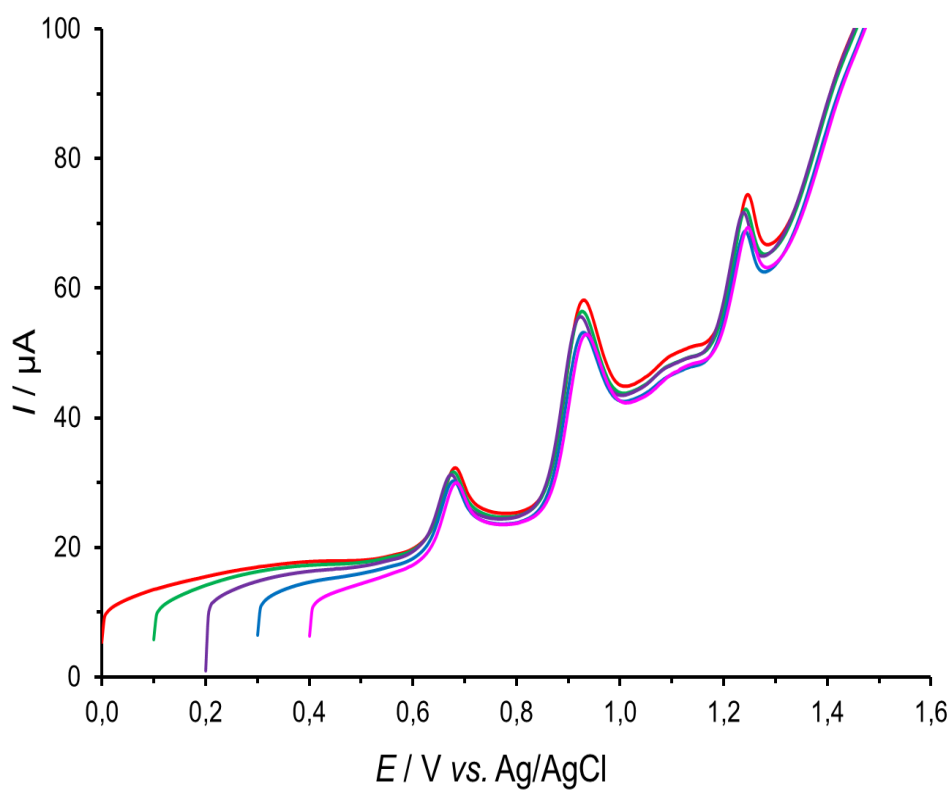
**Záznam 16** *Optimalizace amplitudy u SWV-rampy*



**Záznam 17** Optimalizace frekvence u SWV-rampy



**Záznam 18** Průběh adsorpce na elektrodu



**Záznam 19** Studium vlivu počátečního potenciálu

#### 5.2.4 Validace vyvinuté metody

Byly připraveny tři modelové vzorky. Model A obsahoval pouze anethol, model E obsahoval pouze eugenol a model M obsahoval pouze myristicin. Pro každý vzorek byla změřena nejdříve kalibrace s použitím pouze té látky, která se nacházela v modelovém vzorku. Poté byl každý vzorek změřen 5x, z daných měření byl vypočítán průměr, odchylka a návratnost metody. Pro všechny výpočty byly použity hodnoty výšek píků, protože z nich vypočítané hodnoty byly přesnější než hodnoty vypočítané za použití ploch píků. Pro zápis výsledků byl použit výpočet pomocí studentova rozdělení pro 95% spolehlivost pro 5 měření ( $t = 2,02$ ). Výsledky měření pro všechny modelové vzorky jsou uvedeny v tabulce 1.

**Tab. 1** *Výsledky měření pro modelové vzorky*

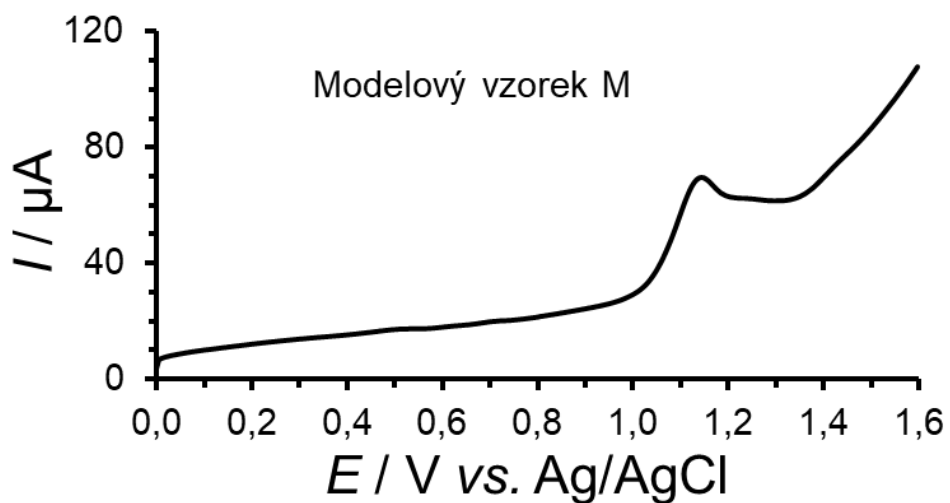
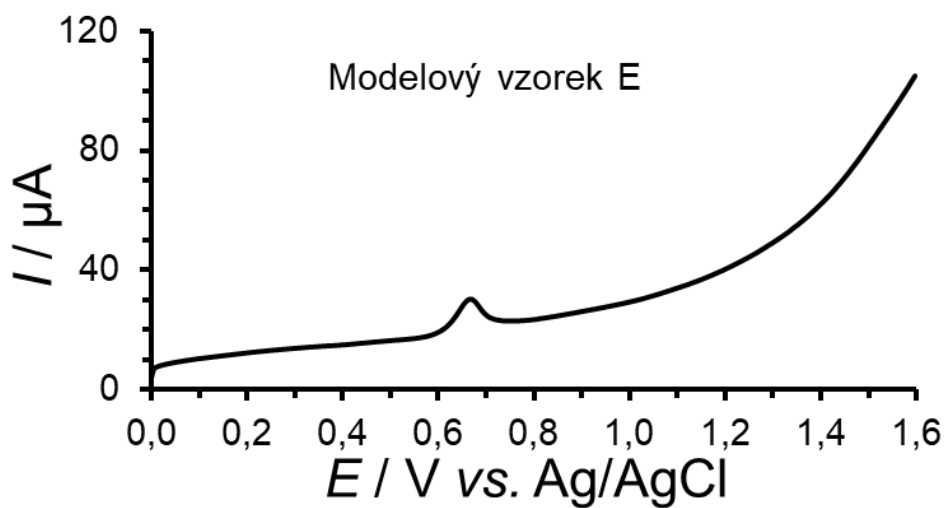
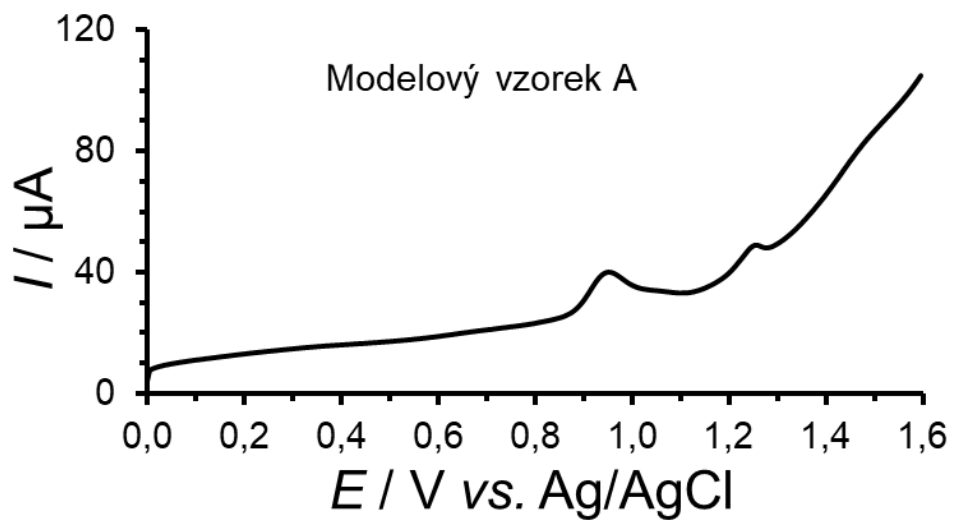
Vzorek	SWV / $\mu\text{mol/l}$	Deklarované množství / $\mu\text{mol/l}$	Návratnost / %
Model A	$51,15 \pm 2,77$	48,25	106,0
Model E	$51,46 \pm 4,68$	51,77	99,4
Model M	$45,37 \pm 6,23$	46,30	98,0

Bylo provedeno měření modelového vzorku A (viz. záznam 20). Byla změřena kalibrace o koncentraci anetholu od 20 do 200  $\mu\text{mol/l}$  (viz. záznam 21). Z naměřených dat byly vyřazeny 3 body pro lepší linearitu kalibrace. Vzniklá rovnice regrese  $I_p = 0,1288 c + 6,0775$  ( $R^2 = 0,9957$ ) byla použita pro výpočet koncentrace modelového vzorku dle naměřených dat. Vypočtená koncentrace anetholu v modelovém vzorku A byla  $51,15 \pm 2,77 \mu\text{mol/l}$ . Vzorek reálně obsahoval 48,25  $\mu\text{mol/l}$ . Návratnost metody pro anethol je tedy 106,0 %.

