

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Elektrochemické vlastnosti látek obsažených v šafránu
Bc. Monika Bínová

Diplomová práce
2024

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Monika Bínová**
Osobní číslo: **C22284**
Studijní program: **N0531A130028 Analytická chemie**
Téma práce: **Electrochemické vlastnosti látek obsažených v šafránu**
Téma práce anglicky: **Electrochemical properties of compounds present in saffron**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Uveďte základní fyzikálně-chemické vlastnosti vybraných látek obsažených v šafránu. Z odborných publikací zpracujte literární rešerši na téma elektrochemické detekce krocínu a safranalů. Zaměřte se na elektrochemické chování těchto látek na různých elektrodových materiálech ve vodných a organických základních elektrolytech.
2. V praktické části studujte elektrochemické vlastnosti krocínu a safranalů pomocí cyklické voltametrie a určete optimální pracovní podmínky pro elektrochemickou analýzu krocínu a safranalů zahrnující výběr elektrody, složení a pH základního elektrolytu a parametry pulzních voltametrických technik.
3. Při optimálních podmínkách sestavte příslušné kalibrační závislosti pro elektroanalýzu krocínu a safranalů a určete základní analytické parametry stanovení. Proveďte testy výtěžnosti na modelových vzorcích. Navrženou metodu poté aplikujte při stanovení obou látek ve vzorcích koření.

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

Seznam doporučené literatury:
Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Radovan Metelka, Ph.D.**
Katedra analytické chemie
Konzultant diplomové práce: **Ing. Marian Vojs, Ph.D.**
Slovenská technická univerzita, FEI, Bratislava
Datum zadání diplomové práce: **7. února 2024**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. Ing. Petr Česla, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Elektrochemické vlastnosti látek obsažených v šafránu 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 10. 5. 2024

Bc. Monika Bínová v. r.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych vyjádřila svou upřímnou vděčnost všem, kteří mi poskytli podporu a pomoc při tvorbě této diplomové práce. Především mému vedoucímu práce Ing. Radovanu Metelkovi, Ph.D., za jeho cenné rady, vedení a trpělivost. Také bych chtěla poděkovat svým nejbližším za podporu při studiu.

ANOTACE

Šafrán je koření známé pro svou výraznou barvu a charakteristickou vůni, které je vzhledem ke své vysoké ekonomické hodnotě často předmětem falzifikačních podvodů. Tato diplomová práce je zaměřena na elektrochemickou analýzu a stanovení dvou hlavních složek šafránu, krocínu a safranalu. V experimentální části byla provedena detailní studie elektrochemického chování těchto složek ve vodném a organickém prostředí a dále byla vytvořena a optimalizována metoda pro stanovení safranalu pomocí pulzních elektrochemických technik. Metoda byla úspěšně využita pro stanovení safranalu v reálném vzorku šafránu. Tato práce přináší ucelený pohled na elektrochemické chování složek šafránu a poskytuje užitečné nástroje pro jeho analýzu a kontrolu kvality.

KLÍČOVÁ SLOVA

Šafrán, krocín, safranal, voltametrie

TITLE

Electrochemical properties of compounds present in saffron

ANNOTATION

Saffron is a spice known for its vivid color and characteristic aroma, which, due to its high economic value, is often the subject of adulteration scams. This diploma thesis focuses on the electrochemical analysis and determination of two main components of saffron, crocin and safranal. In the experimental part, a detailed study of the electrochemical behavior of these components in aqueous and organic environments was conducted, and a method for determining safranal using pulse electrochemical techniques was developed and optimized. The method was successfully applied to determine safranal in a real saffron sample. This work provides a comprehensive view of the electrochemical behavior of saffron components and offers useful tools for its analysis and quality control.

KEYWORDS

Saffron, crocin, safranal, voltametry

OBSAH

Seznam obrázků.....	11
Seznam tabulek	17
Seznam zkratek	18
Úvod	20
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	21
1.1 Šafrán z biologického hlediska	21
1.1.1 Využití šafránu.....	22
1.1.2 Pěstování šafránu	23
1.1.2.1 Podmínky pro pěstování	23
1.1.2.2 Sběr a sušení	24
1.2 Chemické látky obsažené v šafránu.....	25
1.2.1 Metabolické dráhy hlavních složek	25
1.2.2 Zastoupení jednotlivých složek v šafránu.....	27
1.2.3 Krocín	27
1.2.4 Pikrokrocín.....	29
1.2.5 Safranal	31
1.3 Metody hodnocení kvality šafránu	31
1.3.1 Kvalita šafránu	32
1.3.2 Senzorická analýza	33
1.3.3 Vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie	33
1.3.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	34
1.3.5 Plynová chromatografie.....	35
1.3.6 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací	36
1.3.7 Elektrochemická stanovení.....	37
1.3.7.1 Elektronický jazyk	37
1.3.7.2 Voltametrické techniky.....	38
1.3.7.3 Polarografické stanovení.....	38
2 Experimentální část	40
2.1 Použité chemikálie.....	40
2.2 Použitá zařízení.....	41

2.3	Příprava standardů a základních elektrolytů.....	42
2.3.1	Příprava zásobních roztoků safranalů a krocínu.....	42
2.3.2	Příprava pufrů.....	42
3	Výsledky a diskuze.....	43
3.1	Rozpustnost krocínu a safranalů ve vodném a nevodném prostředí.....	43
3.2	Elektrochemická detekce v Brittonových-Robinsonových pufrách.....	45
3.2.1	Cyklická voltametrie krocínu.....	45
3.2.2	Diferenční pulzní voltametrie krocínu.....	50
3.2.3	Square wave voltametrie krocínu.....	54
3.2.4	Cyklická voltametrie safranalů.....	57
3.3	Elektrochemická detekce safranalů v H ₂ SO ₄	62
3.4	Elektrochemická detekce ve fosfátovém pufru.....	63
3.4.1	Diferenční pulzní voltametrie krocínu.....	63
3.4.2	Square wave voltametrie krocínu.....	64
3.5	Elektrochemická detekce v octanovém pufru.....	64
3.5.1	Diferenční pulzní voltametrie krocínu.....	65
3.5.2	Square wave voltametrie krocínu.....	65
3.5.3	Diferenční pulzní voltametrie safranalů.....	66
3.5.4	Square wave voltametrie safranalů.....	66
3.6	Elektrochemická detekce v HCl.....	67
3.6.1	Diferenční pulzní voltametrie krocínu.....	67
3.6.2	Square wave voltametrie krocínu.....	68
3.6.3	Diferenční pulzní voltametrie safranalů.....	68
3.6.4	Square wave voltametrie safranalů.....	69
3.7	Elektrochemická detekce v KCl.....	70
3.7.1	Diferenční pulzní voltametrie krocínu.....	70
3.7.2	Square wave voltametrie krocínu.....	70
3.7.3	Diferenční pulzní voltametrie safranalů.....	71
3.7.4	Square wave voltametrie safranalů.....	72
3.8	Elektrochemická detekce ve směsi HCl a KCl.....	72
3.8.1	Diferenční pulzní voltametrie krocínu.....	72
3.8.2	Square wave voltametrie krocínu.....	73

3.8.3	Diferenční pulzní voltametrie safranalu	74
3.8.4	Square wave voltametrie safranalu	74
3.9	Elektrochemická detekce v acetonitrilu	75
3.9.1	Cyklická voltametrie krocínu.....	75
3.9.2	Cyklická voltametrie safranalu	76
3.10	Elektrochemická detekce v ethanolu	76
3.10.1	Cyklická voltametrie krocínu.....	76
3.10.2	Cyklická voltametrie safranalu	77
3.11	Elektrochemická detekce v dimethylsulfoxidu.....	78
3.11.1	Cyklická voltametrie krocínu.....	78
3.11.2	Cyklická voltametrie safranalu	78
3.12	Elektrochemická detekce v dimethylformamidu	79
3.12.1	Cyklická voltametrie krocínu.....	79
3.12.2	Cyklická voltametrie safranalu	80
3.13	Vliv rychlosti skenu při elektrochemické oxidaci safranalu.....	80
3.14	Volba prostředí pro optimalizaci metody stanovení safranalu	81
3.15	Optimalizace parametrů elektrochemické detekce safranalu.....	82
3.15.1	Optimalizace pro elektrodu ze skelného uhlíku.....	83
3.15.2	Optimalizace pro borem dopovanou diamantovou elektrodu.....	84
3.16	Analytické parametry elektrochemického stanovení safranalu	85
3.16.1	Vliv leštění povrchu elektrody ze skelného uhlíku na směrnici kalibrace ...	85
3.16.2	Vliv nové borem dopované elektrody na směrnici kalibrace	86
3.16.3	Kalibrační závislosti nízkých koncentrací safranalu	87
	3.16.3.1 Kalibrační závislosti nízkých koncentrací safranalu na elektrodě ze skelného uhlíku	88
	3.16.3.2 Kalibrační závislosti nízkých koncentrací safranalu na borem dopované diamantové elektrodě	91
3.16.4	Výtěžnost stanovení safranalu	93
3.17	Analýza reálných vzorků	94
	Závěr	99
	Použitá literatura	100

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Podrobný popis jednotlivých částí <i>Crocus sativus</i> (upraveno podle Shahi, 2016).	22
Obrázek 2 Metabolické dráhy <i>Crocus sativus</i> (upraveno podle Martí, 2020)	26
Obrázek 3 Rozdělení krocínů na základě počtu a polohy jejich glykosylových skupin.(upraveno podle Xie, 2023)	28
Obrázek 4 Struktura pikrokrocinu, (převzato z Kyriakoudi, 2015)	30
Obrázek 5 Struktura safranal, převzato z Kyriakoudi, 2015	31
Obrázek 6 Tištěný senzor s borem dopovanou diamantovou elektrodou (nahore), uhlíková tištěná elektroda s nanotrubičkami (dole)	41
Obrázek 7 Rozpustnost krocínu v acetonitrilu (odměrná baňka A), ethanolu (odměrná baňka B), dimethylsulfoxidu (odměrná baňka C) a dimethylformamid (odměrná baňka D)	44
Obrázek 8 Cyklické voltamogramy B-R pufru o pH 2,4 (zelené křivky) a přidavku $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ krocínu (červené křivky) na GCE	45
Obrázek 9 Cyklické voltamogramy B-R pufru o pH 2 (zelené křivky) a přidavku $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ krocínu (červené křivky) na BDD.	46
Obrázek 10 Cyklické voltamogramy B-R pufru o pH 4 (zelené křivky) a přidavku $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ krocínu (červené křivky) na SPCE.	47
Obrázek 11 Cyklické voltamogramy v prostředí B-R pufrů o pH 2–11 (A-J, zelené křivky) a přidavku $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ krocínu (červené křivky) na GCE	48
Obrázek 12 Cyklické voltamogramy v prostředí B-R pufrů o pH 2–11 (A-J, zelené křivky) a přidavku $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ krocínu (červené křivky) na BDD.	49
Obrázek 13 Cyklické voltamogramy v prostředí B-R pufrů o pH 2–11 (A-J, zelené křivky) a přidavku $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ krocínu (červené křivky) na BDD.	50
Obrázek 14 DPV voltamogramy v prostředí B-R pufru o pH 2–11 (A-J, modré křivky) a přidavku $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ krocínu (červené křivky) na GCE	51
Obrázek 15 DPV voltamogramy v prostředí B-R pufru o pH 2–11 (A-J, modré křivky) a přidavku $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ krocínu (červené křivky) na BDD.	52
Obrázek 16 DPV voltamogramy v prostředí B-R pufru o pH 2–11 (A-J, modré a zelené křivky) a přidavku $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ krocínu (červené křivky) na SPCE.	53
Obrázek 17 SWV voltamogramy v prostředí B-R pufru o pH 2–11 (A-J, modré křivky) a přidavku $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ krocínu (červené křivky) na GCE	55
Obrázek 18 SWV voltamogramy v prostředí B-R pufru o pH 2–11 (A-J, modré křivky) a přidavku $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ krocínu (červené křivky) na BDD.	56

Obrázek 19 SWV voltamogramy v prostředí B-R pufru o pH 2–11 (A–J, modré a zelené křivky) a přídavku 0,1 mmol l ⁻¹ krocínu (červené křivky) na SPCE.	57
Obrázek 20 Cyklické voltamogramy směsi B-R pufru o pH 7 a methanolu (1:1, zelené křivky) a přídavku 0,5 mmol l ⁻¹ safranalu (červené křivky) na GCE.	58
Obrázek 21 Cyklické voltamogramy směsi B-R pufru o pH 8 a methanolu (1:1, zelené křivky) a přídavku 0,5 mmol l ⁻¹ safranalu (červené křivky) na BDD.	58
Obrázek 22 Cyklické voltamogramy směsi B-R pufru o pH 8 a methanolu (1:1, zelené křivky) a přídavku 0,5 mmol l ⁻¹ safranalu (červené křivky) na SPCE.	59
Obrázek 23 Cyklické voltamogramy ve směsi B-R pufrů o pH 3–11 a methanolu (1:1) (A–J, zelené křivky) a přídavku 0,5 mmol l ⁻¹ safranalu (červené křivky) na GCE.	60
Obrázek 24 Cyklické voltamogramy ve směsi B-R pufrů o pH 3–11 a methanolu (1:1) (A–J, zelené křivky) a přídavku 0,5 mmol l ⁻¹ safranalu (červené křivky) na BDD.	61
Obrázek 25 Cyklické voltamogramy ve směsi B-R pufrů o pH 3–11 a methanolu (1:1) (A–J, zelené křivky) a přídavku 0,5 mmol l ⁻¹ safranalu (červené křivky) na SPCE.	62
Obrázek 26 technikou cyklické voltametrie GCE elektrodou (voltamogram A), BDD elektrodou (voltamogram B) a SPCE (voltamogram C) v prostředí 0,5M kyseliny sírové a methanolu 1:1 a následně přidaným safranalem na koncentraci 0,5 mmol l ⁻¹ v měřeném roztoku.	63
Obrázek 27 DPV voltamogramy 0,1 M fosfátového pufru pH 7 (modrá křivka) a přídavku 0,1 mmol l ⁻¹ (červená křivka) a 0,2 mmol l ⁻¹ krocínu (rudá křivka) na GCE (A), BDD (B) a SPCE (C).	64
Obrázek 28 DPV voltamogramy 0,1 M fosfátového pufru pH 7 (modrá křivka) a přídavku 0,1 mmol l ⁻¹ (červená křivka) a 0,2 mmol l ⁻¹ krocínu (rudá křivka) na GCE (A), BDD (B) a SPCE (C).	64
Obrázek 29 DPV voltamogramy 0,1 M octanového pufru pH 5 (modrá křivka) a přídavku 0,1 mmol l ⁻¹ (červená křivka) a 0,2 mmol l ⁻¹ krocínu (rudá křivka) na GCE (A), BDD (B) a SPCE (C).	65
Obrázek 30 SWV voltamogramy 0,1 M octanového pufru pH 5 (modrá křivka) a přídavku 0,1 mmol l ⁻¹ (červená křivka) a 0,2 mmol l ⁻¹ krocínu (rudá křivka) na GCE (A), BDD (B) a SPCE (C).	66
Obrázek 31 DPV voltamogramy směsi octanového pufru a methanolu (1:1) (modrá křivka) a přídavku 0,5 mmol l ⁻¹ (červená křivka) a 1 mmol l ⁻¹ safranalu (rudá křivka) na GCE (A), BDD (B) a SPCE (C).	66

Obrázek 32 SWV voltamogramy směsi octanového pufru a methanolu (1:1) (modrá křivka) a přídavku 0,5 mmol l ⁻¹ (červená křivka) a 1 mmol l ⁻¹ safranalů (rudá křivka) na GCE (A), BDD (B) a SPCE (C).	67
Obrázek 33 DPV voltamogramy 0,1 M HCl (modrá křivka) a přídavku 0,1 mmol l ⁻¹ (červená křivka) a 0,2 mmol l ⁻¹ krocínu (rudá křivka) na GCE (A), BDD (B) a SPCE (C)..	68
Obrázek 34 SWV voltamogramy 0,1 M HCl (modrá křivka) a přídavku 0,1 mmol l ⁻¹ (červená křivka) a 0,2 mmol l ⁻¹ krocínu (rudá křivka) na GCE (A), BDD (B) a SPCE (C).	68
Obrázek 35 DPV voltamogramy směsi 0,1 M HCl a methanolu (1:1) (modrá křivka) a přídavku 0,5 mmol l ⁻¹ (červená křivka) a 1 mmol l ⁻¹ safranalů (rudá křivka) na GCE (A), BDD (B) a SPCE (C)..	69
Obrázek 36 SWV voltamogramy směsi 0,1 M HCl a methanolu (1:1) (modrá křivka) a přídavku 0,5 mmol l ⁻¹ (červená křivka) a 1 mmol l ⁻¹ safranalů (rudá křivka) na GCE (A), BDD (B) a SPCE (C)..	69
Obrázek 37 Oxidační voltamogramy měřené technikou diferenčně pulzní voltametrií GCE (voltamogram A), BDD (voltamogram B) a SPCE (voltamogram C) v prostředí 0,1M chloridu draselného a následně přidaným krocínem na koncentraci 0,1 m mol l ⁻¹ červený sken a 0,2 m mol l ⁻¹ rudý sken	70
Obrázek 38 Oxidační voltamogramy měřené technikou square wave voltametrií GCE (voltamogram A), BDD (voltamogram B) a SPCE (voltamogram C) v prostředí 0,1M chloridu draselného a následně přidaným krocínem na koncentraci 0,1 m mol l ⁻¹ červený sken a 0,2 m mol l ⁻¹ rudý sken.	71
Obrázek 39 Oxidační voltamogramy měřené technikou diferenčně pulzní voltametrie GCE (voltamogram A), BDD (voltamogram B) a SPCE (voltamogram C) v prostředí 0,1M chloridu draselného a methanolu v poměru 1:1 a následně přidaným safranalem na 0,5 m mol l ⁻¹ červený sken a 1 m mol l ⁻¹ rudý sken.	71
Obrázek 40 Oxidační voltamogramy měřené technikou square wave voltametrie GCE (voltamogram A), BDD (voltamogram B) a SPCE (voltamogram C) v prostředí 0,1M chloridu draselného a methanolu v poměru 1:1 a následně přidaným safranalem na 0,5 m mol l ⁻¹ červený sken a 1 m mol l ⁻¹ rudý sken	72
Obrázek 41 Oxidační voltamogramy měřené technikou diferenčně pulzní voltametrií GCE (voltamogram A), BDD (voltamogram B) a SPCE (voltamogram C) v prostředí 0,1 M kyseliny chlorovodíkové a 0,1 M chloridu draselného v poměru (1:9) a následně přidaným krocínem na koncentraci 0,1 mmol l ⁻¹ červený sken a 0,2 mmol l ⁻¹ rudý	73

Obrázek 42 Oxidační voltamogramy měřené technikou square wave voltametrií GCE (voltamogram A), BDD (voltamogram B) a SPCE (voltamogram C) v prostředí 0,1 M kyseliny chlorovodíkové a 0,1 M chloridu draselného v poměru (1:9) a následně přidaným krocinem na koncentraci 0,1 mmol l ⁻¹ červený sken a 0,2 mmol l ⁻¹ rudý	73
Obrázek 43 Oxidační voltamogramy měřené technikou diferenčně pulzní voltametrií GCE (voltamogram A), BDD (voltamogram B) a SPCE (voltamogram C) v prostředí 0,1 M kyseliny chlorovodíkové, 0,1 M chloridu draselného a methanolu v poměru (1:9:10) a následně přidaným safranalem na koncentraci 0,1 mmol l ⁻¹ červený sken a 0,2 mmol l ⁻¹ rudý.....	74
Obrázek 44 Oxidační voltamogramy měřené technikou square wave voltametrií GCE (voltamogram A), BDD (voltamogram B) a SPCE (voltamogram C) v prostředí 0,1 M kyseliny chlorovodíkové, 0,1 M chloridu draselného a methanolu v poměru (1:9:10) a následně přidaným safranalem na koncentraci 0,1 mmol l ⁻¹ červený sken a 0,2 mmol l ⁻¹ rudý.....	75
Obrázek 45 Oxidační voltamogramy měřené metodou cyklické voltametrie v prostředí acetonitrilu (modrá) a 0,1M LiClO ₄ elektrodami GCE (obrázek vlevo) a BDD (obrázek vpravo). Následně byl přidán krocín aby byla výsledná koncentrace měřeného roztoku 0,5 mmol l ⁻¹ (červená).	75
Obrázek 46 Oxidační voltamogramy měřené metodou cyklické voltametrie v prostředí acetonitrilu (modrá) a 0,1M LiClO ₄ elektrodami GCE (obrázek vlevo) a BDD (obrázek vpravo). Následně byl přidán safranál aby byla výsledná koncentrace měřeného roztoku 3 mmol l ⁻¹ červená).	76
Obrázek 47 Oxidační voltamogramy měřené metodou cyklické voltametrie v prostředí ethanolu (modrá) a 0,1M LiClO ₄ (obrázky A a B) nebo LiCl (obrázek C) elektrodami GCE (obrázek A) a BDD (obrázek B a C). Následně byl přidán krocín, aby byla výsledná koncentrace měřeného roztoku 0,5 mmol l ⁻¹ (červená).	77
Obrázek 48 Oxidační voltamogramy měřené metodou cyklické voltametrie v prostředí ethanolu (modrá) a 0,1M LiClO ₄ (obrázky A a B) nebo LiCl (obrázek C) elektrodami GCE (obrázek A) a BDD (obrázek B a C). Následně byl přidán safranál aby byla výsledná koncentrace měřeného roztoku 3 mmol l ⁻¹ (červená).	77
Obrázek 49 Oxidační voltamogramy měřené metodou cyklické voltametrie v prostředí dimethylsulfoxidu (modrá) a 0,1M LiClO ₄ (obrázky A a B) nebo LiCl (obrázek C) elektrodami GCE (obrázek A) a BDD (obrázek B a C). Následně byl přidán krocín, aby byla výsledná koncentrace měřeného roztoku 0,5 mmol l ⁻¹ (červená).	78
Obrázek 50 Oxidační voltamogramy měřené metodou cyklické voltametrie v prostředí dimethylsulfoxidu (modrá) a 0,1M LiClO ₄ (obrázky A a B) nebo LiCl (obrázek C) elektrodami	

GCE (obrázek A) a BDD (obrázek B a C). Následně byl přidán safranal aby byla výsledná koncentrace měřeného roztoku 3 mmol l ⁻¹ (červená).	79
Obrázek 51 Oxidační voltamogramy měřené metodou cyklické voltametrie v prostředí dimethylformamidu (modrá) a 0,1M LiClO ₄ elektrodami GCE (obrázek vlevo) a BDD (obrázek vpravo). Následně byl přidán krocín aby byla výsledná koncentrace měřeného roztoku 0,5 mmol l ⁻¹ (červená).....	79
Obrázek 52 Oxidační voltamogramy měřené metodou cyklické voltametrie v prostředí dimethylformamidu (modrá) a 0,1M LiClO ₄ elektrodami GCE (obrázek vlevo) a BDD (obrázek vpravo). Následně byl přidán safranal aby byla výsledná koncentrace měřeného roztoku 3 mmol l ⁻¹ (červená).	80
Obrázek 53 Závislost výšky píku na odmocnině rychlosti skenu (obrázek vlevo) a závislost logaritmu v na logaritmu I _p (obrázek vpravo).....	81
Obrázek 54 Optimalizace parametrů GCE elektrody pro DPV modulační amplitudy (obrázek A), modulačního času (obrázek B) a intervalového času (obrázek C)	83
Obrázek 55 Optimalizace parametrů GCE elektrody pro SWV modulační amplitudy (obrázek A), frekvence pro amplitudu 20 mV (obrázek B), krokového potenciálu pro amplitudu 20 mV (obrázek C), frekvence pro amplitudu 40 mV (obrázek D) a krokového potenciálu pro amplitudu 40 mV (obrázek E)	84
Obrázek 56 Optimalizace parametrů BDD elektrody pro DPV modulační amplitudy (obrázek A), modulačního času (obrázek B) a intervalového času (obrázek C)	85
Obrázek 57 Optimalizace parametrů BDD elektrody pro SWV modulační amplitudy (obrázek A), frekvence pro amplitudu 20 mV (obrázek B), krokového potenciálu pro amplitudu 20 mV (obrázek C)	85
Obrázek 58 Opakovatelnost kalibračních závislostí s novým povrchem GCE elektrody metodou DPV (grafy A a B), SWV za defaultních parametrů (graf C a D), SWV optimální parametry (graf E, F).....	86
Obrázek 59 Opakovatelnost kalibračních závislostí za použití nových BDD elektrod metodou DPV (grafy A a B) a SWV (graf C a D).....	87
Obrázek 60 Kalibrační voltamogram DPV za optimálních podmínek GCE elektrodou a kalibrační závislosti výšky píku (vpravo) a plochy píku (vlevo).....	88
Obrázek 61 Kalibrační voltamogram SWV za optimálních podmínek (vpravo) a za defaultních podmínek (vlevo) GCE elektrodou, kalibrační závislosti výšky píku (vpravo) a plochy píku (vlevo).....	90

Obrázek 62 Kalibrační voltamogram DPV za optimálních podmínek GCE elektrodou a kalibrační závislosti výšky píku (nahore) a plochy píku (dole).....	91
Obrázek 63 Kalibrační voltamogram SWV za optimálních podmínek (obrázek A) a za defaultních podmínek (obrázek B) BDD elektrodou, kalibrační závislosti výšky píku (vpravo) a plochy píku (vlevo)	93
Obrázek 64 Extrahvaný vzorek šafránu v acetonitrilu z Maroka (vlevo) a ze Španělska (vpravo)	95
Obrázek 65 Analyzované vzorky šafránu. Marocký vzorek (vpravo), vzorek ze Španělska (vpravo).....	95
Obrázek 66 Voltamogramy DPV (vlevo) a SWV (vpravo) měřené GC elektrodou extraktu z reálného vzorku šafránu (modrý sken) s přidavky standardu safranalu (červené skeny)	96
Obrázek 67 Voltamogramy DPV (vlevo) a SWV (vpravo) měřené BDD elektrodou extraktu z reálného vzorku šafránu (modrý sken) s přidavky standardu safranalu (červené skeny)	97
Obrázek 68 Voltamogramy DPV (vlevo) a SWV (vpravo) měřené GC elektrodou (A a B) a BD elektrodou (C a D) extraktu z reálného vzorku šafránu (modrý sken) s přidavky standardu safranalu (červené skeny)	98

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Parametry kalibrací koncentrace safranalu vůči výšce píku v prostředí acetonitrilu a ethanolu.....	82
Tabulka 2 Parametry kalibrací koncentrace safranalu vůči ploše píku v prostředí acetonitrilu a ethanolu.....	82
Tabulka 3 Výtěžnost modelových vzorků měřených s GCE elektrodou.....	94
Tabulka 4 Výtěžnost modelových vzorků měřené BDD elektrodou.....	94
Tabulka 5 Vypočtené výsledky reálného vzorku safranalu z reálného vzorku měřeného BDD elektrodou	96
Tabulka 6 Vypočtené výsledky reálného vzorku safranalu z reálného vzorku měřeného BDD elektrodou	97

SEZNAM ZKRATEK

AAPH	2,2'-azobis(2-methylpropionamidin)dihydrochlorid
ACN	acetonitril
ALD	aldehyd dehydrogenáza
BdCCD	dioxygenázy štěpení karotenoidů v komuli
B-R	Brittonův a Robinsonův pufr
Caco-2	lidská buněčná linie izolovaná z kolorektálního karcinomu
CCD	dioxygenázy štěpení karotenoidů
CrtZ	beta-karoten hydroxyláza
CsALDH	aldehyd dehydrogenáza <i>Crocus sativus</i>
CsCCD	dioxygenáza štěpení karotenoidu šafránu
CV	cyklická voltametrie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPV	borem dopovaná diamantová elektroda
DPV	diferenční pulzní voltametrie
EtOH	ethanol
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GC	plynová chromatografie
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
GG	geranyl-geranyl
GGPP	geranyl-geranyl difosfát
HepG2	lidská buněčná linie izolovaná z hepatocelulárního karcinomu
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HTCC	4-hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyklohexadien-1-on
IL-6	interleukin 6
I_{pa}	anodový proud píku
I_{pc}	katodový proud píku
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MRM	monitorování více reakcí
MS	hmotnostní spektrometrie
PDS	fytoen desaturáza

PSY	fytoen syntáza
SPCE	tištěná uhlíková elektroda
SPE	tištěná elektroda
SPME	mikroextrakce na tuhé fázi
STAT3	transkripční faktor 3
SWV	square wave voltametrie
UDP	uridin difosfát
UV-VIS	ultrafialová a viditelná spektrofotometrie

ÚVOD

Šafrán jakožto rostlina a zároveň jedno z nejdražších koření na světě má dlouhou historii využití především v gastronomickém a medicínálním odvětví. Unikátní je jeho růstový cyklus, jelikož jeho aktivita dosahuje maxima v průběhu podzimu, čímž se odlišuje od většiny ostatních rostlin. Mezi přední producenty šafránu patří Írán, Indie a některé země jižní Evropy. Pro jeho vysokou výtěžnost je zapotřebí zejména dostatek vláhy a přijatelná teplota, která se pohybuje v rozmezí 10–20 °C. Zpracování šafránu pro uvedení na trh zahrnuje sběr, sušení a vhodné skladování, přičemž v obchodě se lze setkat s šafránem ve dvou formách, a to ve formě sušených stigmat nebo drceného prášku.

Šafrán je ceněn především pro své sensorické vlastnosti způsobené zejména krocinem, safranalem a pikrokrocinem. Jeho kvalita je založena na obsahu těchto klíčových složek a z toho důvodu se často přistupuje k jeho falzifikaci za pomoci rostlin, které jsou šafránu podobné. V současné době se jeho kvalita posuzuje metodou UV-VIS spektrometrie, která však není schopna spolehlivě odhalit příměsi těchto rostlin. Alternativní techniky pro ověření jeho jakosti zahrnují infračervenou spektroskopii, kapalinovou a plynovou chromatografii. Jejich použití je ale značně finančně a časově náročné. Tento nedostatek jsou schopné kompenzovat elektrochemické metody stanovení.

Cílem této diplomové práce bylo ověřit elektrochemické chování krocinu a safranalů ve vodném a organickém prostředí. Dalším požadavkem bylo zjistit vhodnost různých typů elektrod a elektrolytů pro elektrochemické stanovení těchto dvou látek. Na základě dosažených výsledků bylo potřeba optimalizovat dodatečné podmínky a zjistit analytické parametry pro voltametrické stanovení safranalů v reálném vzorku šafránu.

1 TEORETICKÁ ČÁST

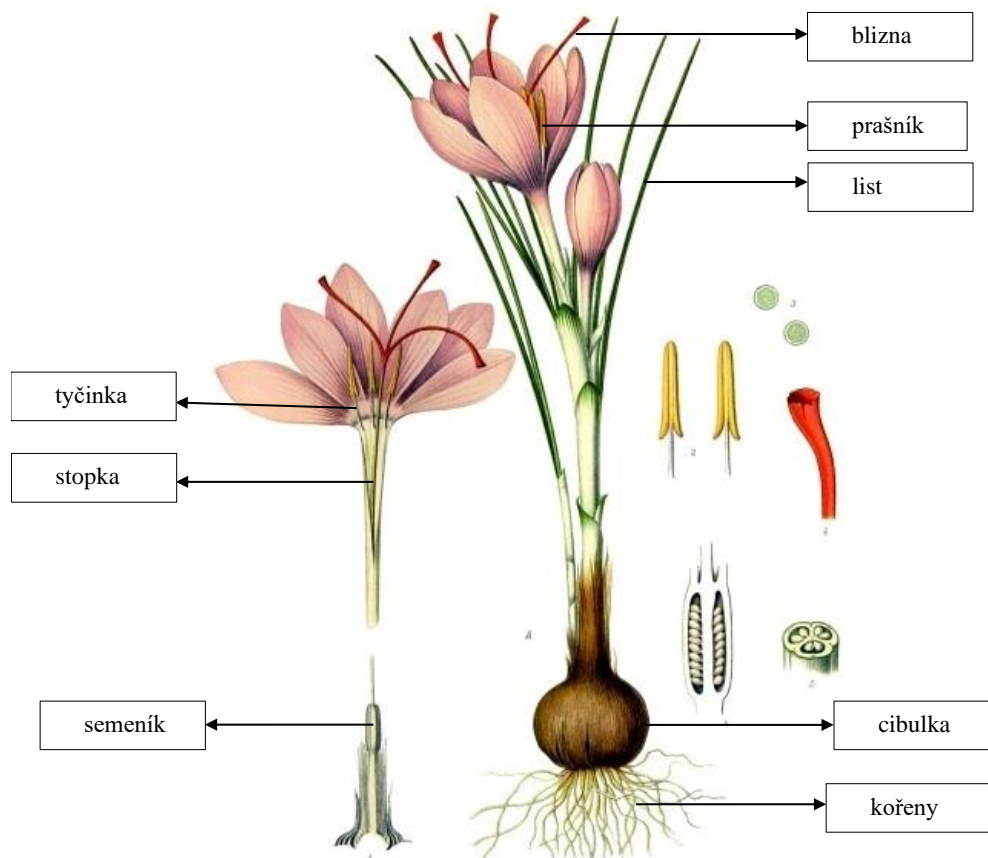
1.1 Šafrán z biologického hlediska

Název šafrán pochází z arabského slova „Zafran“, což znamená žlutý. Koření šafrán se získává sklizením a sušením třílaločných blizen šafránu setého (*Crocus sativus*), vytrvalé a polo-tropické rostliny čeledi kosatcovitých (*Iridaceae*), a je jedním z rodu *Crocus*, kam bezmála patří 85 druhů. Dalšími zástupci jsou například *C. asumaniae*, *C. cartwrightianus*, *C. hadriaticus*. (Nemati, 2018; Spence 2023; Dastranj, 2019; Cardone, 2020).

Fylogenetický původ šafránu je prozatím bohužel neznámý, nejčastěji se uvádí, že *Crocus sativus* se vyvinul z *C. cartwrightianus*, *C. hadriaticus*, *C. pallasii* nebo *C. thomasii* (Nemati, 2018). Jeho nejstarší doklady o použití pocházejí již z 50 000 let staré prehistorické jeskynní malby v severozápadním Íránu, kde byl použit jako pigment (Nemati, 2018; Kazemi-Shahandashti, 2022)

Šafrán obsahuje 10 % vody, 12 % bílkovin, 5 % lipidů, 5 % minerálních látek jako je vápník, fosfor, draslík, sodík, zinek a mangan. Hrubá vláknina je přítomna v 5 % a nejvíce jsou zastoupeny sacharidy v obsahu 63 % včetně škrobu a redukujících cukrů (glukóza, fruktóza, gentiobióza, xylóza a ramnóza), pentozanů, gelů, pektinů a dextrinů (Shahi, 2016).

Rostlina jako taková (obrázek č. 1) se skládá z okvětních lístků a semeníku. Přičemž semeník je hlavní součástí, protože zastává významnou roli při rozmnožování. Květy obvykle obsahují 2-3 cm dlouhé trojitě blizny, které se sklízí, suší a následně využívají jako koření. Na rostlině se taktéž nachází tři prašníky důležité při opylování a neméně důležitých šest světle fialových okvětních lístků, které lákají opylovače. Samičí pohlavní část květu šafránu zahrnuje bliznu, čnělku, semeník a stopku. Jeho samčí pohlavní část zase žlutě zbarvené tyčinky (Shahi, 2016). Horizontální průměr rostliny se pohybuje v rozmezí 0,5 po 6,5 cm a hmotnost od 0,5 do 70 g. Minimální hmotnost hlízy, která je schopná kvést je 2,5 cm (Cardone, 2020).



Obrázek 1 Podrobný popis jednotlivých částí *Crocus sativus* (upraveno podle Shahi, 2016).

1.1.1 Využití šafránu

Šafrán byl dříve využíván pro své biologické, aromatické, barvicí a chuťové vlastnosti jako koření, kadidlo, barvivo, využití našel rovněž v parfumerii nebo lékařství již před 3500 lety v Egyptě a Mezopotámii. Následně byl exportován do Číny a Japonska. Jeho snadné rozšíření do těchto oblastí napomáhalo jeho použití v tradiční medicíně jako afrodisiakum, spasmolytikum nebo expektorans. Často se používal ke zmírnění bolesti žaludečních onemocnění, zmírnění bolesti a uvolnění napětí. V tradiční medicíně je dále známý pro léčbu kožních onemocnění jako je impetigo nebo akné, depresí nebo jako stimulant imunity. Jeho silice je zároveň relaxační a používá se k léčbě nespavosti nervového původu. Nesmíme ale opomenout i jeho významné využití v gastronomickém průmyslu, kde se přidává do jídla díky své unikátní chuti, ale také jako dekorační prvek pro atraktivnější vzhled jídla na talíři díky jeho charakteristickému vzhledu (Sethi, 2018; Spence, 2023).

1.1.2 Pěstování šafránu

Existuje celá řada metod, které se snaží co nejefektivněji získat šafrán z květu *Crocus sativus*. Některé fáze jsou popsány v následujícím textu.

1.1.2.1 Podmínky pro pěstování

Aktivita šafránu se na jaře zpomaluje na rozdíl od běžných rostlin, které se v jarních měsících naopak probouzí k životu. Jeho aktivita se v oblastech Džámmú a Kašmíru nejvíce projevuje v podzimních měsících, především začátkem října za předpokladu, že půda je obohacena vodou ze srážek nebo případného prvního sněhu a teploty se pohybují v rozmezí 10–20 °C. Pokud nejsou dodrženy tyto optimální podmínky, tak se výrazně snižuje jeho výnos. Nejvíce jeho produkce trpí při snížených či zvýšených teplotách oproti optimu. Méně významný, avšak stejně důležitý, je parametr srážek, zejména v dnešní době klimatické krize. Srážky jsou nepravidelné a mnohem méně časté oproti dřívějším letům. Tyto neduhy se projevují hlavně v podobě sníženého růstu květu, ze kterého se následně šafrán sklízí (Yasmin, 2018). Další místa, která jsou známa pro svoji produkci šafránu, jsou provincie Khorasan, Fars a Kerman v Íránu, Řecko, Indie, Maroko, Španělsko a Itálie (Gazeran, 2016). Největší dovozce šafránu je momentálně Írán, který produkuje a zásobuje světový trh až z 96 % (Sogandi, 2023).

Šafrán je díky své nízké spotřebě vody a vysoké ekonomické hodnotě považován za udržitelnou surovinu. Specifické podmínky, důležité pro zdárný růst šafránu přiměly farmáře k jeho pěstování v mnoha aridních a polosuchých oblastech. V Íránu je hlavním zavlažovacím zdrojem podzemní voda, která je ale v závislosti na nedávných obdobích sucha zasolená. Jelikož se očekává, že období sucha budou pokračovat a přibývat místa, kde je omezený zdroj vody, byly zkoumány účinky na pěstování šafránu v takto zasolené vodě v brázdách oproti tradičnímu pěstování do květináčů. Rozhodujícími faktory pro hodnocení byla zvolena výtěžnost šafránu, jeho suché hmotnosti listů a výtěžnosti hlíz. Ukázalo se, že výtěžnost šafránu pěstovaného v tradičních květináčích byla v první a druhé vegetační sezóně 2,06 a 2,21krát nižší než výnosy, které byly sazeny v brázdách. Je to pravděpodobně proto, že v květináčích je tvrdost půdního povrchu o 56,6 % vyšší, než je tomu u vysazování do zasolených brázd. Tato nižší tvrdost v brázdách umožňovala snadnější kvetení šafránu a výstup listů. Zároveň se ukázalo, že je šafrán velmi citlivý na nedostatek vody a na vysokou salinitu v půdě. Vysoká salinita ale nebyla tak důležitým faktorem oproti nedostatku vody, který je klíčový (Danstranij, 2019; Shabrangzadeh, 2023). Další faktory spojené s půdou jsou například hustota a hloubka výsadeb nebo metoda a typ hnojení (Cardone, 2020).

Alternativu k polnímu pěstování navrhla studie Nardi z roku 2022, kdy se autoři snažili najít optimální podmínky pro pěstování šafránu v uzavřeném hydroponickém prostředí (což je prostředí, ve kterém jsou rostliny pěstovány bez půdy) pro efektivní produkci šafránu na farmaceutické využití. Bylo zjištěno, že nejvyšší výtěžnost suchých stigmat pomoci tohoto hydroponického procesu byla $3,2 \text{ g/m}^2$ což je oproti průměrné výtěžnosti získané z polního pěstování ($0,2 \text{ g/m}^2$) šestnáctkrát vyšší za předpokladu neoptimálnějších podmínek. Předpokládá se ale, že proces by mohl být ještě lépe optimalizován díky linií hlíz, které by byly speciálně přizpůsobeny k hydroponickému pěstování (Nardi, 2022).

