

APLIKACE ELEKTROCHEMICKÝCH METOD PŘI ANALÝZÁCH KOŘENÍ

APPLICATION OF ELECTROCHEMICAL METHODS IN ANALYSES OF SPICES

Radovan Metelka, Granit Jashari, Milan Sýs, Monika Bínová

Abstract: New electrochemical methods for analyzing substances present in spices using carbon-based electrodes were developed. The method for determining *trans*-anethole is based on the anodic oxidation of the compound in acetonitrile at a carbon paste electrode modified with sodium dodecyl sulfate (40 % w/w). The mechanism of the electrochemical oxidation was elucidated using a glassy carbon electrode. The voltammetric determination of *trans*-anethole under optimal conditions was characterized by the linear range of 2.3–196.1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, the sensitivity of 0.1122 $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$, and the detection limit of 0.7 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The standard addition method was used to assay the analyte in anise and fennel seeds, and the results agreed with a reverse-phase HPLC. Electrochemical detection of safranal, which is present in saffron spice, was carried out at glassy carbon (GCE) and boron-doped diamond (BDD) electrodes in organic solvents. The sensitivity of the detection was higher at the GCE than at BDD and in acetonitrile than in ethanol, respectively. A linear range of 1–300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of safranal was achieved at the GCE.

Keywords: *trans*-anethole, safranal, carbon paste electrode, glassy carbon electrode, boron-doped diamond electrode, voltammetry

ÚVOD

Anethol (1-methoxy-4-(1-propenyl)benzen) je derivát fenypropenu, který se v přírodě vyskytuje v silicích aromatických rostlin. Jeho hlavním zdrojem je bedrník anýz (*Pimpinella anisum* L.), badyánik pravý (*Illicium verum*) a fenykl obecný (*Foeniculum vulgare*). Anethol tvoří dvě izomerní formy, kdy převažuje *trans*-anethol (90 %). Pouze tato forma se používá jako potravinářské aditivum, *cis*-anethol je prudce jedovatý. Často se přidává do léčiv, kosmetiky, mýdel a do přípravků ústní hygieny. *trans*-Anethol je považován za bezpečné potravinářské aditivum, jeho denní dávka by neměla překročit 2 mg kg⁻¹ (Newberne et al, 1999).

Analytické stanovení této látky ve vzorcích potravin, léčiv nebo kosmetiky se většinou provádí pomocí plynové nebo kapalinové chromatografie. Bylo popsáno pouze jedno voltametrické stanovení *trans*-anetholu elektrochemickou oxidací na uhlíkové pastové elektrodě modifikované La₂O₃ a borem dopované diamantové elektrodě (Kowalcze et al, 2018). Rozpustnost *trans*-anetholu ve vodném prostředí je velmi malá (cca 750 $\mu\text{mol l}^{-1}$). Z tohoto důvodu je vhodnější používat při extrakci vzorků čistá organická rozpouštědla, ve kterých se *trans*-anethol velmi dobře rozpouští. Příspěvek popisuje využití uhlíkové pastové elektrody modifikované dodecylsíránem sodným (40 % hm.) pro elektroanalýzu *trans*-anetholu po jeho extrakci v čistém acetonitrilu s přísadkou 0,1 mol l⁻¹ LiClO₄. Navržená metoda umožňuje jednodušší přípravu vzorků v porovnání s chromatografickými technikami, provedení analýzy na jednom povrchu elektrody bez další úpravy a kvantifikaci pomocí metody standardního přídatku. Elektrochemické stanovení *trans*-anetholu bylo provedeno ve vzorcích koření fenyklu a anýzu a porovnáno s referenční metodou RP-HPLC se spektrofotometrickou detekcí.