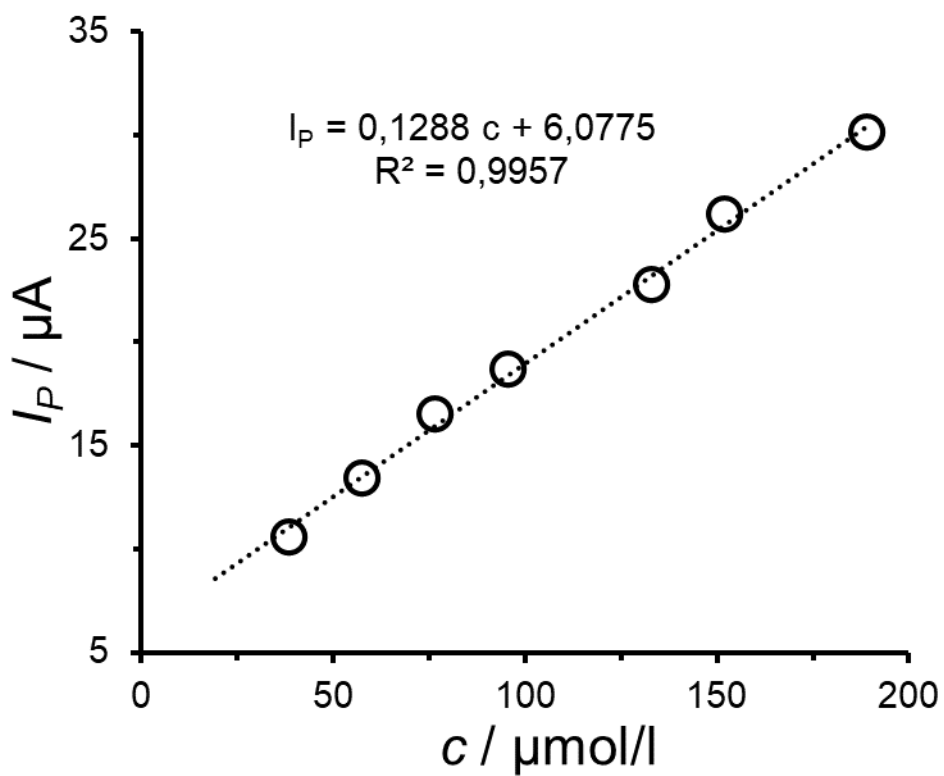
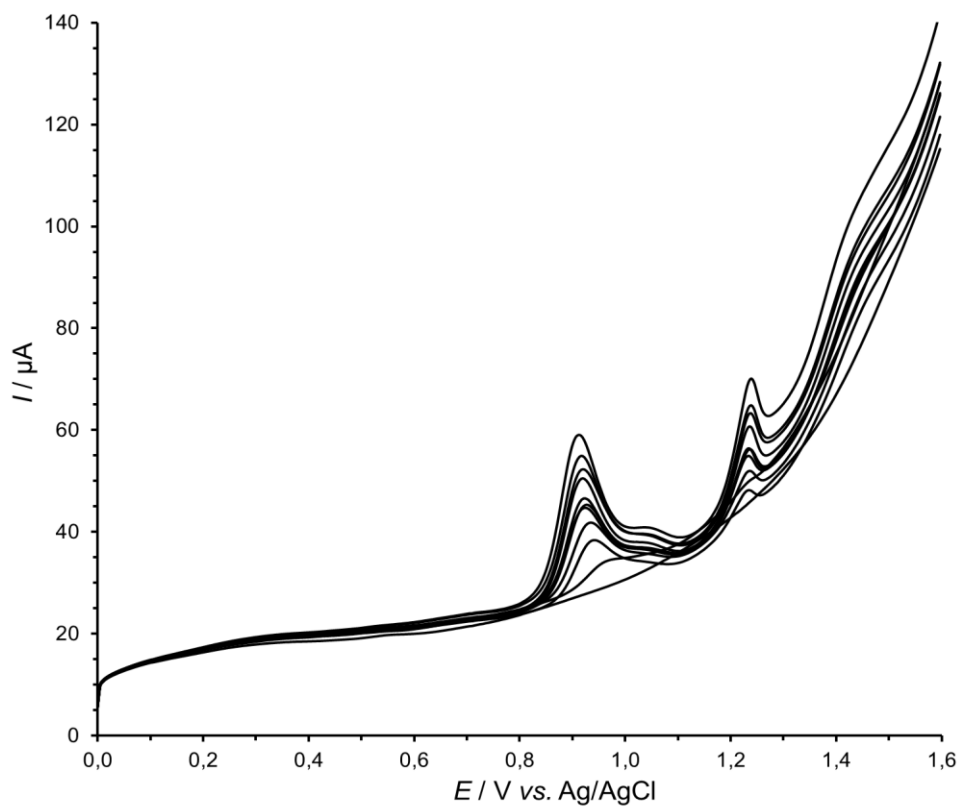
Bylo provedeno měření modelového vzorku E (viz. záznam 20). Byla změřena kalibrace o koncentraci eugenolu od 20 do 200  $\mu\text{mol/l}$  (viz. záznam 22). Z naměřených dat byly vyřazeny poslední 2 body pro lepší linearitu kalibrace. Vzniklá rovnice regrese  $I_p = 0,1665 c + 2,1785$  ( $R^2 = 0,9957$ ) byla použita pro výpočet koncentrace modelového vzorku dle naměřených dat. Vypočtená koncentrace eugenolu v modelovém vzorku E byla  $51,46 \pm 4,68 \mu\text{mol/l}$ . Vzorek reálně obsahoval 51,77  $\mu\text{mol/l}$ . Návratnost metody pro eugenol je tedy 99,4 %.

Bylo provedeno měření modelového vzorku M (viz. záznam 20). Byla změřena kalibrace o koncentraci myristicinu od 20 do 200  $\mu\text{mol/l}$  (viz. záznam 23). Z naměřených dat byl vyřazen první a poslední bod pro lepší linearitu kalibrace. Vzniklá rovnice regrese  $I_p = 0,308 c + 6,2637$  ( $R^2 = 0,9933$ ) byla použita pro výpočet koncentrace modelového vzorku dle naměřených dat. Vypočtená koncentrace myristicinu v modelovém vzorku M byla  $45,37 \pm 6,23 \mu\text{mol/l}$ . Vzorek reálně obsahoval 46,3  $\mu\text{mol/l}$ . Návratnost metody pro myristicin je tedy 98,0 %.

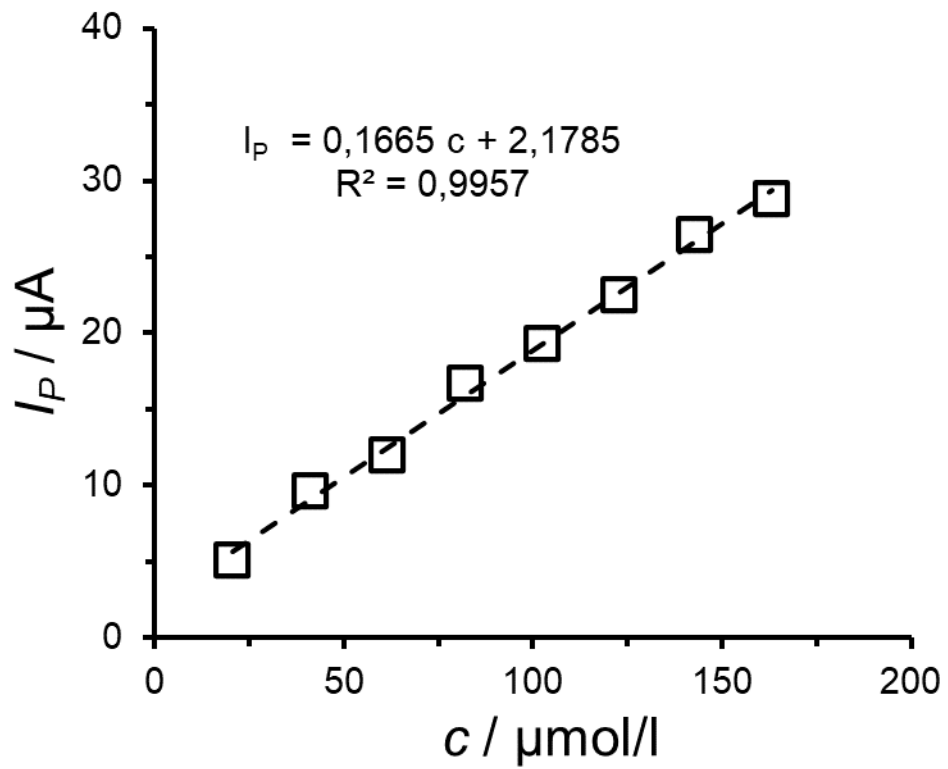
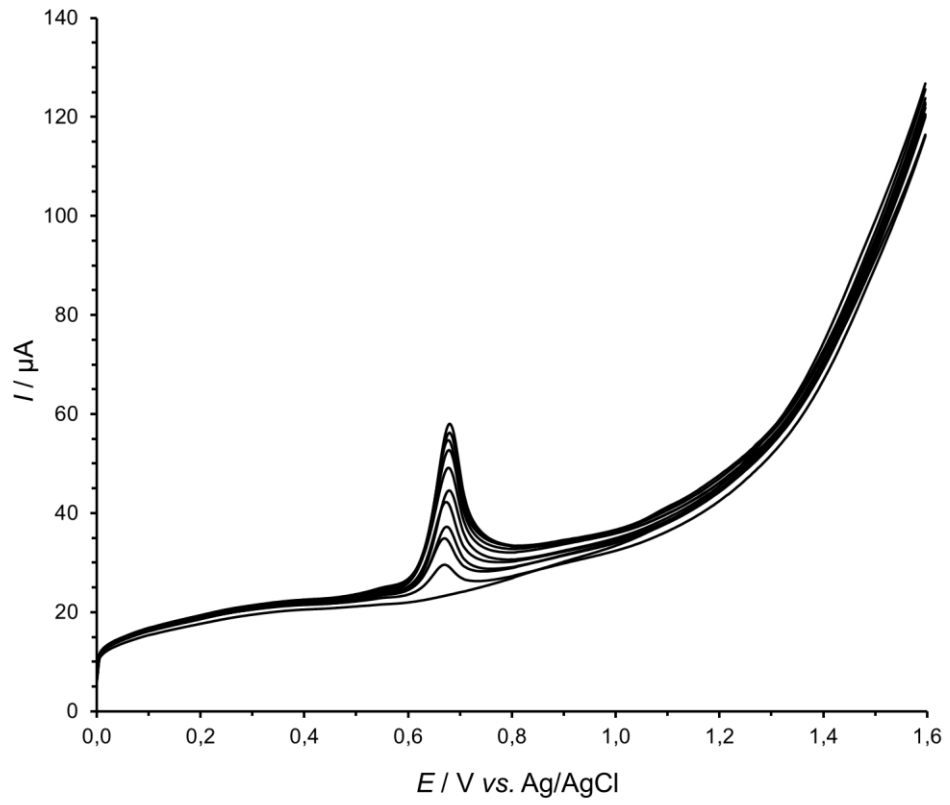