1.1.2.2 Sběr a sušení

Květy šafránu se sbírají v časných ranních hodinách, kdy jsou ještě květy uzavřené, aby byla zajištěna větší odolnost proti degenerativním procesům květních orgánů. Můžeme květy sbírat jak ručně, tak mechanicky, kdy nejprve oddělujeme korunu od stonku a následně je sbírán oddělený květ přes vakuový sběrač. Následně se květy otevřou, odříznou se blizny a odstraní se bílo-žluté části. Tím se stigmata oddělí od zbytku rostliny. Následuje sušení, během kterého stigmata ztratí asi 80 % své hmotnosti v důsledku ztráty vody. Sušení je velmi kritickým krokem, kdy je snaha zaměřena především na omezení enzymatické a mikrobiální aktivity a zároveň zajištění, aby se koření uchovalo a zvýšila se jeho trvanlivost. V každé zemi probíhá sušení jiným způsobem. Příkladem je sušení v Řecku za pomoci umístění stigmat na hedvábná síta, kdy sušení probíhá 12–24 hodin v temné místnosti s kontrolovanou počáteční teplotou $20 \text{ }^\circ\text{C}$, která se následně zvyšuje na $30\text{--}35 \text{ }^\circ\text{C}$. Dalším příkladem je sušení v Abuzzu, kde jsou stigmata položena na síto, které je následně umístěno asi 20 cm nad žhavým uhlí z dubového dřeva po dobu 15–20 minut (Cardone, 2020). Každá země má svůj originální způsob sušení, který ale razantně ovlivňuje i kvalitu šafránu. Šafrán se ihned po usušení skladuje v těsně uzavřených nádobách, které jsou chráněny před světlem. Hotový výrobek se prodává buď ve formě sušených stigmat nebo sytě oranžovo-červeného prášku, který je ale snadné falzifikovat (Cid-Peréz, 2021).

Nejlepší podmínky pro skladování šafránu byly stanoveny jako dodržení tmavé inertní atmosféry, s nízkou úrovní aktivity vody ($<0,43$) a teplotou, která musí být nižší, než okolní teplota ($<25 \text{ }^\circ\text{C}$). Byly zkoumány také vodné extrakty šafránu. U nich se ukázalo, že se degradace barvy a esterů krocínu řídí kinetikou prvního řádu. Jsou tedy velmi citlivé na světelnou expozici, tepelnou úpravu, kyselé prostředí a přítomnost přísad (Sánchez, 2011).

Šafránu se přezdívá „červené zlato“ nejen kvůli jeho typické barvě, ale zároveň i proto, že je považován za nejdražší koření na Zemi. Jeho maloobchodní ceny se pohybují v rozmezí 2 000

až 7 000 €/kg. Vysoké ceny jsou zapříčiněné jeho náročnou sklizní. I přes obtížnou sklizeň roční produkce šafránu přesahuje 220 000 kg koření. Jedna blizna šafránu váží kolem 2 mg. Jelikož se většinou musí sklízet ručně a využívají se pouze šafránové blizny, nikoli květy, tak je v jednom kilogramu obsaženo přibližně 110 000 až 170 000 květů, což odpovídá asi 80 kg nesusušeným květům a zároveň 370–470 hodinám práce (Frusciante, 2014; Shahi, 2016; Ahrazem, 2022).

1.2 Chemické látky obsažené v šafránu

V šafránu je obsaženo mnoho chemických látek, které dokreslují jeho aroma a barvu. Za typické zbarvení šafránu jsou zodpovědné estery krocetinu, pikrokrocín pak podtrhuje jeho chuť a charakteristická vůně je způsobena především safranalem, ale i dalšími látkami jako isoforonem, 4-ketoiso-foronem, isomerem isoforonu a safranalu, 2,2,6-trimethyl-1,4-cyklohexandionem a HTCC (4-hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyklohexadien-1-on). Safranál společně s isoforonem se také podílejí na kořeněných a květinových tónech jeho vůně. V průběhu jednoho roku po sklizni ale postupně degradují a objevují se karamelové, citrusové a zeleninové podtóny způsobené vyšším obsahem některých těkavých alkoholů a aldehydů (Nenandis, 2016). Čím vyšší procento safranalu, krocínu a pikrokrocínu se v šafránu nachází, tím se považuje šafrán za kvalitnější (Sogandi, 2023)

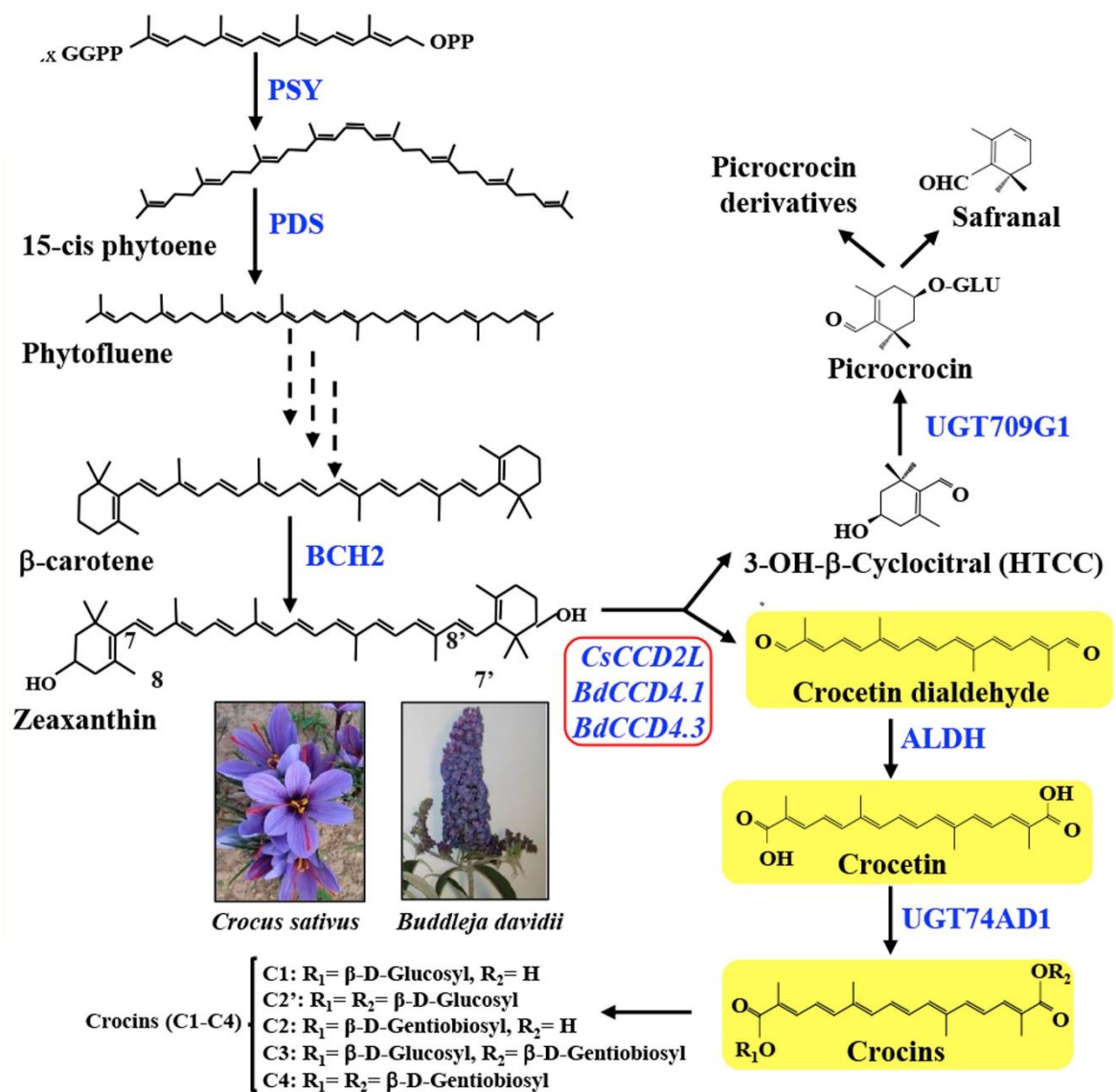
1.2.1 Metabolické dráhy hlavních složek

Na obrázku č. 2 je znázorněna biosyntetická dráha krocínu v *Crocus sativus*, která spočívá v reakci tří molekul isopentyldifosfátu s dimethylallyldifosfátem. Dimethylallyldifosfát je odvozen z dráhy mevalonové kyseliny nebo methylerytrol-4-fosfátu. Následně působením geranylgeranyl pyrofosfátové syntázy vzniká GGPP (geranyl–geranyl difosfát). Ten prochází mnoha procesy zahrnující enzymy jako je PSY (fytoen syntáza), PDS (fytoen desaturáza), ζ-karoten izomeráza, ζ-karoten desaturázy a karoteinodové izomerázy, aby se vytvořil lykopen. Poté je lykopen přeměněn působením lykopen β-karoten cyklinázy na β-karotenoidy, které jsou katalytickou reakcí prostřednictvím β-karoten hydrolázy využity k tvorbě zeaxantinu (Xie, 2023; Ahrazem, 2022).

Zeaxantin, lykopen a β-karoten jsou následně společně štěpeny na krocetindialdehyd a dvě molekuly HTCC (4-hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyklohexen-1-karboxaldehyd) pomocí karotenoidových štěpících dioxygenáz. Krocetindialdehyd je následně přeměněn na krocetin za pomoci

aldehyddehydrogenázy. Krocetin slouží jako substrát glukosyltransferáz. Je tedy následně glykosilován UDP-glukosyltransferázami katalyzující přenos glukózové molekuly na oba konce krocetinu za vzniku krocinu (Xie, 2023; Ahrazem, 2022). Molekula 4-hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyklohexen-1-karboxaldehydu je také rozpoznána glukosyltransferázou, což vede k tvorbě pikrokrocinu, který je následně dále metabolizován na safranal (Ahrazem, 2022).

Existují ještě další rostliny, které jsou schopny produkovat krociny jako jsou komule (*Buddleja*) nebo *Gardenia jasminoides*. Nicméně, tyto rostliny nejsou komerčně využívány z důvodu nízké akumulace krocinu (Martí, 2020).



Obrázek 2 Metabolické dráhy Crocus sativus (upraveno podle Martí, 2020)

1.2.2 Zastoupení jednotlivých složek v šafránu

Díky studii Caballero-Ortegy, zkoumající jedenáct vzorků šafránu z různých zemí a zdrojů pomocí HPLC (vysokoúčinné kapalinové chromatografii), jsme schopni určit, jaké hlavní složky v šafránu dominují s ohledem, v jaké zemi byl šafrán pěstován a sklízen. Nalezené hlavní složky jsou pikrokrocín, HTCC, 3-gentiobiosyl-kaempferol, safranal, *trans*-krocín 4, *trans*-krocín 3, *trans*-krocín 2', *cis*-krocín 4, *trans*-krocín 2, *cis*-krocín 2. Ve své studii uvádí, že koncentrace složek je silně ovlivněna nejen původem, ale i procesy sušení a podmínkami skladování, které ovlivňují koncentraci glykosidických karotenoidů, jelikož se jedná o tepelně labilní a fotochemicky citlivé složky (Caballero-Ortega, 2007).

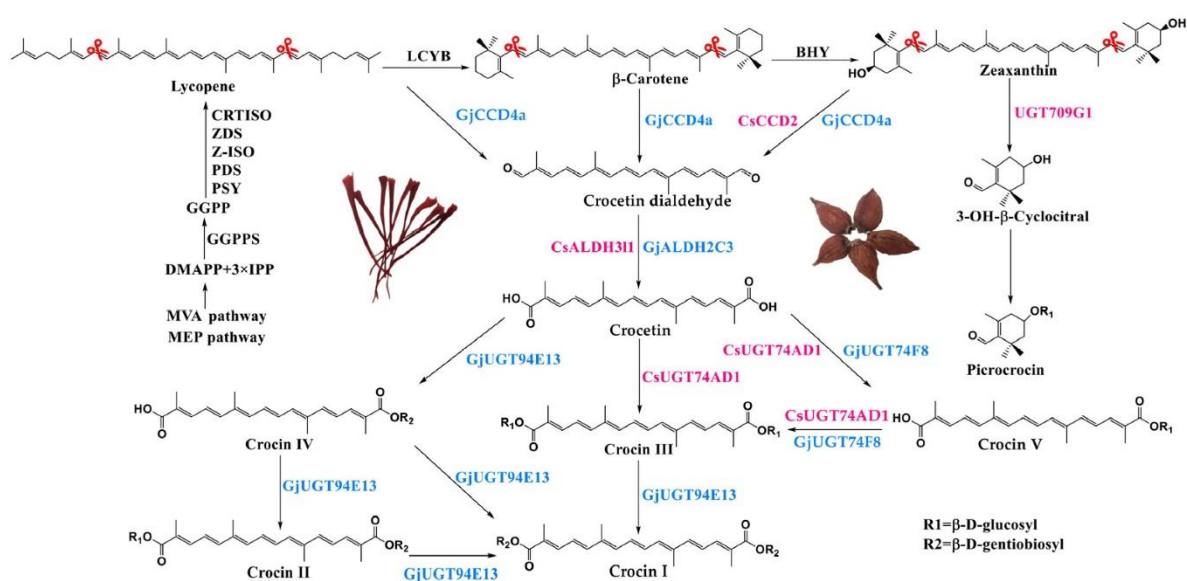
Nejvyšší koncentraci sledovaných složek vykazoval řecký šafrán (s celkovou koncentrací 94,06 mg/g stigmat), následovaný indickým, novozélandským, španělským, francouzským, ázerbájdžánským, italským, tureckým a íránským extraktem šafránu. Nejnižší koncentraci vykazovaly vzorky z Tibetu a Číny s celkovým obsahem 9,86 mg/g stigmat. U tibetského šafránu je ale možné, že za nižší koncentraci látek může fakt, že byl vzorek odebrán z pole, kde stigmata šafránu byla výrazně kratší. Pro porovnání byl zakoupen i vzorek od Sigmy, u něhož byla určena koncentrace jako 12,43 mg/g stigmat. I přes to, že Sigma deklarovala, že jejich šafrán je původem ze Španělska, tak na rozdíl od nich obsahoval analyzovaný španělský šafrán z oblasti La Mancha podstatně vyšší celkovou koncentraci sledovaných složek (Caballero-Ortega, 2007).

Nejvyšší zastoupení má krocín, který byl v řeckém šafránu přítomen ve formách *trans*-krocín 2', *trans*-krocín 2 a *cis*-krocín 4. Naproti tomu šafrán z Nového Zélandu měl nejvyšší podíl *trans*-krocínu 4 a *trans*-krocínu 3. Indický šafrán měl zase nejvyšší podíl *cis*-krocínu 2. Safranal a HTCC byly přítomny ve velkém množství ve španělských a novozélandských vzorcích s obsahem 8,14 mg/g stigmat pro safranal a 7,9 mg/g stigmat u HTCC. Nejvyšší hodnoty HTCC byly ale naměřeny u šafránu z Turecka a to 0,42 mg/g stigmat (Caballero-Ortega, 2007).

1.2.3 Krocín

Krocín se strukturálním vzorcem $C_{44}H_{64}O_{24}$ (8,8-diapokaroten-8,8-diová kyselina) je sloučenina, která je zodpovědná především za pigmentové vlastnosti šafránu. Skládá se z řady mono-, di- a tri-glukosylesterů krocetinu polyendikarboxylové kyseliny, kde se D-glukóza a/nebo D-gentiobióza vyskytují jako sacharidové zbytky, které zajišťují dobrou rozpustnost krocínu ve vodě (Gazeran, 2016; Ghahghaei 2012; Alavizadeh 2014). Krociny jsou hydrofilní apokarotenoidy,

kteře se hromadí jen v bliznách *Crocus sativus* a plodech *Gardenia jasminoides*. Na obrázku č. 3 je vyobrazeno rozdělení krocínů podle struktury na základě počtu a polohy jejich glykosylových skupin na krocín 1, který obsahuje čtyři glykosylové skupiny, dále krocín 2 (tři glykosylové skupiny), krocín 3, krocín 4 (oba dvě glykosylové skupiny) a krocín 5 s jednou glykosylovou skupinou (Pu, 2020). Krocín 1 a krocín 2 jsou převažující v rostlinách a jsou považovány za aktivní složky, které slouží k hodnocení kvality šafránu (Xie, 2023; Ahrazem, 2022). Kromě krocínu 1 se všechny deriváty krocínu vyskytují ve formě *cis*-krocínu 1. Mělo by tomu tak být z důvodu, že *trans*-krociny podléhají fotoizomeračním reakcím a přecházejí na *cis*-krociny (Alavizadeh 2014).



Obrázek 3 Rozdělení krocínů na základě počtu a polohy jejich glykosylových skupin. (upraveno podle Xie, 2023)

Krocín je velmi farmakologicky významný díky protinádorovým a antioxidačním vlastnostem. Tyto vlastnosti se využívají při léčbě poškozených neuronů, například u léčby Alzheimerovy choroby. Krocín jako takový není lékem Alzheimerovy choroby, ani ji nezpomaluje, ale jeho antioxidační schopnost dokáže zmírňovat její příznaky, jako je například demence a zkvalitňuje tak život pacientů i jejich pečovateli (Ghahghaei 2012). Studie taktéž ukázaly jeho využití v protinádorové medicíně, především při leukémii, rakovině prsu, močového měchýře a rakovině kolorektální. Zároveň se ukázalo, že je schopen působit jako nutraceutikum jaterní tkáně před steatózou jater. Je tedy možné, že se krocín v budoucnu bude používat pro prevenci různých druhů rakoviny. Ve studii Kima z roku 2018 byly poskytnuty důkazy vlivu protinádorové aktivity krocínu prostřednictvím inhibice signální dráhy IL-6/STAT3 u jaterního karcinomu (Kim, 2018).

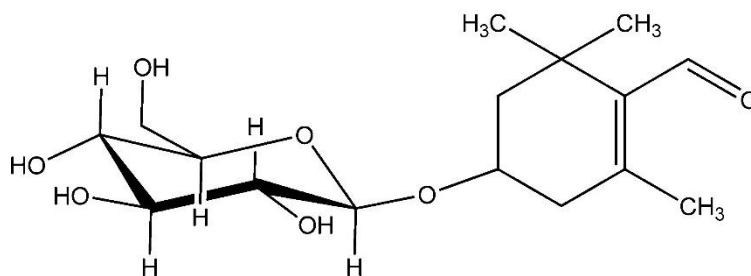
Vzhledem k náročnosti pěstování, poptávce po šafránu a zvýšeným cenám v závislosti na vysokých mzdových nákladech a následného sklizení, byly provedeny experimenty na získání krocínu jinými způsoby, než je tomu pomocí zdlouhavého pěstování šafránu. Experimenty byly provedeny na rajčatech, bramborech a tabáku (Xie, 2023; Ahrazem, 2022). Jsou taktéž evidovány pokusy o získání krocínu a krocetinu pomocí upravení metabolických drah v mikrobiálních systémech. Pokusy byly provedeny na základě předchozích úspěšných korelace mezi genovou expresí a akumulací metabolitů u terpenoidů, kumarinů a flavonoidů. Tyto pokusy ale neskončily převelkým úspěchem. Ve studii od Tan z roku 2019 byl proveden test, ve kterém autoři zavedly geny CsCCD2 a CsALDH do kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, díky čemuž byly kvasinky schopné produkce krocetinu. Výsledky ale prokázaly, že pouze CsAKDH3 je schopen překonat endogenní ALD enzymy a bylo možné zvýšit produkci krocínu o 39 % (62,79 µg/g sušiny) ve srovnání s kontrolními vzorky (Tan, 2019). Autoři Chai a další z roku 2017 zkoumali taktéž tento problém a zaměřovali se především na podmínky při kultivaci. Bylo zjištěno, že lepších výsledků je dosaženo kultivací při 20 °C a kombinací CrtZ/CCD a zdrojů ALD. To vedlo k maximální akumulaci 6278 µg/l krocetinu za pomoci kultivace *Saccharomyces cerevisiae* v bioreaktoru (Chai, 2017, Martí, 2020).

Studie autorů Martí a kol. z roku 2020 zkoumala možnosti pro výtěžnost krocínu a pikrokrocínu z důvodu komplikovaného získání přirozeným způsobem. Autoři využili manipulaci biosyntetické dráhy karotenoidů pomocí genetického inženýrství na jaderné i transplastonomické úrovni. Byl použit virový vektor odvozený z *Tobacco etch* viru (rod Polyvirus, čeleď Potyviriidae) k přechodné expresi série CCD enzymů jakožto takových nebo v kombinaci s jinými karotenoidovými a nekarotenoidovými enzymy biosyntézy u rostlin *Nicotiana benthamiana*. Ukázalo se, že listy, které byly infikované virem exprimující CsCCD2L nebo BdCCD4.1 získaly žlutou pigmentaci viditelnou pouhým okem. Následné analýzy těchto tkání prokázaly akumulaci krocínů a pikrokrocínů, které dosahovaly úroveň dostačující ke komerční výrobě čili 0,35 % a 0,8 % sušinového podílu obzvláště v listech, ve kterých byly současně exprimovány CsCCD2L a fyto-gen syntáza viru *Patonea ananatis* (Martí, 2020).

1.2.4 Pikrokrocín

Pikrokrocín (4-[p-d-glukopyranosyloxy]-2,6,6-trimethyl-1-cyklohexen-1-karboxaldehyd) se strukturálním vzorcem $C_{16}H_{26}O_7$ (obrázek č. 4) je bezbarvý monoterpenní glykosid, jehož molekulová hmotnost je 330,37 g/mol. Dle biosyntetické dráhy je pikrokrocín rozkladný produkt karotenoidzeaxanthinu, následně je pikrokrocín účinkem β -glukosidázy přeměněn na 4-

hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyklohexen-1-karboxaldehyd, který se během sušení přemění dehydratací na D-glukózu a safranal, který představuje asi 60 % aromatické složky šafránu (Gazeran, 2016; Shahi, 2016; Samarghandian, 2014). Další způsob přeměny na safranal je přímo tepelnou degradací, ale existují i důkazy o přeměně při extrémních hodnotách pH (Sánchez, 2011). Pikrokrocín je považován za druhou nejhojnější složku (1-13 % suché hmoty), jež je zodpovědná za hořkou chuť šafránu. Ve studii prováděné s čistým pikrokrocínem byla prokázána jeho vysoká stabilita při pokojové teplotě a teplotách v rozmezí 4 až -20 °C při pH 7 (Shahi, 2016). V nepříznivých podmínkách trávicího traktu se ukázalo, že až 75 % počátečního množství pikrokrocinu odolalo nepříznivým gastrointestinálním podmínkám, což svědčí o jeho vysoké stabilitě. Pro porovnání, estery krocetinu a cukru v extraktu šafránu degradovaly až ze 40 %. Pikrokrocín je také vysoce stabilní vůči tepelnému zpracování. Informace o vlivu pH a trávicích enzymů na jeho degradaci ale nejsou podrobně prozkoumány (Kyriakoudi, 2015).

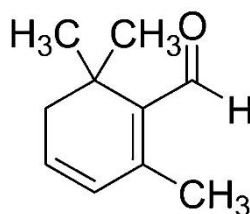


Obrázek 4 Struktura pikrokrocinu, (převzato z Kyriakoudi, 2015)

Pikrokrocín je druhý nejhojnější apokarotenoid v šafránu. V šafránu byl zjištěn jeho obsah $14,4 \pm 0,7$ g/100 g suchých stigmat za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie s reverzní fází. Můžeme ho extrahovat ze šafránu společně s estery krocetinu a cukru za použití vody a alkoholových směsí. Bylo taktéž prokázáno, že buňky po ošetření čistým pikrokrocínem, krocetinem a krocetinovým extraktem po dobu 24 hodin a následným vystavením peroxidu vodíku po dobu 30 minut zaznamenaly významný pokles poškození DNA o 13,2 %, které bylo vyvoláno peroxidem vodíku. Bylo taktéž prokázáno, že pikrokrocín a ostatní složky šafránu mají protinádorové účinky prostřednictvím inhibice růstu rakovinových buněk. Toto bylo zkoumáno za pomoci buněčných linií lidského adenokarcinomu Caco-2 a lidského hepatocelulárního karcinomu HepG2. Pikrokrocín a ester krocetinu snižovaly proliferaci buněk Caco-2, ale toto snížení bylo vysoce závislé na dávce použitého pikrokrocinu (Kyriakoudi, 2015).

1.2.5 Safranal

Safranal, (C₁₀H₁₄O) neboli 2,6,6-trimethyl-1,3-cyklohexadien-1-karboxaldehyd (obrázek č. 5) jehož molekulová hmotnost je 150,21 g/mol, je cyklický terpenický aldehyd, který se v čerstvých rostlinách obvykle nevyskytuje. Během procesu sušení se až následně metabolizuje z pikrokrocinu a HTCC. Lze ho považovat za hlavní těkavý olej, který je zodpovědný za aroma sušeného šafránu. Další látky, které dotváří šafránové aroma jsou 4-ketoisoforon a dihydrooxoforon nebo β-ionon, který je považován za hlavní těkavou sloučeninu nacházející se v čerstvých bliznách a jeho úlohou je přitahovat opylující hmyz (Tan, 2019; Samarghandian, 2014; Cardone, 2020; Moras, 2022).



Obrázek 5 Struktura safranal, (převzato z Kyriakoudi, 2015)

Jedním z možných uplatnění safranal je v protinádorové medicíně. Je totiž schopen inhibovat proces polymerace mikrotubulů. Interakce se safranalem vede k strukturálním změnám tubulinu a může tedy vést ke změně vazebného úhlu mezi α- a β-tubulinem. Tím je ovlivněna tubulin–tubulinová interakce a tubulin–nukleotidová interakce, která by jinak vedla k polymeraci mikrotubulů a k rozvoji rakoviny (Naghshineh, 2015). Safranal je taktéž znám pro své ochranné účinky proti různým markerům oxidačního poškození vůči savcím buňkám a pro jeho neuropsychologické účinky. Jeho další farmakologické využití je ve zvýšení aktivity antioxidantních enzymů a snížení tvorby reaktivních forem kyslíku což vede ke snížené tvorbě kožních papilomů (Mardani, 2019).

1.3 Metody hodnocení kvality šafránu

Kvalita a klasifikace šafránu je definována normami ISO, konkrétně ISO 3632-2:2010 definující mikroskopickou analýzu pro detekci cizích látek v šafránu a ISO 362-1:2011 založená na měření hodnot maximální absorpce vodných extraktů šafránu pomocí UV-VIS spektrofotometrie. Metoda hodnocení využívající UV-VIS byla ale prokázána jako nedostatečná za předpokladu, že je šafrán padělán za pomoci rostlinného materiálu, který má podobnou barvu a morfologii. Ukázalo se, že tato metoda nedokáže detekovat přísady rostlin, kterými se šafrán falšuje

v hmotnostním podílu nižším než 20 hmotnostních procent. Z tohoto důvodu se začaly vyvíjet metody, které by byly schopné detekce nižšího podílu falzifikačních složek (Filatova, 2024).

1.3.1 Kvalita šafránu

Šafrán je pěstován především pro jeho využití v potravinářském sektoru kvůli jeho barvě, chuti a vůni. Tyto vlastnosti mu poskytují látky v něm obsažené jako jsou estery krocetinu, pikrocín, safranal a další těkavé látky. Několik studií taktéž prokázalo, že akumulace těchto bioaktivních molekul (především krociny a pikrokrocín) je ovlivněna především klimatickými podmínkami, geografickým původem, stupni otevření květu, posklizňovými úpravami, sušením, kultivarem, stresem z přesazování a agronomickými podmínkami. Neméně důležité jsou podmínky skladování, protože obsah těchto látek se skladováním drasticky mění vlivem oxidačních a hydrolytických reakcí. Rychlost těchto chemických reakcí závisí na pH, teplotě, relativní vlhkosti, přítomnosti kyslíku a světla. Při dlouhodobém skladování tedy upadá jeho kvalita a tento nekvalitní šafrán se následně využívá při falzifikaci komerčních produktů (Nenandis, 2016; Cardone, 2020; Aghhavani-Shajari, 2021; Nardi, 2022).

Estery krocetinu a pikrokrocín se hromadí především během vývoje semeníků a dosahují maximální úrovně koncentrace ve vývojové fázi antézi (Chrysanthou, 2016). Ve vysoce kvalitním šafránu by měly estery krocetinu a pikrokrocín tvořit asi 20–30 % hmotnosti suchých stigmat. Další látkou sloužící pro určení kvality šafránu je safranal, který je neméně důležitý (Chrysanthou, 2016). Čerstvost vzorků šafránu je určována na základě analýzy α -glukózy a α -gentiobiózy za využití metody nukleární magnetické rezonance, jelikož tyto látky nejsou přítomny u čerstvých vzorků. Vznikají až později vlivem hydrolytické degradace esterů krocínu a pikrokrocínu. Další látky obsažené ve starších vzorcích šafránu jsou například mastné kyseliny (Consonni, 2016).

Dle ISO 3632–2010/2011 se jakost šafránu rozděluje do tří kategorií na základě přítomnosti květinových zbytků, vlhkosti a těkavé složky, obsahu popela, barevné síle, hořkosti a aromatické síle. Z důvodu vysokých nákladů dochází k falšování šafránu mnoha způsoby (Cardon, 2020). Jedním z nich je přidávání starého šafránu k novému, popřípadě přidávání jiných částí *Crocus sativus* (tyčinek a blizen) a nemalou výjimkou je taktéž kombinování s jinými druhy šafránu, například s *Curcuma longa*, *Cathamus tinctorius*, *Calendula officinalis*, *Buddleja officinalis* a *Allium porrum*, ale i jiných rostlin, zejména *Allium schoenoprasum*, barvířský šafrán nebo *Arnica montana*. Falšování se taktéž může týkat i umělého zvyšování hmotnosti nasáváním sirupu, medu, glycerinu a tatrazinu (Cardon, 2020; Soffriti, 2016). Nejhorší na určení

pravosti šafránu je jeho prášková forma, jelikož nejsme schopni určit tvar stigmat. V takovémto případě se vzorek analyzuje mikroskopickými technikami pro přítomnost charakteristických struktur jako je například pyl. Některé podvody zahrnují i přidávání syntetického safranalů do práškových stigmat nebo extraktů (Moras, 2022).

1.3.2 Senzorická analýza

Studie autorů Chrysanthou a kol. z roku 2015 se zaměřovala především na senzorickou analýzu pikrokrocinu jakožto hlavní hořké sloučeniny šafránu. Senzorické analýzy prováděné pomocí vyškolených pracovníků a studií spotřebitelů jsou spíše vzácné. Zejména senzorické vnímání hořkosti šafránu a jeho extraktů jsou omezeny pouze na určení prahu detekce čistého pikrokrocinu pomocí částečně vzdělaných panelistů. Test chuti probíhal tak, že byly testovací subjekty nejdříve proškoleny a byla testována jejich vnímavost chuti na hořkost pomocí kofeinu. Subjekty určovaly prahy detekce pikrokrocinu a byly taktéž požádány, aby popsaly chuť pikrokrocinu (Chrysanthou, 2016).

Ve studii byly taktéž určeny parametry ovlivňující pikrokrocinovou hořkost jako je vliv teploty podávání, vliv přítomnosti esterů krocinu a vliv přítomnosti ethanolu. Bylo zjištěno, že práh detekce chuti je 5,34 mg/l a práh rozpoznání byl 7,26 mg/l s ohledem na to, že pro vzrůstající koncentraci pikrokrocinu byly subjekty hodnocení úspěšnější. Chuť pikrokrocinu byla popsána jako jódová chuť, šafránová, dřevitá a příjemná. Hořkost byla popsána jako rozdílná od hořkosti kofeinu nebo chininu. Hořkou chuť taktéž spíše vnímaly subjekty se zpožděním a spíše jako pachů (Chrysanthou, 2016).

1.3.3 Vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie

U tenkovrstvé kapalinové chromatografie bylo posuzováno složení a separační schopnost složek vzorků šafránu. Na rozdělení byly použity methanolové extrakty vzorků šafránu. Po separaci byly pozorovatelné na denním světle žluté skvrny blízko startu typické pro krocin a krocecin. Oba vykazovaly fluorescenci při vlnové délce 254 nm. Následně byla pozorována světle žlutá skvrna asi v polovině separační dráhy, která po derivatizaci anisaldehydem a zahřátí na 100-105 °C po dobu 5 minut se následně stala tmavě fialovomodrou, což potvrdilo přítomnost pikrokrocinu. Safranal byl přítomen v bledých oblastech nad pikrokrocinem. Bylo testováno 6 vzorků z Ukrajiny a dále po jednom vzorku ze Španělska, Maroka a Íránu. Metoda vysokoúčinné tenkovrstvé chromatografie se ukázala být dobrým hodnotícím nástrojem kvality

šafránu díky své dobré separační účinnosti za daných podmínek. Bylo prokázáno, že vzorky šafránu mají podobné chemické složení, nicméně intenzita zbarvení jednotlivých složek byla rozdílná v rámci zkoumaných vzorků (Jarukas, 2022).

Velkou výhodou metody vysokoúčinné tenkovrstvé chromatografie je možnost kvantitativního vyhodnocení obsahu složek a možnost provádět screening více vzorků současně. Výsledky ukázaly, že obsah krocínu v ukrajinských vzorcích byl 18–33 %, ve španělských 17 %, v marockých 24 % a v íránských 32 %. Obsah pikrokrocínu byl nejvyšší u vzorků z Ukrajiny (24 %) a Íránu (26 %). Obsah safranalů se pohyboval v rozmezí 4–17 %. Je to pravděpodobně způsobeno odlišnými environmentálními faktory v oblastech pěstování šafránu, sušením a zpracováním. Nejvyšší obsah složek měl šafrán ze Záporožské oblasti na Ukrajině s obsahy 33 % krocínu, 24 % pikrokrocínu a 13 % safranalů. Data ukazují, že metoda vysokoúčinné tenkovrstvé chromatografie je jednoduchá, přesná a je vhodná pro pravidelnou kontrolu kvality šafránu ve farmaceutické analýze (Jarukas, 2022).

1.3.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Ve studii autorů Spinelli a kol. byly vzorky analyzovány za pomoci vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií v režimu MRM (monitorování více reakcí). Vyvinutá metoda byla úspěšně použita pro určení obsahu krocínu a krocetinu v analyzovaných vzorcích, které byly sesbírány v průběhu čtyř let ze čtyřech různých geografických oblastí Itálie. Zároveň byly odděleny různé izomery díky optimalizované separaci. Na základě výsledků této studie byly spolehlivě rozlišeny vzorky různého geografického původu. Z výsledků také vyplývá, že během let skladování dochází k výrazným změnám v obsahu krocínu u vzorků stejného původu. Oblast sklizně je tedy esenciální z pohledu organoleptických vlastností koření šafránu (Spinelli, 2023).

Xiaobin a kol. ve své studii vytvořili a optimalizovali metodu kapalinové chromatografie pro určení hlavních apokarotenoidů šafránu, který pocházel z Chu-čou. Ukázalo se, že hlavní apokarotenoidy, zahrnující například krocín 1 a krocín 2, tvoří asi 40 % celkové hmotnosti suchých stigmat v šafránu (Xiaobin, 2018).

Suchareau a kol. využili metodu kapalinové chromatografie v kombinaci s detektorem diodového pole a hmotnostním spektrometrem pro studium vlivu podmínek skladování na kvalitu šafránu. Degradací produkty, které se objevily v průběhu skladování, byly identifikovány na základě srovnání retenčních časů s retenčními časy standardů, absorpčních a hmotnostních

spekter. Byly porovnávány vzorky v různých podmínkách po dobu jednoho týdne. Vzorky zahrnovaly čerstvý šafrán, vzorek chráněný před světlem při pokojové teplotě, vzorek vystavený světlu v pokojové teplotě, vzorek chráněný před světlem při 60 °C a vzorek vystaven světlu při 60 °C. Byl připraven standard *trans*-4-GG krocínu, který se obecně používá jako standard pro kvantifikaci krocínu v šafránu. Bylo zjištěno, že u vzorku, který byl skladován při pokojové teplotě a byl chráněn před světlem bylo nalezeno 68 % standardu *trans*-4-GG a produkty degradace představovaly především krociny a krocetin. U druhého vzorku, který byl skladován při pokojové teplotě, ale byl vystaven světlu se ukázalo, že *trans*-4-GG krocín představoval pouze 45 % směsi. U vzorků, které byly vystaveny 60 °C nebyl nalezen žádný *trans*-4-GG krocín. Z tohoto lze usuzovat, že teplota degraduje krocín závažněji, než je tomu v případě expozice světlem (Suchareau, 2021).

1.3.5 Plynová chromatografie

Studie Di Donata a kol. se zabývala analýzou aromatického profilu šafránu v souvislosti s aromatickým profilem falzifikátů. Analýza byla provedena pomocí plynového chromatografu v kombinaci s hmotnostním spektrometrem. Přístroj byl zároveň vybaven automatickým dávkovačem se SPME vláknem. Nosným plynem bylo helium. Kvalitativní chemické složení bylo určeno porovnáním retenčních indexů a srovnáním hmotnostních spekter získaných píků s hmotnostními spektry z knihoven. Podmínky analýzy byly optimalizovány tak, aby byly zesíleny signály GC/MS falšovaných sloučenin ve srovnání se signály poskytované šafránovou maticí. Metoda dokáže detekovat falešné přísady v šafránu už od koncentrace 2 % u kurkumy, měsíčku a 3 % u světlice barvířské, z důvodu nižších intenzit signálů svých těkavých složek. Pro porovnání, necílené spektrofotometrické metody jsou schopny detekovat množství až 5–20 %. Naopak metody založené na kapalinové chromatografii poskytují srovnatelné nebo mírně horší výsledky (Di Donato, 2021).

Podobnou studii jako Di Donato provedla i Filatová a kol. Studie se zaměřovala na schopnost odhalit do jaké hmotnostní koncentrace jsme schopni pomocí plynové chromatografie odhalit ve vzorcích šafránu falzifikát. Zde byla použita plynová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií a head-space SPME extrakcí. Parametry byly optimalizovány a následně byly analyzovány vzorky šafránu a uměle falzifikované vzorky šafránu, které obsahovaly části rostlin, které se nejčastěji používají k falzifikaci (například kurkuma, paprika, světlice barvířská a měsíček). Následně byly výsledky vyhodnoceny chemometrickou analýzou (Filatová, 2024).

Studie autorů Morozzi a kol. využívala head-space plynovou chromatografii s plamenově ionizační detekcí. Byla detekována příměs kurkumy a měsíčku jako falzifikátorů šafránu už od 5 hmotnostních procent (Morozzi, 2019).

1.3.6 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

Naim a kol. se zabývali zjišťováním pravosti šafránu. Byly analyzovány vzorky získané z trhů a porovnány se spektry čistého šafránu. Rozemleté a homogenizované vzorky byly skenovány v rozsahu vlnových délek 4000-400 cm^{-1} . Porovnáním se spektry čistého šafránu bylo zjištěno, že u vzorku z Íránu byl přítomen jiný rostlinný materiál, jelikož ve spektru chyběly charakteristické absorpční pásy, které jsou spojené s krocinem a charakteristický pás typický pro pikrokrocín byl posunut. U vzorku ze Španělska FTIR spektra vykazovala stejný vzhled jako je tomu u čistého šafránu. Byly přítomny i pásy charakteristické pro krociny a pikrokrociny, což dokládá autenticitu vzorku. Spektra marockého vzorku vykazují určitý rozdíl zejména v oblasti, kde se nachází spektra cukrů a polysacharidů. Lze tedy usuzovat, že tento vzorek je smíchaný s jiným rostlinným materiálem. Výsledky byly následně ověřeny pomocí DNA kódování, které potvrdilo, že vzorek z Íránu byl identifikován jako tráva ovsík vyvýšený (*Arrhenhathrum elatius*). Výsledky byly taktéž potvrzeny pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrofotometrií. Byla zjištěna přítomnost vysoké koncentrace terpenů, do kterých patří jak safranal, tak isoforon a 4-ketisoforon. U pravých vzorků šafránu se obsah safranalů pohyboval kolem 60 % těkavé frakce a isoforonu mezi 2,14 – 15,41 % těkavé frakce. U vzorku z Íránu bylo nalezeno pouze 10,17 % těkavé frakce safranalů. Zároveň se i ukázala přítomnost látek, které se běžně v šafránu nevyskytují jako jsou α -murolen nebo β -bisabolen. U vzorku z Maroka, u kterého se předpokládá, že se nejedná o čistý šafrán byly taktéž pozorovány jiné sloučeniny v čele s mentholem, které se taktéž přirozeně nevyskytují v šafránu. Definitivním potvrzením byla nízká přítomnost safranalů a isoforonu (Naim, 2022).

Consonni a další zkoumali autenticitu, kvalitu šafránu a schopnost vysledovat stáří vzorků šafránu pomocí metabolomických přístupů, které byly založeny na nukleární magnetické rezonanci a FTIR. Byly testovány jak čerstvé vzorky (0-4 roky od sklizně), tak i staré vzorky (5-14 let od sklizně) za různých podmínek skladování. Ukázalo se, že vzorky, které byly označeny jako staré, vykazovaly mnohem nižší hodnoty procentického zastoupení pikrokrocínu a celkového množství krocínů na to, aby mohly být označeny do jakostní kategorie I. Dokonce jen pár z nich by dosáhlo jakostní kategorie III. Většina z nich byla označena za nevyhovující. Naopak

vzorky označené za čerstvé a stálé vykazovaly dostatečné hodnoty pro zařazení do jakostní kategorie I a II (Consonni, 2016).

1.3.7 Elektrochemická stanovení

1.3.7.1 Elektronický jazyk

Elektrodový systém elektronického jazyka zahrnuje nespécifickou sadu málo selektivních elektrochemických senzorů, které mají vysokou stabilitu a vzájemnou citlivostí na různé typy roztoků. Tento elektrodový systém využívá řadu senzorů, které reagují na soli, kyseliny, cukry a hořké složky, z něhož následně získáme signál, který se nadále analyzuje. Jeho výhodou je především rychlost analýz, nízké náklady a jednoduchost stanovení. Tento systém byl již aplikován na stanovení mnoha potravin jako je med, čaj, mléko nebo různé odrůdy jablek (Yousefi-Nejad, 2022). Nejčastěji používané metody při tomto typu stanovení jsou potenciometrie, amperometrie, cyklická voltametrie nebo impedance (Heidarbeigi, 2016).

Yousefi-Nejada a spoluautoři použili při měření krocínu v šafránu tříelektrodovou celu obsahující Ag/AgCl elektrodu jako referentní elektrodu, platinový drátek jako pomocnou elektrodu a čtyři pracovní elektrody. Pracovní elektrody zahrnovaly elektrodu ze skelného uhlíku (GCE), modifikovaného skelného uhlíku, zlata (Au) a platiny (Pt). Cyklické voltamogramy byly měřeny v rozsahu potenciálů od -1 V do +1 V (vs. Ag/AgCl) s rychlostí skenování $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Jako prostředí byl použit 0,1M fosfátový pufr s různými hodnotami pH, jelikož krocín v čistě vodném prostředí neposkytoval žádné znatelné odezvy. Bylo zjištěno, že u GCE elektrod bylo nejvyšší odezvy dosaženo při pH 2 a u platinové a zlaté elektrody při pH 12. Nejlepší odezvu měl roztok krocínu u zlaté elektrody (v porovnání s jinými senzory), jelikož ukázal zvýšení jak anodového proudu (I_{pa}), tak i katodového proudu (I_{pc}), narůstaly se zvyšující se koncentrací krocínu. U modifikovaných i nemodifikovaných GCE elektrodách nedošlo ke zvýšení I_{pa} ani I_{pc} se vzrůstající koncentrací. Platinová elektroda vykazovala zvyšující I_{pc} , ale neměnný I_{pa} (Yousefi-Nejad, 2022).

Studie Heidarbeigia a kol. se zabývala analýzou devíti vzorků šafránu pocházejících ze Španělska a Íránu. Měření bylo provedeno za pomoci sestavy tří tištěných elektrod zahrnujících uhlíkovou, platinovou, zlatou pracovní elektrodu a pracovní elektrodu z uhlíkové pasty a pruské modři. Cyklické voltamogramy byly měřeny v rozsahu potenciálů od -1 V do +1 V s rychlostí skenu $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Vzorky byly měřeny v prostředí 0,1 M KCl. Bylo zjištěno, že tvar a poloha píků závisí na typu použité elektrody. Při použití C-SPE nebyl vidět žádný signál, u Pt-SPE a

Au-SPE se objevilo několik píků a elektroda modifikovaná pruskou modří ukazovala typickou redoxní odezvu. Vlastnosti, které byly pozorovány na voltamogramech, odráží reakce elektroaktivních sloučenin, které jsou v šafránu obsaženy. To lze vyložit tak, že voltametrické odpovědi elektrod jsou specifické pro každý typ šafránu a takovýto vzor lze považovat za charakteristický otisk prstu šafránu. Toto může být použito pro rozlišení různých vzorků šafránu s cílem kontroly kvality vzorků (Heidarbeigi, 2016).

1.3.7.2 Voltametrické techniky

Cílem studie autorů Armellini a kol. bylo sledování reakce mezi extrakty krocínu a šafránu s azoradikálovým iniciátorem 2,2'-azobis(2-methylpropionamidin)dihydrochloridu (AAPH) k charakterizaci antioxidační aktivity extraktu. Vzorky byly získány z Itálie a Španělska a byly po získání hermeticky uzavřeny, aby se zabránilo vystavení světlu. Vzorky byly smíchány se směsí methanol/acetonitril (50:50) a byla provedena jejich extrakce. K měření byla využita elektroda ze skelného uhlíku jako pracovní elektroda, platinový drát jako pomocná elektroda a stříbrná nevodná referentní elektroda. Antioxidační aktivita byla hodnocena na základě změny aktivity AAPH (Armellini, 2017).

Byla provedena cyklická voltametrie, kde probíhala oxidace krocínu ve dvou samostatných procesech. První za tvorby volných krocínových radikálů, následovaný druhým oxidačním procesem, kdy se krocínový radikál oxidoval na krocín. Následně byla provedena square wave voltametrie, kde bylo maximum píku krocínu pozorováno při potenciálech podobných jako u cyklické voltametrii. Proud píku byl zde lineárně závislý na koncentraci krocínu. Následně byla metoda square wave voltametrie aplikována na reálné vzorky, kde proud píku pouze slabě koreloval s koncentrací krocínu. Tato špatná korelace může být způsobena interferencí karotenoidů a retinoidů ve vzorku, které mají redoxní chování podobné krocínu a tím mohou přispívat k výsledné intenzitě signálu (Armellini, 2017).

Autoři Dar a kol. se věnovali antioxidační aktivitě krocínu za pomoci cyklické a diferenční pulzní voltametrie s použitím pastové elektrody modifikované vícečetnými uhlíkovými nanotrubičkami v acetátovém pufru. Zároveň byla měřena aktivita superoxidových radikálů na rtuťové kapkové elektrodě v 0,1 M KCl. Bylo prokázáno, že šafrán byl schopen vázat superoxidový aniont produkovaný elektrochemickou redukcí kyslíku (Dar, 2017).

1.3.7.3 Polarografické stanovení

Ahmad Dar a spoluautoři vyvinuli novou elektrochemickou metodu pro kvantifikaci krocínu ve vzorku šafránu. Krocín je polarograficky neaktivní, ale je schopen reagovat s cysteinem za

vzniku komplexu, který polarograficky aktivní je. Tato aktivita byla dokázána smícháním fixní koncentrace cysteinu a různých koncentrací krocínu. Byly zaznamenány polarogramy, kde se oproti polarogramům samotnému cysteinu posunul potenciál maxima cysteinu k negativnějším hodnotám a difuzní proud se snižoval s rostoucí koncentrací krocínu. Zároveň byla provedena i amperometrická titrace krocínu za pomoci cysteinu jako titrantu a 0,1 M NaCl jako základního elektrolytu. Bod ekvivalence v tomto případě ukazoval poměr krocínu ku cysteinu jako 1:2. Tato metoda byla aplikována taktéž na reálné vzorky z oblasti Kašmíru, kdy byla určena koncentrace krocínu v šafránu jako 2,13 %, což je v dobré shodě s HPLC analýzou (Ahmad Dar, 2012).

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité chemikálie

Látka	Výrobce
Acetonitril	Supelco
Krocin	Sigma-Aldrich Co.
Dihydrogenfosforečnan sodný	PENTA s.r.o.
Dimethylsulfoxid	Mallinckrodt SpectrAR
Ethanol (96% p.a.)	Lach-Ner, s.r.o.
Hydrogenfosforečnan sodný	J.T.Baker
Hydroxid sodný	J.T.Baker
Chlorid draselný	Chemapol
Chlorid lithný	Roth
Chloristan lithný	Sigma-Aldrich Co.
Kyselina boritá	CHEMAPOL GROUP, a.s.
Kyselina fosforečná (85% p.a.)	PENTA s.r.o.
Kyselina chlorovodíková (32% p.a.)	Fluka
Kyselina octová (99% p.a.)	Lach-Ner s.r.o.
Kyselina sírová	J.T.Baker
Methanol	Honeywell
N,N-Dimethylformamid	PENTA s.r.o.
Octan sodný	Lach-Ner s.r.o.
Safranal (≥ 90 %)	Sigma-Aldrich Co.,

2.2 Použitá zařízení

Přístroje	Výrobce
Elektrochemický analyzátor PGSTAT30	AUTOLAB EcoChemie
pH metr InoLab pH 720	WTW
Elektrody	Výrobce
pH elektroda SenTix 81 (A103114034)	WTW
Ag/AgCl referenční elektroda (6.0726.100)	Metrohm
Elektroda ze skelného uhlíku (6.1204.300 GC) s držákem (6.1241.060)	Metrohm
Platinová elektroda OP-600	Radelkis
Uhlíková tištěná elektroda modifikovaná MWCNTs-COOH, průměr 4 mm (110CNT)	Metrohm
Tištěný senzor s borem dopovanou diamantovou elektrodou, průměr 3 mm	Slovenská technická univerzita v Bratislavě



Obrázek 6 Tištěný senzor s borem dopovanou diamantovou elektrodou (nahore), uhlíková tištěná elektroda s nanotrubičkami (dole)

2.3 Příprava standardů a základních elektrolytů

2.3.1 Příprava zásobních roztoků safranalů a krocínu

Zásobní roztok krocínu byl připraven rozpuštěním 0,0974 g krocínu v 10 ml Brittonova-Robinsonova (B-R) pufru o pH 7, jehož příprava je popsána níže. Safranal byl připraven rozpuštěním 0,0150 g safranalů v 10 ml organického rozpouštědla (acetonitril, ethanol, methanol). Zásobní roztoky byly namíchané koncentrací 0,01 mol l⁻¹.

2.3.2 Příprava pufrů

B-R pufr byl připraven odměřením a navážením 2,71 ml H₃PO₄, 2,52 ml CH₃COOH a 2,74 g H₃BO₄. Tyto chemikálie byly rozpuštěny v jednom litru redestilované vody a následně bylo upraveno pH na požadovanou hodnotu (pH 2–11) za pomoci peciček NaOH. Přesná hodnota byla zjištěna pH měrnou kalibrovanou elektrodou.

Octanový pufr byl připraven rozpuštěním 0,8203 g octanu sodného společně s 0,57 ml kyseliny octové v redestilované vodě a doplněn do 100 ml odměrné baňky po rysku.

Fosfátový pufr o pH 7 byl připraven za pomoci dvou odměrných roztoků. Na první roztok bylo naváženo 3,5 g Na₂HPO₄·2H₂O v redestilované vodě do 100 ml odměrné baňky, na druhý bylo naváženo 2,7 g NaH₂PO₄·H₂O v redestilované vodě do 100 ml odměrné baňky. Následně byly roztoky doplněny po rysku a smíchány v poměru 30,5:19,5 Na₂HPO₄·2H₂O ku NaH₂PO₄·H₂O.

Kyselina chlorovodíková o koncentraci 0,1 M byla připravena pipetováním 0,98 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové a roztok byl doplněn po rysku 100 ml odměrné baňky redestilované vody.

Chlorid draselný o koncentraci 0,1 M byl připraven rozpuštěním 0,7455 g chloridu draselného v redestilované vodě a roztok doplněn po rysku 100 ml odměrné baňky.

Kyselina sírová o koncentraci 0,5 M byla připravena pipetováním 2,66 ml koncentrované kyseliny sírové a roztok doplněn po rysku 100 ml odměrné baňky redestilovanou vodou.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem diplomové práce bylo studovat elektrochemické vlastnosti safranalů a krocínů, tedy látek, které jsou obsaženy v šafránu, za pomoci různých elektrochemických technik, jako je např. cyklická voltametrie, diferenční pulzní nebo square wave voltametrie. Dále bylo úkolem stanovit optimální pracovní podmínky pro elektrochemickou analýzu krocínů a safranalů, které zahrnovaly výběr elektrody, pH základního elektrolytu a parametry pulzních voltametričeských technik. Při měření se používaly tři typy elektrod, a to tištěná uhlíková elektroda modifikovaná uhlíkovými nanotrubičkami s karboxylovými skupinami (SPCE), tištěný senzor s borem dopovanou diamantovou elektrodou (BDD) a jako poslední byla elektroda ze skelného uhlíku (GCE). U tištěného senzoru s modifikovanou uhlíkovou elektrodou byla uhlíková pomocná elektroda a stříbrná pseudoreferenční elektroda. U BDD senzoru byla pomocná elektroda z borem dopovaného diamantu a také chloridostříbrná referenční elektroda. Pro měření s GCE byly připojeny platinová pomocná a chloridostříbrná referenční elektroda s testovaným organickým roztokem s přídavkem 0,1 M LiClO₄ nebo LiCl.

V diplomové práci byly sledovány jak oxidační procesy látek, tak i redukční. Ty ale pouze u cyklické voltametrie v prostředí Brittonova-Robinsonova (B-R) pufru po odstranění kyslíku vyubílaváním plynným argonem. Ve voltamogramech při negativních potenciálech ale nebyly pozorovány žádné významné signály studovaných látek, a proto nejsou v diplomové práci uvedeny pro větší přehlednost všechny, pouze příklady pro každou elektrodu.

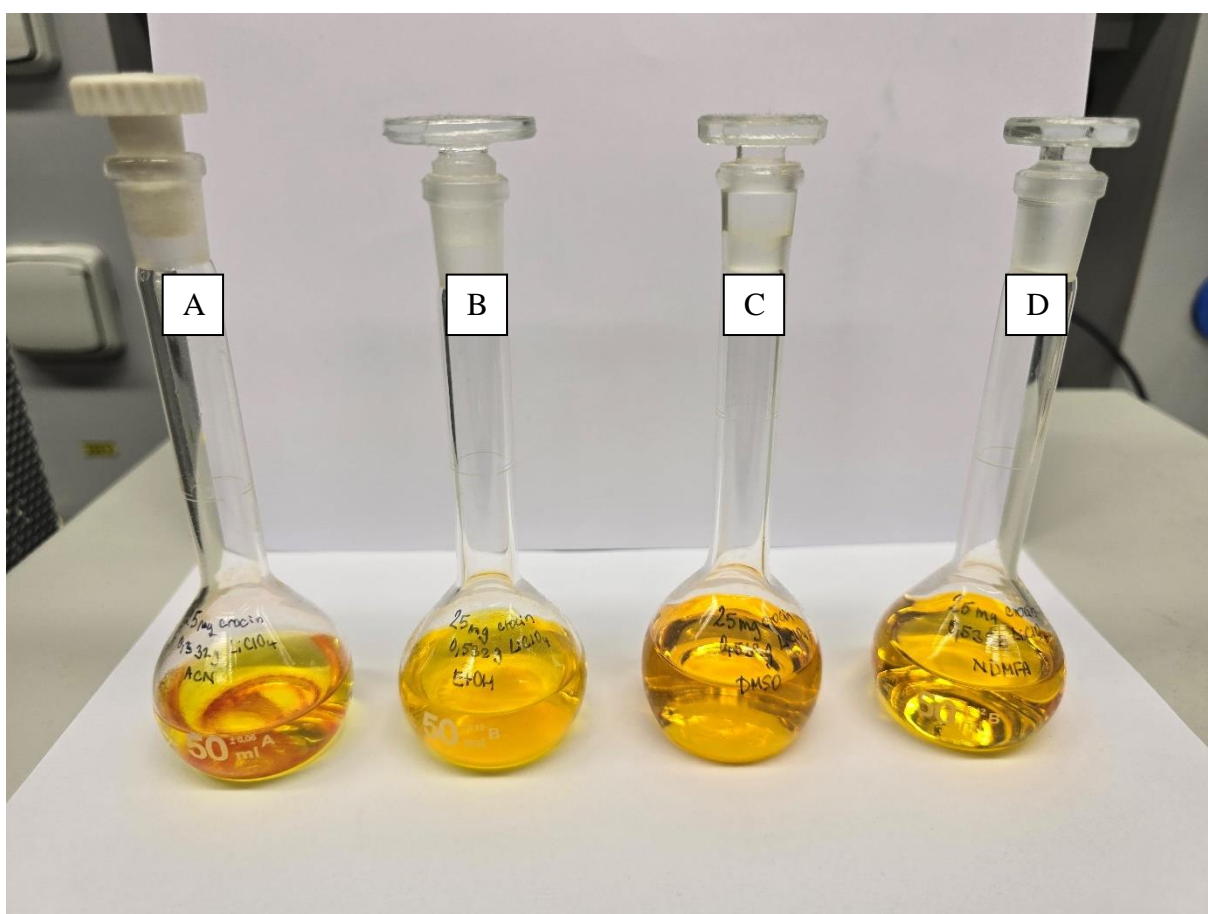
3.1 Rozpustnost krocínů a safranalů ve vodném a nevodném prostředí

Byla zjišťována rozpustnost krocínů a safranalů tak, že se k 10 ml testovaného rozpouštědla přidalo 5 mg zkoumané látky (koncentrace 0,5 mol l⁻¹ krocínů a 3,3 mol l⁻¹ safranalů). U demineralizované vody se po protřepání s malým množstvím krocínů roztok vyčehil a nebyly pozorovány žádné krystalky, které by představovaly nerozpouštěný krocín. Z toho bylo usouzeno, že je krocín velmi dobře rozpustný ve vodném prostředí. Naopak po přídavku safranalů se roztok zakalil, což značí, že je jeho rozpustnost ve vodě nízká.

Obdobným způsobem byla následně testována také organická rozpouštědla. Nejprve byl rozpouštěn krocín v acetonitrilu, kde se ukázalo, že je téměř nerozpustný. I po 30 minutách v ultrazvuku se roztok pouze lehce zabarvil do žluta, přičemž na dně byly stále patrné jeho krystalky. V methanolu a ethanolu byla jeho rozpustnost o poznání lepší, ale ne dokonalá. Roztok měl sytější odstín žluté, než tomu bylo u acetonitrilu, ale i tak byly patrné krystalky na dně

testovací nádoby. Testován byl i dimethylsulfoxid a dimethylformamid, ve kterých byl krocín dokonale rozpustný. Roztoky byly ponechány několik dnů volně stát při laboratorní teplotě a ukázalo se, že se roztoky acetonitrilu, methanolu i ethanolu staly o poznání sytější, ale i tak v nich byly stále vidět nerozpuštěné krystalky krocínu.

Rozpustnost safranalů byla ověřována obdobným způsobem se zjištěním, že je rozpustný v acetonitrilu, methanolu, ethanolu, dimethylsulfoxidu i dimethylformamidu. Roztoky těchto rozpouštědel byly krystalově čiré na rozdíl od zakaleného roztoku v destilované vodě. Dodatečně byl tedy testován poměr demineralizované vody a methanolu, ve kterém je safranal rozpustný a byl zjištěn minimální poměr 1:1.



Obrázek 7 Rozpustnost krocínu v acetonitrilu (odměrná baňka A), ethanolu (odměrná baňka B), dimethylsulfoxidu (odměrná baňka C) a dimethylformamid (odměrná baňka D).

Elektrochemické chování krocínu a safranalů bylo testováno ve vodném prostředí Brittonova-Robinsonova pufru v rozmezí pH 2–11, 0,1 M kyselině sírové, 0,1 M fosfátovém pufru o pH 7, 0,1 M octanovém pufru, 0,1 M kyselině chlorovodíkové, 0,1 M chloridu draselném a směsném roztoku kyseliny chlorovodíkové a chloridu draselného v poměru 1:9. U safranalů byl

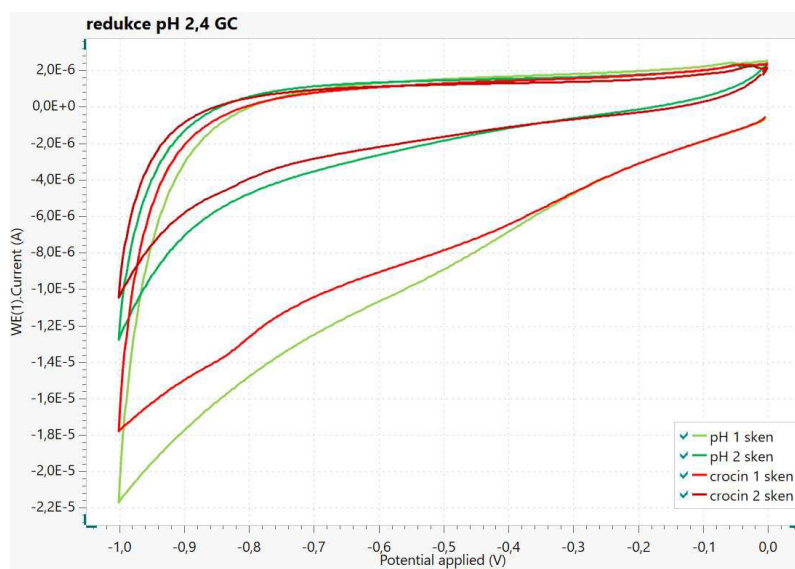
vždy testován daný roztok společně s methanolem v poměru 1:1 z důvodu nízké rozpustnosti ve vodném prostředí.

3.2 Elektrochemická detekce v Brittonových-Robinsonových pufrch

3.2.1 Cyklická voltametrie krocinu

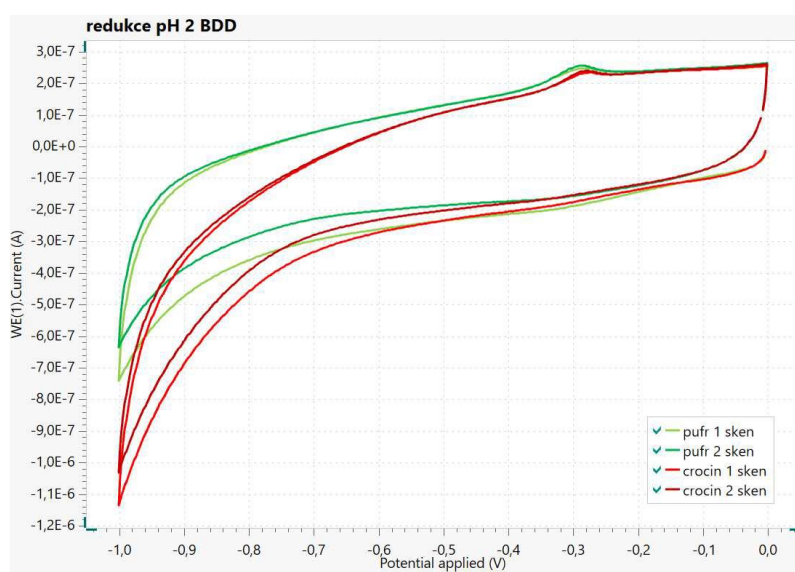
Jako první bylo sledováno elektrochemické chování krocinu za využití metody cyklické voltametrie. Pro měření v negativní části potenciálového okna byl nastaven rozsah 0 V až -1 V, pro měření v pozitivní části pak $-0,2$ V až $+1,5$ V. Pozadí pro měření představoval B-R pufr v rozsahu pH 2 až 11. S využitím každé ze tří testovaných elektrod (GCE, BDD, SPCE) byly měřeny dva skeny pozadí, kde první představuje světle zelený voltamogram, druhý sken pozadí tmavě zelený voltamogram. Následně byl do roztoku přidán přírůstek standardu krocinu tak, aby se v měřeném roztoku nacházela jeho koncentrace $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$. První sken tohoto měřeného roztoku je zobrazen červenou barvou a druhý sken barvou rudou.

Na obrázku č. 8 můžeme vidět příklad voltamogramu v negativní části potenciálového okna, který byl naměřen za pomoci GCE elektrody. U prvního skenu B-R pufru je viditelné vyšší pozadí až $-20 \mu\text{A}$. U druhého skenu došlo k velkému poklesu pozadí na $-12 \mu\text{A}$. Po přidání krocinu je vidět malý pík u potenciálu $-0,8$ V, u kterého ale nelze bezpečně určit, zda jde o krocín, či o nečistotu. Pík je pozorovatelný i u druhého skenu.



Obrázek 8 Cyklické voltamogramy B-R pufru o pH 2,4 (zelené křivky) a přidavku $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ krocinu (červené křivky) na GCE.

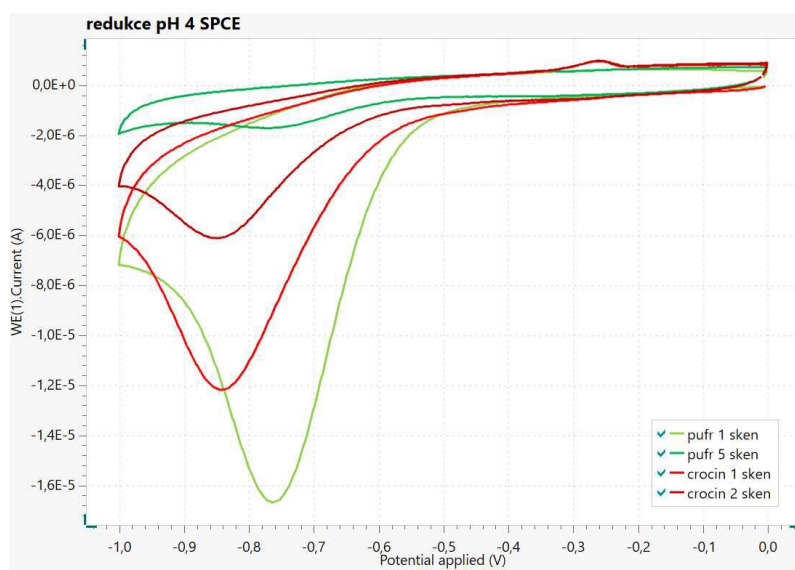
Na obrázku č. 9 jsou zobrazeny voltamogramy za podobných podmínek naměřené pomocí BDD, kde jsou patrné minimálně o řád nižší proudy pozadí, než je tomu u GCE elektrody. První i druhý sken jsou na rozdíl od GCE elektrody téměř totožné. Předpokládá se, že velká proudová změna po prvním skenu u GCE je asi způsobena redukcí kyslíku adsorbovaného na povrchu elektrody, který se adsorbuje méně na BDD. Po přidání krocínu dochází v porovnání se skenem pozadí pouze k mírnému nárůstu proudů při negativních potenciálech, ale bez viditelného signálu.



Obrázek 9 Cyklické voltamogramy B-R pufru o pH 2 (zelené křivky) a přidavku $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ krocínu (červené křivky) na BDD.

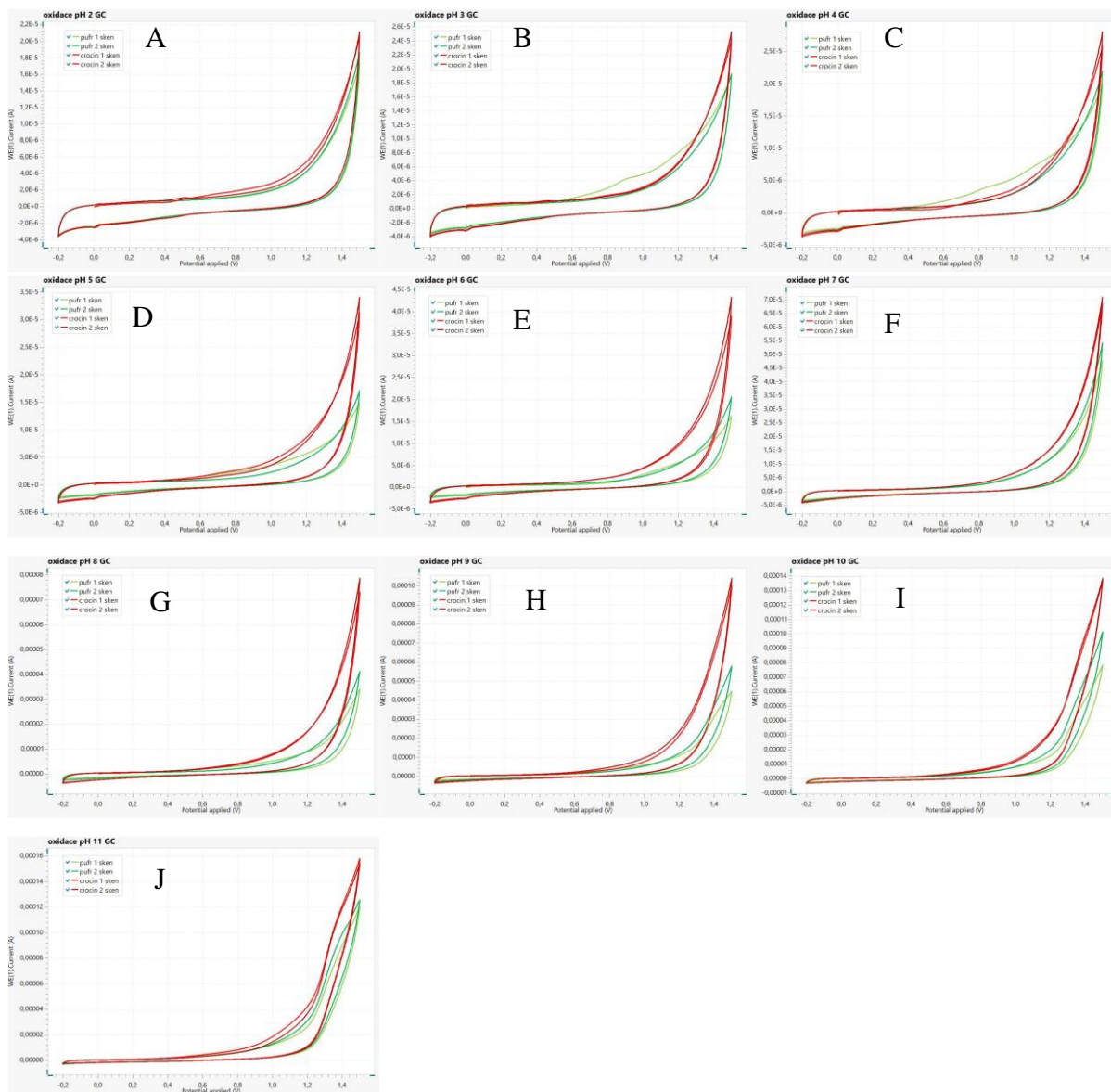
Na obrázku č. 10 je příklad cyklických voltamogramů v negativní oblasti naměřených na SPCE elektrodě při pH 4. Na voltamogramu pozadí B-R pufru je patrný intenzivní proudový signál, který má potenciál přibližně $-0,75 \text{ V}$. S dalším skenem následně signál poklesl a stejný průběh je viditelný v následných skenech po přidání krocínu. Možné vysvětlení může být to, že ačkoli byl pufr vyhublán argonem, elektroda byla do měřeného roztoku vložena až dodatečně. SPCE elektrody jsou modifikovány uhlíkovými nanotrubičkami, které mají navázanou karboxylovou skupinu. Tato modifikace má zřejmě za následek velkou adsorpci kyslíku na povrch elektrody a jeho následné přenesení do měřeného roztoku. Toto vysvětlení podporuje i fakt, že je při druhém skenu jsou proudy daleko menší. Po přidání krocínu dojde k posunutí maxima k zápornějším potenciálům, které se pak pohybuje v závislosti na pH. V kyselějším pH do zápornějších potenciálů vůči signálu pozadí, v neutrálním pH se signál vyrovnává potenciálu pozadí a v zásaditěm přechází do kladnějších hodnot potenciálu v porovnání se signálem pozadí. V rozmezí

pH 3 až pH 8 je viditelný taktéž signál u potenciálu $-0,3$ V, který ale není vidět u skenů pozadí. Tento signál se objevuje pouze na tištěné elektrodě a pouze v tomto rozmezí pH.



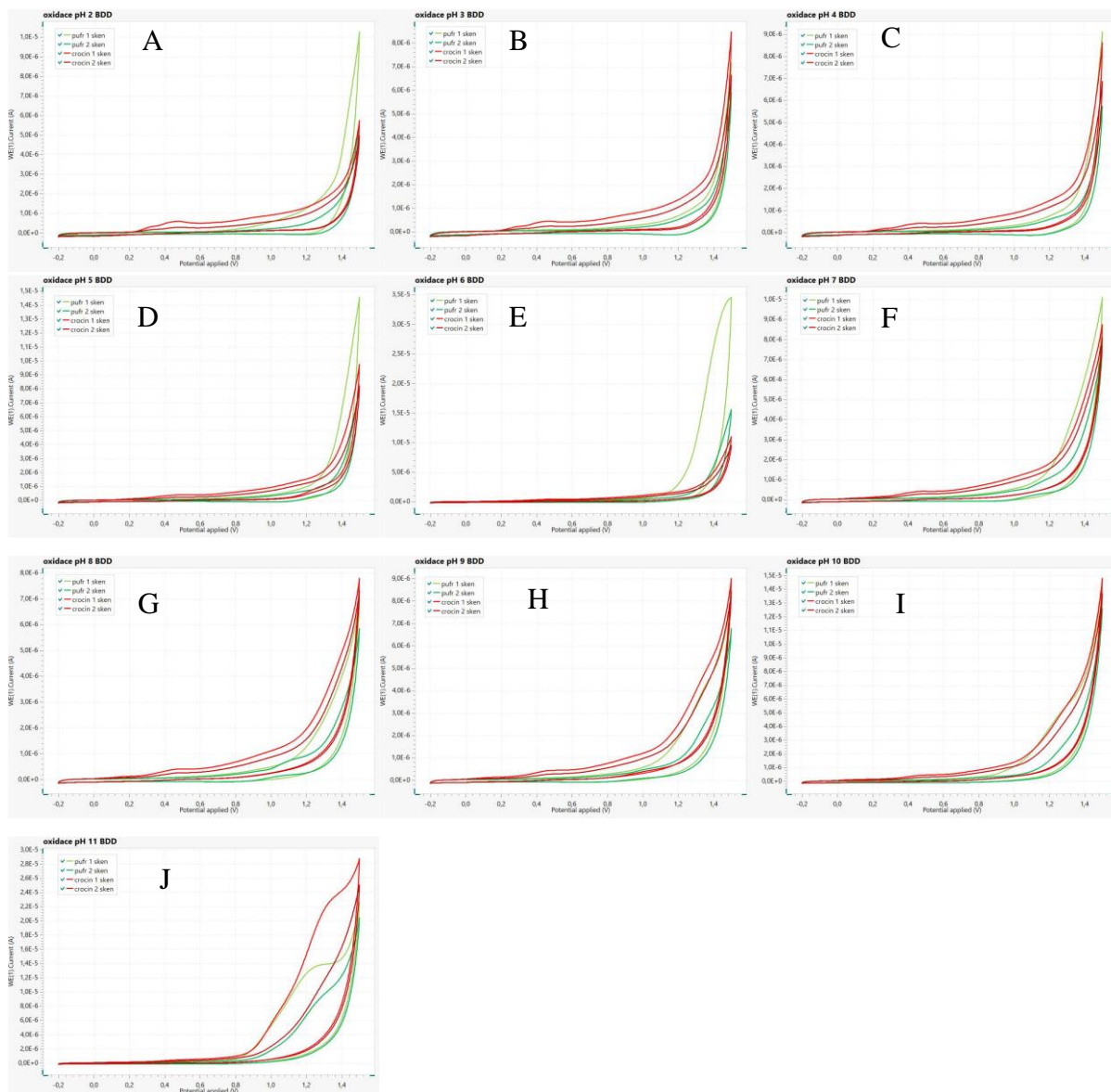
Obrázek 10 Cyklické voltamogramy B-R pufru o pH 4 (zelené křivky) a přidavku $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ krocinu (červené křivky) na SPCE.

Obrázek č. 11 zobrazuje sadu cyklických voltamogramů oxidace, které jsou měřené v rozsahu pH 2–11 v prostředí B-R pufru za pomoci GCE elektrody. Voltamogramy A–F dosahují nižších proudů, než je tomu u voltamogramů G–J. Na rozdíl od předchozích měření v negativnějších potenciálech jsou průběhy prvních skenů pozadí podobné jako u druhých. Po následném přidání krocinu se voltamogramy téměř nezměnily kromě strmějších náběhů při vyšších potenciálech. Na žádném voltamogramu ale není pozorováno zvýšení signálu kromě voltamogramů A a B, u kterých ale následný signál klesá s druhým skenem.



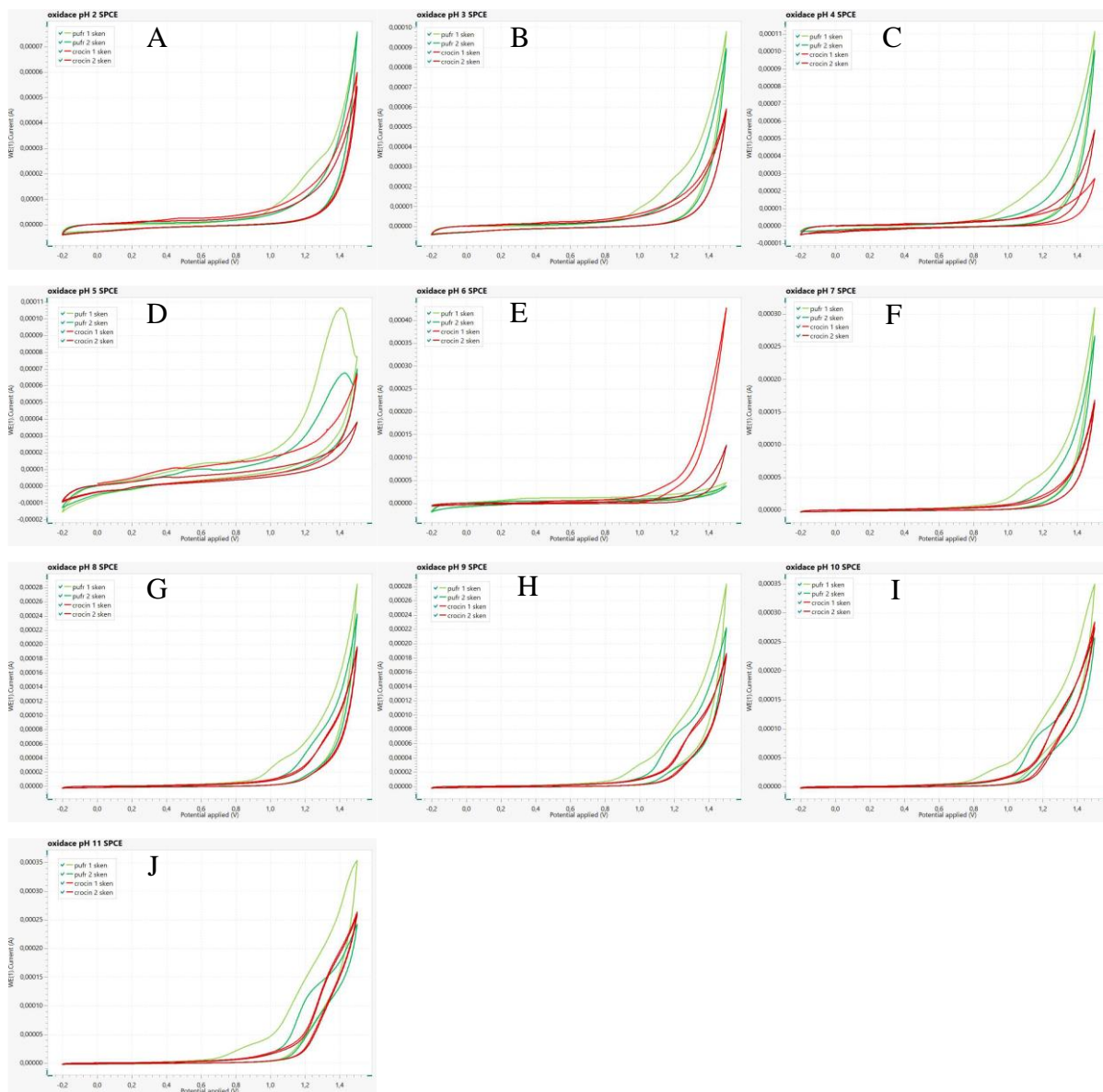
Obrázek 11 Cyklické voltamogramy v prostředí B-R pufrů o pH 2–11 (A–J, zelené křivky) a přidavku $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ krocinu (červené křivky) na GCE.

Obrázek č. 12 zobrazuje sadu oxidačních voltamogramů, které jsou měřené v rozsahu pH 2–11 v prostředí B-R pufru na BDD elektrodě. Voltamogramy se všechny pohybují v podobném proudovém rozsahu, intenzity jsou opět menší než u GCE. Po přidání krocinu se na voltamogramech objevuje viditelný signál při potenciálu 0,5 V, který se na skenech pozadí neprojevuje. Mohl by to tedy pravděpodobně být signál krocinu. Na skenech G–J se taktéž projevuje signál, který vzrůstá s vyšším pH. Tento signál se ale objevuje i v samotném pozadí.



Obrázek 12 Cyklické voltamogramy v prostředí B-R pufrů o pH 2–11 (A–J, zelené křivky) a přidavku $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ krocinu (červené křivky) na BDD.

Obrázek č. 13 zobrazuje sadu cyklických voltamogramů oxidace, které jsou měřené v rozsahu pH 2–11 v prostředí B-R pufru pomocí SPCE elektrody. Všechny voltamogramy dosahují vysokých hodnot proudů. První skeny pozadí dosahují nejvyšších hodnot proudů. Proud následně při opakovaném skenu klesá. Zároveň se zde objevuje signál pozadí, který se nachází v potenciálovém rozmezí +0,9 V až +1,1 V v závislosti na pH. Tento signál na obrázcích A, E, H, I, J se s dalším skenem pohybuje ke kladnějšímu potenciálu. Po přidání krocinu se skeny téměř nemění kromě toho, že klesl jejich proud. V zásaditém prostředí (skeny G–J) se objevuje signál při potenciálu +1,1 V, který se rostoucím pH posouvá do kladnějších potenciálů. Je viditelný jak na skenech pozadí, tak i na skenech krocinu.



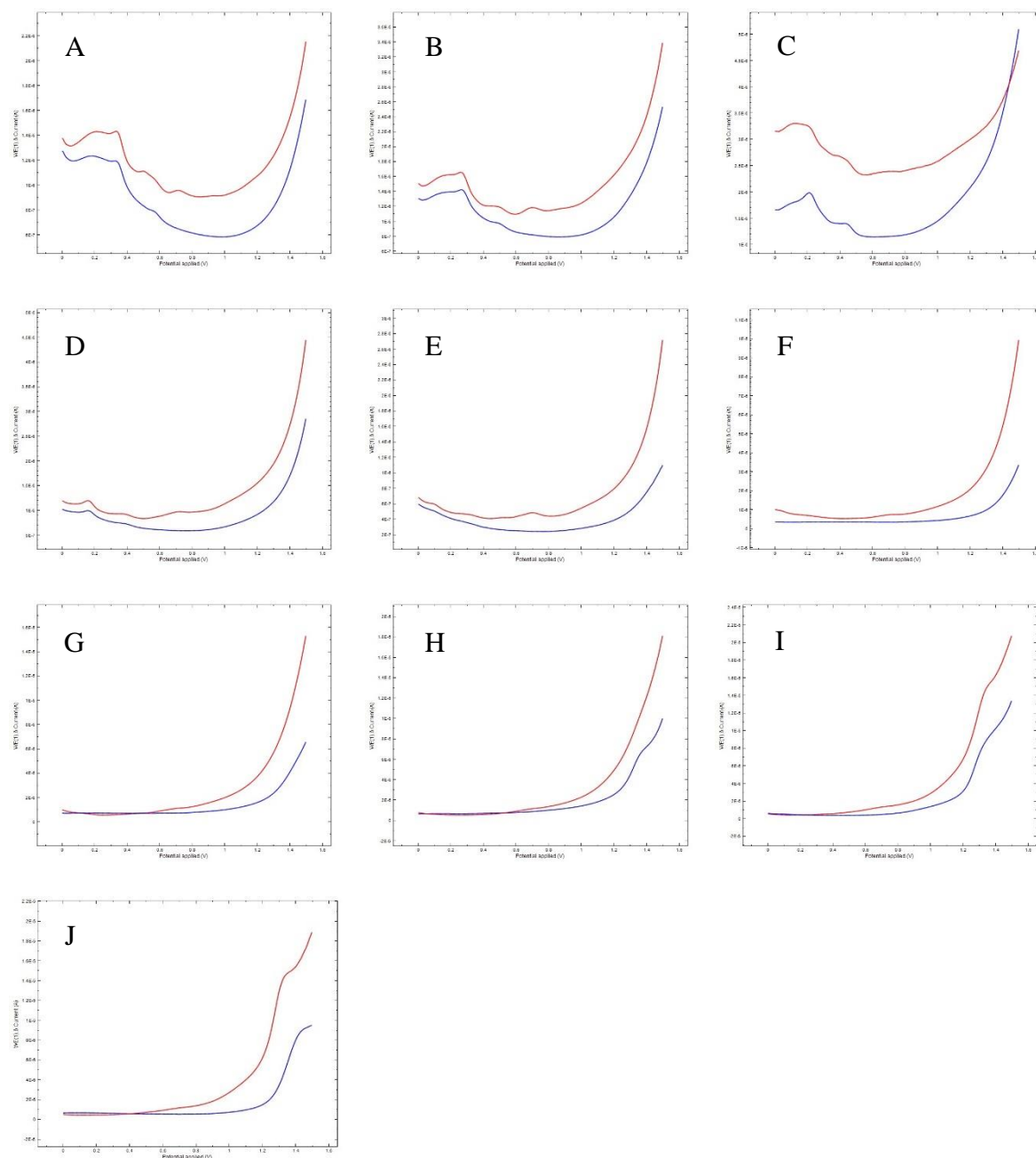
Obrázek 13 Cyklické voltamogramy v prostředí B-R pufrů o pH 2–11 (A–J, zelené křivky) a přídavku 0,1 mmol l⁻¹ krocínu (červené křivky) na BDD.

3.2.2 Diferenční pulzní voltametrie krocínu

Elektrochemické chování krocínu bylo dále ověřováno pomocí diferenční pulzní voltametrie. Měření bylo prováděno v potenciálovém rozsahu 0 V až +1,5 V. Pozadí pro měření představoval Brittonův-Robinsonův pufr v rozsahu pH 2 až 11. Na třech testovaných elektrodách byl vždy měřen jeden sken pozadí o různém pH (modrý voltamogram) následovaný měřením přídavku krocínu o koncentraci 0,1 mmol l⁻¹ (červený voltamogram).

Obrázek č. 14 zobrazuje diferenční pulzní voltamogramy, které byly měřené v daném rozsahu pH v prostředí B-R pufru na GCE elektrodě. V kyselém pH (A–G) byly zjištěny nepravidelné intenzivní signály v potenciálovém rozmezí 0 V až 1 V. Byly provedeny další experimenty,

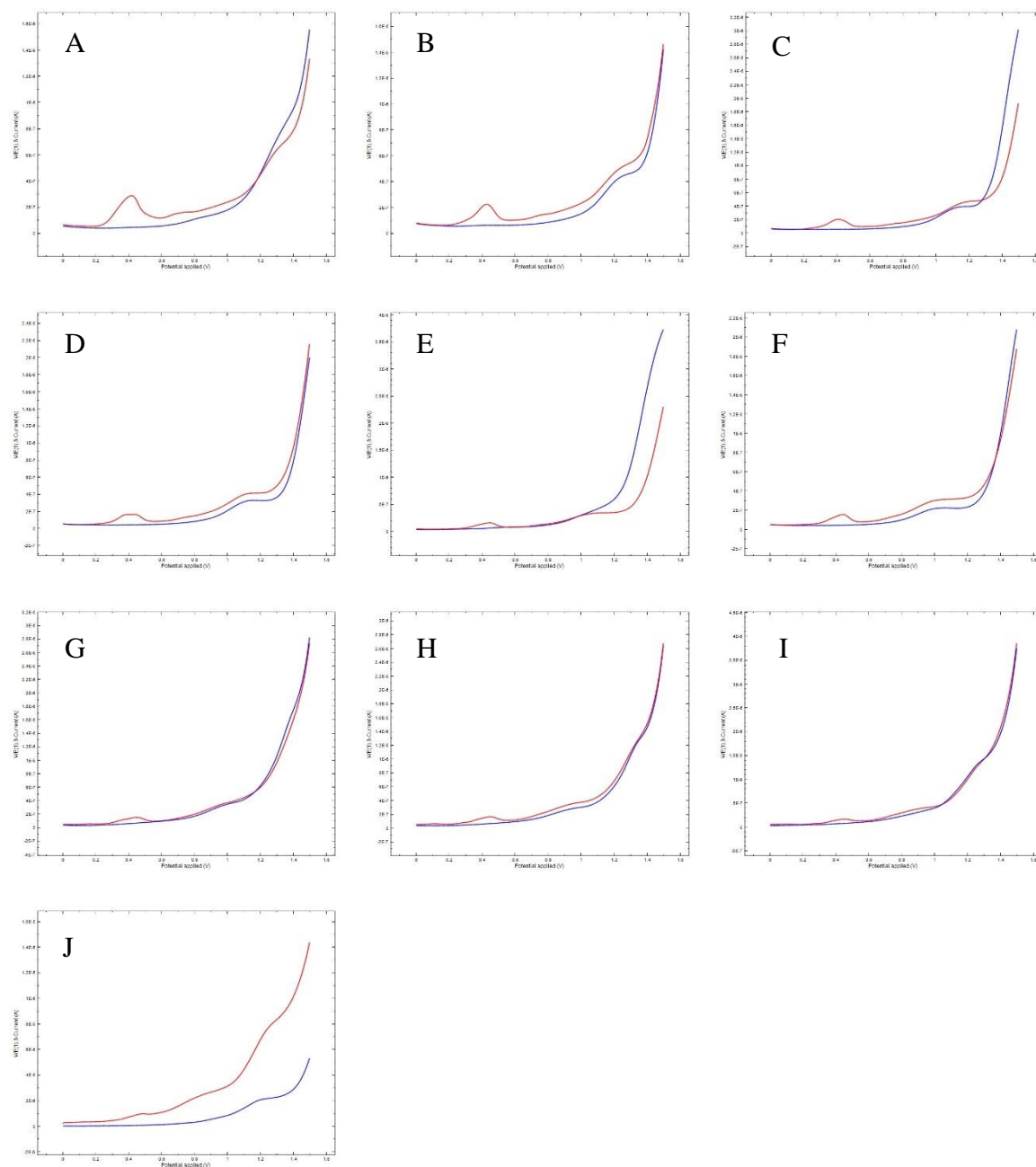
včetně přídavků krocinu, avšak interferující signály pozadí se nepodařilo vysvětlit. Jedním z možných vysvětlení je kontaminace zásobních láhví činidel, použitých pro přípravu B-R pufru. Tyto signály v neutrálním prostředí (E–G) mizí a je zároveň vidět pík, který se objevuje pouze po přidání krocinu. V zásaditém prostředí (H–J) tento signál mizí a objevují se signály při kladnějších potenciálech i při měření samotného pufru.



Obrázek 14 DPV voltamogramy v prostředí B-R pufru o pH 2–11 (A–J, modré křivky) a přídavku 0,1 mmol l⁻¹ krocinu (červené křivky) na GCE.

Obrázek č. 15 zobrazuje sérii diferenčních pulzních voltamogramů, které byly měřeny v rozsahu pH 2–11 v prostředí B-R pufru na BDD elektrodě. Po přidání krocinu se na

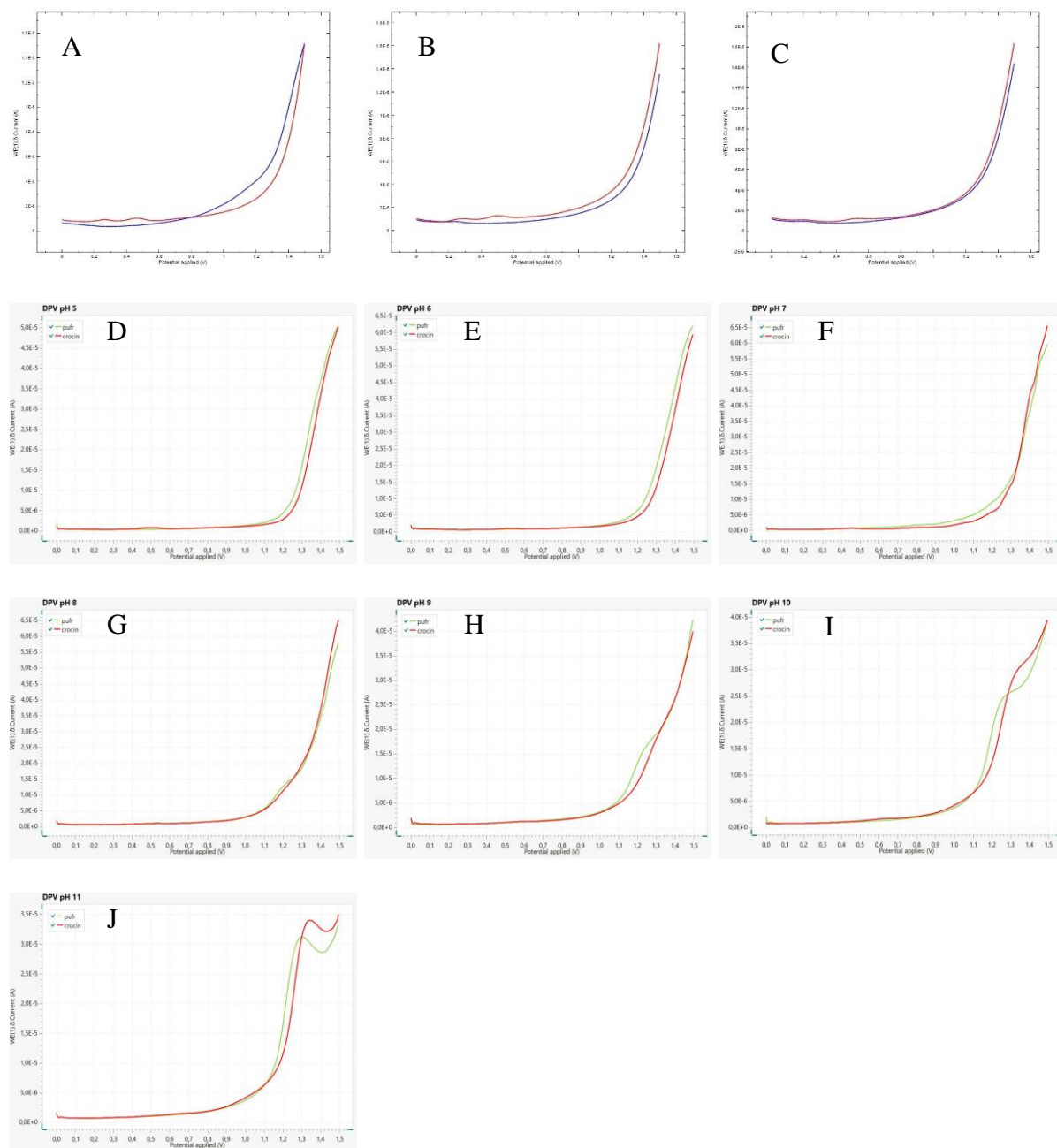
voltamogramech objevuje signál při potenciálu 0,4 V, který se na skenech pozadí nenachází. Po vyhodnocení výšek píku bylo zjištěno, že je tento signál nejvyšší při pH 2 (voltamogram A) a následně výška píku klesá se zvyšujícím se pH prostředí. Potenciál maxima se zároveň téměř neposouvá, což znamená, že oxidace tohoto signálu není závislá na pH. Signál tak je vyhodnocen jako pravděpodobný pík krocínu.



Obrázek 15 DPV voltamogramy v prostředí B-R pufru o pH 2–11 (A–J, modré křivky) a přidavku 0,1 mmol l⁻¹ krocínu (červené křivky) na BDD.

Obrázek č. 16 zobrazuje diferenční pulzní voltamogramy měřené v daném rozsahu pH v prostředí B-R pufru za pomoci SPCE elektrody. Na voltamogramech A–D jsou vidět po přidání

krocinu dva signály při potenciálu +0,3 V a +0,5 V, které nejsou na skenu pozadí přítomny. Tyto signály v neutrálním pH mizí. V zásaditějším pH (voltamogramy G–J) se objevují signály pozadí, které se taktéž objevují i po přidání krocinu. Čím více zásaditý je roztok, tím se signály posouvají k pozitivnějším potenciálům. V zásaditém pH se tedy u píku při +1,2 V nejedná o krocin, protože se objevuje i u pozadí.

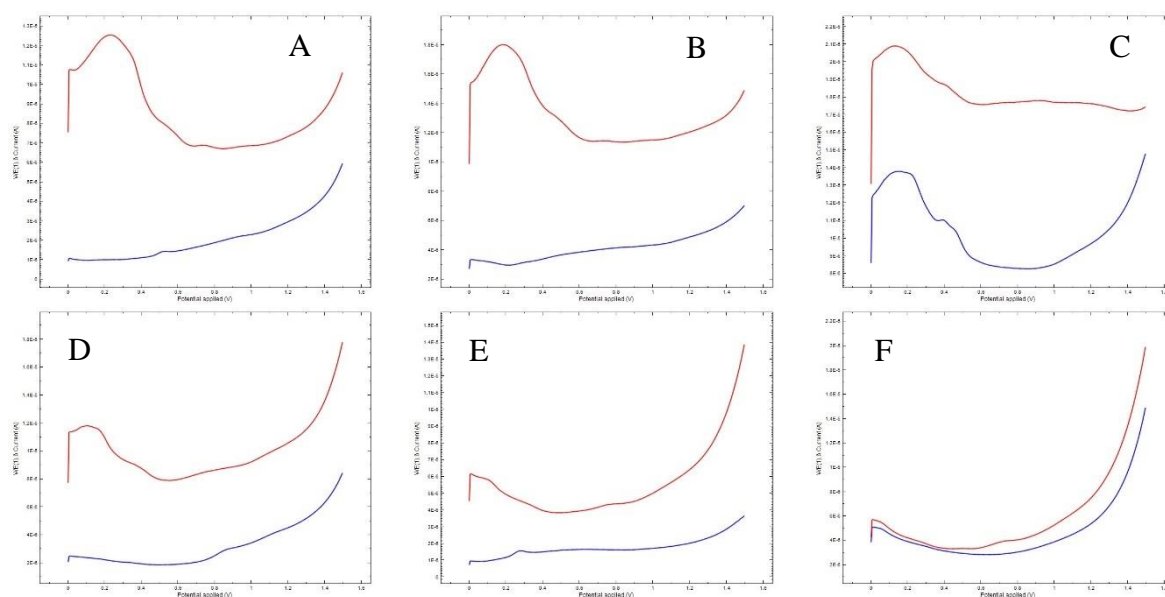


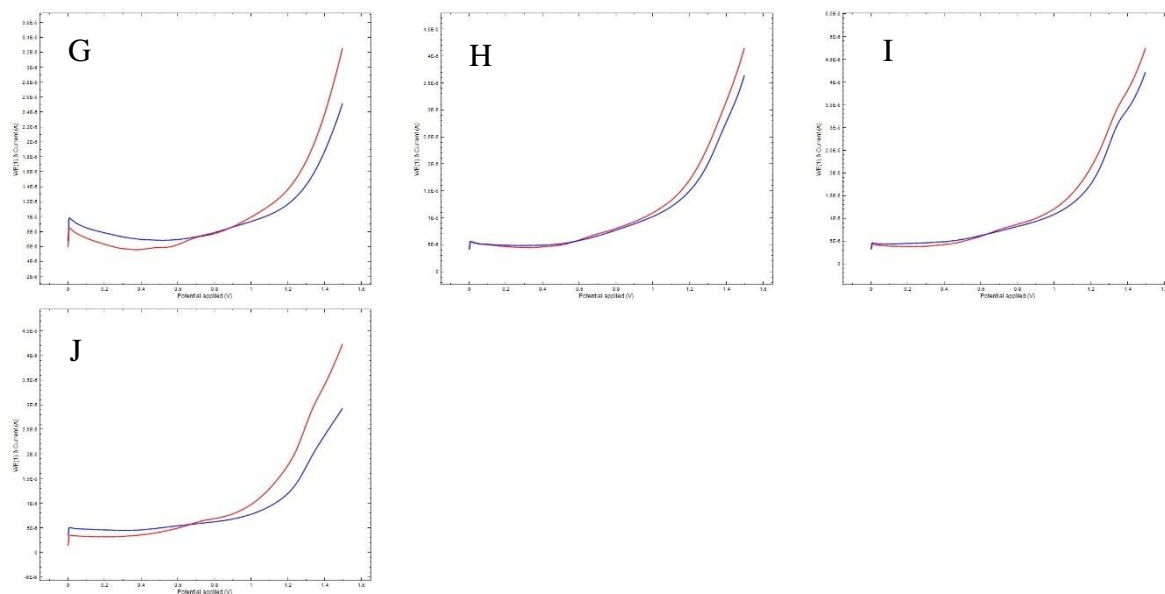
Obrázek 16 DPV voltamogramy v prostředí B-R pufru o pH 2–11 (A–J, modré a zelené křivky) a přidavku 0,1 mmol l⁻¹ krocinu (červené křivky) na SPCE.

3.2.3 Square wave voltametrie krocinu

Pro sérii měření square wave voltametrií byl nastaven potenciálový rozsah 0 V až +1,5 V. Pozadí pro měření představoval Brittonův-Robinsonův pufr v rozsahu pH 2 až 11. Byl měřen jeden sken pozadí o různém pH (modrý voltamogram), následovaný měřením přídávku krocinu o koncentraci $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ (červený voltamogram).

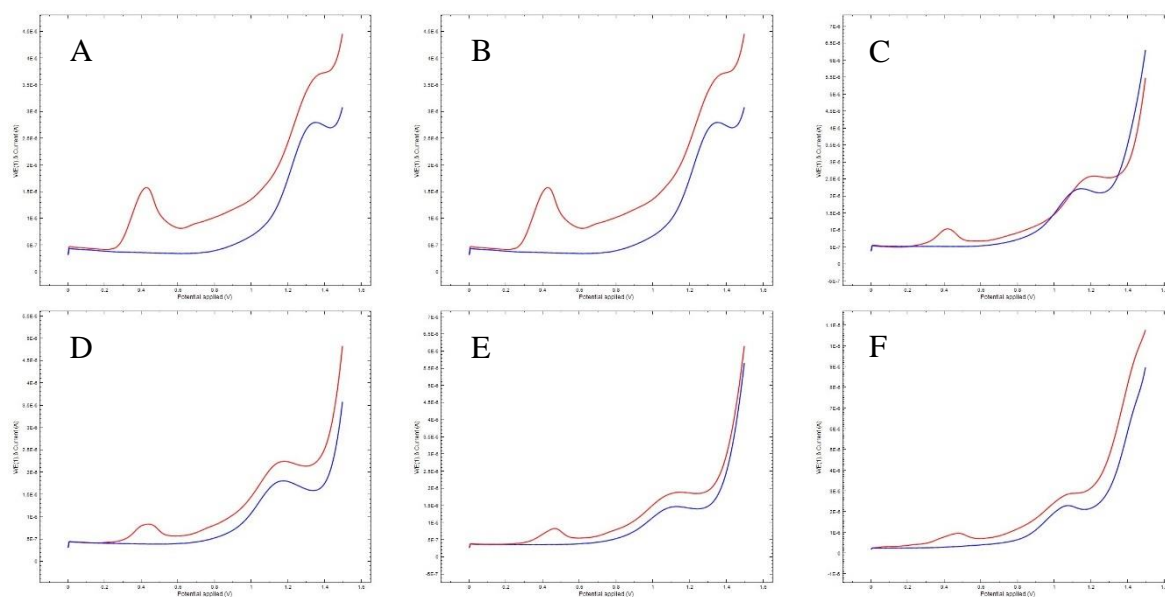
Obrázek č. 17 zobrazuje square wave voltamogramy měřené v daném rozsahu pH v prostředí B-R pufru za pomoci GCE elektrody. Voltamogramy se pohybují v podobném proudovém rozsahu. V kyselém pH (A–E) se podobně jako u DPV objevují po přidávku krocinu intenzivní proudové signály v potenciálovém rozmezí 0 V až 1 V. Byly provedeny další experimenty, nepodařilo se však objasnit takto atypický průběh voltamogramů. Tyto signály v neutrálním prostředí (F–G) mizí a zároveň jsou vidět dva píky při potenciálech +0,5 V a +0,7 V, které se objevují pouze po přidání krocinu. V zásaditém prostředí (voltamogramy H–J) se nenachází žádné rozdílné signály mezi skenem pufru a přídávkem krocinu.

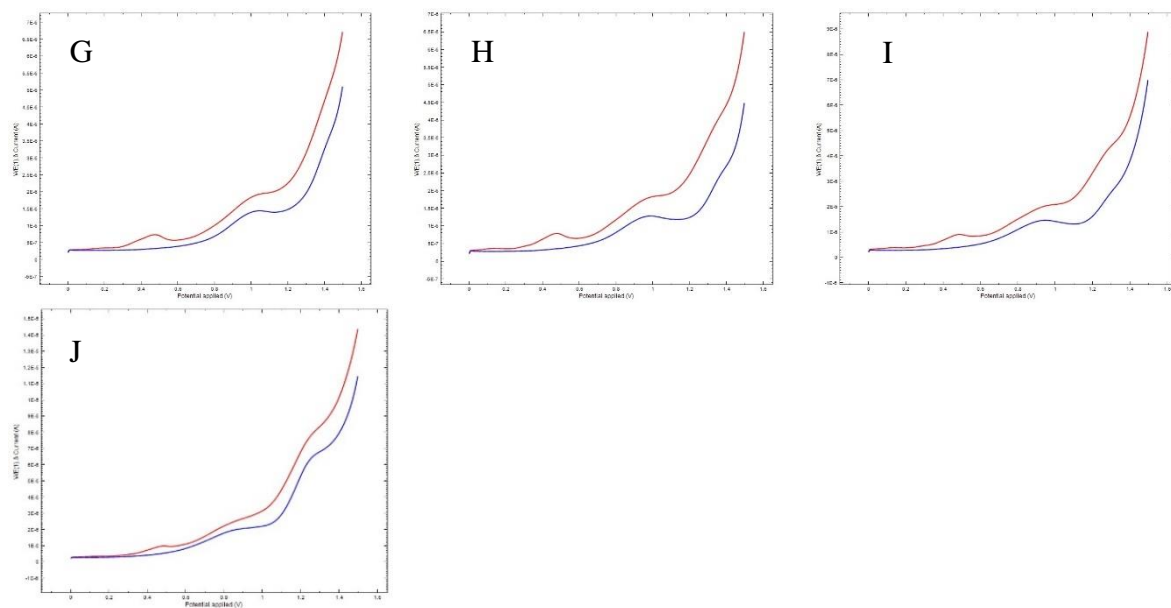




Obrázek 17 SWV voltamogramy v prostředí B-R pufru o pH 2–11 (A-J, modré křivky) a přidavku 0,1 mmol l⁻¹ krocínu (červené křivky) na GCE.

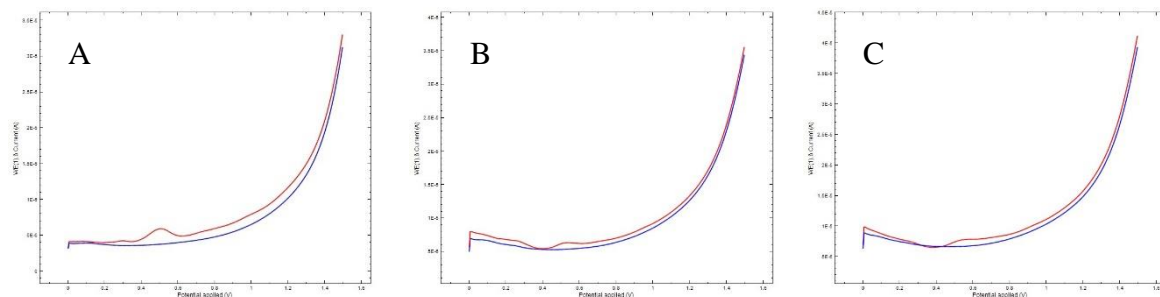
Obrázek č. 18 zobrazuje sérii square wave voltamogramů, které jsou měřeny v daném rozsahu pH v prostředí B-R pufru na BDD elektrodě. Hodnoty dosažených proudů jsou podobné u všech voltamogramů. Po přidání krocínu se na voltamogramech objevuje intenzivní signál při potenciálu 0,4 V, který na skenech pozadí není viditelný. Po vyhodnocení výšek píku bylo zjištěno, že nejvyšší výška píku je při pH 2 (voltamogram A) a ta následně klesá se zvyšující se hodnotou pH měřeného roztoku. Signál se zároveň neposouvá nebo jen minimálně, což znamená, že oxidace není závislá na pH.

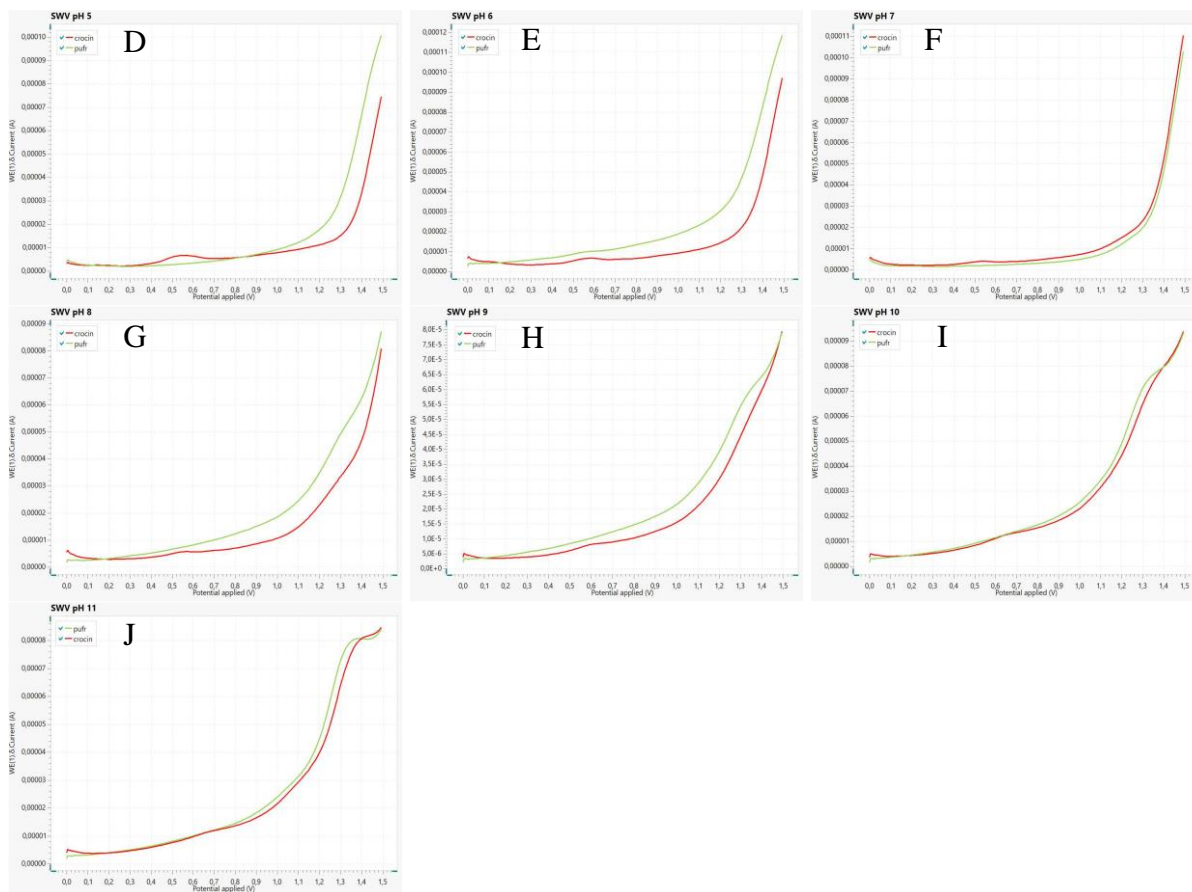




Obrázek 18 SWV voltamogramy v prostředí B-R pufru o pH 2–11 (A-J, modré křivky) a přidavku $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ krocinu (červené křivky) na BDD.

Obrázek č. 19 zobrazuje sérii square wave voltamogramů, které jsou měřené v daném rozsahu pH v prostředí B-R pufru za pomoci SPCE elektrody. Na voltamogramech je vidět po přidání krocinu pík při potenciálu $+0,5 \text{ V}$, který není patrný na skenu pozadí. Od voltamogramu G začíná objevovat další signál, který je ale viditelný i na pozadí. Nejde tedy o krocin, ale o signál pozadí.





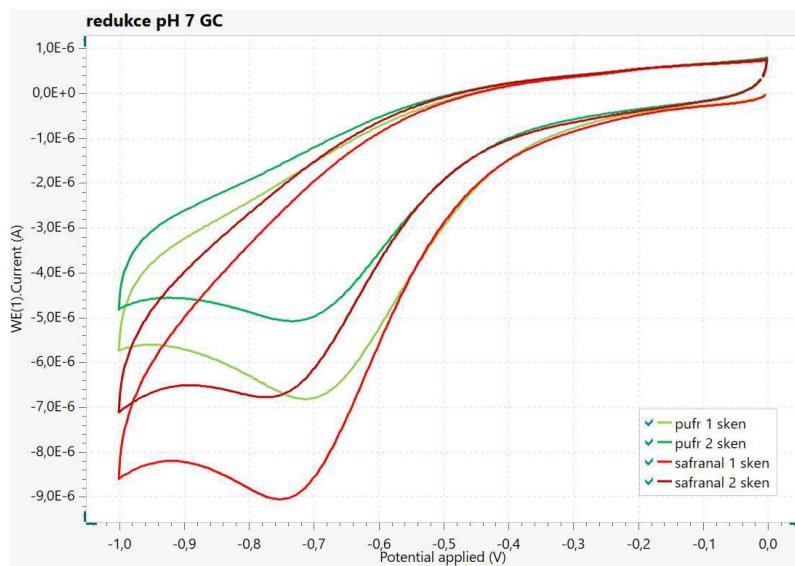
Obrázek 19 SWV voltamogramy v prostředí B-R pufru o pH 2–11 (A–J, modré a zelené křivky) a přidavku $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ krocinu (červené křivky) na SPCE.

3.2.4 Cyklická voltametrie safranalů

Po zjištění chování krocinu v B-R pufrch o různém pH byly také zjišťovány elektrochemické vlastnosti safranalů pomocí cyklické voltametrie. Pro měření v negativní části potenciálového okna byl nastaven potenciálový rozsah 0 V až -1 V , pro oxidace $-0,2 \text{ V}$ až $+1,5 \text{ V}$. Pozadí pro měření představoval Brittonův-Robinsonův pufr v rozsahu pH 3 až 11 smíchaný 1:1 s methanolem. Byly měřeny dva skeny pozadí, první sken je označen světle zeleně, druhý sken pozadí pak tmavě zeleně. Následně byl do roztoku přidán přírůstek standardu safranalů tak, aby se v měřeném roztoku nacházela jeho koncentrace $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ (červený sken). Tato vyšší koncentrace oproti krocinu byla použita z důvodu, že na voltamogramech nebyla koncentrace safranalů $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ viditelná. Druhý sken této koncentrace je vyobrazen rudou barvou.

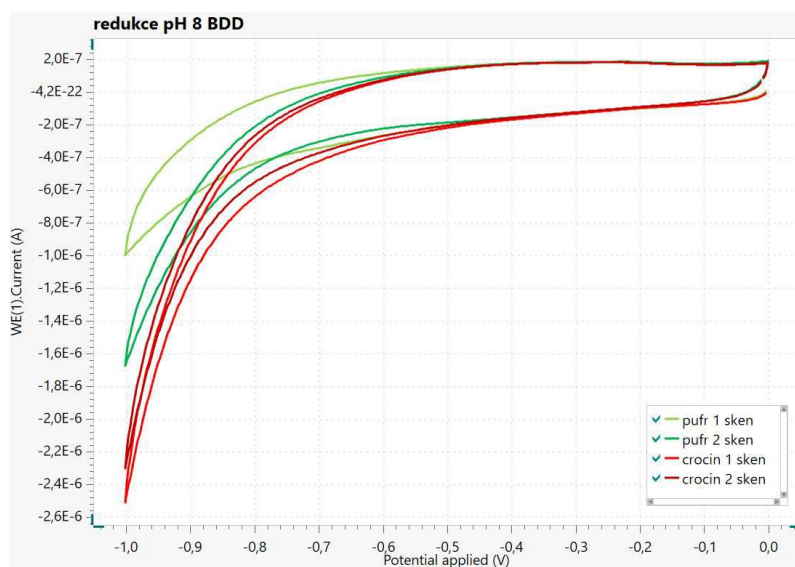
Na obrázku č. 20 je uveden příklad cyklické voltametrie v negativní oblasti potenciálů, konkrétně se jedná o voltamogram při pH 7. Voltamogramy jsou měřené v rozsahu pH 3 až 11 v prostředí 1:1 methanolu a B-R pufru pomocí GCE elektrody. Na prvním skenu pozadí je vždy vidět signál v potenciálovém okně $-0,8 \text{ V}$ až $-0,5 \text{ V}$ v závislosti na pH základního elektrolytu,

druhý sken je vždy nižší. Po následném přidání safranalů se tento signál v kyselém a neutrálním pH nachází v zápornějších hodnotách potenciálu vůči signálu pozadí. V zásaditějších roztocích se ale signál dostává do kladnějších hodnot potenciálů vůči signálu pozadí.



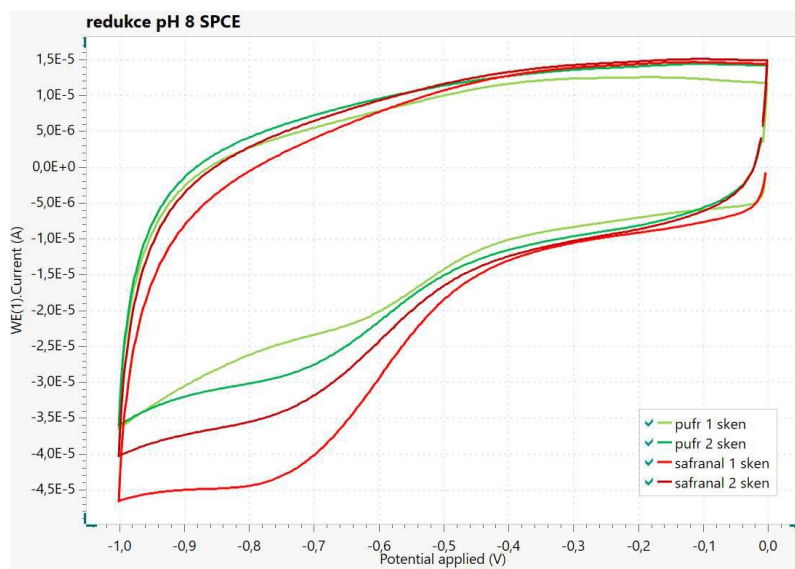
Obrázek 20 Cyklické voltamogramy směsi B-R pufru o pH 7 a methanolu (1:1, zelené křivky) a přidavku $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ safranalů (červené křivky) na GCE.

Na obrázku č. 21 je příklad redukce safranalů měřené cyklickou voltametrií, konkrétně voltamogram při pH 8. Záznamy byly měřené ve směsi B-R pufru s rozmezím pH 3 až 11 a methanolu (1:1) s využitím BDD elektrody. Skeny pozadí mají vždy nižší proudové hodnoty, než je tomu u skenu s přidavkem safranalů, další redoxní signály se na záznamu neobjevují.



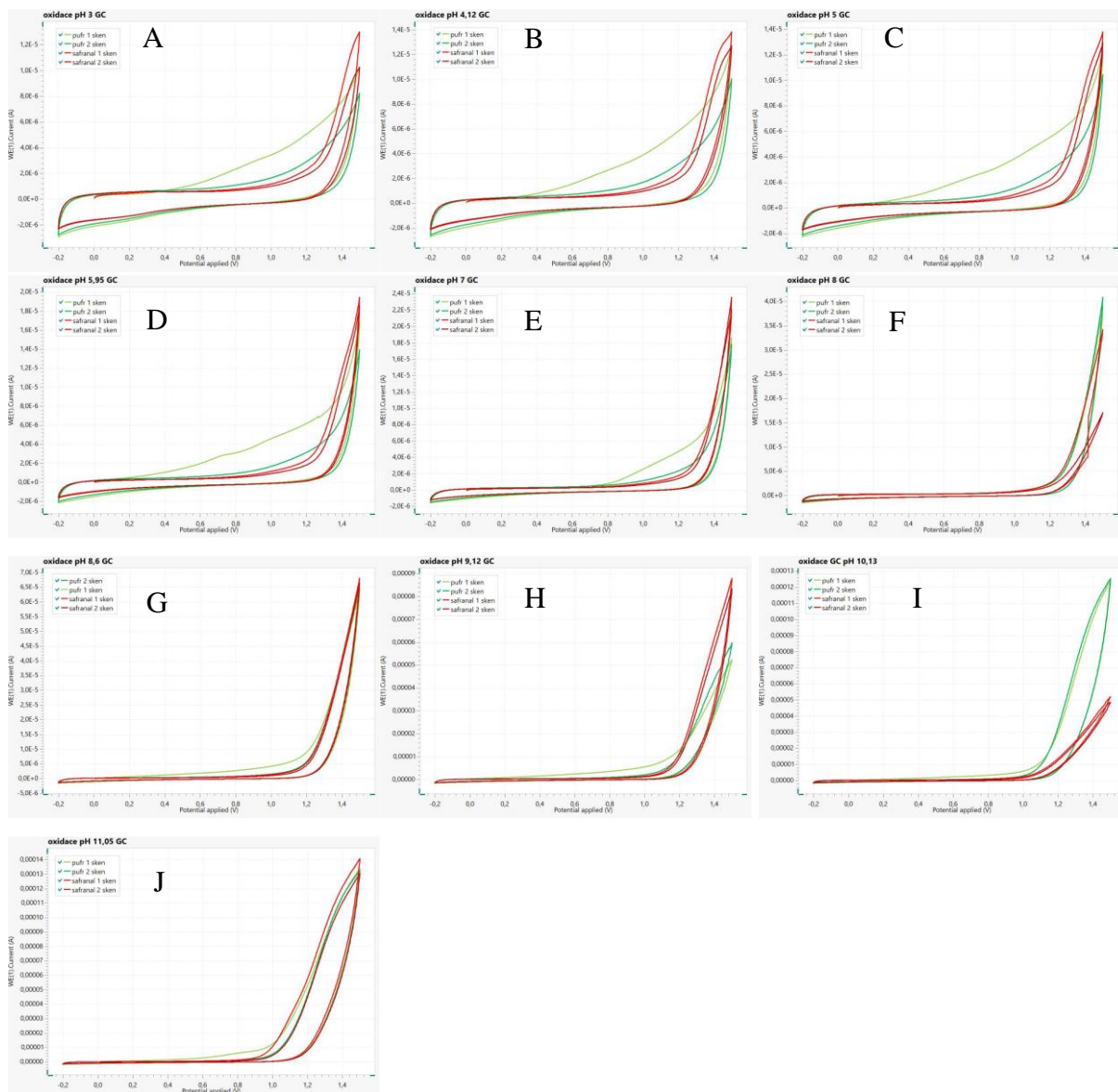
Obrázek 21 Cyklické voltamogramy směsi B-R pufru o pH 8 a methanolu (1:1, zelené křivky) a přidavku $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ safranalů (červené křivky) na BDD.

Na obrázku č. 22 je příklad cyklické voltametrie safranalů v negativních potenciálech pro pH 8. Voltamogramy jsou měřené ve směsi B-R pufru v rozsahu pH 3 až 11 a methanolu (1:1) na SPCE elektrodě. Skeny mají vysoké hodnoty proudů a mají i široké proudové rozmezí. Je viditelný pouze narůstající signál v rozmezí potenciálů $-0,8$ V až $-0,6$ V, který se s každým dalším skenem zvyšuje. Po přidání safranalů je průběh prakticky stejný, dojde pouze k poklesu proudů v druhém skenu. Jelikož je odezva prakticky stejná s pozadím, nejedná se o signál spojený s přítomností safranalů.



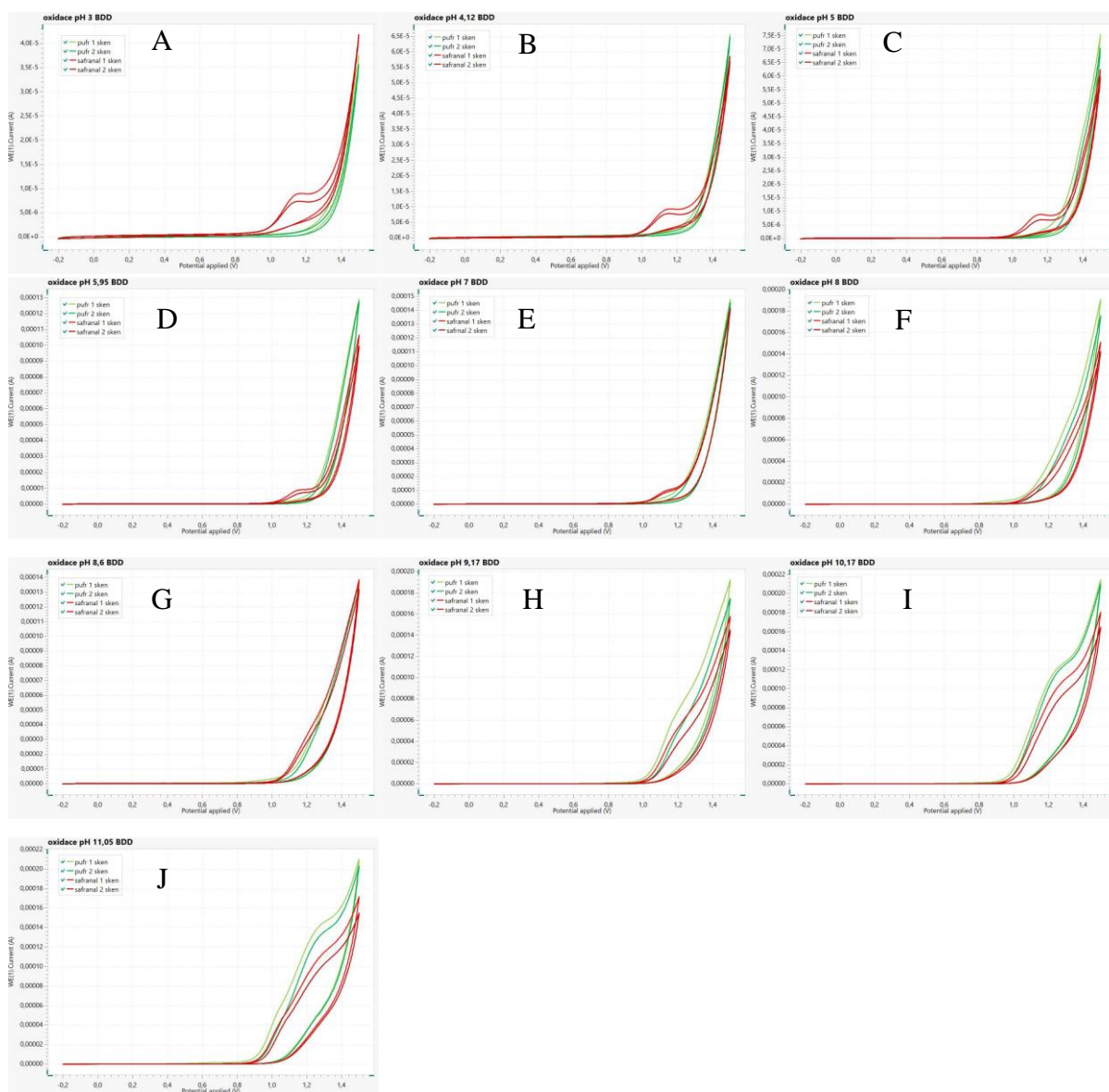
Obrázek 22 Cyklické voltamogramy směsi B-R pufru o pH 8 a methanolu (1:1, zelené křivky) a přidavku $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ safranalů (červené křivky) na SPCE.

Obrázek č. 23 zobrazuje cyklické voltamogramy oxidace safranalů, které byly měřeny ve směsi B-R pufru s pH 3 až 11 a methanolu (1:1) pomocí GCE elektrody. Měření bylo provedeno v rozsahu potenciálu $-0,2$ V až $+1,5$ V. Voltamogramy A–G dosahují nízkých hodnot proudů, voltamogramy H–J naopak vysokých, kdy dochází k oxidaci základního elektrolytu dříve při nižších potenciálech. První a druhé skeny pozadí jsou téměř identické společně se skeny po přidání safranalů. V případě experimentů v kyselé oblasti pH lze pozorovat náznak signálu spojený s přítomností safranalů, nicméně signál se nachází na hranici potenciálového okna a jeho interpretace je obtížná.



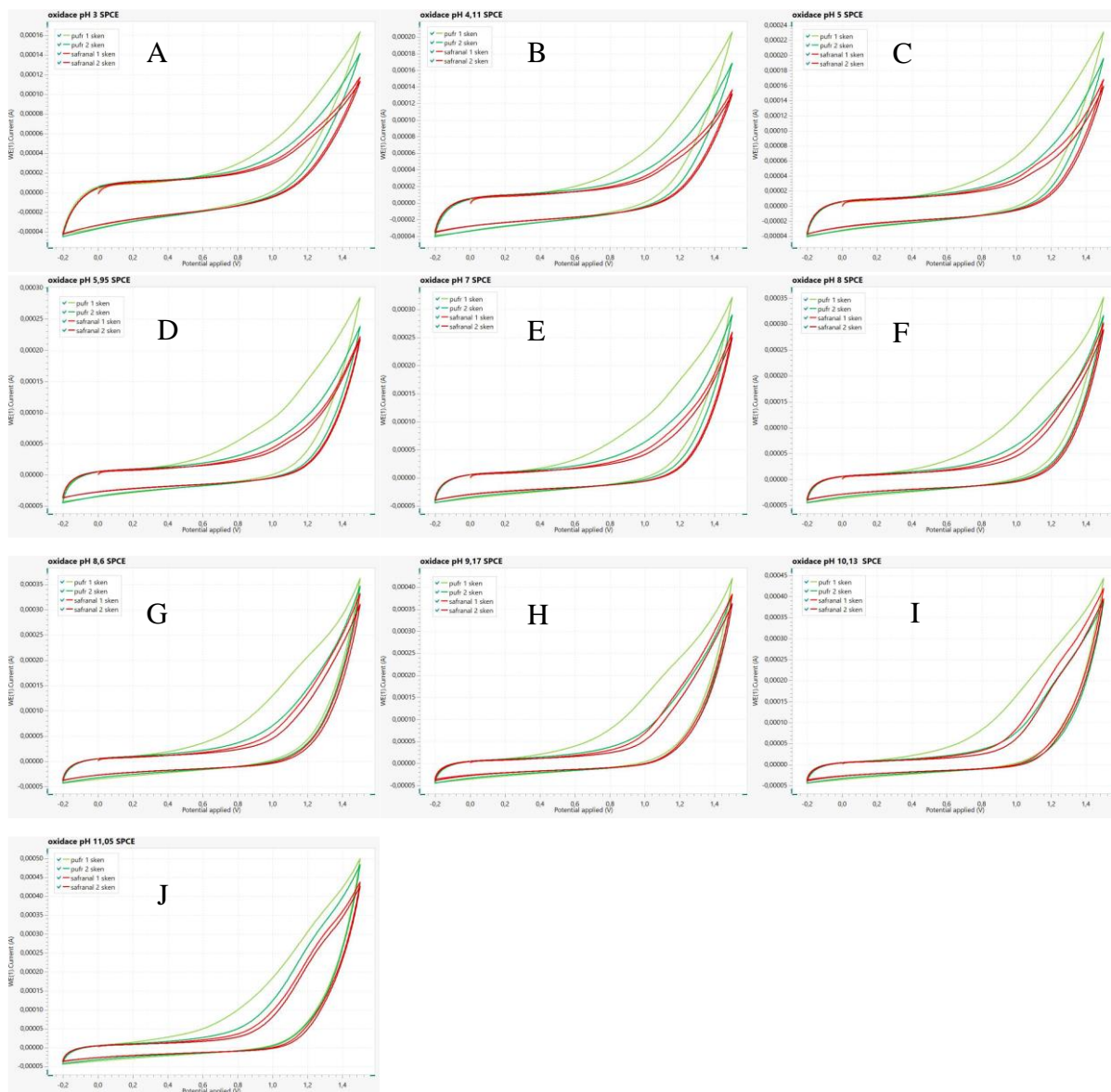
Obrázek 23 Cyklické voltamogramy ve směsi B-R pufrů o pH 3–11 a methanolu (1:1) (A–J, zelené křivky) a přidavku $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ safranal (červené křivky) na GCE.

Obrázek č. 24 zobrazuje sérii cyklických voltamogramů oxidace safranal, které byly měřeny ve směsi B-R pufru s pH 3 až 11 a methanolu (1:1) na BDD elektrodě. Měření bylo provedeno v rozsahu potenciálu $-0,2 \text{ V}$ až $+1,5 \text{ V}$. Voltamogramy A–C dosahují nízkých hodnot proudů, voltamogramy D–J naopak vysokých. První a druhé skeny pozadí jsou téměř identické. Po přidavku safranal lze pozorovat charakteristický pík (vyjma voltamogramu F) při potenciálu $+1,2 \text{ V}$, přičemž nejlepších výsledků je dosaženo v kyselém pH prostředí. Naopak v zásadité oblasti se pík nachází na konci potenciálového okna a jeho vyhodnocení tak není možné.



Obrázek 24 Cyklické voltamogramy ve směsi B-R pufrů o pH 3–11 a methanolu (1:1) (A–J, zelené křivky) a přidavku $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ safranal (červené křivky) na BDD.

Obrázek č. 25 zobrazuje sérii cyklických voltamogramů oxidace safranal, které byly měřeny ve směsi B-R pufru s pH 3 až 11 a methanolu (1:1) na SPCE elektrodě. Měření bylo provedeno v rozsahu potenciálu $-0,2 \text{ V}$ až $+1,5 \text{ V}$. Všechny voltamogramy dosahují nízkých hodnot proudů. První a druhé skeny pozadí jsou téměř identické. Po přidání safranal nebyl v kyselém a neutrálním pH pozorován žádný signál, který by mohl být interpretován jako safranal. Od pH 8 se začal objevovat náznak signálu ke konci potenciálového okna, a proto nebyla jeho interpretace uskutečnitelná.

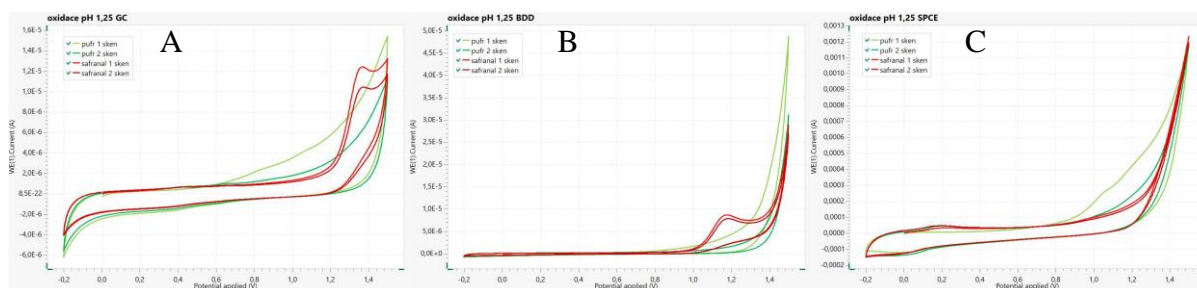


Obrázek 25 Cyklické voltamogramy ve směsi B-R pufrů o pH 3–11 a methanolu (1:1) (A-J, zelené křivky) a přidavku $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ safranal (červené křivky) na SPCE.

3.3 Elektrochemická detekce safranal v H_2SO_4

Toto prostředí bylo zvoleno z toho důvodu, aby byl safranal proměřen i při nižším pH, jelikož při smíchání B-R pufru o pH 2 a methanolu dojde ke zvýšení pH na hodnotu 3. Obrázek č. 26 zobrazuje cyklické voltamogramy oxidace safranal v prostředí $0,5 \text{ M}$ kyseliny sírové a methanolu (1:1, pH 1,25). Měření bylo provedeno v rozsahu potenciálu $-0,2 \text{ V}$ až $+1,5 \text{ V}$ na GCE elektrodě (voltamogram A), BDD elektrodě (voltamogram B) a SPCE elektrodě (voltamogram C). Po prvním skenu základního elektrolytu dochází k poklesu měřených proudů. Po následném přidání safranal s výslednou koncentrací v měřeném roztoku $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ se v případě GCE elektrody (voltamogram A) objevil pravděpodobně pík safranal při potenciálu

+1,3 V, nicméně tento signál se nacházel na hranici potenciálového okna. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s využitím BDD elektrody (voltamogram B), kde byl zjištěn dobře vyhodnotitelný signál safranalů při hodnotě potenciálu +1,2 V. Při využití SPCE elektrody (voltamogram C) se po přidavku safranalů na voltamogramech neobjevil žádný rozdílný signál oproti pozadí kromě malého nárůstu proudu kolem potenciálu +0,2 V.



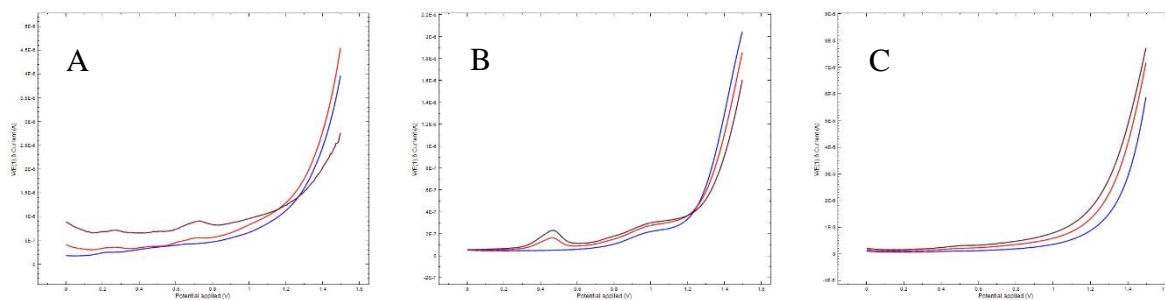
Obrázek 26 Cyklické voltamogramy ve směsi 0,5 M kyseliny sírové a methanolu (1:1) (zelené křivky) a přidavku 0,5 mmol l⁻¹ safranalů (červeně křivky) na GCE (A), BDD (B) a SPCE (C).

3.4 Elektrochemická detekce ve fosfátovém pufru

Byly provedeny experimenty pro ověření využitelnosti fosfátového pufru jako prostředí pro stanovení krocínu. Pro měření byly použity metody diferenční pulzní voltametrie a square wave voltametrie s GCE, BDD a SPCE elektrodami. Modrá křivka zobrazuje sken 0,1 M fosfátového pufru, měřeného jako pozadí, a následně dva přidavky standardu krocínu tak, aby v měřicí nádobce byla jeho koncentrace 0,1 mmol l⁻¹ (červený sken) a 0,2 mmol l⁻¹ (rudý sken). U safranalů tento pufr nebyl testován, jelikož po jeho přidání do roztoku methanolu a fosfátového pufru se objevily vysrážené krystalky, pravděpodobně samotného safranalů.

3.4.1 Diferenční pulzní voltametrie krocínu

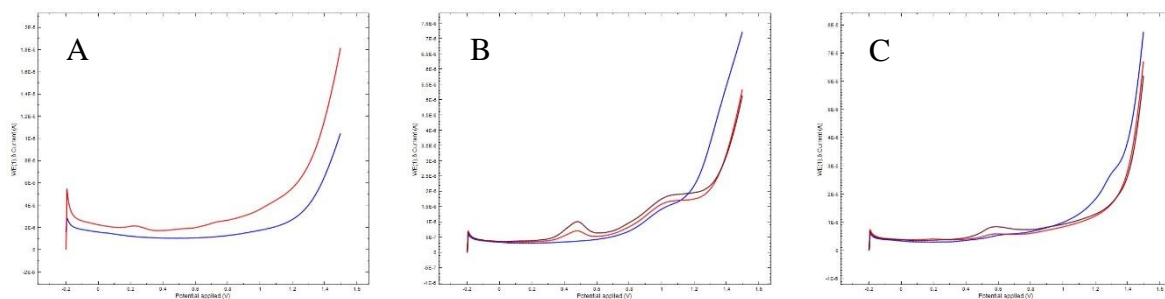
Na obrázku č. 27 jsou zobrazeny voltamogramy měřené GCE elektrodě (voltamogram A), kde jsou vidět dva signály při potenciálech +0,3 V a +0,7 V. S využitím BDD elektrody (voltamogram B) je viditelný pík při potenciálu +0,45 V, který se po přidání krocínu zvyšuje. Na skenu měřeného s pomocí SPCE elektrod (voltamogram C) je vidět náznak signálu kolem potenciálu +0,5 V, který ale není dostatečně vysoký ke spolehlivému vyhodnocení. Vzhledem k jeho poloze by se ale mohlo jednat o krocín.



Obrázek 27 DPV voltamogramy 0,1 M fosfátového pufru pH 7 (modrá křivka) a přidavku 0,1 mmol l⁻¹ (červená křivka) a 0,2 mmol l⁻¹ krocinu (rudá křivka) na GCE (A), BDD (B) a SPCE (C).

3.4.2 Square wave voltametrie krocinu

Na obrázku č. 28 je zobrazeno měření za použití GCE elektrody (voltamogram A), kde je vidět jeden signál při potenciálu +0,2 V. U měření provedené BDD elektrodou (voltamogram B) je vidět jeden pík při potenciálu +0,5 V, který se s přidavkem zvyšuje. Následně je vidět signál při potenciálu +1,1 V. Ten je ale zároveň viditelný i ve skenu pozadí a na rozdíl od signálu při +0,5 V nedochází s přidavky k jeho zvyšování. U záznamu provedeného za použití SPCE elektrody (voltamogram C) je vidět signál při +0,6 V, který taktéž s přidavkem krocinu vzrůstá. Je také patrný signál na pozadí při potenciálu +1,3 V, který ale s přidavkem krocinu vymizí.



Obrázek 28 DPV voltamogramy 0,1 M fosfátového pufru pH 7 (modrá křivka) a přidavku 0,1 mmol l⁻¹ (červená křivka) a 0,2 mmol l⁻¹ krocinu (rudá křivka) na GCE (A), BDD (B) a SPCE (C).

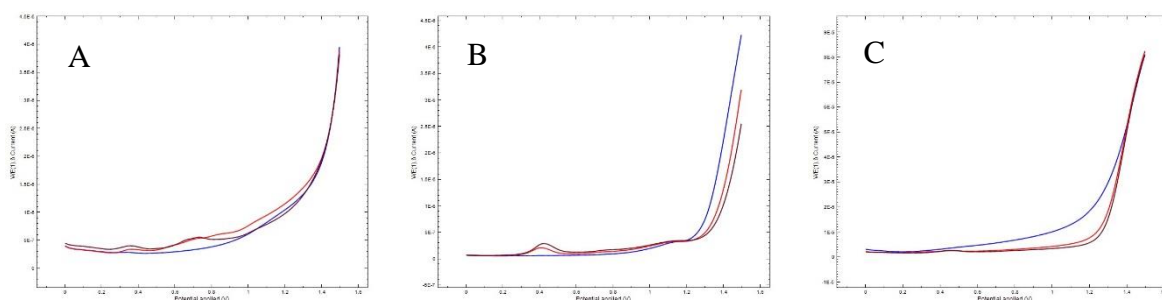
3.5 Elektrochemická detekce v octanovém pufru

Dalším testovaným prostředím byl 0,1 M octanový pufr o pH 5, ve kterém bylo ověřováno elektrochemické chování krocinu i safranalu metodami diferenční pulzní voltametrií a square wave voltametrií s využitím GCE, BDD a SPCE elektrod. Modrá křivka zobrazuje sken octanového pufru, který byl měřen jako pozadí, a následně dva přidavky standardu krocinu tak, aby v měřící nádobce byla jeho koncentrace 0,1 mmol l⁻¹ (červený sken) a 0,2 mmol l⁻¹ (rudý sken).

U safranalu byla koncentrace prvního přídávku $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ (červený sken) a 1 mmol l^{-1} (rudý sken).

3.5.1 Diferenční pulzní voltametrie krocinu

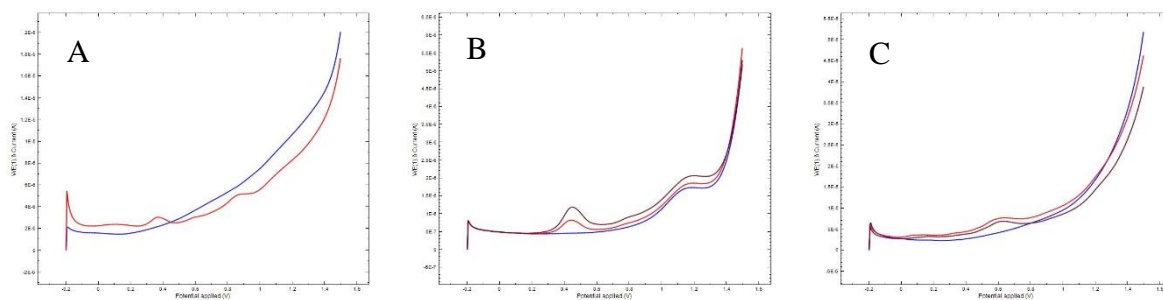
Na obrázku č. 29 jsou zobrazeny voltamogramy v potenciálovém rozpětí 0 V až +1,5 V. S pomocí GCE elektrody (voltamogram A) je vidět signál při potenciálech +0,3 V a +0,7 V, což bylo pozorováno i v případě fosfátového pufru. Na voltamogramu měřeného BDD elektrodou (voltamogram B) je viditelný signál při potenciálu +0,45 V, který se po přidání krocinu zvyšuje. V porovnání s fosfátovým pufrům se tento signál nachází rovněž na stejném místě, avšak jeho intenzita je v tomto případě vyšší. S využitím SPCE elektrody (voltamogram C) je vidět náznak signálu kolem potenciálu +0,5 V, který ale není dostatečně vysoký ke spolehlivému vyhodnocení. Vzhledem k jeho poloze by se mohlo jednat o krocín. Signál je zároveň taktéž na stejném místě, jako tomu bylo u fosfátovému pufru.



Obrázek 29 DPV voltamogramy 0,1 M octanového pufru pH 5 (modrá křivka) a přídávku $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ (červená křivka) a $0,2 \text{ mmol l}^{-1}$ krocínu (rudá křivka) na GCE (A), BDD (B) a SPCE (C).

3.5.2 Square wave voltametrie krocinu

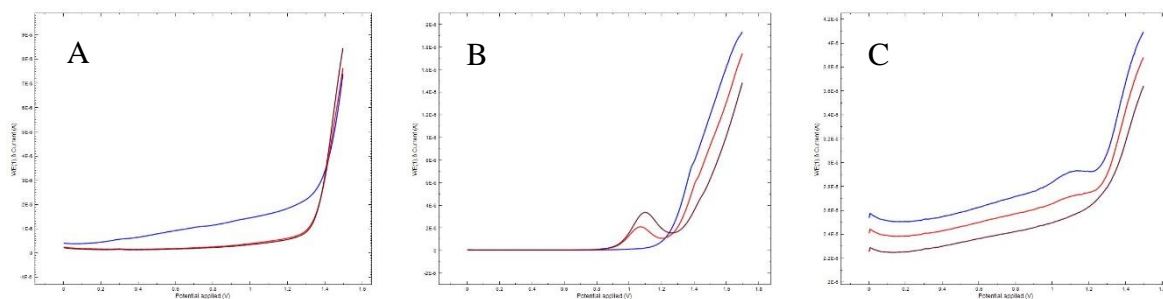
Na obrázku č. 30 jsou zobrazeny voltamogramy v potenciálovém rozpětí $-0,2 \text{ V}$ až $+1,5 \text{ V}$. Při používání GCE elektrody (voltamogram A) jsou vidět signály při potenciálu +0,4 V a +0,9 V. S pomocí BDD elektrody (voltamogram B) je patrný jeden pík při potenciálu +0,5 V, který se s přídávkem zvyšuje a nachází se na stejném místě, jako u fosfátového pufru. Následně je vidět signál při potenciálu +1,2 V. Ten je ale zároveň přítomný i na skenu pozadí a na rozdíl od signálu při +0,5 V nedochází po přidávku k jeho zvýšení. Při použití SPCE elektrody (voltamogram C) byl zaznamenaný pík při +0,6 V, který lze spojovat s přítomností krocínu.



Obrázek 30 SWV voltamogramy 0,1 M octanového pufru pH 5 (modrá křivka) a přidavku 0,1 mmol l⁻¹ (červená křivka) a 0,2 mmol l⁻¹ krocinu (rudá křivka) na GCE (A), BDD (B) a SPCE (C).

3.5.3 Diferenční pulzní voltametrie safranalů

Na obrázku č. 31 jsou zobrazeny DPV záznamy ve směsi octanového pufru s methanolem (1:1) pro rozpuštění safranalů v potenciálovém rozpětí 0 V až +1,5 V u voltamogramů A a C, voltamogram B byl měřen v rozmezí 0 V až +1,7 V. Při použití GCE elektrody (voltamogram A) není vidět žádný signál, který by se lišil od odezvy pozadí. Po přidání safranalů dochází dokonce ke snížení proudů pozadí. U BDD elektrody (voltamogram B) je vidět jeden pík při potenciálu +1,1 V, který se s přidavkem safranalů zvyšuje. V případě SPCE elektrody (voltamogram C) nebyly pozorovány žádné výrazné rozdíly mezi signály pozadí a s přidavkem safranalů.

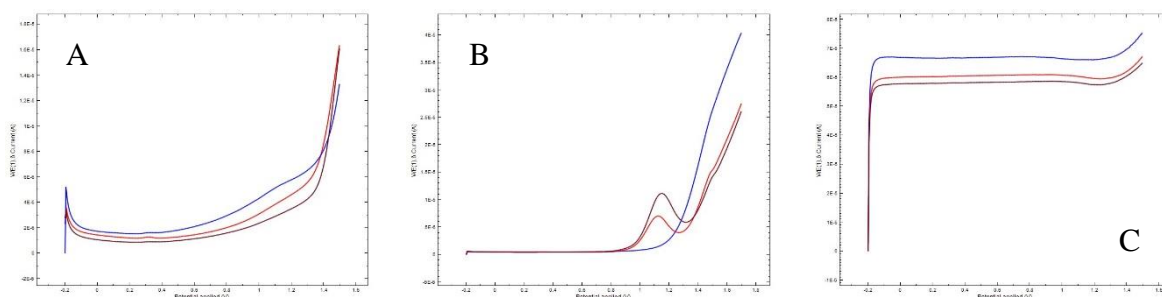


Obrázek 31 DPV voltamogramy směsi octanového pufru a methanolu (1:1) (modrá křivka) a přidavku 0,5 mmol l⁻¹ (červená křivka) a 1 mmol l⁻¹ safranalů (rudá křivka) na GCE (A), BDD (B) a SPCE (C).

3.5.4 Square wave voltametrie safranalů

Na obrázku č. 32 jsou zobrazeny voltamogramy v potenciálovém rozpětí -0,2 V až +1,5 V u voltamogramů A a C, voltamogram B byl měřen v rozsahu -0,2 V až +1,7 V. S využitím GCE elektrody (voltamogram A) není vidět žádný signál, který by se lišil od signálu pozadí. S přidavkem safranalů navíc docházelo ke snižování proudů pozadí. V případě BDD elektrody (voltamogram B) je vidět jeden pík při potenciálu +1,1 V, který se s přidavkem safranalů zvyšuje.

Při měření SPCE elektrodou (voltamogram C) není vidět žádný rozdílný signál na skenech safranalů oproti pozadí.



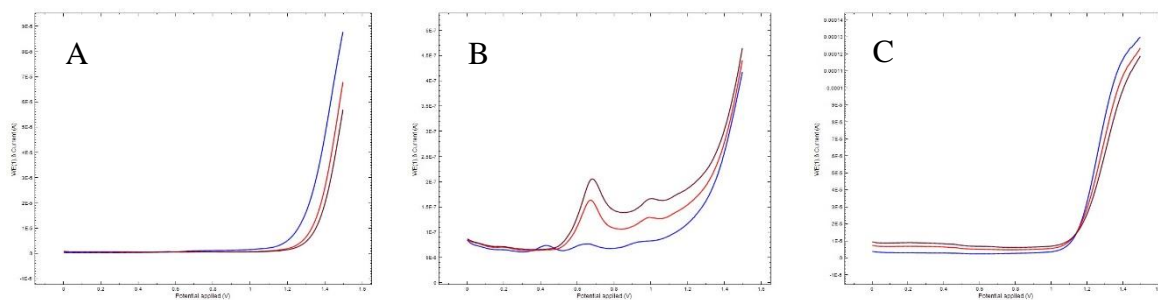
Obrázek 32 SWV voltamogramy směsi octanového pufru a methanolu (1:1) (modrá křivka) a přídavku $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ (červená křivka) a 1 mmol l^{-1} safranalů (rudá křivka) na GCE (A), BDD (B) a SPCE (C).

3.6 Elektrochemická detekce v HCl

Pro ověření využití $0,1 \text{ M}$ kyseliny chlorovodíkové jakožto pracovního prostředí pro stanovení krocínu a safranalů byly využity metody diferenční pulzní voltametrie a square wave voltametrie s GCE, BDD a SPCE elektrodami. Na následujících voltamogramech je jako modrá křivka znázorněno pozadí $0,1 \text{ M}$ kyseliny chlorovodíkové, červené a rudé linie pak představují analýzy s přídavky krocínu ($0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ a $0,2 \text{ mmol l}^{-1}$) a safranalů ($0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ a 1 mmol l^{-1}).

3.6.1 Diferenční pulzní voltametrie krocínu

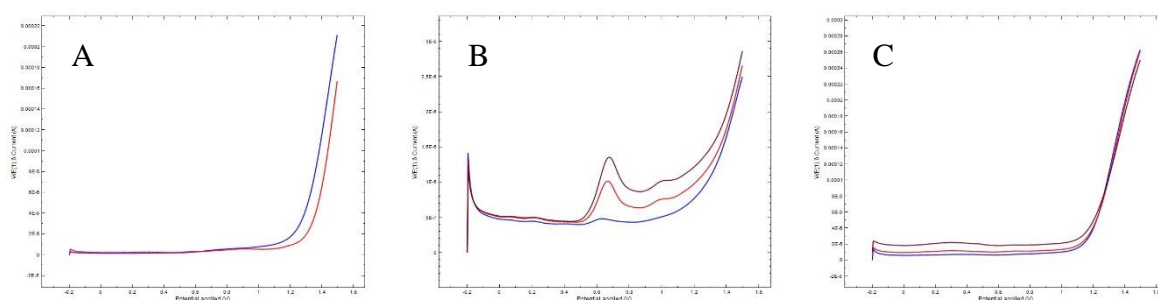
Na obrázku č. 33 jsou vyobrazeny záznamy z analýz krocínu metodou diferenční pulzní voltametrie v potenciálovém rozpětí 0 až $+1,5 \text{ V}$. S využitím GCE elektrody (voltamogram A) nebyl po přídavku krocínu pozorován žádný nový signál v porovnání s pozadím. Při použití BDD elektrody (voltamogram B) lze pozorovat dva píky v oblasti $+0,55 \text{ V}$ a $+1 \text{ V}$, nicméně pouze u signálu při $+0,55 \text{ V}$ docházelo k jeho růstu při zvyšování koncentrace krocínu. V porovnání s fosfátovým a octanovým pufrům je signál posunut vlivem přítomnosti chloridových iontů, které ovlivňují potenciál referenčních elektrod tištěných senzorů, ke kladnějším hodnotám potenciálů a zároveň je jeho intenzita nižší. Při využití SPCE elektrody (voltamogram C) nebyl pozorován žádný rozdíl mezi roztokem pozadí a roztoky s přídavkem krocínu.



Obrázek 33 DPV voltamogramy 0,1 M HCl (modrá křivka) a přidavku 0,1 mmol l⁻¹ (červená křivka) a 0,2 mmol l⁻¹ krocinu (rudá křivka) na GCE (A), BDD (B) a SPCE (C).

3.6.2 Square wave voltametrie krocinu

Na obrázku č. 34 jsou zobrazeny voltamogramy v potenciálovém rozpětí -0,2 V až +1,5 V. Při využití GCE elektrody (voltamogram A) je vidět náznak signálu při potenciálu +0,9 V, který na pozadí není. Při měření BDD elektrodou (voltamogram B) jsou vidět dva píky při potenciálu +0,7 V a +1 V. Signál při +0,7 V je viditelný již na pozadí, ale zvyšuje se s koncentrací krocinu. Je dokonce vyšší, než je tomu u signálu měřenému v prostředí octanového a fosfátového pufru. Jedním z možných vysvětlení tohoto jevu je nedokonalé vymytí krocinu z měřicí nádoby. Signál je posunutý ke kladnějším potenciálům, než je tomu u octanového a fosfátového pufru, což je způsobeno chloridovými ionty. Při využití SPCE elektrody (voltamogram C) je vidět pouze mírná proudová vlna kolem potenciálu +0,3 V po druhém přidavku krocinu.

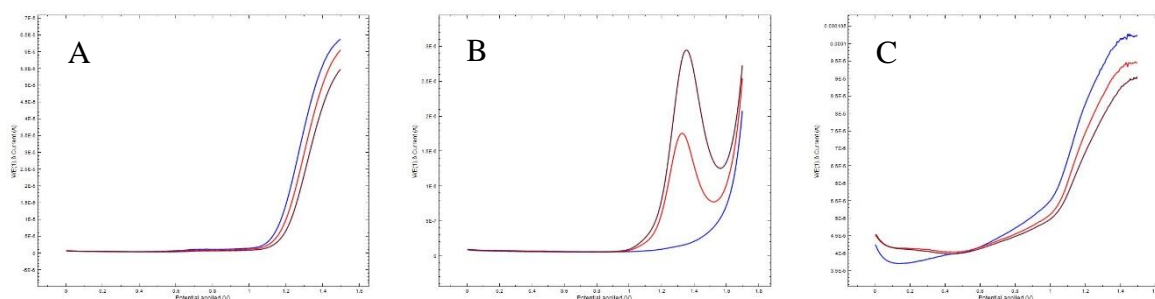


Obrázek 34 SWV voltamogramy 0,1 M HCl (modrá křivka) a přidavku 0,1 mmol l⁻¹ (červená křivka) a 0,2 mmol l⁻¹ krocinu (rudá křivka) na GCE (A), BDD (B) a SPCE (C).

3.6.3 Diferenční pulzní voltametrie safranalů

Na obrázku č. 35 jsou zobrazeny voltamogramy ve směsi 0,1 M HCl a methanolu (1:1) v rozmezí potenciálů 0 V až +1,5 V u voltamogramů A a C, voltamogram B je měřen v rozsahu 0 V až +1,7 V. S využitím GCE elektrody (voltamogram A) není po přidavku safranalů vidět žádný signál, který by se lišil od pozadí základního elektrolytu. V případě BDD elektrody

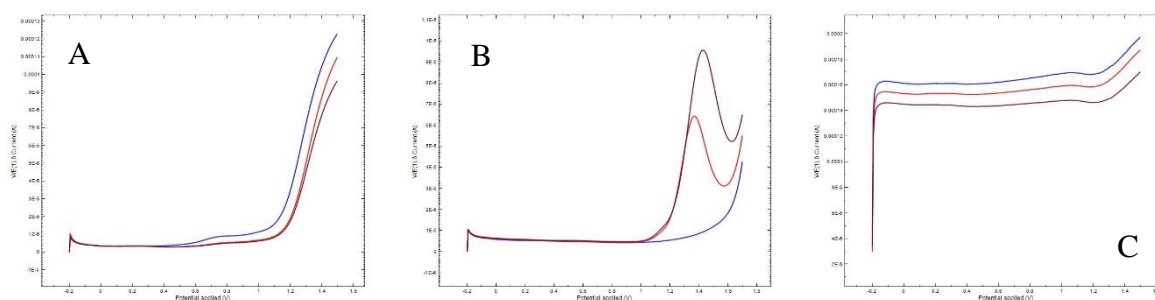
(voltamogram B) je vidět intenzivní pík při potenciálu +1,3 V, který se s přidavkem safranalů zvyšuje. Tento pík je nižší než signál měřený v octanovém pufru a zároveň je vlivem chloridových iontů posunut do kladnějších hodnot potenciálů. U SPCE elektrody (voltamogram C) není po přidavku vidět žádná odezva safranalů v porovnání s pozadím.



Obrázek 35 DPV voltamogramy směsi 0,1 M HCl a methanolu (1:1) (modrá křivka) a přidavku 0,5 mmol l⁻¹ (červená křivka) a 1 mmol l⁻¹ safranalů (rudá křivka) na GCE (A), BDD (B) a SPCE (C).

3.6.4 Square wave voltametrie safranalů

Na obrázku č. 36 jsou zobrazeny voltamogramy v potenciálovém rozpětí -0,2 V až +1,5 V u voltamogramů A a C, voltamogram B je měřen v rozsahu -0,2 V až +1,7 V. Při využití GCE elektrody (voltamogram A) není vidět žádný signál, který by se lišil od signálu pozadí. Po přidání safranalů se dokonce pozadí snižuje. Při aplikaci BDD elektrody (voltamogram B) je vidět jeden signál při potenciálu +1,4 V, který se s přidavkem safranalů zvyšuje. Tento signál je vyšší, jak signál měřený v octanovém pufru. Zároveň je vlivem chloridových iontů posunut do kladnějších hodnot potenciálů. V rámci použití SPCE elektrody (voltamogram C) není vidět žádný signál na skenech safranalů oproti pozadí.



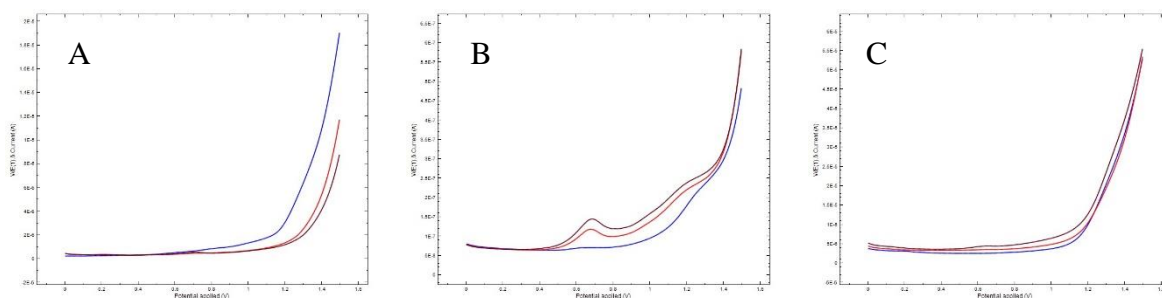
Obrázek 36 SWV voltamogramy směsi 0,1 M HCl a methanolu (1:1) (modrá křivka) a přidavku 0,5 mmol l⁻¹ (červená křivka) a 1 mmol l⁻¹ safranalů (rudá křivka) na GCE (A), BDD (B) a SPCE (C).

3.7 Elektrochemická detekce v KCl

Ověření využitelnosti chloridu draselného jako pracovního prostředí pro stanovení krocínu a safranalů bylo provedeno metodami diferenční pulzní voltametrie a square wave voltametrie za využití GCE, BDD a SPCE elektrod. Modrá křivka zobrazuje sken 0,1M chloridu draselného, který byl měřen jako pozadí. Přidávky standardu krocínu jsou znázorněny červeně (výsledná koncentrace 0,1 mmol l⁻¹), resp. rudě (0,2 mmol l⁻¹). V případě safranalů byly zvoleny výsledné koncentrace přidavků 0,5 mmol l⁻¹ (červený sken) a 1 mmol l⁻¹ (rudý sken).

3.7.1 Diferenční pulzní voltametrie krocínu

Na obrázku č. 37 jsou zobrazeny voltamogramy v potenciálovém rozpětí 0 V až +1,5 V. Při aplikaci GCE elektrody (voltamogram A) je vidět náznak signálu při potenciálu +0,7 V, který není viditelný na pozadí. Při využití BDD elektrody (voltamogram B) jsou na záznamu dva píky při potenciálech +0,65 V a +1,2 V. Signál při potenciálu +1,2 V je viditelný i na skenu pozadí, signál při potenciálu +0,65 V stoupá s koncentrací krocínu. Maximum píku je posunuto ke kladnějším potenciálům vlivem přítomnosti chloridových iontů, signál je ale zároveň nižší, než je tomu u fosfátového pufru, octanového pufru a kyseliny chlorovodíkové. Na měření uskutečněné prostřednictvím SPCE elektrody (voltamogram C) lze pozorovat náznak píku při +0,65 V, ale jeho velikost je malá.

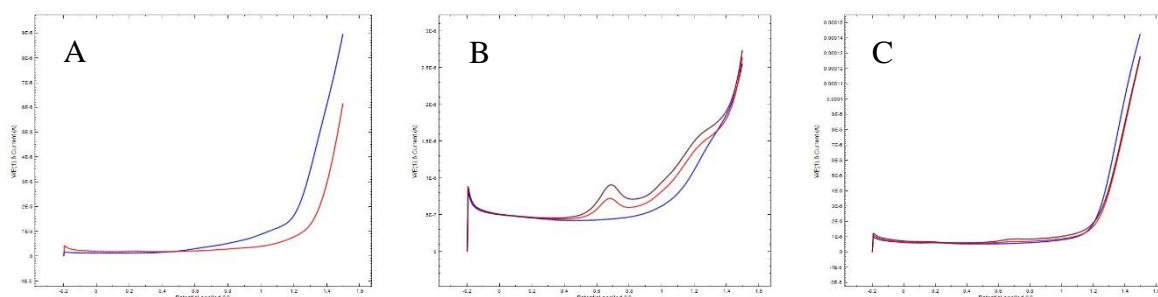


Obrázek 37 DPV voltamogramy 0,1 M KCl (modrá křivka) a přidavku 0,1 mmol l⁻¹ (červená křivka) a 0,2 mmol l⁻¹ krocínu (rudá křivka) na GCE (A), BDD (B) a SPCE (C).

3.7.2 Square wave voltametrie krocínu

Na obrázku č. 38 jsou zobrazeny voltamogramy v potenciálovém rozpětí -0,2 V až +1,5 V. S pomocí GCE elektrody (voltamogram A) není vidět žádný signál. Při využití BDD elektrody (voltamogram B) jsou dva signály při potenciálu +0,7 V a +1,2 V. Signál při +0,7 V stoupá s koncentrací krocínu. Je nižší, než je tomu u signálu měřenému v prostředí octanového pufru,

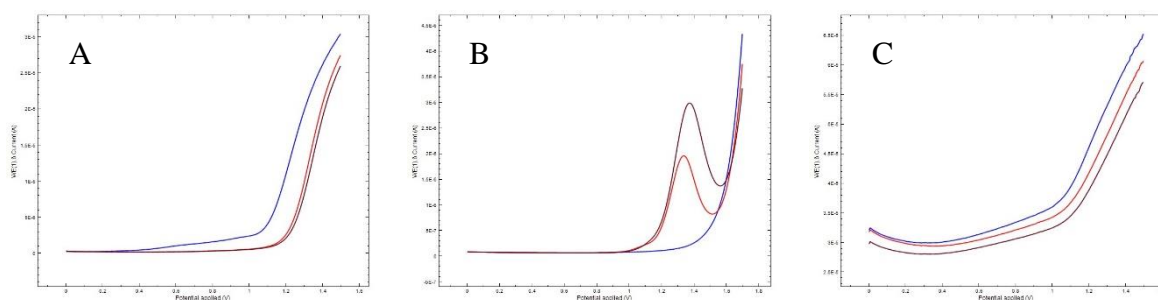
fosfátového pufru, ani kyseliny chlorovodíkové. Signál je posunutý ke kladnějším potenciálům, než je tomu u octanového a fosfátového pufru, ale je na stejném místě, jako v případě prostředí kyseliny chlorovodíkové, což je způsobeno chloridovými ionty. Při aplikaci SPCE elektrody (voltamogram C) je vidět málo intenzivní signál při potenciálu +0,7 V.



Obrázek 38 SWV voltamogramy 0,1 M KCl (modrá křivka) a přidavku 0,1 mmol l⁻¹ (červená křivka) a 0,2 mmol l⁻¹ krominu (rudá křivka) na GCE (A), BDD (B) a SPCE (C).

3.7.3 Diferenční pulzní voltametrie safranalů

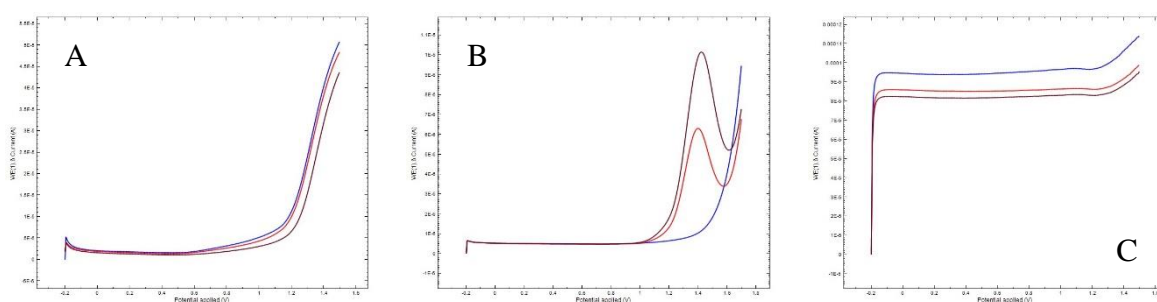
Na obrázku č. 39 jsou zobrazeny voltamogramy v potenciálovém rozpětí 0 V až +1,5 V u voltamogramů A a C, voltamogram B byl měřen v rozsahu 0 V až +1,7 V. Při použití GCE elektrody (voltamogram A) není vidět žádný signál, který by se lišil od signálu pozadí, dokonce pozadí klesá s přidáním safranalů. V případě BDD elektrody (voltamogram B) je vidět jeden pík při potenciálu +1,3 V, který se s přidávkem safranalů zvyšuje. Tato odezva je vyšší než signály měřené v octanovém pufru i prostředí kyseliny chlorovodíkové. Zároveň je vlivem chloridových iontů posunut do kladnějších hodnot potenciálů. Za pomoci SPCE elektrody (voltamogram C) není vidět žádný signál na skenech safranalů oproti pozadí.



Obrázek 39 DPV voltamogramy směsi 0,1 M KCl a methanolu (1:1) (modrá křivka) a přidavku 0,5 mmol l⁻¹ (červená křivka) a 1 mmol l⁻¹ safranalů (rudá křivka) na GCE (A), BDD (B) a SPCE (C).

3.7.4 Square wave voltametrie safranalu

Na obrázku č. 40 jsou zobrazeny voltamogramy v potenciálovém rozpětí $-0,2$ V až $+1,5$ V u voltamogramů A a C, voltamogram B byl měřen v rozsahu $-0,2$ V až $+1,7$ V. U měření provedeného za pomoci GCE elektrody (voltamogram A) není vidět žádný signál, který by se lišil od signálu pozadí. Při použití BDD elektrody (voltamogram B) je vidět jeden intenzivní pík při potenciálu $+1,4$ V, který se s přidavkem safranalů zvyšuje. Tento signál je nižší, než signály měřené v octanovém pufru i v prostředí kyseliny chlorovodíkové. Zároveň je vlivem chloridových iontů posunut do kladnějších hodnot potenciálů. Při použití SPCE elektrody (voltamogram C) není vidět žádný signál na skenech safranalů oproti pozadí.



Obrázek 40 SWV voltamogramy směsi $0,1$ M KCl a methanolu (1:1) (modrá křivka) a přidavku $0,5$ mmol l^{-1} (červená křivka) a 1 mmol l^{-1} safranalů (rudá křivka) na GCE (A), BDD (B) a SPCE (C).

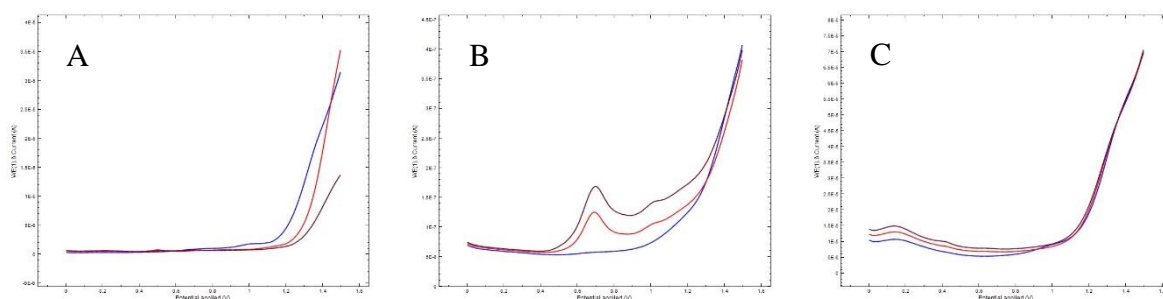
3.8 Elektrochemická detekce ve směsi HCl a KCl

Posledním z testovaných pufrů byla směs kyseliny chlorovodíkové a chloridu draselného o pH 2, která byla proměřena metodami diferenční pulzní voltametrie a square wave voltametrie pomocí GCE, BDD a SPCE elektrod. Modrá křivka zobrazuje sken $0,1$ M kyseliny chlorovodíkové a $0,1$ M chloridu draselného v poměru (1:9), který je využit jako pozadí a následně dva přidavky standardu krocínu tak, aby v měřené nádobě byla jeho koncentrace $0,1$ mmol l^{-1} (červený sken) a $0,2$ mmol l^{-1} (rudý sken). U safranalů byla koncentrace prvního přidavku $0,5$ mmol l^{-1} (červený sken) a 1 mmol l^{-1} (rudý sken).

3.8.1 Diferenční pulzní voltametrie krocínu

Na obrázku č. 41 jsou zobrazeny voltamogramy v rozmezí potenciálů 0 V až $+1,5$ V. S využitím GCE elektrody (voltamogram A) není viditelný žádný signál. Při aplikaci BDD elektrody (voltamogram B) jsou viditelné dva píky při potenciálu $+0,7$ V a $+1$ V. Signál při potenciálu $+0,7$ V stoupá s koncentrací krocínu. Jeho maximum je posunuto ke kladnějším potenciálům

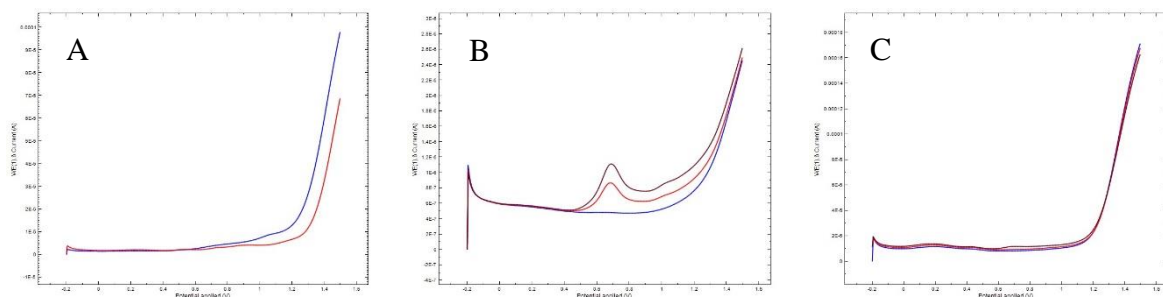
vlivem přítomnosti chloridových iontů a signál je zároveň nižší, než je tomu u fosfátového pufru a octanového pufru. Je ale vyšší v porovnání s kyselinou chlorovodíkovou a chloridem draselným. Při využití SPCE elektrody se objevuje pouze náznak píku při +0,45 V až po druhém přidavku krocinu.



Obrázek 41 DPV voltamogramy směsi 0,1 M HCl a 0,1 M KCl (1:9) (modrá křivka) a přidavku 0,1 mmol l⁻¹ (červená křivka) a 0,2 mmol l⁻¹ krocinu (rudá křivka) na GCE (A), BDD (B) a SPCE (C).

3.8.2 Square wave voltametrie krocinu

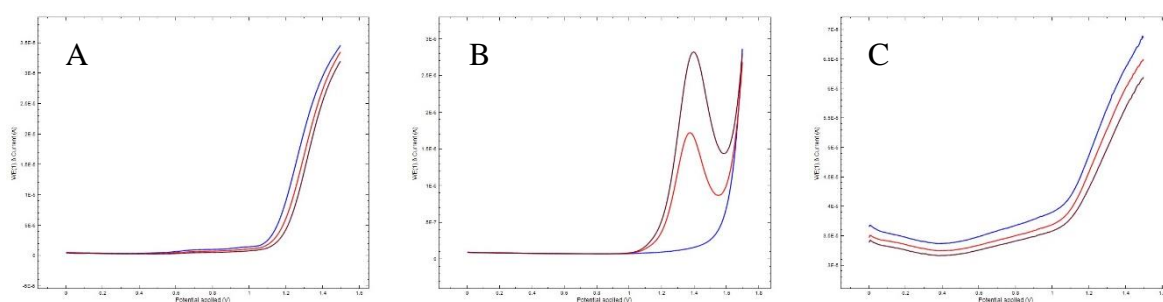
Na obrázku č. 42 jsou zobrazeny voltamogramy v potenciálovém rozmezí -0,2 V až +1,5 V. Na GCE elektrodě (voltamogram A) není vidět žádný signál. Při využití BDD elektrody (voltamogram B) jsou vidět dva signály při potenciálu +0,7 V a +1 V. Signál při +0,7 V stoupá s koncentrací krocinu. V porovnání s octanovým puftrem a kyselinou chlorovodíkovou je tento signál nižší, nicméně je vyšší než v případě fosfátového pufru a chloridu draselného. Signál je posunutý ke kladnějším potenciálům, než je tomu u octanového a fosfátového pufru, ale je na stejném místě, jako v případě v prostředí kyseliny chlorovodíkové a chloridu draselného, což je způsobeno chloridovými ionty. S využitím SPCE elektrody (voltamogram C) není vidět žádný signál oxidace krocinu.



Obrázek 42 SWV voltamogramy směsi 0,1 M HCl a 0,1 M KCl (1:9) (modrá křivka) a přidavku 0,1 mmol l⁻¹ (červená křivka) a 0,2 mmol l⁻¹ krocinu (rudá křivka) na GCE (A), BDD (B) a SPCE (C).

3.8.3 Diferenční pulzní voltametrie safranalu

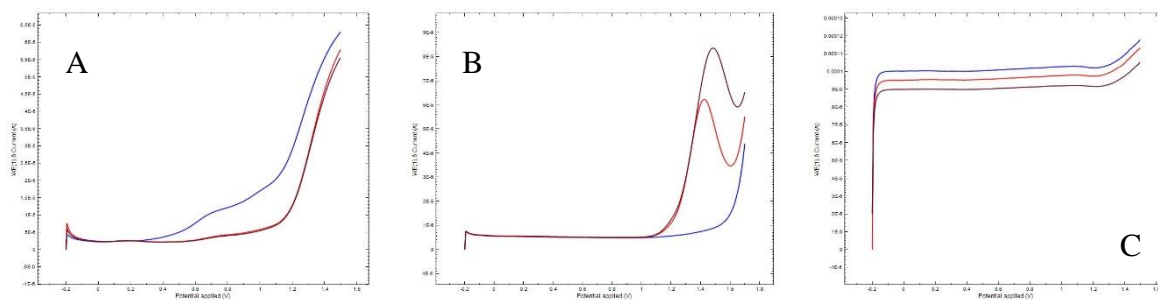
Na obrázku č. 43 jsou zobrazeny voltamogramy v rozmezí 0 V až +1,5 V u voltamogramů A a C, voltamogram B byl měřen v rozsahu 0 V až +1,7 V. V případě GCE elektrody (voltamogram A) není vidět žádný signál, který by se lišil od signálu pozadí. V případě BDD elektrody (voltamogram B) je vidět jeden intenzivní pík při potenciálu +1,3 V, který se s přidavkem safranalů zvyšuje. Tento signál je nižší než signály měřené v octanovém pufru, prostředí kyseliny chlorovodíkové i chloridu draselného. Zároveň je vlivem chloridových iontů posunut do kladnějších hodnot potenciálů. Při aplikaci SPCE elektrody (voltamogramu C) není vidět žádný signál na skenech safranalů oproti pozadí.



Obrázek 43 DPV voltamogramy směsi 0,1 M HCl, 0,1 M KCl a methanolu (1:9:10) (modrá křivka) a přidavku 0,5 mmol l⁻¹ (červená křivka) a 1 mmol l⁻¹ safranalů (rudá křivka) na GCE (A), BDD (B) a SPCE (C).

3.8.4 Square wave voltametrie safranalů

Na obrázku č. 44 jsou zobrazeny voltamogramy v potenciálovém rozpětí -0,2 V až +1,5 V u voltamogramů A a C, voltamogram B je měřen v rozsahu -0,2 V až +1,7 V. U GCE elektrody (voltamogram A) není po přidavku safranalů pozorovatelný žádný signál, který by se lišil od signálu pozadí. Naopak s přidavkem safranalů signál oproti pozadí klesá. V případě BDD (voltamogram B) je vidět jeden pík při potenciálu +1,4 V, který se s přidavkem safranalů zvyšuje. Tento signál je nižší než signály měřené v octanovém pufru, prostředí kyseliny chlorovodíkové i chloridu draselného. Zároveň je vlivem chloridových aniontů posunut do kladnějších hodnot potenciálů. Měření s SPCE elektrodou neposkytlo prokazatelný signál, který by souvisel s přidavkem safranalů.

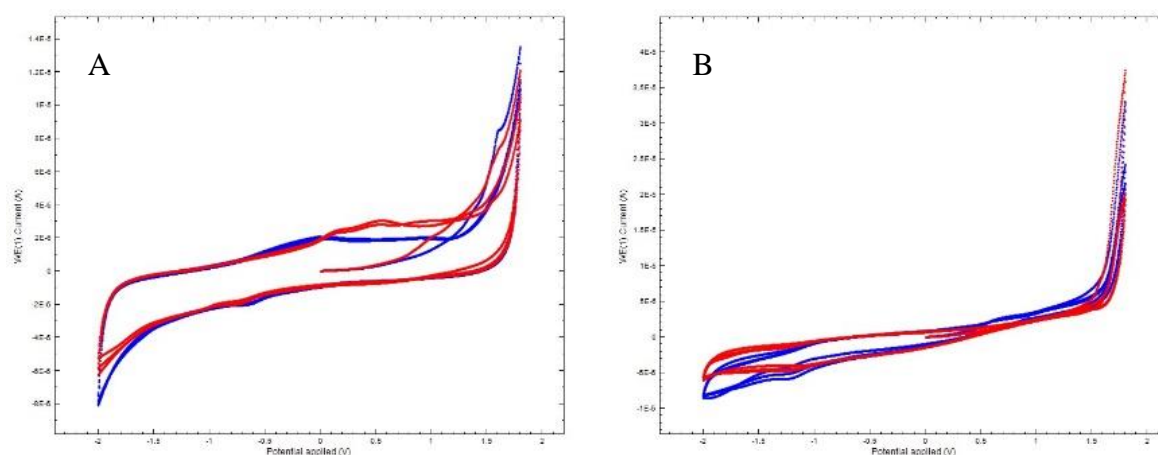


Obrázek 44 SWV voltamogramy směsi 0,1 M HCl, 0,1 M KCl a methanolu (1:9:10) (modrá křivka) a přidavku 0,5 mmol l⁻¹ (červená křivka) a 1 mmol l⁻¹ safranal (rudá křivka) na GCE (A), BDD (B) a SPCE (C).

3.9 Elektrochemická detekce v acetonitrilu

3.9.1 Cyklická voltametrie krocinu

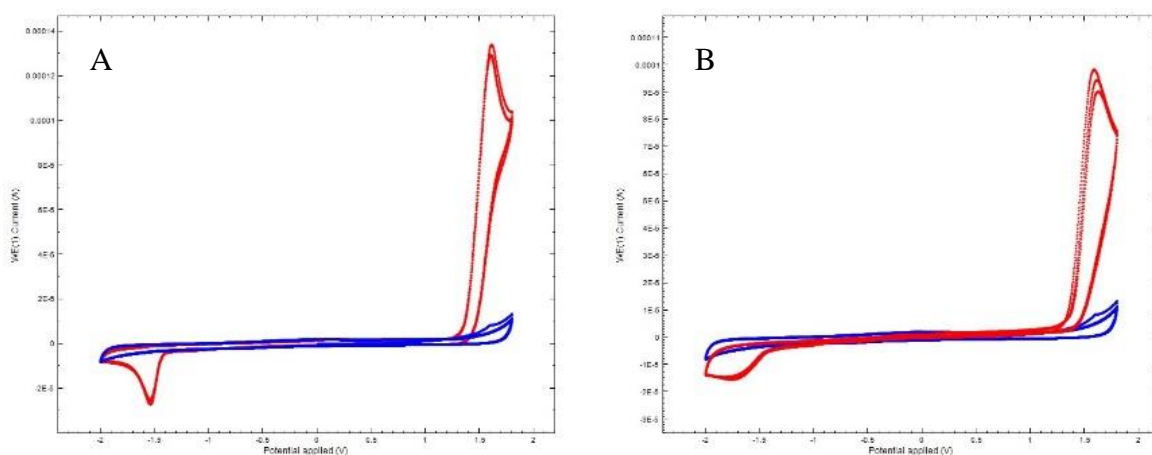
Obrázek č. 45 zobrazuje cyklické voltamogramy v rozmezí potenciálů -2 V až +1,9 V. Voltamogram A byl měřen s GCE elektrodou, voltamogram B pomocí BDD elektrody v prostředí acetonitrilu a 0,1M LiClO₄ (modré skeny). Pro SPCE nebyl voltamogram měřen, jelikož se ukázalo, že acetonitril je pro tuto elektrodu nevhodné prostředí. Následně byl přidán přídavek 0,5 mmol l⁻¹ krocinu (červené skeny). U GCE byl pozorován pouze mírný nárůst proudů oproti pozadí, kdežto na BDD elektrodě byl průběh voltamogramů prakticky stejný. Může to být způsobeno tím, že je krocin v acetonitrilu téměř nerozpustný.



Obrázek 45 Cyklické voltamogramy acetonitrilu s 0,1M LiClO₄ (modrá křivka) a přidavku 0,5 mmol l⁻¹ krocinu (červená křivka) na GCE (A) a BDD (B).

3.9.2 Cyklická voltametrie safranalů

Obrázek č. 46 zobrazuje cyklické voltamogramy v rozpětí potenciálů -2 V až $+1,9$ V. Voltamogram A je měřen s GCE elektrodou, voltamogram B pomocí BDD elektrody v prostředí acetonitrilu a $0,1\text{M LiClO}_4$ (modré skeny). Následně byl přidán přírůstek 3 mmol l^{-1} safranalů (červené skeny). Na voltamogramu A je vidět intenzivní oxidační signál při potenciálu $+1,6$ V a následný redukční signál s vrcholem při $-1,55$ V. U voltamogramu B je vidět oxidační signál při potenciálu $+1,6$ V a široká redukční odezva při $-1,7$ V.

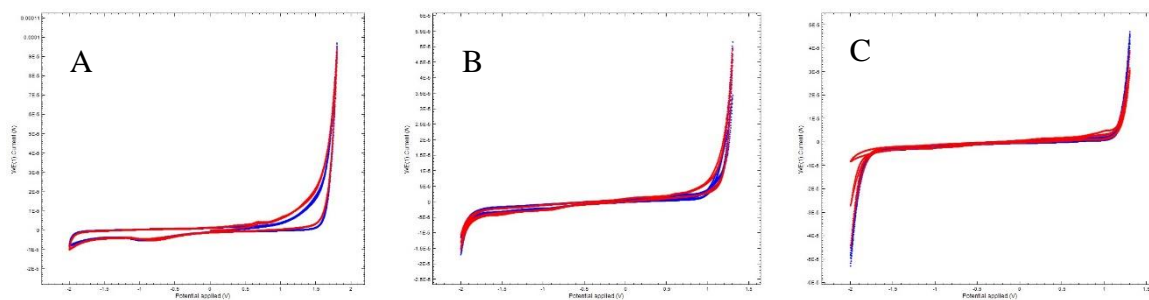


Obrázek 46 Cyklické voltamogramy acetonitrilu s $0,1\text{M LiClO}_4$ (modrá křivka) a přírůstku 3 mmol l^{-1} safranalů (červená křivka) na GCE (A) a BDD (B).

3.10 Elektrochemická detekce v ethanolu

3.10.1 Cyklická voltametrie krocinu

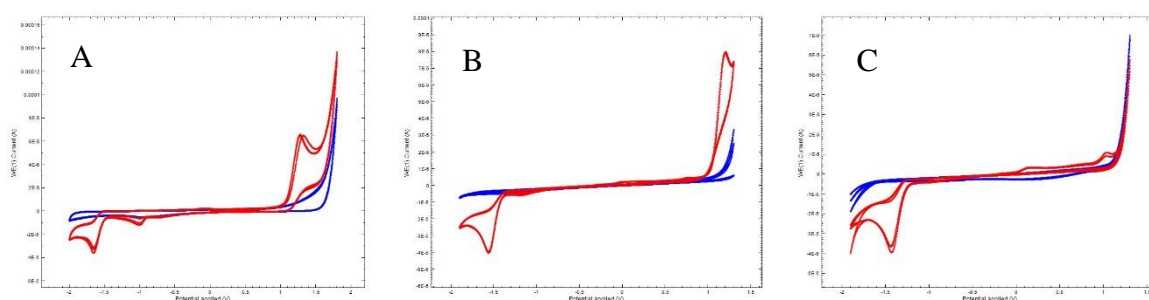
Obrázek č. 47 zobrazuje výsledky měření cyklickou voltametrií v rozmezí potenciálů -2 V až $+1,7$ V u voltamogramu A a -2 V až $+1,3$ V u voltamogramů B a C. Voltamogram A byl změřen s GCE elektrodou, voltamogram B a C pomocí BDD elektrody. Záznamy A a B byly měřeny v prostředí ethanolu a $0,1\text{M LiClO}_4$ (modré skeny), zatímco voltamogram C v ethanolu s $0,1\text{M LiCl}$ pro sledování vlivu přítomnosti chloridových aniontů na posun redoxních signálů. Následně bylo přidán přírůstek $0,5\text{ mmol l}^{-1}$ krocinu (červené skeny). Na obou elektrodách nebyl pozorován žádný signál odlišný od skenu pozadí a u voltamogramu C je vidět malý pík při potenciálu $+1,2$ V. Tyto malé nebo žádné signály mohou být způsobeny tím, že je krocin nedokonale rozpustný v ethanolu.



Obrázek 47 Cyklické voltamogramy ethanolu s $0,1\text{M LiClO}_4$ (A, B, modrá křivka) nebo $0,1\text{M LiCl}$ (C) a přidavku $0,5\text{ mmol l}^{-1}$ krocinu (červená křivka) na GCE (A) a BDD (B, C).

3.10.2 Cyklická voltametrie safranalů

Obrázek č. 48 zobrazuje cyklické voltamogramy v potenciálovém rozmezí -2 V až $+1,7\text{ V}$ u voltamogramu A, -2 V až $+1,3\text{ V}$ u voltamogramů B a C. Voltamogram A byl měřen za pomoci GCE elektrody, voltamogram B a C pomocí BDD elektrody. Voltamogramy A a B byly měřeny v prostředí ethanolu a $0,1\text{M LiClO}_4$ nebo $0,1\text{ M LiCl}$ (modré skeny). Následně bylo přidáno 3 mmol l^{-1} safranalů (červené skeny). Na voltamogramu A je vidět oxidační signál při potenciálu $+1,3\text{ V}$ a následný redukční signály při potenciálu -1 V a $-1,6\text{ V}$. U voltamogramu B je pozorovatelný oxidační signál při potenciálu $+1,15\text{ V}$ a následný redukční při potenciálu $-1,55\text{ V}$. Na voltamogramu C jsou redoxní signály posunuty ke kladnějším potenciálům vlivem chloridů, proto oxidační pík splývá s vlnou rozkladu základního elektrolytu a redukční signál je posunut na $-1,4\text{ V}$. Zároveň se v druhém skenu objevuje nový oxidační signál při potenciálu $+0,2\text{ V}$.

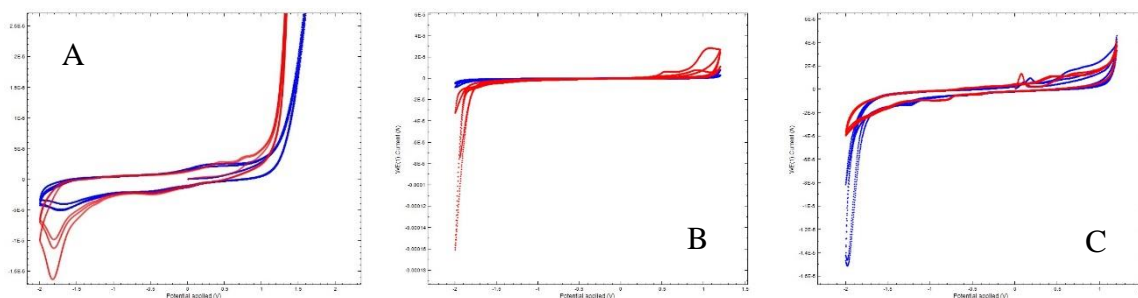


Obrázek 48 Cyklické voltamogramy ethanolu s $0,1\text{M LiClO}_4$ (A, B, modrá křivka) nebo $0,1\text{M LiCl}$ (C) a přidavku 3 mmol l^{-1} safranalů (červená křivka) na GCE (A) a BDD (B, C).

3.11 Elektrochemická detekce v dimethylsulfoxidu

3.11.1 Cyklická voltametrie krocinu

Obrázek č. 49 zobrazuje cyklické voltamogramy v rozmezí potenciálů -2 V až $+1,8$ V u voltamogramu A a -2 V až $+1,3$ V u voltamogramů B a C. Voltamogram A byl měřen s využitím GCE elektrody, voltamogramy B a C pak pomocí BDD elektrody. Voltamogramy A a B byly měřeny v prostředí dimethylsulfoxidu a $0,1\text{M LiClO}_4$ nebo s $0,1\text{ M LiCl}$ u voltamogramu C (modré skeny). Následně byl přidán přídavek $0,5\text{ mmol l}^{-1}$ krocinu (červené skeny). Na voltamogramu A je u GCE viditelný oxidační signál při potenciálu $+0,8$ V a následný redukční při $-1,7$ V. Na BDD (voltamogram B) lze pozorovat oxidační signály při potenciálech $+0,6$ V a $+1,1$ V. U voltamogramu C v přítomnosti LiCl je vidět pouze malý signál při potenciálu $+0,5$ V.

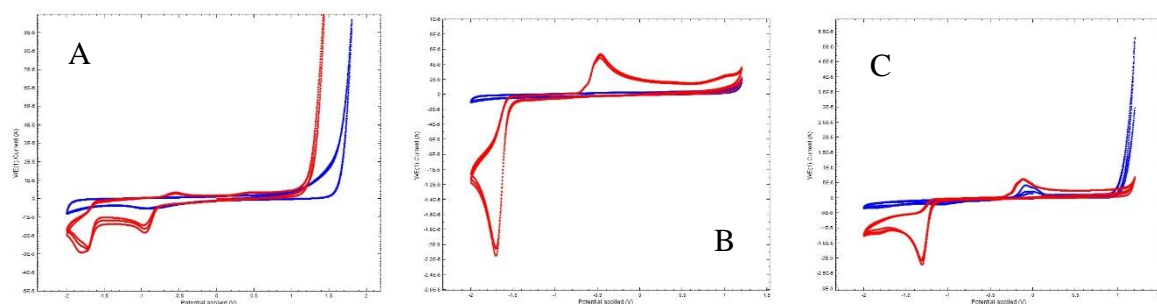


Obrázek 49 Cyklické voltamogramy dimethylsulfoxidu s $0,1\text{M LiClO}_4$ (A, B, modrá křivka) nebo $0,1\text{M LiCl}$ (C) a přídávku $0,5\text{ mmol l}^{-1}$ krocinu (červená křivka) na GCE (A) a BDD (B, C).

3.11.2 Cyklická voltametrie safranalů

Obrázek č. 50 zobrazuje cyklické voltamogramy v rozmezí potenciálů -2 V až $+1,8$ V u voltamogramu A a -2 V až $+1,3$ V u voltamogramu B a C. Voltamogram A byl měřen s GCE elektrodou, voltamogramy B a C pomocí BDD elektrody. Voltamogramy A a B byly měřeny v prostředí dimethylsulfoxidu a $0,1\text{M LiClO}_4$ (modré skeny), zatímco voltamogram C pro porovnání v dimethylsulfoxidu a $0,1\text{ M LiCl}$. Následně byl přidán přídavek 3 mmol l^{-1} safranalů (červené skeny). Na GCE (voltamogram A) lze vidět redukční signály při potenciálech -1 V a $-1,8$ V následovaný oxidačními píky při $-0,6$ V a $0,5$ V. Úplně jiná odezva byla pozorována na BDD (voltamogram B), kde byl zjištěn pouze malý oxidační signál při potenciálu $+1$ V a následně intenzivní redukční pík při potenciálu $-1,7$ V, který doprovázela složená reoxidační odezva s maximem při $-0,5$ V. Signály na voltamogramu C jsou vlivem chloridů posunuty ke

kladnějším potenciálům: malý oxidační signál vymizí, redukční je posunutý na $-1,4$ V a reoxidační na $-0,2$ V.

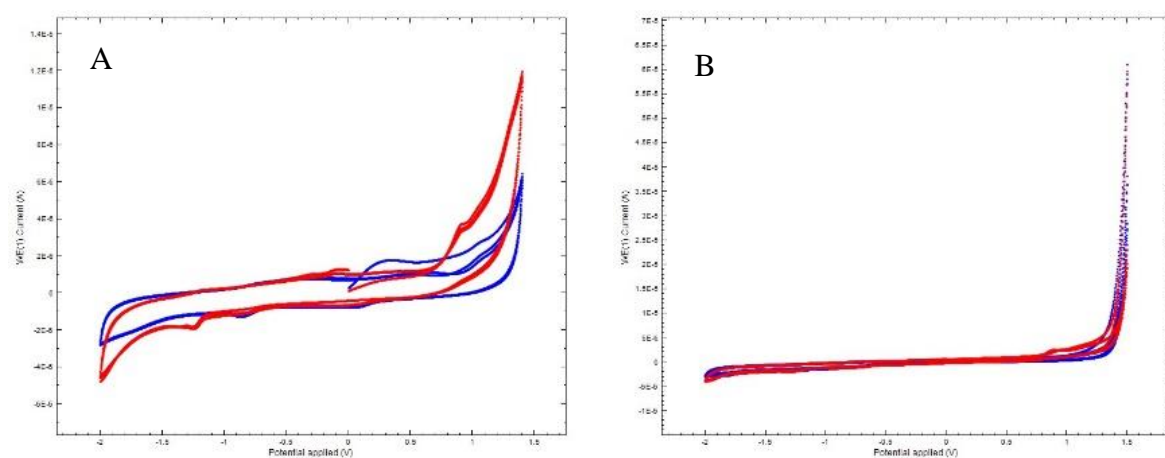


Obrázek 50 Cyklické voltamogramy dimethylsulfoxidu s $0,1\text{M LiClO}_4$ (A, B, modrá křivka) nebo $0,1\text{M LiCl}$ (C) a pří-
davku 3 mmol l^{-1} safranal (červená křivka) na GCE (A) a BDD (B, C).

3.12 Elektrochemická detekce v dimethylformamidu

3.12.1 Cyklická voltametrie krocinu

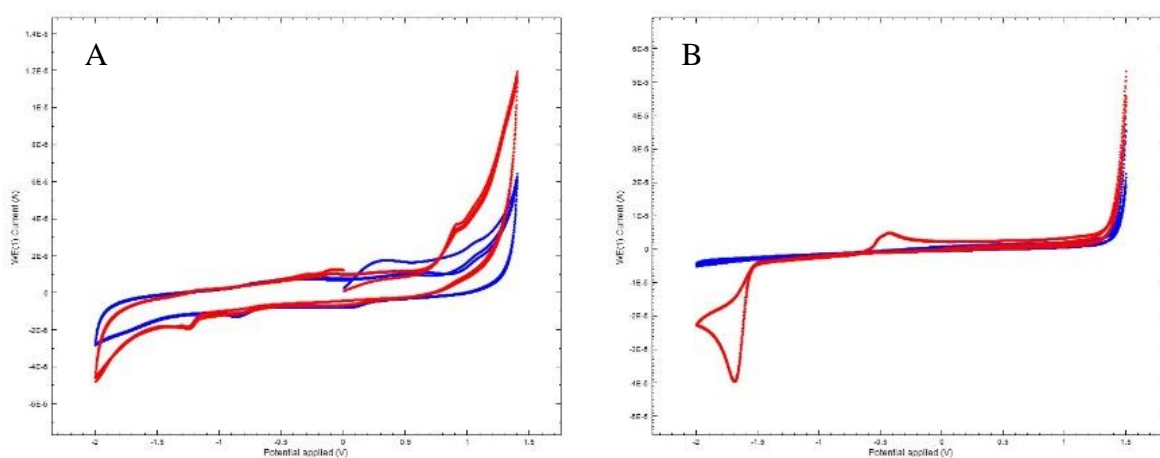
Obrázek č. 51 zobrazuje cyklické voltamogramy v rozmezí potenciálů -2 V až $+1,5$ V. Voltamogram A je měřen GCE elektrodou, voltamogram B pomocí BDD elektrody v prostředí dimethylformamidu a $0,1\text{M LiClO}_4$ (modré skeny). Následně bylo přidáno $0,5\text{ mmol l}^{-1}$ krocinu (červené skeny). Na GCE (voltamogram A) se objevuje oxidační signál při potenciálu $+0,9$ V a redukční při $-1,3$ V. Taktéž je viditelný signál při 0 V, který se ale na začátku neobjevuje a je viditelný až následně po redukci. U BDD (voltamogram B) je viditelný oxidační signál při potenciálu $+0,9$ V.



Obrázek 51 Cyklické voltamogramy dimethylformamidu s $0,1\text{M LiClO}_4$ (A, B, modrá křivka) a přidavku $0,5\text{ mmol l}^{-1}$ kro-
cinu (červená křivka) na GCE (A) a BDD (B).

3.12.2 Cyklická voltametrie safranalu

Obrázek č. 52 znázorňuje cyklické voltamogramy na GCE (voltamogram A) v rozmezí potenciálů -2 V až $+1,3$ V a BDD (voltamogram B) v rozmezí -2 V až $+1,5$ V v prostředí dimethylformamidu a $0,1$ M LiClO_4 (modré skeny). Následně bylo přidáno 3 mmol l^{-1} safranal (červené skeny). Na voltamogramu A je vidět oxidační signál při potenciálu $+1$ V a následný redukční signál s vrcholem při $-1,2$ V. Dále je patrný signál při 0 V, který se ale na začátku měření neobjevuje a je viditelný až následně po redukci. U voltamogramu B je vidět nejprve redukční signál při $-1,7$ V a pak reoxidační signál při potenciálu $+0,4$ V, podobně jako u DMSO.

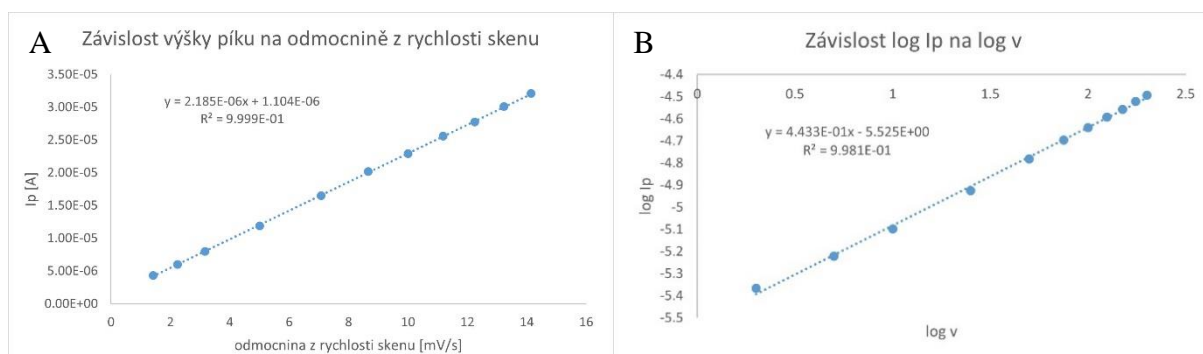


Obrázek 52 Cyklické voltamogramy dimethylformamidu s $0,1\text{M LiClO}_4$ (A, B, modrá křivka) a přidavku 3 mmol l^{-1} safranal (červená křivka) na GCE (A) a BDD (B).

3.13 Vliv rychlosti skenu při elektrochemické oxidaci safranal

Pro další experimenty byl vybrán pouze safranal, pro který byla postupně optimalizována elektrochemická detekce a zjištěny analytické parametry jeho stanovení. V prvním kroku byla studováno, zda je elektrochemická oxidace safranal na GCE řízená difuzí nebo adsorpcí v acetonitrilu nebo ethanolu. Graf A na obrázku č. 53 popisuje závislost výšky píku na odmocnině z rychlosti skenu v prostředí acetonitrilu. Koeficient determinace ($0,9999$) je velmi blízký 1 z čehož vyplývá, že je elektrochemický děj řízen difuzí. Graf B popisuje závislost logaritmu výšky píku na logaritmu rychlosti skenu. Hodnota směrnice přímky ($0,44$) je blízká teoretické hodnotě $0,5$, což potvrzuje, že je děj řízený difuzí. Pro ověření byl zopakován pokus v prostředí ethanolu, kde koeficient determinace grafu závislosti výšky píku na odmocnině z rychlosti skenu vyšel $0,9988$ což je blízké hodnotě 1 . Směrnice grafu popisující závislost logaritmu

rychlosti skenu na logaritmu výšky píku vyšla 0,4551, což je hodnota blízká teoretické hodnotě 0,5 potvrzující, že se děj řídí difuzí.



Obrázek 53 Závislost výšky píku oxidace 3 mmol l⁻¹ safranalů na odmocnině z rychlosti skenu (A) a závislost $\log I_p$ na \log rychlosti skenu (B).

3.14 Volba prostředí pro optimalizaci metody stanovení safranalů

Organické rozpouštědlo (ACN nebo EtOH, vždy s 0,1 M LiClO₄) pro optimalizaci parametrů voltametrických technik a vlastní stanovení safranalů bylo zvoleno na základě provedení kalibrací při parametrech diferenční pulzní a square wave voltametrie nastavených výrobcem. Pro DPV byly použity následující parametry: potenciál kroku 5 mV, modulační amplituda (amplituda pulzu) 25 mV, modulační čas (čas pulzu) 50 ms a interval mezi pulzy 500 ms. Pro SWV byly parametry tyto: potenciál kroku 5 mV, amplituda 20 mV a frekvence 25 Hz. Prostředí ethanolu a acetonitrilu bylo měřeno pomocí GCE a BDD elektrod. Koncentrace měřeného roztoku safranalů byly 10, 20, 50, 100, 200 a 300 μmol l⁻¹. Vyšší citlivosti kalibračních závislostí mají dle tabulek č. 1 a 2 měřené roztoky acetonitrilu, protože směrnice mají vyšší hodnotu, než je tomu u směrnice kalibrací v případě ethanolu. Zároveň byla zjištěna vyšší citlivost na GCE elektrodě než na BDD. Linearita kalibrací byla nejlepší u měření s GCE elektrodou v EtOH. Velká nevýhoda prostředí ethanolu je ale ta, že ani v jednom případě nebyl detekovatelný signál při 10 μmol l⁻¹ safranalů. U měření za pomoci BDD elektrody a DPV techniky byl detekovatelný signál až při 100 μmol l⁻¹ a u square wave až při 200 μmol l⁻¹ safranalů. Z důvodu nemožnosti detekce nižších koncentrací safranalů a lepší citlivosti stanovení byl pro další experimenty vybrán acetonitril.

Tabulka 1 Parametry kalibrací elektrochemické detekce safranalů zjištěných z výšek píků.

Výška píku		DPV		SWV	
		ACN	EtOH	ACN	EtOH
BDD	Směrnice [A l mol ⁻¹]	0,0076	0,0022	0,0214	-
	R ²	0,9954	0,9899	0,9781	-
	Úsek [nA]	72,26	-187,1	321,11	-
GCE	Směrnice [A l mol ⁻¹]	0,01125	0,0058	0,0394	0,0227
	R ²	0,9902	0,9997	0,9956	0,9622
	Úsek [nA]	108,8	-53,29	230	261,4

Tabulka 2 Parametry kalibrací elektrochemické detekce safranalů zjištěných z ploch píků.

Plocha píku		DPV		SWV	
		ACN	EtOH	ACN	EtOH
BDD	Směrnice [A l mol ⁻¹]	0,0013	0,0002	0,0040	-
	R ²	0,9985	0,9759	0,9929	-
	Úsek [nA]	4,69	-23,01	25,467	-
GCE	Směrnice [A l mol ⁻¹]	0,0016	0,0009	0,0054	0,0037
	R ²	0,9974	0,9992	0,9996	0,9699
	Úsek [nA]	0,3043	-14,69	-15,58	17,5

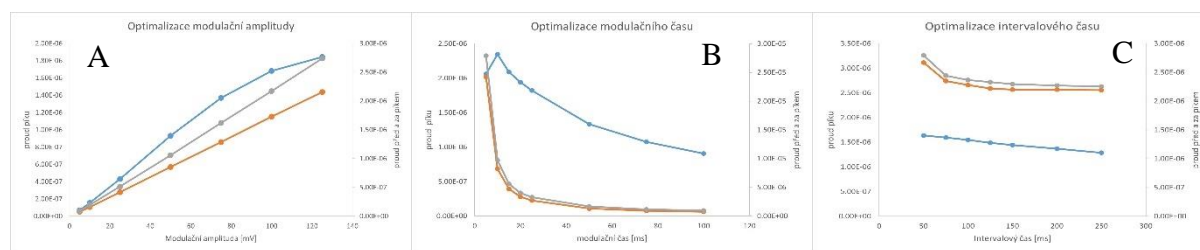
3.15 Optimalizace parametrů elektrochemické detekce safranalů

Cílem optimalizace parametrů detekce bylo najít kompromis mezi co největší výškou píků a co nejnižšími proudy pozadí. V následujících kapitolách je proud píku oxidace safranalů

znázorněn modrou křivkou a proudy pozadí jsou oranžové a šedé křivky. Oranžová zobrazuje proud těsně před píkem a šedá proud těsně za píkem. Byly optimalizovány techniky DPV a SWV na GCE a BDD elektrodách v prostředí acetonitrilu a $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ safranal. SPCE elektroda nebyla použita, jelikož není vhodná do tohoto prostředí. Optimalizované parametry pro DPV byly modulační amplituda, modulační čas a intervalový čas. Pro SWV to byla amplitudy, frekvence a potenciál kroku.

3.15.1 Optimalizace pro elektrodu ze skelného uhlíku

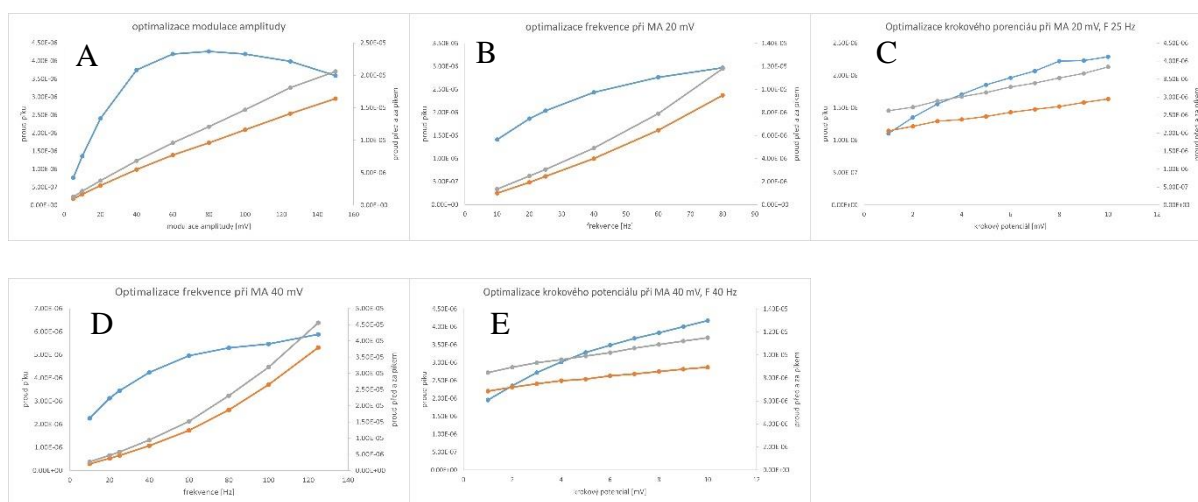
Obrázek č. 54 zobrazuje grafy optimalizací jednotlivých parametrů DPV pro GCE elektrodu. Obrázek A zobrazuje vliv modulační amplitudy na výšku píku safranal. Jako optimální byla zvolena hodnota 75 mV, při které jsou vysoké proudy píků a proudy pozadí jsou relativně nízké. Obrázek B zobrazuje závislost modulačního času na proudy píku a pozadí, kde s delší dobou modulačního času klesá proud píku, ale prudčeji také proud pozadí. Vzhledem k signálu píku by bylo nejlepší zvolit hodnotu 10 mV, kdy je signál nejintenzivnější, ale je značně ovlivněn proudy pozadí. Proto byla jako kompromis zvolena hodnota 20 mV, kde je signál intenzivní, ale zároveň je nižší pozadí. Jako poslední byl optimalizován parametr intervalového času, který je znázorněn na obrázku C. Čím je tento interval delší, tím více signál klesá. Hodnota pro intervalový čas byla zvolena jako 100 ms. Optimalizací těchto parametrů se zvýšil signál safranal a zkrátil se čas analýzy.



Obrázek 54 Optimalizace parametrů DPV pro GCE elektrodu: modulační amplituda (A), modulační čas (B) a čas intervalu (C).

Obrázek č. 55 zobrazuje grafy optimalizací parametrů SWV pro GCE elektrodu. Obrázek A zobrazuje optimalizaci modulační amplitudy, pro kterou byly zvoleny hodnoty 20 mV a 40 mV. Při amplitudě 40 mV byl vyšší pík oxidace safranal oproti 20 mV, ale následná kalibrace měla horší linearitu. Zároveň se od hodnoty 40 mV prudce zvyšuje proud pozadí. Ukázalo se, že hodnota 20 mV je přednastavena jako výchozí parametr pro tuto metodu. Proto byly testovány parametry pro obě hodnoty s následným dalším rozhodnutím, která varianta bude v konečném

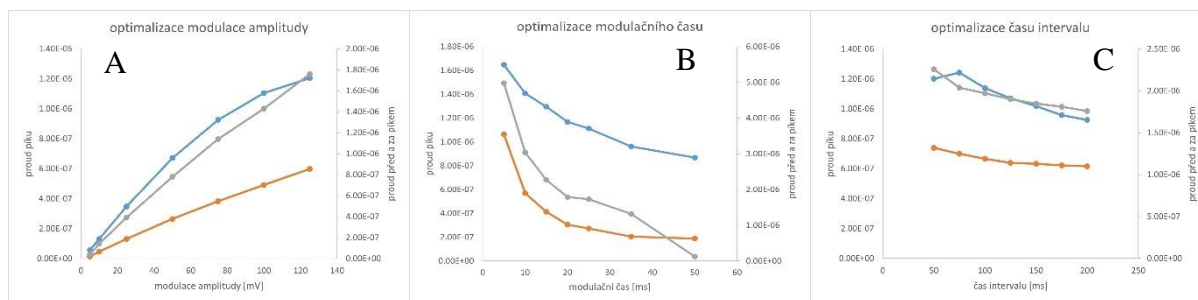
důsledků více vyhovující. Obrázky B a D znázorňují optimalizaci parametru frekvence: obrázek B pro modulační amplitudu 20 mV (výchozí parametr) a obrázek D pro modulační amplitudu 40 mV (optimální parametr pro velkou výšku píku). V případě výchozí amplitudy byla jako optimální frekvence zvoleno 25 Hz, což se shoduje s přednastaveným parametrem pro tuto metodu. U modulační amplitudy byla určena vhodná frekvence 40 Hz, jelikož poskytuje nejvyšší proudy píku oproti pozadí. Obrázky C a E zobrazují vliv potenciálu kroku. Pro defaultní parametry je vyhodnocena hodnota 5 mV jako nejlepší, což se taktéž shoduje s přednastavenými parametry. Pro optimální parametry byla zvolena hodnota 10 mV.



Obrázek 55 Optimalizace parametrů SWV pro GCE elektrodu: modulační amplituda (A), frekvence (B) a potenciál kroku (C) pro amplitudu 20 mV a frekvence (D) a potenciál kroku pro amplitudu 40 mV (E).

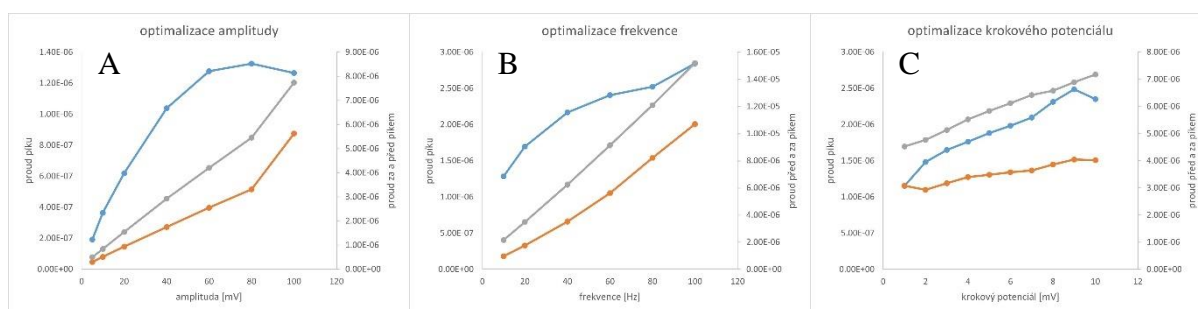
3.15.2 Optimalizace pro borem dopovanou diamantovou elektrodu

Obrázek č. 56 zobrazuje grafy optimalizací jednotlivých parametrů DPV u BDD elektrody. Obrázek A zobrazuje optimalizaci modulační amplitudy, pro kterou byla zvolena hodnota 75 mV pro nejvyšší proudy píků v porovnání s pozadím. Od této hodnoty se už výšky píků zvyšují méně, ale pozadí narůstá stále. Obrázek B zobrazuje vliv modulačního času na proudy píku a pozadí. Byla vyhodnocena hodnota 20 mV jako kompromis oproti výšce signálu a pozadí, protože pro vyšší modulační časy je signál příliš nízký. Jako poslední byl optimalizován čas intervalu, který můžeme vidět na obrázku C. Čím je tento interval delší, tím hodnota signálu klesá. Optimální hodnota byla v tomto případě 75 ms, kdy je signál i nejintenzivnější. Optimalizací těchto parametrů se zvýšil signál safranal a zkrátil se čas analýzy.



Obrázek 56 Optimalizace parametrů DPV pro BDD elektrodu: modulační amplituda (A), modulační čas (B) a čas intervalu (C).

Obrázek č. 57 zobrazuje grafy optimalizací parametrů SWV pro BDD elektrodu. Obrázek A zobrazuje optimalizaci modulační amplitudy, kde byla vyhodnocena jako nejlepší hodnota 60 mV, kdy je patrný velký nárůst výšky píku v porovnání s pomalu se zvyšujícím pozadím. Obrázek B představuje optimalizaci frekvence. Byla zvolena hodnota 40 Hz, při které je vysoký proud píku a zároveň nízké pozadí. Na obrázku C je optimalizace potenciálu kroku, kdy byla zvolena hodnota 9 mV pro vyšší proudy píku v porovnání s pozadím.



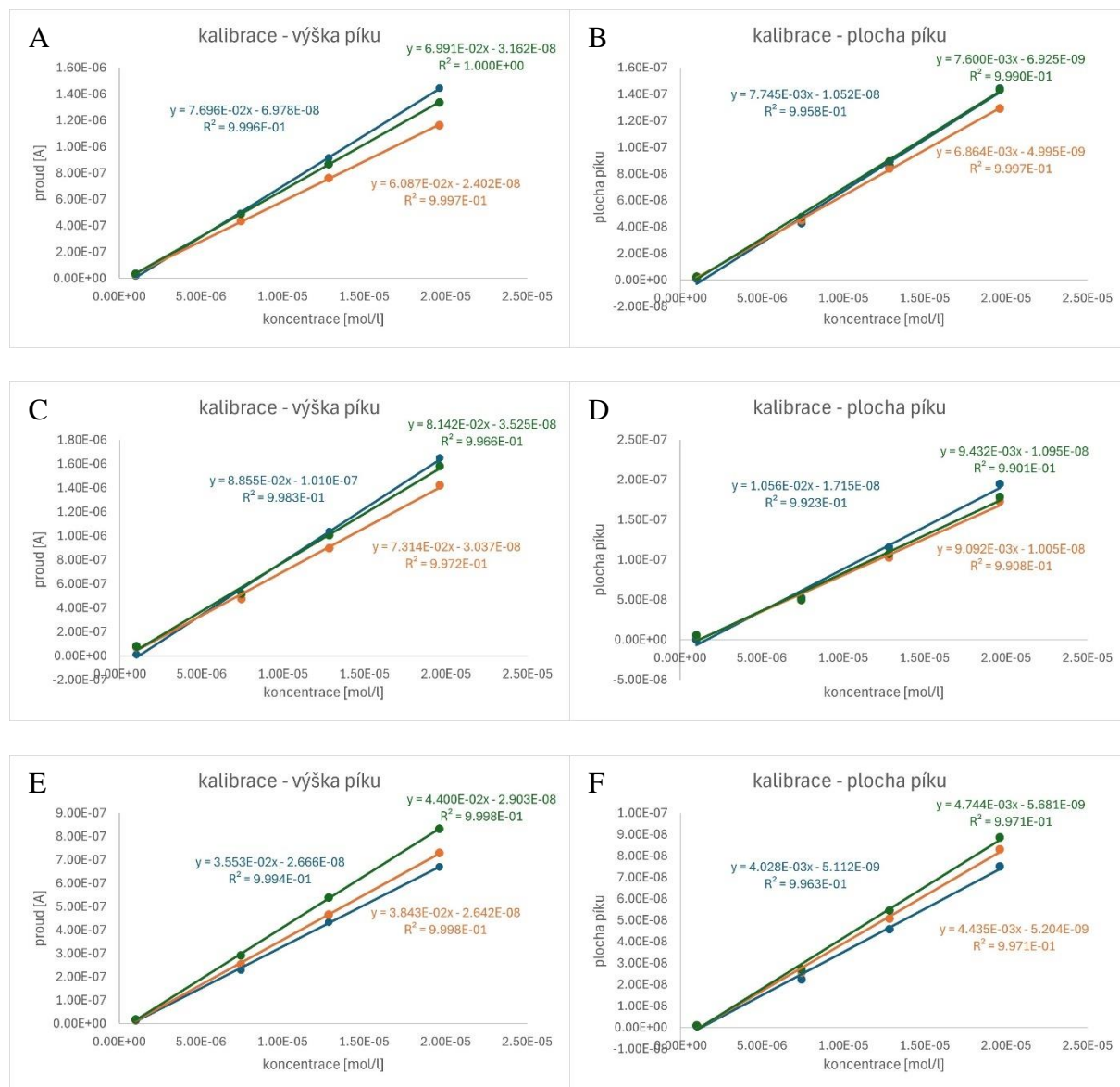
Obrázek 57 Optimalizace parametrů SWV pro BDD elektrodu: modulační amplituda (A), frekvence (B) a potenciál kroku (C).

3.16 Analytické parametry elektrochemického stanovení safranalů

3.16.1 Vliv leštění povrchu elektrody ze skelného uhlíku na směrnici kalibrace

Obrázek č. 58 ukazuje kalibrační závislosti měřené pokaždé na nově vyleštěném povrchu GCE elektrody, aby se zjistilo, jak moc je kalibrace opakovatelná s novým povrchem. Kalibrační grafy A a B byly měřeny technikou diferenční pulzní voltametrie za optimálních podmínek (modulační amplituda 75 mV, modulační čas 20 ms a intervalový čas 100 ms). Grafy C a D byly měřeny za pomoci techniky square wave voltametrie za optimálních podmínek (potenciál kroku 10 mV, amplituda 40 mV a frekvence 40 Hz). Grafy E a F byly měřeny za pomoci techniky square wave voltametrie za defaultních podmínek (potenciál kroku 5 mV, amplituda

20 mV a frekvence 25 Hz). Měření probíhalo v prostředí acetonitrilu s 0,1 M LiClO₄ a s koncentracemi safranalu 1, 7,5, 13 a 20 μmol l⁻¹. Grafy mají odlišné hodnoty směrnic, z toho vyplývá, že leštění elektrody je nezanedbatelným parametrem pro měření a je nutno na něj brát ohled.

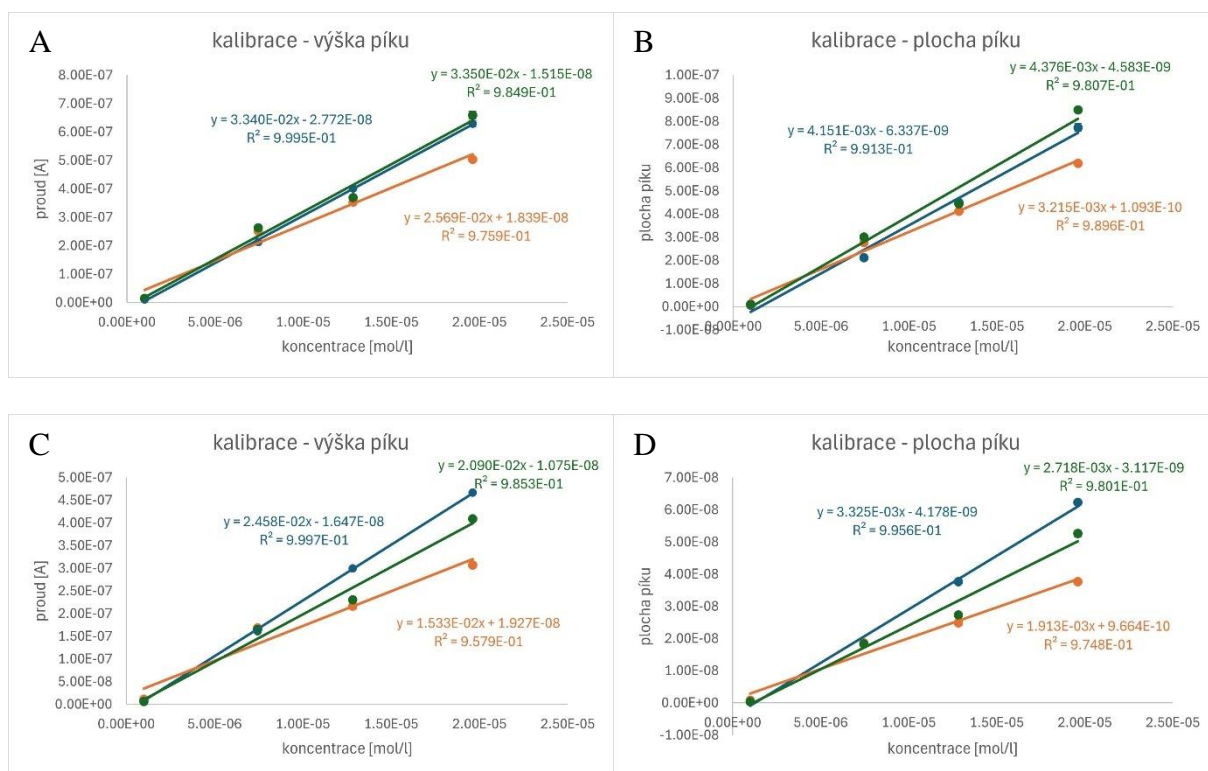


Obrázek 58 Opakovatelnost kalibračních závislostí safranalu s novým povrchem GCE elektrody metodou DPV (A a B), SWV za výchozích parametrů (C a D) a SWV za optimálních parametrů (E a F).

3.16.2 Vliv nové borem dopované elektrody na směrnici kalibrace

Obrázek č. 59 ukazuje kalibrační závislosti měřené vždy s novými BDD elektrodami, aby se zjistilo, jak moc je kalibrace safranalu opakovatelná při použití nového tištěného senzoru. Kalibrační grafy A a B byly měřeny technikou diferenční pulzní voltametrie za optimálních

podmínek (modulační amplituda 75 mV, modulační čas 20 ms a intervalový čas 75 ms). Grafy C a D byly měřeny za pomoci techniky square wave voltametrie za optimálních podmínek (potenciál kroku 9 mV, amplituda 60 mV a frekvence 40 Hz). Měření probíhalo v prostředí acetonitrilu s 0,1 M LiClO₄ a s koncentracemi safranalů 1, 7,5, 13 a 20 μmol l⁻¹. Grafy mají značný rozptyl směrnic, z toho vyplývá, že použití nových senzorů je nezanedbatelným parametrem pro měření a je nutno na něj brát ohled. Plochy pracovních BDD elektrod jednotlivých senzorů se mohou trochu lišit, což má vliv na výslednou proudovou odezvu.



Obrázek 59 Opakovatelnost kalibračních závislostí safranalů za použití nových BDD elektrod metodou DPV (grafy A a B) a SWV (graf C a D).

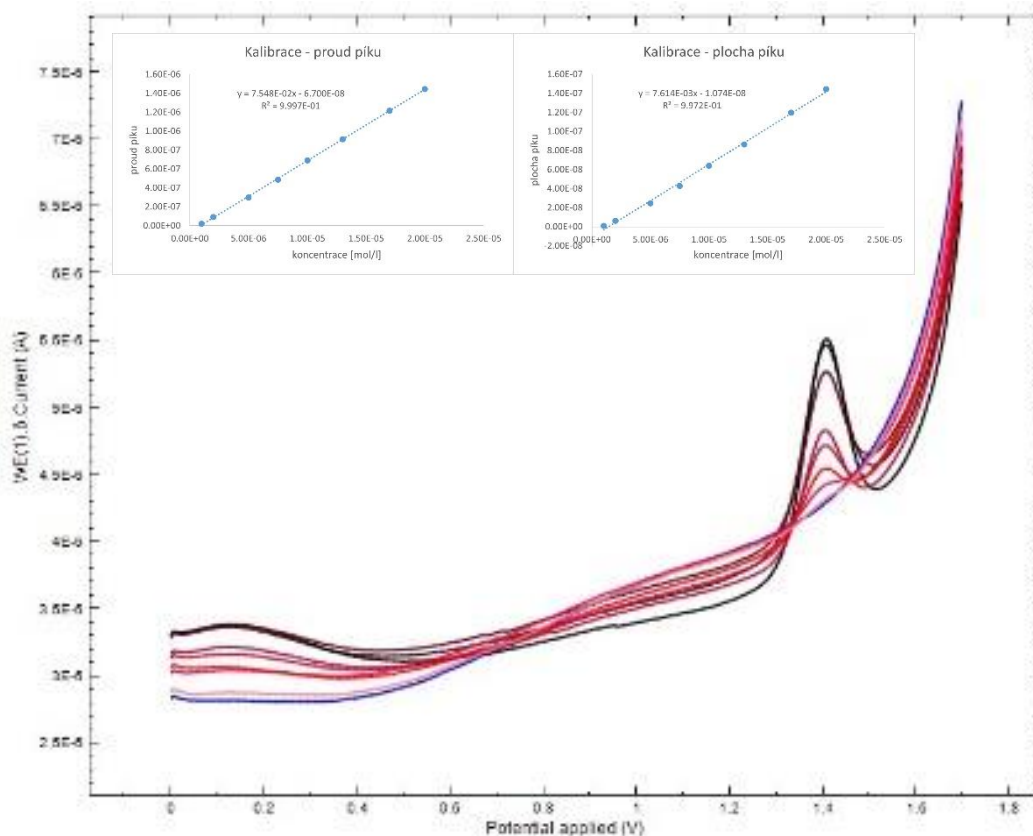
3.16.3 Kalibrační závislosti nízkých koncentrací safranalů

Kalibrační závislosti byly měřeny GCE a BDD elektrodami metodou diferenční pulzní nebo square wave voltametrie za optimalizovaných nebo výchozích parametrů v prostředí acetonitrilu a 0,1M LiClO₄. Na obrázku je viditelný voltamogram, kde modrý sken znázorňuje pozadí a následné červené skeny 0,5, 1, 2, 5, 7,5, 10, 13, 17 a 20 μmol l⁻¹ safranalů. Měření každé koncentrace bylo pětkrát opakováno. Pro větší přehlednost je vždy uveden jen jeden sken pro každou koncentraci. Parametry LOD (limit detekce) a LOQ (limit kvantifikace) byly

vypočítány vzorcem $LOD = \frac{3 \cdot s}{k}$ a $LOQ = \frac{10 \cdot s}{k}$, kde s je směrodatná odchylka úseku kalibrace a k směrnice kalibrace, které byly zjištěny programem Origin.

3.16.3.1 Kalibrační závislosti nízkých koncentrací safranalů na elektrodě ze skelného uhlíku

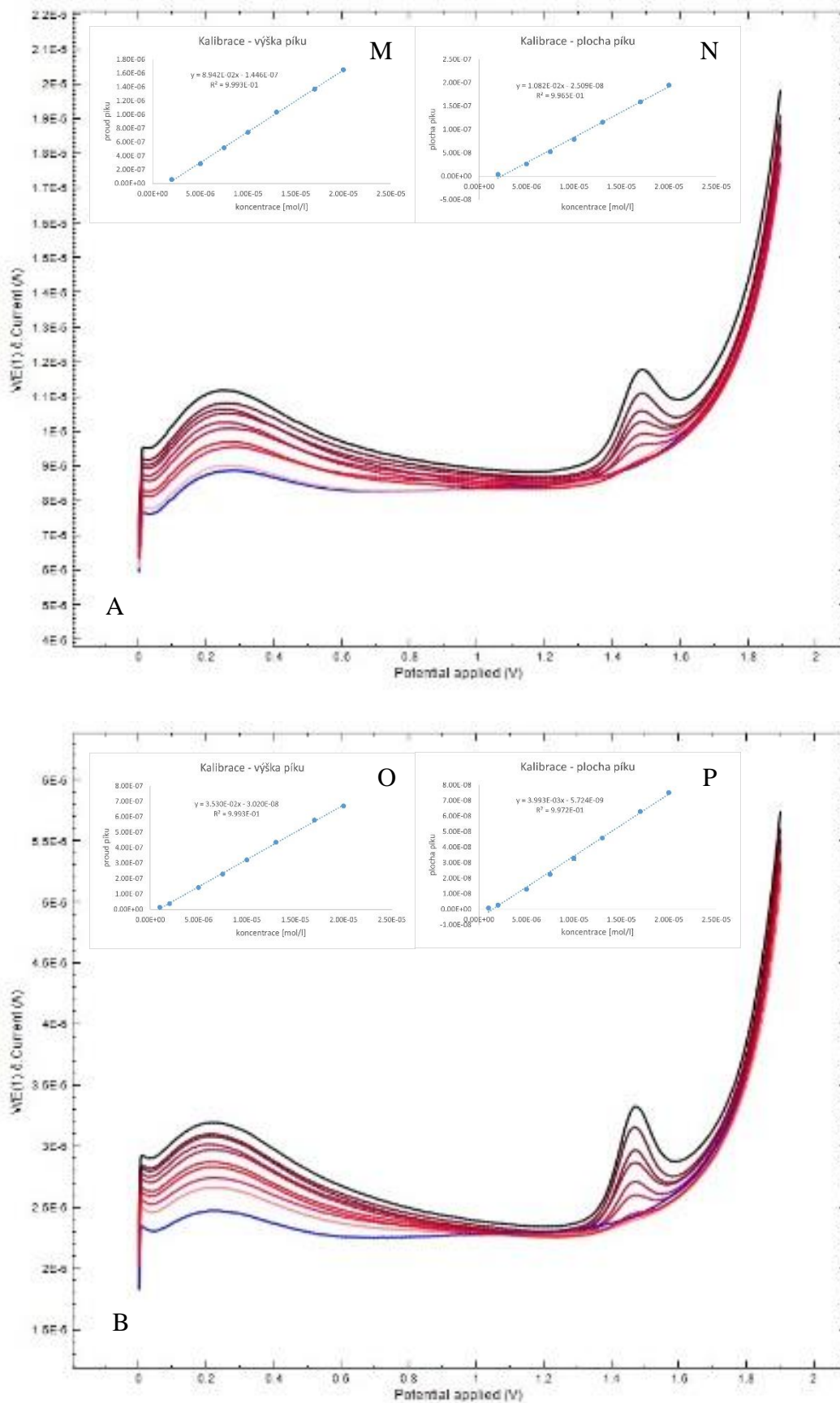
Obrázek č. 60 vyobrazuje voltamogramy a kalibrační závislosti měřené technikou DPV. Z výšek píků byly určeny parametry $LOD = 1,24 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ a $LOQ = 4,14 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$. Je patrná dobrá linearita, jelikož se R^2 blíží 1. Citlivost detekce (směrnice kalibrace) je vyšší než u většiny kalibrací níže. Z kalibrační závislosti konstruované z ploch píků byly spočítány parametry $LOD = 3,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ a $LOQ = 1,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. Linearita kalibrace je taktéž blízká 1 a citlivost je vysoká. Byla testována statistická významnost úseku za pomoci t-testu programem Adstat. Bylo zjištěno, že úsek je statisticky významný, tudíž pro budoucí analýzy nelze použít metodu vícenásobného standardního přídatku k vyhodnocení výsledků.



Obrázek 60 Kalibrační DPV voltamogramy safranalů za optimálních podmínek na GCE elektrodě a příslušné kalibrace z výšek (vlevo) a ploch píků (vpravo).

Na obrázku č. 61 jsou zobrazeny voltamogramy a kalibrační závislosti měřené technikou SWV za optimálních podmínek (obrázek A) a výchozích podmínek (obrázek B). Vypočítané analytické parametry z výšek píků $LOD = 6,28 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ a $LOQ = 2,09 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ pro optimální podmínky (graf M) a $LOD = 1,81 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ a $LOQ = 6,03 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ pro výchozí podmínky

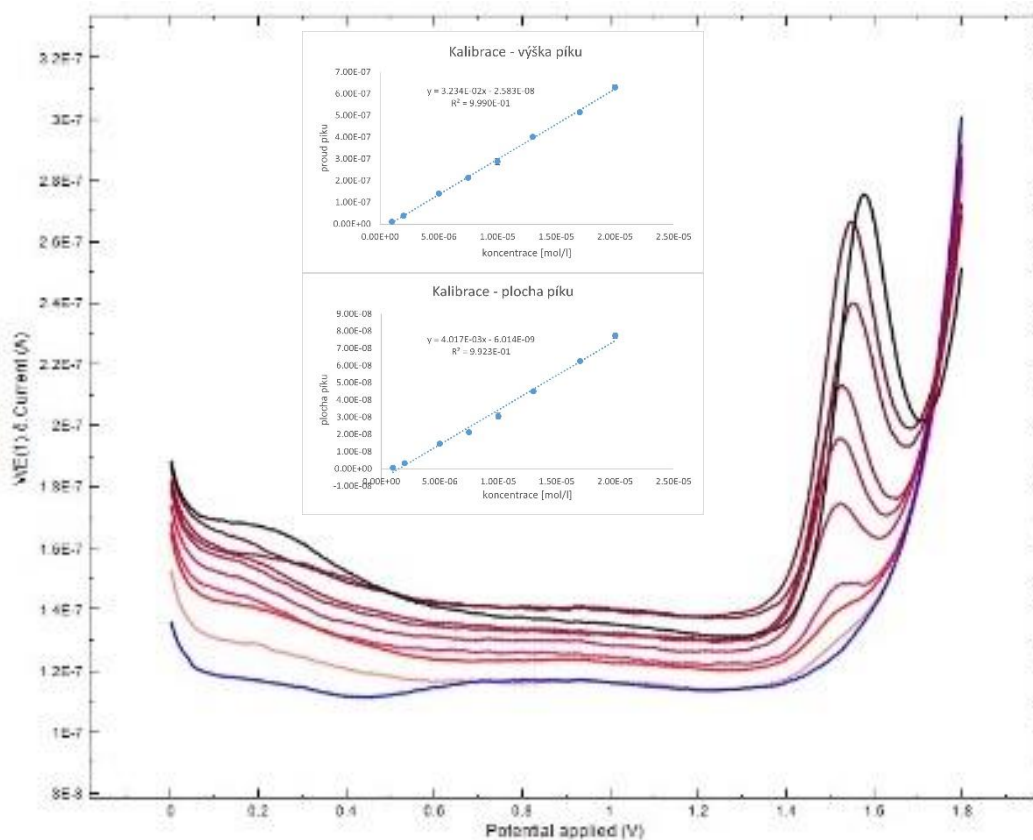
(graf O). Je tedy zřejmé, že s výchozími parametry má SWV metoda nižší LOD a LOQ a je schopna detekovat i koncentrace safranalů, které nejsou měřitelné u SWV s optimálními parametry. Zároveň má kalibrace s výchozími parametry SWV lepší linearitu, ale horší citlivost oproti kalibraci s optimálními parametry. Byly spočítány taktéž hodnoty LOD a LOQ z kalibračních ploch píků $\text{LOD} = 1,43 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ a $\text{LOQ} = 4,96 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ pro optimální podmínky (graf N) a $\text{LOD} = 3,46 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ a $\text{LOQ} = 1,15 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ pro výchozí podmínky (graf P). Nejnižší hodnoty LOD a LOQ a nejlepší linearitu kalibračních poskytovala metoda DPV. Nejvyšší citlivost vykazovala metoda SWV za optimálních parametrů. Je testována statistická významnost úseku za pomoci t-testu programem Adstat. Bylo zjištěno, že úsek je statisticky významný, tudíž pro budoucí analýzy nelze použít metodu vícenásobného standardního přídatku k vyhodnocení výsledků.



Obrázek 61 Kalibrační SWV voltamogramy za optimálních podmínek (vpravo) a za výchozích podmínek (vlevo) na GCE elektrodě a příslušné kalibrace z výšek (vpravo) a ploch píků (vlevo).

3.16.3.2 Kalibrační závislosti nízkých koncentrací safranalu na borem dopované diamantové elektrodě

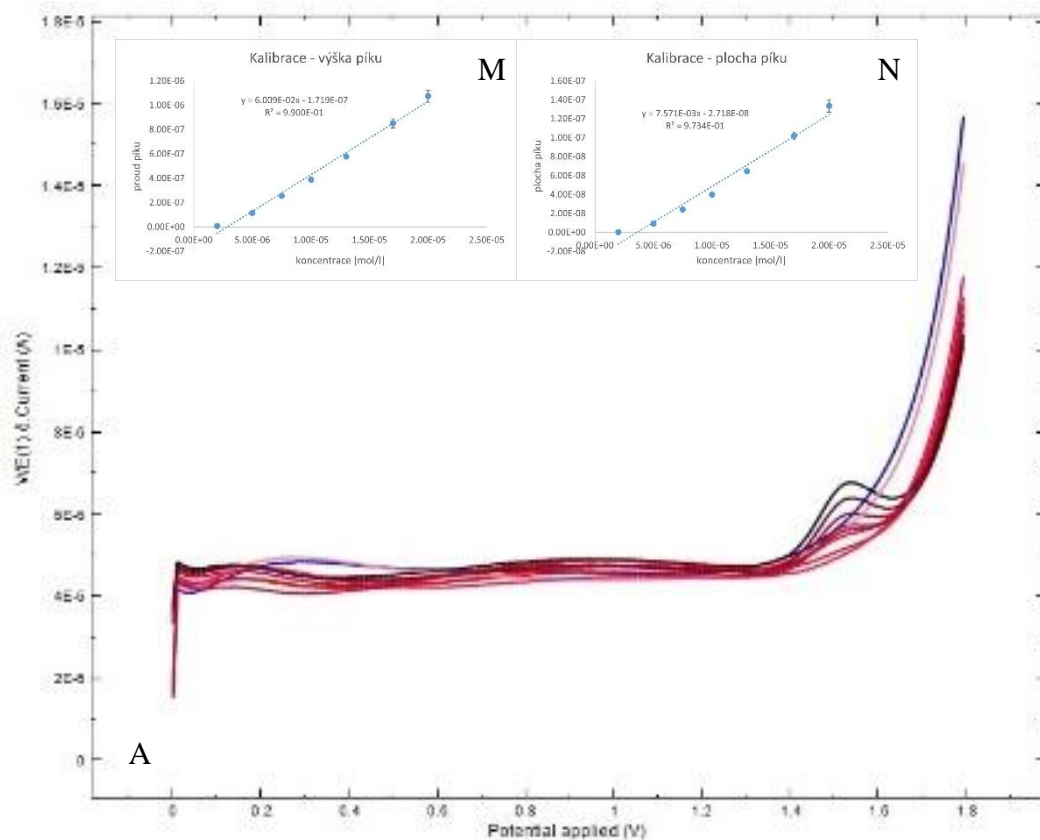
Obrázek č. 62 zobrazuje voltamogramy měřené technikou diferenční pulzní voltametrie a kalibrační závislosti, kde byly z výšek píků určeny parametry $LOD = 2,59 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ a $LOQ = 8,64 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$. Je zde patrná dobrá linearita, jelikož se R^2 blíží 1. Citlivost je horší než u většiny kalibrací. Z kalibrace z ploch píků byly vypočítány $LOD = 5,39 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ a $LOQ = 1,80 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. Linearita kalibrace i citlivost jsou v porovnání s GCE také horší. Byla testována statistická významnost úseku za pomoci t-testu programem Adstat. Bylo zjištěno, že úsek je statisticky významný, tudíž pro budoucí analýzy nelze použít metodu vícenásobného standardního přídatku k vyhodnocení výsledků.

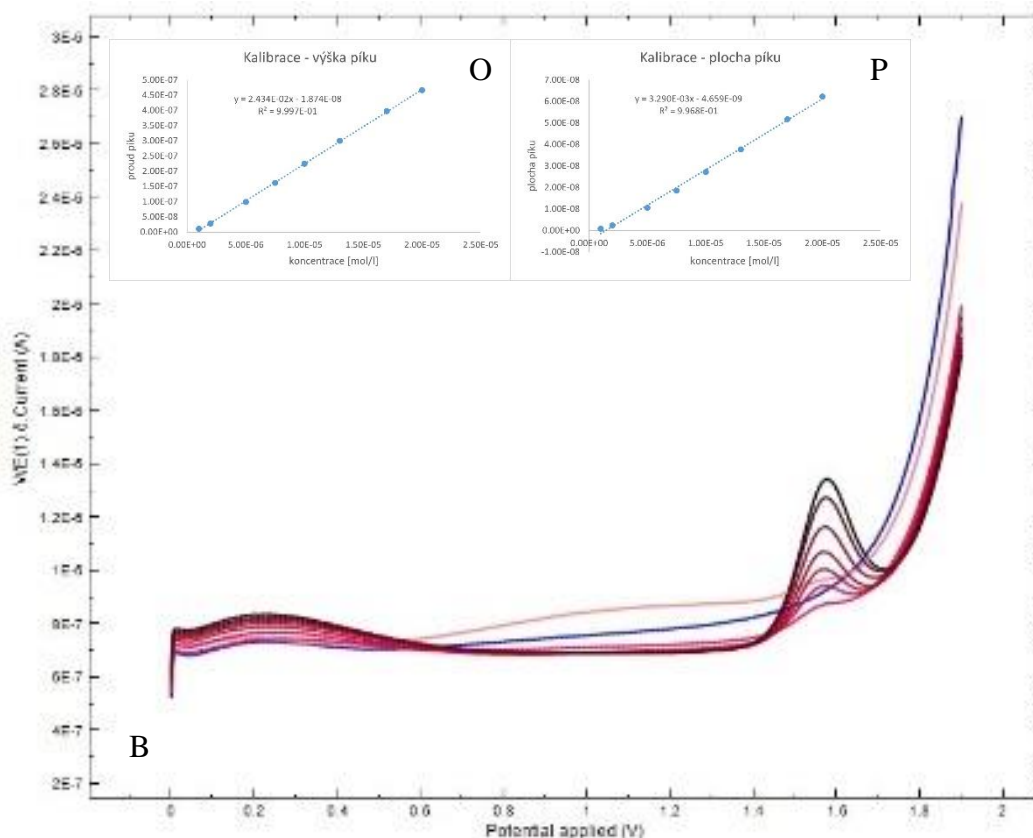


Obrázek 62 Kalibrační DPV voltamogramy safranalu za optimálních podmínek na BDD elektrodě a příslušné kalibrace z výšek (nahore) a ploch píků (dole).

Obrázek č. 63 zobrazuje voltamogramy měřené technikou square wave voltametrie za optimálních podmínek (A) a defaultních podmínek (B) a kalibrační závislosti. Vypočítané parametry $LOD = 7,91 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ a $LOQ = 2,64 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ pro optimální podmínky (graf M) a $LOD = 1,25 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ a $LOQ = 4,18 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ pro defaultní podmínky (graf O). Je tedy zřejmé, že s defaultními parametry má metoda nižší LOD a LOQ a je schopna detekovat i

koncentrace, které nejsou detekovatelné s optimálními parametry. Zároveň má kalibrace s defaultními parametry lepší linearitu ale horší citlivost. Byly taktéž spočítány tytéž parametry za pomoci ploch píku. $LOD = 1,49 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ a $LOQ = 4,98 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ pro optimální parametry (graf N) a $LOD = 3,40 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ a $LOQ = 1,14 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ pro defaultní podmínky (graf P). Lepší schopnost detekce a kvantifikace má kalibrace měřena za defaultních podmínek, zároveň má lepší linearitu, ale horší citlivost. Nejlepší schopnost detekce byla zjištěna pomocí DPV, linearitu má nejlepší metoda SWV za optimálních parametrů a citlivost metoda SWV za optimálních parametrů. Byla testována statistická významnost úseků za pomoci t-testu programem Adstat. Bylo zjištěno, že úseky jsou statisticky významný, tudíž pro budoucí analýzy nelze použít metodu vícenásobného standardního přídatku k vyhodnocení výsledků.





Obrázek 63 Kalibrační SWV voltamogramy za optimálních podmínek (obrázek A) a za výchozích podmínek (obrázek B) na BDD elektrodě a příslušné kalibrace z výšek (vlevo) a ploch píků (vpravo).

3.16.4 Výtěžnost stanovení safranalů

Pro určení výtěžnosti stanovení safranalů byly nejprve zjištěny rychlé kalibrační závislosti měřené DPV (optimální parametry) a SWV (defaultní a optimální parametry) na GCE a BDD elektrodě. Po každé kalibrační závislosti byly následně měřeny modelové vzorky safranalů o koncentraci 5, 20 a 50 $\mu\text{mol l}^{-1}$ v prostředí acetonitrilu a 0,1M LiClO_4 a každé měření bylo pětkrát opakováno. Následně byly výsledky zprůměrovány a byla vypočtena výtěžnost stanovení safranalů podle vzorce $\frac{\text{vypočtená koncentrace safralanu}}{\text{skutečná koncentrace safralanu}} \cdot 100 [\%]$. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 3 a 4. Z nich je patrné, že stanovení pomocí GCE elektrody měla lepší výtěžnost, než tomu bylo u měření BDD elektrodou. Nejvyšší výtěžnost měla u GCE i BDD elektrod metoda SWV s optimálními parametry.

Tabulka 3 Výtěžnost modelových vzorků safranalů měřených s GCE elektrodou.

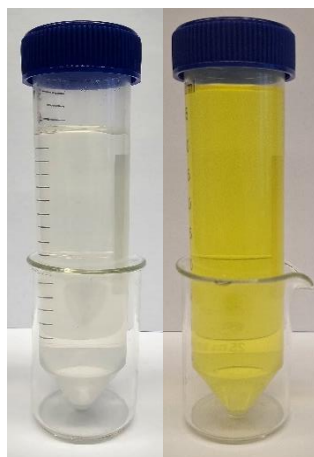
GCE	DPV optimální		SWV výchozí		SWV optimální	
	Průměr [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	R [%]	Průměr [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	R [%]	Průměr [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	R [%]
4,98	4,63	93,03	4,50	90,48	4,78	96,14
19,61	18,88	96,29	18,88	96,26	19,10	97,42
47,62	44,59	93,64	44,90	94,30	46,50	97,65

Tabulka 4 Výtěžnost modelových vzorků safranalů měřených s BDD elektrodou.

BDD	DPV optimální		SWV výchozí		SWV optimální	
	Průměr [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	R [%]	Průměr [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	R [%]	Průměr [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	R [%]
4,98	4,64	92,88	5,88	117,71	4,23	84,59
19,61	24,87	124,60	23,38	117,12	19,88	99,60
47,62	60,97	122,55	53,62	107,78	45,76	91,98

3.17 Analýza reálných vzorků

Reálný vzorek koření byl připraven navážením 200 mg sušeného šafránu, rozemletím v třecí misce a následně extrahováním 30 minut do 50 ml acetonitrilu. Po extrakci byl vzorek filtrován, aby se oddělil od tuhé fáze (obrázek č. 64) a změřen metodami DPV a SWV na GCE a BDD elektrodách. Byl analyzován marocký a španělský vzorek (obrázek č. 65). Marocký vzorek pocházel z tržnice v Ouarzazate a byl zakoupený před 10 lety. Vzhledem k metabolizaci safranalů by se tedy v tomto vzorku neměl nacházet žádný safranin nebo pouze zanedbatelné množství. Druhý vzorek (obrázek č. 65 vpravo) byl zakoupen na tržnici v Barceloně před necelým rokem. U tohoto vzorku je předpoklad nálezu safranalů.

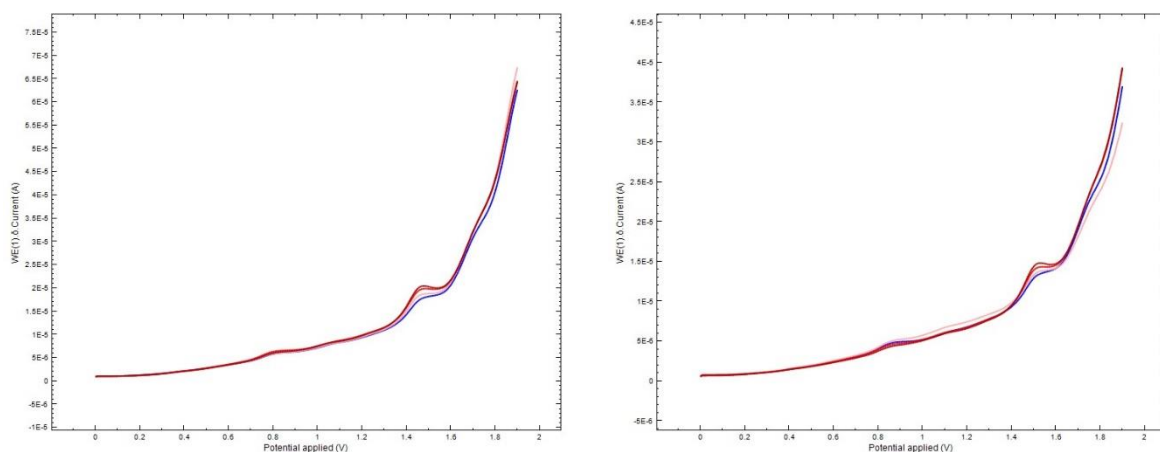


Obrázek 64 Extrahovaný vzorek šafránu v acetonitrilu z Maroka (vlevo) a ze Španělska (vpravo)



Obrázek 65 Analyzované vzorky šafránu. Marocký šafrán (vlevo), šafrán ze Španělska (vpravo).

Na obrázku č. 66 jsou uvedeny voltamogramy naměřené s GCE, kdy byla provedena analýza extraktu španělského šafránu (sken extraktu je znázorněn modrou barvou) a následné přidavky standardu safralanu o koncentraci 10, 20 a 30 $\mu\text{mol l}^{-1}$ barvou červenou (čím tmavší, tím vyšší koncentrace). Vlevo je voltamogram změřen metodou DPV, vpravo pak metodou SWV. Koncentrace safralanu ve vzorku byla vypočítána za pomoci kalibračních závislostí uvedených výše (viz kapitola 3.7.3.1 a 3.7.3.2). Vzhledem ke statisticky významnému úseku kalibrací nelze pro vyhodnocení využít metodu vícenásobného standardního přidavku. Přidavky sloužili pouze ke kvalitativní analýze safralanu k potvrzení jeho přítomnosti ve vzorku. Vypočtené výsledky jsou přehledně uvedeny v tabulce č. 5.

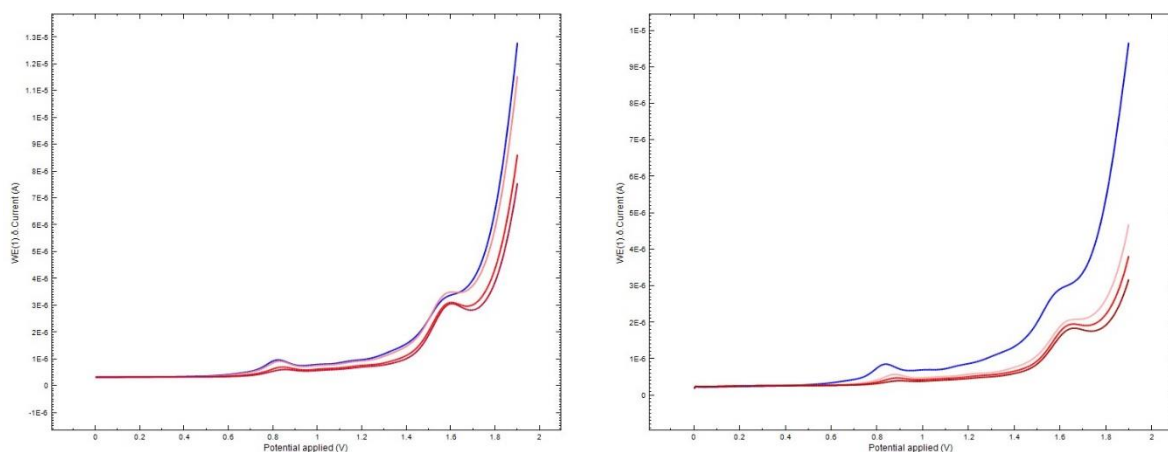


Obrázek 66 DPV (vlevo) a SWV (vpravo) voltamogramy extraktu z reálného vzorku španělského safránu (modré křivky) s přidavky standardu safranalů (červené křivky) měřené na GCE.

Tabulka 5 Vypočtené koncentrace safranalů z reálného vzorku španělského safránu měřené GCE elektrodou.

Číslo analýzy	DPV [$\mu\text{mol l}^{-1}$]		SWV [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	
	výška	plocha	výška	plocha
1	24,9	22,6	35,39	31,2
2	21,7	25,6	31,58	28,3

Na obrázku č. 67 je viditelný voltamogram, kde je provedena analýza extraktu z reálného španělského vzorku, kde sken extraktu je znázorněn modrou barvou a následné přidavky safranalů o koncentraci 10, 20 a 30 $\mu\text{mol l}^{-1}$ barvou červenou (čím tmavší, tím vyšší koncentrace). Za pomoci BDD elektrody. Vlevo je voltamogram změřen metodou BDD, vpravo metodou SWV. Nemůžeme použít vyhodnocení standardního přidavku, jelikož bylo zjištěno, že je úsek statisticky významný. Úsek kalibrační křivky není roven 0. Přidavky sloužili pouze ke kvalitativní analýze safranalů. Koncentrace safranalů ve vzorku je vypočítána za pomoci kalibračních závislostí uvedených výše (viz kapitola 3.7.3.1 a 3.7.3.2). Vypočtené výsledky jsou přehledně uvedeny v tabulce č. 6.

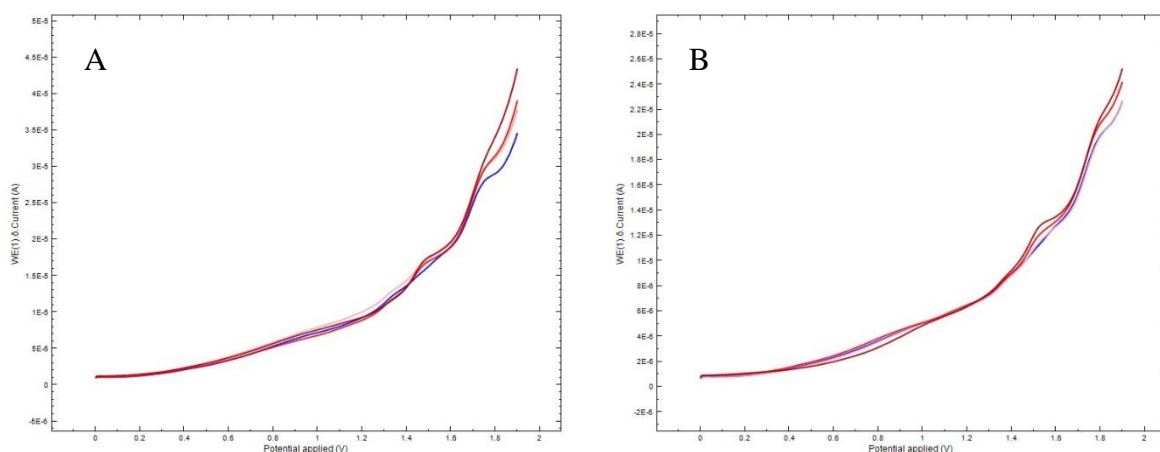


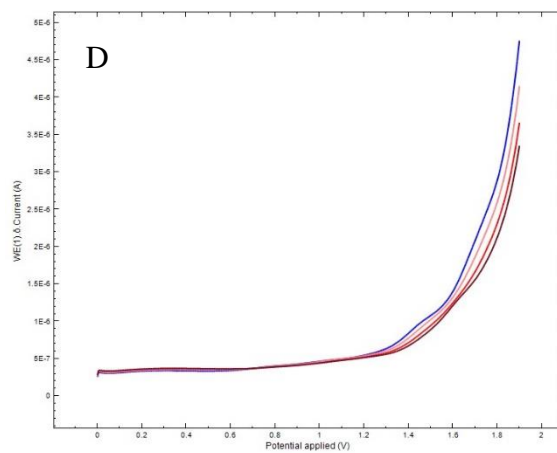
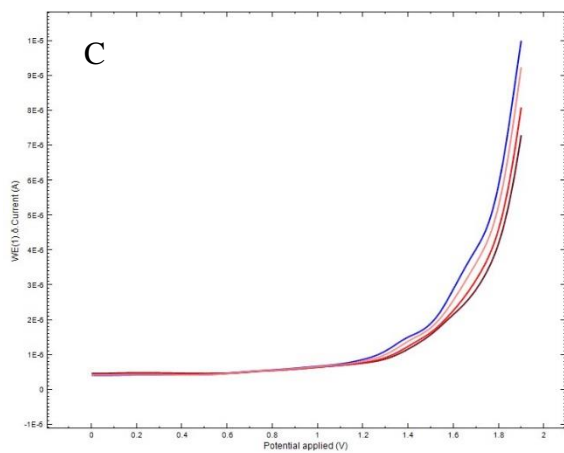
Obrázek 67 DPV (vlevo) a SWV (vpravo) voltamogramy extraktu z reálného vzorku španělského šafránu (modré křivky) s přidávkou standardu safránu (červené křivky) měřené na BDD.

Tabulka 6 Vypočtené koncentrace safránu z reálného vzorku španělského šafránu měřené BDD elektrodou.

Číslo analýzy	DPV [$\mu\text{mol l}^{-1}$]		SWV [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	
	výška	plocha	výška	plocha
1	14,3	13,3	13,5	11,6
2	13,5	12,6	12,1	10,5

Ve vzorku marockého šafránu nebyly vypočítány koncentrace safránu, jelikož nebyl ve vzorku detekován. Na obrázku č. 68 jsou modrou křivkou znázorněny voltamogramy extraktu marockého šafránu a červeně přidávky safránu o koncentraci 10, 20 a 30 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (čím koncentrovanější roztok, tím tmavší barva). Obrázky 68 A a B zobrazují voltamogramy měřené s GCE elektrodou, C a D jsou zaznamenány pomocí BDD elektrody. Obrázky A a C představují DPV voltamogramy a obrázky B a D pak SWV voltamogramy.





Obrázek 68 DPV (vlevo) a SWV (vpravo) voltamogramy extraktu z reálného vzorku marockého šafránu (modré křivky) s přidavky standardu safránu (červené křivky) měřené na GCE (A a B) a BDD (C a D).

ZÁVĚR

Byla vypracována literární rešerše, shrnující poznatky ohledně šafránu. Nejprve byla pozornost věnována taxonomii a popisu samotné rostliny. Teoretická část se dále zabývala jeho využitím, vhodnými podmínkami pro pěstování a zpracováním. Následující kapitoly byly věnovány popisu chemického složení šafránu s detailním zaměřením na krocín, pikrocín a safranal. V závěru teoretické části byly shrnuty techniky využívané pro ověření a kontrolu kvality šafránu.

Experimentální část se podrobně zabývala elektrochemickým stanovením hlavních složek šafránu, konkrétně krocínu a safranal. S využitím elektrochemických technik, zahrnující cyklickou, diferenční pulzní a square wave voltametrii, bylo zjištěno elektrochemické chování těchto dvou látek ve vodném a organickém prostředí. Výsledky těchto experimentů poskytly významné informace, díky kterým bylo určeno vhodné prostředí pro stanovení safranal.

Následně se práce zabývala optimalizací metod, které měly za cíl najít nejlepší podmínky pro elektrochemické stanovení safranal za využití GCE a BDD elektrod. V dalším kroku byly tyto poznatky aplikovány pro zjištění kalibračních závislostí. Byl prokázán vliv nového povrchu použitých elektrod na směrnice stanovení a byly určeny meze detekce a kvantifikace pro stanovení safranal. S ohledem na tyto poznatky byl proveden test výtěžnosti stanovení safranal a pokus o jeho stanovení v reálných vzorcích.

Tato diplomová práce přináší poznatky o chování krocínu a safranal v různých prostředích, ale také přináší užitečné informace pro další výzkum v oblasti analýzy šafránu. Tyto poznatky mají potenciál být využity ke kvalitativnímu i kvantitativnímu stanovení safranal a krocínu v reálných vzorcích. Navíc může výzkum vést k dalšímu zdokonalení metod pro kontrolu kvality šafránu, což by mohlo přinést významné benefity pro průmyslové a spotřebitelské sektory.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] AGHHAVANI-SHAJARI, Mahsa, Hamid-Reza FALLAHI, Hossein SAHABI, Hamed KAVEH a Ferdinando BRANCA. Production systems and methods affect the quality and the quantity of saffron (*Crocus sativus* L.). *Spanish Journal of Agricultural Research*. 2021, 2021-03-15, 19(1). ISSN 2171-9292. Dostupné z: doi:10.5424/sjar/2021191-17100
- [2] AHMAD DAR, Riyaz, Pradeep Kumar BRAHAMAN, Sweety TIWARI a Krishna Sadasshiv PITRE. Indirect Electrochemical Analysis of Krocin in Phytochemical Sample. *E-Journal of Chemistry*. 2012, 9(2), 918-925. ISSN 0973-4945. Dostupné z: doi:10.1155/2012/967079
- [3] AHRAZEM, Oussama, Changfu ZHU, Xin HUANG, Angela RUBIO-MORAGA, Teresa CAPELL, Paul CHRISTOU a Lourdes GÓMEZ-GÓMEZ. Metabolic Engineering of Krocin Biosynthesis in *Nicotiana* Species. *Frontiers in Plant Science*. 2022, 2022-3-8, 13. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2022.861140
- [4] ALAVIZADEH, Seyedeh Hoda a Hossein HOSSEINZADEH. Bioactivity assessment and toxicity of krocin: A comprehensive review. *Food and Chemical Toxicology*. 2014, 64, 65-80. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2013.11.016
- [5] ARMELLINI, Rita; COMPAGNONE, Dario; SCAMPICCHIO, Matteo a PITTIA, Paola. Hydrogen and Atom Transfer Activity of Saffron Extracts by Square Wave Voltammetry. *Electroanalysis*. 2017, roč. 29, č. 2, s. 521-528. ISSN 1040-0397. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/elan.201600325>.
- [6] AVILA-SOSA, Raul; NEVÁREZ-MOORILLÓN, Guadalupe Virginia; OCHOA-VELASCO, Carlos Enrique; NAVARRO-CRUZ, Addí Rhode; HERNÁNDEZ-CARRANZA, Paola et al. Detection of Saffron's Main Bioactive Compounds and Their Relationship with Commercial Quality. *Foods*. 2022, roč. 11, č. 20. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods11203245>.
- [7] CABALLERO-ORTEGA, Heriberto; PEREDA-MIRANDA, Rogelio a ABDULLAEV, Fikrat I. HPLC quantification of major active components from 11 different saffron (*Crocus sativus* L.) sources. *Food Chemistry*. 2007, roč. 100, č. 3, s. 1126-1131. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.020>.

- [8] CARDONE, Lorian, Donato CASTRONUOVO, Michele PERNIOLA, Nunzia CICCIO a Vincenzo CANDIDO. Saffron (*Crocus sativus* L.), the king of spices: An overview. *Scientia Horticulturae*. 2020, 272. ISSN 03044238. Dostupné z: doi:10.1016/j.scienta.2020.109560
- [9] CID-PÉREZ, Teresa Soledad, Guadalupe Virginia NEVÁREZ-MOORILLÓN, Carlos Enrique OCHOA-VELASCO, Addí Rhode NAVARRO-CRUZ, Paola HERNÁNDEZ-CARRANZA a Raúl AVILA-SOSA. The Relation between Drying Conditions and the Development of Volatile Compounds in Saffron (*Crocus sativus*). *Molecules*. 2021, 26(22). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26226954
- [10] CONSONNI, Roberto, Stella ORDOUDI, Laura CAGLIANI, Maria TSIANGALI a Maria TSIMIDOU. On the Traceability of Commercial Saffron Samples Using ¹H-NMR and FT-IR Metabolomics. *Molecules*. 2016, 21(3). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules21030286
- [11] DAR, Riyaz A., Pradeep K. BRAHMAN, N. KHURANA, Javed A. WAGAY, Zahoor A. LONE, Mohd A. GANAIE a Krishna S. PITRE. Evaluation of antioxidant activity of crocin, podophyllotoxin and kaempferol by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017, 10, S1119-S1128. ISSN 18785352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2013.02.004
- [12] DASTRANJ, Maryam a Ali Reza SEPASKHAH. Saffron response to irrigation regime, salinity and planting method. *Scientia Horticulturae*. 2019, 251, 215-224. ISSN 03044238. Dostupné z: doi:10.1016/j.scienta.2019.03.027
- [13] DI DONATO, Francesca, Angelo Antonio D'ARCHIVIO, Maria Anna MAGGI a Leucio ROSSI. Detection of Plant-Derived Adulterants in Saffron (*Crocus sativus* L.) by HS-SPME/GC-MS Profiling of Volatiles and Chemometrics. *Food Analytical Methods*. 2021, 14(4), 784-796. ISSN 1936-9751. Dostupné z: doi:10.1007/s12161-020-01941-x
- [14] FILATOVA, Maria, Jana HAJŠLOVÁ a Michal STUPAK. Detection of saffron adulteration by other plant species using SPME-GC-HRMS. *European Food Research and Technology*. 2024, 250(3), 911-922. ISSN 1438-2377. Dostupné z: doi:10.1007/s00217-023-04443-2

- [15] FRUSCIANTE, Sarah, Gianfranco DIRETTO, Mark BRUNO, et al. Novel carotenoid cleavage dioxygenase catalyzes the first dedicated step in saffron crocin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014, 2014-08-19, **111**(33), 12246-12251. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1404629111
- [16] GAZERAN, Samaneh, Faezeh TAJALLI a Ali MOHAMADI SANI. Effect of Ultrasonic Extraction on Qualitative Parameters of Saffron Edible Extract. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2016, 2016-09-20, **19**(5), 1286-1291. ISSN 0972-060X. Dostupné z: doi:10.1080/0972060X.2015.1004126
- [17] Ghahghaei, A.; Bathaie, SZ; Bahraminejad, E. Mechanisms of the Effects of Crocin on Aggregation and Deposition of A β 1-40 Fibrils in Alzheimer's disease. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 2012, 18, 347–351.
- [18] HEIDARBEIGI, K.; MOHTASEBI, S.S.; SERRANO-DIAZ, J.; MEDINA-PLAZA, C.; GHASEMI-VARNAMKHASTI, M. et al. Flavour characteristics of Spanish and Iranian saffron analysed by electronic tongue. 2016, roč. 8, č. 3, s. 359-368. ISSN 1757-8361. Dostupné z: <https://doi.org/10.3920/QAS2015.0591>.
- [19] CHAI, Fenghua, Ying WANG, Xueang MEI, Mingdong YAO, Yan CHEN, Hong LIU, Wenhai XIAO a Yingjin YUAN. Heterologous biosynthesis and manipulation of crocetin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*. 2017, 16(1). ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/s12934-017-0665-1
- [20] CHRYSANTHOU, Andreas, Evangelia POULIOU, Anastasia KYRIAKOUDI a Maria Z. TSIMIDOU. Sensory Threshold Studies of Picrocrocin, the Major Bitter Compound of Saffron. *Journal of Food Science*. 2016, 81(1). ISSN 0022-1147. Dostupné z: doi:10.1111/1750-3841.13152
- [21] ISO 3632-1:2011. "Spices - Saffron (*Crocus sativus* L.). Part 1: Specifications". International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- [22] JARUKAS, Laurynas, Konradas VITKEVICIUS, Olha MYKHAILENKO, Ivan BEZRUK, Victoriya GEORGIYANTS a Liudas IVANAUSKAS. Effective Isolation of Picrocrocin and Crocins from Saffron: From HPTLC to Working Standard Obtaining. *Molecules*. 2022, 27(13). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27134286

- [23] KAZEMI-SHAHANDASHTI, Seyyede-Sanam, Ludwig MANN, Abdullah EL-NAGISH, Dörte HARPKE, Zahra NEMATI, Björn USADEL a Tony HEITKAM. Ancient Artworks and Crocus Genetics Both Support Saffron's Origin in Early Greece. *Frontiers in Plant Science*. 2022, 2022-2-25, **13**. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2022.834416
- [24] KIM, Buyunġ½ a Byoungduck PARK. Saffron carotenoids inhibit STAT3 activation and promote apoptotic progression in IL-6-stimulated liver cancer cells. *Oncology Reports*. 2018, 2018-01-25. ISSN 1021-335X. Dostupné z: doi:10.3892/or.2018.6232
- [25] KYRIAKOUDI, Anastasia, Yvonne C. O'CALLAGHAN, Karen GALVIN, Maria Z. TSIMIDOU a Nora M. O'BRIEN. Cellular Transport and Bioactivity of a Major Saffron Apocarotenoid, Pikrocrocġn (4-(β -D-Glucopyranosyloxy)-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene-1-carboxaldehyde). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015, 2015-10-07, **63**(39), 8662-8668. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.5b03363
- [26] MARDANI, Hossein, John MANINANG, Kwame Sarpong APPIAH, Yosei OIKAWA, Majid AZIZI a Yoshiharu FUJII. Evaluation of Biological Response of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) and Weeds to Safranal Allelochemical of Saffron (*Crocus sativus*) by Using Static Exposure Method. *Molecules*. 2019, 24(9). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24091788
- [27] MARTġ, Maricarmen, Gianfranco DIRETTO, Verónica ARAGONÉS, Sarah FRUSCIANTE, Oussama AHRAZEM, Lourdes GÓMEZ-GÓMEZ a José-Antonio DARÒS. Efficient production of saffron krocġns and pikrocrocġn in *Nicotiana benthamiana* using a virus-driven system. *Metabolic Engineering*. 2020, **61**, 238-250. ISSN 10967176. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymben.2020.06.009
- [28] MORAS, Benjamin, Camille POUCHIEU, David GAUDOUT, Stéphane REY, Anthony ANCHISI, Xavier SAUPIN a Patrick JAME. Authentication of Iranian Saffron (*Crocus sativus*) Using Stable Isotopes $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^2\text{H}$ and Metabolites Quantification. *Molecules*. 2022, 27(20). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27206801
- [29] MOROZZI, Pietro, Alessandro ZAPPI, Fernando GOTTARDI, Marcello LOCATELLI a Dora MELUCCI. A Quick and Efficient Non-Targeted Screening Test for Saffron

- Authentication: Application of Chemometrics to Gas-Chromatographic Data. *Molecules*. 2019, 24(14). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24142602
- [30] NAGHSHINEH, Ali, Ali DADRAS, Behafarid GHALANDARI, Gholam Hossein RIAZI, Seyed Mohamad Sadegh MODARESI, Ali AFRASIABI a Mahsa Kiani ASLANI. Safranal as a novel anti-tubulin binding agent with potential use in cancer therapy: An in vitro study. *Chemico-Biological Interactions*. 2015, 238, 151-160. ISSN 00092797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2015.06.023
- [31] NAIM, Nadia, Nabil ENNAHLI, Hafida HANINE, Rachid LAHLALI, Abdesslem TAHIRI, Marie-Laure FAUCONNIER, Ilham MADANI a Said ENNAHLI. ATR-FTIR spectroscopy combined with DNA barcoding and GC-MS to assess the quality and purity of saffron (*Crocus sativus* L.). *Vibrational Spectroscopy*. 2022, 123. ISSN 09242031. Dostupné z: doi:10.1016/j.vibspec.2022.103446
- [32] NARDI, Luca, Giulio METELLI, Marco GAREGNANI, et al. Farming for Pharming: Novel Hydroponic Process in Contained Environment for Efficient Pharma-Grade Production of Saffron. *Molecules*. 2022, 27(24). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27248972
- [33] NEMATI, Zahra, Frank R. BLATTNER, Helmut KERNDORFF, Osman EROL a Dörte HARPKE. Phylogeny of the saffron-crocus species group, *Crocus* series *Crocus* (Iridaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2018, 127, 891-897. ISSN 10557903. Dostupné z: doi:10.1016/j.ympev.2018.06.036
- [34] NENADIS, Nikolaos, Samuel HEENAN, Maria Z. TSIMIDOU a Saskia VAN RUTH. Applicability of PTR-MS in the quality control of saffron. *Food Chemistry*. 2016, 196, 961-967. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2015.10.032
- [35] PU, Xiangdong, Chunnian HE, Yan YANG, Wei WANG, Kaizhi HU, Zhichao XU a Jingyuan SONG. In Vivo Production of Five Krocins in the Engineered *Escherichia coli*. *ACS Synthetic Biology*. 2020, 2020-05-15, 9(5), 1160-1168. ISSN 2161-5063. Dostupné z: doi:10.1021/acssynbio.0c00039
- [36] SAMARGHANDIAN, Saeed a Abasalt BORJI. Anticarcinogenic effect of saffron (*Crocus sativus* L.) and its ingredients. *Pharmacognosy Research*. 2014, 6(2). ISSN 0974-8490. Dostupné z: doi:10.4103/0974-8490.128963

- [37] SÁNCHEZ, Ana M., Manuel CARMONA, Manuel JARÉN-GALÁN, M. Isabel MÍN-GUEZ MOSQUERA a Gonzalo L. ALONSO. Picrocrocin Kinetics in Aqueous Saffron Spice Extracts (*Crocus sativus* L.) upon Thermal Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011, 2011-01-12, 59(1), 249-255. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf102828v
- [38] SHABRANGZADEH, Marzieh, Vahidreza JALALI, Majid MAHMOODABADI a Mehdi HOMAEE. Quantifying Saffron (*Crocus sativus* L.) Leaves and Corms Growth under Natural Saline Conditions. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 2023, 2023-04-12, 54(7), 975-991. ISSN 0010-3624. Dostupné z: doi:10.1080/00103624.2022.2137185
- [39] SHAHI, Tayebeh, Elham ASSADPOUR a Seid Mahdi JAFARI. *Main chemical compounds and pharmacological activities of stigmas and tepals of 'red gold'; saffron*. 2016, **58**, 69-78. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2016.10.010
- [40] SOFFRITTI, Giovanna, Matteo BUSCONI, Rosa SÁNCHEZ, Jean-Marie THIERCELIN, Moschos POLISSIOU, Marta ROLDÁN a José FERNÁNDEZ. Genetic and Epigenetic Approaches for the Possible Detection of Adulteration and Auto-Adulteration in Saffron (*Crocus sativus* L.) Spice. *Molecules*. 2016, 21(3). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules21030343
- [41] SOGANDI, Fatemeh a Mahdyyeh SHIRI. Metaheuristic algorithms for a sustainable saffron supply chain network considering government policies and product quality under uncertainty. *Journal of Computational Design and Engineering*. 2023, 2023-10-01, **10**(5), 1892-1929. ISSN 2288-5048. Dostupné z: doi:10.1093/jcde/qwad079
- [42] SPENCE, Charles. Saffron: The colourful spice. *International Journal of Gastronomy and Food Science*. 2023, **34**. ISSN 1878450X. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijgfs.2023.100821
- [43] SPINELLI, Michele, Alessandra BIANCOLILLO, Gennaro BATTAGLIA, Martina FOSCHI, Angela AMORESANO a Maria Anna MAGGI. Saffron Characterization by a Multidisciplinary Approach. *Molecules*. 2023, 28(1). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules28010042
- [44] SUCHAREAU, Marlène, Alexandra BORDES a Laurent LEMÉE. Improved quantification method of krocins in saffron extract using HPLC-DAD after qualification by HPLC-

- DAD-MS. Food Chemistry. 2021, 362. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2021.130199
- [45] TAN, Hexin, Xianghui CHEN, Nan LIANG, et al. Transcriptome analysis reveals novel enzymes for apo-carotenoid biosynthesis in saffron and allows construction of a pathway for crocetin synthesis in yeast. *Journal of Experimental Botany*. 2019, 2019-09-15, 70(18), 4819-4834. ISSN 0022-0957. Dostupné z: doi:10.1093/jxb/erz211
- [46] XIAOBIN, Feng, Qian XIAODONG, Han SHUWEN, Yao CHONG, Yuan YUMEI a Zhou GUIFEN. Extracted apocarotenoids from saffron stigmas and evaluated the quality of saffron. *Natural Product Research*. 2018, 2018-01-17, 32(2), 225-228. ISSN 1478-6419. Dostupné z: doi:10.1080/14786419.2017.1340288
- [47] XIE, Lei, Zuliang LUO, Xunli JIA, et al. Synthesis of Crocin I and Crocin II by Multigene Stacking in *Nicotiana benthamiana*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023, **24**(18). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms241814139
- [48] YASMIN, Salwee, F.A. NEHVI, S.S. SAMAD, A.M. IQBAL a SETHI. *Acta Horticulturae*. 2018, (1200). ISSN 0567-7572. Dostupné z: doi:10.17660/ActaHortic.2018.1200.28
- [49] YASMIN, Salwee, J. SETHI, F.A. NEHVI a E. SHARMA. Saffron: from medicine to industry. *Acta Horticulturae*. 2018, (1200), 227-232. ISSN 0567-7572. Dostupné z: doi:10.17660/ActaHortic.2018.1200.36
- [50] YOUSEFI-NEJAD, Shekoufeh, Kobra HEIDARBEIGI a Mahmoud ROUSHANI. Electronic tongue as innovative instrument for detection of crocin concentration in saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Food Science and Technology*. 2022, 59(9), 3548-3556. ISSN 0022-1155. Dostupné z: doi:10.1007/s13197-021-05349-1