Safranal (2,6,6-trimethylcyklohexa-1,3-dien-1-karbaldehyd) je aldehydická aromatická sloučenina, která vytváří charakteristické aroma koření šafránu. Tato látka byla izolována z rozemletých blizen šafránu setého (*Crocus sativus* L.), ze kterých se sušením šafrán připravuje. Safranal je elektroaktivní a lze ho elektrochemicky oxidovat. Dosud byla zmíněna

pouze jeho elektrochemická detekce společně s krocinem pomocí square wave voltametrie (SWV) na elektrodě ze skelného uhlíku ve směsi ethanol:acetonitril (1:1) s přidavkem LiClO_4 (Armellini et al, 2017). Yousefi-Nejad et al (2021) potom popsali použití elektronického jazyka se čtyřmi různými pracovními elektrodami ke klasifikaci kvality šafránu cyklickou voltametrií mikromolárních koncentracích safranalů.

MATERIÁL A METODIKA

Pracovní uhlíková pastová elektroda CPE/SDS byla připravena homogenizací 0,4 g uhlíkového prášku s průměrem částic $\geq 5 \mu\text{m}$ (Graphite Týn, Týn nad Vltavou, Česká republika), 0,2 g minerálního oleje a 0,4 g dodecylsírany sodného (vše Merck KGaA, Darmstadt, Německo). Uhlíková pasta byla poté vpravena do pístového teflonového držáku o průměru 3 mm. Před použitím byla elektroda obnovena vytlačení menšího množství pasty a vyleštěním povrchu filtračním papírem. Mechanismus elektrochemické oxidace byl zkoumán s využitím rotační diskové GCE o průměru 3 mm a cyklické voltametrie a lineární voltametrie v bezvodém acetonitrilu s $500 \mu\text{mol l}^{-1}$ *trans*-anetholu, $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ LiClO_4 nebo Bu_4NPF_6 . Reálné vzorky koření byly analyzovány diferenční pulzní voltametrií (DPV) na CPE/SDS v čistém acetonitrilu s přidavkem $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ LiClO_4 . Pro kvantifikaci vzorků byla použita metoda vícenásobného standardního přidavku se čtyřmi alikvoty $20 \mu\text{l}$ $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ *trans*-anetholu v čistém acetonitrilu.

Safranal byl analyzován na GCE o průměru 3 mm (Metrohm Česká republika s.r.o., Praha, Česká republika) nebo na tištěném senzoru s borem dopovanou diamantovou elektrodou, vytvořenou chemickou depozicí z par (pracovní a pomocná elektroda) a referentní Ag/AgCl elektrodou (STU v Bratislave, Bratislava, Slovenská republika). Všechna elektrochemická měření u klasických elektrod byla prováděna v tříelektrodovém uspořádání společně s referentní nasycenou kalomelovou nebo chloridostříbrnou elektrodou s můstkem obsahující acetonitril s přidavkem $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ LiClO_4 nebo Bu_4NPF_6 a platinovou pomocnou elektrodou pomocí potenciostatu/galvanostatu PGSTAT101 a software Nova 1.11 (vše Metrohm Česká republika s.r.o., Praha, Česká republika).

Chromatografická sestava pro RP-HPLC analýzu obsahovala autosampler SIL 30AC, gradientovou pumpu LC 30AD, degasser DGU 20A5R, spektrofotometrický detektor s diodovým polem SPD M30A PDA a termostat kolony CTO 20AC (vše Shimadzu, Kjóto, Japonsko). Separace byla prováděna na koloně Ascentis[®] C18 ($100 \times 2,1 \text{ mm}$, velikost částic $3,0 \mu\text{m}$) při teplotě $40 \text{ }^\circ\text{C}$, mobilní fází byla redestilovaná voda s kyselinou mravenčí ($\text{pH} \sim 3,2$) jako rozpouštědlo A a čistý acetonitril jako rozpouštědlo B s gradientovým profilem od 30 % do 90 % pro rozpouštědlo B s průtokem $0,5 \text{ ml min}^{-1}$, nástřik vzorku $10 \mu\text{l}$ a vlnová délka spektrofotometrické detekce 260 nm .