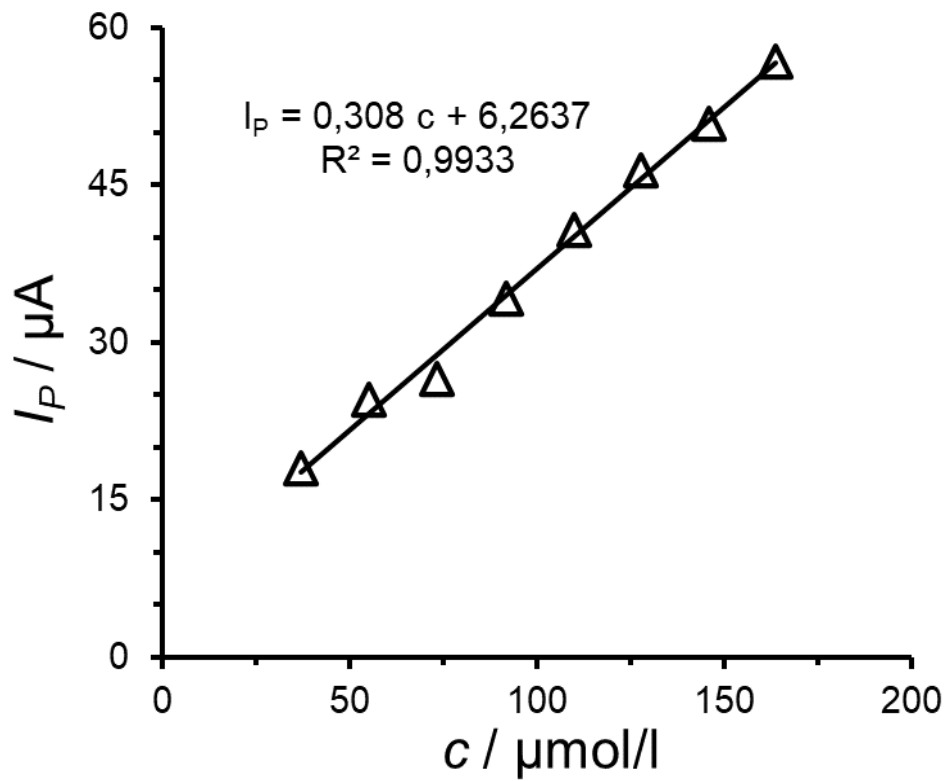
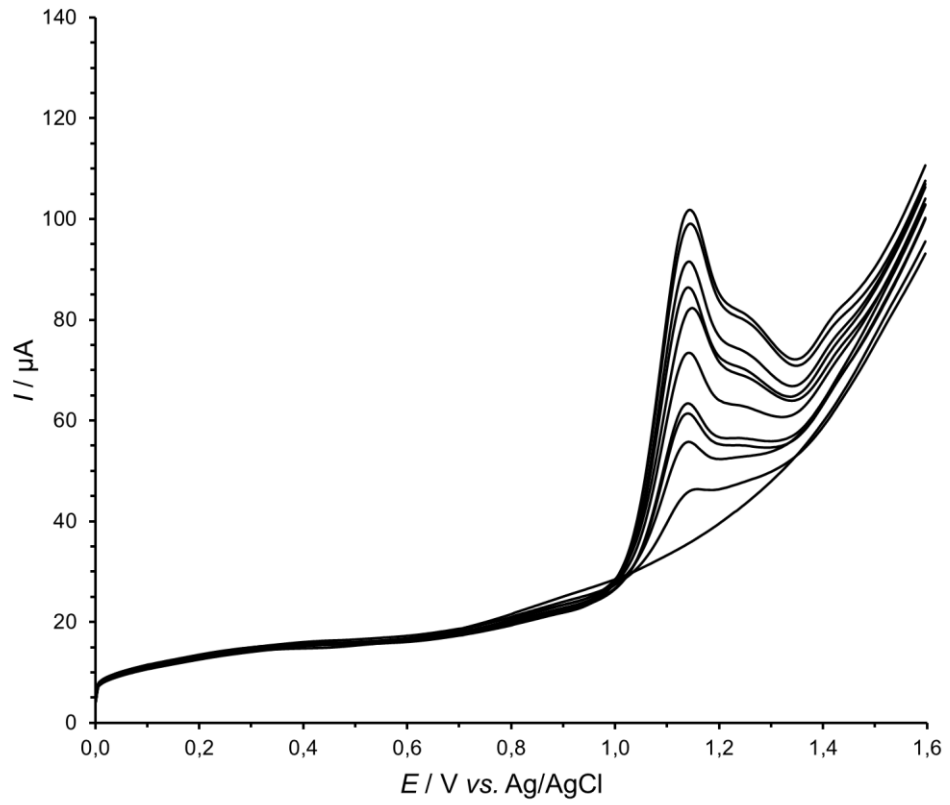
Záznam 20 Analýza modelových vzorků



**Záznam 21** Kalibrace anetholu (záznam a výsledný graf)

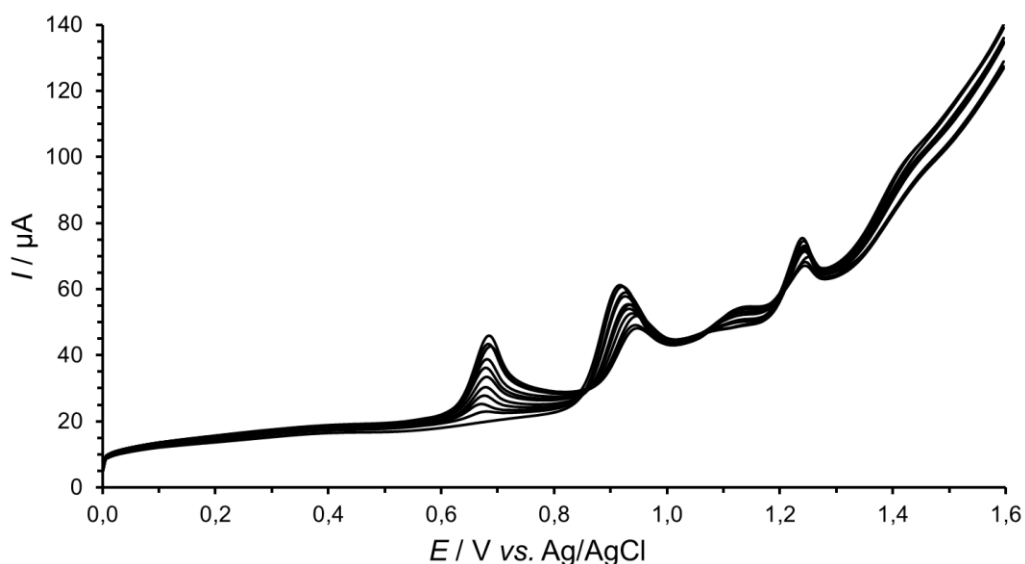


**Záznam 22** Kalibrace eugenolu (záznam a výsledný graf)

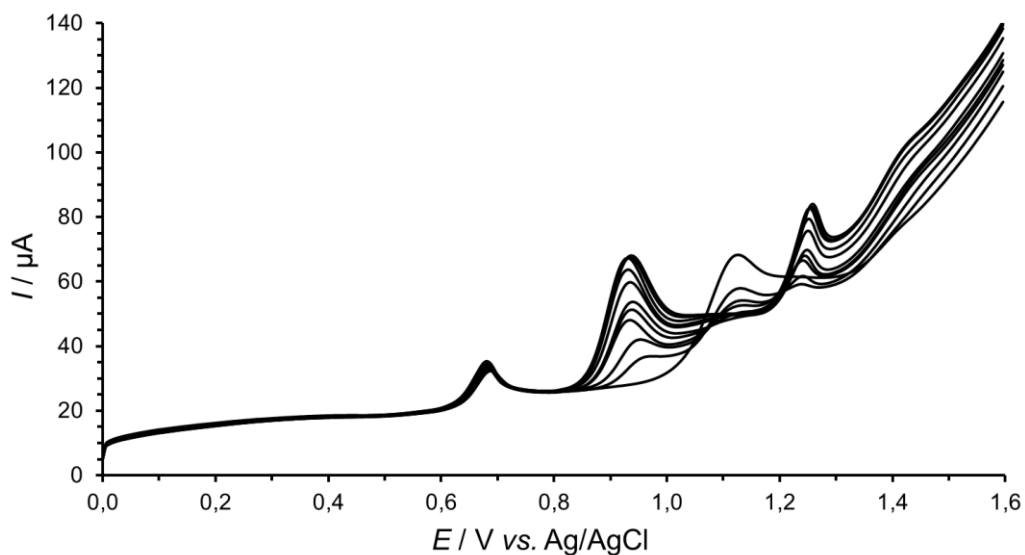


**Záznam 23** Kalibrace myristicinu (záznam a výsledný graf)

Byly měřeny i kalibrace pro roztoky obsahující všechny 3 látky. Bylo zjištěno, že na stanovení eugenolu nemá přítomnost dalších látek téměř žádný vliv (viz. záznam 24). Oproti tomu by bylo velmi obtížné stanovit myristicin vedle anetholu a naopak. S rostoucí koncentrací anetholu klesá pík myristicinu, až se spojí s píkem anetholu (viz. záznam 25). Při nízké koncentraci anetholu by bylo možné stanovit větší množství myristicinu. Při koncentraci anetholu 100  $\mu\text{mol/l}$  se hodnoty LOQ pro myristicin pohybují kolem 60  $\mu\text{mol/l}$ . Z toho vyplývá, že eugenol lze stanovit vedle anetholu i myristicinu. Myristicin vedle anetholu lze stanovit jen velmi obtížně, stejně tak i anethol v přítomnosti myristicinu.



**Záznam 24** Záznamy z kalibrace eugenolu za přítomnosti anetholu a myristicinu



**Záznam 25** Záznamy z kalibrace anetholu za přítomnosti eugenolu a myristicinu

Pro každou kalibraci bylo provedeno 5 měření pro nízké koncentrace standardních látek. Z těchto 5 měření bylo vypočteno pro každou látku LOD a LOQ. LOD byl vypočítán jako  $3 \cdot \text{směrodatná odchylka} / \text{směrnice}$  z kalibrace. LOQ byl vypočítán jako  $10 \cdot \text{směrodatná odchylka} / \text{směrnice}$  z kalibrace. Pro porovnání metody s jinými již dříve použitými byl použit lineární rozsah a mez detekce. Porovnání této metody s vybranými dříve použitými je uvedeno v tabulce 2.

**Tab. 2** Porovnání této metody s již dříve použitými metodami

Analyt	Elektroda	Medium	Lineární rozsah	LOD	Reference
			$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$	
Anethol	GCE	0,05 M HClO <sub>4</sub>	8,75 až 189,20	2,10	tato práce
	BDDE	0,1 M octanový pufr pH 6	4,72 až 118,08	0,16	[55]
	GCE	0,1 M octanový pufr pH 6	4,72 až 118,08	0,07	[55]
	CPE	0,1 M octanový pufr pH 6	4,72 až 118,08	0,04	[55]
	CeO <sub>2</sub> /CPE	0,1 M octanový pufr pH 6	4,72 až 118,08	0,07	[55]
	La <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /CPE	0,1 M octanový pufr pH 6	4,72 až 118,08	0,03	[55]
Eugenol	GCE	0,05 M HClO <sub>4</sub>	14,06 až 163,00	5,57	tato práce
	SnO <sub>2</sub> / CPE	0,1 M fosfátový pufr pH 3	0,05 až 440,00	0,02	[63]
	BDDE	0,1 M octanový pufr pH 6	2,63 až 98,72	0,13	[61]
	Grafen / CPE	Britton-Robinson pufr pH 2 Britton-Robinson pufr pH 2	0,10 až 17,00	0,007	[60]
	PGE	s 0,1 M KCl	0,30 až 50,00	0,085	[59]
Myristicin	GCE	0,05 M HClO <sub>4</sub>	15,75 až 181,60	4,72	tato práce

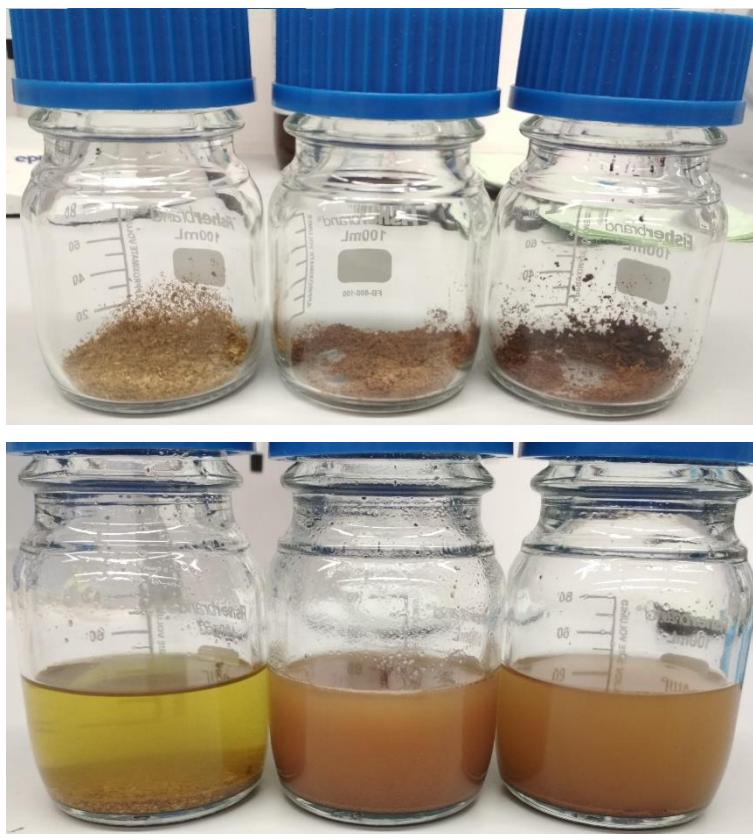
V porovnání s nalezenou literaturou má metoda z této práce vyšší LOD i LOQ, ale na druhou stranu má větší lineární rozsah. Jelikož je elektroanalýza eugenolu častější než u zbylých dvou látek, je k dispozici více druhů měření a modifikací elektrod. Oproti již dříve použitým metodám má tato vyšší LOD i LOQ. Pro analýzu koření je však vhodnější tato metoda, protože u většiny dřívějších metod je malý lineární rozsah. Pro elektroanalýzu myristicinu byla nalezena pouze 1 předešlá práce. Jelikož se v dané práci nepíše, jaké jsou LOD, LOQ či stanovené množství, nelze tuto metodu porovnat s žádnou jinou elektrochemickou metodou. Rozdíl mezi jednotlivými metodami je v tom, že v této práci byly hledány jednotné parametry pro 3 látky, a to anethol, eugenol a myristicin, zatímco v nalezené literatuře byla vyvíjena vhodná metoda pouze pro analýzu jedné konkrétní látky.

### 5.3 Analýza koření

Pro analýzu reálných vzorků byly vybrány 3 druhy koření. Jako zástupce koření obsahující anethol byl vybrán anýz. Jako druhé koření byl vybrán hřebíček, který obsahuje eugenol. Poslední vybrané koření byl muškátový oříšek, který obsahuje myristicin a eugenol.

#### 5.3.1 Úprava vzorku k analýze

Vzorek muškátového oříšku byl koupen již mletý. Vzorky anýzu a hřebíčku byly koupeny celé a poté nadrceny ve třecí misce. Od každého koření byly naváženy cca 2 g. Anýzu bylo naváženo 2,0320 g, hřebíčku 2,0156 g a muškátového oříšku 2,0183 g. Koření bylo převedeno do nádobek. Ke každému koření bylo přidáno 50 ml ethanolu (viz. obr. 14). Vzorky byly uzavřeny a umístěny do uzavíratelného ultrazvuku, aby byly ve tmě. Ultrazvuk byl nastaven na intenzitu 5 a vzorky v něm byly nechány 20 minut. Jelikož se ultrazvuk zahříval, byla snížena jeho intenzita na hodnotu 1. Vzorky byly v ultrazvuku nechány ještě 30 a 30 minut. Byly odebrány vzorky hřebíčku po 20, 50 a 80 minutách v ultrazvuku. Podle výsledků měření bylo zjištěno, že koncentrace pro všechny 3 časy je téměř stejná. Pro extrakci tedy stačí 20 minut.



Obr. 14 Extrakty koření

### 5.3.2 Výsledky analýzy

Pro jednotlivé vzorky koření byly změřeny kalibrace. Kalibrace samostatného anetholu pro anýz, kalibrace samostatného eugenolu pro hřebíček a kalibrace myristicinu s eugenolem pro muškátový oříšek. Extrakty vzorků byly před měřením filtrovány přes stříkačkový mikrofiltr. Každý extrakt byl změřen 5x. Pro všechny výpočty byly použity hodnoty výšek píků, protože z nich vypočítané hodnoty byly přesnější než hodnoty vypočítané za použití ploch píků. Byl vybrán výpočet pomocí kalibrační křivky, protože úsek u rovnic regresí je významný. Výpočet pomocí vícenásobného standardního přídatku byl proveden u vzorku hřebíčku a vedl k nesprávným výsledkům. Pro zápis výsledků byl použit výpočet pomocí studentova rozdělení pro 95% spolehlivost pro 5 měření ( $t = 2,02$ ) v případě anýzu nebo pro 3 měření ( $t = 2,35$ ) pro hřebíček a muškátový oříšek. Výsledky měření pro všechny vzorky jsou uvedeny v tabulce 3.

**Tab. 3** Vzorky koření

Vzorek	Látka	SWV (mg/g)	Deklarované množství (mg/g)	Reference
Anýz	Anethol	$15,53 \pm 0,91$	16,00 až 57,00	[65]
Hřebíček	Eugenol	$130,36 \pm 15,46$	93,80 až 146,50	[66]
Muškátoový ořech	Myristicin	$2,21 \pm 0,12$	0,60 až 12,90	[67]

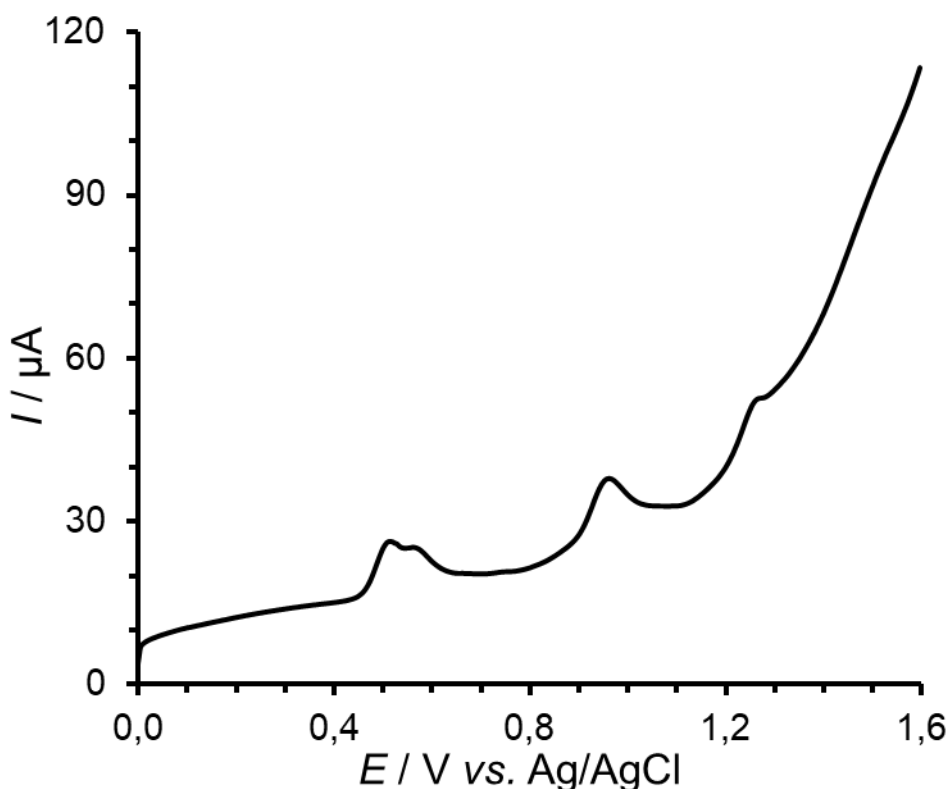
Extrakt anýzu byl po filtraci změřen (viz. záznam 26). Byla změřena kalibrace pro samotný anethol (viz. záznam 21). Rovnice kalibrační přímky pro anýz je  $I_p = 0,1288 c + 6,0775$  ( $R^2 = 0,9957$ ). Pomocí této rovnice, přepočtů s pipetacemi a navázkou a za pomoci studentova rozdělení bylo stanoveno množství anetholu v anýzu na  $15,53 \pm 0,91$  mg/g. Deklarované množství je 16,00 až 57,00 mg/g. Stanovené množství anetholu v anýzu je tedy na spodní hranici deklarovaného množství. Kromě dvou píků pro anethol s hodnotami + 0,95 V a + 1,25 V je v grafu vidět i pík u + 0,55 V. Vzhledem ke složení anýzu by se mohlo jednat o acetaldehyd nebo nějaký z fenyylpropanoidů.

Extrakt hřebíčku byl po filtraci změřen (viz. záznam 27). Byla změřena kalibrace pro samotný eugenol (viz. záznam 29). Jelikož je v grafu extraktu dvojitý pík na místě eugenolu a eugenolu připadá nižší z nich, byla kalibrace sestrojena z absolutních výšek daných píků. Rovnice kalibrační přímky pro eugenol je  $I_p = 0,1751 c + 3,9676$  ( $R^2 = 0,9945$ ). Pomocí této rovnice, přepočtů s pipetacemi a navázkou a za pomoci studentova rozdělení bylo stanoveno množství eugenolu v hřebíčku na  $130,36 \pm 15,46$  mg/g. Deklarované množství

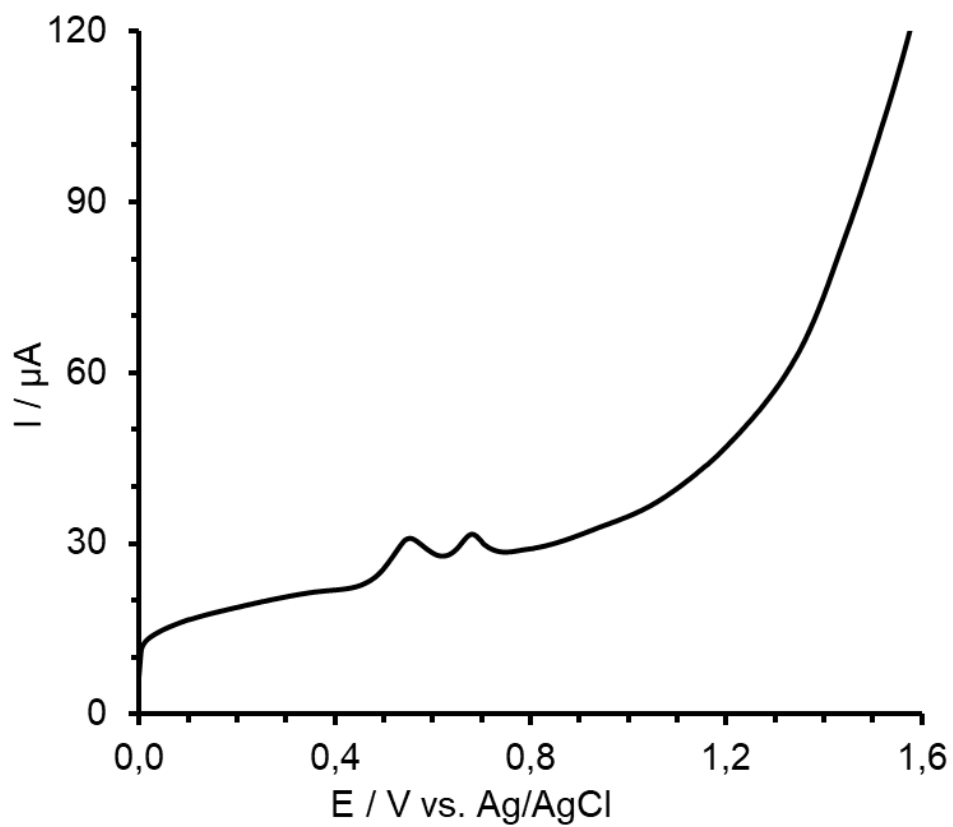


je 93,80 až 146,50 mg/g. Stanovené množství eugenolu v hřebíčku se nachází v intervalu deklarovaného množství. Jak už bylo psáno, je kromě píku eugenolu v grafu i pík jiné látky, který je velmi blízko píku eugenolu. Podle složení hřebíčku předpokládám, že se jedná o isoeugenol nebo eugenolacetát.

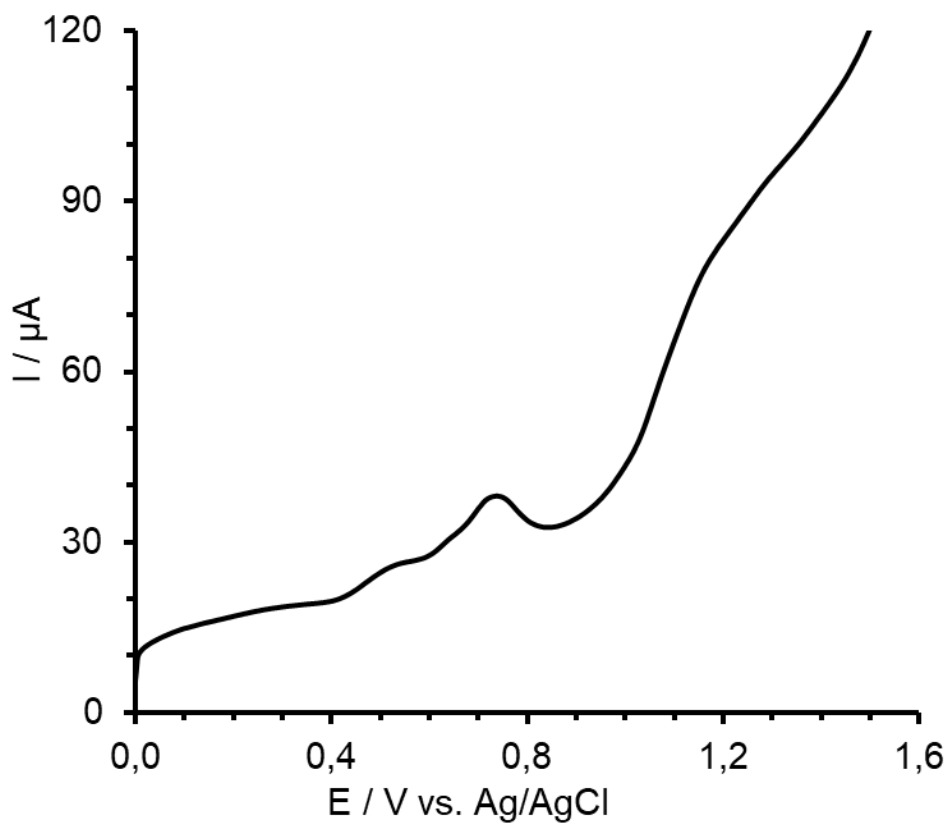
Extrakt muškátového byl po filtraci změřen (viz. záznam 28). Byla změřena kalibrace pro myristicin s eugenolem (viz. záznam 30). Rovnice kalibrační přímky pro myristicin je  $I_p = 0,2497 c + 4,9302$  ( $R^2 = 0,9894$ ). Pomocí této rovnice, přepočtů s pipetacemi a navázkou a za pomoci studentova rozdělení bylo stanoveno množství myristicinu v muškátovém oříšku na  $2,21 \pm 0,12$  mg/g. Deklarované množství je 0,60 až 12,90 mg/g. Stanovené množství myristicinu v muškátovém oříšku se nachází v intervalu deklarovaného množství. Muškátový oříšek obsahuje i eugenol. Eugenol v tomto případě nemohl být stanoven, protože je jeho pík nevýrazný. Pík myristicinu se nachází v + 1,2 V. Pík eugenolu vidíme v + 0,55 V. V + 0,75 V je vykreslen výrazný pík. Dle složení muškátového oříšku se jedná o některý z terpenů či fenylypropanoidů.



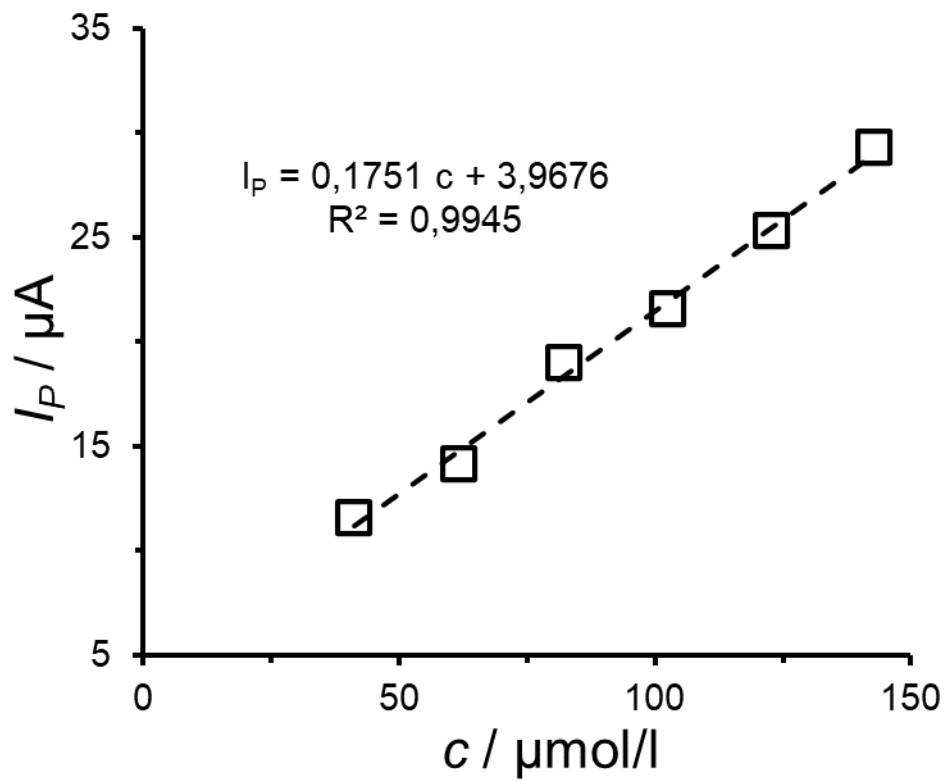
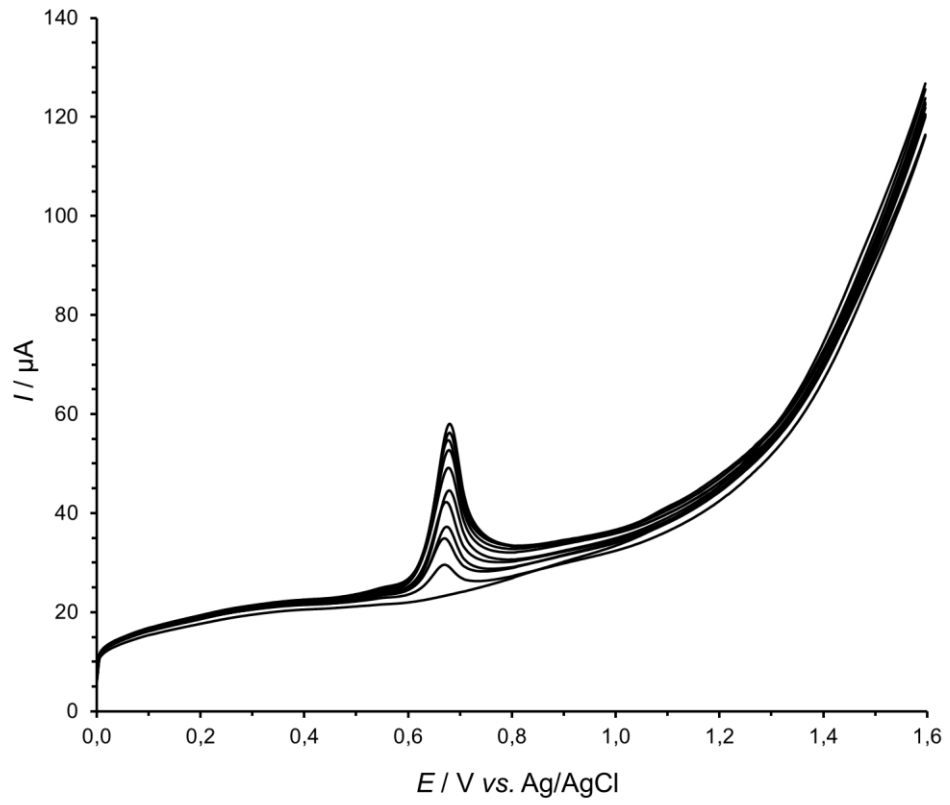
**Záznam 26** Analýza extraktu anýzu



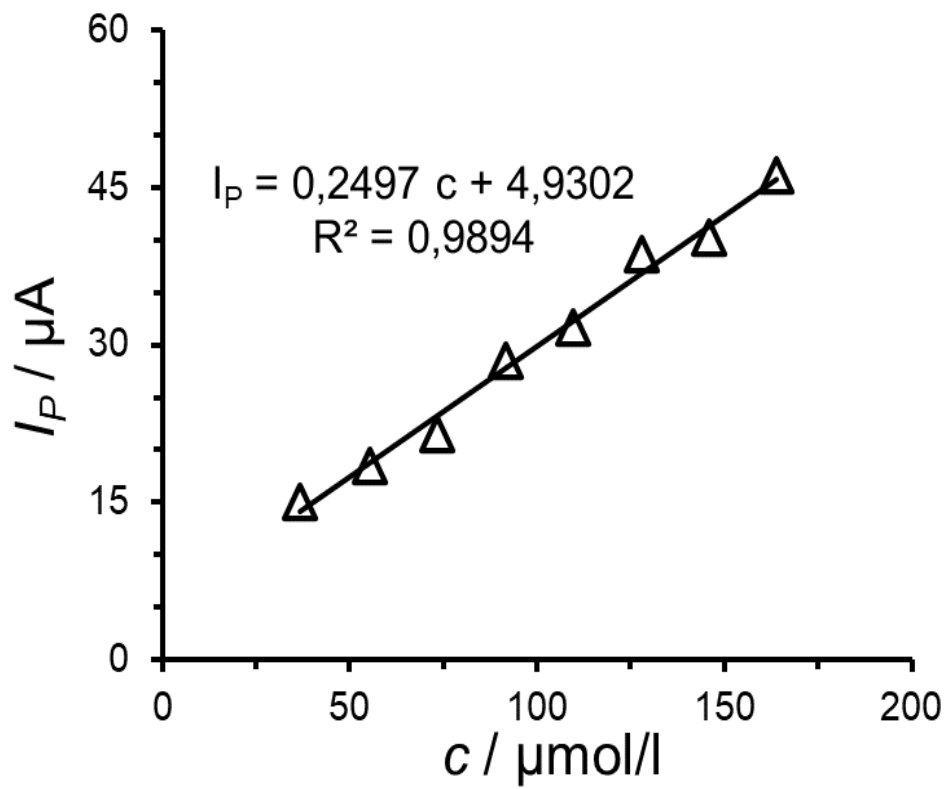
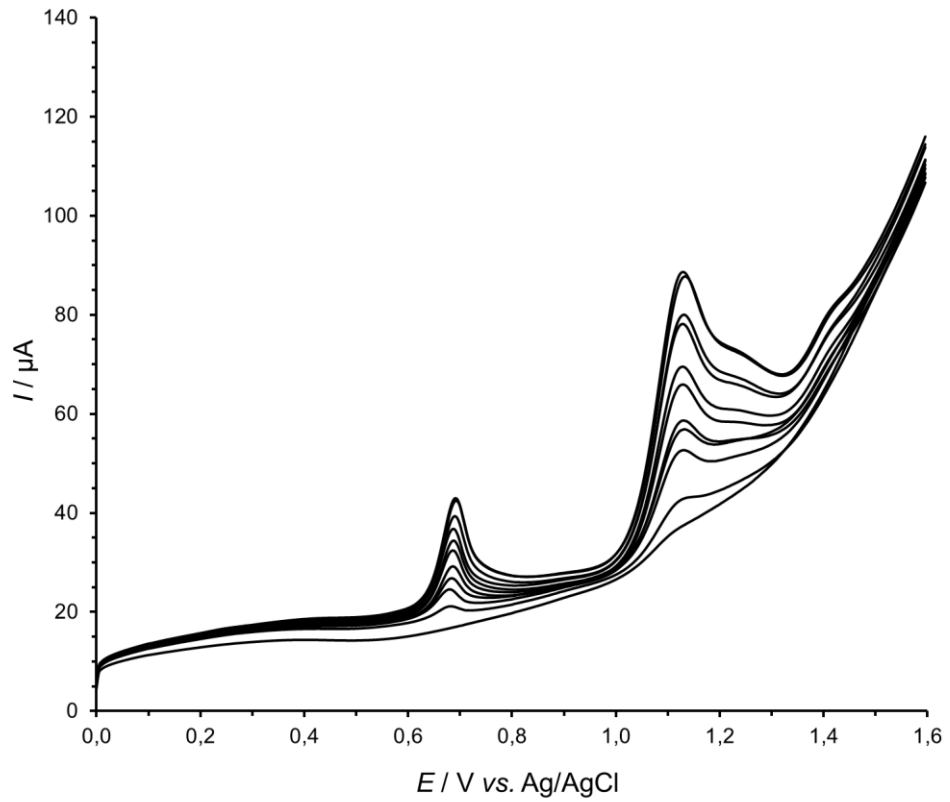
**Záznam 27** Analýza extraktu hřebíčku



**Záznam 28** Analýza extraktu muškátového oříšku



**Záznam 29** Kalibrace eugenolu z absolutní výšky (záznam a výsledný graf)



**Záznam 30** Kalibrace myristicinu s přidavky eugenolu (záznam a výsledný graf)

## Závěr

Bylo potvrzeno, že vybrané aromatické látky, anethol, eugenol a myristicin, jsou elektrochemicky aktivní. Pomocí cyklické voltametrie bylo zjištěno, že u všech látek dochází k jejich oxidaci. Anethol se oxiduje okolo + 1,0 V, eugenol mezi + 0,2 a + 0,7 V a myristicin okolo + 1,1 V. U všech látek dochází se zvyšujícím se pH k posunu k nižším hodnotám potenciálu. Pro analýzu byla vybrána square-wave voltametrie (SWV). Jako pracovní elektroda byla vybrána elektroda ze skelného uhlíku (GCE), jako referentní chloridostříbrná a jako pomocná Pt-plíšek. Jako pracovní elektrolyt byla vybrána HClO<sub>4</sub> o koncentraci 0,05 mol/l. Při optimalizaci parametrů SWV bylo zjištěno, že se před každým měřením musí povrch elektrody přečistit a zároveň, že se musí měřit ihned po vložení elektrody do roztoku, aby nedocházelo k nežádoucí adsorpci látek na povrch elektrody. Pro další měření byla vybrána amplituda 50 mV a frekvence 40 Hz. Při výběru počátečního potenciálu byla zvolena hodnota 0. Hodnota počátečního potenciálu nemá vliv na záznam měření.

Byly změřeny tři modelové vzorky, a to model A, model E a model M. Modelový vzorek A obsahoval pouze anethol, který byl stanoven na  $51,15 \pm 2,77$   $\mu\text{mol/l}$ . Návratnost pro anethol je 106,0 %. Modelový vzorek E obsahoval pouze eugenol, který byl stanoven na  $51,46 \pm 4,68$   $\mu\text{mol/l}$ . Návratnost pro eugenol je 99,4 %. Modelový vzorek M obsahoval pouze myristicin, který byl stanoven na  $45,37 \pm 6,23$   $\mu\text{mol/l}$ . Návratnost pro myristicin je 98,0 %. V porovnání s jinými metodami má tato poněkud vyšší LOD i LOQ. Má však větší lineární rozsah, což je důležité hlavně u eugenolu, kterého je v koření velké množství. Díky širokému lineárnímu rozsahu nebylo nutné přílišné ředění vzorku. V této metodě byla zvolena GCE, která je levnější i snazší při použití, než modifikované či diamantové elektrody. Je také běžně komerčně dostupná a při správné úpravě povrchu spolehlivá.

Reálné vzorky koření byly nadrceny a extrahovány ethanolem v ultrazvuku. Extrakty byly zfiltrány přes stříkačkový mikrofiltr. Ve vzorku anýzu byl stanovován anethol, který byl stanoven na  $15,53 \pm 0,91$  mg/g. Podle [65] obsahuje anýz 16,00 až 57,00 mg/g anetholu. Stanovené množství anetholu bylo na spodní hranici deklarovaného množství. Ve vzorku hřebíčku byl stanovován eugenol, který byl stanoven na  $130,36 \pm 15,46$  mg/g. Podle [66] obsahuje hřebíček 93,80 až 146,50 mg/g eugenolu. Stanovené množství eugenolu se nacházelo v rozmezí deklarovaného množství. Ve vzorku muškátového oříšku byl stanovován myristicin, který byl stanoven na  $2,21 \pm 0,12$  mg/g. Podle [67] obsahuje muškátový oříšek 0,60 až 12,90 mg/g myristicinu. Nalezené množství myristicinu se opět nacházelo v intervalu deklarovaného množství. Jelikož šlo o vzorky koření, byly na příslušných záznamech pozorovány i další odezvy, nejspíše přítomných inhibitorů – fenylypropanoidů.

## Použitá literatura

- [1] ŠVANCARA, I., R. METELKA, T. MIKYSEK a K. VYTRĚAS. 30 years with carbon paste electrodes at the University of Pardubice. *Scientific papers of the University of Pardubice*. 2017, **23**, str. 5-50. ISSN 1211-5541.
- [2] ŠVANCARA, I., K. KALCHER, A. WALCARIUS a K. VYTRĚAS. *Electroanalysis with carbon paste electrodes*. Boca Raton, USA: Taylor & Francis / CRC Press, 2012. Analytical chemistry series. ISBN 978-143-9830-192.
- [3] PETER, K. V. Introduction. *Handbook of herbs and spices*. Cambridge, Anglie: Woodhead Publishing Limited, 2001, Svazek 1, str. 1-12. ISBN 1-85573-562-8.
- [4] STEGLICH, W. *Römp encyclopedia natural product*. New York, USA: Thieme Medical Publishers, 2000, str. 35. ISBN 978-0-86577-988-4.
- [5] SURBURG, H. a J. PANTEN. *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*. 6. Edice. Weinheim, Německo: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2016, str. 144-145. ISBN 978-3-527-33160-4.
- [6] THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. *Food Chemicals Codex*. 11. Edice. Baltimore, USA: The United States Pharmacopeial Convention, 2018, str. 75. ISBN 978-1-936424-77-1.
- [7] ÖZGÜVEN, M. Aniseed. PETER, K. *Handbook of herbs and spices*. Cambridge, Anglie: Woodhead Publishing Limited, 2001, Svazek 1, str. 39-51. ISBN 1-85573-562-8.
- [8] SINGHAL, R., P. KULKARNI a D. REGE. *Handbook of indices of food quality and authenticity*. Cambridge, Anglie: Woodhead Publishing Limited, 1997, str. 415-416. ISBN 18-557-3299-8.
- [9] Badyán (*Illicium verum*). In: *Diety a hubnutí* [online]. [cit. 2021-06-15]. Dostupné z: <https://www.dietyahubnuti.cz/encyklopedie/koreni/badyan-illicium-verum/>
- [10] ASH, M. a I. *Handbook of Textile Processing Chemicals*. New York, USA: Synapse Information Resources, 2013, str. 648. ISBN 978-1-934764-52-7.
- [11] STEGLICH, W. *Römp encyclopedia natural product*. New York, USA: Thieme Medical Publishers, 2000, str. 220. ISBN 978-0-86577-988-4.
- [12] SURBURG, H. a J. PANTEN. *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*. 6. Edice. Weinheim, Německo: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2016, str. 149-150. ISBN 978-3-527-33160-4.
- [13] POHANISH, R. P. *Sittig's handbook of toxic and hazardous chemicals and carcinogens*. 6. Edice. Oxford, Anglie: Elsevier Inc. All rights reserved, 2012, str. 1291-1293. ISBN 978-1-4377-7869-4.

- [14] NURDJANNAH, N. a N. BERMAWIE. Clove. PETER, K. *Handbook of herbs and spices*. Cambridge, Anglie: Woodhead Publishing Limited, 2001, Svazek 1, str. 154-163. ISBN 1-85573-562-8.
- [15] KRISHNAMOORTHY, B. a J. REMA. Allspice. PETER, K. *Handbook of herbs and spices*. Cambridge, Anglie: Woodhead Publishing Limited, 2004, Svazek 2, str. 117-139. ISBN 1-85573-721-3.
- [16] Nové koření celé. In: *Eshop Bylinkářství* [online]. [cit. 2021-06-15]. Dostupné z: <http://www.bylinky21.eu/obchod/koreni/nove-koreni-cele>
- [17] THOMAS, J. a P. DUETHI. Cinnamon. PETER, K. *Handbook of herbs and spices*. Cambridge, Anglie: Woodhead Publishing Limited, 2001, Svazek 1, str. 143-153. ISBN 1-85573-562-8.
- [18] STEGLICH, W. *Römpp encyclopedia natural product*. New York, USA: Thieme Medical Publishers, 2000, str. 565. ISBN 978-0-86577-988-4.
- [19] KNOVEL CORPORATION. *Knovel Critical Tables* [online]. 2. Edice. Norwich, New York, USA: Knovel Corporation, 2008 [cit. 2021-06-03]. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpKCTE000X/knovel-critical-tables/knovel-critical-tables>
- [20] COULTATE, T. P. *Food: The chemistry of its components*. 6. Edice. Cambridge, Anglie: Royal Society of Chemistry, 2016, str. 443. ISBN 978-1-84973-880-4.
- [21] KRISHNAMOORTHY, B. a J. REMA. Nutmeg and mace. PETER, K. *Handbook of herbs and spices*. Cambridge, Anglie: Woodhead Publishing Limited, 2001, str. 238-248, Svazek 1. ISBN 1-85573-562-8.
- [22] JAISWAL, P., P. KUMAR, V. SINGH a D. SINGH. Biological Effects of *Myristica fragrans*. *Annual Review of Biomedical Sciences*. 2009, **11**, str. 21-29. ISSN 1806-8774. Dostupné z: [doi:10.5016/1806-8774.2009v11p21](https://doi.org/10.5016/1806-8774.2009v11p21)
- [23] Muškátový oříšek 5 ml. *Esenciální Olejíčky: Pro harmonii těla i duše* [online]. [cit. 2021-06-15]. Dostupné z: <https://www.esencialniolejicky.cz/Muskatovy-orisek-5-ml-d148.htm?tab=description>
- [24] ATTOKARAN, M. *Natural Food Flavors and Colorants*. 2. Edice. Chichester, Anglie: John Wiley & Sons Ltd, 2017, str. 290-292. ISBN 9781119114765.
- [25] DASGUPTA, A. *Effects of Herbal Supplements on Clinical Laboratory Test Results*. Berlin, Německo; New York, USA: Walter de Gruyter GmbH & Co.KG, 2011, str. 108. ISBN 978-3-11-024561-5.
- [26] SCHWACK, W., E. PELLISSIER a G. MORLOCK. Analysis of unauthorized Sudan dyes in food by high-performance thin-layer chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2018, **410**(22), str. 5641-5651. ISSN 1618-2642. Dostupné z: [doi:10.1007/s00216-018-0945-6](https://doi.org/10.1007/s00216-018-0945-6)

- [27] SERESHTI, H., Z. POURSORKH, G. ALIAKBARZADEH, S. ZARRE a S. ATAOLAH. An image analysis of TLC patterns for quality control of saffron based on soil salinity effect: A strategy for data (pre)-processing. *Food Chemistry*. 2018, **239**, str. 831-839. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2017.07.012
- [28] BHOOMA, V., K. NAGASATHIYA, M. VAIRAMANI a M. PARANI. Identification of synthetic dyes magenta III (new fuchsin) and rhodamine B as common adulterants in commercial saffron. *Food Chemistry*. 2020, **309**. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2019.125793
- [29] VADIVEL, V., N. RAVICHANDRAN, P. RAJALAKSHMI, P. BRINDHA, A. GOPAL a C. KUMARAVELU. Microscopic, phytochemical, HPTLC, GC–MS and NIRS methods to differentiate herbal adulterants: Pepper and papaya seeds. *Journal of Herbal Medicine*. 2018, **11**, str. 36-45. ISSN 22108033. Dostupné z: doi:10.1016/j.hermed.2018.01.004
- [30] FARAG, M., N. HEGAZI, E. DOKHALAHY a A. KHATTAB. Chemometrics based GC-MS aroma profiling for revealing freshness, origin and roasting indices in saffron spice and its adulteration. *Food Chemistry*. 2020, **331**. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2020.127358
- [31] SASIKUMAR, B., V. SWETHA, V. PARVATHY a T. SHEEJA. Advances in Adulteration and Authenticity Testing of Herbs and Spices. DOWNEY, G. *Advances in Food Authenticity Testing*. Cambridge, Anglie: Woodhead Publishing, 2016, str. 585-624. ISBN 978-0-08-100220-9.
- [32] SEBAEI, A., M. YOUSSEF a A. ABDEL-MAKSOUUD GHAZI. Determination of seven illegal dyes in Egyptian spices by HPLC with gel permeation chromatography clean up. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2019, **84**. ISSN 08891575. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2019.103304
- [33] SAHU, P., J. PANDA, Y. JOGENDRA KUMAR a S. RANJITHA. A robust RP-HPLC method for determination of turmeric adulteration. 2020, **43(7-8)**, str. 247-254. ISSN 1082-6076. Dostupné z: doi:10.1080/10826076.2020.1722162
- [34] ZOUGAGH, M., B.M. SIMONET, A. RÍOS a M. VALCÁRCEL. Use of non-aqueous capillary electrophoresis for the quality control of commercial saffron samples. *Journal of Chromatography A*. 2005, **1085(2)**, str. 293-298. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2005.06.041
- [35] KUCHARSKA-AMBROŹEJ, K. a J. KARPINSKA. The application of spectroscopic techniques in combination with chemometrics for detection adulteration of some herbs and spices. *Microchemical Journal*. 2020, **153**. ISSN 0026265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2019.104278
- [36] D'ARCHIVIO, A. a M. MAGGI. Geographical identification of saffron (*Crocus sativus* L.) by linear discriminant analysis applied to the UV–visible spectra of aqueous extracts. *Food Chemistry*. 2017, **219**, str. 408-413. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2016.09.169



- [37] KAR, S., B. TUDU, A. BAG a R. BANDYOPADHYAY. Application of Near-Infrared Spectroscopy for the Detection of Metanil Yellow in Turmeric Powder. *Food Analytical Methods*. 2018, **11**(5), str. 1291-1302. ISSN 1936-9751. Dostupné z: doi:10.1007/s12161-017-1106-9
- [38] CANTARELLI, M., C. MOLDES, E. MARCHEVSKY, S. AZCARATE a J. CAMIÑA. Low-cost analytic method for the identification of Cinnamon adulteration. *Microchemical Journal*. 2020, **159**. ISSN 0026265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2020.105513
- [39] HORN, B., S. ESSLINGER, M. PFISTER, C. FAUHL-HASSEK a J. RIEDL. Non-targeted detection of paprika adulteration using mid-infrared spectroscopy and one-class classification – Is it data preprocessing that makes the performance?. *Food Chemistry*. 2018, **257**, str. 112-119. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2018.03.007
- [40] ORDOUDI, S., L. CAGLIANI, S. LALOU, E. NAZIRI, M. TSIMIDOU a R. CONSONNI. <sup>1</sup>H NMR-based metabolomics of saffron reveals markers for its quality deterioration. *Food Research International*. 2015, **70**, str. 1-6. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2015.01.021
- [41] PETRAKIS, E., L. CAGLIANI, M. POLISSIOU a R. CONSONNI. Evaluation of saffron (*Crocus sativus* L.) adulteration with plant adulterants by <sup>1</sup>H NMR metabolite fingerprinting. *Food Chemistry*. 2015, **173**, str. 890-896. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.107
- [42] DONG, H., K. XIAO, Y. XIAN a Y. WU. Authenticity determination of honeys with non-extractable proteins by means of elemental analyzer (EA) and liquid chromatography (LC) coupled to isotope ratio mass spectroscopy (IRMS). *Food Chemistry*. 2018, **240**, str. 717-724. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2017.08.008
- [43] POTOČNIK, T., N. OGRINC, D. POTOČNIK a I. KOŠIR. Fatty acid composition and  $\delta^{13}\text{C}$  isotopic ratio characterisation of pumpkin seed oil. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2016, **53**, str. 85-90. ISSN 08891575. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2016.09.005
- [44] IDRIS, N., H. YASIN a A. USMAN. Voltammetric and spectroscopic determination of polyphenols and antioxidants in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Heliyon*. 2019, **5**(5). ISSN 24058440. Dostupné z: doi:10.1016/j.heliyon.2019.e01717
- [45] BLAGOJEVIC, S., D. SUZNEVIC a D. VUCELIC. *Study of the perborate monohydrate ionexchanged NaA zeolite system by voltammetric methods*. Electrochemical Society INC, 1997, **97**(19), str. 485-488. ISSN 0275-0171.
- [46] LADÓ, K., M. THEN, Z. MAY a K. SZENTMIHÁLYI. Element determination in volatile oil containing fennel (*Foeniculum vulgare*) by ICP-OES and polarography. *Acta Alimentaria*. 2007, **36**(4), str. 415-418. ISSN 0139-3006. Dostupné z: doi:10.1556/AAlim.36.2007.4.3
- [47] ARMELLINI, R., D. COMPAGNONE, M. SCAMPICCHIO a P. PITTIA. Hydrogen and Atom Transfer Activity of Saffron Extracts by Square Wave Voltammetry. *Electroanalysis*. 2017, **29**(2), str. 521-528. ISSN 10400397. Dostupné z: doi:10.1002/elan.201600325

- [48] CHAN, K., M. HAMID a R. WEBSTER. Quantification of capsaicinoids in chillies by solid-phase extraction coupled with voltammetry. *Food Chemistry*. 2018, **265**, str. 152-158. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2018.05.069
- [49] DAVOUDI, S., M. GIVIANRAD, M. SABER-TEHRANI a P. AZAR. A novel electrochemical sensor based on Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CeO<sub>2</sub>-ZnO multi metal oxide nanocomposite for simultaneous detection of nanomolar Pb<sup>2+</sup> and Hg<sup>2+</sup> in different kind of spices. *Indian journal of chemistry section a-inorganic bio-inorganic physical theoretical & analytical chemistry*. 2019, **58**(10), str. 1075-1084. ISSN 0376-4710.
- [50] ZIYATDINOVA, G., E. ZIGANSHINA, A. SHAMSEVALIEVA a H. BUDNIKOV. Voltammetric determination of capsaicin using CeO<sub>2</sub>-surfactant/SWNT-modified electrode. *Arabian Journal of Chemistry*. 2020, **13**(1), str. 1624-1632. ISSN 18785352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2017.12.019
- [51] BURC, M., O. GUNGOR a S. DURAN. Voltammetric Determination of Curcumin in Spices using Platinum Electrode Electrochemically Modified with Poly(Vanillin-co-Caffeic Acid). *Analytical & bioanalytical electrochemistry*. 2020, **12**(5), str. 625-643. ISSN 2008-4226.
- [52] ZIYATDINOVA, G. a H. BUDNIKOV. MWNT-Based Electrode for the Voltammetric Quantification of Carvacrol. *Food Analytical Methods*. 2021, **14**(2), str. 401-410. ISSN 1936-9751. Dostupné z: doi:10.1007/s12161-020-01895-0
- [53] DEMAILLET, Ch. a A. BARD. Kinetics and Mechanism of the Anodic Dimerization of trans-anethole studied by cyclic voltametry and scanning electrochemical microscopy. *Acta chemica Scandinavica*. Dánsko, 1999, **53**, str. 842-848. ISSN 0904-213X.
- [54] WANG, L.-H., Ch.-L. CHANG a Y.-Ch. HU. Electrochemical Oxidation of Fragrances 4-Allyl and 4-Propenylbenzenes on Platinum and Carbon Paste Electrodes. *Croatica Chemica Acta*. 2015, **88**(1), str. 35-42. ISSN 00111643. Dostupné z: doi:10.5562/cca2342
- [55] JAKUBOWSKA, M., M. DZIUBANIUK, J. WYRWA a M. KOWALCZE. Voltammetric Determination of Anethole on La<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/CPE and BDDE. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. Hindawi, 2018, **2018**.ISSN 2090-8865. Dostupné z: doi.org/10.1155/2018/2158407
- [56] LOPEZ, J., M. ZON, H. FERNÁNDEZ a A. GRANERO. Development of an enzymatic biosensor to determine eugenol in dental samples. *Talanta*. 2020, **210**. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2019.120647
- [57] IGUCHI, M., A. NISHIYAMA, Y. TERADA a S. YAMAMURA. Voltammetric and Coulometric Studies on Eugenol and Related Compounds. *Analytical Letters*. 2007, **12**(10), str. 1079-1087. ISSN 0003-2719. Dostupné z: doi:10.1080/00032717908082535

- [58] THAKUR, K. a K. PITRE. Modified Electrochemical Methods for the Determination of Eugenol in Clove (*Syzygium Aromaticum*) and Pharmaceutical Formulations. *Reviews in Analytical Chemistry*. 2007, **26**(3), str. 199-208. ISSN 2191-0189. Dostupné z: doi:10.1515/REVAC.2007.26.3.199
- [59] SAĞLAM, Ö., D. DILGIN, B. ERTEK a Y. DILGIN. Differential pulse voltammetric determination of eugenol at a pencil graphite electrode. *Materials Science and Engineering: C*. 2016, **60**, str. 156-162. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2015.11.031
- [60] YILDIZ, G., Z. AYDOGMUS, M. CINAR, F. SENKAL a T. OZTURK. Electrochemical oxidation mechanism of eugenol on graphene modified carbon paste electrode and its analytical application to pharmaceutical analysis. *Talanta*. 2017, **173**, str. 1-8. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2017.05.056
- [61] KOWALCZE, M. a M. JAKUBOWSKA. Multivariate approach in voltammetric identification and simultaneous determination of eugenol, carvacrol, and thymol on boron-doped diamond electrode. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*. 2019, **150**(6), str. 991-1002. ISSN 0026-9247. Dostupné z: doi:10.1007/s00706-019-02394-7
- [62] MURTADA, K., V. MORENO, Á. RÍOS a M. ZOUGAGH. Decoration of graphene oxide with copper selenide in supercritical carbon dioxide medium as a novel approach for electrochemical sensing of eugenol in various samples. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2019, **153**. ISSN 08968446. Dostupné z: doi:10.1016/j.supflu.2019.104597
- [63] FADILLAH, G., W. WICAKSONO, I. FATIMAH a T. SALEH. A sensitive electrochemical sensor based on functionalized graphene oxide/SnO<sub>2</sub> for the determination of eugenol. *Microchemical Journal*. 2020, **159**. ISSN 0026265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2020.105353
- [64] MIKYSEK, T., K. KOLESÍKOVÁ, K. ROSECKÁ a I. ŠVANCARA. Elektrochemické stanovení různých alkaloidů na uhlíkových pastových elektrodách. In: XXXVII. *Moderní elektrochemické metody: sborník přednášek*. Jetřichovice, Česká republika, 2017, str. 151-154. ISBN 978-80-905221-5-2.
- [65] Bedrník anýz. In: *Bylinkaření.cz* [online]. [cit. 2021-05-15]. Dostupné z: <https://www.bylinkareni.cz/bylinky/bedrnik-anyz/>
- [66] CORTÉS-ROJAS, D., C. DE SOUZA a W. OLIVEIRA. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2014, **4**(2), str. 90-96. ISSN 22211691. Dostupné z: doi:10.1016/S2221-1691(14)60215-X
- [67] NOWAK, J., M. WOŹNIAKIEWICZ, M. GŁADYSZ, A. SOWA a P. KOŚCIELNIAK. Development of Advance Extraction Methods for the Extraction of Myristicin from *Myristica fragrans*. *Food Analytical Methods*. 2016, **9**(5), str. 1246-1253. ISSN 1936-9751. Dostupné z: doi:10.1007/s12161-015-0300-x