

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
Katedra analytické chemie



**Štúdium elektrochemického správania kapsaicínu  
na uhlíkových elektródach a jeho analytické využitie**

Diplomová práca

Autor:	Bc. Andrea Rajcová
Študijný odbor:	Analytická chemie
Typ štúdia:	Prezenčný
Vedúci práce:	RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.

Olomouc 2018

## **Bibliografická identifikácia:**

Meno a priezvisko autora: Andrea Rajcová

Názov práce: Štúdium elektrochemického správania kapsaicínu na uhlíkových elektródach a jeho analytické využitie

Typ práce: diplomová

Pracovisko: Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

Školiteľ: RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2018

Anotácia: Diplomová práca sa zaoberá štúdiom elektrochemických vlastností kapsaicínu a možnosťou ich využitia pre analytické stanovenie na elektróde zo skleného uhlíku. Na objasnenie elektrochemických vlastností bola využitá cyklická a diferenčne pulzná voltametria. Oxidačné produkty boli identifikované s využitím oxidácie v prietokovej elektrochemickej cele pripojenej k hmotnostnému spektrometru. Bolo testovaných niekoľko metód pre stanovenie kapsaicínu v čili paprikách a dochucovadlách obsahujúcich extrakty čili paprik pomocou diferenčne pulznej a lineárnej voltametrie. Štatisticky významná korelácia s referenčnou HPLC metódou bola zistená pri voltametrických metódach, predovšetkým pri diferenčne pulznej voltimetrii s asolectinom modifikovanou elektródou.

Kľúčové slová: kapsaicín, elektróda zo skleného uhlíku, asolectinom modifikovaná elektróda voltametria, elektrochémia, hmotnostná spektrometria, čili papriky

Počet strán: 63

Jazyk: Slovenčina

## **Bibliographical identification:**

Author's first name and surname: Andrea Rajcová

Title: Study of electrochemical behaviour of capsaicin on carbon electrodes and its analytical application

Type of thesis: Master's

Department: Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc

Supervisor: RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.

The year of submission: 2018

Annotation: This Master's thesis deals with the study of electrochemical behaviour of capsaicin on glassy carbon electrode and its application for analytical purposes. To explain electrochemical properties and oxidation mechanism cyclic and differential pulse voltammetry were used. The oxidation products generated in an electrochemical flow-through cell were online detected and analyzed by mass spectrometry. Several methods for determination of capsaicin in chilli peppers were tested using differential pulse and direct current voltammetry. A statistically significant correlation with the results of the reference HPLC method was found in case of voltammetric methods, especially in differential pulse voltammetry with asolectin modified electrode.

Keywords: capsaicin, glassy carbon electrode, asolection modified electrode, voltammetry, electrochemistry, mass spectrometry, chilli peppers

Number of pages: 63

Language: Slovak

Prehlasujem, že som záverečnú prácu vypracovala samostatne pod odborným vedením RNDr. Jany Skopalovej, Ph.D. Všetky použité zdroje informácií a literatúru som uviedla v zozname použitej literatúry.

Táto práca ani jej podstatná časť nebola použitá na získanie iného alebo rovnakého akademického titulu.

Súhlasím s tým, aby bola práca sprístupnená v knižnici Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci, 20. 04. 2018

.....

Podpis

Moje poďakovanie patrí predovšetkým RNDr. Jane Skopalovej, Ph.D. za odborné vedenie, trpezlivosť a cenné rady a pripomienky pri vypracovaní tejto práce. Ďalej ďakujem Doc. RNDr. Petrovi Bartákovi, Ph.D. a RNDr. Sandre Benickej za poskytnutie vzoriek papriek a prof. RNDr. Jurajovi Ševčíkovi, Ph.D. za jazykové konzultácie.

# Obsah

1. Úvod .....	9
2. Teoretická časť .....	10
2.1. Paprika ( <i>Capsicum</i> ) .....	10
2.2. Kapsaicinoidy .....	11
2.3. Kapsaicín .....	14
2.3.1. Biologické vlastnosti kapsaicínu .....	14
2.3.2. Elektrochemické správanie kapsaicínu .....	15
2.4. Metódy stanovenia a identifikácie kapsaicínu .....	17
2.4.1. Kvapalinová chromatografia .....	17
2.4.2. Plynová chromatografia .....	18
2.4.3. Voltametrické metódy .....	19
2.4.4. Ďalšie metódy .....	22
3. Experimentálna časť .....	23
3.1. Prístrojové vybavenie .....	23
3.2. Chemikálie .....	23
3.3. Metodická časť .....	24
3.3.1. Príprava nemodifikovanej elektródy na meranie .....	24
3.3.2. Príprava zásobného roztoku kapsaicínu .....	24
3.3.3. Meranie závislosti na rýchlosti skenu .....	24
3.3.4. Meranie závislosti na pH .....	25
3.3.5. Meranie kalibračnej závislosti .....	26
3.3.6. Elektrochémiá s online detekciou hmotnostnou spektrometriou .....	26
3.3.7. HPLC .....	27
3.3.7.1. Spôsob extrakcie .....	27
3.3.7.2. Mobilná fáza .....	27
3.3.7.3. Príprava kalibračných roztokov kapsaicínu .....	27
3.3.7.4. Extrakcia vzoriek čili papriek a príprava vzoriek na HPLC meranie ..	27
3.3.7.5. Stanovenie pomocou HPLC .....	28
3.3.8. Príprava elektródy modifikovanej fosfolipidovou membránou .....	28
3.3.9. Testovanie fosfolipidovej membrány .....	28
3.3.10. Akumulácia kapsaicínu na elektródu .....	29
3.3.11. Čistenie elektródy od fosfolipidovej membrány .....	29

3.3.12.	Voltametrické metódy stanovenia.....	30
3.3.12.1.	Diferenčne pulzná voltaméria (DPV) .....	30
3.3.12.1.1.	Metóda A .....	30
3.3.12.1.2.	Metóda B – transferová metóda na nemodifikovanej elektróde .....	30
3.3.12.1.3.	Metóda C – transferová metóda na modifikovanej elektróde .....	31
3.3.12.2.	Lineárna voltametria .....	32
3.3.12.2.1.	Metóda D – transferová metóda na nemodifikovanej elektróde .....	32
3.3.12.2.2.	Metóda E – transferová metóda na modifikovanej elektróde .....	32
3.3.13.	Merané vzorky paprík .....	33
3.4.	Výsledky a diskusia.....	34
3.4.1.	Cyklická voltametria – popis elektrochemického správania kapsaicínu ..	34
3.4.2.	Cyklická voltametria – závislosť na rýchlosti skenu .....	35
3.4.3.	Diferenčne pulzná voltametria – závislosť na pH.....	37
3.4.4.	Kalibračná závislosť .....	38
3.4.5.	EC - MS .....	39
3.4.6.	HPLC .....	47
3.4.7.	Voltametrické metódy.....	48
3.4.7.1.	DPV .....	48
3.4.7.1.1.	Metóda A .....	48
3.4.7.2.	Metóda B – transferová metóda na nemodifikovanej elektróde .....	49
3.4.7.3.	Metóda C – transferová metóda na modifikovanej elektróde.....	50
3.4.7.4.	DC.....	52
3.4.7.4.1.	Metóda D – transferová metóda na nemodifikovanej elektróde.....	52
3.4.7.4.2.	Metóda E – transferová metóda na modifikovanej elektróde .....	53
3.4.8.	Vyhodnotenie .....	54
4.	Záver .....	57
5.	Použitá literatúra .....	58

## Zoznam použitých skratiek

AdSV	adsorptívna stripping voltametria
BDD	bórom dopovaná diamantová elektróda
CPE	uhlíková pastová elektróda
CV	cyklická voltametria
DC	lineárna voltametria
DPV	diferenčne pulzná voltametria
EC-MS	spojenie elektrochemickej cely s hmotnostnou detekciou
ESI	ionizácia elektrosprejom
GC	plynová chromatografia
GCE	elektróda zo skleneného uhlíku
HPLC	vysokoučinná kvapalinová chromatografia
PG	grafitová tužková elektróda
PIGE	parafinom impregnovaná uhlíková elektróda
SHU	Scovilleho jednotka štipľavosti
SPE	extrakcia tuhou fázou
SWV	square – wave voltametria



# 1. Úvod

Kapsaicín je prírodný alkaloid vyskytujúci sa v plodoch čili papriek, ktoré patria k najdôležitejším a najrozšírenejším koreninám na svete. Za ich popularitou stoja významné organoleptické vlastnosti, predovšetkým typická štiplavá chuť. Okrem toho má kapsaicín antioxidantné či antimikrobiálne účinky.

Štiplavosť čili papriek je hlavným dôvodom ich konzumácie a z pohľadu konzumenta predstavuje jednu z ich najdôležitejších charakteristík. Vzniká tak potreba štiplavosť merať. Miera štiplavosti priamo súvisí s obsahom kapsaicínu a jemu podobných látok kapsaicinoidov v paprikách. Najčastejšie využívanou metódou pre stanovenie obsahu kapsaicínu a ostatných kapsaicinoidov je vysokoúčinná kvapalinová chromatografia. Kapsaicín vo svojej štruktúre obsahuje oxidovateľné *o*-metoxyfenylové jadro, čo umožňuje použitie elektrochemických metód na jeho stanovenie.

Cieľom práce bolo najskôr popísať elektrochemické správanie kapsaicínu na uhlíkových elektródach v závislosti na pH roztoku, na rýchlosti polarizácie pracovnej elektródy a na jeho koncentrácii s využitím cyklickej a diferenciálnej pulznej voltametrie. Ďalej bol overený oxidačný mechanizmus kapsaicínu priamym spojením elektrochémie s hmotnostnou spektrometriou. Výsledky týchto meraní boli využité na vývoj jednoduchej voltametrickej metódy pre stanovenie kapsaicínu v čili paprikách a dochucovadlách obsahujúcich extrakty z čili papriek.

## 2. Teoretická časť

### 2.1. Paprika (*Capsicum*)

Paprika (*Capsicum*) je rod rastlín z čeľade ľuľkovité (*Solanaceae*). Všetky druhy papriek pochádzajú pôvodne z tropických oblastí Ameriky. V rôznych regiónoch Mexika, Strednej a Južnej Ameriky boli ľuďmi domestikované druhy *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum frutescens* a *Capsicum pubescens*. Pikantné plody rastlín z rodu paprika (*Capsicum*) sú známe ako čili papriky. Najvýznamnejšie odrody sú uvedené v tabuľke (Tab.1)[1]:

Tab. 1: Významné odrody čili papriek zaradené k jednotlivým druhom *Capsicum*

Druh	Odroda
<i>Capsicum annuum</i>	Chiltepin Cayenne Jalapeño
<i>Capsicum baccatum</i>	Ají amarillo Ají Limon Ají ayuello
<i>Capsicum chinense</i>	Red Carribean Carolina Reaper Ají Limo Orange Habanero Bhut Jolokia Scotch Bonnet
<i>Capsicum frutescens</i>	Tabasco Malagueta Siling Labuyo
<i>Capsicum pubescens</i>	Canario Manzano Peron

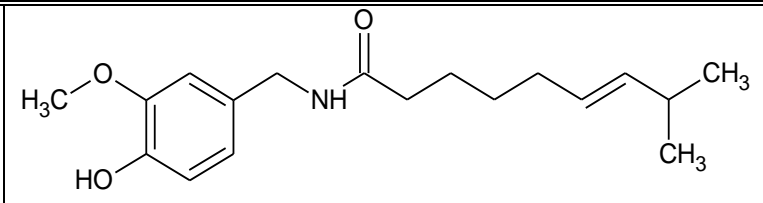
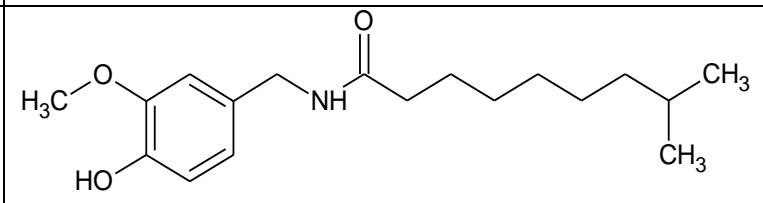
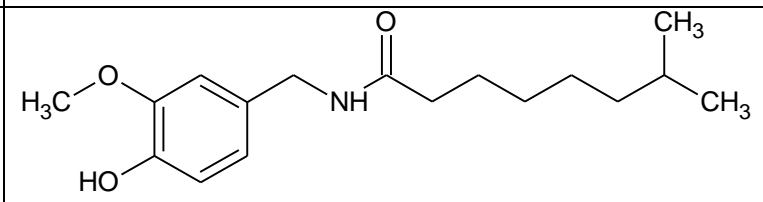
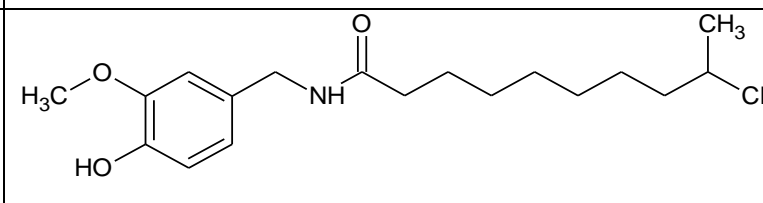
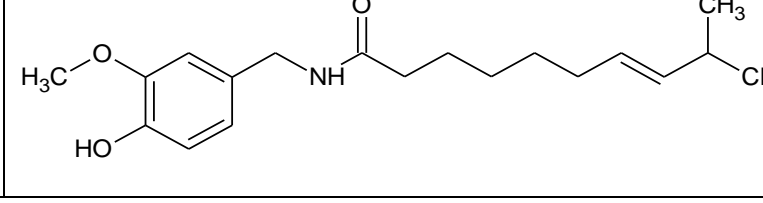
Čili papriky sú populárnou koreninou rozšírenou po celom svete. Obsahujú množstvo chemických látok, dôležitých z hľadiska výživy, chuti, farby a arómy. Najvýznamnejšími skupinami látok sú kapsaicinoidy a karotenoidy. Zatiaľ čo karotenoidy sú zodpovedné za farbu plodov, kapsaicinoidy sú nositeľmi typickej štipľavosti čili papriek. [2] Okrem týchto látok obsahujú čili papriky sacharidy, lipidy,

proteíny, kyselinu askorbovú, živice, flavonoidy či minerálne látky (K, Mg, Ca, Na, Fe, Zn).[2–5]

## 2.2. Kapsaicinoidy

Kapsaicinoidy tvoria skupinu chemických látok vyskytujúcich sa v plodoch čili paprik. Sú to alkaloidy syntetizované rastlinami ako sekundárne metabolity, ktorých funkciou je pravdepodobne ochrana rastliny proti fytopatogénom.[6]

Tab. 2: Štruktúry najvýznamnejších prírodných kapsaicinoidov

Názov kapsaicinoidu	Chemická štruktúra
<b>Kapsaicín</b>	
<b>Dihydrokapsaicín</b>	
<b>Norhydrokapsaicín</b>	
<b>Homodihydrokapsaicín</b>	
<b>Homokapsaicín</b>	

Z hľadiska štruktúry sa jedná o amidy vznikajúce enzymatickou kondenzáciou mastných kyselín (C9 - C11) a vanilylamínu. Štruktúrne rozdiely medzi jednotlivými kapsaicinoidmi vyplývajú z rôznej dĺžky alkylového reťazca a z prítomnosti resp. neprítomnosti dvojitej väzby. Medzi najvýznamnejšie prírodne sa vyskytujúce kapsaicinoidy patria kapsaicín, dihydrokapsaicín, nordihydrokapsaicín, homodihydrokapsaicín a homokapsaicín (Tab. 2), pričom najväčšie percentuálne zastúpenie majú kapsaicín 69 % a dihydrokapsaicín 22 %. Existujú tiež niektoré syntetické kapsaicinoidy ako napr. nonivamid a  $\omega$ -hydroxykapsaicín. [7]

Kapsaicinoidy stoja za významnými sensorickými vlastnosťami čili papriek, vďaka ktorým patria čili papriky medzi najdôležitejšie druhy zeleniny a korenín na svete. [8] Charakteristické sú predovšetkým pre latinsko-americkú a ázijskú kuchyňu, ale popularitu si získali aj v ostatných častiach sveta. [9]

Na obsah kapsaicinoidov má vplyv viacero faktorov, medzi inými množstvo vody, ktoré sa k rastline dostáva [10], genotyp [11], či vývojová fáza plodu. [12] Ich celkový obsah a aj pomerné zastúpenie jednotlivých kapsaicinoidov sa v rôznych druhoch čili papriek líši. [13,14] Celkový obsah kapsaicinoidov sa zväčša vyjadruje ako štipľavosť, ktorá priamo súvisí s koncentráciou kapsaicinoidov. [15]

Z historických dôvodov sa obsah kapsaicinoidov vyjadruje v Scovilleho jednotkách – SHU (Scoville Heat Units). Podľa Scovillovho organoleptického testu sa určité definované množstvo papriky extrahovalo v alkohole a extrakt sa postupne riedil osladenou vodou dovtedy, pokiaľ štipľavosť na jazyku nebola viac cítiť. SHU jednotky vyjadrujú koľkokrát musel byť extrakt zriedený, aby štipľavosť vymizla. [16]

Podľa stupňa štipľavosti a počtu SHU jednotiek sa papriky dajú rozdeliť do piatich skupín:

- 0 – 700 SHU – neštipľavé
- 700 – 3000 SHU – mierne štipľavé
- 3000 – 25 000 SHU – stredne štipľavé
- 25 000 – 75 000 SHU – silne štipľavé
- > 80 000 SHU – veľmi silne štipľavé [17]

Pre SHU jednotky platí nasledujúci prepočet [18]:

$$16 \text{ SHU} = 1 \text{ ppm} = 0,001 \text{ mg kapsaicinoidov/g}$$

Hodnota SHU pre čistý kapsaicín je 16 miliónov. [18]

Todd et al. zistili štiplavosť jednotlivých kapsaicinoidov a vyjadrili ju v jednotkách SHU (Tab.3) [15,19]:

Tab. 3: Štiplavosť kapsaicinoidov v SHU jednotkách [19]

<b>Kapsaicinoid</b>	<b>SHU</b>
Kapsaicín	16 100 000
Dihydrokapsaicín	16 100 000
Nordihydrokapsaicín	9 300 000
Homokapsaicín	6 900 000

V tabuľke 4 (Tab.4) sú uvedené hodnoty štiplavosti v SHU jednotkách pre niektoré druhy čili papriky [20]:

Tab.4: Niektoré odrody čili papriky a ich štiplavosť v SHU jednotkách [20]

<b>Druh papriky</b>	<b>SHU</b>
Carolina Reaper	1 400 000 - 2 200 000
Trinidad Scorpion Chocolate	1 200 000 - 2 000 000
Trinidad Moruga Scorpion	1 200 000 - 2 000 000
7 Pot Brain Strain	1 000 000 - 1 350 000
Ghost Pepper	855 000 - 1 041 427
Bhut Jolokia Chocolate	800 000 - 1 001 304
Chocolate Habanero	425 000 - 577 000
Red Savina Habanero	350 000 - 577 000
Cayenne Pepper	30 000 - 50 000
Jalapeño Pepper	2 500 - 8 000
Sladká paprika	0

Tradičný organoleptický test bol postupne nahradený inými metódami stanovenia kapsaicinoidov. Medzi menej časté patria kolorimetrické stanovenie [21], spektrofotometrické metódy [22] či infračervená spektrometria [23]. Ďalšími metódami použitými na stanovenie kapsaicinoidov sú voltametrické metódy [24], vysokoúčinná chromatografia na tenkej vrstve [25], kapilárna elektroforéza [26] a plynová chromatografia [27]. Najčastejšou metódou pre detekciu a stanovenie kapsaicinoidov je vysokoúčinná kvapalinová chromatografia. [28] Podrobnejší popis najpoužívanejších metód je v kapitole 2.4.

## 2.3. Kapsaicín

Kapsaicín (E)-N-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methyl]-8-methylnon-6-enamid je prírodne sa vyskytujúca fenolická látka. Vytvára sa v plodoch papriky (*Capsicum*) a môže predstavovať až 1% hmotnosti papriky.[29] Kapsaicín bol prvýkrát objavený a izolovaný v nečistej forme Christianom Friedrichom Bucholzom v roku 1812.[30] V takmer čistej kryštalickej forme kapsaicín vyizoloval John Clough Thresh v roku 1876 [31], v čistej forme potom Karl Micko v roku 1898.[32] Štruktúru kapsaicínu objasnil Nelson v roku 1919 [33] a prvú syntézu kapsaicínu uskutočnili v roku 1930 Späth a Darling [34].

Kapsaicín predstavuje kryštalickú organickú látku s molekulovou hmotnosťou 305,418 g/mol, teplotou topenia 65 °C a teplotou varu 210 – 220 °C. V studenej vode je nerozpustný, málo sa rozpúšťa vo vode pri teplote 25°C a je dobre rozpustný v metanole a etanole.[35]

### 2.3.1. Biologické vlastnosti kapsaicínu

Pri styku s tkanivami vyvoláva kapsaicín pocit tepla, štipania až bolesti. Pôsobí na senzorické neuróny tak, že sa viaže na kapsaicinový (vaniloidný) receptor TRPV 1, čo je proteín s hmotnosťou 92-95 kDa skladajúci sa z 838 aminokyselín. TRPV 1 je receptor pre vnímanie bolestivých podnetov. Predstavuje kationový kanál, ktorý je kapsaicínom aktivovaný, a to spôsobuje reakciu v podobe štipania a bolesti.[36,37]

Po stimulácii kapsaicínom sú neuróny dlhšiu dobu necitlivé na ďalšie podnety, čo je efekt, ktorý je možné využiť na terapeutické účely. Krémy s obsahom kapsaicínu sa uplatňujú pri miernení neuropatickej bolesti. [38]

Štúdie tiež naznačujú protizápalový účinok kapsaicínu pri gastritíde spôsobenej *Helicobacterom pylori* [39], antioxidačnú aktivitu [40], antimikrobiálne a antivirálne pôsobenie [41], či antikarcinogénny potenciál [42,43].

### 2.3.2. Elektrochemické správanie kapsaicínu

*Jovanović et al.* skúmali elektrochemické vlastnosti kapsaicínu na parafínom impregnovanej uhlíkovej elektróde (PIGE) pomocou cyklickej (CV) a square – wave voltametrie (SWV). Na základe prevedených experimentov navrhli oxidačný mechanizmus kapsaicínu (schéma 1).[24]

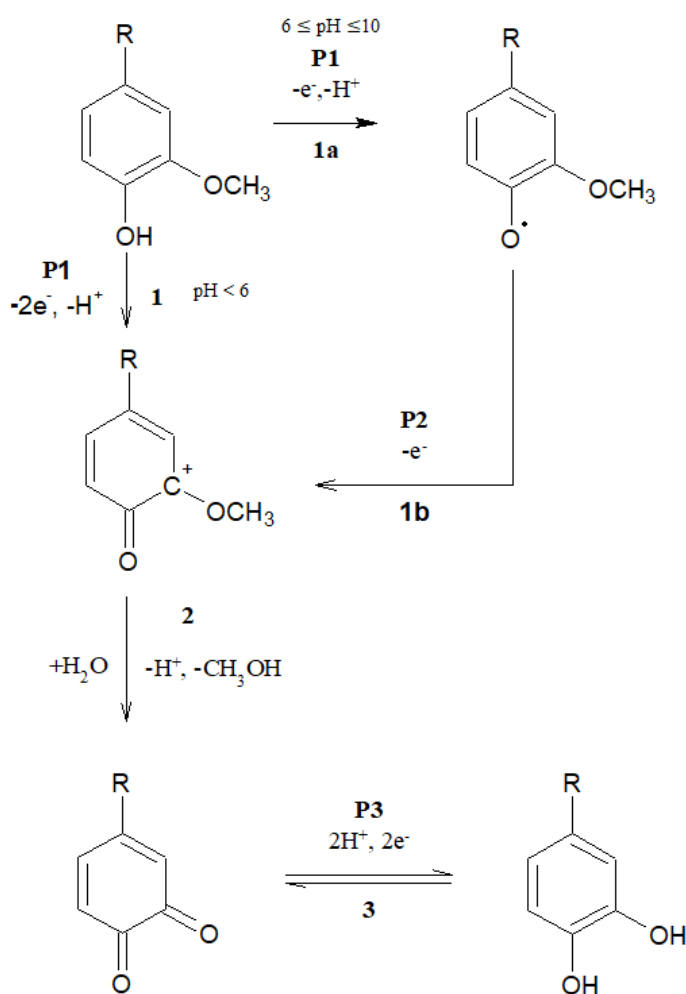
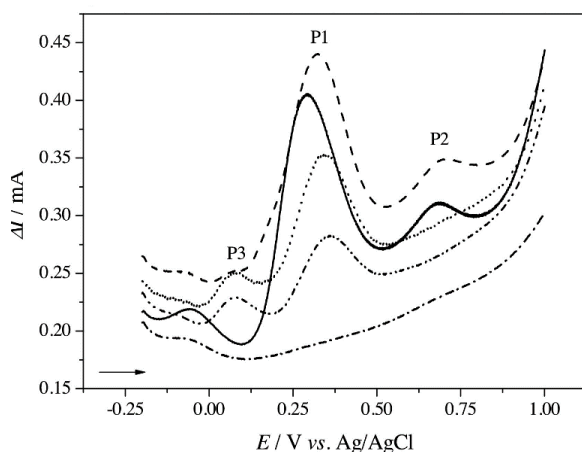
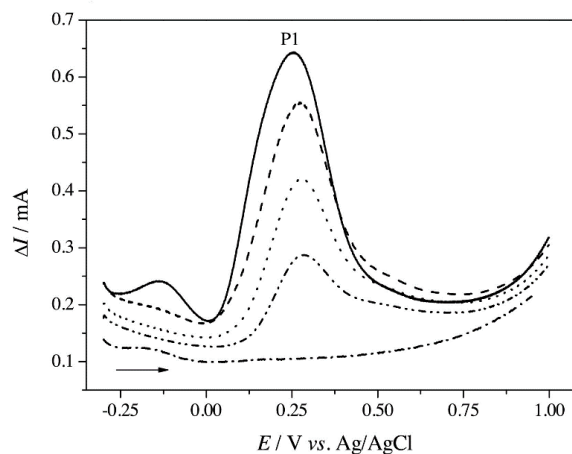


Schéma 1: Oxidačný mechanizmus kapsaicínu [24]

Oxidácia kapsaicínu je dej silne závislý na pH. V závislosti na hodnote pH nastáva oxidácia hydroxylovej skupiny na benzénovom jadre kapsaicínu rôznymi cestami. Pri neutrálnych a bázických podmienkach ( $6 \leq \text{pH} \leq 10$ ) oxidácia prebieha EE – mechanizmom, cez dva separované 1 – elektrónové kroky, ktoré sú v SWV voltamograme (Obr.1) prezentované dvoma píkmi (P1 a P2). V prvom kroku vzniká fenoxylový radikál (1a), ktorý sa v druhom kroku oxiduje na fenoxoniový katión (1b). Prvá elektródová reakcia prebieha rýchlejšie ako druhá, čo sa v SWV voltamograme (Obr. 1) prejavuje vyššou hodnotou prúdovej odozvy píku P1 oproti píku P2. V kyslom pH ( $\text{pH} \leq 6$ ) nastáva oxidácia v jednom kroku 2 – elektrónovým procesom, počas ktorého z kapsaicínu vzniká fenoxoniový katión (1). V silne bázickom prostredí sa rovnako predpokladá prenos 2 elektrónov v jedinom kroku (1), čo potvrdzuje aj jediný pík v SWV voltamograme zmeranom pri pH 11 (Obr. 2). Vzniknutý fenoxoniový katión ďalej podlieha hydrolyze a v štruktúre kapsaicínu vzniká *o*-benzochinón (2) a ten sa ďalej reverzibilne redukuje na katechol (3).[24]



Obr. 1: Opakované SW voltamogramy kapsaicínu v 0,1 M  $\text{KNO}_3$  pri pH 9 (Frekvencia: 100 Hz, amplitúda 50 mV, potenciálový krok: 2 mV)[24]



Obr. 2: Opakované SW voltamogramy kapsaicínu v 0,1 M  $\text{KNO}_3$  pri pH 11 (Frekvencia: 100 Hz, amplitúda 50 mV, potenciálový krok: 2 mV)[24]



## 2.4. Metódy stanovenia a identifikácie kapsaicínu

Vzhľadom k významným organoleptickým vlastnostiam kapsaicínu a vplyvu jeho obsahu na kvalitu čili papriek vzniká potreba jeho stanovenia. [2] Za týmto účelom bolo navrhnutých mnoho metód.

### 2.4.1. Kvapalinová chromatografia

Najčastejšie používanou metódou pre stanovenie kapsaicínu je kvapalinová chromatografia s rôznymi formami detekcie.

*Nag et al.* využili pre stanovenie kapsaicínu vo vybraných druhoch papriek metódu vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) na reverzných fázach s UV-VIS detekciou. Zmes acetonitrilu a vody 65:35 (v/v) bola použitá ako mobilná fáza. pH vody bolo upravené 1% ľadovou kyselinou octovou na hodnotu 3,8. Prietok mobilnej fázy bol nastavený na 1 ml/min. Separácia bola prevedená na kolóne C-18 (250 x 4,6 mm, 5µm) pri teplote 25°C. Objem nástreku bol 20 µl a analýza prebiehala za izokratických podmienok. Vzorky boli pripravené extrakciou navážky papriky v metanole a následnou filtráciou. Pre UV detekciu bola použitá vlnová dĺžka 230 nm. Dosaiahnutý detekčný limit bol 148,34 ng/ml a limit kvantifikácie 445,32 ng/ml. [28]

V štúdií od *Chanthai et al.* bola na stanovenie kapsaicínu využitá HPLC na reverzných fázach s fluorescenčnou detekciou. Mobilnou fázou bola zmes metanolu a deionizovanej vody v pomere 66:34 (v/v). Separácia prebiehala na kolóne Hypersil ODS C18 (4,6 x 100 mm, 3 µm) za izokratických podmienok, pri rýchlosti prietoku 0,9 ml/min. Objem nástreku bol 20 µl. Vzorky papriky boli extrahované metanolom pomocou zrýchlenej extrakcie tuhej látky rozpúšťadlom (ASE – accelerated solvent extraction) a prečistené extrakciou na pevnej fáze (SPE). Na detekciu bol použitý fluorescenčný detektor s excitačnou vlnovou dĺžkou 278 nm a emisnou vlnovou dĺžkou 310 nm. Metódou bol dosiahnutý detekčný limit 0,008 - 0,01 µg/ml.[44]

*Šupáľková et al.* zisťovali vo svojej štúdií obsah kapsaicínu v rôznych častiach papriky. Pre tento účel bola optimalizovaná metóda HPLC s elektrochemickou detekciou. Ako mobilná fáza bola využitá zmes acetátového pufru a metanolu 40:60 (v/v, %), prietok mobilnej fázy bol 0,55 ml/min. Bola použitá kolóna Polaris C-18A (150 x 4,6 mm, 5µm). Separácia bola prevedená pri teplote 25°C. Objem nástreku bol

5  $\mu$ l. Elektrochemický detektor pozostával z prietokovej cely zloženej z pracovnej elektródy zo skleneného uhlíku, na ktorú bol vložený potenciál 750 mV, z referenčnej paládiovej elektródy a pomocnej uhlíkovej elektródy. Merané boli metanolové extrakty vzoriek papriek. Touto metódou bol dosiahnutý detekčný limit 350 ng/ml.[45]

Na charakterizáciu kapsaicinoidov v čerstvých plodoch papriek použili *Schweiggert et al.* kvapalinovú chromatografiu spojenú s hmotnostnou spektrometriou (LC-MS). Čerstvé plody čili papriek boli lyofilizované, následne bola alikvótna navážka papriky extrahovaná v acetóne, odparená do sucha, rozpustená v metanole a prefiltrovaná cez membránový filter. Takto pripravená vzorka bola použitá pre LC-MS. Mobilná fáza bola zložená z 0,5 % kyseliny octovej vo vode a acetonitrilu 90:10 (v/v, A) a z 0,5 % kyseliny octovej v acetonitrile a vody 90:10 (v/v, B). Separácia v systéme Agilent HPLC series 1100 na kolóne Phenomenex C18 SynergiHydro-RP (150 mm x 3,0 mm, 4  $\mu$ m) s predkolónou C18 ODS (10 mm x 3,0 mm) prebiehala za gradientovej elúcie pri teplote 25°C. Objem nástreku bol 15  $\mu$ l. Eluát z kolóny bol zavádzaný do hmotnostného spektrometru Bruker Esquire 3000+ s iónovou pascou. Na ionizáciu vzorky bola použitá chemická ionizácia za atmosférického tlaku. Dáta boli zbierané v pozitívnom móde v rozsahu m/z 100 - 1100. Dusík bol použitý ako sušiaci (5 ml/min) aj zhmlovací plyn (50 psi). Ako kolízny plyn pre kolízne indukovanú disociáciu bolo použité hélium. Z kolíznych spektier bolo okrem kapsaicínu identifikovaných a charakterizovaných ďalších 14 kapsaicinoidov.[46]

## 2.4.2. Plynová chromatografia

Na stanovenie kapsaicínu a ďalších kapsaicinoidov v sušených plodoch papriky bola v štúdií *Bononih* a *Tatea* navrhnutá rýchla plynová chromatografia (GC). Využitý bol systém Shimadzu zložený z plynového chromatografu vybaveného dávkovačom split/splitless, autosamplérom a plameňovo-ionizačným detektorom (FID). Separácia prebiehala na kolóne RTX<sup>®</sup>-5 (5% difenyl – 95% dimetyl polysiloxan) (10 m x 0,1 mm, 0,1  $\mu$ m). Analýza využívala teplotný gradient. Teplota bola na začiatku udržiavaná po dobu 2 min na hodnote 180°C, potom bola postupne rýchlosťou 8°C/min zvyšovaná na 240°C a následne rýchlosťou 14°C/min na hodnotu 320°C. Ako nosný plyn bol použitý vodík s prietokom 78,5 cm/s. Teplota nástreku bola 280°C, splitovací pomer 1:100 a dávkovaný objem 1  $\mu$ l. Extrakty boli pripravené podľa oficiálnej metódy

AOAC (Association of Official Analytical Chemists) 995.03 (1995) extrakciou vriacim etanolom pod spätným chladičom po dobu 5 hodín. Popísaným postupom bol dosiahnutý pre kapsaicín limit detekcie 1,2  $\mu\text{g/mL}$  ml a limit kvantifikácie 3,6  $\mu\text{g/mL}$ . Metóda poskytla podobné časy analýzy ako HPLC-DAD a rýchlejšie časy ako iné GC metódy. [47]

Plynovú chromatografiu s hmotnostnou detekciou popísali ako vhodnú metódu na stanovenie kapsaicínu v čili paprikách *Saha et al.*. Vzorka na meranie bola pripravená lyofilizáciou čili papriky, nasledovala extrakcia acetonitrilom v ultrazvuku a po scentrifugovaní a filtrácii bola vzorka nadávkovaná do plynového chromatografu 7890A GC (Agilent Co., USA) spojeného s hmotnostným spektrometrom Triple Axis HED-EM 5975C (Agilent Co., USA). Ako nosný plyn bolo použité hélium s prietokom 1 ml/min. Dávkovaný objem vzorky bol 1  $\mu\text{l}$ . Na separáciu bola použitá kolóna HP-MS (30 m x 0,25 mm; 0,25  $\mu\text{m}$ ). Analýza prebiehala za teplotného gradientu. Počiatočná teplota 90°C bola udržiavaná po dobu 1 min, potom bola zvyšovaná rýchlosťou 5°C/min na hodnotu 290°C. Použitá bola ionizácia elektrónom (EI) pri 70 eV s teplotou iónového zdroja 200°C. Dáta boli zbierané v módoch full scan a SIM (selected ion monitoring). Štruktúry boli potvrdené porovnaním s knižnicou spektier. Metóda umožnila identifikovať a kvantifikovať 4 hlavné kapsaicinoidy. [27]

### 2.4.3. Voltametrické metódy

Voltametrické techniky pracujúce s rôznymi druhmi a modifikáciami pracovných elektród využívajú pre stanovenie kapsaicínu možnosť jeho elektrooxidácie.

*Novak Janović et al.* používali pre zistenie štipľavosti čili papriek parafinom impregnovanú grafitovú elektródu (PIGE). Elektrochemický experiment využíval trojelektrodový systém v dusíkovej atmosfére zložený z PIGE ako pracovnej elektródy, z Ag/AgCl (3M KCl) ako referenčnej elektródy a platinového drôtku ako pomocnej elektródy. Elektrolyt bol tvorený 0,1 M  $\text{KNO}_3$ . Vzorka papriky vo forme prášku bola aplikovaná na PIGE abrazívne, otrením elektródy o vzorku. Následne bola elektróda ponorená do elektrolytu a použitá na meranie. Po každom meraní bola mechanicky vyčistená. Meranie bolo prevedené square-wave voltametrou (SWV) pri pH 11 s nasledujúcimi parametrami: potenciálový krok 2 mV, amplitúda 50 mV, frekvencia 150 Hz. Kapsaicín poskytoval jeden pík pri potenciáli 0,282 až 0,333 V. Výška píku

poskytovala informáciu o obsahu kapsaicínu. Výsledky boli korelované s informáciami o štiplavosti papriek podľa Scovilleho stupnice štiplavosti, na základe čoho bolo zistené, že popísaná metóda môže byť použitá na rozlišovanie medzi rôznymi druhmi papriek na základe ich štiplavosti. Dosiahnutý limit detekcie zisťovaný v zmesi s  $\text{CaCO}_3$  bol 10 ppm.[24]

*Yardim a Şentiürk* stanovovali kapsaicín na tužkovej grafitovej elektróde (PG) metódou square-wave adsorptívnej stripping voltametrie (SW-AdSV). Experiment prebiehal v trojelektrodovom usporiadaní s pracovnou elektródou PG, referenčnou elektródou Ag/AgCl (3 M KCl) a pomocnou elektródou z platinového drôtku. PG bola pred meraním predupravená aplikovaním potenciálu +1,4 V na 30 s vo vodnom médiu obsahujúcom elektrolyt za účelom zväčšenia povrchu elektródy. Okrem toho oxidáciou grafitových vrstiev vznikli na povrchu elektródy funkčné skupiny obsahujúce kyslík. Každé meranie bolo prevedené s novou PG. Elektrolytom bol Britton - Robinsonov pufor (pH 9,0). Pred samotným meraním bola prevedená akumulácia po dobu 120 s pri potenciáli -0,1 V. Meranie SWV prebiehalo v rozsahu potenciálov -0,1 V až +0,1 V, frekvencia bola 125 Hz, amplitúda 20 mV, potenciálový krok 8 mV. Vzorky papriky boli extrahované etanolom 20 min v ultrazvukovom kúpeli, miešané 120 min na magnetickej miešačke, následne centrifugované a supernant bol použitý na meranie. Kapsaicín poskytoval odozvu pri + 0,31 V (vs. Ag/AgCl). Detekčný limit pre kapsaicín bol 1,12 g/ml ( $3,7 \times 10^{-9}$  mol/l). [48]

Bórom dopovaná diamantová elektróda (BDD) bola využitá pre stanovenie kapsaicínu v práci od *Yardima*. Meranie bolo prevedené adsorptívnou stripping voltametrou (AdSV). Bol využitý trojelektrodový systém s BDD ako pracovnou elektródou, s referenčnou Ag/AgCl (3 M NaCl) elektródou a pomocnou elektródou z platinového drôtku. Základným elektrolytom bol Britton – Robinsonov pufor pH 1,0. Pred meraním bola elektróda predupravená polarizáciou po dobu 180 s pri -0,3 V a + 0,3 V v 0,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Pred každým meraním bola BDD elektróda mechanicky vyleštená na leštiacej tkanine s aluminou a umytá v deionizovanej vode. Pred samotným meraním bola prevedená akumulácia po dobu 90 s pri potenciáli nezaťaženého obvodu (open circuit). Samotné meranie bolo uskutočnené SWV v rozsahu potenciálov +0,2 V až +1,3 V, pri frekvencii 100 Hz, s amplitúdou 30 mV a potenciálovým krokom 10 mV. Ako vzorky boli vybrané drvené čili papričky a čili pasta. Vzorky boli extrahované etanolom, sonifikované v ultrazvukovom kúpeli, miešané na magnetickej miešačke a sцентрифugované. Supernatanty boli použité na voltametrickú analýzu. Výsledky ukázali,

že prítomnosť dodecylsulfátu sodného (SDS) BDD výrazne zvyšuje prúdovú odozvu kapsaicínu pri jeho oxidácii. Kapsaicín poskytoval odozvu pri potenciáli +0,7 V. Metóda poskytovala linearitu v rozsahu od 0,05 do 6,0 µg/ml (0,16 – 20 µM). Meraním pomocou BDD bol dosiahnutý detekčný limit 0,012 µg/ml. [49]

*Baytak a Aslanoglu* modifikovali elektródu zo skleneného uhlíku (GCE) uhlíkovými nanotrubičkami (CNTs) a dekorovali ruténiovými nanočasticami (RuNTs). Experiment bol prevedený v trojelektrodovom zapojení, kde GCE s priemerom 3 mm slúžila ako pracovná elektróda, Ag/AgCl ako referenčná elektróda a platínový drôtik mal funkciu pomocnej elektródy. Ako základný elektrolyt bol použitý fosfátový pufr (PBS) o pH 4. GCE elektróda bola vyleštená na alumine, sonifikovaná v etanole v ultrazvukovom kúpeli a umytá vodou. Aktivácia elektródy bola prevedená cyklickou voltametriadou (CV) v rozsahu potenciálov od -0,4 do + 1,0 V rýchlosťou 0,1 V/s v 0,1 mol/l PBS, pokiaľ elektróda nedávala stabilný voltamogram. CNTs boli pridané do zmesi koncentrovanej HNO<sub>3</sub> s HClO<sub>4</sub> (3:7, v.v) a sonifikované po dobu 5 h. Týmto bol funkcionalizovaný ich povrch. Po filtrácii, vysušení a navážení 5 mg častíc, boli častice prevedené do 25 ml chloroformu a sonifikované 2 h. Na GCE boli nanosené 2 µl suspenzie CNTs. Následne bola elektróda ponorená do roztoku acetonitrilu obsahujúceho 1 mM RuCl<sub>3</sub> a 10 mM LiClO<sub>4</sub>. Pomocou CV v rozsahu od -1,25 V do +1,75 V (10 cyklov) boli RuNTs deponované na povrch elektródy. Nakoniec bola ešte prevedená reaktivácia elektródy cyklickou voltametriadou (CV) v rozsahu potenciálov od -0,4 do + 1,0 V v 0,1 mol/l PBS a elektróda bola použitá na meranie. Vzorky boli pripravené extrakciou vzoriek papriek v metanole, pH bolo upravené na hodnotu 4 a vzorky boli sonifikované, miešané, a nakoniec prefiltrované. Filtrát bol použitý na meranie pomocou SWV v 0,1 M PBS pH4. Frekvencia bola 22 Hz, amplitúda 50 mV/s a potenciálový krok 100 mV/s. SWV s RuNPs/CNTs/GCE bol dosiahnutý lineárny koncentračný rozsah od 1,0 x 10<sup>-8</sup> mol/l do 4,1 x 10<sup>-7</sup> mol/l a detekčný limit 2,5 x 10<sup>-9</sup> mol/l. [50]

Uhlíkovú pastovú elektródu (CPE) modifikovanú amino-funcionalizovanou mezoporéznym oxidom kremičitým (NH<sub>2</sub>-FMS) použili na stanovenie kapsaicínu *Ya et al.* Použitý bol trojelektrodový systém zložený z pracovnej uhlíkovej pastovej elektródy, referenčnej kalomelovej elektródy a z platínového drôtku ako pomocnej elektródy. Modifikovaná CPE bola pripravená zmiešaním vopred nasyntetizovanej MS-FMS (0,038 g) a práškového uhlíku (0,15 g) s parafinovým olejom (0,30 ml). Homogénna pasta bola natlačená do polyterafluoroetylénovej trubičky s priemerom

3 mm s medeným piestom. Povrch elektródy sa vyleštil na jemnom papieri. Ako elektrolyt bol použitý pufoer NaAc-HCl (1 M) o pH 2. Pred meraním bola prevedená akumulácia po dobu 180 s pri potenciáli nezat'azeneho obvodu (open circuit). Na meranie bola použitá voltametria s lineárnou zmenou napätia. Meraný potenciálový rozsah bol 0,4 – 0,9 V. Rýchlosť skenu bola 50 mV/s. Kapsaicín poskytoval odozvu pri potenciáli 0,6 V. Vzorky boli pripravené extrakciou čili prášku metanolom v ultrazvukovom kúpeli a následnou centrifugáciou. Supernatant bol po zriedení použitý na meranie. Popísaná metóda poskytla detekčný limit 0,02  $\mu\text{mol/l}$ . [51]

#### **2.4.4. Ďalšie metódy**

Okrem už zmienených metód boli publikované štúdie uvádzajúce ďalšie inštrumentálne techniky pre stanovenie kapsaicínu v paprikách. Ako príklad možno uviesť kapilárnu elektroforézu či elektrokinetickú micelárnu chromatografiu. [26,52]

## 3. Experimentálna časť

### 3.1. Prístrojové vybavenie

Elektrochemické merania boli prevedené na prístrojoch EcoTribo polarograf (Polaro-Senzors, Praha, Česká Republika) so softvérom Polar 4 a Autolab PGSTAT128N (Metrohm Autolab, Utrecht, Holandsko) so softvérom NOVA 1.10 a 1.11. Pomocou softvérov boli nastavené parametre meraní a vyhodnocované výsledky. Pre elektrochemické experimenty bolo použité trojelektrodové zapojenie s uhlíkovou sklenenou elektródou (GCE) ako pracovnou elektródou, Ag/AgCl (1 M KCl) ako referenčnou elektródou a platinovým drôtikom (resp. platinovým plieškom) ako pomocnou elektródou.

Pre chromatografický experiment bol využitý kvapalinový chromatograf ECOM (ECOM spol. s r.o., Praha, Česká republika) so softvérom Clarity.

Pri experimentoch bol využitý aj hmotnostný spektrometer s iónovou pascou Agilent 1100 Series LC/MSD Trap (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) v spojení s elektrochemickou celou Model 5021A (ESA, Chelmsford, USA) pripojenou k potenciostatu ADLC1 (Lab. prístroje, Praha, Česká republika). Súčasťou cely bola pracovná elektróda z porézneho uhlíku a hydrogenpaládiová referenčná elektróda.

Pri akumulácii stanovovanej látky na povrch GCE bolo potrebné miešanie vzorky pomocou magnetickej miešačky MR Hei-Standard (Heldolph instruments, Schwabach, Nemecko). Počas čistenia elektródy sa uplatnil ultrazvukový kúpeľ Sonorex Digitec (Bandelin, Berlín, Nemecko).

Pri úprave pH Britton-Robinsonovho pufru sa využil pH meter InoLab 720 (WTW, Weilheim, Nemecko) a kombinovanou sklenenou elektródou SenTix 41 (WTW, Weilheim, Nemecko) a chemikálie boli vážené na váhach Kern ALS 220-4 (Kern&Sohn GmbH, Balingen, Nemecko).

### 3.2. Chemikálie

- Kapsaicín ( $\geq 95\%$  from *Capsicum sp.*) (Sigma – Aldrich, St. Louis, USA)
- Asolectin (fosfatidylcholin  $\sim 25\%$ ) (Fluka, Buchs, Švajčiarsko)
- Chlorid sodný (Lachema, Brno, Česká republika)
- Ferrokyanid draselný trihydrát (Lachema, Brno, Česká republika)
- Metanol (HPLC grade, VWR chemicals, USA)

- Etanol (HPLC grade, VWR chemicals, USA)
- n – hexán (Lach-ner, Neratovice, Česká republika)
- Acetón (Lach-ner, Neratovice, Česká republika)
- Acetonitril (HPLC grade, VWR chemicals, USA)
- Alumina (Sigma – Aldrich, St. Louis, USA)
- Kyselina mravčia (Merck, Darmstadt, Nemecko)
- Kyselina boritá (Lach-ner, Neratovice, Česká republika)
- Hydroxid sodný (Lach-ner, Neratovice, Česká republika)
- Kyselina octová (Lach-ner, Neratovice, Česká republika)
- Kyselina ortho-fosforečná 85 % (Fluka, Buchs, Švajčiarsko)
- Chlorid draselný (Spolek pro chemickou a hutní výrobu, Rybitví)

### **3.3. Metodická časť**

#### **3.3.1. Príprava nemodifikovanej elektródy na meranie**

Elektróda zo skleného uhlíku bola pred každým meraním opláchnutá destilovanou vodou a následne mechanicky vyčistená na leštiacej tkanine pomocou suspenzie alumíny ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ , <50 nm) v destilovanej vode, ktorá bola na leštiacu tkaninu nanesená pipetou. Takto vyčistená elektróda bola následne sonifikovaná v ultrazvukovom kúpeli ponorená v skúmavke s destilovanou vodou po dobu 1 minúty a nakoniec znova opláchnutá destilovanou vodou.

#### **3.3.2. Príprava zásobného roztoku kapsaicínu**

Zásobný roztok kapsaicínu s koncentráciou  $10^{-3}$  mol/l (resp.  $10^{-2}$  mol/l) bol pripravený rozpustením navážky kapsaicínu v metanole.

#### **3.3.3. Meranie závislosti na rýchlosti skenu**

Meranie závislosti prúdovej odozvy na rýchlosti polarizácie elektródy, bolo prevedené metódou cyklickej voltametrie (CV) v trojelektrodovom systéme s pracovnou elektródou zo skleného uhlíku, referenčnou Ag/AgCl (1 M KCl) elektródou a pomocnou platinovou elektródou. Meranie prebehlo pri nasledujúcich parametroch:

- Počiatočný potenciál: 0 mV



- Potenciálový rozsah: 0 – 1000 mV
- Počet cyklov: 2
- Rýchlosti skenu: 500, 400, 300, 200, 100, 75, 50, 20 mV/s

Ako základný elektrolyt slúžil Britton – Robinsonov pufr, ktorým bola naplnená voltametrická nádobka. V nej bola umiestnená malá nádobka s fritou (vycor) s meraným roztokom o celkovom objeme 500  $\mu\text{l}$ , v ktorej bol postupne pri jednotlivých rýchlostiach skenu premeraný najskôr základný elektrolyt, ktorý obsahoval 250  $\mu\text{l}$  Britton – Robinsonovho pufru pH 3 a 250  $\mu\text{l}$  destilovanej vody. Následne bol pri všetkých rýchlostiach skenu premeraný roztok s prídavkom štandardného roztoku kapsaicínu ( $10^{-3}$  mol/l), ktorý obsahoval 250  $\mu\text{l}$  Britton – Robinsonovho pufru pH 3, 200  $\mu\text{l}$  destilovanej vody a 50  $\mu\text{l}$  roztoku kapsaicínu. Rovnaký postup sa zopakoval za použitia Britton – Robinsonovho pufru o pH 7 a pH 10.

### 3.3.4. Meranie závislosti na pH

Metódami cyklickej (CV) a diferenciálne pulznej voltametrie (DPV) sa merali závislosti prúdovej odozvy a potenciálu na pH. Bola pripravená séria Britton – Robinsonových pufrův o rôznom pH v rozmedzí 2 – 12. Každou z metód bol najskôr premeraný základný elektrolyt (250  $\mu\text{l}$  Britton – Robinsonovho pufru o určitom pH + 200  $\mu\text{l}$  destilovanej vody) a následne bolo do elektrolytu pridaných 50  $\mu\text{l}$  roztoku štandardu kapsaicínu ( $10^{-3}$  mol/l). Rovnaký postup sa zopakoval pri každom pH.

Parametre merania pre CV:

- Počiatočný potenciál: 0 mV
- Potenciálový rozsah: 0 – 1000 mV
- Rýchlosť skenu: 100 mV/s
- Počet cyklov: 2

Parametre merania pre DPV:

- Počiatočný potenciál: 0 mV
- Potenciálový rozsah: 0 – 1000 mV
- Výška pulzu: 50 mV
- Šírka pulzu: 80 ms
- Rýchlosť skenu: 20 mV/s

### 3.3.5. Meranie kalibračnej závislosti

Na zistenie závislosti prúdu na koncentrácii kapsaicínu sa využila metóda diferenčne pulznej voltametrie s parametrami:

- Potenciálový rozsah: 100 – 1000 mV
- Výška pulzu: 50 mV
- Šírka pulzu: 80 ms
- Rýchlosť skenu: 20 mV/s

Základný elektrolyt v malej voltametrickej nádobke s vycorovou fritou pozostával z 500  $\mu$ l Britton – Robinsonovho pufru pH 2 a 500  $\mu$ l destilovanej vody. Na začiatku bol zmeraný samostatný základný elektrolyt, do ktorého sa postupne pridával roztok štandardu kapsaicínu ( $10^{-3}$  mol/l), aby sa dosiahli koncentrácie  $10^{-6}$ ,  $2 \cdot 10^{-6}$ ,  $4 \cdot 10^{-6}$ ,  $6 \cdot 10^{-6}$ ,  $8 \cdot 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $2 \cdot 10^{-5}$ ,  $4 \cdot 10^{-5}$ ,  $6 \cdot 10^{-5}$ ,  $8 \cdot 10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  mol/l. Pri každej z týchto koncentrácií bola zmeraná krivka a každé meranie bolo opakované dvakrát.

### 3.3.6. Elektrochémia s online detekciou hmotnostnou spektrometriou

Elektrochemická oxidácia kapsaicínu bola prevedená v prietokovej elektrochemickej cele pripojenej cez decoupler k iónovému zdroju hmotnostného spektrometru s analyzátorom iónovou pascou. Na pracovnú elektródu sa vkladal potenciál postupne sa zvyšujúci po krokoch 50 mV v rozmedzí od 0 do 1000 mV. Roztok obsahujúci 200  $\mu$ l štandardu kapsaicínu ( $10^{-3}$  mol/l), 200  $\mu$ l metanolu, 200  $\mu$ l kyseliny mravčej a 2,4 ml deionizovanej vody bol dávkován rýchlosťou 9  $\mu$ l/min.

Hmotnostné spektrá boli zaznamenávané po dobu 1 min. v kladnom i zápornom móde elektrospreja (ESI), s parametrami nastavenými nasledovne:

- Napätie na vstupnej kapiláre: - 2500 V (ESI+)/+2500 V (ESI-)
- Tlak zhmlovaného plynu ( $N_2$ ): 10 psi
- Prietok sušiacieho plynu ( $N_2$ ): 3 l/min
- Sušiacia teplota: 150 °C
- Sken: 20 – 500 m/z

### **3.3.7. HPLC**

#### **3.3.7.1. Spôsob extrakcie**

Boli porovnané dva postupy extrakcie kapsaicínu zo vzoriek štiplavých papriek a pre ďalšie merania vybraný ten, ktorý poskytoval lepšie výsledky.

Postup 1: K navážke 100 mg vzorky čili papriky sa pridali 2 ml etanolu, nasledovala macerácia po dobu 30 min a 15 – minútová sonifikácia v ultrazvukovom kúpeli pri teplote 40°C. [53]

Postup 2: K navážke 100 mg vzorky čili papriky sa pridali 2 ml etanolu a vzorka bola 30 min sonifikovaná v ultrazvukovom kúpeli pri teplote 40°C.

#### **3.3.7.2. Mobilná fáza**

Mobilná fáza pre meranie HPLC obsahovala 40 % acetonitrilu a 60 % vody s 0,1 % kyseliny mravčej. [53]

#### **3.3.7.3. Príprava kalibračných roztokov kapsaicínu**

Riedením štandardného roztoku kapsaicínu ( $10^{-3}$  mol/l) mobilnou fázou (MF) boli pripravené kalibračné roztoky v koncentráciách  $2 \cdot 10^{-5}$  mol/l (10  $\mu$ l štandardu + 490  $\mu$ l MF),  $10^{-4}$  mol/l (50  $\mu$ l štandardu + 450  $\mu$ l MF) a  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l (250  $\mu$ l štandardu + 250  $\mu$ l MF). Kalibračné roztoky slúžili na stanovenie obsahu kapsaicínu metódou kalibračnej priamky.

#### **3.3.7.4. Extrakcia vzoriek čili papriek a príprava vzoriek na HPLC meranie**

Navážka vzorky čili papriky (100 mg) sa extrahovala v 2 ml etanolu počas macerácie (30 min) a sonifikácie v ultrazvukovom kúpeli (15 min). Extrakty sa prefiltrovali cez teflónový mikrofilter. Z každého extraktu bolo odobraných 600  $\mu$ l, ku ktorým sa pridalo 400  $\mu$ l etanolu. Ďalších 600  $\mu$ l extraktu sa zriedilo 350  $\mu$ l etanolu a pridalo sa 50  $\mu$ l štandardného roztoku. Zo všetkých pripravených roztokov sa odobralo 250  $\mu$ l a pridalo sa 250  $\mu$ l mobilnej fázy. Takto pripravené roztoky boli použité na stanovenie obsahu kapsaicínu metódou štandardného prídavku.

### 3.3.7.5. Stanovenie pomocou HPLC

Pripravené kalibračné roztoky a extrakty boli analyzované metódou HPLC pomocou prístroja ECOM s UV detektorom Sapphire 800 pri vlnovej dĺžke 222 nm. Pri analýze sa využila kolóna Kinetex C18 (2,6  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ ). Mobilná fáza obsahovala 40 % acetonitrilu a 60 % vody s 0,1 % kyseliny mravčej a analýza prebiehala pri izokratckej elúcii. Objem nástreku bol 20  $\mu\text{l}$  a rýchlosť prietoku bola nastavená na 0,4 ml/min. Pre kvantifikáciu sa využili metódy kalibračnej priamky a štandardného prídavku.

### 3.3.8. Príprava elektródy modifikovanej fosfolipidovou membránou

Očistená elektróda zo skleneného uhlíku (GCE) bola elektrochemicky modifikovaná. Elektrochemická nádobka sa naplnila roztokom chloridu sodného (9 g/l) a na pracovnú GCE elektródu bolo po dobu 3 minút vkladané napätie 1,5 V (vs. Ag/AgCl (1M KCl)). Následne bola elektróda opláchnutá destilovanou vodou a prúd dusíku bol použitý na jej vysušenie. Na vysušenú elektródu sa nanieslo 5  $\mu\text{l}$  roztoku asolectinu v hexáne (3 mg/ml) a elektróda bola ponorená do roztoku chloridu sodného na dobu 30 min, počas ktorej sa vytvorila fosfolipidová membrána.[54]

### 3.3.9. Testovanie fosfolipidovej membrány

Potom ako bola prevedená modifikácia povrchu elektródy, bolo potrebné zistiť kvalitu pokrytia fosfolipidovou membránou. K tomu sa využilo meranie cyklickou voltametrou v roztoku ferrokyanidu draselného ( $10^{-3}$  mol/l) s týmito parametrami:

- Počiatočný potenciál: 0 mV
- Potenciálový rozsah: -400 mV až +700 mV
- Rýchlosť skenu: 50 mV/s

Elektróda bola použitá na ďalšie meranie, pokiaľ sa potvrdila prítomnosť fosfolipidovej membrány tým, že sa v cyklickom voltamograme nevyskytovali prúdové odozvy ferro/ferrikyjanidu.

### 3.3.10. Akumulácia kapsaicínu na elektródu

Pred akumuláciou sa GCE elektróda, či už nemodifikovaná alebo modifikovaná fosfolipidovou membránou, jemne opláchla ponorením do destilovanej vody. Následne sa na 1 minútu ponorila do extraktu čili papriky miešaného na magnetickej miešačke (Obr. 3). Po akumulácii sa elektróda opäť jemne opláchla ponorením do destilovanej vody a bola použitá na meranie.



Obr. 3: Akumulácia kapsaicínu na povrch elektródy v extrakte čili papriky

### 3.3.11. Čistenie elektródy od fosfolipidovej membrány

Elektróda bola postupne sonifikovaná v hexáne, metanole a vode, vždy 5 minút. Potom sa vyleštil jej povrch na leštiacej tkanine so suspenziou alumíny, opláchla sa vodou a sonifikovala v skúmavke s destilovanou vodou v ultrazvukovom kúpeli po dobu 1 minúty.

### 3.3.12. Voltametrické metódy stanovenia

Všetky voltametrické merania prebiehali v dvojdielnej nádobke, kde vo vonkajšej nádobke bol vždy základný Britton - Robinsonov pufor a vo vnútornej malej nádobke s vycorovou fritou bolo pre všetky metódy okrem metódy A 500  $\mu\text{l}$  Britton – Robinsonovho pufru o pH 2, v ktorom prebiehalo meranie kalibračných štandardov alebo vzoriek.

#### 3.3.12.1. Diferenčne pulzná voltameria (DPV)

##### 3.3.12.1.1. Metóda A

Navážka 100 mg vzorky čili papriky sa extrahovala 2 ml etanolu podľa postupu 1 popísanom v 3.3.7.1 a extrakty boli prefiltrované cez teflónový filter. Do malej nádobky sa napipetovalo 500  $\mu\text{l}$  Britton – Robinsonovho pufru pH 2 a 450  $\mu\text{l}$  etanolu. Takto prichystaný základný elektrolyt bol zmeraný metódou DPV. Vzápätí sa do malej nádobky napipetovalo 50  $\mu\text{l}$  extraktu papriky a roztok bol zmeraný. Nakoniec sa ešte premeral roztok po prídavku 20  $\mu\text{l}$  štandardného roztoku kapsaicínu ( $10^{-3}$  mol/l). Výsledky sa vyhodnotili metódou štandardného prídavku.

Parametre metódy:

- Počiatočný potenciál: 100 mV
- Potenciálový rozsah: 100 - 1000 mV
- Rýchlosť skenu: 20 mV/s
- Výška pulzu: 50 mV
- Šírka pulzu: 80 ms

##### 3.3.12.1.2. Metóda B – transferová metóda na nemoifikovanej elektróde

Do vialky bolo navážených 20 mg vzorky čili papriky, pridaný 1 ml etanolu, nasledovala macerácia po dobu 30 minút a sonifikácia po dobu 15 min pri teplote 40°C, a nakoniec boli pridané 4 ml destilovanej vody. Do tohto extraktu bola na 1 minútu ponorená čistá pracovná elektróda zo skleneného uhlíku. Po akumulácii bola opláchnutá ponorením do destilovanej vody a vložená do malej voltametrickej nádobky a bolo spustené meranie s týmito parametrami:

- Počiatočný potenciál: 300 mV
- Potenciálový rozsah: 300 - 1000 mV

- Rýchlosť skenu: 20 mV/s
- Výška pulzu: 50 mV
- Šírka pulzu: 80 ms

Po každom meraní sa elektróda očistila na leštiacej tkanine so suspenziou alumíny podľa postupu v kapitole 3.3.1 a vymenil sa elektrolyt v malej nádobke s fritou za čistý.

Meranie bolo vyhodnocované metódou kalibračnej priamky (**metóda B1**) a štandardného prídavku (**metóda B2**). Pre metódu kalibračnej priamky boli pripravené kalibračné štandardy kapsaicínu v koncentráciách  $2 \cdot 10^{-4}$ ;  $10^{-4}$ ;  $5 \cdot 10^{-5}$ ;  $2,5 \cdot 10^{-5}$ ,  $1,25 \cdot 10^{-5}$  a  $0,625 \cdot 10^{-5}$  mol/l. Kalibračné roztoky boli premerané rovnakým spôsobom ako extrakty čili paprík, teda bola prevedená akumulácia na povrch GCE elektródy za miešania po dobu 1 minúty. Po akumulácii sa elektróda preniesla do elektrolytu v malej nádobke a bolo spustené meranie. Pre metódu štandardného prídavku bolo do pripravených extraktov po ich premeraní pridané určité množstvo štandardného roztoku kapsaicínu ( $10^{-2}$  mol/l) v závislosti na intenzite prúdovej odozvy samotnej vzorky.

### 3.3.12.1.3. Metóda C – transferová metóda na modifikovanej elektróde

Analytická vzorka bola pripravená navážením 20 mg vzorky čili papriky a jej extrakciou v 1 ml etanolu podľa postupu 1 v kapitole 3.3.7.1. Po extrakcii sa k extraktu pridali 4 ml destilovanej vody. Elektróda zo skleneného uhlíku (GCE) modifikovaná fosfolipidovou membránou (viď. kapitola 3.3.8) sa na 1 minútu ponorila do miešaného extraktu čili papriky. Po akumulácii nasledovalo jemné opláchnutie elektródy ponorením do destilovanej vody tak, aby sa nepoškodila fosfolipidová membrána. Potom sa elektróda ponorila do malej voltametrickej nádobky a spustilo sa meranie s rovnakými nastaveniami ako v kapitole 3.3.12.1.2.

Po meraní bolo potrebné vymeniť elektrolyt v malej nádobke za čistý a vyčistiť povrch elektródy s fosfolipidovou membránou od naakumulovaného kapsaicínu. Za týmto účelom sa elektróda ponorila na 10 min do destilovanej vody. Po uplynutí tohto času mohla byť prevedená ďalšia akumulácia.

Na vyhodnotenie výsledkov sa použila metóda kalibračnej priamky (**metóda C1**) a štandardného prídavku (**metóda C2**). Na vytvorenie kalibračnej závislosti boli pripravené kalibračné roztoky kapsaicínu s koncentraciami  $2 \cdot 10^{-4}$ ;  $10^{-4}$ ;  $5 \cdot 10^{-5}$ ;  $2,5 \cdot 10^{-5}$ ,  $1,25 \cdot 10^{-5}$  a  $0,625 \cdot 10^{-5}$  mol/l a zmerané boli rovnakým spôsobom ako extrakty čili

papriek. Pre vyhodnotenie metódou štandardného prídavku bol do pripravených extraktov pridaný určitý objem štandardu kapsaicínu ( $10^{-2}$  mol/l).

### 3.3.12.2. Lineárna voltametria

#### 3.3.12.2.1. Metóda D – transferová metóda na nemodifikovanej elektróde

20 mg vzorky čili papriky sa navážilo do vialky, pridal sa 1 ml etanolu a vykonala sa extrakcia podľa postupu 1 v kapitole 3.3.7.1. Do extraktu boli pridané 4 ml destilovanej vody. Čistá GCE elektróda bola ponorená do pripraveného extraktu, ktorý bol miešaný na magnetickej miešačke. Akumulácia prebiehala po dobu 1 minúty, potom bola elektróda zbavená pevných nečistôt z extraktu ponorením do destilovanej vody a vzápätí použitá na meranie.

Parametre merania pre lineárnu voltametriu:

- Počiatočný potenciál: 300 mV
- Potenciálový rozsah: 300 - 1000 mV
- Rýchlosť skenu: 100 mV/s

Po každom meraní bolo potrebné elektródu vyleštiť na tkanine s aluminou (viď. 3.3.1) a vymeniť elektrolyt v malej nádobke za čistý.

Metóda kalibračnej priamky (**metóda D1**) a metóda štandardného prídavku (**metóda D2**) sa využili na kvantifikáciu kapsaicínu vo vzorkách papriek. Pre metódu kalibračnej priamky boli pripravené kalibračné roztoky s koncentraciami kapsaicínu  $2 \cdot 10^{-4}$ ;  $10^{-4}$ ;  $5 \cdot 10^{-5}$ ;  $2,5 \cdot 10^{-5}$ ,  $1,25 \cdot 10^{-5}$  a  $0,625 \cdot 10^{-5}$  mol/l. Tieto roztoky sa zmerali rovnakým spôsobom ako extrakty papriek. Pre stanovenie kapsaicínu metódou štandardného prídavku bol do extraktu papriky pridaný určitý objem štandardného roztoku kapsaicínu ( $10^{-2}$  mol/l) a extrakty boli znova zmerané.

#### 3.3.12.2.2. Metóda E – transferová metóda na modifikovanej elektróde

Podľa postupu 1 v kapitole 3.3.7.1. bola prevedená extrakcia 20 mg vzorky čili papriky v 1 ml etanolu. Po extrakcii boli k extraktu pridané 4 ml destilovanej vody. GCE sa podľa postupu v kapitole 3.3.8 modifikovala fosfolipidovou membránou a použila na meranie. Najskôr bola prevedená akumulácia v extrakte papriky za miešania po dobu 1 minúty, následne sa elektróda opatrne umyla destilovanou vodou a preniesla do mernej nádoby, kde bolo uskutočnené meranie pri rovnakých



parametroch ako v kapitole 3.3.12.2.1 Po meraní sa elektróda ponorila na 10 min do destilovanej vody, aby sa vyčistila od naadsorbovaného kapsaicínu a mohla byť použitá na ďalšie meranie.

Vyhodnocovacie metódy využité na stanovenie obsahu kapsaicínu boli metóda kalibračnej krivky (**metóda E1**) a metóda štandardného prídavku (**metóda E2**). Pre kalibračnú závislosť sa zostrojila z pripravených kalibračných roztokov kapsaicínu s koncentráciami  $2 \cdot 10^{-4}$ ;  $10^{-4}$ ;  $5 \cdot 10^{-5}$ ;  $2,5 \cdot 10^{-5}$ ,  $1,25 \cdot 10^{-5}$  a  $0,625 \cdot 10^{-5}$  mol/l. Pre metódu štandardného prídavku bol do každého extraktu pridaný definovaný objem štandardného roztoku kapsaicínu. Kalibračné roztoky a extrakty so štandardným prídavkom boli premerané rovnakým postupom ako samotné extrakty čili papriek.

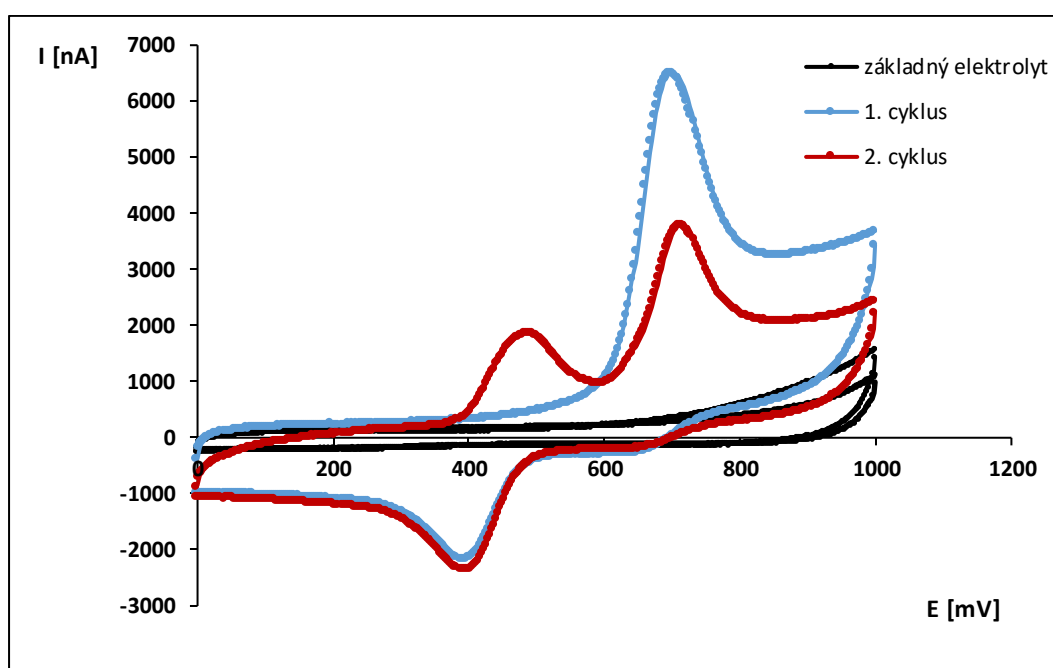
### 3.3.13. Merané vzorky papriek

- Madras chilli – prášok
  - Výskumný ústav rastlinné výroby v Olomouci
  - mleté chilli
- Sušený kozí roh
- Habanero – výt'azok
  - tekutý výt'azok z chilli Habanero žté
  - zloženie: min. 83 % výt'azok z chilli, soľ
  - výrobca: Paprikáreň chillis
- Naga Jolokia – výt'azok
  - tekutý výt'azok z chilli Naga Jolokia
  - zloženie: min. 83 % výt'azok z chilli, soľ
  - výrobca: Paprikáreň chillis
- Carolina Reaper – prášok
  - mleté chilli
- Habanero – prášok
  - mleté chilli

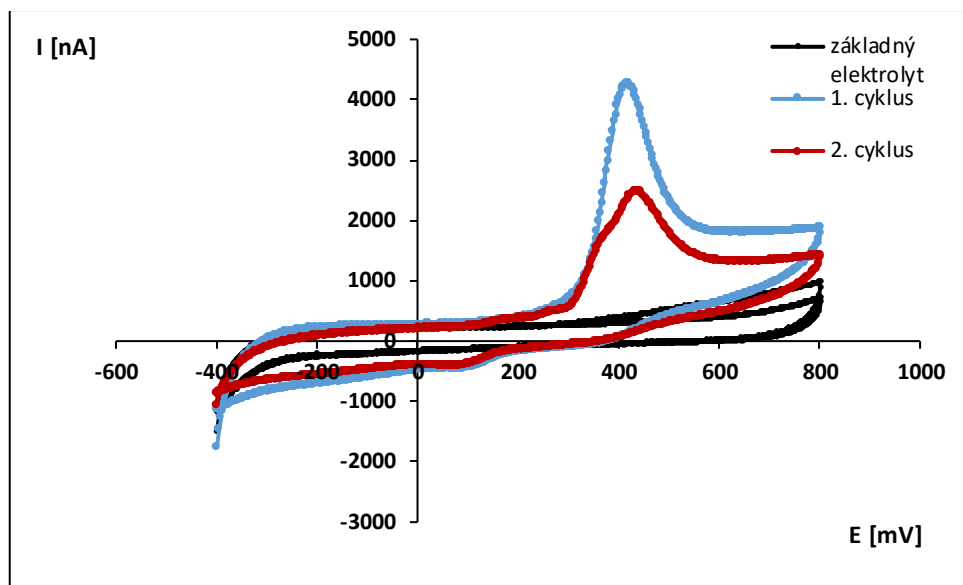
### 3.4. Výsledky a diskusia

#### 3.4.1. Cyklická voltametria – popis elektrochemického správania kapsaicínu

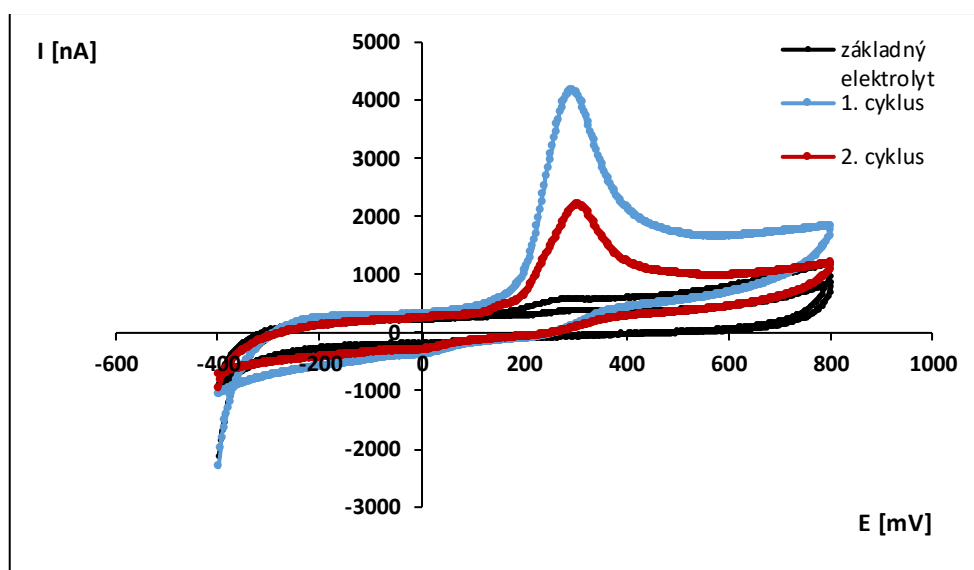
Cyklický voltamogram kapsaicínu (Obr. 4) zmeraný na čistej elektróde zo skleneného uhlíku (GCE) v prostredí Britton – Robinsonovho pufru s pH 2, zobrazuje jeden hlavný anodický pík a jeden redoxný pár píkov. Anodický pík v 1. cykle s maximom pri 700 mV predstavuje oxidáciu kapsaicínu na príslušný *ortho*-benzochinón. V katodickej časti 1. cyklu sa k anodickému píku nenachádza protipík, čo znamená, že oxidácia kapsaicínu je ireverzibilný dej. V katodickej vetve sa objavuje pri potenciáli 400 mV pík, ktorý predstavuje redukciu *ortho*-benzochinónu na katechol. Tento dej je reverzibilný a v anodickej časti 2. cyklu sa vyskytuje pík oxidácie katecholu na *ortho*-benzochinón. V cyklickom voltamograme kapsaicínu zmeranom pri pH 7 a pH 10 (Obr.5) (Obr.6) došlo k posunu hlavného anodického píku oxidácie kapsaicínu k zápornejším hodnotám. Redoxný pár píkov *ortho*-benzochinónu a katecholu z voltamogramov (Obr.5) (Obr.6) pri vyšších hodnotách pH postupne vymizol.



Obr. 4: Cyklický voltamogram kapsaicínu ( $10^{-4}$  mol/l) zmeraný pri rýchlosti skenu 100 mV/s v prostredí Britton – Robinsonovho pufru s pH 2



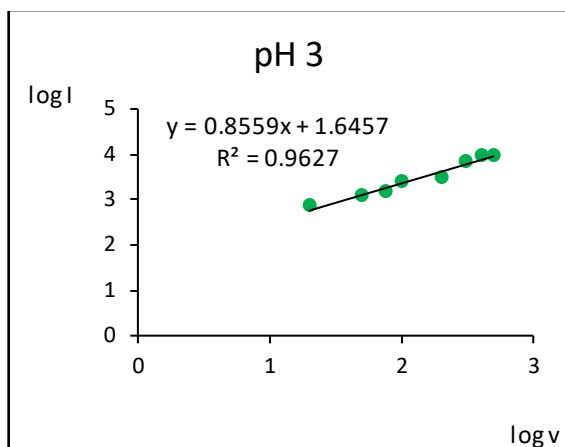
Obr. 5: Cyklický voltamogram kapsaicínu ( $10^{-4}$  mol/l) zmeraný pri rýchlosti skenu  $100$  mV/s v prostredí Britton – Robinsonovho pufru s pH 7



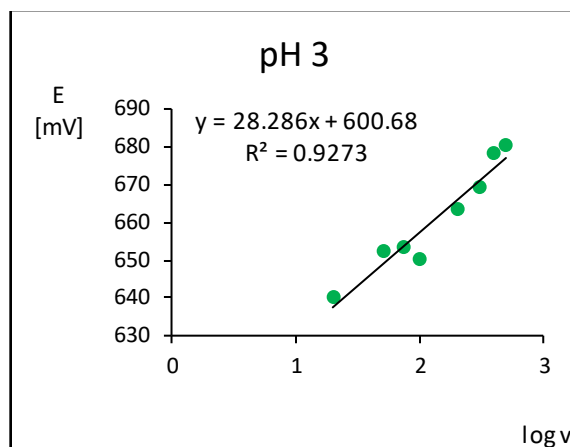
Obr. 6: Cyklický voltamogram kapsaicínu ( $10^{-4}$  mol/l) zmeraný pri rýchlosti skenu  $100$  mV/s v prostredí Britton – Robinsonovho pufru s pH 10

### 3.4.2. Cyklická voltametria – závislosť na rýchlosti skenu

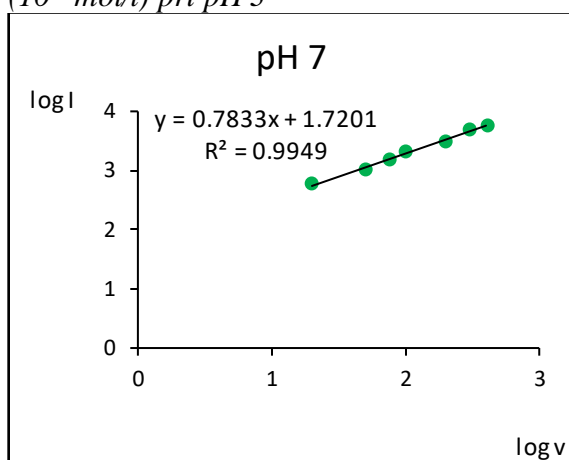
Závislosť na rýchlosti polarizácie pracovnej elektródy bola zistená pre hlavný anodický pík oxidácie kapsaicínu pomocou cyklickej voltametrie pre rýchlosti  $20$  –  $500$  mV/s. Základný elektrolyt tvoril Britton – Robinsonov pufr s destilovanou vodou. Závislosť bola meraná v prostredí s rôznym pH: pufr s pH 3 (kyslé prostredie), pufr s pH 7 (neutrálne prostredie) a pufr s pH 10 (bázické prostredie).



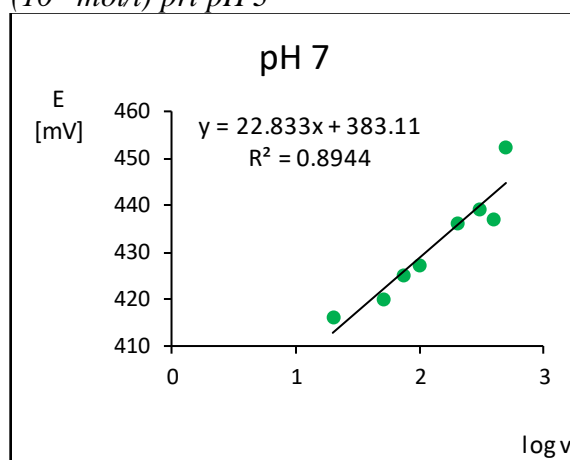
Obr.7a: Závislosť logaritmu prúdu na logaritme rýchlosti skenu pre kapsaicín ( $10^{-4}$  mol/l) pri pH 3



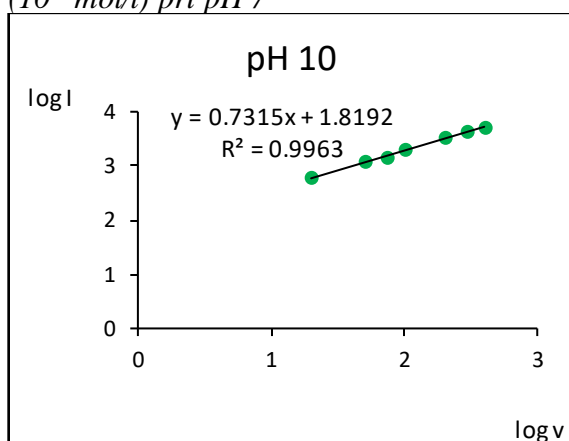
Obr.7b: Závislosť potenciálu na logaritme rýchlosti skenu pre kapsaicín ( $10^{-4}$  mol/l) pri pH 3



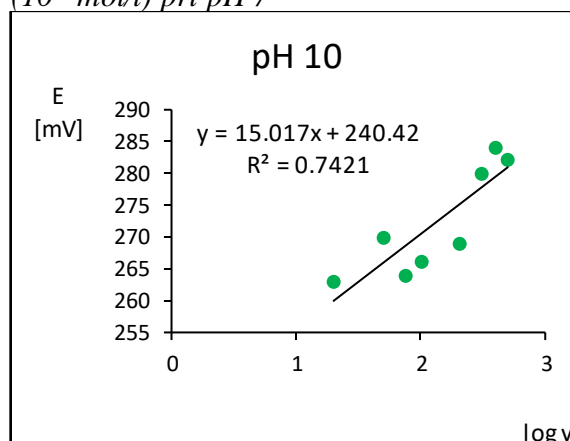
Obr.8a: Závislosť logaritmu prúdu na logaritme rýchlosti skenu pre kapsaicín ( $10^{-4}$  mol/l) pri pH 7



Obr.8b: Závislosť potenciálu na logaritme rýchlosti skenu pre kapsaicín ( $10^{-4}$  mol/l) pri pH 7



Obr.9a: Závislosť logaritmu prúdu na logaritme rýchlosti skenu pre kapsaicín ( $10^{-4}$  mol/l) pri pH 10



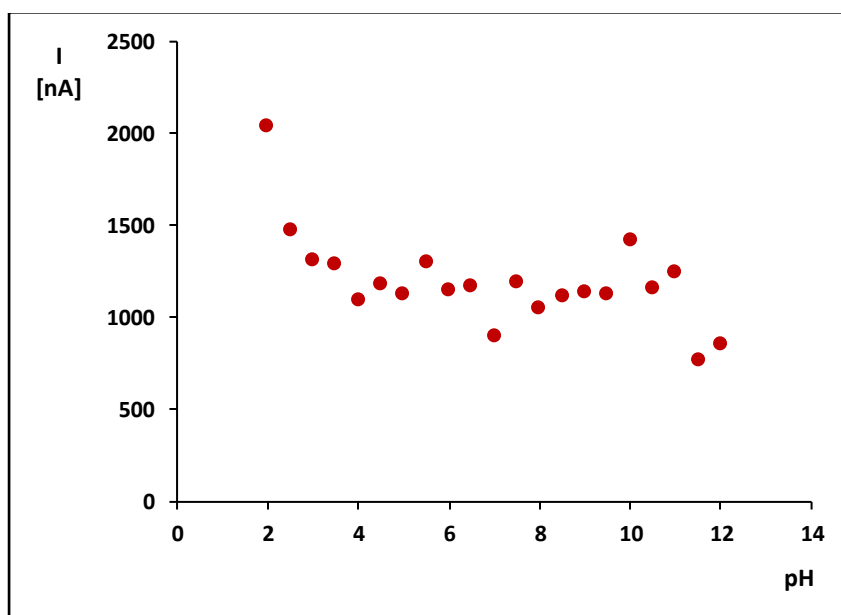
Obr.9b: Závislosť potenciálu na logaritme rýchlosti skenu pre kapsaicín ( $10^{-4}$  mol/l) pri pH 10

V grafoch zobrazujúcich závislosť logaritmu prúdovej odozvy na logaritme rýchlosti polarizácie elektródy  $\log I = f(\log v)$  (Obr. 7a, 8a, 9a) je pozorovateľný

lineárny priebeh. Vzhľadom k tomu, že hodnoty smerníc priamok sa pohybujú medzi hodnotami 0,5 (pre difúziou riadený dej) a 1 (pre dej riadený adsorpciou), jedná sa o dej difúzne – adsorpčný. [55] S rastúcou hodnotou pH sa vplyv adsorpcie znižuje. V grafoch závislosti potenciálu na logaritme rýchlosti skenu pozorujeme lineárnu závislosť. S rastúcou rýchlosť skenu dochádza k posunu potenciálu píku kapsaicínu ku kladnejším potenciálom pri všetkých meraných hodnotách pH (Obr. 7b, 8b, 9b). Tento posun je typický pre ireverzibilný prenos elektrónov. [56]

### 3.4.3. Diferenčne pulzná voltametria – závislosť na pH

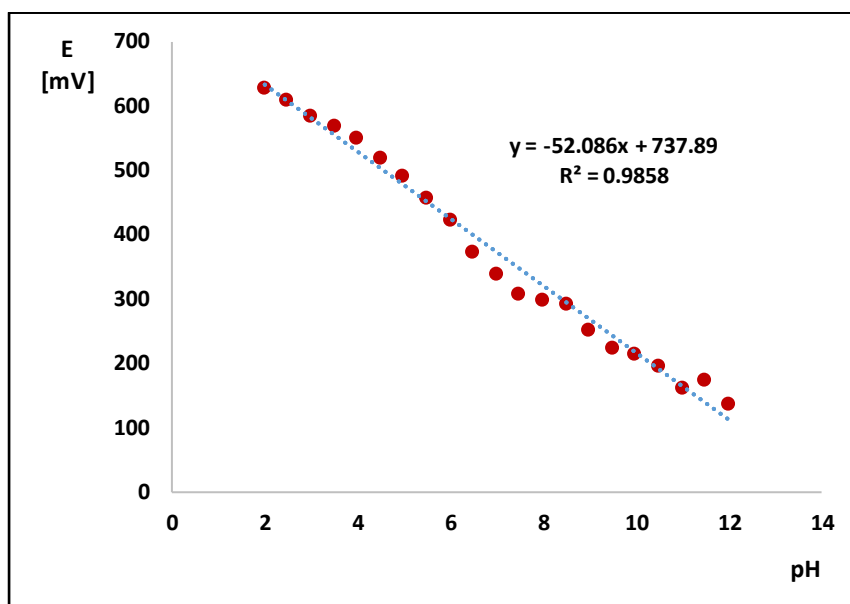
Pomocou diferenčne pulznej voltametrie bol pozorovaný vplyv pH na prúdovú odozvu kapsaicínu. Diferenčne pulzné voltamogramy kapsaicínu ( $10^{-4}$  mol/l) boli zmerané v prostredí Britton – Robinsonových pufrov v rozmedzí pH 2 – 12 pri rýchlosti skenu 20 mV/s a výške pulzu 50 mV. V grafe závislosti prúdu na hodnote pH (Obr. 10) je zreteľne najvyššia prúdová odozva v kyslom prostredí pri pH 2. Pri vyšších hodnotách pH poskytoval kapsaicín nižšiu hodnotu prúdu, preto bolo pre všetky ďalšie merania využité kyslé prostredie Britton – Robinsonovho pufru o pH 2.



Obr. 10: Závislosť prúdovej odozvy kapsaicínu ( $10^{-4}$  mol/l) na pH

Graf závislosti potenciálu píku kapsaicínu na pH (Obr. 11) ukazuje, že s rastúcou hodnotou pH sa pík posúval záporným smerom a hodnota potenciálu klesala. Hodnota smernice  $-52,086$  mV/pH naznačuje, že pri oxidácii dochádza k výmene rovnakého počtu protónov a elektrónov, čo je v súlade s publikáciou od *Jonanović et*

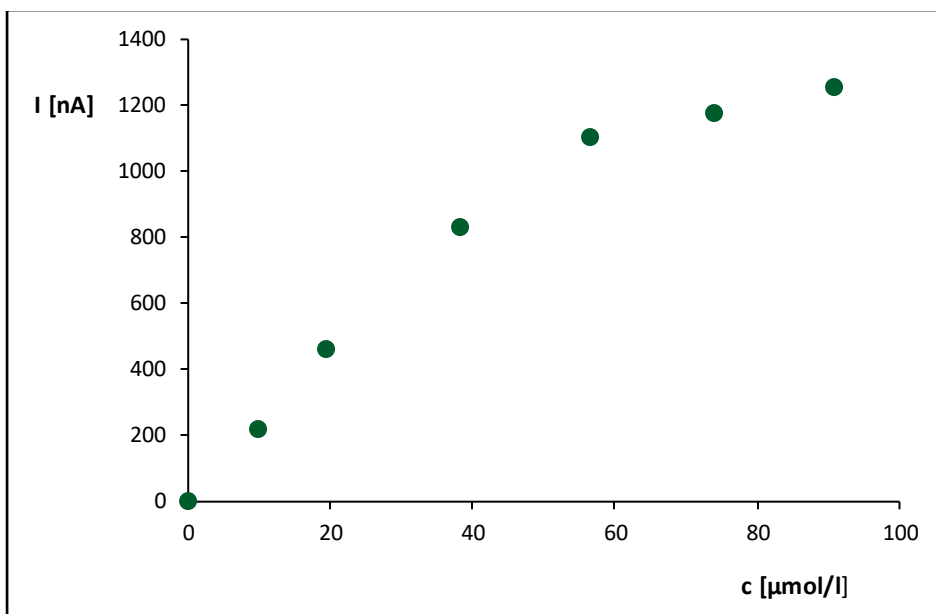
al.[24] Hodnota smernice je nižšia než teoretická hodnota 59 mV/pH (pre prípad rovnakého počtu protónov a elektrónov), čo môže byť dôsledkom ireverzibility elektródovej reakcie.



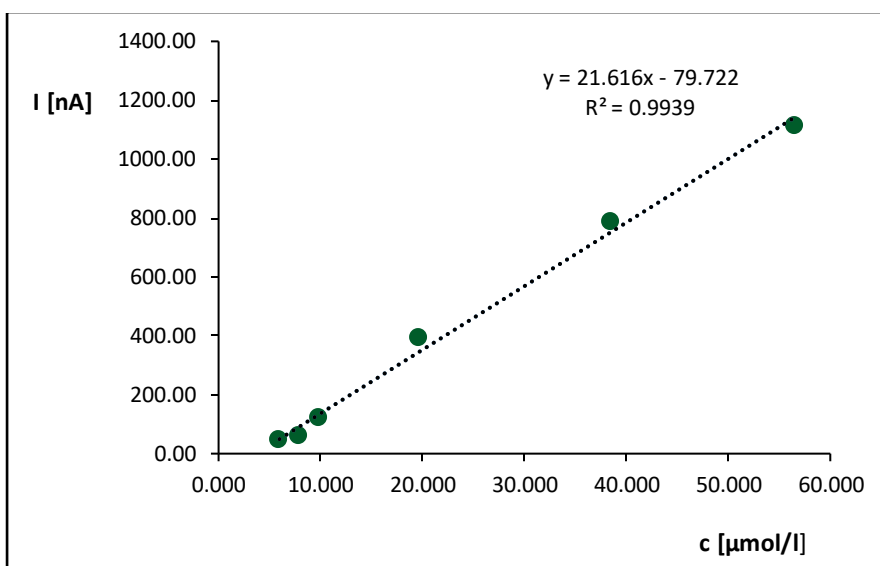
Obr. 11: Závislosť potenciálu piku kapsaicínu na pH

#### 3.4.4. Kalibračná závislosť

Metódou diferenciálne pulznej voltametrie bola premeraná kalibračná závislosť na čistej GCE elektróde pre koncentrácie kapsaicínu od  $10^{-6}$  do  $10^{-4}$  mol/l. Prvý kalibračný štandard, ktorý poskytol prúdovú odozvu, mal koncentráciu  $6 \cdot 10^{-6}$  mol/l. Graf zobrazujúci rozsah koncentrácií  $10^{-5}$  až  $10^{-4}$  mol/l (Obr. 12) ukazuje zahnutie krivky pri vyšších koncentráciách vplyvom adsorpcie a vysýtenia povrchu elektródy. Lineárna oblasť kalibračnej závislosti (Obr. 13) od  $6 \cdot 10^{-6}$  až  $6 \cdot 10^{-5}$  mol/l mala koeficient determinácie ( $R^2$ ) 0,9939. Z parametrov regresnej priamky bol podľa vzťahu  $L_d = 3 \cdot s_b/a$  (a – smernica kalibračnej priamky,  $s_b$  – smerodajná odchýlka úseku kalibračnej priamky) vypočítaný limit detekcie  $3,5 \mu\text{mol/l}$ . Reálny limit detekcie, kedy bolo možné vyhodnotiť prúdový signál bol  $6 \mu\text{mol/l}$ .



Obr.12: Kalibračná závislosť pre kapsaicín v rozsahu koncentrácií od  $10^{-5}$  do  $10^{-4}$  mol/l.



Obr. 13: Kalibračná závislosť pre kapsaicín v rozsahu koncentrácií od  $6 \cdot 10^{-6}$  do  $6 \cdot 10^{-5}$  mol/l.

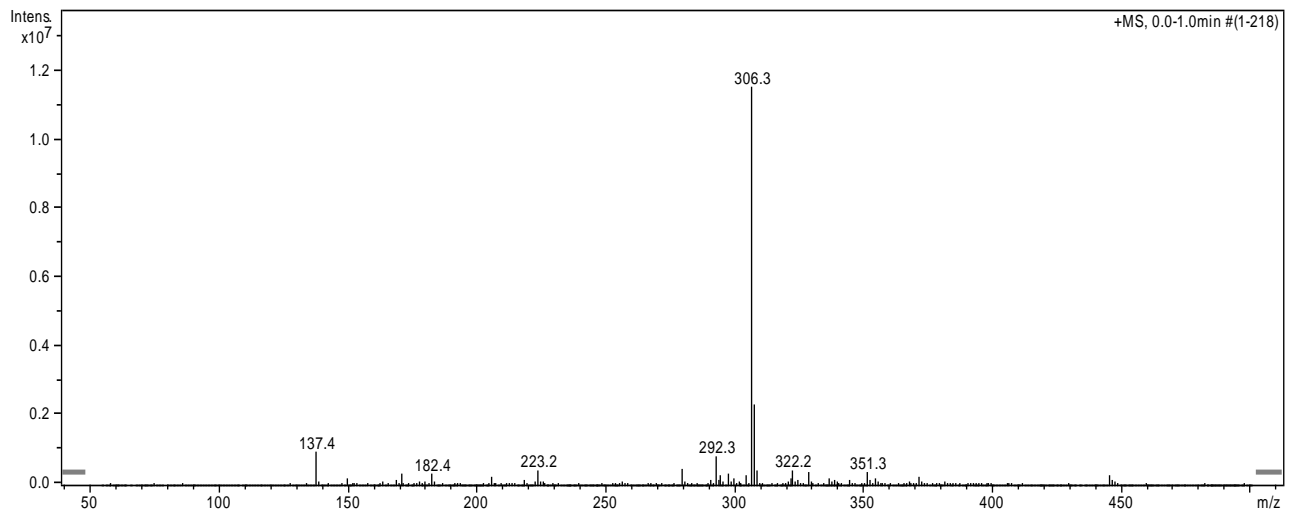
### 3.4.5. EC - MS

Pred samotným meraním EC-MS bola optimalizovaná teplota sušiacieho plynu nastavením na 110, 130, 150, 170 a 190 °C. Najvyššia intenzita signálu kapsaicínu bola zaznamenaná pri teplote 150 °C (Tab. 5). Táto teplota sa využila pri ďalších experimentoch. Hmotnostné spektrum kapsaicínu v kladnom móde s protónovanou

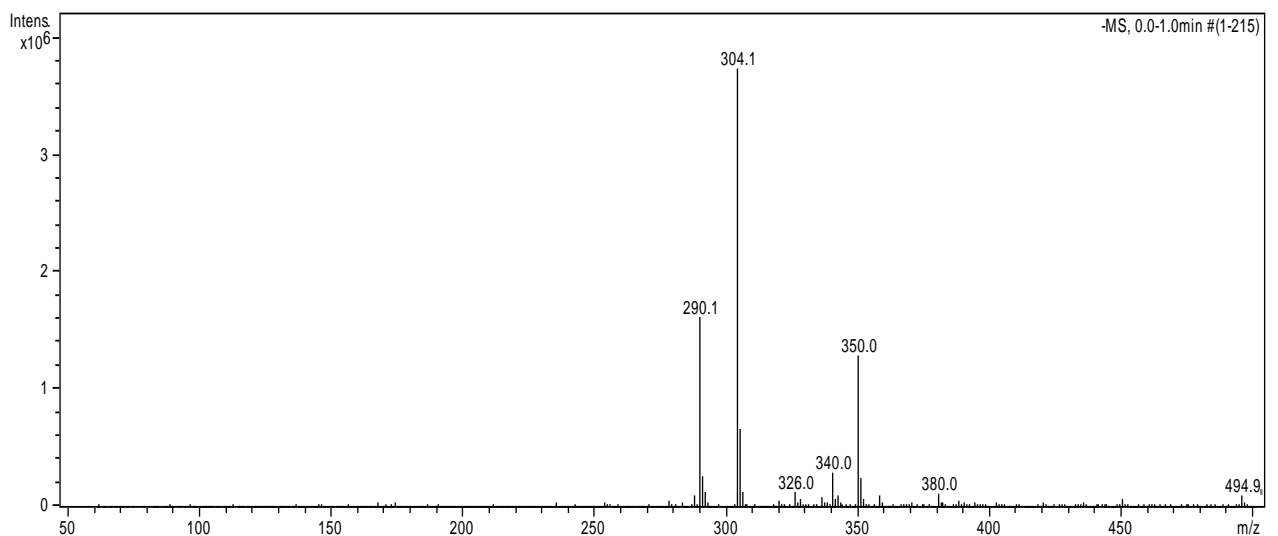
molekulou kapsaicínu  $[M+H]^+$  o  $m/z$  306,31 je znázornené na obrázku 14 a v zápornom móde s deprotonovanou molekulou  $[M-H]^-$  o  $m/z$  304,1 na obrázku 15.

Tab. 5: Intenzita signálu kapsaicínu pri rôznych teplotách sušiaceho plynu

t (°C)	cnts
110	3 104 905
130	20 868 306
150	21 508 922
170	5 759 918
190	1 080 421

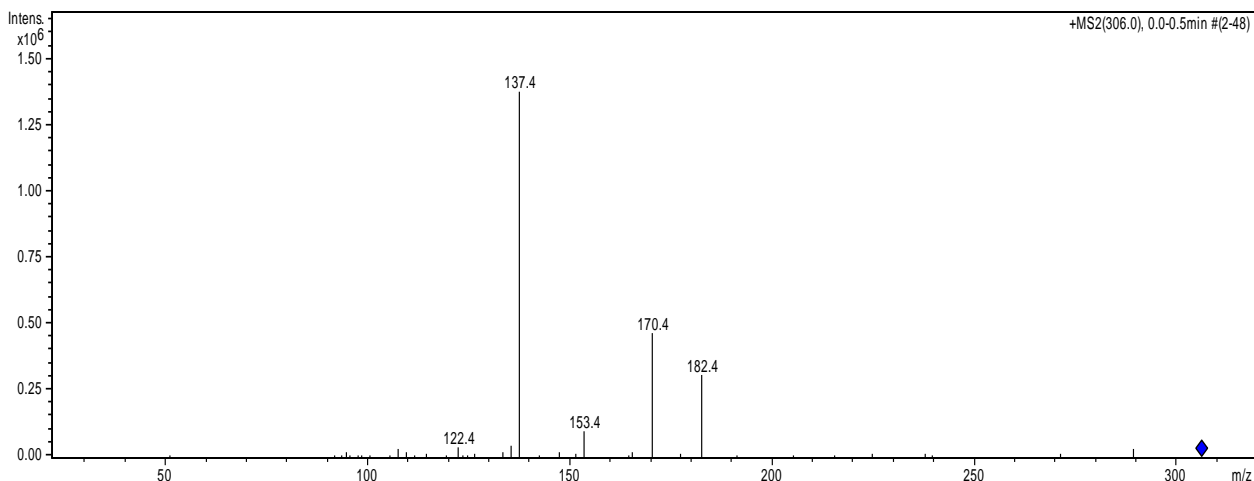


Obr. 14: Hmotnostné spektrum kapsaicínu v kladnom móde (ESI+)



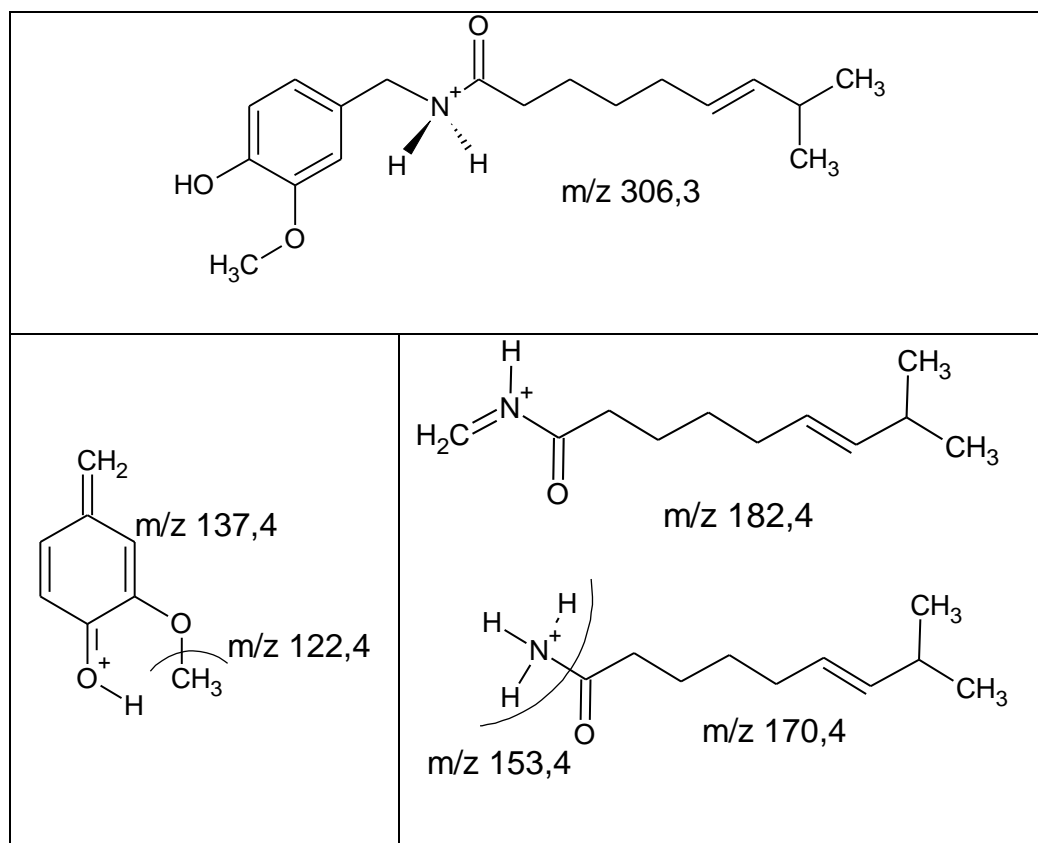
Obr. 15: Hmotnostné spektrum kapsaicínu v zápornom móde (ESI-)





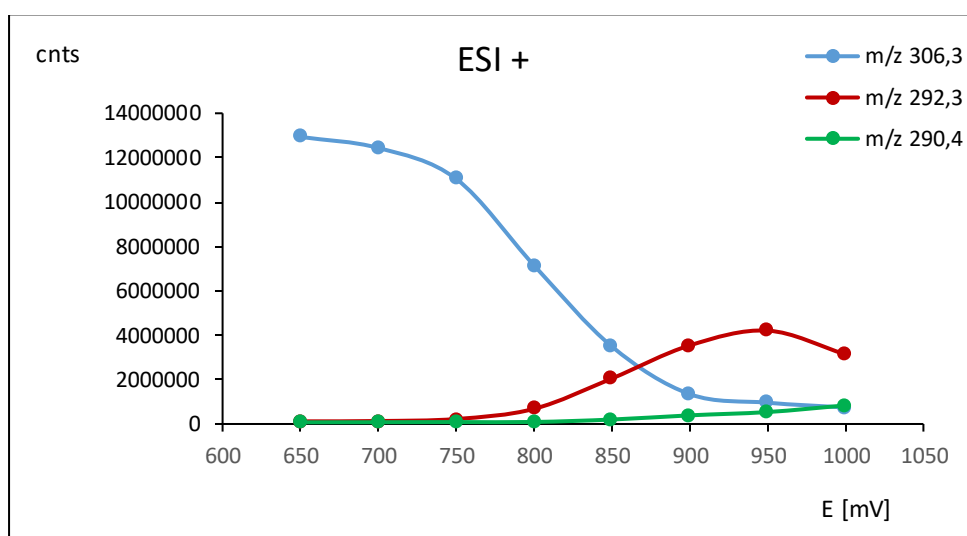
Obr. 16: Fragmentačné spektrum protonovanej molekuly  $[M+H]^+$  s  $m/z$  306,3

Vo fragmentačnom spektre protónovanej molekuly kapsaicínu (Obr. 16) s  $m/z$  306,3 (ESI+) sa nachádzajú ióny s  $m/z$  122,4; 137,4; 153,4; 170,4 a 182,4. Ich štruktúry sú znázornené na obrázku 17. Spektrum kapsaicínu zodpovedá spektrám uvádzaným v literatúre.[57]



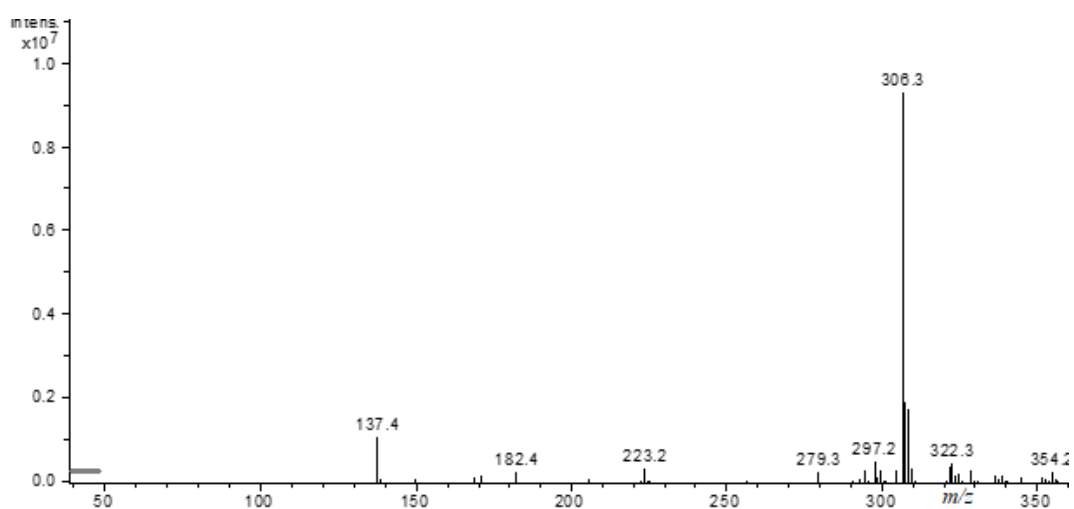
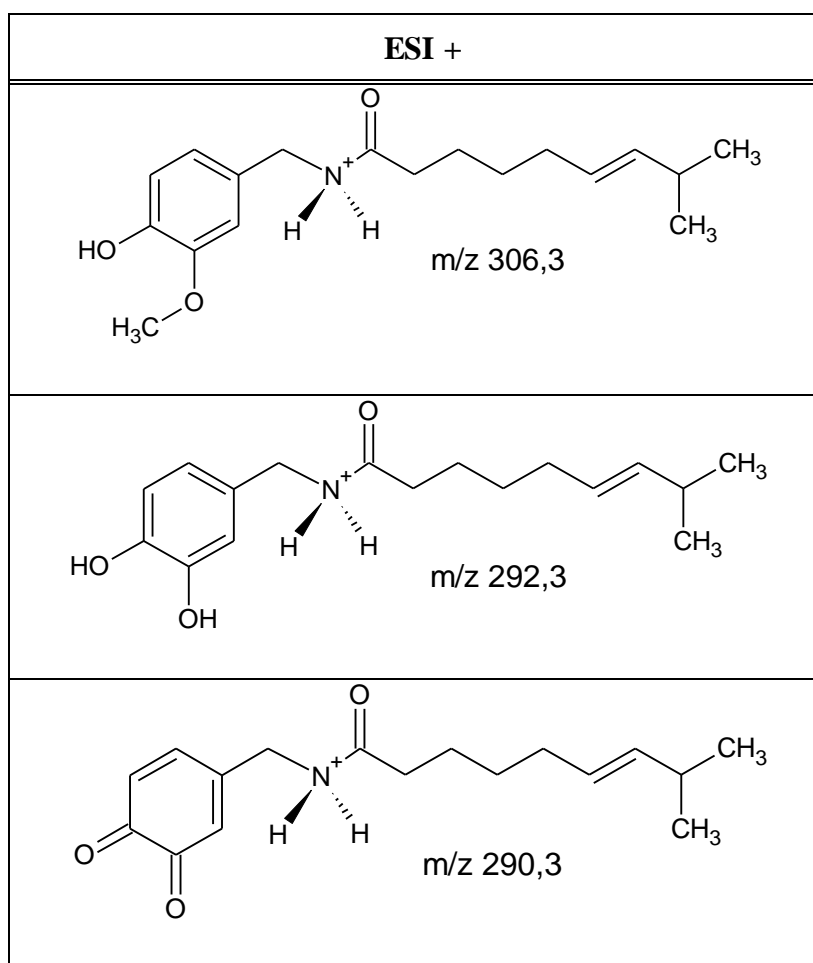
Obr. 17: Štruktúry protónovanej molekuly  $[M+H]^+$  kapsaicínu ( $m/z$  306,3) a jej fragmentov

Elektrochemická oxidácia kapsaicínu bola prevedená v elektrochemickej cele pripojenej k hmotnostnému spektrometru. K elektrochemickej cele bol zapojený potenciostat, pomocou ktorého bol postupne zvyšovaný potenciál, pri ktorom prebiehala elektrochemická oxidácia. V kladnom móde neboli v spektrách v rozmedzí 0 až 650 mV viditeľné výrazné zmeny. Od potenciálu 650 mV začala postupne klesať intenzita protónovanej molekuly kapsaicínu s  $m/z$  306,3 a začala narastať intenzita iónu s  $m/z$  292,3 (Obr. 18). Ďalšie zvyšovanie potenciálu spôsobovalo nárast signálu  $m/z$  292,3 až po potenciál 950 mV, kde začal signál tohto iónu klesať a narástol signál iónu s  $m/z$  290,3 (Obr. 18). Ión s  $m/z$  292,3 predstavoval oxidačný produkt kapsaicínu v katecholovej forme a ión s  $m/z$  290,3 produkt vo forme benzochinónu (Tab. 6). Na obrázku 19 je zobrazené hmotnostné spektrum pri potenciáli 550 mV, predtým ako prebehla oxidácia. Najväčšiu intenzitu v spektre má pík kapsaicínu  $m/z$  306,3. Hmotnostné spektrum na obrázku 20 bolo zmerané pri potenciáli 900 mV, kedy už prebehla oxidácia kapsaicínu. Najintenzívnejším píkom v tomto spektre je pík katecholovej formy s  $m/z$  292,3.

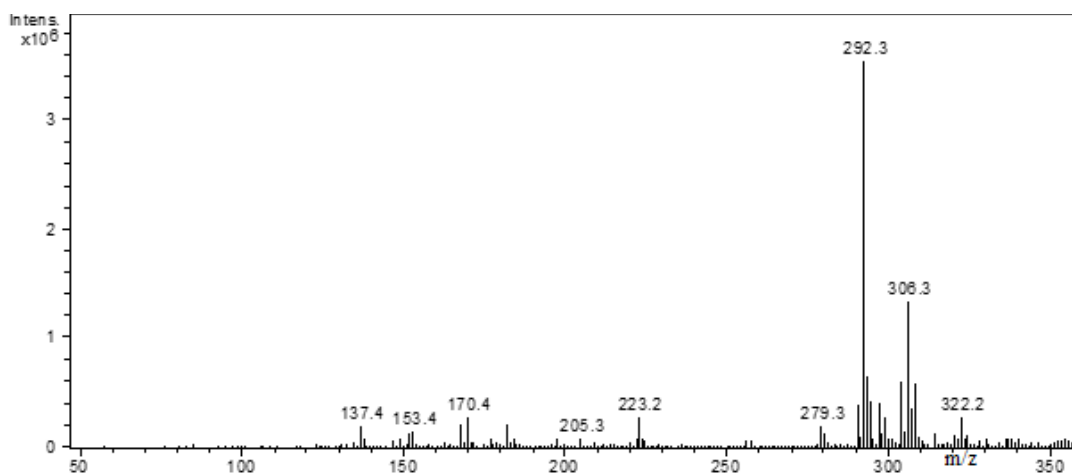


Obr. 18: Závislosť intenzity protónovanej molekuly kapsaicínu a jeho oxidačných produktov na potenciáli elektrochemickej oxidácie

Tab. 6: Štruktúry protónovanej molekuly kapsaicínu a jeho oxidačných produktov

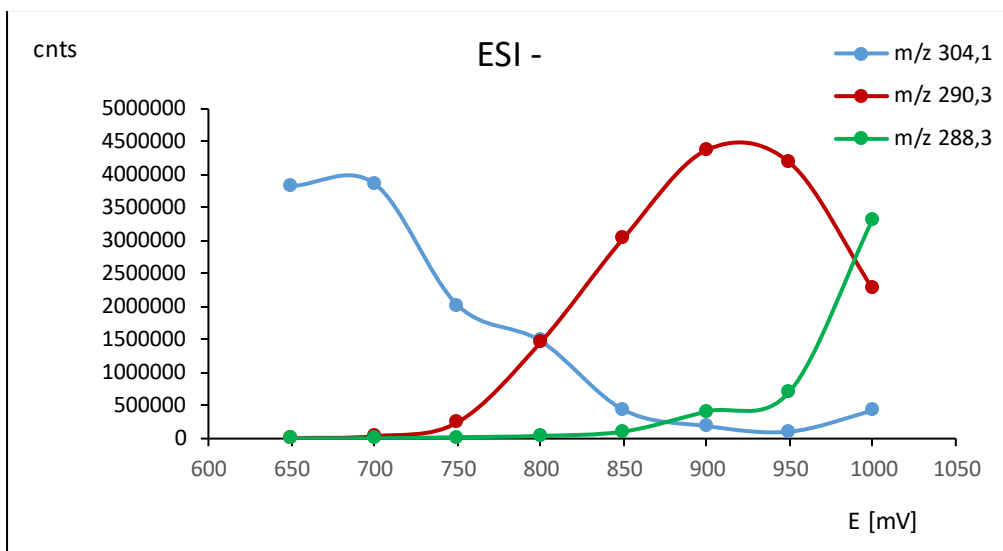


Obr. 19: Hmotnostné spektrum zmerané pri potenciáli 550 mV (ESI+)



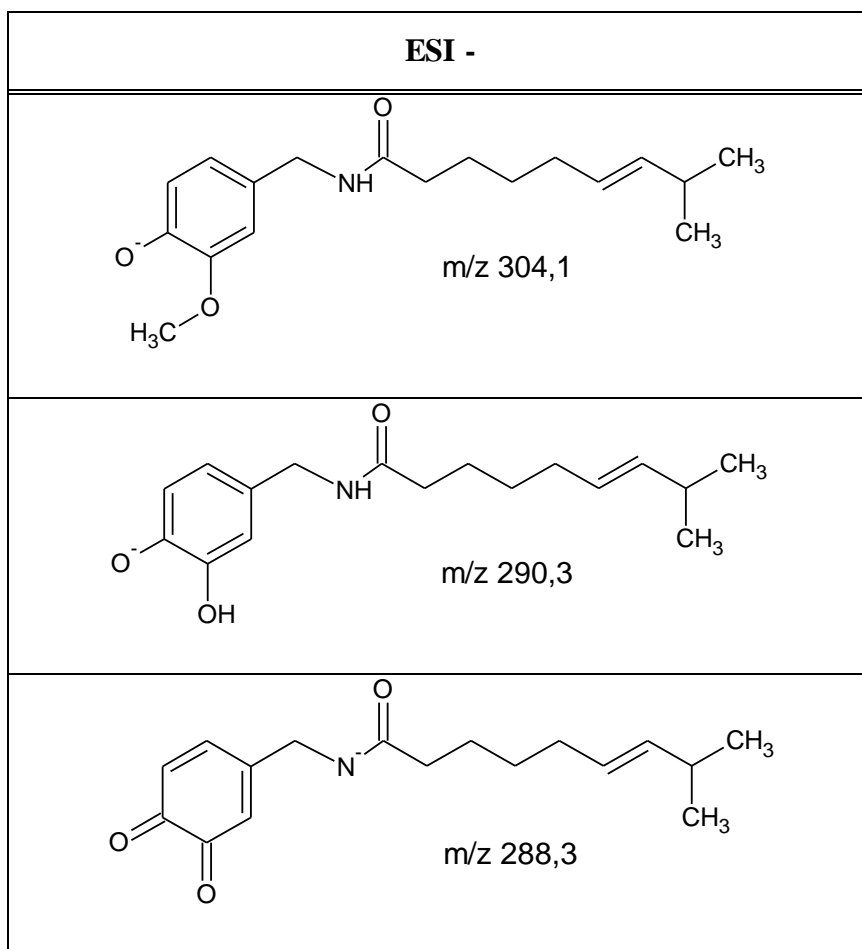
Obr. 20: Hmotnostné spektrum zmerané pri potenciáli 900 mV (ESI+)

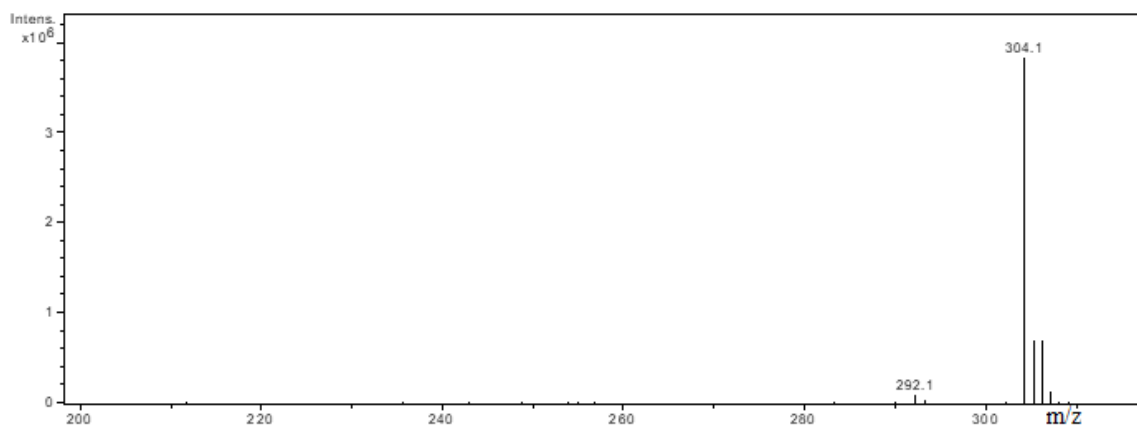
V zápornom móde (ESI-) sa hmotnostné spektrum výrazne nemenilo v rozmedzí potenciálov 0 až 700 mV. Od potenciálu 700 mV začala intenzita signálu deprotonovanej molekuly kapsaicínu  $m/z$  304,1 významne klesať a postupne sa zvyšovala intenzita signálu iónu  $m/z$  290,3 (Obr. 21). Nárast signálu iónu  $m/z$  290,3 pokračoval po dosiahnutie potenciálu 900 mV. S ďalším nárastom potenciálu jeho signál výrazne klesal a zároveň narastal signál iónu  $m/z$  288,3 (Obr. 21). Ión s  $m/z$  290,3 predstavoval oxidačný produkt kapsaicínu vo forme katecholu a ión s  $m/z$  288,3 oxidačný produkt v chinónovej forme (Tab. 7). V hmotnostnom spektre na obrázku 22 pri 650 mV pred oxidáciou kapsaicínu je najintenzívnejší signál jeho deprotonovanej molekuly s  $m/z$  304,1. Na obrázku 23 pri potenciáli 900 mV prevláda signál katecholovej formy s  $m/z$  290,3 mV a v hmotnostnom spektre na obrázku 24 pri potenciáli 1000 mV má najvyššiu intenzitu ión chinónovej formy s  $m/z$  288,3.



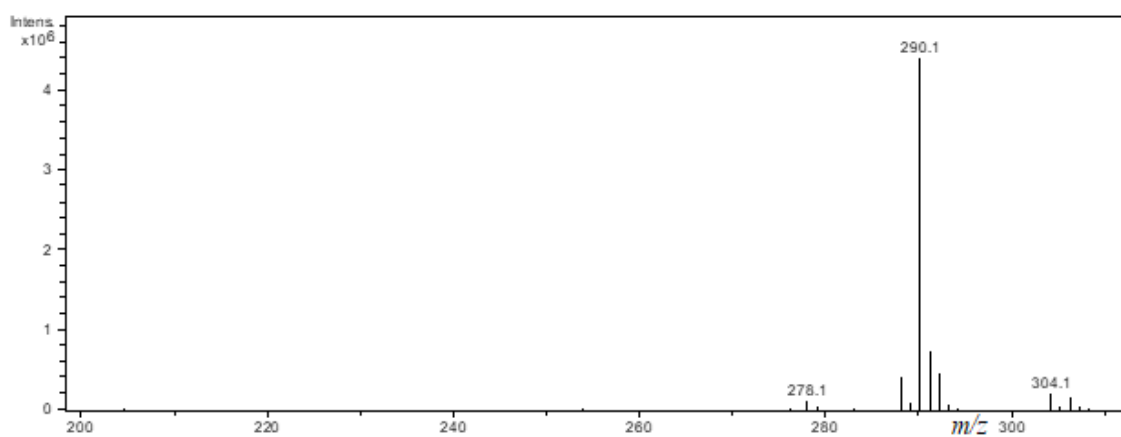
Obr. 21: Závislosť intenzity deprotónovanej molekuly kapsaicínu a jeho oxidačných produktov na potenciáli elektrochemickej oxidácie

Tab. 7: Štruktúry deprotónovanej molekuly kapsaicínu a jeho oxidačných produktov

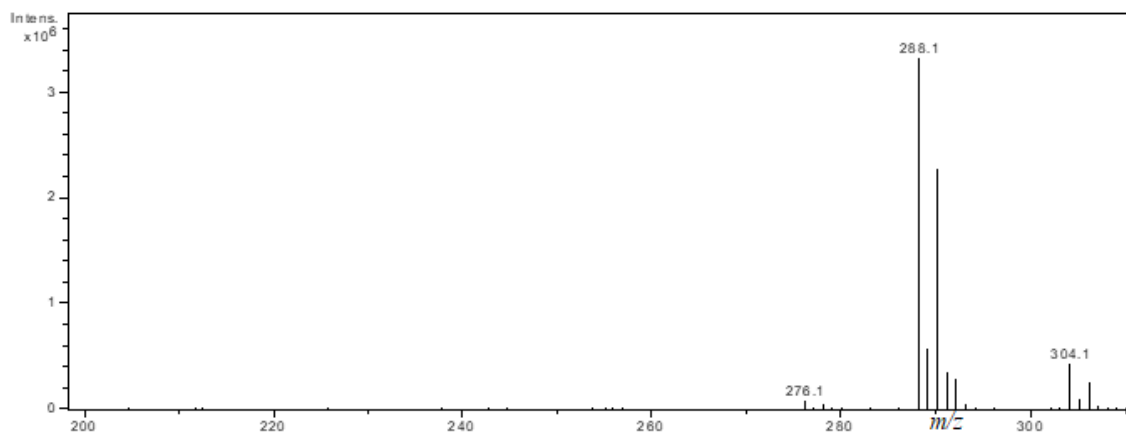




Obr. 22: Hmotnostné spektrum zmerané pri potenciáli 650 mV (ESI-)



Obr. 23: Hmotnostné spektrum zmerané pri potenciáli 900 mV (ESI-)



Obr. 24: Hmotnostné spektrum zmerané pri potenciáli 1000 mV (ESI-)

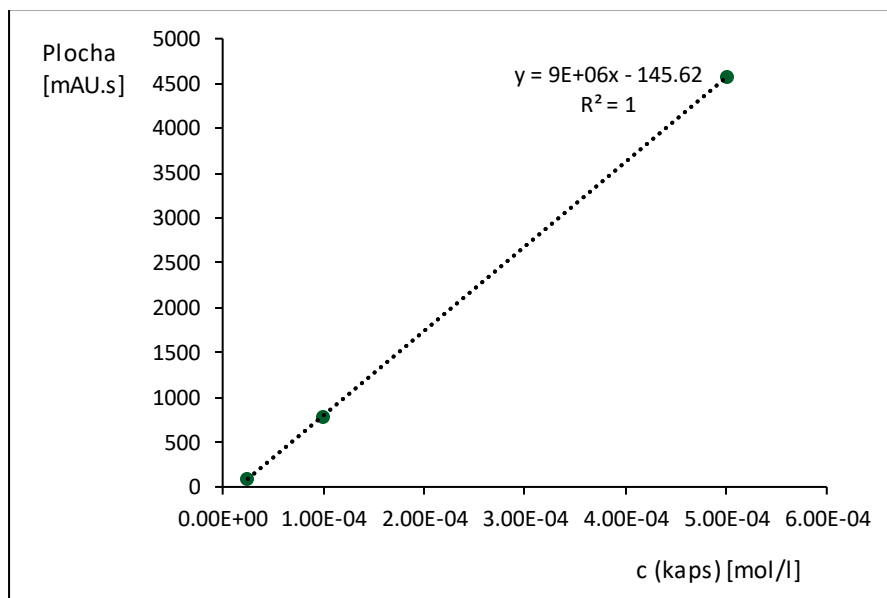
### 3.4.6. HPLC

Pomocou HPLC bol najskôr vybraný vhodný spôsob extrakcie vzoriek papriek. Porovnané boli dva postupy extrakcie etanolom. Postup 1 zahŕňal 30 – minútovú maceráciu a následnú 15 – minútovú sonifikáciu pri 40°C v ultrazvukovom kúpeli a 2. postup 30 – minútovú sonifikáciu v ultrazvukovom kúpeli pri teplote 40°C. Ďalej boli extrakty troch vzoriek papriek upravené pred HPLC analýzou podľa postupu v kapitole 3.3.7.4. a zmerané za podmienok uvedených v kapitole 3.3.7.5. Pre ďalšie merania bol používaný postup 1, pretože týmto spôsobom bola dosiahnutá vyššia výťažnosť. Výsledky sú uvedené v tabuľke 8.

Tab. 8: Porovnanie výťažnosti dvoch extrakčných postupov

		HPLC	
		Postup 1	Postup 2
c [mg/kg]	Naga Jolokia (výťažok)	3487.99	189.45
	Habanero (výťažok)	1025.67	894.44
	Madras Chilli	179	57.96

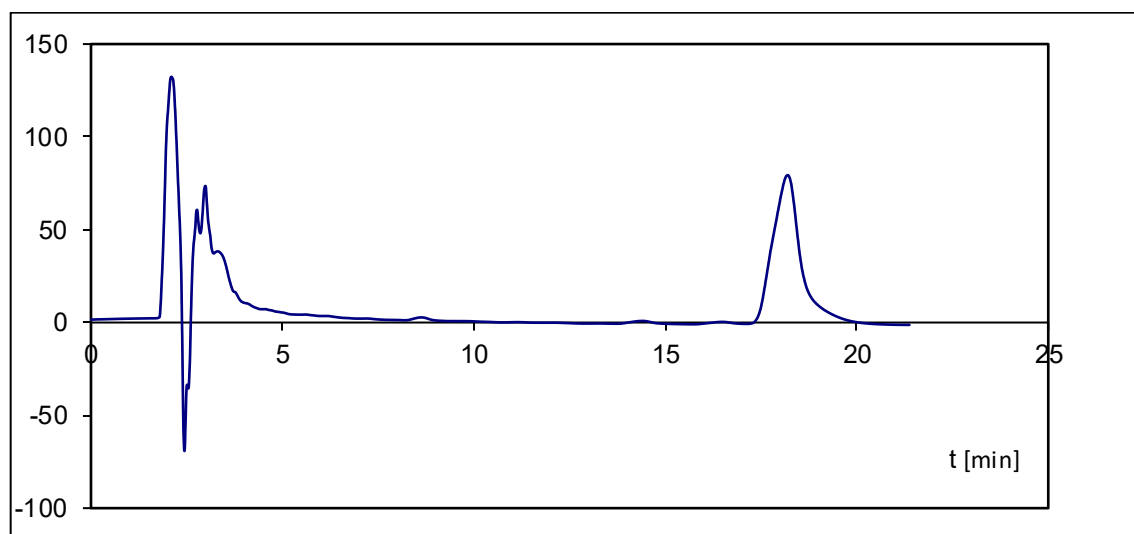
Kalibračná závislosť (Obr. 25) pre vyhodnotenie metódou kalibračnej priamky bola vytvorená premeraním štandardov s koncentraciami  $2,5 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l.



Obr. 25: Kalibračná závislosť pre kapsaicín zmeraná metódou HPLC

Všetky vzorky papriek uvedené v kapitole 3.4.6 boli pripravené na meranie podľa postupu v kapitole 3.3.7.4 a zmerané pomocou HPLC. Príklad chromatogramu je zobrazené na obrázku 26. Pík v 18,2 min zodpovedá kapsaicínu. Výsledky boli

vyhodnotené metódou kalibračnej priamky a štandardného prídavku a sú uvedené v tabuľkách 9 a 10 na stranách 53 a 54.



*Obr. 26: Chromatogram vzorky papriky Habanero – prášok. Pik v čase 18,2 min predstavuje kapsaicín.*

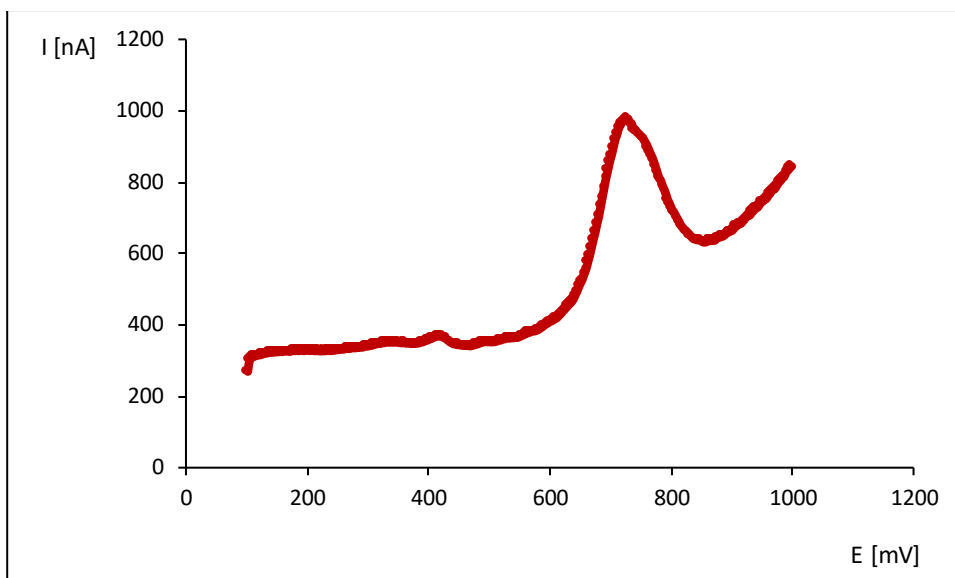
### **3.4.7. Voltametrické metódy**

#### **3.4.7.1. DPV**

##### **3.4.7.1.1. Metóda A**

Vzorky papriky (kapitola 3.4.6.) boli pripravené na meranie a zmerané podľa postupu v kapitole 3.3.12.1.1. Výsledky dosiahnuté metódou diferenčne pulznej voltametrie, kde bol meraný roztok pridávaný priamo do mernej nádoby, sa nachádzajú v tabuľke 10 na stranách 53 a 54. Na vyhodnotenie bola použitá metóda štandardného prídavku. Obrázok 27 ukazuje príklad voltamogramu pre reálnu vzorku papriky.

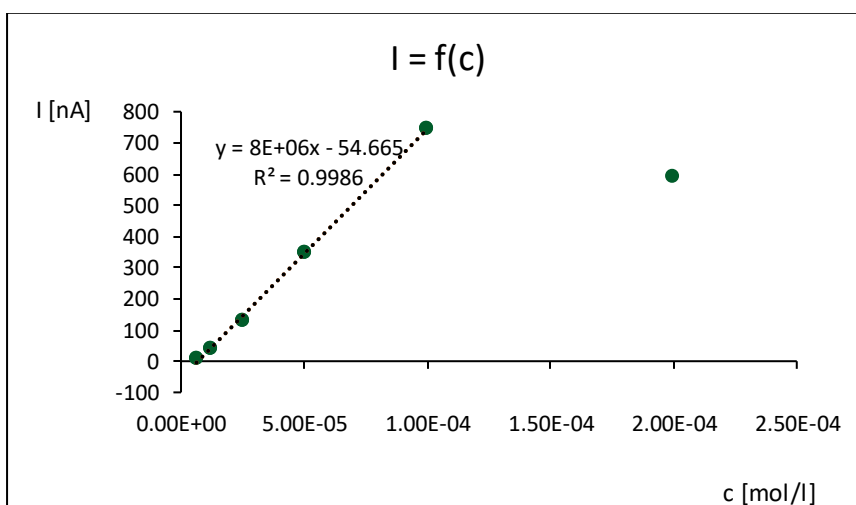




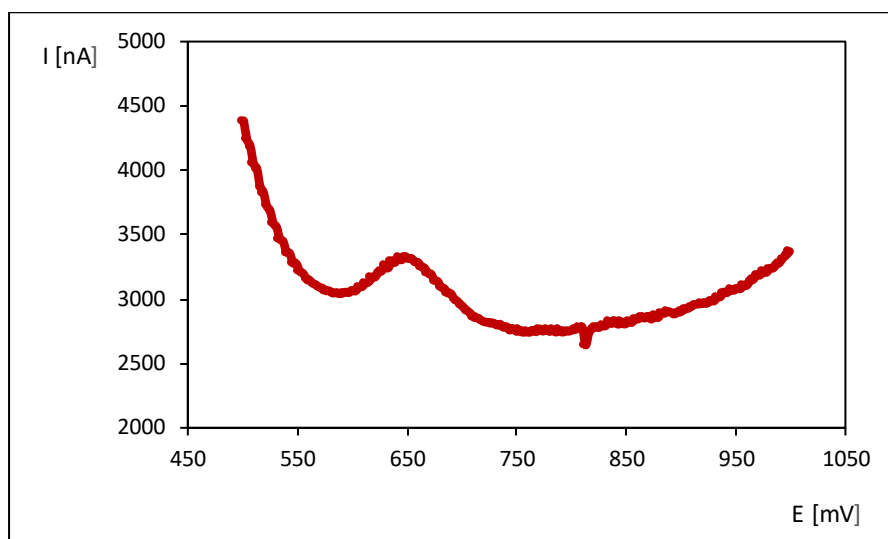
Obr. 27: Diferenčne pulzný voltamogram vzorky papriky sušený kozí roh.  
Pík kapsaicínu sa objavil pri potenciáli 720 mV.

### 3.4.7.2. Metóda B – transferová metóda na nemodifikovanej elektróde

Meranie diferenčne pulznej voltametrie na nemodifikovanej GCE elektróde transferovou metódou bolo prevedené podľa postupu v kapitole 3.3.12.1.2. Výsledky sa vyhodnotili metódou kalibračnej priamky a štandardného prídavku a sú uvedené v tabuľkách 9 a 10 na stranách 53 a 54. Kalibračná priamka vznikla premeraním štandardných roztokov kapsaicínu s koncentraciami  $2 \cdot 10^{-4}$ ;  $10^{-4}$ ;  $5 \cdot 10^{-5}$ ;  $2,5 \cdot 10^{-5}$ ;  $1,25 \cdot 10^{-5}$ ;  $0,625 \cdot 10^{-5}$  mol/l (Obr. 28). Najvyšší kalibračný bod bol z kalibrácie vynechaný, pretože ležal mimo lineárny rozsah (Obr. 28). Na obrázku 29 je zobrazený príklad voltamogramu.



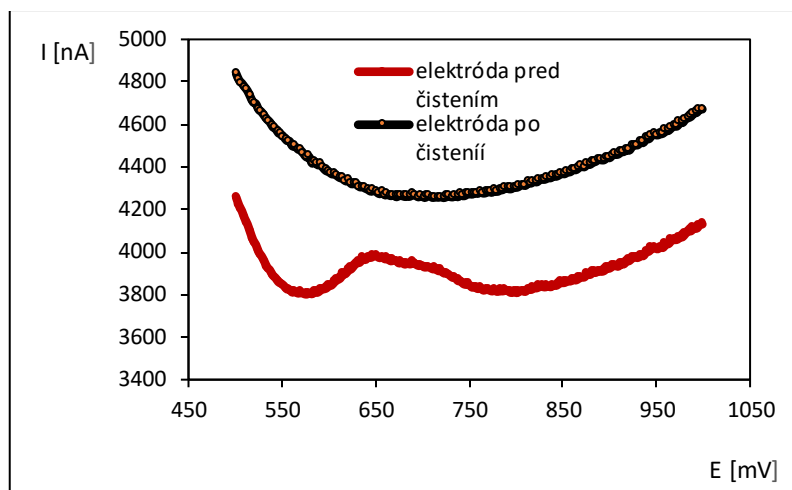
Obr.28: Kalibrácia v rozsahu  $2 \cdot 10^{-4}$  až  $6,25 \cdot 10^{-6}$  mol/l



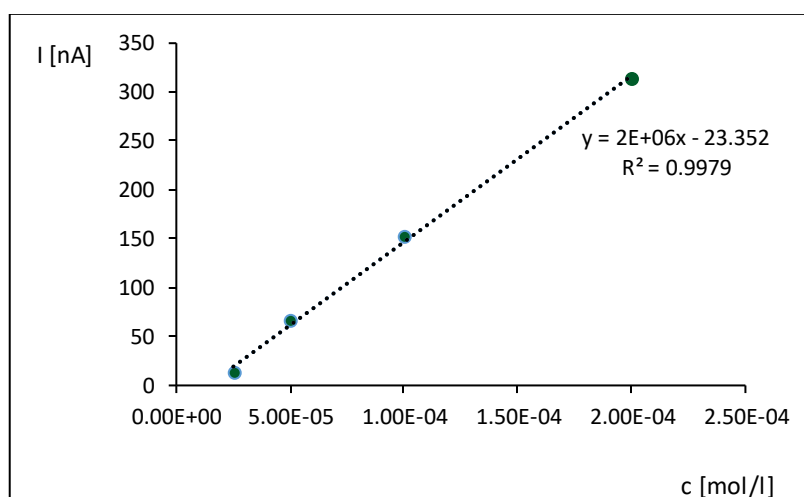
Obr. 29: Diferenčne pulzný voltamogram vzorky Naga Jolokia (výťažok). Pík kapsaicínu mal potenciál 650 mV.

### 3.4.7.3. Metóda C – transferová metóda na modifikovanej elektróde

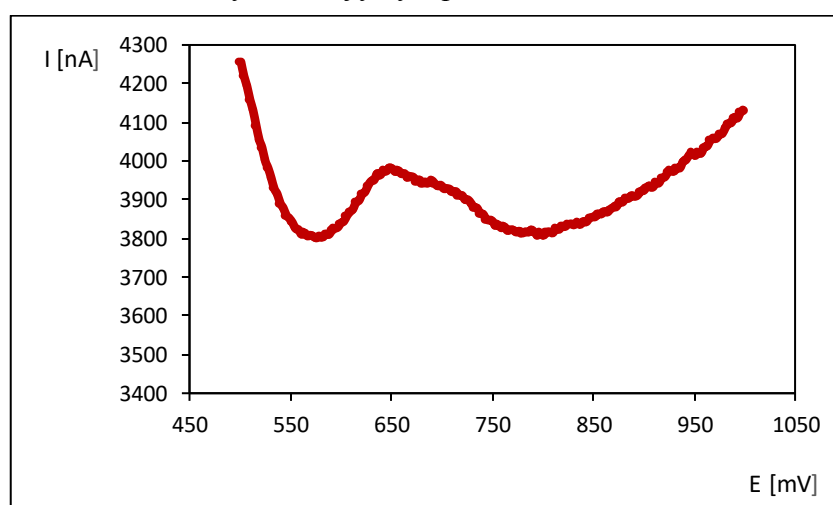
Diferenčne pulznou voltametrou na GCE elektróde modifikovanej fosfolipidovou membránou (postup kapitola 3.3.12.1.3.) boli zmerané všetky vzorky papriek (kapitola 3.4.6). Fosfolipidová vrstva by mala selektívne akumulovať a prepúšťať k elektródovému povrchu hydrofóbné látky, zatiaľ čo hydrofilné cez vrstvu neprejdú.[54] Po každom meraní bola elektróda ponorená na 10 minút do destilovanej vody, aby sa vyčistila od kapsaicínu. Voltamogram zmeraný po vyčistení elektródy po meraní je ukázaný na obrázku 30. Vyhodnotenie bolo prevedené metódou kalibračnej priamky s kalibračnými bodmi  $2 \cdot 10^{-4}$ ;  $10^{-4}$ ;  $5 \cdot 10^{-5}$ ;  $2,5 \cdot 10^{-5}$ ,  $1,25 \cdot 10^{-5}$ ,  $0,625 \cdot 10^{-5}$  mol/l a metódou štandardného prídavku. Výsledky sú zhrnuté v tabuľkách 9 a 10 na stranách 53 a 54. Kalibračná závislosť (Obr. 31) bola zmeraná v rozsahu  $2 \cdot 10^{-4}$  až  $6,25 \cdot 10^{-6}$  mol/l. Pri koncentráciách  $1,25 \cdot 10^{-5}$  mol/l a  $6,25 \cdot 10^{-6}$  mol/l modifikovaná elektróda neposkytla odozvu. Na rozdiel od kalibrácie na nemoifikovanej elektróde kalibračný bod s koncentráciou  $2 \cdot 10^{-4}$  mol/l ešte ležal v oblasti lineárneho rozsahu. Na obrázku 32 je voltamogram jednej z meraných vzoriek papriek.



Obr. 30: Diferenčne pulzný voltamogram GCE elektródy pred a po vyčistení



Obr. 31: Kalibračná závislosť pre kapsaicín na GCE elektróde modifikovanej fosfolipidovou membránou.

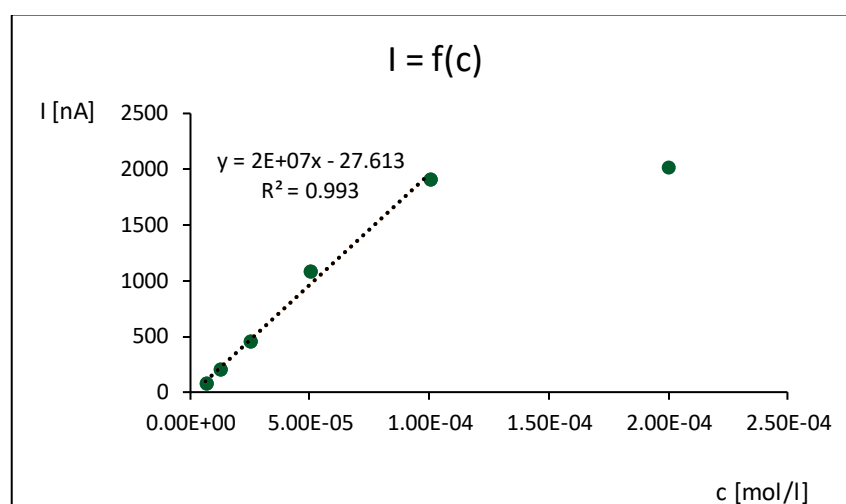


Obr. 32: Diferenčne pulzný voltamogram vzorky Naga Jolokia (výťažok). Plk kapsaicínu mal potenciál 650 mV.

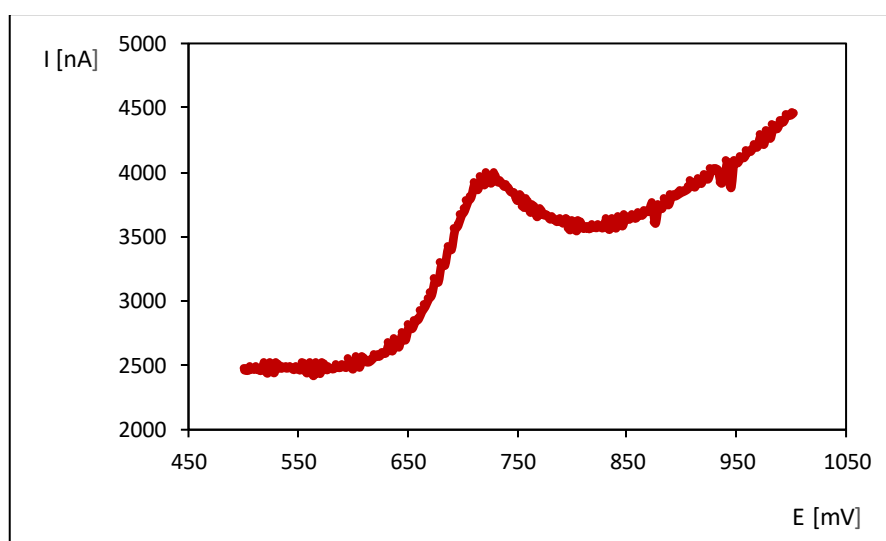
### 3.4.7.4. DC

#### 3.4.7.4.1. Metóda D – transferová metóda na nemodifikovanej elektróde

Metódou lineárnej voltametrie boli zmerané vzorky paprík (kapitola 3.4.6) podľa postupu uvedenom v kapitole 3.3.12.2.1. Metódy kalibračnej priamky a vnútorného štandardu boli použité na vyhodnotenie. Výsledky merania sú uvedené v tabuľkách 9 a 10 na stranách 53 a 54. Kalibračná krivka bola vytvorená premeraním série štandardných roztokov kapsaicínu s koncentraciami  $2 \cdot 10^{-4}$ ;  $10^{-4}$ ;  $5 \cdot 10^{-5}$ ;  $2,5 \cdot 10^{-5}$ ;  $1,25 \cdot 10^{-5}$ ,  $0,625 \cdot 10^{-5}$  mol/l (Obr. 33). Pre vyhodnotenie bola využitá kalibračná priamka, z ktorej bol vylúčený kalibračný bod s najvyššou koncentráciou, pretože sa nachádzal v nelineárnej oblasti (Obr. 33). Príklad voltamogramu reálnej vzorky papriky ukazuje obrázok 34.



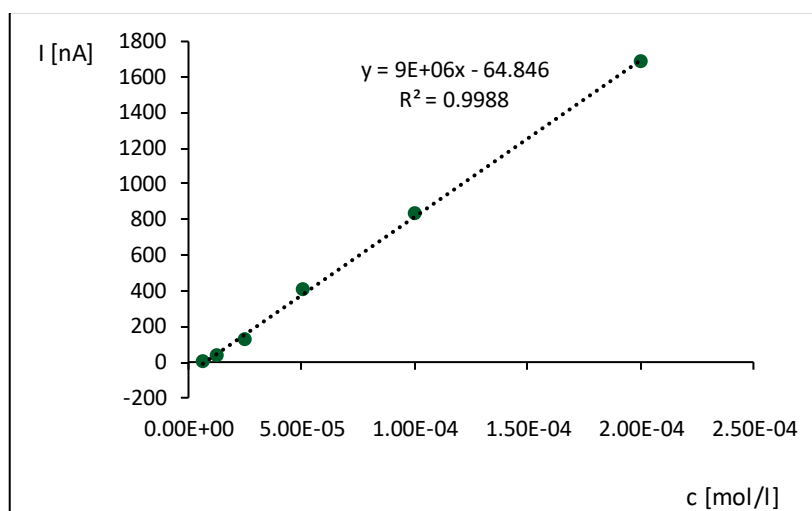
Obr.33: Kalibrácia v rozsahu  $2 \cdot 10^{-4}$  až  $6,25 \cdot 10^{-6}$  mol/l



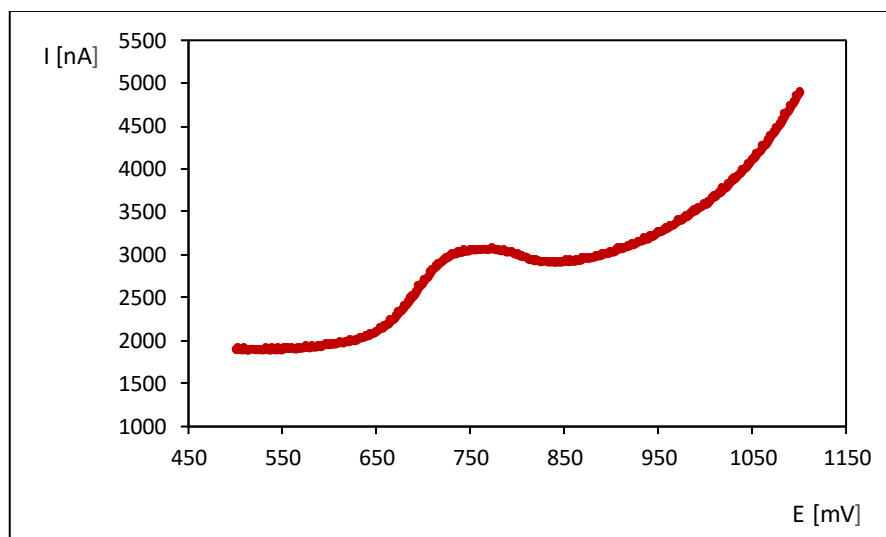
Obr. 34: Lineárny voltamogram vzorky Naga Jolokia (výťažok). Pik kapsaicínu mal potenciál 720 mV.