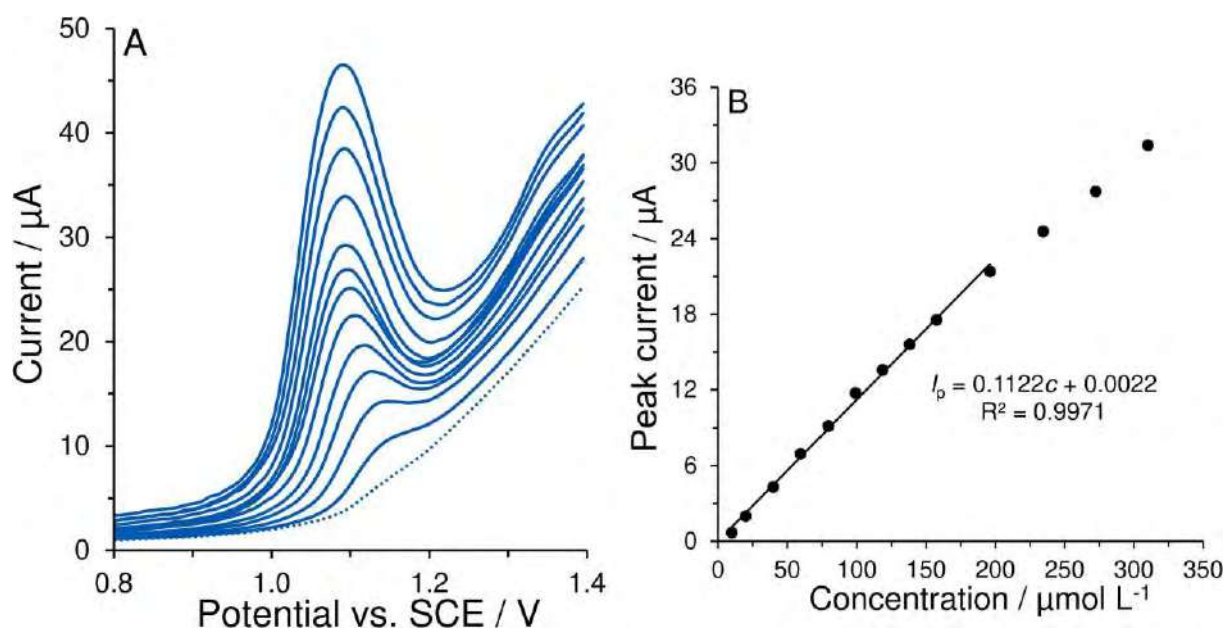
Reálné vzorky koření byly rozdrceny a homogenizovány v třecí misce po dobu 15 min. Poté byla navážka 1 g vzorku převedena do odměrné baňky a doplněna acetonitrem s $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ LiClO_4 . Vzorek byl extrahován v třepačce přes noc a výsledný extrakt byl přefiltrován přes skládaný filtr. Takto připravený roztok vzorku byl poté přímo bez dalšího ředění analyzován pomocí DPV. Pro chromatografickou analýzu byl extrakt ještě přefiltrován přes PTFE stříkačkový filtr s průměrem pórů $0,22 \mu\text{m}$.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Elektrochemická oxidace *trans*-anetholu poskytuje dva irreverzibilní anodické signály. Z měření na rotační diskové elektrodě bylo zjištěno, že oba signály představují jednoelektronové oxidační děje řízené difúzí. Dále bylo optimalizováno složení uhlíkové pastové elektrody pro co nejintenzivnější anodický pík *trans*-anetholu. Množství pastové kapaliny bylo ponecháno konstantní (20 % hm.) a měnil se pouze poměr uhlíkového prášku a

surfaktantu. Na uhlíkových pastách s obsahem 20 – 40 % SDS se oxidační signál už příliš neměnil a pro další experimenty byl použit maximální obsah SDS k zajištění co největší polarity povrchu elektrody a tím udržení dostatečné stability materiálu pasty při experimentech v nevodném prostředí (Jashari et al, 2022). Parametry DPV byly voleny jako přijatelný kompromis mezi výškou píku, tvarem oxidačního signálu a intenzitou proudů pozadí.

Kalibrační závislost elektrochemického stanovení *trans*-anetholu za optimálních experimentálních podmínek (Obrázek 1) byla lineární v rozmezí koncentrací 2.3–196.1 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Hodnoty LOD 0,7 $\mu\text{mol l}^{-1}$ a LOQ 2,4 $\mu\text{mol l}^{-1}$ byly určeny podle vztahů $3s/k$ a $10s/k$, kde s je směrodatná odchylka opakovaných měření ($n = 10$) 10 $\mu\text{mol l}^{-1}$ *trans*-anetholu a k je směrnice kalibrační přímky. Opakovatelnost měření vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka byla 4 %.



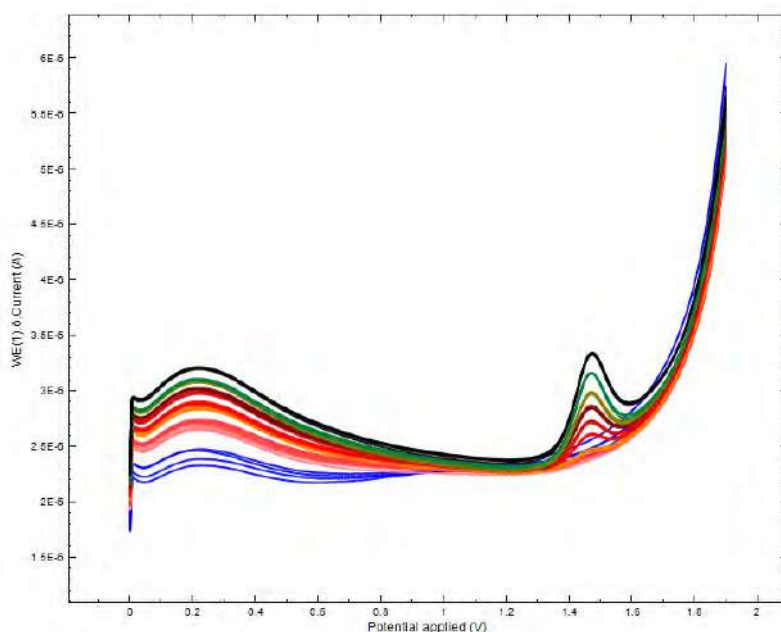
Obrázek 1 DPV voltamogramy 0 (tečkovaná čára), 20–320 $\mu\text{mol l}^{-1}$ *trans*-anetholu (plné čáry) na CPE/SDS v acetonitrilu s 0.1 mol l^{-1} LiClO_4 (A) a příslušná kalibrační závislost (B)

Analýza *trans*-anetholu v reálných matricích může být ztížena přítomností dalších elektroaktivních složek, které mohou rušit vlastní stanovení. Vzhledem k povaze analyzovaných vzorků se jedná hlavně o další silice, jako např. eugenol, fenchon, linalool, menthol nebo thymol. Z těchto látek pouze eugenol a thymol poskytují oxidační signály při potenciálech +1,05 V a +1,2 V, nicméně jejich elektrochemická oxidace není za použitých experimentálních podmínek příliš intenzivní a při poměru 1:1 neruší stanovení *trans*-anetholu. Tabulka 1 shrnuje výsledky analýz reálných vzorků koření a porovnání s RP-HPLC jako referentní metodou (Jashari et al, 2023).

Tabulka 1 Analýza *trans*-anetholu ve vzorcích koření

Vzorek	DPV $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$	RP-HPLC $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$
Semínka anýzu	$1318,9 \pm 8,3$	$1206,7 \pm 0,2$
Semínka fenyklu	—	—
Semínka fenyklu s přidavkem <i>trans</i> -anetholu	$604,1 \pm 23,4$	$575,1 \pm 2,5$