### 3.4.7.4.2. Metóda E – transferová metóda na modifikovanej elektróde

Podľa postupu v kapitole 3.3.12.2.2. boli vzorky papriky (kapitola 3.4.6.) zmerané lineárnou voltametrou na GCE elektróde modifikovanej fosfolipidovou membránou. Merania boli vyhodnotené metódou kalibračnej priamky a štandardného prídavku. Výsledky sú zhrnuté v tabuľkách 9 a 10 na stranách 53 a 54. Pre vytvorenie kalibračnej priamky (Obr. 35) boli zmerané štandardy kapsaicínu od  $2 \cdot 10^{-4}$  po  $6,25 \cdot 10^{-6}$  mol/l. Na rozdiel od ostatných voltametrických metód bola odozva lineárna v celom rozsahu meraných koncentrácií štandardov. Na obrázku 36 je znázornený príklad voltamogram vzorky papriky.



Obr. 35: Kalibračná závislosť pre kapsaicín na GCE elektróde modifikovanej fosfolipidovou membránou.



Obr. 36: Lineárny voltamogram vzorky Naga Jolokia (výťažok). Pik kapsaicínu mal potenciál 740 mV.

### 3.4.8. Vyhodnotenie

Vyhodnotenie merania HPLC a všetkých voltametrických meraní je zhrnuté v tabuľke 9 (pre metódu kalibračnej krivky) a v tabuľke 10 (pre metódu štandardného prídavku).

Voltametrické metódy:

Metóda A: DPV – extrakt vzorky pridávaný do mernej nádoby

Metóda B: DPV – transferová metóda na nemodifikovanej elektróde

Metóda C: DPV – transferová metóda na modifikovanej elektróde

Metóda D: DC – transferová metóda na nemodifikovanej elektróde

Metóda E: DC – transferová metóda na modifikovanej elektróde

(1 – vyhodnotená metódou kalibračnej krivky, 2 – vyhodnotená metódou štandardného prídavku)

Tab. 9: Výsledky meraní vyhodnotených metódou kalibračnej priamky

Metóda kalibračnej priamky					
Vzorka	c [mg/kg]				
	HPLC	Metóda B1	Metóda C1	Metóda D1	Metóda E1
Naga Jolokia (výťažok)	1261.46	4265.86	7614.33	3584.80	5657.26
Habanero (výťažok)	303.96	1389.09	1872.62	603.14	1432.42
Sušený kozí roh	1610.34	3308.59	8458.02	4541.50	13173.70
Madras Chillí (prášok)	134.63	ND	ND	ND	ND
Habanero (prášok)	2873.16	1069.27	8538.19	2694.81	10934.10
Carolina Reaper (prášok)	8641.68	7357.18	26987.60	17064.30	48148.40

ND - nedetekované

Tab. 10: Výsledky meraní vyhodnotené metódou štandardného prídavku

Metóda štandardného prídavku						
Vzorka	c [mg/kg]					
	HPLC	Metóda A	Metóda B2	Metóda C2	Metóda D2	Metóda E2
Naga Jolokia (výťažok)	3487.99	2785.95	7488.27	2689.14	6958.77	5745.53
Habanero (výťažok)	1025.60	8145.90	1294.94	654.09	177.14	794.07
Sušený kozí roh	4534.73	1854.86	44589.90	3026.61	88110.80	1136.13
Madras Chillí (prášok)	179.00	ND	ND	ND	ND	ND
Habanero (prášok)	11890.05	7544.85	876.07	7646.70	28002.30	5178.23
Carolina Reaper (prášok)	12813.99	31308.90	11104.20	18072.60	60394.00	58432.00

ND - nedetekované

V dôsledku veľkej biologickej diverzity sa obsah kapsaicínu líši v rámci rôznych odrôd, ale aj jedinej odrody, a rovnako je obsah kapsaicínu odlišný v rôznych častiach jedného plodu. To je jeden z faktorov, ktorý ovplyvnil veľké rozdiely v zistených koncentráciách kapsaicínu. Ďalším významným faktorom je rozličný princíp používaných metód. Najvyššie hodnoty kapsaicínu boli väčšinou použitých metód a postupov zistené vo vzorke čili papriky Carolina Reaper. Pre stanovenie nízke koncentrácií kapsaicínu nie sú tieto metódy vhodné.

Vzťah medzi výsledkami nameranými metódou HPLC a jednotlivými voltametrickými metódami bol vyhodnotený pomocou korelačnej analýzy v programe QC Expert. Výsledky korelačnej analýzy pre hodnoty vyhodnotené metódou kalibračnej krivky sú uvedené v tabuľke 11. Pre hodnoty vyhodnotené metódou štandardného prídavku sú výsledky korelačnej analýzy zhrnuté v tabuľke 12. Štatisticky významné hodnoty korelačných koeficientov sú vyznačené červenou farbou.

Tab. 11: Hodnoty korelačných koeficientov pre výsledky získané voltametrickými metódami v porovnaní s HPLC. Porovnávané výsledky boli vyhodnotené metódou kalibračnej priamky.

		Korelácia	
Porovnávacía metóda	Porovnávaná metóda	Spearmanova	Párová
HPLC	Metóda B1	0.6	0.816346365
	Metóda C1	1	0.981867183
	Metóda D1	0.828571429	0.969844842
	Metóda E1	0.942857143	0.986092311

Tab. 12: Hodnoty korelačných koeficientov pre výsledky získané voltametrickými metódami v porovnaní s HPLC. Porovnávané výsledky boli vyhodnotené metódou štandardného prídavku.

		Korelácia	
Porovnávacía metóda	Porovnávaná metóda	Spearmanova	Párová
HPLC	Metóda A	0.6	0.716691598
	Metóda B2	0.542857143	0.027530067
	Metóda C2	1	0.894217986
	Metóda D2	0.498111728	0.828571429
	Metóda E2	0.828571429	0.695633101

Korelačná analýza ukázala štatisticky významné korelácie medzi metódou HPLC a metódami voltametrickej analýzy tam, kde boli výsledky vyhodnocované metódou kalibračnej krivky. Predovšetkým merania na GCE elektróde modifikovanej fosfolipidovou membránou (metódy C1 a E1) vykazujú silnú koreláciu s HPLC. V prípade stanovenia metódou štandardného prídavku bola zistená najtesnejšia korelácia s výsledky porovnávej HPLC pri metóde DPV na fosfolipidmi modifikovanej elektróde .



## 4. Záver

Cieľom tejto práce bolo sledovanie elektrochemického správania kapsaicínu pomocou cyklickej a diferenciálne pulznej voltametrie. Merania boli prevedené s použitím pracovnej elektródy zo skleneného uhlíku. Oxidačné produkty kapsaicínu boli identifikované pomocou elektrochémie s online detekciou hmotnostnou spektrometriou. Na základe výsledkov získaných touto štúdiou bolo testovaných niekoľko metód stanovenia kapsaicínu s využitím lineárnej a diferenciálne pulznej voltametrie.

V cyklickom voltamograme kapsaicínu, zaznamenanom v kyslom prostredí pH 2, bol v anodickom smere polarizácie pozorovaný pri potenciáli 700 mV jeden pík, ktorý zodpovedal irreverzibilnej oxidácii kapsaicínu na príslušný *o*-benzochinón. V katodickom smere sa pri potenciáli 450 mV objavoval pík redukcie tohto chinónu na odpovedajúci katechol. V 2. cykle v anodickom smere sme potom pozorovali pík oxidácie katecholu na *o*-benzochinón, čo znamená, že táto reakcia bola reverzibilná. Meraním závislosti prúdovej odozvy kapsaicínu na pH meraného roztoku bolo zistené, že kapsaicín poskytoval najvyššiu odozvu v kyslom prostredí s pH 2. Závislosť prúdovej odozvy na koncentrácii kapsaicínu mala lineárny rozsah od  $5 \cdot 10^{-6}$  po  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l. Bol vypočítaný limit detekcie 3,5  $\mu\text{mol/l}$ . Reálny limit detekcie, kedy bolo možné vyhodnotiť prúdový signál bol 6  $\mu\text{mol/l}$ . Na základe smernice závislosti logaritmu prúdovej odozvy na logaritme rýchlosti polarizácie elektródy bolo zistené, že sa jedná o dej adsorpčne – difúzny.

Pomocou elektrochémie s online detekciou hmotnostnou spektrometriou bol potvrdený vznik príslušného *o*-benzochinónu a katecholu, ktoré sú oxidačnými produktami kapsaicínu.

Pre stanovenie kapsaicínu v čili paprikách a v dochucovadlách obsahujúcich extrakty čili paprik bolo navrhnutých a testovaných niekoľko metód s využitím diferenciálne pulznej a lineárnej voltametrie na nemodifikovanej a asolectinom modifikovanej elektróde zo skleneného uhlíku. Výsledky získané týmito metódami boli hodnotené korelačnou analýzou, ktorá potvrdila štatisticky významnú koreláciu medzi výsledkami niektorých z týchto metód, najmä diferenciálne pulznou voltametriou s asolectionm modifikovanou elektródou, a hodnotami nameranými pomocou HPLC.

## 5. Použitá literatura

- [1] D. DeWitt, P.W. Bosland, *The Complete Chile Pepper Book: A Gardener's Guide to Choosing, Growing, Preserving, and Cooking*, Timber Press, 2009.
- [2] V.A. Parthasarathy, B. Chempakam, T.J. Zachariah, *Chemistry of Spices*, CABI, 2008.
- [3] Y. Zou, K. Ma, M. Tian, Y. Zou, K. Ma, M. Tian, Chemical composition and nutritive value of hot pepper seed (*Capsicum annuum*) grown in Northeast Region of China, *Food Science and Technology*, 35 (2015) 659–663.
- [4] M.E. Ionică, V. Nour, I. Trandafir, Bioactive compounds and antioxidant activity of hot pepper fruits at different stages of growth and ripening, 1, 90 (2017) 232–237.
- [5] L.C. Montoya-Ballesteros, A. González-León, Y.J. Martínez-Núñez, M.R. Robles-Burgueño, M.A. García-Alvarado, G.C. Rodríguez-Jimenes, Impact Of Open Sun Drying And Hot Air Drying On Capsaicin, Capsanthin, And Ascorbic Acid Content In Chiltepin (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*), *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 16 (2017).  
<http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=62053304011> (accessed April 2, 2018).
- [6] N. Kozukue, J.-S. Han, E. Kozukue, S.-J. Lee, J.-A. Kim, K.-R. Lee, C.E. Levin, M. Friedman, Analysis of Eight Capsaicinoids in Peppers and Pepper-Containing Foods by High-Performance Liquid Chromatography and Liquid Chromatography–Mass Spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2005) 9172–9181.
- [7] M. Kaiser, I. Higuera, F.M. Goycoolea, Capsaicinoids: Occurrence, Chemistry, Biosynthesis, and Biological Effects, in: E.M. Yahia (Ed.), *Fruit and Vegetable Phytochemicals*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2017: pp. 499–514.
- [8] I. Guzmán, P.W. Bosland, Sensory properties of chile pepper heat – and its importance to food quality and cultural preference, *Appetite*, 117 (2017) 186–190.
- [9] J. McQuaid, *Tasty: The Art and Science of What We Eat*, Simon and Schuster, .
- [10] N. Jeeatid, S. Techawongstien, B. Suriarn, S. Chanthai, P.W. Bosland, S. Techawongstien, Influence of water stresses on capsaicinoid production in hot pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) cultivars with different pungency levels, *Food Chemistry*. 245 (2018) 792–797.

- [11] D. DeWitt, P.W. Bosland, *The Pepper Garden*, Ten Speed Press, Berkeley, Calif, 1993.
- [12] M. Contreras-Padilla, E.M. Yahia, Changes in Capsaicinoids during Development, Maturation, and Senescence of Chile Peppers and Relation with Peroxidase Activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (1998) 2075–2079.
- [13] P. Popelka, P. Jevinová, K. Šmejkal, P. Roba, Determination of Capsaicin Content and Pungency Level of Different Fresh and Dried Chilli Peppers, *Folia Veterinaria*, 61 (2017).
- [14] K. Sanatombi, G.J. Sharma, Capsaicin Content and Pungency of Different Capsicum spp. Cultivars, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 36 (2008) 89–90.
- [15] L. Duelund, O.G. Mouritsen, Contents of capsaicinoids in chillies grown in Denmark, *Food Chemistry*, 221 (2017) 913–918.
- [16] W.L. Scoville, Note on capsicums, *The Journal of the American Pharmaceutical Association*, 1 (1912) 453–454.
- [17] E.A. Weiss, *Spice Crops*, CABI, 2002.
- [18] K.V. Peter, *Handbook of Herbs and Spices*, Elsevier, 2001.
- [19] P.H. Todd, M.G. Bensinger, T. Biftu, Determination Of Pungency Due To Capsicum By Gas-Liquid Chromatography, *Journal of Food Science*, 42 (1977) 660–665.
- [20] THE Hot Pepper List: Know Your Spice, PepperScale. (2014). <https://www.pepperscale.com/hot-pepper-list/> (accessed April 16, 2018).
- [21] W.-K. Ryu, H.-W. Kim, G.-D. Kim, H.-I. Rhee, Rapid determination of capsaicinoids by colorimetric method, *Journal of Food and Drug Analysis*, 25 (2017) 798–803.
- [22] A. González-Zamora, E. Sierra-Campos, R. Pérez-Morales, C. Vázquez-Vázquez, M.A. Gallegos-Robles, J.D. López-Martínez, J.L. García-Hernández, Measurement of Capsaicinoids in Chiltepin Hot Pepper: A Comparison Study between Spectrophotometric Method and High Performance Liquid Chromatography Analysis, *Journal of Chemistry*, (2015).
- [23] I.M. Hwang, J.Y. Choi, E.Y. Nho, G.H. Lee, N. Jamila, N. Khan, C.H. Jo, K.S. Kim, Characterization of Red Peppers (*Capsicum annum*) by High-performance

- Liquid Chromatography and Near-infrared Spectroscopy, *Analytical Letters*, 50 (2017) 2090–2104.
- [24] I. Novak Jovanović, L. Čížmek, Š. Komorsky-Lovrić, Electrochemistry-based determination of pungency level of hot peppers using the voltammetry of microparticles, *Electrochimica Acta*, 208 (2016) 273–281.
- [25] A. Das, S. Kundu, B. Ghosh, A Simple and Efficient Method for Extraction and Quantification of Capsaicin from Pepper Fruits through High Performace Thin Layer Chromatography, *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*, 6 (2015) 606–612.
- [26] L. Liu, X. Chen, J. Liu, X. Deng, W. Duan, S. Tan, Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum anuum* and related products by capillary electrophoresis with a mixed surfactant system, *Food Chemistry*, 119 (2010) 1228–1232.
- [27] S. Saha, S. Walia, A. Kundu, C. Kaur, J. Singh, R. Sisodia, Capsaicinoids, Tocopherol, and Sterols Content in Chili (*Capsicum sp.*) by Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Determination, *International Journal of Food Properties*, 18 (2015) 1535–1545.
- [28] M. Nag, J. Chanda, R. Biswas, N.A. Al-Dhabi, V. Duraipandiyan, P. Banerji, P.K. Mukherjee, Validation of Capsaicin in Indian Capsicum Species Through RP-HPLC, *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51 (2017) 337–342.
- [29] V. Fattori, M.S.N. Hohmann, A.C. Rossaneis, F.A. Pinho-Ribeiro, W.A. Verri, Capsaicin: Current understanding of its mechanism and therapy of pain and other pre-clinical and clinical uses, *Molecules*, 21 (2016).
- [30] J. Pereira, *The Elements of Materia Medica and Therapeutics*, Longman, 1855.
- [31] J.C. Thresh, Isolation of capsaicin, *The Pharmaceutical Journal and Transactions*, (1876) 941–947.
- [32] K. Micko, Zur Kenntnis des Capsaicins, *Zeitschrift Für Untersuchung Der Nahrungs- Und Genussmittel*. (1898) 818–829.
- [33] E.K. Nelson, L.E. Dawson, The Constitution Of Capsaicin, The Pungent Principle Of Capsicum. III, *Journal of the American Chemical Society*, 45 (1923) 2179–2181.
- [34] E. Späth, S.F. Darling, Synthese des Capsaicins, *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 63 (1930) 737–743.

- [35] Pubchem, Capsaicin, (n.d.).  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1548943> (accessed April 16, 2018).
- [36] V. Vlachová, K. Su, D.P. Kuffler, L. Vyklický, Kapsaicinový Receptor □  
 Specifický Iontový Kanál Pro Detekci Bolestivých Podnětů, *Psychiatrie*, (2002) 8.
- [37] M. Hayman, P.C.A. Kam, Capsaicin: A review of its pharmacology and clinical applications, *Current Anaesthesia & Critical Care*. 19 (2008) 338–343.
- [38] A.M. Bode, Z. Dong, The Two Faces of Capsaicin, *Cancer Research*, 71 (2011) 2809–2814.
- [39] T. Toyoda, L. Shi, S. Takasu, Y.-M. Cho, Y. Kiriya, A. Nishikawa, K. Ogawa, M. Tatematsu, T. Tsukamoto, Anti-Inflammatory Effects of Capsaicin and Piperine on *Helicobacter pylori*-Induced Chronic Gastritis in Mongolian Gerbils, *Helicobacter*, 21 (2016) 131–142.
- [40] I. Perucka, M. Materska, Antioxidant activity and content of capsaicinoids isolated from paprika fruits, *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 12 (2003) 15–18.
- [41] E. Marini, G. Magi, M. Mingioia, A. Pugnali, B. Facinelli, Antimicrobial and Anti-Birulence Activity of Capsaicin Against Erythromycin-Resistant Cell-Invasive Group A Streptococci, *Frontiers in Microbiology*, 6 (2015).
- [42] H.-S. Jun, T. Park, C.K. Lee, M.K. Kang, M.S. Park, H.I. Kang, Y.-J. Surh, O.H. Kim, Capsaicin induced apoptosis of B16-F10 melanoma cells through down-regulation of Bcl-2, *Food and Chemical Toxicology*, 45 (2007) 708–715.
- [43] A.M. Sánchez, S. Malagarie-Cazenave, N. Olea, D. Vara, A. Chiloeches, I. Díaz-Laviada, Apoptosis induced by capsaicin in prostate PC-3 cells involves ceramide accumulation, neutral sphingomyelinase, and JNK activation, *Apoptosis*, 12 (2007) 2013–2024.
- [44] S. Chantai, J. Juangsamoot, C. Ruangviriy Achai, S. Techawongstien, Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in Some Chilli Varieties using Accelerated Solvent Extraction Associated with Solid-Phase Extraction Methods and RP-HPLC\_Fluorescence, *E-Journal of Chemistry*, 9 (2012) 1550–1561.
- [45] V. Šupálková, H. Stavělková, S. Křížková, V. Adam, A. Horna, L. Havel, P. Ryant, P. Babula, R. Kizek, Study of Capsaicin Content in Various Parts of Pepper Fruit by Liquid Chromatography with Electrochemical Detection, *Acta Chimica Slovenica*, 54 (2007) 55–59.

- [46] U. Schweiggert, R. Carle, A. Schieber, Characterization of major and minor capsaicinoids and related compounds in chili pods (*Capsicum frutescens* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 557 (2006) 236–244.
- [47] M. Bononi, F. Tateo, Determination of Capsaicinoids from Dried Pepper Fruits by Fast-Gas Chromatography, *Italian Journal of Food Science: IJFS*; Pinerolo, 24 (2012) 49–54.
- [48] Y. Yardım, Z. Şentürk, Electrochemical evaluation and adsorptive stripping voltammetric determination of capsaicin or dihydrocapsaicin on a disposable pencil graphite electrode, *Talanta*, 112 (2013) 11–19.
- [49] Y. Yardım, Sensitive Detection of Capsaicin by Adsorptive Stripping Voltammetry at a Boron-Doped Diamond Electrode in the Presence of Sodium Dodecylsulfate, *Electroanalysis*, 23 (2011) 2491–2497.
- [50] A.K. Baytak, M. Aslanoglu, Sensitive determination of capsaicin in pepper samples using a voltammetric platform based on carbon nanotubes and ruthenium nanoparticles, *Food Chem*, 228 (2017) 152–157.
- [51] Y. Ya, L. Mo, T. Wang, Y. Fan, J. Liao, Z. Chen, K.S. Manoj, F. Fang, C. Li, J. Liang, Highly sensitive determination of capsaicin using a carbon paste electrode modified with amino-functionalized mesoporous silica, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 95 (2012) 90–95.
- [52] A. Laskaridou-Monnerville, Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography and Its Application to Various Species of *Capsicum*, *Solanaceae*, *Journal of Chromatography A*, 838 (1999) 293–302.
- [53] S. Benická, *Extrakce kapsaicinu s dihydrokapsaicinu z Capsicum Annuum*, Rigorózní práce, Univerzita Palackého v Olomouci, 2018.
- [54] Švecová Hana, Součková Jitka, Pyszková Michaela, Svítková Jana, Labuda Ján, Skopalová Jana, Barták Petr, Phospholipids improve selectivity and sensitivity of carbon electrodes: Determination of pesticide Paraquat, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116 (2014) 1247–1255.
- [55] D.K. Gosser, *Cyclic voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms*, VCH, 1993.

- [56] R.S. Nicholson, I. Shain, Theory of Stationary Electrode Polarography for a Chemical Reaction Coupled between Two Charge Transfers, *Analytical Chemistry*, 37 (1965) 178–190.
- [57] C.A. Reilly, D.J. Crouch, G.S. Yost, A.A. Fatah, Determination of Capsaicin, Nonivamide, and Dihydrocapsaicin in Blood and Tissue by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology*, 26 (2002).