Safranal se velmi dobře rozpouští v organických a směsných rozpouštědlech, jeho elektrochemická oxidace byla proto sledována na GCE cyklickou voltametrií v acetonitrilu, ethanolu, dimethylsulfoxidu a dimethylformamidu, vždy s přidavkem LiClO_4 . Nejintenzivnější oxidační signál byl pozorován v acetonitrilu. U voltametrických technik DPV a SWV byly optimalizovány instrumentální parametry a poté určeny příslušné kalibrační závislosti. Intenzivnější signály byly zjištěny u SWV s parametry optimalizovanými na co největší výšku signálu, ale výsledná kalibrace vykazovala odchylky od linearity. Safranal bylo možné analyzovat v lineárním rozsahu $1\text{--}300\ \mu\text{mol l}^{-1}$ na GCE i BDD. Výhodou měření na GCE je vysoká stabilita proudového signálu oxidace safranal. Na začátku měření je sice nutné nejprve provést cca pět testovacích měření, ale následně je odezva stabilní a prakticky stejná pro danou koncentraci safranal (Obrázek 2). V případě BDD je možné provést několik desítek měření, ale poté tištěný senzor v organickém rozpouštědle pomalu degraduje a je nutné ho vyměnit.



Obrázek 2 SWV voltamogramy ($n = 5$) $1\text{--}20\ \mu\text{mol l}^{-1}$ safranal na GCE v acetonitrilu s $0.1\ \text{mol l}^{-1}\ \text{LiClO}_4$

ZÁVĚR

Byla vyvinuta nová elektroanalytická metoda pro stanovení *trans*-anetholu ve vzorcích koření přímo v jejich extraktech bez dalších úprav vzorku. Modifikace pracovní uhlíkové pastové elektrody větším množstvím dodecylsiranu sodného umožňovala práci i v nevodném prostředí čistého acetonitrilu. Charakter elektrodového materiálu zároveň brání adsorpci produktů oxidace *trans*-anetholu, elektroda nevykazuje paměťový efekt a měření lze tak provádět bez nutnosti regenerace povrchu elektrody v průběhu analýzy. Výsledky elektrochemického stanovení jsou ve shodě se standardní RP-HPLC metodou se spektrofotometrickou detekcí. Navržené stanovení lze využít pro rychlé a nenákladné zjišťování obsahu *trans*-anetholu jako potravinářského aditiva. Dále byla navržena elektrochemická metoda detekce safranal pro případné stanovení v šafránu na klasické elektrodě ze skelného uhlíku nebo tištěném senzoru s borem-dopovanou diamantovou elektrodou v acetonitrilu. Použité elektrodové materiály a detekční prostředí umožňují provést několik desítek měření na jednom elektrodovém povrchu bez nutnosti jeho regenerace.

LITERATURA

- Armellini, R., Compagnone, D., Scampicchio, M., Pittia, P. 2017. Hydrogen and atom transfer activity of saffron extracts by square wave voltammetry. *Electroanalysis*, 29, 521–528. <https://doi.org/10.1002/elan.201600325>
- Jashari, G., Švancara, I., Sýs, M. 2022. Characterisation of carbon paste electrodes bulk-modified with surfactants for measurements in nonaqueous media. *Electrochimica Acta*, 410, 140047. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2022.140047>
- Jashari, G., Frühbauerová, M., Mikysek, T., Švancara, I., Metelka, R., Sýs, M. 2023. New electroanalytical method for the determination of trans-anethole in spices and sweets. *Food Chemistry*, 408, 135167. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135167>
- Kowalcze, M., Wyrwa, J., Dziubaniuk, M., Jakubowska, M. 2018. Voltammetric Determination of Anethole on La₂O₃/CPE and BDDE. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2018, 2158407. <https://doi.org/10.1155/2018/2158407>
- Newberne, P., Smith, R. L., Doull, J., Goodman, J. I., Munro, I. C., Portoghese, P. S., Wagner, B. M., Weil, C. S., Woods, L. A., Adams, T. B., Lucas, C. D., Ford, R. A. 1999. The FEMA GRAS assessment of trans-anethole used as a flavouring substance. Flavour and Extract Manufacturer's Association. *Food and Chemical Toxicology*, 37(7), 789-811. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00037-X](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00037-X)
- Yousefi-Nejad, S., Heidarbeigi, K., Roushani, M. 2021. Applications of electronic tongue system for quantification of safranal concentration in saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15, 1626–1633. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00723-7>

Pod'akovanie: Autoři děkují za podporu Fakultě chemicko-technologické Univerzity Pardubice (projekt SGS_2023_001).

Kontaktná adresa: Ing. Radovan Metelka, Ph.D., Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice