Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Stanovení rozdělovacích koeficientů v systému liposom – voda plynovou chromatografií

Diplomová práce

Autor:	Bc. Veronika Talášková
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.
Studijní program:	N1407 – Chemie
Studijní obor:	Analytická chemie
Forma studia:	Prezenční

Olomouc 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením doc. RNDr. Petra Bartáka, Ph.D. Veškeré literární prameny a zdroje, které jsem v této práci použila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne ………………………

……………………………

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce doc. RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a pomoc během zpracovávání diplomové práce. Jemu a taktéž RNDr. Janě Skopalové, Ph.D. vděčím za cenné rady a pomoc během vykonávání experimentální části diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat svým kolegům Bc. Radku Jergovi a Bc. Veronice Müllerové za pomoc a Katedře analytické chemie za umožnění vypracování této práce. Můj dík také patří mé rodině za podporu při studiu.

Tato závěrečná práce vznikla za podpory Interní grantové agentury UP (projekty číslo IGA_PrF_2019_028 a IGA_PrF_2020_030).

Bibliografické údaje

Autor:	Bc. Veronika Talášková
Název práce:	Stanovení rozdělovacích koeficientů v systému liposom – voda plynovou chromatografií
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2020

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá studiem stanovení rozdělovacích koeficientů fenolických látek přírodního původu v systému liposom – voda. Hodnoty rozdělovacího koeficientu byly stanoveny modifikovanou metodou rovnovážné dialýzy za využití vyrobené rozdělovací aparatury. Koncentrace studovaných látek v roztocích byly analyzovány plynovou chromatografií ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Analýze předcházela derivatizace hydroxylových skupin studovaných látek za účelem zlepšení detekčních limitů a zvýšení robustnosti metody. Metoda pro stanovení rozdělovacích koeficientů byla optimalizována a aplikována při stanovení rozdělovacích koeficientů eugenolu, thymolu a karvakrolu. Výsledné hodnoty byly porovnány s hodnotami určenými pro stejné vzorky pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a diferenční pulzní voltametrie. Hodnoty rozdělovacích koeficientů nalezené třemi různými technikami se pohybují v intervalu 120–1100 (log K = 2,09–3,04) a dobře korespondují s hodnotami uvedenými v literatuře.

Klíčová slova:	Rozdělovací koeficient, plynová chromatografie, liposomy, eugenol, thymol, karvakrol, asolektin
Počet stran:	64
Jazyk:	český

Bibliographical identification

Author:	Bc. Veronika Talášková
Title:	Determination of partition coefficients in the liposome – water system by gas chromatography
Type of thesis:	Master‘s
Department:	Department of Analytical Chemistry
Supervisor:	doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.
The year of presentation:	2020

Abstract

This Master's thesis deals with the study of determination of partition coefficients in the liposome – water system for phenolic compounds commonly found in the nature. The values of partition coefficients were determinated by modified equilibrium dialysis method with the use of self-made partitioning apparatus. The concentration of analysed compounds in the solution was examined by gas chromatography with mass spectrometry. Before that, derivatization of hydroxyl parts was performed in order to improve detection limits and robustness of the method. The method for determination of partition coefficients was optimized and applied for determining partition coefficients of eugenol, thymol and carvacrol. Results were compared with values from the same sample solution obtained by high-performance liquid chromatography and differential pulse voltammetry. The values of partition coefficients obtained by these three techniques are found in interval 120–1100 (log K = 2,09–3,04). These values agree well with values found in the literature.

Keywords:	Partition coefficient, gas chromatography, liposomes, eugenol, thymol, carvacrol, asolectin
Number of pages:	64
Language:	Czech

Obsah

1 ÚVOD 8

2 TEORETICKÁ ČÁST 10

2.1 Rozdělovací koeficient 10

2.2 Metody pro stanovení rozdělovacího koeficientu 11

2.2.1 Třepání 12

2.2.2 Pomalé míchání 14

2.2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie 15

2.2.4 Jiné metody 16

2.3 Liposomy 17

2.3.1 Příprava liposomů 19

2.3.2 Využití liposomů 20

2.4 Metody pro stanovení rozdělovacího koeficientu v systému liposom – voda 21

2.4.1 Potenciometrie 21

2.4.2 Rovnovážná dialýza 22

2.4.3 Liposomální elektrokinetická chromatografie 23

2.4.4 Jiné metody 23

2.5 Plynová chromatografie 24

2.5.1 Stanovení rozdělovacího koeficientu pomocí GC 25

2.6 Vybrané látky k analýze 27

2.6.1 Eugenol 28

2.6.2 Thymol 29

2.6.3 Karvakrol 30

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 32

3.1 Chemikálie a materiály 32

3.2 Přístroje a software 32

3.3 Příprava experimentu ... 33
3.4 Úprava vzorku před analýzou ... 34
3.4.1 Eugenol ... 34
3.4.2 Thymol a karvakrol ... 35
3.4.3 Asolektin ... 35
3.5 Analýza GC/MS ... 35
3.6 Výpočet rozdělovacího koeficientu ... 36
4 VÝSLEDKY A DISKUZE ... 38
4.1 Optimalizace metody ... 39
4.1.1 Stanovení asolektinu ... 39
4.1.2 Volba vhodné membrány ... 42
4.1.3 Časová závislost rozdělování eugenolu ... 43
4.1.4 Koncentrační závislost rozdělování eugenolu ... 45
4.2 Stanovení rozdělovacího koeficientu v systému liposom – voda ... 47
4.2.1 Eugenol ... 47
4.2.2 Thymol ... 50
4.2.3 Karvakrol ... 55
5 ZÁVĚR ... 59
6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY ... 60

1 ÚVOD

Rozdělovací koeficient je jedním z nejpoužívanějších parametrů při určování lipofility látky. Zejména důležitá je tato vlastnost u farmaceuticky aktivních substancí podávaných do lidského organismu, kdy se za pomocí rozdělovacího koeficientu dá určit, zdali bude daná látka interagovat s buněčnými membránami a jak dobře. Dále je tato vlastnost důležitá i u znečišťujících látek v životním prostředí, protože tato vlastnost vypovídá o jejich následném osudu v daném prostředí. [1]

Farmaceutický průmysl při výrobě nových léků stojí před důležitou otázkou a to, zda jsou schopné tyto nové sloučeniny interagovat s buněčnými membránami, aby se dostaly na své místo působení v organismu. Buněčné membrány jsou považovány za jedno z prvotních míst, kde dochází k interakci mezi organismem a léčivem. Pokud známe fyzikálně-chemické vlastnosti tohoto léčiva, lze pak dosáhnout požadované farmakokinetiky v organismu, aniž by to mělo velký vliv na farmakodynamiku. Aby se tyto látky dostaly přes buněčnou membránu, je třeba, aby byly dostatečně lipofilní. Tuto informaci poskytne rozdělovací koeficient. [2]

V případě životního prostředí byla prokázána korelace mezi hodnotou rozdělovacího koeficientu a bioakumulací látky v rybách. Například pokud by studovaná látka byla vysoce lipofilní a zároveň ve vyšších koncentracích toxická, docházelo by s vysokým rozdělovacím koeficientem k akumulaci této látky v tuku ryb. Nejen, že by poškozovala organismus ryb, ale také by se stala toxická pro další členy potravinového řetězce, které se rybami živí, tedy také pro lidi. Tato látka, která by se určitým způsobem dostávala do životního prostředí, by se později mohla stát vysoce nebezpečnou. Rozdělovací koeficient může sloužit v prevenci před tímto nebezpečím. [1]

Rozdělovací koeficient určuje, jakým způsobem se analyt rozděluje do dvou různých prostředí. Pro studium lipofility se používá prostředí polární a nepolární. Jako polární se používá nejčastěji voda a jako nepolární oktanol. Čím je látka lipofilnější, tím lépe se rozpouští v nepolárním prostředí a na konci experimentu je v této fázi zjištěna její větší koncentrace. Dále je možné sledovat rozdělování zejména u těkavých látek např. v prostředí kapalném a plynném. Čím je látka těkavější, tím více uniká do plynné fáze a ve vodné fázi se zadržuje minimálně. Tento proces je více závislý na teplotě a tlaku než v případě rozdělování do dvou kapalných prostředí. [3]

Jak již bylo zmíněno, pro studium průchodu léčivých látek do organismu přes buněčné membrány se využívá rozdělovacích koeficientů. Oktanol svou strukturou připomíná lipidy, ze kterých jsou buněčné membrány složeny, tedy jedna část struktury je hydrofilní a druhá hydrofobní. Pokud látka přechází spíše do oktanolové fáze, je lipofilnějšího charakteru, a tudíž by měla dobře procházet i do buněčných membrán. Oktanol je ovšem oproti fosfolipidům, které tvoří buněčné membrány, o hodně jednodušší struktura a nemůže simulovat složité procesy, které se dějí ve skutečných membránách. Proto se poslední dobou začaly používat místo oktanolové fáze liposomy, které procesy ve skutečných membránách dokáží simulovat lépe. [1,3]

Cílem této práce je optimalizovat podmínky pro stanovení rozdělovacích koeficientů a následně je stanovit v systému liposom – voda pro vybrané fenolické látky. Tyto látky jsou přírodního charakteru a vykazují různé (např. antibakteriální a antioxidační) vlastnosti, tudíž by tyto látky mohly nalézt uplatnění ve farmaceutickém průmyslu. Stanovení rozdělovacího koeficientu bylo provedeno za pomoci vyrobené tzv. rozdělovací aparatury a stanovení koncentrací studovaných látek bylo provedeno za pomoci plynové chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem (GC/MS). Dalším cílem této práce bude také porovnat výsledky získané pomocí GC/MS s hodnotami, které získali kolegové Bc. Veronika Müllerová a Bc. Radek Jerga pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a voltametrických metod. [4,5]

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Rozdělovací koeficient

Rozdělovací koeficient je veličina, která vychází z Nernstova rozdělovacího zákona. Tento zákon se uplatňuje při rovnováze mezi dvěma nemísitelnými nebo omezeně mísitelnými kapalinami při určité teplotě a tlaku, a je popisován rovnicí 1:

$$K_D = \frac{c_{org}}{c_{aq}}, \qquad (1)$$

kde K_D je Nernstův rozdělovací koeficient, c_{org} a c_{aq} jsou rovnovážné koncentrace studované látky v organickém a vodném rozpouštědle. Tento koeficient je bezrozměrný a vyjadřuje se nejčastěji v logaritmickém tvaru, jak je vyjádřeno v rovnici 2:

$$\log K_D = \log \frac{c_{org}}{c_{aq}} \qquad (2)$$

Rozdělovací koeficient by tedy neměl záviset na koncentraci, a pokaždé by ideálně mělo dojít ke stejnému rozdělení látky mezi fáze. [6]

Nejčastěji se jako nepolární organické rozpouštědlo používá n-oktanol a jako vodné rozpouštědlo voda. Rozdělovací koeficient K se pak vyjádří rovnicí 3:

$$\log K_{o/v} = \log \frac{c_{oktanol}}{c_{voda}}, \qquad (3)$$

kde $K_{o/v}$ je rozdělovací koeficient v systému n-oktanol – voda a $c_{oktanol}$ a c_{voda} jsou rovnovážné koncentrace studované látky v rozpouštědle n-oktanolu a ve vodě. Je-li rozdělovací koeficient větší jak 1, znamená to, že je látka více zastoupena v oktanolové fázi, ve které se lépe rozpouští, a je tudíž spíše hydrofobního charakteru. Je-li rozdělovací koeficient menší jak 1, platí to o studované látce opačně. [6–8]

Rozdělovací koeficient bývá nejčastějším deskriptorem používaným při studiu modelů kvantitativní závislosti aktivity na struktuře (QSAR, *quantitative structure-activity relationship*). Tyto modely nacházejí využití zejména ve farmaceutickém průmyslu pro navrhování léčiv a zjišťování jejich toxicity, ale také v analýze životního prostředí. V případě studia léčiv se u vybrané látky, u které se prokázal požadovaný farmaceutický účinek, za pomoci rozdělovacího koeficientu zkoumá, jestli se bude dobře vstřebávat

do tkání, ve kterých tento účinek vyvolá. Pokud se ale vstřebává ve velké míře, může dojít k akumulaci látky v organismu a následně k toxicitě. Mezi procesem vstřebávání látky do tkání organismu a rozdělovacím koeficientem této látky byla popsána lineární korelace. Oktanol je v tomto případě organické rozpouštědlo, které se tím, že na jednom svém konci má hydrofilní část a na druhém konci část hydrofobní, blíží struktuře membránových lipidů. [1,9–11]

V momentě, kdy K dosahuje vyšších hodnot a jedná se o vysoce hydrofobní látku, se tato lineární korelace mezi K a vstřebáváním látek do tkání vytrácí. Jedním z důvodů může být, že dochází k odlišnostem v mechanismu při prostupování těchto hydrofobních látek do lipidových částí organismu. Tudíž zaniká podoba s oktanolem, který má o dost jednodušší strukturu oproti skutečným buněčným membránám. Stejně tak dochází k odlišnostem taktéž mezi neutrálními a nabitými látkami, kdy v systému oktanol – voda je poměr rozdělení nabitých látek o 2–3 řády menší než v systému liposom – voda. Proto se jako lepší model pro buněčné membrány začaly používat uměle vytvořené liposomy. [1,9–11]

2.2 Metody pro stanovení rozdělovacího koeficientu

Rozdělovací koeficient lze stanovit několika metodami, které jsou popsány mimo jiné Organizací pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD). Obecně jsou metody pro jeho určení rozděleny na přímé a nepřímé. Mezi přímé metody řadíme např. metody třepání a pomalého míchání, které jsou ovšem časově náročné, náchylné ke tvorbě emulzí a vyžadují velké množství čistých chemikálií. Na druhou stranu nepřímé metody, mezi které se řadí chromatografické a elektromigrační techniky, jsou rychlé, poměrně snadno proveditelné a vyžadují malé množství materiálu, u kterého se nemusí dbát tak moc na čistotu jako u metod přímých. Kromě toho existují i metody výpočetní, které hodnotu K pro danou látku spočítají. [8,9,12–14]

Rozdělovací koeficient je veličina závislá na různých parametrech v roztoku. Tyto parametry by během měření hodnoty K měly zůstat konstantní. Jedním takovým parametrem je teplota. Např. v případě, kdy teplota během experimentu v systému oktanol – voda stoupá, stoupá také rozpustnost vody v oktanolu. Tyto změny mohou vést k nepřesnostem při stanovení K. Další parametry, na které je třeba během experimentu dávat pozor, jsou

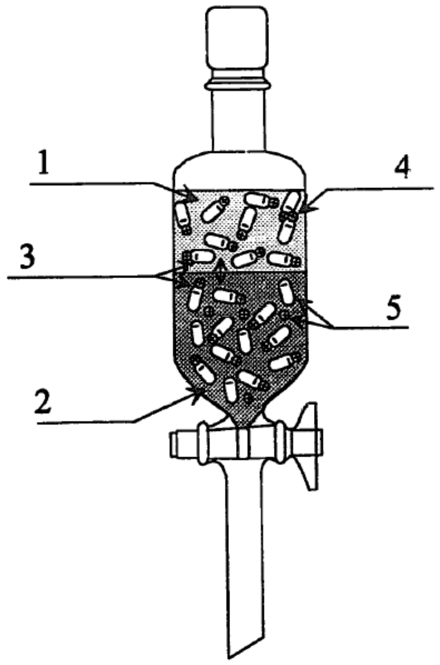
např. tlak, pH a iontová síla. Zejména pH a iontová síla jsou důležité parametry při stanovení hodnoty K u nabitých látek. [8,15]

Rozdělovací koeficient se dá stanovit pro látky neutrální a nabité. Určení K nabitých látek je pak závislé na hodnotě pH a iontové síle. Pro stanovení se obvykle používají tlumivé roztoky o konstantním pH, během stanovení ovšem nebývá konstantní iontová síla. Davis a kolegové [16] zkoumali vliv iontové síly na distribuci fenolu v systému oktanol – voda i v systému cyklohexan – voda. Jako elektrolyt byl použit chlorid sodný, vodný roztok měl neutrální pH a fenol o pK_a = 9,87 byl v tomto roztoku disociován pouze nepatrně. V tomto experimentu bylo zpozorováno, že hodnota K roste se zvyšující se iontovou silou, a pokud je iontová síla v roztoku udržována pod hodnotu 0,1M, pak má iontová síla zanedbatelný vliv na určení hodnoty K. [15,17]

Obecně je v systému oktanol – voda míra distribuce nabitých látek o několik řádů nižší než míra distribuce neutrálních látek v tomto systému. Univerzální technikou k určení K nabitých látek je potenciometrie. Tato metoda byla nejprve vyvinuta pro určení K v systému oktanol – voda, nedávno byla tato metoda rozšířena na použití taktéž v systému liposom – voda. V systémech oktanol – voda a liposom – voda si jsou hodnoty K např. určitých fenolických látek podobné v obou systémech, pokud se nachází v neutrálním stavu. Jakmile jsou tyto fenoly nabité, daleko lépe procházejí do fosfolipidové dvojvrstvy než do roztoku oktanolu. Oktanol tudíž v případě nabitých látek nemůže věrohodně nahrazovat biologické membrány. Další informace o této metodě jsou uvedeny v podkapitole 2.4.1 Potenciometrie. V případě, že je studována hodnota K pro neutrální látky, musí být zajištěny podmínky v roztoku tak, aby nedošlo k nabití této látky (tedy zajištění konstantního pH). [11,17,18]

2.2.1 Třepání

První a nejčastěji používaná experimentální metoda pro stanovení hodnoty K neutrálních látek je metoda třepání (*shake flask method*), která má podobné uspořádání jako extrakce v systému kapalina – kapalina. Toto uspořádání je zobrazeno na obr. 1. Tato metoda obecně zvládá pokrýt rozsah hodnot logaritmického rozdělovacího koeficientu od -2 po 4. Nelze tuto metodu použít pro látky, které jsou povrchově aktivní. Pro provedení této metody je nutné mít konstantní tlak, teplotu a pH. Studovaná látka, n-oktanol a voda by měly být vysoké čistoty, jinak dochází ke zkreslení výsledků. Voda se doporučuje redestilovaná. [12]



Obrázek 1 – Schéma uspořádání třepacího experimentu [19]

(1 – n-oktanolová fáze, 2 – vodná fáze, 3 – molekuly, které se rozdělují mezi fázemi, 4 – možnost vzniku dimerů v oktanolové fázi, 5 – možnost disociace ve vodné fázi)

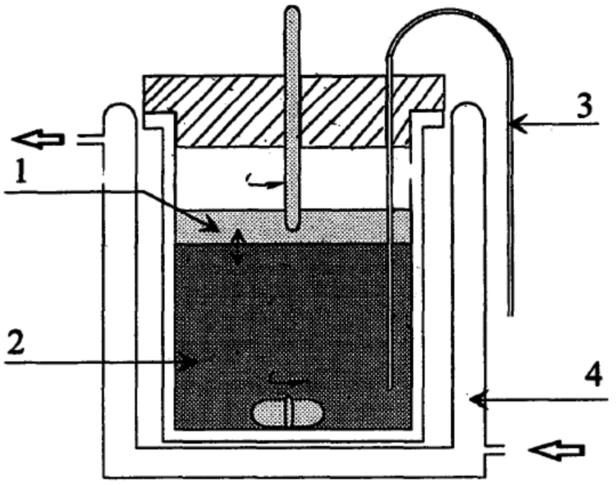
Před samotným experimentem pro stanovení rozdělovacího koeficientu je nutné obě fáze vzájemně nasytit. To se obvykle provádí tak, že se baňka, ve které se nachází n-oktanol a voda, ponechá třepat 24 h na mechanické třepačce. Po nasycení se rozpouštědla převedou do dělící nálevky, kde se k nim dále přidá studovaná látka rozpuštěná o dané koncentraci ve vodě nasycené oktanolem. Poté je dělící nálevka s rozpouštědly a studovanou látkou umístěna na mechanickou třepačku a nechá se ustavit rovnováha. Po ustavení rovnováhy se jednotlivé fáze od sebe oddělí centrifugací. Následně se např. fotometricky, plynovou či kapalinovou chromatografií určí koncentrace studované látky v obou fázích, porovná se s původní aplikovanou koncentrací a spočítá se rozdělovací koeficient. [12]

U této metody může docházet k chybám ve vodné fázi. Je důležité, aby se do vodné fáze při jejím odebírání nedostaly stopy n-oktanolu, proto se doporučuje při odebírání vodné fáze (např. jehlou) nabrat nejdříve trochu vzduchu a při ponoření do rozpouštědla jemně vzduch vytlačit, aby nedošlo k nasátí n-oktanolu. Při vysoké lipofilitě studované látky se

mohou mikrokapičky n-oktanolu dostávat do vodné fáze a zkreslovat výslednou koncentraci ve vodné fázi, proto je tato metoda limitována pouze do hodnoty log K = 4. [9,12]

2.2.2 Pomalé míchání

Metoda pomalého míchání (*slow-stirring method*) zvládá určit hodnotu logaritmu K až do 8,2. Je to tedy vhodná metoda pro určování K vysoce nepolárních látek. Také by zde mělo docházet ke zmenšení míry tvorby mikrokapiček n-oktanolu ve vodné fázi oproti třepací metodě. V tomto experimentu jsou obě rozpouštědla a studovaná látka termostatované na stejnou teplotu v míchaném reaktoru a ustavení fázové rovnováhy je podpořeno mícháním. Schéma uspořádání tohoto experimentu je zobrazeno na obr. 2. Míchání zprostředkovává pouze omezené turbulence, které zvyšují výměnu látky mezi fázemi, aniž by vznikaly mikrokapičky n-oktanolu ve vodné fázi. [13]



Obrázek 2 – Schéma uspořádání míchacího experimentu [19]

(1 – oktanolová fáze, 2 – vodná fáze, 3 – kapilára pro odebírání vzorku, 4 – vodné termostatování teploty)

Stejně jako u třepací metody je zde požadavek na vysokou čistotu rozpouštědel a studované látky. Stejně tak by mělo před experimentem dojít k nasycení obou fází, což probíhá v dostatečně velké nádobě pomalým mícháním dvojfázového systému po dobu dvou dní. Míchátko by mělo být obaleno teflonem, aby zůstalo inertní. Samotný experiment by měl být ochráněn před slunečním zářením. [13]

Vzhledem k hydrofobicitě studované látky se předpokládá, že její koncentrace ve vodné fázi bude malá. Proto je doporučeno při stanovení použít vhodnou extrakční a prekoncentrační techniku. Pokud je předpokládaná hodnota log K vyšší jak 6, doporučuje se před samotnou extrakcí přidat do vodné fáze definovaný standard, aby mohly být zaznamenány ztráty během extrakce a prekoncentrace. [13]

Délka experimentu se odvíjí od doby, kdy dochází k ustavení rovnováhy. Ta se zjistí při zkušebním pokusu, kdy se v různých časových intervalech odebírá vzorek z obou fází, který se analyzuje. Například pro sloučeninu dekachlorbifenyl s hodnotou log K = 8,23 dojde k ustavení rovnováhy mezi oběma fázemi za 144 hodin. [13]

Pro provedení experimentu se požadovaná koncentrace studované látky rozpustí v definovaném množství n-oktanolu nasyceném vodou a opatrně se přidá do testovací nádoby. Fáze n-oktanolu se přidá pomalým pipetováním po stěně nádoby blízko vodné fáze, aby tato fáze nakonec utvořila nad vodnou fází vrstvu. Po začátku míchání by se měla zvyšovat rychlost míchání pomalu a měla by se upravovat tak, aby vír měl hloubku maximálně 2,5 cm. Intenzivnější míchání zapříčiňuje vznik mikrokapiček n-oktanolu ve vodné fázi, a tudíž vznik chyb podobně jako v třepací metodě. [13]

2.2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) se řadí mezi separační techniky, kde dochází k rozdělování složek vzorku na základě jejich interakce se stacionární fází v koloně. Vzorek je do kolony transportován mobilní fází, kterou je zde kapalina. Rozlišujeme analýzy v systému normálních a reverzních fázích. Při separaci na normálních fázích je použita polární kolona (např. silikagel) a nepolární mobilní fáze. Při reverzních fázích je tomu naopak a nejčastěji se jako sorbent používá silikagel s navázanými uhlovodíkovými řetězci (např. C18). [6,7]

HPLC metoda pokrývá rozsah hodnoty log K od 0 do 6. Používá se systém o reverzních fázích při izokratické eluci, jako náplně kolon se používají dlouhé uhlovodíkové řetězce vázané na silikagel jako jsou C8 a C18. Jako mobilní fáze se doporučuje kombinace methanolu a deionizované vody. Nejčastěji se používá poměr 3:1 methanol – voda, např. pro látky s hodnotou log K = 6 dochází k eluci do hodiny při průtoku 1 ml/min. Pro látky s vyšší hodnotou log K je nutné zmenšit eluční čas

zmenšením polarity mobilní fáze nebo úpravou délky kolony. Pokud není vhodný methanol jako mobilní fáze, může se použít např. ethanol nebo acetonitril. [1,14]

Experiment je opět závislý na parametrech jako je teplota, pH a iontová síla. Principem HPLC metody je, že se látky po nástřiku na kolonu zadržují na koloně úměrně jejich rozdělovacím koeficientům v systému uhlovodík – voda. Hydrofilní látky tedy budou eluovány jako první a lipofilní látky jako poslední. Z retenčního času (t_R) a mrtvého času (t_0) jsme schopni vypočítat kapacitní faktor (k) podle rovnice 4. Ze znalosti kapacitního faktoru a hodnot a a b (koeficienty lineární regrese) jsme dále schopni podle rovnice 5 spočítat hodnotu rozdělovacího koeficientu. Pro získání hodnot a a b je třeba sestavit kalibrační graf alespoň o šesti bodech. [1,14]

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \tag{4}$$

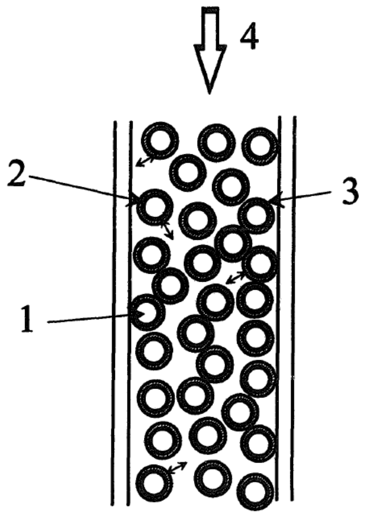
$$\log K_{o/v} = a \cdot \log k + b \tag{5}$$

Studované látky musí být rozpustné v mobilní fázi v dostatečné koncentraci tak, aby je bylo možné detekovat. HPLC metoda není použitelná pro silné kyseliny a báze, kovové komplexy, povrchově aktivní látky či pro látky, které interagují s mobilní fází. Problémem užití této nepřímé metody může být fakt, že chromatografické systémy s reverzními fázemi poskytují pouze částečný model pro skutečné rozdělování v systému oktanol – voda. V koloně může docházet k dalším specifickým interakcím, ke kterým by v samotném systému oktanol – voda nedošlo (např. iontová výměna u silanolových skupin). Reprodukovatelnost výsledků na běžných kolonách bývá často problémová. Jedním způsobem, jak přiblížit chromatografický systém systému oktanol – voda, jsou kolony potažené oktanolem a užití tlumivého roztoku nasyceného oktanolem. [9,14,20]

2.2.4 Jiné metody

Jednou z dalších metod je využití tzv. „kolony s generátorem“ (*generator column*), která umožňuje stanovit hodnotu log K pro látky s vysokou hydrofobicitou. V této metodě se používá kolona naplněná inertním materiálem, např. skleněné kuličky, které se silanizují. Poté se potáhnou vrstvičkou oktanolu nasyceného vodou se studovanou látkou. Do kolony je následně pumpována voda a dojde k ustavení rovnováhy mezi vodnou a oktanolovou fází. Schéma tohoto experimentu je zobrazeno na obr. 3. Voda, která opustí kolonu, se poté extrahuje organickým rozpouštědlem a analyzuje se např. HPLC systémem o reverzních

fázích. Pokud se před experimentem voda nasytí oktanolem, dochází k prodloužení životnosti kolonky a je možné určit až hodnotu log K = 8,5. [20,21]



Obrázek 3 – Schéma uspořádání experimentu s „kolonou s generátorem“ [19]

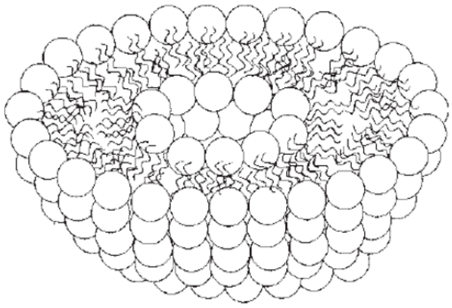
(1 – skleněné kuličky, 2 – silanizovaný povrch, 3 – adsorbovaná oktanolová fáze se studovanou látkou, 4 – proud vodné fáze)

Alternativní metodou jsou výpočetní metody hodnoty K. Ty se používají zejména tehdy, když se stojí před rozhodnutím, který experiment je nejvhodnější pro použití. V případě užití metody HPLC slouží předběžný výpočet k nastavení vhodných podmínek. Výpočetní metody tedy mohou pomoct při určení pravděpodobnosti, jakých hodnot K se získá při pokusu, anebo poskytují alespoň odhad hodnoty K u látek, u kterých nelze použít žádný experiment. Spolehlivost výpočetní metody klesá se zvyšující se komplexností studované látky. Mezi výpočetní metody se řadí např. Fujita-Hanschova π-metoda, Rekkerova metoda, Hansch-Leova metoda a kvantově chemické metody moderní výpočetní chemie. [8,14]

2.3 Liposomy

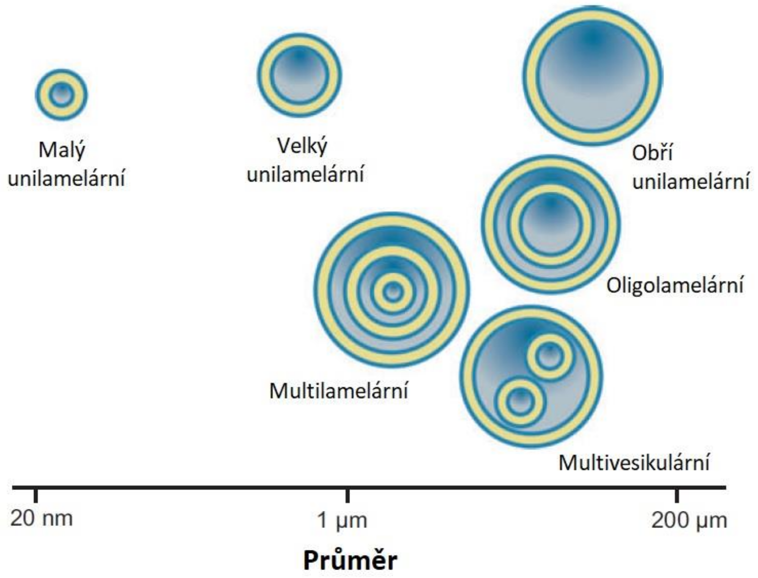
Liposomy jsou malé sférické váčky, které jsou tvořeny jednou či více fosfolipidovými dvojvrstvami. Schéma liposomů je zobrazeno na obr. 4. Vlastnosti liposomů závisejí na struktuře lipidů, velikosti, povrchovém náboji a způsobu přípravy. Liposomy se vyskytují

volně v přírodě, ale lze je také uměle připravit v laboratoři. Nejčastěji se využívá neutrální fosfatidylcholin, nebo záporně nabitá kyselina fosfatidová, fosfatidylglycerol, fosfatidylserin nebo fosfatidyletanolamin. Fosfolipidy obecně mají polární a nepolární část. V případě dostatečné koncentrace se fosfolipidy začnou shlukovat nepolárními částmi k sobě, čímž utvoří fosfolipidovou dvojvrstvu. Dojde-li k překročení kritické liposomální koncentrace, začínají tvořit uzavřené struktury s izolovanou dutinou uvnitř. Tato dutina většinou obsahuje část vodného roztoku, ve kterém byly liposomy zformovány. Polární části fosfolipidu směřují jak do vnitřní dutiny, tak do vnějšího prostředí. [22–25]



Obrázek 4 – Schéma liposomů [3]

Velikost liposomů se může lišit od velmi malých (0,025 μm) až po velké (2,5 μm). Na základě jejich velikosti a počtu dvojvrstev je lze řadit do dvou kategorií: unilamelární a multilamelární liposomy. Unilamelární liposomy (*unilamellar vesicles*, ULV) obsahují jednu fosfolipidovou dvojvrstvu s dutinou obsahující vodný roztok a dále se dělí na malé, velké a obří. Multilamelární liposomy (*multilamellar vesicles*, MLV) mívají strukturu vrstev připomínající cibuli. Obvykle se stává, že se několik unilamelárních jednotek liposomů odpojí a uvnitř dutiny vytvoří další unilamelární liposom o menší velikosti. Vzniká tak multilamelární liposom, kde jsou jednotlivé fosfolipidové dvojvrstvy od sebe oddělené vrstvami vody. Podobně může vzniknout multivesikulární liposom. Velikost a struktura jednotlivých druhů liposomů jsou znázorněné na obr. 5. [22,25]



Obrázek 5 – Velikost a struktura jednotlivých druhů liposomů [25]

2.3.1 Příprava liposomů

Pro přípravu liposomů existuje několik metod v závislosti na tom, je-li účelem připravit unilamelární či multilamelární liposomy. Pro přípravu MLV se používá tvorby suchého filmu lipidů, který je následně hydratován vodným roztokem s rozpuštěnou látkou, která má být uzavřena do dutin liposomů. Takový způsob přípravy je vysoce efektivní při uzavírání látek do dutin MLV. Nevýhodou jsou pak velké rozdíly ve velikosti liposomů. MLV lze potom transformovat několika mechanickými technikami na unilamelární liposomy, nevýhodou ovšem může být degradace vzorku a vznik reziduí lipidů o různých velikostech. Jedna z těchto technik je tzv. technika vytlačování (*extrusion*), která poskytuje ULV o definované velikosti. MLV jsou v tomto případě tlakem nuceny projít přes pórovitý membránový filtr, např. přes polykarbonátovou membránu o postupně se zmenšující velikostí pórů (např. 200, 100, 50 nm). MLV jsou obvykle protlačeny přes tuto membránu 5–10x do doby, než je dosaženo požadované velikosti. Pro zmenšení velikostí liposomů se také používá metoda sonifikace. V této metodě se po krátkou dobu při kontrolované teplotě liposomy ošetřují sonifikovací sondou s titanovým hrotem. Následně se liposomy filtrují přes 0,45 µm membránový filtr, aby došlo k oddělení částic titanu, uvolněných během sonifikace, od liposomů. [25]

K tvorbě ULV se používají metody hydratace/dehydratace, které jsou založeny na nabobtnání lipidových filmů po vystavení vodnému prostředí. Díky přítomnosti

tlumivého roztoku v dehydratovaném filmu dochází k působení osmotického tlaku na vodu, která přechází mezi jednotlivé dvojvrstvy lipidu. Tím se od sebe separují lamely, aby utvořily liposom. Tímto způsobem vznikají obří unilamelární liposomy, ale také MLV. Metoda k přípravě výhradně obřích unilamelárních liposomů prozatím není dostupná, za využití metody elektroformace ale vzniká mnoho ULV. Elektroformace je řešení pro směsi lipidů, které se ne příliš snadno formují na liposomy. Během procesu nabobtnávání lipidového filmu vodným médiem se aplikuje pole střídavého napětí. Toto pole by mělo narušovat lipidové dvojvrstvy, a tudíž vyvolat oddělení lamel a tvorbu liposomů. Tento proces ovlivňuje tloušťka lipidového filmu, doba působení a velikost napětí. [25]

U připravených liposomů se posuzují jejich vlastnosti. K posouzení průměru, polydisperzity a distribuce velikostí liposomů se používá kryogenní transmisní elektronový mikroskop. K určení velikosti liposomů se taktéž efektivně používá gelová vylučovací chromatografie, kde jsou běžné kolony schopné odseparovat liposomy o velikostech 30–300 nm. Lamelarita liposomů se určuje elektronovým mikroskopem nebo nukleární magnetickou rezonancí. Schopnost uzavírání molekul do dutiny se měří hydrofilním markerem, např. radioaktivním cukrem nebo fluorescenčním barvivem. [25]

2.3.2 Využití liposomů

Jak již bylo zmíněno, během tvorby liposomů dochází k tvorbě izolovaných dutin. Díky tomu se zejména multilamelární liposomy začaly široce používat jako přenašeče různých molekul v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Jsou schopné přenášet např. antibiotika, antivirotika, léky proti rakovině, hormony i enzymy. Liposomy jsou biokompatibilní, biologicky rozložitelné a málo toxické, což z nich činí ideální přenašeče. Jsou rezistentní vůči enzymům v ústech a žaludku, trávicím šťávám, střevní mikroflóře a také volným radikálům. Fosfolipidy jsou ve vodě hydrofobní i hydrofilní zároveň, což znamená, že je možné díky nim přenášet molekuly obou druhů. Hydrofilní látky se přenášejí uvnitř dutiny, hydrofobní látky uvnitř fosfolipidové dvojvrstvy. Hlavní význam těchto přenašečů spočívá v doručení aktivní léčivé látky na místo určení (např. místo rakovinného bujení či místo zánětu). K uvolnění látky uvnitř dutiny liposomu by tedy mělo dojít až na místě určení. [22,25]

Na druhou stranu unilamelární liposomy se často používají jako modelové membrány, které slouží ke studiu interakcí mezi buněčnými membránami a biologicky

důležitými látkami (např. léčivé látky). Liposomy byly vybrány na základě jejich podobných vlastností se skutečnými biologickými membránami. Toto použití je ale možné využít pouze pro látky, které jsou schopny přes membrány projít pasivní difúzí. [24,25]

2.4 Metody pro stanovení rozdělovacího koeficientu v systému liposom – voda

Stejně jako u metod stanovení hodnoty K v systému oktanol – voda, i v systému liposom – voda existují pro stanovení K metody přímé a nepřímé. Mezi přímé se řadí např. potenciometrie a rovnovážná dialýza, mezi nepřímé pak chromatografické metody. Prozatím není známa žádná výpočetní metoda, která by byla schopna odhadnout rozdělovací koeficient v systému liposom – voda. [3]

2.4.1 Potenciometrie

Potenciometrie je považována za univerzální metodu hlavně v případě určení rozdělovacího koeficientu nabitých látek. Za pomoci této metody lze u studované látky určit také její hodnotu pK_a. Tato metoda umožňuje měření rozsahu log K = -0,5 až 4. Jak již bylo zmíněno, nejprve se tato metoda používala pro stanovení K v systému oktanol – voda. Následně došlo k upravení metody pro možnost stanovení K také v systému liposom – voda. Důvodem bylo odlišné chování nabitých látek v oktanolu a v liposomech, kdy nabité látky lépe prostupují do fosfolipidové membrány než do roztoku oktanolu. V případě, kdy by měl oktanol nahrazovat biologickou membránu, nebyl by oktanol pro tento popis věrohodný. [3,17,26]

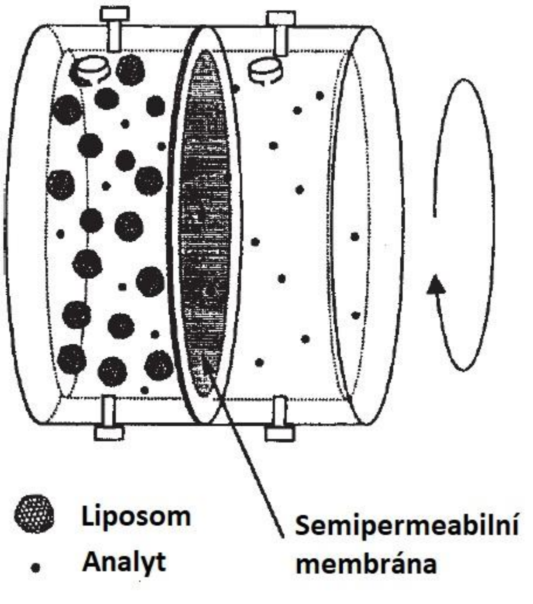
Přítomnost oktanolu či liposomu ovlivňuje chování látky během titrace, díky čemuž lze určit K v těchto systémech. Studovaná látka se nejprve titruje ve vodném prostředí standardizovanou kyselinou či bází, aby se zjistila její hodnota pK_a. Následně se několikrát provede titrace ve dvojfázovém systému při různých fázových poměrech, tedy při různých koncentracích liposomů. Posun v hodnotách pK_a se využije k výpočtu hodnoty K jednotlivých acidobazických forem. Vynesením hodnoty pH a log K lze získat lipofilní profil studované látky. Nejnižší mezní limit pH je při hodnotě 3,5, protože při nižších hodnotách pH pak dochází k protonizaci fosfátových skupin, což může narušit průběh titrační křivky. Nejvyšší mezní limit hodnoty pH je pak při hodnotě 10,5, protože při vyšších

hodnotách dochází k hydrolýze liposomů a zvyšuje se množství volných mastných kyselin, které lze titrovat, což opět vede k narušení průběhu titrační křivky. [3,18,26]

2.4.2 Rovnovážná dialýza

Metoda rovnovážné dialýzy nalezla svůj počátek v třepací metodě, která byla původně vyvinuta pro určení K léčiv v systému liposom – voda. K separaci liposomů se pak používala centrifuga. Tato separace ovšem nebyla dokonalá a vedla také ke srážení studovaných molekul. Tento problém vyřešila rovnovážná dialýza a stala se dnes široce používanou technikou pro studování chování látek v systému liposom – voda. [3,18]

V samotném experimentu jsou vodná a liposomální fáze odděleny semipermeabilní membránou, která dovoluje procházet analytu ale nikoliv liposomům. Schéma provedení tohoto experimentu je zobrazeno na obr. 6. Na začátku experimentu je studovaná látka přítomna pouze v jedné fázi, v tomto případě ve vodné. Jakmile je dosaženo rovnováhy, analyt může být kvantifikován a spočítán K. Většinou se analyzuje pouze vodná fáze před zahájením experimentu a po dosažení rovnováhy za předpokladu, že při rovnováze je koncentrace volného analytu ve vodné fázi v obou kompartmentech stejná. K vypočtení hodnoty K se pak použije celkový objem liposomů (spočtený z koncentrace) obsažený v liposomální fázi, výchozí koncentrace analytu před ustavením rovnováhy a finální koncentrace analytu ve vodné fázi po dosažení rovnováhy. [3]

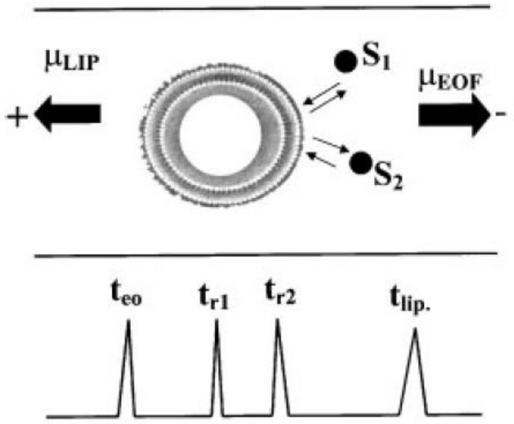


Obrázek 6 – Schéma popisující uspořádání experimentu při rovnovážné dialýze [3]

2.4.3 Liposomální elektrokinetická chromatografie

Jedním z dalších možných způsobů, jak stanovit rozdělovací koeficient studované látky v systému liposom – voda, je užití liposomální elektrokinetické chromatografie (LEKC). Tato technika je velice podobná micelární elektrokinetické chromatografii (MEKC) a umožňuje rozdělovat neutrální i nabité látky. Rozdělování analytu v této technice do liposomální části závisí na náboji, chemické struktuře a hydrofobicitě analytu. [24]

Tato technika využívá kapilární elektroforézu (CE), kde jsou liposomy součástí tlumivého roztoku. Stávají se z nich tak pseudo-stacionární fáze a poskytují rozdělovací místa pro analyty. Náboj liposomů použitých zde je záporný, proto migrují k anodě. Vzhledem k tomu, že elektroosmotický tok je silnější, jsou liposomy a analyty unášeny ke katodě, kde jsou detekovány. Schéma pro rozdělování nenabitých analytů lze vidět na obr. 7, kde μ_{LIP} a μ_{EOF} jsou mobility liposomů a elektroosmotického toku, S_1 a S_2 představují nenabité analyty, které se rozdělují. t_{eo}, t_{r1}, t_{r2} a $t_{lip.}$ jsou migrační časy nezadrženého markeru (např. methanol), dvou analytů a liposomálního markeru (např. dodekafenon). Rozdělovací koeficient je pak spočítán na základě těchto migračních časů. [27]



Obrázek 7 – Schéma LEKC metody u nenabitých látek [27]

2.4.4 Jiné metody

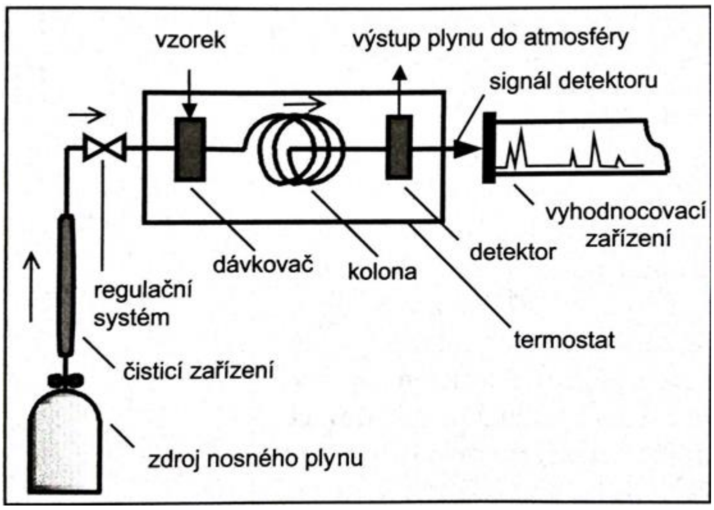
Další metodou, jak stanovit hodnotu K v systému liposom – voda, je spektrofotometrické stanovení. Tato metoda ovšem vyžaduje důkladnou separaci vodné fáze od lipidové např. centrifugací nebo filtrací, protože lipidy způsobují vysoké signály v pozadí. Ovšem za použití derivační spektrofotometrie, jak píše Rodrigues C. a kolegové, není třeba obě fáze separovat a dojde k eliminaci rušivého efektu lipidů při použití druhé derivace. Rozdělovací

koeficienty se následně spočítají ze změn absorbance léčivé látky, které jsou způsobeny navázáním látky na liposom. [28]

Jinou metodou je určení K za pomoci mikroextrakce pevnou fází. Obecně se k rozpuštěné studované látce přidají liposomy a nechá se ustavit rovnováha. Následně se vzorek extrahuje pomocí mikroextrakce tuhou fází. Jako pevná fáze se zde používá vlákno potažené polymerem. Po dokončení extrakce se uvolní studovaná látka, která se nezachytila v liposomech, a dále se analyzuje např. HPLC nebo GC. Výhodami této metody jsou použití malého objemu analytu, rychlost a jednoduchost. [29]

2.5 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (*Gas Chromatography*, GC) se řadí mezi separační techniky. K rozdělování složek vzorku zde dochází na základě různých interakcí látek se stacionární fází v koloně. Schéma plynového chromatografu je zobrazeno na obr. 8. Mobilní fází je zde nosný plyn, u kterého je podmínka, aby byl inertní. Používá se vodík, dusík, helium nebo argon. Nosný plyn unáší analyt do kolony, v případě GC se používají kolony náplňové nebo kapilární. Náplňové kolony jsou plněné sorbentem nebo kapalnou stacionární fází na nosiči a oproti kapilárním kolonám mají větší kapacitu. Vnitřní průměr těchto kolon je 2-3 mm a délka 1-3 m. U kapilárních kolon se využívá jejich vnitřních stěn pro zakotvení stacionární fáze. Tyto kolony mají průměr 0,1-0,6 mm a bývají dlouhé průměrně 30 m. Jako detektor se používá např. tepelně vodivostní detektor, který detekuje průchod analytů na základě ochlazení vlákna žhaveného elektrickým proudem. Dalším možným detektorem je plamenově ionizační detektor, kde se analyty ionizují v kyslíkovodíkovém plameni a měří se změna elektrického proudu. Jiným detektorem používaným u GC je hmotnostní spektrometr. Hmotnostní spektrometrie je další separační technika, která rozděluje ionizací vzniklé ionty podle jejich podílu hmotnosti ku náboji (m/z). Výhodou použití hmotnostního spektrometru jako detektoru je možnost identifikace látek. [6,7]



Obrázek 8 – Schéma plynového chromatografu [6]

V případě plynové chromatografie je možné analyzovat pouze látky, které mají relativní molekulovou hmotnost menší než 1 000, jsou termálně stálé a lze je snadno převést do plynného skupenství. V tomto tkví hlavní rozdíl oproti HPLC, která je naopak vhodnější pro analýzu netěkavých látek. Látky, které nejsou dostatečně těkavé, lze určitým způsobem před analýzou upravit. Těmto úpravám se říká derivatizace a mohou vést např. ke zvýšení těkavosti nebo také ke zlepšení detekce. [6,7]

2.5.1 Stanovení rozdělovacího koeficientu pomocí GC

Při stanovení rozdělovacího koeficientu v systému oktanol – voda nebo liposom – voda slouží plynová chromatografie převážně v závěru experimentu k měření koncentrací analytu v roztoku obou fází. Tyto roztoky bývá nutné před samotnou analýzou ještě upravit. Například v práci Gobase a kolegů [10], kde studovali halogenované uhlovodíky, byl použit pro stanovení hodnoty K dvoufázový systém. Na jedné straně byla fáze liposomů a na druhé straně fáze n-hexanu s rozpuštěnou studovanou látkou. Dvojfázový systém byl pomalu míchán za stálé teploty a po 3–5 dnech, kdy došlo k ustavení rovnováhy, byly odebrány vzorky z obou fází. Vzorky odebrané z fáze n-hexanu byly pouze zředěny a ihned analyzovány, vzorky odebrané z liposomální fáze byly 2x extrahovány do n-hexanu a zakoncentrovány na rotační odparce při 30 °C. Vzorky byly analyzovány plynovou chromatografií s detektorem elektronového záchytu. [10]

Plynová chromatografie kromě toho umožňuje také stanovení rozdělovacího koeficientu těkavých látek v systému voda – plyn. Tento druh rozdělovacího koeficientu pak

popisuje distribuci těkavých složek mezi fázemi kapalnou a plynnou. Při jeho stanovení se analyzuje plynná fáze metodou headspace. Pro stanovení hodnoty K těkavých látek v systému liposom – voda představili Skopalová, J., Barták, P. a kolegové kombinovanou metodu headspace – mikroextrakce tuhou fází – plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Do připravených roztoků asolektinových liposomů bylo přidáno známé množství těkavé složky (eugenolu) a po ustavení rovnováhy byl odebrán alikvótní podíl. Ten byl vložen do skleněné vialky určené pro headspace analýzu se silikonovým septem. Dále proběhla headspace mikroextrakce extrakčním vláknem a analýza plynovou chromatografií. Vzhledem k předpokladu, že liposomy a látky v nich uzavřené jsou netěkavé, nedocházelo tudíž během ustavení rovnováhy k jejich uvolňování do plynné fáze a probíhala tak analýza pouze volné těkavé složky, která nebyla zachycena v liposomech. Při ustavení rovnováhy volné těkavé složky mezi kapalnou a plynnou fází lze předpokládat, že stanovená koncentrace této složky v plynné fázi bude přímo úměrná koncentraci volné látky v kapalné fázi. Rozdíl původní a stanovené koncentrace dává informaci, kolik látky bylo uzavřeno do dutin liposomů. V tomto experimentu byla také určena hodnota kritické liposomální koncentrace asolektinu na 1,097 g/l. Při koncentraci asolektinu 4, 6 a 8 g/l byly získány pro eugenol hodnoty K = 300, 297 a 305 (pro všechny tři je po zaokrouhlení log K = 2,48). Tyto hodnoty indikují, že za využití koncentrace asolektinu přesahující jeho kritickou liposomální koncentraci jsou hodnoty rozdělovacího koeficientu eugenolu téměř totožné. [30,31]

Další novou metodu pro stanovení rozdělovacího koeficientu těkavých látek v systému liposom – voda za využití GC/MS představili taktéž Barták, P., Skopalová, J. a kolegové. S využitím rozdělovací aparatury a nylonové membrány k oddělení liposomální a vodné fáze se po ustavení rovnováhy analyzovala vodná fáze, kde se určila koncentrace volné těkavé látky za pomoci GC/MS. Ke studiu byla opět použita látka s nízkou molekulovou hmotností eugenol a asolektinové liposomy. Kritická liposomální koncentrace asolektinu byla v této studii stanovena na hodnotu 1,24 g/l. Metodou modifikované rovnovážné dialýzy byl rozdělovací koeficient eugenolu v systému liposom – voda určen na průměrnou hodnotu 284 (log K = 2,45). [32]

Na základě těchto studií je založená experimentální část této diplomové práce, která stanovení rozdělovacího koeficientu pro eugenol rozvíjí a aplikuje pro další látky. Pro zhotovení experimentu bylo využito rozdělovací aparatury a koncentrace studovaných

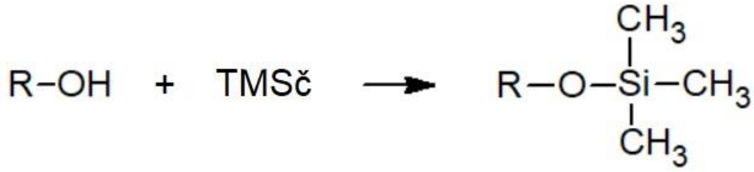
látek v roztocích byly analyzovány GC/MS, v případě kolegů také HPLC na reverzních fázích [4] a voltametrickými metodami [5].

2.6 Vybrané látky k analýze

Pro určení rozdělovacího koeficientu byly vybrány fenolické sloučeniny nacházející se v esenciálních olejích různých rostlin. Tyto rostliny se používají jako koření, a přítomnost vybraných fenolů v těchto rostlinách a koření lze poznat díky jejich charakteristické vůni. [33]

S kořením jsou spojené mimo jiné také zdravotní benefity, které poskytují, např. antioxidační a antibakteriální vlastnosti. Tyto benefity poskytují převážně fenolické sloučeniny přítomné v silicích koření. Je to právě fenolická struktura, která je zodpovědná za tyto kladné vlastnosti v lidském organismu. Oproti jiným látkám, které se vyskytují v esenciálních olejích (např. terpeny), jsou tak mnohem farmaceuticky aktivnější a cennější. Nevýhodou využití následujících látek může být ovšem silný senzorický vjem čichový i chuťový, případně i toxicita ve vyšších dávkách. [33,34]

Fenoly obecně jsou dobře separovány a detekovány pomocí plynové chromatografie. Pro jejich stanovení existuje mnoho metod analýzy. Fenoly lze analyzovat přímo, ale obvykle se doporučuje je vhodně derivatizovat. Hydroxylové skupiny, které jsou součástí fenolů, poskytují snadné reakční centrum pro převedení fenolů na méně polární látky. Ve výsledku to umožňuje použití širšího spektra kolon pro analýzu a také se metoda stává robustnější, tudíž ji lze snadno aplikovat i na jiné podobné látky. Jednou z možných derivatizací hydroxy skupiny je silanizace, kde z původních látek vznikají trimethylsilyl ethery. Obecné schéma této reakce je na obr. 9. Tato metoda derivatizace má velice široké použití v praxi, protože převod mnoha fenolických látek bývá snadný a téměř kvantitativní. Trimethylsilyl deriváty jsou také relativně stabilní při pokojové teplotě pouze pokud v roztoku není přítomná voda, pak dochází k jejich rychlému rozkladu. Díky těmto vlastnostem se z této metody stává snadný způsob, jak analyzovat široké spektrum látek za různých podmínek. [7,35]

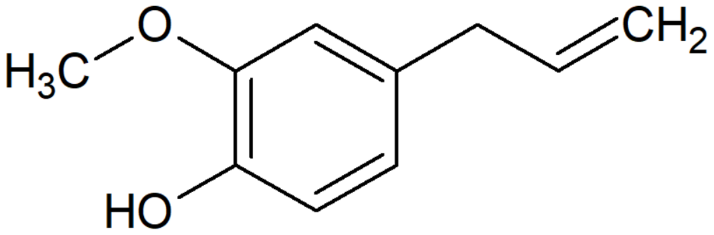


Obrázek 9 – Schéma silanizační reakce (TMSč je silanizační činidlo) [7]

Hodnoty rozdělovacího koeficientu u zvolených fenolických látek (eugenol, thymol a karvakrol) se podle dostupné literatury pohybují kolem hodnot log K = 2–3. Jedná se o hodnoty, které lze poměrně snadno získat základní třepací metodou, ale také mnoha dalšími. Tato a výše zmíněné vlastnosti fenolů činí ze zvolených látek vhodné kandidáty pro testování nových metod. [36]

2.6.1 Eugenol

Eugenol (jinak také kyselina hřebíčková, struktura na obr. 10) je organická látka, která je nejvíce zastoupena v esenciálním oleji v hřebíčku (*eugenia caryophyllata*) – hřebíčkovém oleji. Je to silně aromatická látka zodpovědná za vůni koření hřebíčku. Řadí se mezi fenylpropanoidy. [33,37]



Obrázek 10 – Struktura eugenolu

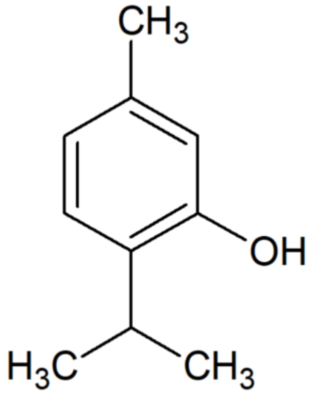
Tradiční použití hřebíčkového oleje spočívá v zubním lékařství jako antiseptikum a analgetikum. Celý hřebíček či olej se používal k úlevě od bolestí zubů. Eugenol se také stal součástí směsi materiálu s oxidem zinečnatým, který se dnes často používá v klinické stomatologii např. jako dočasná výplň. Jakmile se tato směs aplikuje do dentální kavity, malá množství eugenolu difundují přes dentin až do zubní dřeně. Zde působí anti-zánětlivě, tudíž brání procházení bakterií, a také působí jako lokální anestetikum. Pokud by se eugenol aplikoval přímo, došlo by k velkému poškození tkáně, protože je cytotoxický. Proto se aplikuje ve směsi, kde se pak uvolňuje malé množství, které je bezpečné. [38,39]

Eugenol má také antibakteriální vlastnosti, které byly testovány např. proti bakteriím *Salmonella enteritidis, Escherichia coli* nebo *Staphylococcus aureus*. Již 1-2% hřebíčkový olej dokáže potlačit růst bakterií. Mimo to má eugenol také mírný antivirový účinek, antimykotický účinek, vysokou antioxidační aktivitu a dokáže na sebe vázat kovové prvky v organismu. [33,37]

Rozdělovací koeficient eugenolu v systému oktanol – voda byl stanoven v publikaci Jamese Sangstera na hodnotu 2,27 [40]. V jiných studiích byla metodou HPLC na reverzních fázích určena hodnota 2,49 [41] a metodou třepání / extrakce hodnota 2,99 [36]. V publikaci G. N. Reiner a kolegů byl stanoven rozdělovací koeficient eugenolu v systému oktanol – voda na hodnotu 2,30, v systému lecitinový liposom – pufr na hodnotu 2,20 [42].

2.6.2 Thymol

Thymol (struktura na obr. 11) je fenolický monoterpenoid, který se vyskytuje ve velkém množství v esenciálních olejích v bylinách tymián obecný (jinak také mateřídouška obecná, *thymus vulgaris*) nebo dobromysl obecná (*origanum vulgare*). Je to silně aromatická látka zodpovědná za vůni koření tymiánu. [43,44]



Obrázek 11 – Struktura thymolu

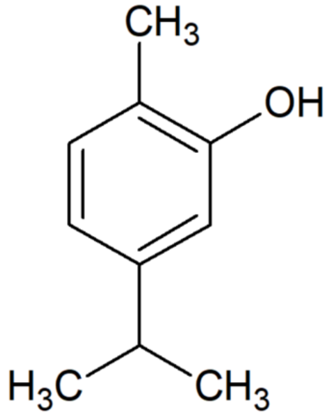
Thymol se používá v malých koncentracích, protože jinak je podobně jako eugenol cytotoxický. Thymol a jeho zdroje se používají pro jejich antioxidační, anti-zánětlivé, antibakteriální i antiseptické účinky, také má příznivý vliv na kardiovaskulární systém. V případě jeho antibakteriální aktivity se projevily inhibiční účinky proti bakteriím *Salmonella typhimurium, Escherichia coli* či *Listeria innocua*. V jedné studii byla porovnávána antibakteriální aktivita thymolu, eugenolu, karvakrolu, kyseliny trans-

skořicové a diacetylu vůči bakteriím *Escherichia coli* a *Salmonella typhimurium*. Thymol byl z těchto látek nejefektivnější s nejnižšími hodnotami minimální inhibiční koncentrace. [43,44]

Rozdělovací koeficient thymolu v systému oktanol – voda byl určen v publikaci Griffina a kolegů na hodnotu 3,30 [36] metodou třepání. V publikaci G. N. Reiner a kolegů byl stanoven rozdělovací koeficient thymolu v systému oktanol – voda na hodnotu 3,21, v systému lecitinový liposom – pufr na hodnotu 2,90 [42].

2.6.3 Karvakrol

Karvakrol (struktura na obr. 12) je fenolický monoterpenoid, který se stejně jako thymol vyskytuje v esenciálních olejích v bylinách dobromysl obecná, tymián obecný a dalších. Je to silně aromatická látka zodpovědná za vůni koření dobromysli obecné (jinak také oregano). Je to polohový izomer thymolu. [45]



Obrázek 12 – Struktura karvakrolu

Karvakrol má vysoký inhibiční účinek vůči Gram pozitivním i Gram negativním bakteriím kromě *Pseudomonas aeruginosa*. Pro testování antimikrobiální aktivity karvakrolu se použil potravinový patogen *Bacillus cereus*, který se řadí do Gram pozitivních bakterií. Vegetativní buňky tohoto patogenu mohou být snadno zabity zahřáním, ale spory mohou přežít a intoxikovat potraviny. Karvakrol už při nízkých koncentrací inhibuje růst i produkci toxinů této bakterie. Ve studii, kde se porovnávaly antibakteriální účinky karvakrolu, eugenolu, mentholu a dvou syntetizovaných derivátů karvakrolu vůči *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* nebo *Lactobacillus plantarum* měl karvakrol, jakožto látka s nejvyšší hydrofobicitou, nejsilnější antibakteriální účinek. Dva jeho deriváty,

methylether karvakrolu a acetát karvakrolu, byli vůči bakteriím málo efektivní. To potvrzuje antibakteriální vlastnosti fenolové struktury. Karvakrol má také mimo jiné i antimykotické účinky, je efektivní např. proti *Aspergillus flavus, Penicillium rubrum* nebo *Trichoderma viride*. [45,46]

Rozdělovací koeficient karvakrolu v systému oktanol – voda byl určen v publikaci Griffina a kolegů na hodnotu 3,49 [36] metodou HPLC na reverzních fázích a v publikaci Ultee a kolegů na hodnotu 3,64 [46] metodou třepání. V publikaci G. N. Reiner a kolegů byl stanoven rozdělovací koeficient karvakrolu v systému oktanol – voda na hodnotu 3,14, v systému lecitinový liposom – pufr na hodnotu 2,76 [42].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie a materiály

Chemikálie:

Pro přípravu liposomů byla použita směs fosfolipidů získaná ze sojových bobů asolektin s obsahem fosfatidylcholinu asi 25 % (Fluka, Buchs, Švýcarsko). Pro studium byly použity látky eugenol a karvakrol (obě Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) a thymol (Merck, Darmstadt, Německo).

Další použité chemikálie byly redestilovaná voda (Millipore, 18,2 MΩ), hydroxid sodný (Lach-ner, Neratovice, Česká republika), kyselina chlorovodíková 35 % p. a. (Penta, Praha, Česká republika), aceton p. a. (Penta, Praha, Česká republika), tetrachlormethan (Lachema, Brno, Česká republika), pyridin p. a. (Penta, Praha, Česká republika) a hexamethyldisilazan (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo).

Materiály:

Epoxidové lepidlo Ceys 350 kg/cm^2

Membrány:

Celulosová dialyzační membrána Nominal MWCO 3,500 (Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) s tloušťkou stěny 25 μm a propustností pórů pro látky do 3 500 Da

Nylonová membrána (Hahnemühle, Dassel, Německo) s průměrem pórů 0,2 μm

Polykarbonátová (PC) membrána Nuclepore Track-Etch filtrační membrána (Whatman, Maidstone, Velká Británie) s velikostí pórů 0,05 μm

3.2 Přístroje a software

Přístroje:

Plynový chromatograf Agilent 6890 Series GC System s hmotnostním detektorem Agilent 5973 Network Mass Selective Detector (Palo Alto, Kalifornie, USA)

Centrifuga Eppendorf 5702 (Eppendorf, Hamburk, Německo)

Blokový termostat – Block Heater Stuart SBH130 (Stuart, Staffordshire, Velká Británie)

Váhy Kern ALS 220-4 (Kern&Sohn, Balingen, Německo)

Třepačka Vibramax 100 (Heidolph, Schwabach, Německo)

Software:

Enhanced ChemStation: MSD ChemStation a Enhanced Data Analysis (Agilent Technologies, Incs., Kalifornie, USA)

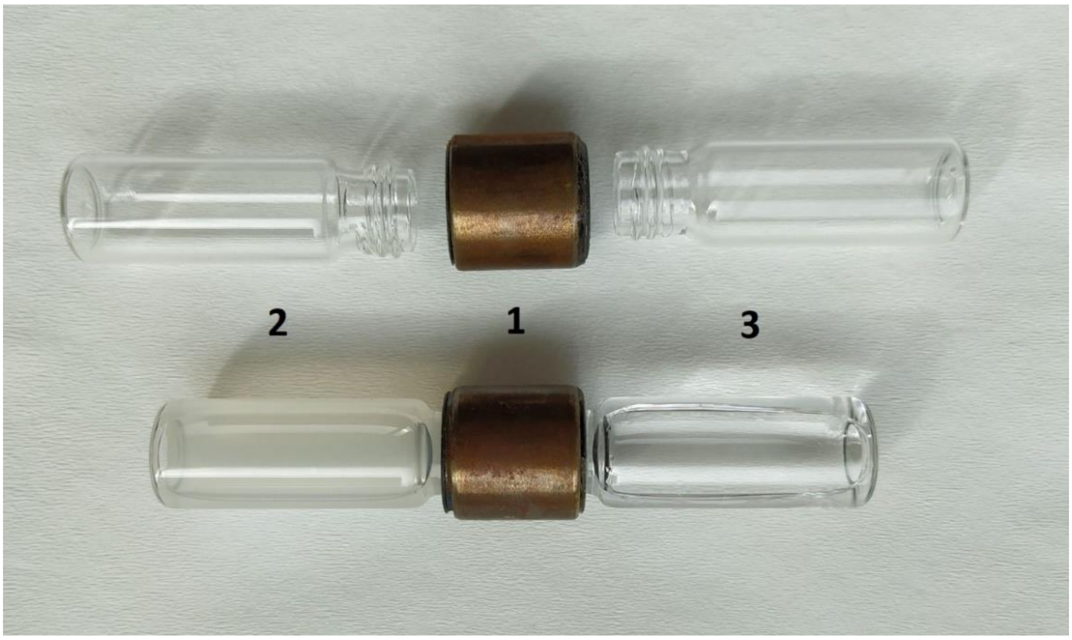
Microsoft Excel (Microsoft, Washington, USA)

3.3 Příprava experimentu

Liposomy byly připraveny rozpuštěním potřebného množství asolektinu v malém množství redestilované vody. Poté byl roztok třepán minimálně 12 hodin na třepačce a následně byl roztok doplněn vodou na požadovaný objem, aby jeho finální koncentrace byla 8 g/l.

Studované látky byly rozpuštěny v redestilované vodě tak, aby výsledná koncentrace připraveného roztoku byla 500 µg/ml.

K určení rozdělovacího koeficientu sloužila rozdělovací aparatura zobrazená na obr. 13. Dvě plastová víčka od 4 ml vialek s otvorem pro septum byla slepena epoxidovým lepidlem a vlepena do kovového pouzdra (obr. 13, část 1). Po vytvrzení lepidla byla do jednoho z víček vložena požadovaná membrána vykrojená korkovrtem do tvaru kruhového výřezu o průměru 10 mm. Následně byly z obou stran přišroubovány vialky s 3,2 ml vody (vodná fáze) nebo 3,2 ml roztoku asolektinu se studovanou látkou (2,8 ml asolektin + 0,4 ml látka ve vodě NEBO v případě slepého pokusu 2,8 ml vody a 0,4 ml látky ve vodě). Zašroubováním vialek došlo k upevnění vložené membrány. Rozdělovací aparatury byly vloženy na třepačku a třepány rychlostí 150 rpm po požadovanou dobu. Po skončení experimentu byly vialky od sebe odděleny a analyzovány. K analýze byly použity obě fáze slepého pokusu a pouze vodná fáze pokusu s asolektinem.



Obrázek 13 – Rozdělaná (vrchní) a sestavená (spodní) rozdělovací aparatura

V kovovém pouzdře (část 1) se nacházejí k sobě slepená víčka s otvorem uprostřed, do které je z jedné strany vložena požadovaná membrána. Ve vialce (část 2) je roztok asolektinu se zkoumaným vzorkem a v další vialce (část 3) je redestilovaná voda.

3.4 Úprava vzorku před analýzou

3.4.1 Eugenol

Pro analýzu na plynovém chromatografu bylo nutné vzorky nejdříve extrahovat z vodné fáze do tetrachlormethanu, a pak provést derivatizaci – silanizaci. Pro rychlou a účinnou izolaci analytů byla využita disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina. Z vialky byly po ukončení experimentu odebrány 2 ml vodné fáze do plastové zkumavky, automatickou pipetou bylo rychle přidáno 750 µl extrakční směsi acetonu a tetrachlormethanu v poměru 4:1 (v/v) tak, aby došlo k vytvoření drobných kapiček (zákalu) tetrachlormethanu. Zkumavka byla 10 minut ručně třepána a 5 minut centrifugována při 4400 ot/min. Z tetrachlormethanové (dolní) fáze bylo odebráno 100 µl do vialky určené pro plynovou chromatografii. K extraktu bylo přidáno 200 µl pyridinu a 200 µl silanizačního činidla – hexamethyldisilazanu. Vialka byla uzavřena a inkubována 30 minut při 80°C. Po skončení inkubace byl případný přetlak, způsobený vedlejším produktem reakce amoniakem, uvolněn propíchnutím septa injekční jehlou, a ihned poté proběhla analýza vzorku v plynovém chromatografu.

3.4.2 Thymol a karvakrol

Při úpravě vzorků těchto dvou látek se postupovalo stejně jako při úpravě vzorku eugenolu, jak je popsáno výše. Rozdíl tkví pouze v teplotě a v době působení silanizačních činidel. Thymol a karvakrol byly ponechány v blokovém termostatu při 90 °C po dobu 60 minut. Poté byl odpuštěn vedlejší produkt reakce amoniak a proběhl nástřik vzorku do plynového chromatografu.

3.4.3 Asolektin

V případě analýzy asolektinu bylo třeba provést hydrolýzu, aby bylo možné identifikovat a stanovit mastné kyseliny, ze kterých je asolektin složen. Ke 2 ml roztoku bylo přidáno 0,5 ml 2M-KOH ve vodě a ponechalo se v blokovém termostatu při 70 °C po dobu 30 minut. Následně se k roztoku přidal 1 ml 2M-HCl pro neutralizaci. Dále se pokračovalo disperzní mikroextrakcí a silanizací, jak je popsáno v podkapitole 3.4.1 Eugenol.

3.5 Analýza GC/MS

Plynová chromatografie:

Dávkovaný objem: 1 μl

Teplota nástřikového prostoru: 280 °C

Dávkovací puls: 140 kPa po dobu 12 s

Nosný plyn: helium, 0,9 ml/min

Teplotní program: 50 °C – 2 min – 10 °C/min – 300 °C – 15 min

Kolona: HP-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) Agilent, Palo Alto, Kalifornie, USA

Hmotnostní spektrometrie:

Energie elektronu: 70 eV

Detekce metodou single-ion monitoring (SIM) pro ionty:

Eugenol: 236, 206 m/z

Mastné kyseliny (hydrolyzovaný asolektin): 337, 339 m/z

Thymol a karvakrol: 222, 207, 150, 135 m/z

3.6 Výpočet rozdělovacího koeficientu

Rozdělovací koeficient pro studované látky byl spočítán následujícím způsobem:

Výpočet ztrát látky v membráně byl proveden podle rovnice 8:

$$m_{zt.} = m_{celk.} - 3{,}2 \cdot (c_{s.p.} + c_{s.v.})\,, \tag{8}$$

kde $m_{zt.}$ = ztráty látky v membráně v µg, $m_{celk.}$ = celkově množství látky v µg, číslo 3,2 je celkový objem v ml, $c_{s.p.}$ = koncentrace látky ve slepém pokusu ve fázi, kam byla původně přidána v µg/ml a $c_{s.v.}$ = koncentrace látky ve slepém pokusu ve vodné fázi, kam látka difundovala v µg/ml.

Naměřená koncentrace látky ve vodné fázi v reálném pokusu proti asolektinu odpovídá při dosažení rovnováhy koncentraci volné látky v asolektinovém roztoku. Celkový objem obou kompartmentů byl stejný, pokud si tedy odpovídají koncentrace volné látky v obou kompartmentech, znamená to, že je v obou kompartmentech také stejné množství této látky. Vynásobíme-li naměřenou koncentraci látky (v µg/ml) 3,2 (celkový objem v ml), získáme množství této volné látky v daném kompartmentu ($m_{vl.v.}$ ve vodné fázi nebo $m_{vl.a.}$ v roztoku s asolektinem) v µg.

Množství látky ($m_{l.lip.}$) zachycené v liposomech se spočítalo podle rovnice 9:

$$m_{l.lip.} = m_{celk.} - m_{zt.} - m_{vl.v.} - m_{vl.a.} \tag{9}$$

Objem liposomů ($V_{lip.}$) v 3,2 ml roztoku se spočítal podle rovnice 10:

$$V_{lip.} = \frac{c_{asol.} \cdot 3{,}2}{1028}\,, \tag{10}$$

kde $c_{asol.}$ = koncentrace asolektinu v g/l a číslo 1028 je hustota asolektinových liposomů v g/l. [47]

Koncentrace látky ($c_{l.lip.}$) v liposomech se spočítala podle rovnice 11:

$$c_{l.lip.} = \frac{m_{l.lip.}}{V_{lip.}} \tag{11}$$

Rozdělovací koeficient (K) se spočítal podle rovnice 12:

$$K = \frac{c_{l.lip.}}{c_{vl.a.}}, \tag{12}$$

kde $c_{l.a.}$ je koncentrace volné látky v asolektinové fázi (μg/ml).

Logaritmus rozdělovacího koeficientu (log K) se spočítal podle rovnice 13:

$$\log K = \log \frac{c_{l.lip.}}{c_{vl.a.}} \tag{13}$$

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Ke stanovení rozdělovacího koeficientu studovaných látek v systému liposom – voda bylo nejdříve nutné optimalizovat podmínky metody, čemuž se věnuje podkapitola 4.1 Optimalizace metody. Nejprve bylo třeba zvolit vhodnou semipermeabilní membránu, která bude oddělovat liposomální a vodnou fázi v rozdělovací aparatuře. Podmínkou bylo, aby přes tuto membránu procházela pouze studovaná látka a nikoliv liposomy. Aby bylo možné rozhodnout, která membrána tuto podmínku splňuje, bylo třeba vhodným způsobem stanovit asolektin za pomoci GC/MS, který přímo touto metodou analyzovat nelze. Tomuto tématu se věnují podkapitoly 4.1.1 Stanovení asolektinu a 4.1.2 Volba vhodné membrány.

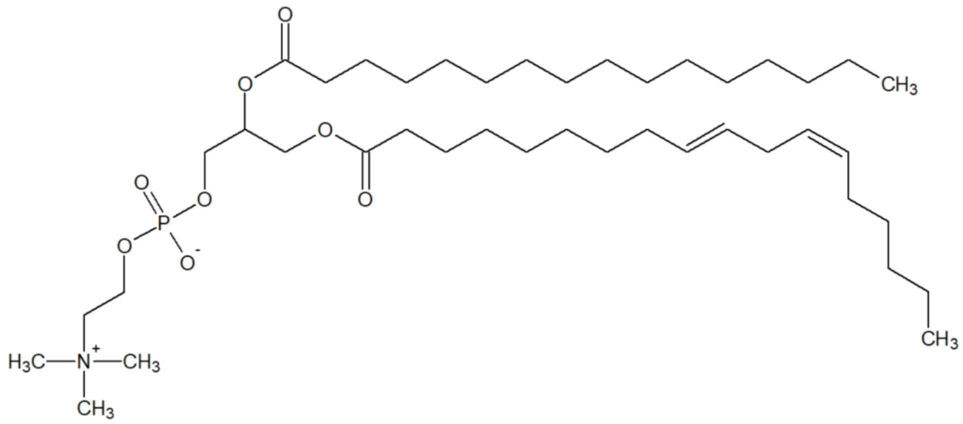
Dále bylo potřeba optimalizovat samotné stanovení rozdělovacího koeficientu studovaných látek za využití rozdělovací aparatury. Nejprve byla zkoumaná doba, po kterou je nutné nechat ustavit rovnováhu v roztocích. Studovaná látka (v tomto případě byl testován eugenol) byla vždy aplikována do roztoku s liposomy a po stanovené době byla odebrána vodná fáze a vyhodnocena její koncentrace pomocí vytvořené lineární koncentrační závislosti pro tuto látku. Rovnováha se nechala ustavovat v rozmezí 1–48 hodin. Tomuto se dále věnuje podkapitola 4.1.3 Časová závislost rozdělování eugenolu. Dalším experimentem bylo třeba zjistit, zdali je možné stanovit rozdělovací koeficient látek pro různé koncentrace látky a zdali je tato hodnota K při různých koncentracích látky konstantní. Pro tento experiment byly použity zásobní roztoky eugenolu, které měly koncentrace v rozmezí 10–500 μg/ml. Této problematice se dále věnuje podkapitola 4.1.4 Koncentrační závislost rozdělování eugenolu.

Za využití informací z optimalizace metody byly následně stanoveny hodnoty rozdělovacích koeficientů pro tři zvolené studované látky v pěti opakovaných pokusech, čemuž se věnuje podkapitola 4.2 Stanovení rozdělovacího koeficientu v systému liposom – voda. Koncentrace analytu ve vzorku se spočítaly z vytvořené lineární koncentrační závislosti. Vzorky byly analyzované za pomoci GC/MS, ale také HPLC na reverzních fázích kolegyní Veronikou Müllerovou [4] a diferenční pulzní voltametrií kolegou Radkem Jergou [5]. Získané hodnoty K se poté mezi sebou porovnaly.

4.1 Optimalizace metody

4.1.1 Stanovení asolektinu

Pro získání informace o propustnosti asolektinu přes jednotlivé zvolené membrány bylo potřeba stanovit jeho množství ve vodné fázi. Hlavní složkou asolektinu jsou mastné kyseliny obsažené ve formě fosfatidylcholinu a obě formy jsou netěkavé, tudíž je nelze přímo analyzovat GC/MS. Jedna z možných struktur fosfatidylcholinu je vyobrazená na obr. 14. Další struktury se liší v obsazení mastných kyselin, na obr. 14 jsou znázorněné kyseliny linolová a palmitová, ale může na jejich místě být taktéž např. kyselina olejová či stearová. Ke stanovení asolektinu za pomoci GC/MS bylo tedy třeba tyto látky derivatizovat takovým způsobem, aby je bylo možno stanovit. Zvolená derivatizace – hydrolýza, extrakce a převedení mastných kyselin na trimethylsilylestery – byla vybrána na základě předchozích experimentů a literatury. [48,49] Z předchozí studie Bartáka, P., Skopalové, J. a kolegů na stanovení obsahu mastných kyselin asolektinu za pomoci GC/MS [48] bylo v asolektinu detekováno mnoho mastných kyselin. Jako nejvíce zastoupená z přítomných mastných kyselin byla v této studii stanovena kyselina linolová (51,34 %). Jednou z dalších nejvíce zastoupených mastných kyselin v asolektinu byla kyselina olejová (15,48 %). Na základě těchto informací byly pro stanovení asolektinu zvoleny tyto dvě mastné kyseliny.



Obrázek 14 – Struktura možného fosfatidylcholinu (linolooyl-palmitoyl-fosfatidylcholin)

Postup provedení derivatizační reakce je popsán v podkapitole 3.4.3 Asolektin. Aby byl výtěžek reakce co největší, byly studovány optimální hodnoty teploty a času derivatizační reakce. K tomuto experimentu byla připravena sestava pěti vzorků, které obsahovaly stejnou koncentraci eugenolu a asolektinu, a k tomu slepý pokus, který obsahoval pouze vodu. U každého z pěti vzorků byla zvolena teplota a čas působení, detailní

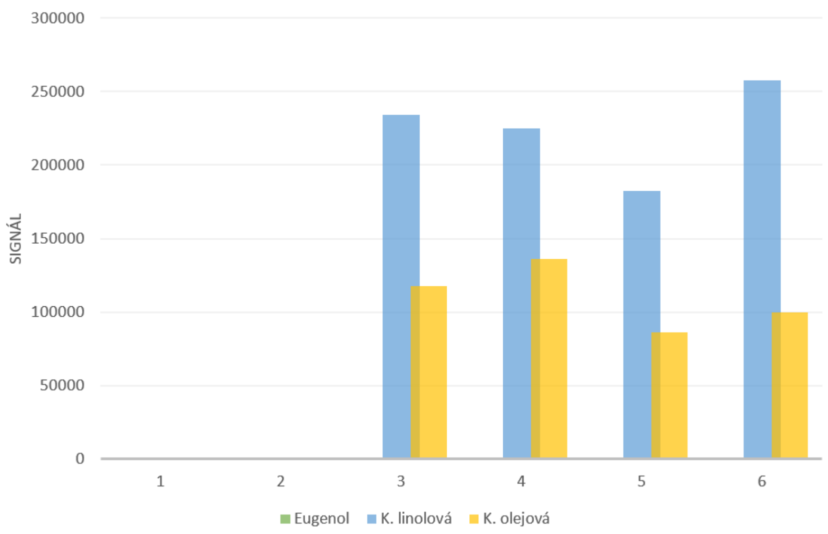
popis jednotlivých pokusů je uveden v tab. 1. Slepý pokus sloužil pro kontrolu. Všechny vzorky, u kterých je teplota působení 70 nebo 100 °C, byly vloženy již do vyhřátého termostatu na danou teplotu. U vzorku č. 2 byla reakce zastavena cca 3-5 vteřin poté, co byla zahájena.

Tabulka 1 – Popis jednotlivých vzorků pro stanovení optimálních podmínek pro hydrolýzu

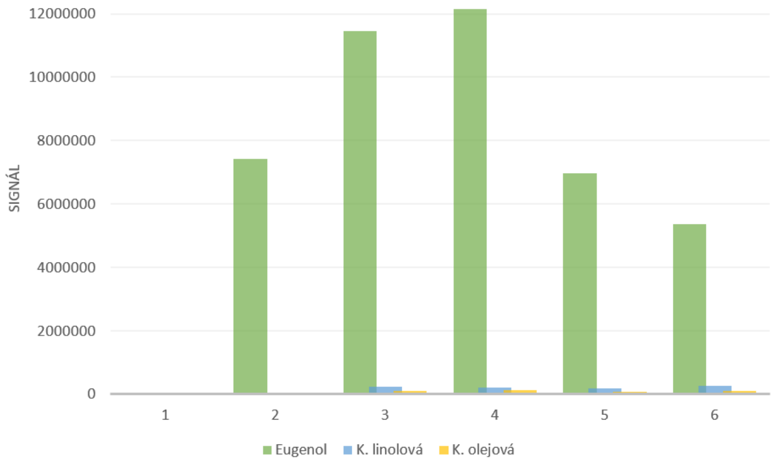
Číslo	Vzorek	Teplota	Čas působení reakce
1	Slepý pokus (voda)	100 °C	60 min
2	Asolektin + eugenol	25 °C	0 min
3	Asolektin + eugenol	70 °C	10 min
4	Asolektin + eugenol	70 °C	30 min
5	Asolektin + eugenol	70 °C	60 min
6	Asolektin + eugenol	100 °C	60 min

Na obr. 15 je zobrazen graf, který znázorňuje zastoupení zvolených mastných kyselin po skončení daného experimentu při zvolených podmínkách. Na obr. 16 je stejný graf navíc obohacený o zastoupení eugenolu ve vzorcích po skončení experimentu. Kyselina linolová byla detekována při retenčním čase 21,77 minut v režimu SIM pro ion 337 m/z. Kyselina olejová byla detekována při retenčním čase 21,82 minut v režimu SIM pro ion 339 m/z. Eugenol byl detekován při retenčním čase 14,14 minut v režimu SIM pro ion 206 m/z.

Na základě porovnání poměrů zastoupení obou mastných kyselin bylo rozhodnuto, že nejvhodnější teplota a čas pro působení reakce je experiment č. 4, ve kterém byla použita teplota 70 °C a čas 30 minut. Na konci tohoto experimentu byl rovněž detekován největší signál eugenolu (obr. 16), což byl další přívětivý aspekt pro tyto podmínky.

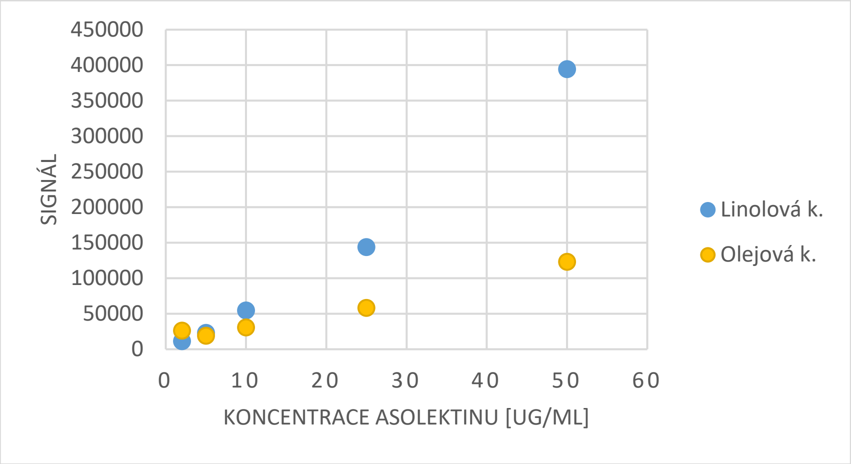


Obrázek 15 – Zastoupení mastných kyselin v různých pokusech



Obrázek 16 – Zastoupení mastných kyselin a eugenolu v různých pokusech

Vybrané mastné kyseliny linolová a olejová se dále detekovaly v koncentrační řadě asolektinu. Účelem bylo zkonstruovat kalibrační závislost asolektinu, podle které by poté bylo možné stanovit jeho koncentraci ve vodě. Na základě této informace by se pak dalo hodnotit, jaké množství asolektinu prošlo přes zvolenou membránu. Asolektin byl připraven v koncentrační řadě 2–50 µg/ml o pěti bodech. Na obr. 17 jsou zobrazeny signály jednotlivých mastných kyselin v koncentrační řadě asolektinu. Kyseliny linolová a olejová se chovají lineárně s koeficientem determinace R^2 = 0,9826 pro kyselinu linolovou a R^2 = 0,9736 pro kyselinu olejovou. Tuto metodu tedy lze použít pro kvantitativní stanovení asolektinu.

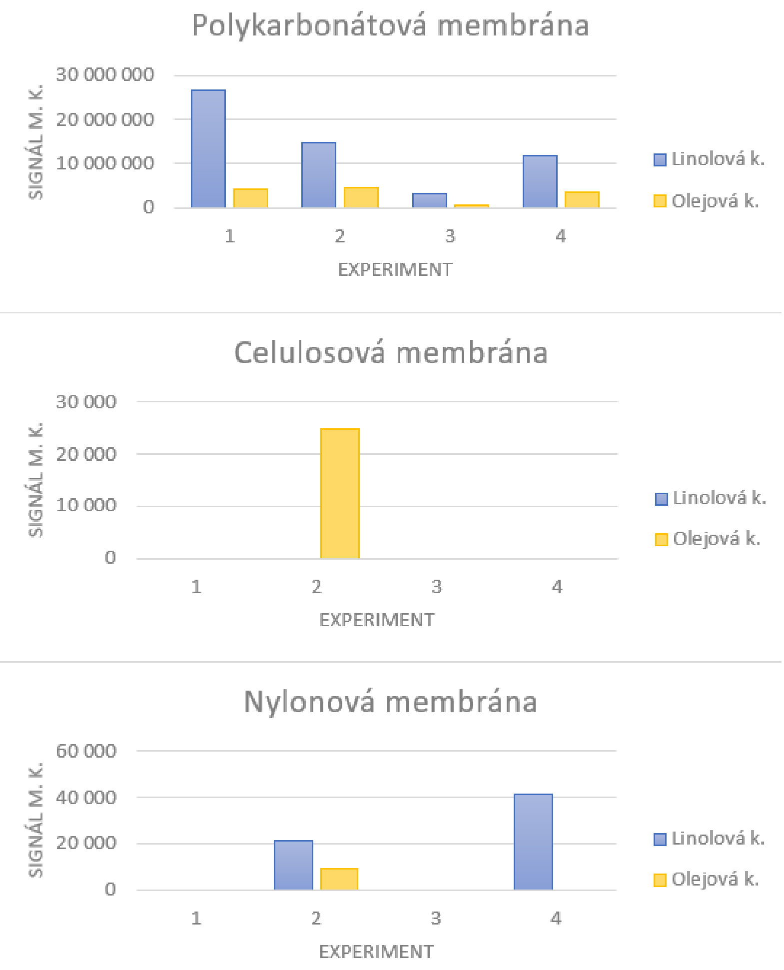


Obrázek 17 – Kalibrační závislost asolektinu

4.1.2 Volba vhodné membrány

Při volbě vhodné membrány byly použity membrány polykarbonátová, celulosová a nylonová. Cílem bylo zjistit, kolik asolektinových liposomů tyto membrány propouštějí. Aby byla membrána pro stanovení rozdělovacího koeficientu považovaná za vhodnou, musí propouštět co nejméně asolektinu. Pro tento experiment byla připravena rozdělovací aparatura, jak je popsáno v kapitole 3.3 Příprava experimentu. Testovací látkou byl eugenol o dvou koncentracích zásobního roztoku – 50 a 500 µg/ml. Každý experiment pro danou membránu byl proveden 2x.

Na obr. 18 jsou zobrazené tři grafy, které zobrazují množství asolektinu, které bylo detekováno ve vodné fázi. Znamená to tedy, že takové množství prošlo z fáze s liposomy do vodné fáze přes zvolenou membránu. Měřítko grafu pro polykarbonátovou membránu je 100x větší než pro membrány celulosovou a nylonovou. Experimenty 1 a 2 obsahovaly koncentraci eugenolu 6,25 µg/ml, experimenty 3 a 4 koncentraci 62,5 µg/ml. Z těchto tří grafů je zřejmé, že polykarbonátová membrána propouští ze všech zvolených membrán nejvíce asolektinu. Celulosová a nylonová membrána až na výjimky nepropouští téměř žádný asolektin. Vzhledem k tomu, že polykarbonátová membrána propouští nejméně 100x více asolektinu než ostatní dvě membrány, byla z následujících experimentů vyřazena a pro stanovení hodnot rozdělovacího koeficientu byly použity pouze membrány celulosová a nylonová. Mnohonásobně větší propustnost asolektinu přes polykarbonátovou membránu byla prokázána také v práci kolegy Radka Jergy pomocí hmotnostní spektrometrie. [5]

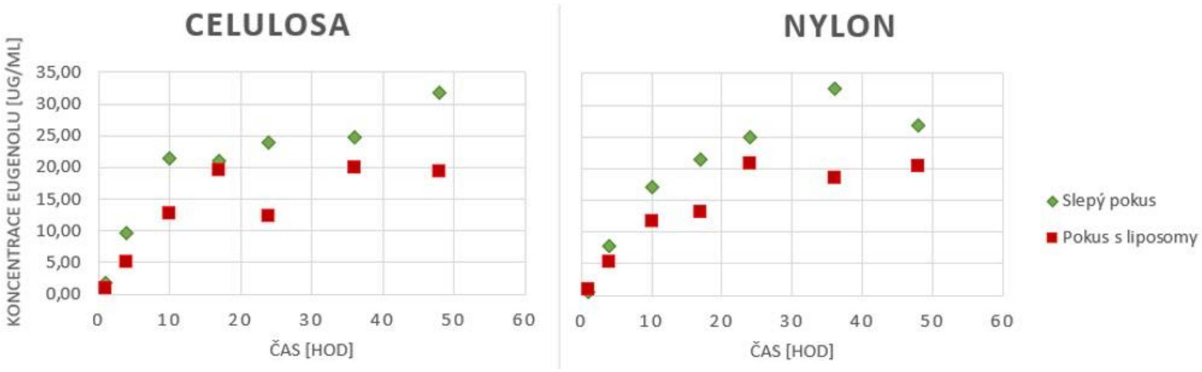


Obrázek 18 – Tři grafy popisující propustnost asolektinu přes zvolené membrány

4.1.3 Časová závislost rozdělování eugenolu

Série pokusů byla připravena pro stanovení časové závislosti rozdělování eugenolu. Cílem tohoto pokusu bylo určit vhodnou dobu pro ustavení rovnováhy studované látky mezi fázemi. Pro tyto pokusy byla připravena rozdělovací aparatura, jak je popsáno v kapitole 3.3 Příprava experimentu. Pokusy byly provedeny pro celulosovou a nylonovou membránu ve dvou opakováních, testovací látkou byl eugenol. Byly připraveny slepé pokusy bez liposomů a reálné pokusy s liposomy. Rovnováha v připravených rozdělovacích aparaturách se nechala ustavovat po dobu 1; 4; 10; 17; 24; 36 a 48 hodin. Následně byla pomocí lineární koncentrační závislosti spočítána koncentrace eugenolu ve vodné fázi a spočítána hodnota rozdělovacího koeficientu, jak je popsáno v podkapitole 3.6 Výpočet rozdělovacího koeficientu.

Na obr. 19 jsou uvedeny dva grafy, které zobrazují ustavování rovnováhy eugenolu mezi fázemi s časem. Graficky zobrazená je zde pouze vodná fáze, do které eugenol difundoval z liposomální fáze, kde se nacházel na začátku experimentu. Ve slepém pokusu difundoval eugenol z vody do vody. V reálném pokusu, ve kterém byly přítomny liposomy, difundoval jen volný eugenol, který nebyl uzavřen do dutin liposomů. Z obr. 19 vyplývá, že v případě celulosové i nylonové membrány měl růst koncentrace eugenolu ve vodné fázi ve slepém i reálném pokusu tendenci spět k určité limitní hodnotě. V grafech se nachází odchylky, které pravděpodobně mohly vzniknout v důsledku nepřesné předúpravy vzorku. V práci kolegyně Veroniky Müllerové [4] tyto vzorky nebyly nijak upravené a body odlehlé nejsou.

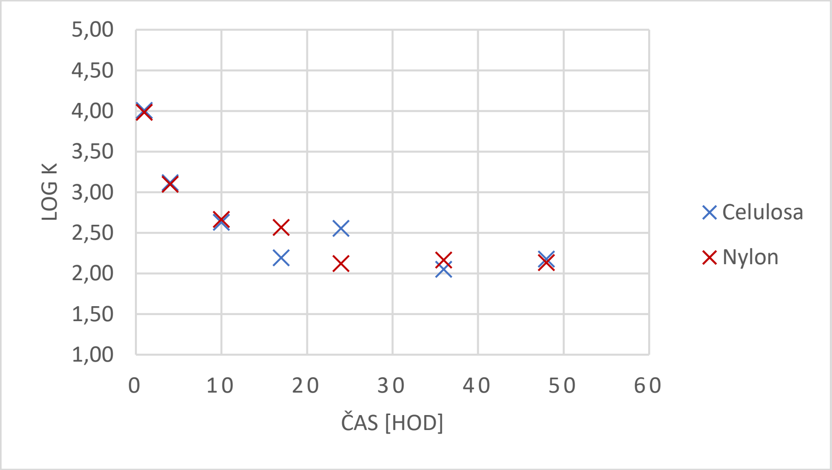


Obrázek 19 – Závislost difuze eugenolu do vodné fáze přes zvolenou membránu v čase

V tab. 2 jsou uvedeny hodnoty rozdělovacího koeficientu eugenolu v závislosti na čase ustavení jeho rovnováhy. Hodnoty log K s časem jsou pak vyneseny do grafu na obr. 20. Také zde lze pozorovat postupné přibližování k limitní hodnotě. Stanovení spolehlivých hodnot K eugenolu tedy vyžaduje nejméně 36 hodin, nejlépe však 48 hodin.

Tabulka 2 – Rozdělovací koeficienty eugenolu v závislosti na době ustavení rovnováhy

Čas [hod]	**Celulosa**		**Nylon**	
	K	**log K**	**K**	**log K**
1	10 183	4,01	9 625	3,98
4	1 315	3,12	1 252	3,10
10	425	2,63	463	2,67
17	155	2,19	370	2,57
24	358	2,56	132	2,12
36	112	2,05	145	2,16
48	150	2,18	136	2,13



Obrázek 20 – Závislost log K eugenolu na čase ustavení rovnováhy

4.1.4 Koncentrační závislost rozdělování eugenolu

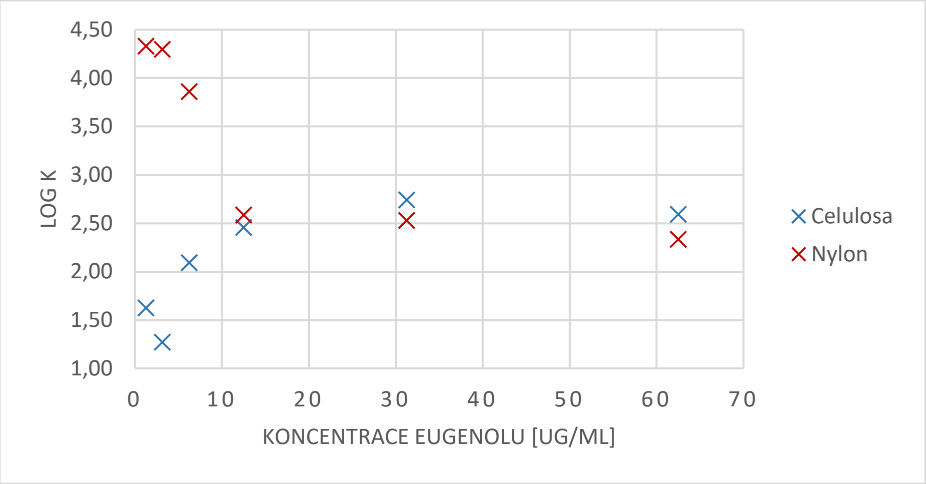
V tomto experimentu pro stanovení koncentrační závislosti rozdělování eugenolu bylo cílem zjistit, jestli je možné stanovit hodnotu K pro různé koncentrace eugenolu za využití GC/MS a jestli jsou získané hodnoty K pro různé koncentrace konstantní. Pro tento experiment byla vytvořena série pokusů. Pro tyto pokusy byla připravena rozdělovací aparatura, jak je popsáno v kapitole 3.3 Příprava experimentu. Pokusy byly provedeny pro celulosovou a nylonovou membránu ve dvou opakováních. Byly připraveny slepé pokusy bez liposomů a reálné pokusy s liposomy. Pro tento experiment byly použity zásobní roztoky eugenolu, které měly koncentrace 10; 25; 50; 100; 250 a 500 µg/ml. Ve výsledku byla tedy v roztoku koncentrace eugenolu 1,25; 3,125; 6,25; 12,5; 31,25 a 62,5 µg/ml. Doba ustavování

rovnováhy byla zvolena na základě předchozího experimentu na 48 hodin. Poté byla pomocí lineární koncentrační závislosti spočítána koncentrace eugenolu ve vodné fázi a spočítána hodnota rozdělovacího koeficientu, jak je popsáno v podkapitole 3.6 Výpočet rozdělovacího koeficientu.

V tab. 3 jsou uvedené hodnoty K a log K eugenolu při jeho různých koncentracích. Ideálně by tyto hodnoty měly být konstantní, ale vzhledem k tomu, že nebyly, byly následně tyto hodnoty vyneseny s koncentracemi roztoku eugenolu do grafu na obr. 21. Konstantní linii lze pozorovat u vyšších koncentrací eugenolu. Při jeho nižších koncentracích, jako je 1,25–6,25 µg/ml, je stanovení K pomocí GC/MS velice nepřesné. Hodnota K u obou membrán vykazuje při těchto nízkých koncentracích velice variabilní čísla. Pro spolehlivé stanovení hodnoty rozdělovacího koeficientu je tedy vhodné použít vyšší koncentrace eugenolu.

Tabulka 3 – Stanovení rozdělovacího koeficientu eugenolu pří jeho různých koncentracích

Koncentrace eugenolu [µg/ml]	**Celulosa**		**Nylon**	
	K	**log K**	**K**	**log K**
1,250	42	1,62	21 268	4,33
3,125	18	1,27	19 830	4,30
6,250	123	2,09	7 214	3,86
12,500	286	2,46	384	2,58
31,250	554	2,74	337	2,53
62,500	390	2,59	215	2,33



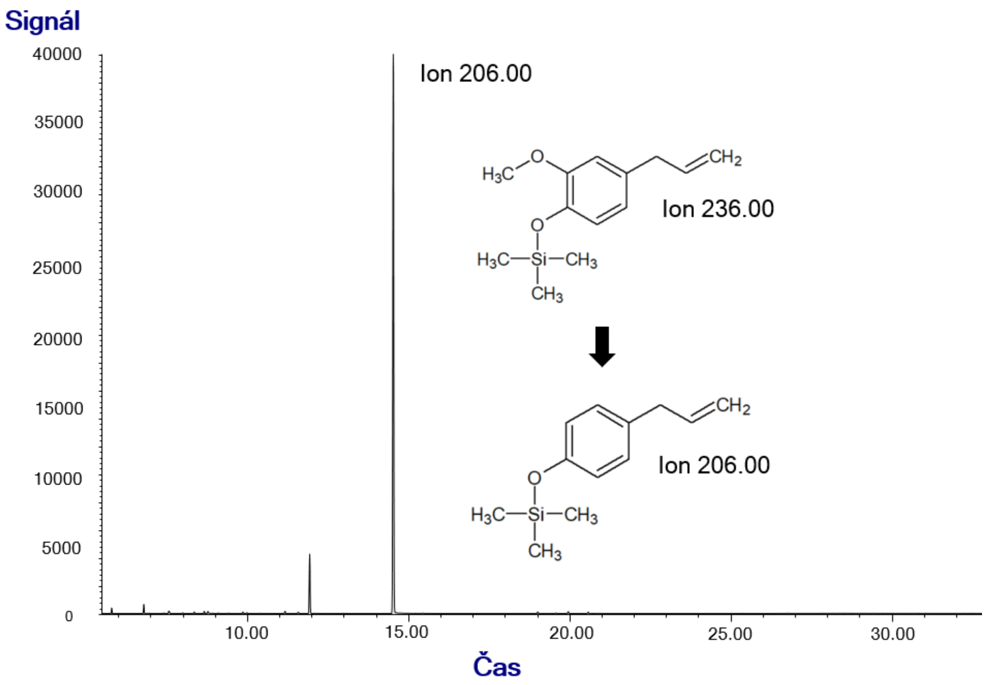
Obrázek 21 – Závislost log K na koncentraci eugenolu

4.2 Stanovení rozdělovacího koeficientu v systému liposom – voda

4.2.1 Eugenol

Pro stanovení rozdělovacího koeficientu eugenolu byly aplikovány poznatky zjištěné z předchozích experimentů. Opět byla připravena rozdělovací aparatura, jak je popsáno v kapitole 3.3 Příprava experimentu. Rovnováha se nechala ustavovat po dobu 48 hodin, koncentrace zásobního roztoku eugenolu byla 500 µg/ml. Byla připravena série pěti pokusů se slepými vzorky pouze s eugenolem a série pěti pokusů reálných vzorků s eugenolem i s asolektinem. Série pokusů byly připraveny zvlášť pro každou membránu. Po ustavení rovnováhy byly tyto vzorky upraveny, jak je popsáno v podkapitole 3.4.1 Eugenol, a analyzovány. Poté byla pomocí lineární koncentrační závislosti spočítána koncentrace eugenolu ve vodné fázi a spočítána hodnota rozdělovacího koeficientu.

Eugenol byl detekován při retenčním čase 14,50 minut v režimu SIM pro ion 206 m/z, což je fragment původního iontu 236 m/z. Ion 206 byl použit pro detekci na základě vyššího signálu oproti iontu 236. Chromatogram pro ion 206 m/z je zobrazen na obr. 22 včetně možné struktury tohoto fragmentu.



Obrázek 22 – Chromatogram iontu 206 m/z pro eugenol s ukázkou možné fragmentace původního iontu 236 m/z

Na základě technické závady u dvou z rozdělovacích aparatur došlo k vyloučení pátých vzorků u obou sérií. Rozdělovací aparatury u těchto vzorků dostatečně netěsnily a po skončení ustavování rovnováhy bylo zjištěno, že došlo ke smíchání obou fází a objemové ztrátě. V tab. 4 jsou tudíž uvedené hodnoty K a log K eugenolu ve čtyřech opakování pro každou membránu. Průměr stanovených rozdělovacích koeficientů eugenolu za využití celulosové membrány je 237 ± 28 (logaritmus průměru K = 2,38). Průměr stanovených rozdělovacích koeficientů eugenolu za využití nylonové membrány je 318 ± 225 (logaritmus průměru K = 2,50). Celkový průměr stanovených rozdělovacích koeficientů eugenolu, kdy se využije všech výsledků získaných s využitím celulosové i nylonové membrány, činí 278 ± 155 (logaritmus průměru K = 2,44), relativní směrodatná odchylka (RSD) činí 56 %.

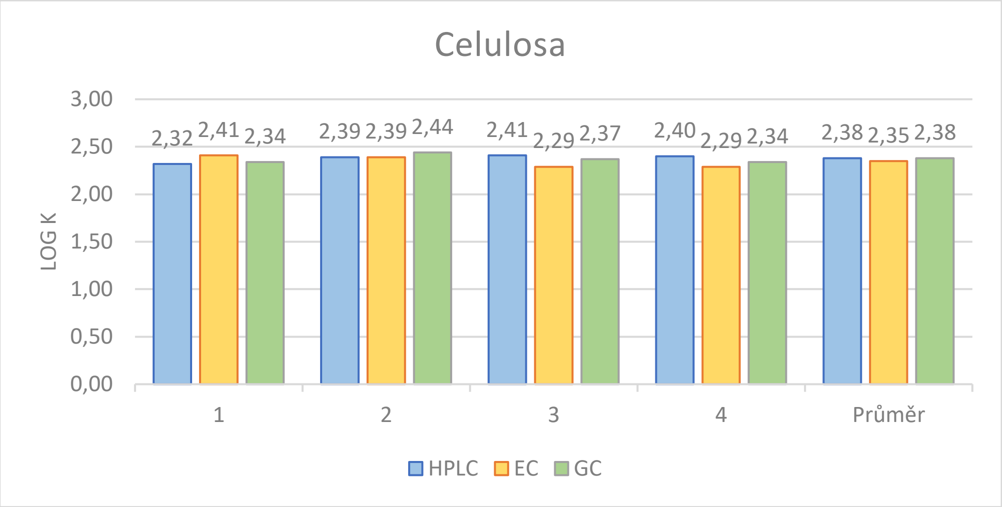
Tabulka 4 – Hodnoty rozdělovacího koeficientu eugenolu ve čtyřech opakováních

Opakování	**Celulosa**		**Nylon**	
	K	**log K**	**K**	**log K**
1	220	2,34	144	2,16
2	278	2,44	590	2,77
3	235	2,37	416	2,62
4	217	2,34	123	2,09
Průměr	237	-	318	-
Sm. odch.	28	-	225	-
Log. průměru K	2,38	-	2,50	-

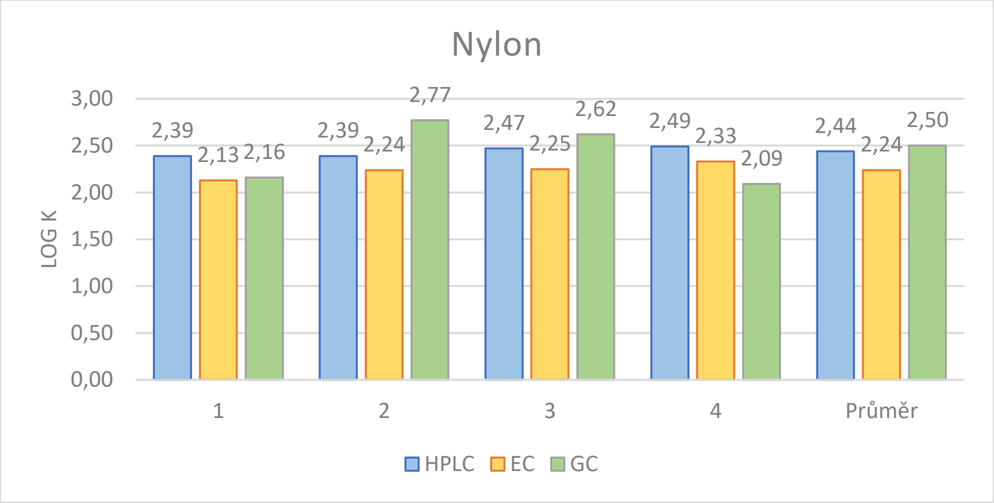
Průměrné hodnoty K eugenolu získané kolegy Veronikou Müllerovou [4] a Radkem Jergou [5] jsou uvedené v tab. 5 společně s průměrnými hodnotami získanými metodou GC/MS. Na obr. 23 a 24 jsou dále uvedeny grafy pro srovnání jednotlivých výsledků měření hodnot K eugenolu včetně logaritmovaných průměrných hodnot pro celulosovou a nylonovou membránu. Hodnoty navzájem korespondují a podobají se hodnotám log K = 2,45 a 2,48 získanými Bartákem, P., Skopalovou, J. a kolegy [31,32]. Taktéž odpovídají referenčním hodnotám z literatury (log K = 2,27 [40], 2,45 [41] a 2,30 [42]), které byly měřené v systému oktanol – voda, a hodnotě log K = 2,20, která byla naměřena v systému lecitinový liposom - pufr. Rozdělování eugenolu v systému oktanol – voda a liposom – voda může být na základě těchto hodnot podobné.

Tabulka 5 – Průměrné hodnoty K eugenolu získané třemi technikami

Technika	**Celulosa**		**Nylon**		**Obě membrány**		
	Průměr K	**Log. průměru K**	**Průměr K**	**Log. průměru K**	**Průměr K (log. průměru)**	**Sm. odch.**	**RSD [%]**
HPLC	240	2,38	273	2,44	257 (2,41)	30	12
EC	222	2,35	174	2,24	198 (2,30)	39	20
GC	237	2,38	318	2,50	278 (2,44)	155	56



Obrázek 23 – Porovnání hodnot log K eugenolu za využití celulosové membrány metodami HPLC, voltametrie (EC) a GC

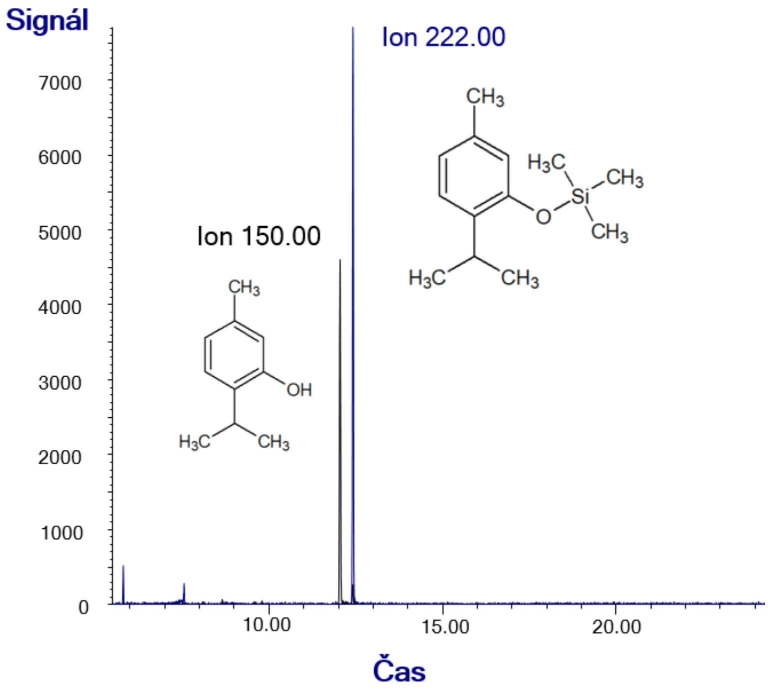


Obrázek 24 – Porovnání hodnot log K eugenolu za využití nylonové membrány metodami HPLC, voltametrie (EC) a GC

4.2.2 Thymol

Stanovení rozdělovacího koeficientu thymolu v systému liposom – voda předcházel problém nedostatečné silanizace jeho hydroxylové skupiny při aplikování stejných silanizačních podmínek jako při silanizaci eugenolu (80 °C, 30 min). Chromatogram silanizovaného standardu thymolu je zobrazen na obr. 25. Detekce thymolu byla provedena v režimu SIM pro ionty 135 a 150 m/z, detekce silanizovaného thymolu byla provedena v režimu SIM pro ionty 207 a 222 m/z. Signál iontu 150 m/z dosahoval přes polovinu signálu iontu 222 m/z, což signalizovalo nedostatečnou silanizaci thymolu. Pro lepší výtěžnost byly

vyzkoušeny jiné podmínky pro působení silanizačních činidel. Teplota pro působení byla zvýšená na 90 °C a doba byla prodloužena na 60 minut. Tato úprava podmínek se při opakovaném pokusu potvrdila jako účinná.

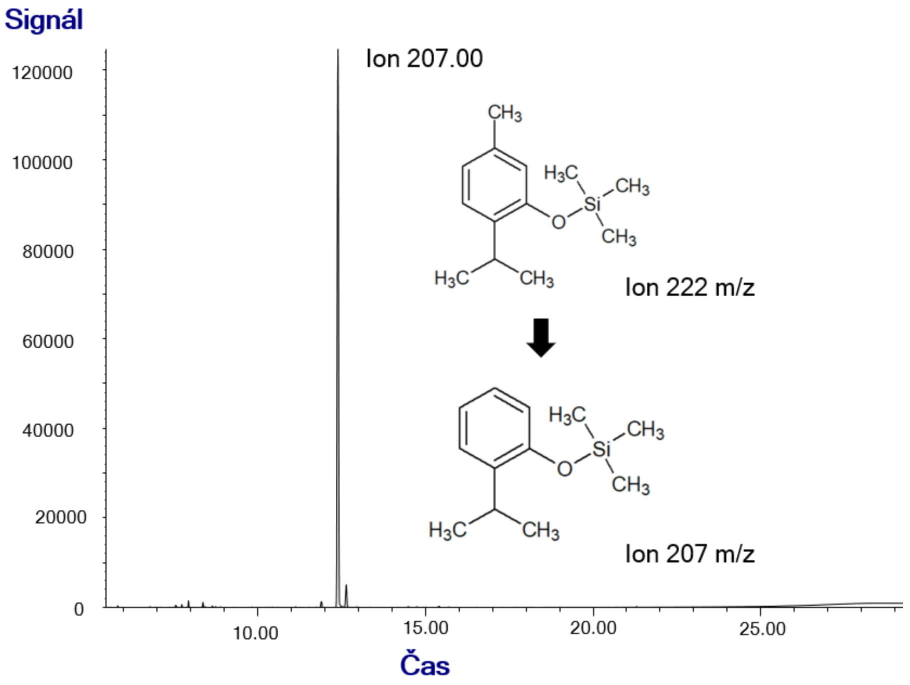


Obrázek 25 – Chromatogram silanizovaného standardu thymolu s patrným obsahem nederivatizované látky (80 °C, 30 min)

Pro stanovení rozdělovacího koeficientu thymolu v systému liposom – voda byly aplikovány parametry zjištěné z experimentů provedených pro eugenol. Opět byla připravena rozdělovací aparatura, jak je popsáno v kapitole 3.3 Příprava experimentu. Rovnováha se nechala ustavovat po dobu 48 hodin, koncentrace zásobního roztoku thymolu byla 500 µg/ml. Pro každou membránu byla připravena série pěti pokusů slepých vzorků pouze s thymolem a série pěti pokusů reálných vzorků s thymolem a asolektinem. Po ustavení rovnováhy byly tyto vzorky upraveny, jak je popsáno v podkapitole 3.4.2 Thymol a karvakrol, a analyzovány. Poté byla pomocí lineární koncentrační závislosti spočítána koncentrace thymolu ve vodné fázi a spočítána hodnota rozdělovacího koeficientu, jak je popsáno v podkapitole 3.6 Výpočet rozdělovacího koeficientu.

Thymol byl detekován při retenčním čase 12,42 minut v režimu SIM pro ion 207 m/z, což je fragment původního iontu 222 m/z. Ion 207 byl použit pro detekci na základě vyššího

signálu oproti iontu 222. Chromatogram pro ion 207 m/z je zobrazen na obr. 26 včetně možné struktury tohoto fragmentu.



Obrázek 26 – Chromatogram iontu 207 m/z pro thymol s ukázkou možné fragmentace původního iontu 222 m/z

V tab. 5 jsou uvedeny hodnoty K a log K thymolu v pěti provedených opakováních pro každou membránu. Průměr stanovených rozdělovacích koeficientů thymolu za využití celulosové membrány je 627 ± 120 (logaritmus průměru K = 2,80). Průměr stanovených rozdělovacích koeficientů thymolu za využití nylonové membrány je 493 ± 107 (logaritmus průměru K = 2,69). Celkový průměr stanovených rozdělovacích koeficientů thymolu, kdy se využije všech výsledků získaných s využitím celulosové i nylonové membrány, činí 560 ± 128 (logaritmus průměru K = 2,75), relativní směrodatná odchylka (RSD) činí 23 %.

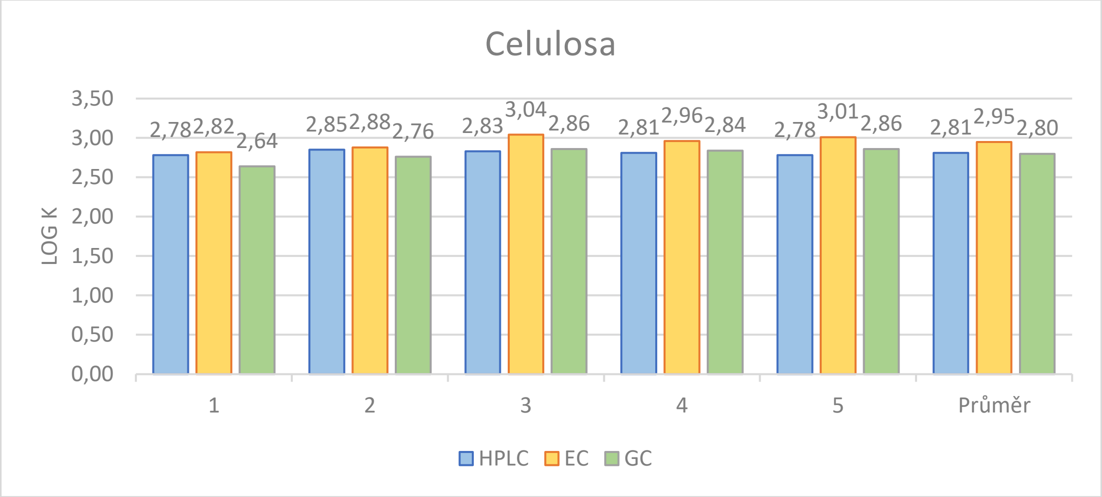
Tabulka 6 - Hodnoty rozdělovacího koeficientu thymolu v pěti opakováních

Opakování	Celulosa		Nylon	
	K	log K	K	log K
1	437	2,64	635	2,80
2	577	2,76	442	2,65
3	717	2,86	516	2,71
4	684	2,84	524	2,72
5	717	2,86	347	2,54
Průměr	627	-	493	-
Sm. odch.	120	-	107	-
Log. průměru K	2,80	-	2,69	-

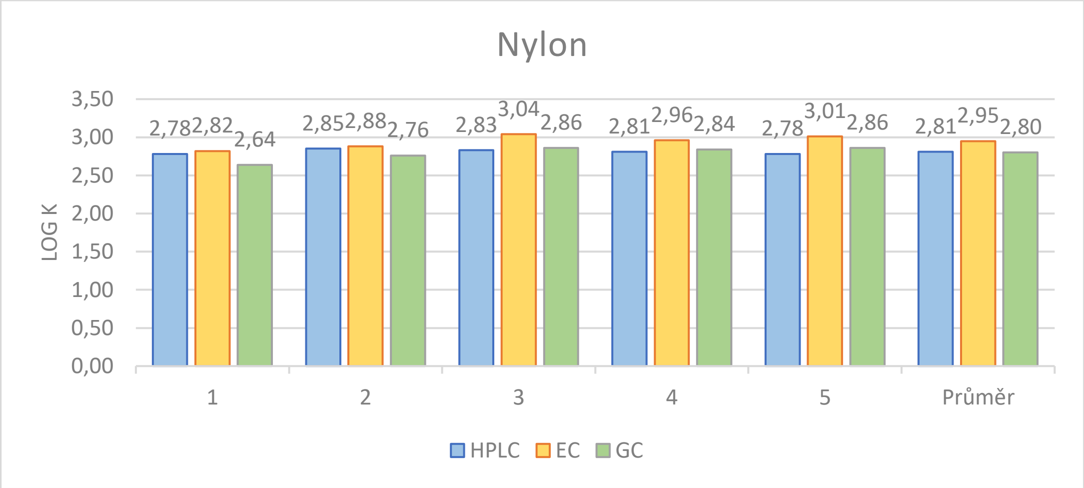
Průměrné hodnoty K thymolu získané kolegy Veronikou Müllerovou [4] a Radkem Jergou [5] jsou uvedené v tab. 7 společně s průměrnými hodnotami získanými metodou GC/MS. Na obr. 27 a 28 jsou dále uvedeny grafy pro srovnání jednotlivých výsledků měření hodnot K thymolu včetně logaritmovaných průměrných hodnot pro celulosovou a nylonovou membránu. Voltametrická metoda poskytuje v tomto případě trochu větší hodnoty rozdělovacího koeficientu, ale stále tyto hodnoty mezi sebou korespondují. V literatuře byl v systému oktanol – voda stanoven log K thymolu na hodnotu 3,30 [36] a 3,21 [42], v systému lecitinový liposom – pufr na hodnotu 2,90 [42]. Třemi technikami stanovené hodnoty K thymolu v systému liposom – voda jsou o něco nižší než referenční hodnoty získané v systému oktanol – voda a spíše odpovídají referenční hodnotě 2,90 získané v systému lecitinový liposom – pufr [42]. Je tedy možné, že thymol prostupuje do liposomů hůře než do oktanolu na základě možných odlišných interakcí.

Tabulka 7 - Průměrné hodnoty K thymolu získané třemi technikami

Technika	Celulosa		Nylon		Obě membrány		
	Průměr K	Log. průměru K	Průměr K	Log. průměru K	Průměr K (log. průměru)	Sm. odch.	RSD [%]
HPLC	644	2,81	657	2,82	651 (2,81)	58	9
EC	890	2,95	776	2,89	833 (2,92)	146	18
GC	627	2,80	493	2,69	560 (2,75)	128	23



Obrázek 27 – Porovnání hodnot log K thymolu za využití celulosové membrány metodami HPLC, voltametrie (EC) a GC

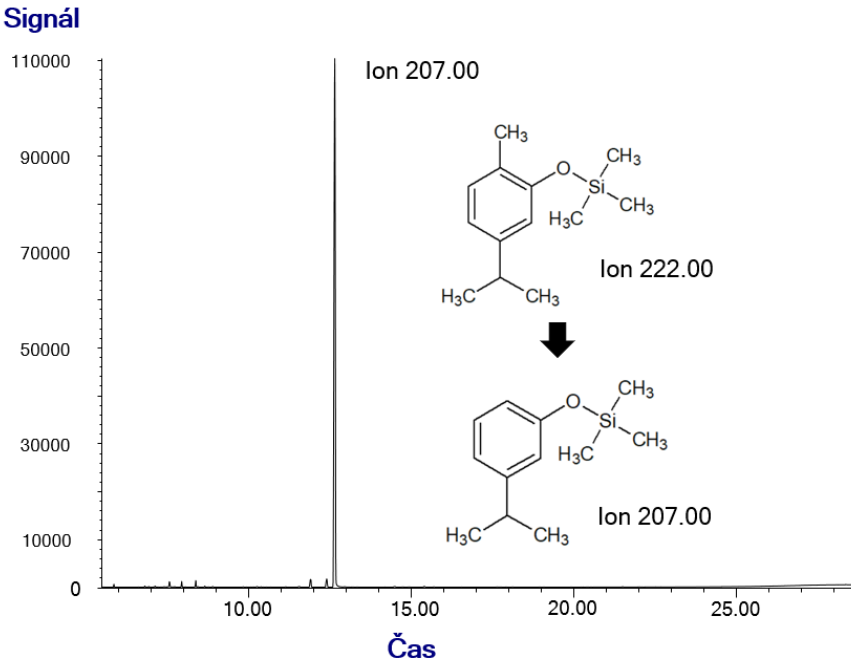


Obrázek 28 - Porovnání hodnot log K thymolu za využití nylonové membrány metodami HPLC, voltametrie (EC) a GC

4.2.3 Karvakrol

Pro stanovení rozdělovacího koeficientu karvakrolu byly aplikovány parametry zjištěné z experimentů provedených pro eugenol. Opět byla připravena rozdělovací aparatura, jak je popsáno v kapitole 3.3 Příprava experimentu. Rovnováha se nechala ustavovat po dobu 48 hodin, koncentrace zásobního roztoku karvakrolu byla 500 µg/ml. Pro každou membránu byla připravena série pěti pokusů slepých vzorků pouze s karvakrolem a série pěti pokusů reálných vzorků s karvakrolem a asolektinem. Po ustavení rovnováhy byly tyto vzorky upraveny, jak je popsáno v podkapitole 3.4.2 Thymol a karvakrol, a analyzovány. Vzhledem k podobnosti struktury karvakrolu k thymolu a k problému nedostatečné silanizace thymolu, bylo taktéž zde přistoupeno k úpravě silanizačních podmínek, tedy na teplotu 90 °C po dobu 60 minut. Pomocí lineární koncentrační závislosti byla poté spočítána koncentrace karvakrolu ve vodné fázi a spočítána hodnota rozdělovacího koeficientu, jak je popsáno v podkapitole 3.6 Výpočet rozdělovacího koeficientu.

Karvakrol byl detekován při retenčním čase 12,67 minut v režimu SIM pro ion 207 m/z, což je fragment původního iontu 222 m/z stejně jako v případě thymolu. Ion 207 byl použit pro detekci na základě vyššího signálu oproti iontu 222. Chromatogram pro ion 207 m/z je zobrazen na obr. 29 včetně možné struktury tohoto fragmentu.



Obrázek 29 - Chromatogram iontu 207 m/z pro karvakrol s ukázkou možné fragmentace původního iontu 222 m/z

Na základě technické závady u jedné rozdělovací aparatury došlo k vyloučení čtvrtého vzorku u série s celulosovou membránou. Rozdělovací aparatura v tomto případě dostatečně netěsnila a po skončení ustavování rovnováhy bylo zjištěno, že došlo ke smíchání obou fází a objemové ztrátě. V tab. 8 jsou uvedeny hodnoty K a log K karvakrolu ve čtyřech opakováních pro celulosovou membránou a v pěti opakováních pro nylonovou membránu. Průměr stanovených rozdělovacích koeficientů karvakrolu za využití celulosové membrány je 576 ± 102 (logaritmus průměru K = 2,76). Průměr stanovených rozdělovacích koeficientů karvakrolu za využití nylonové membrány je 704 ± 148 (logaritmus průměru K = 2,85). Celkový průměr stanovených rozdělovacích koeficientů karvakrolu, kdy se využije všech výsledků získaných s využitím celulosové i nylonové membrány, činí 647 ± 139 (logaritmus průměru K = 2,81), relativní směrodatná odchylka (RSD) činí 22 %.

Tabulka 8 - Hodnoty rozdělovacího koeficientu karvakrolu v pěti opakováních

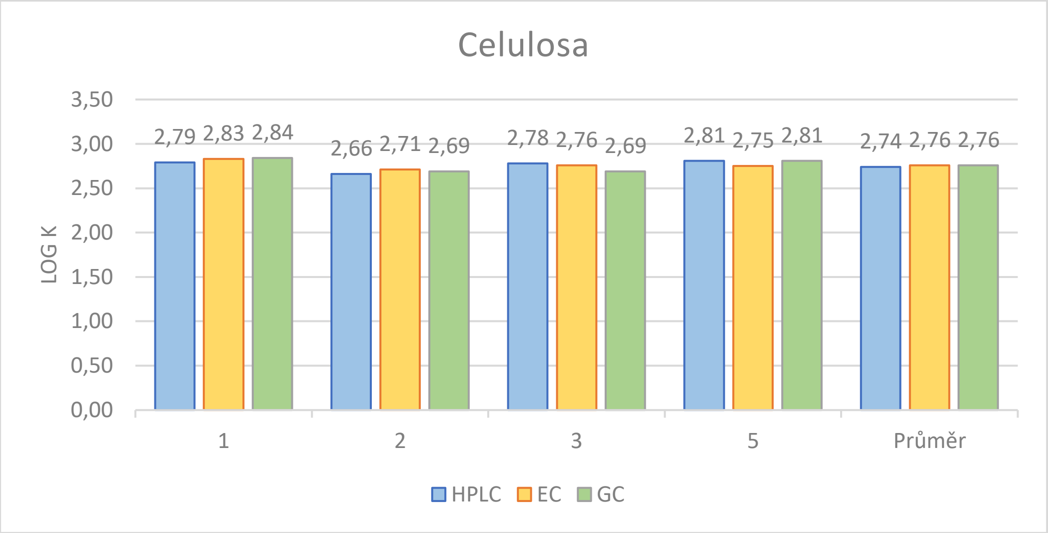
Opakování	**Celulosa**		**Nylon**	
	K	**log K**	**K**	**log K**
1	686	2,84	806	2,91
2	494	2,69	869	2,94
3	485	2,69	546	2,74
4	-	-	747	2,87
5	641	2,81	552	2,74
Průměr	576	-	704	-
Sm. odch.	102	-	148	-
Log. průměru K	2,76	-	2,85	-

Průměrné hodnoty K karvakrolu získané kolegy Veronikou Müllerovou [4] a Radkem Jergou [5] jsou uvedené v tab. 9 společně s průměrnými hodnotami získanými metodou GC/MS. Na obr. 30 a 31 jsou dále uvedeny grafy pro srovnání jednotlivých výsledků měření hodnot K karvakrolu včetně logaritmovaných průměrných hodnot pro celulosovou a nylonovou membránu. Získané hodnoty navzájem korespondují. Referenční hodnota log K z literatury získaná v systému oktanol – voda činila 3,49 [36], 3,64 [46] a 3,14 [42], v systému lecitinový liposom – pufr činila 2,76 [42]. Třemi technikami stanovené hodnoty K karvakrolu v systému liposom – voda jsou o něco nižší než referenční hodnoty získané v systému

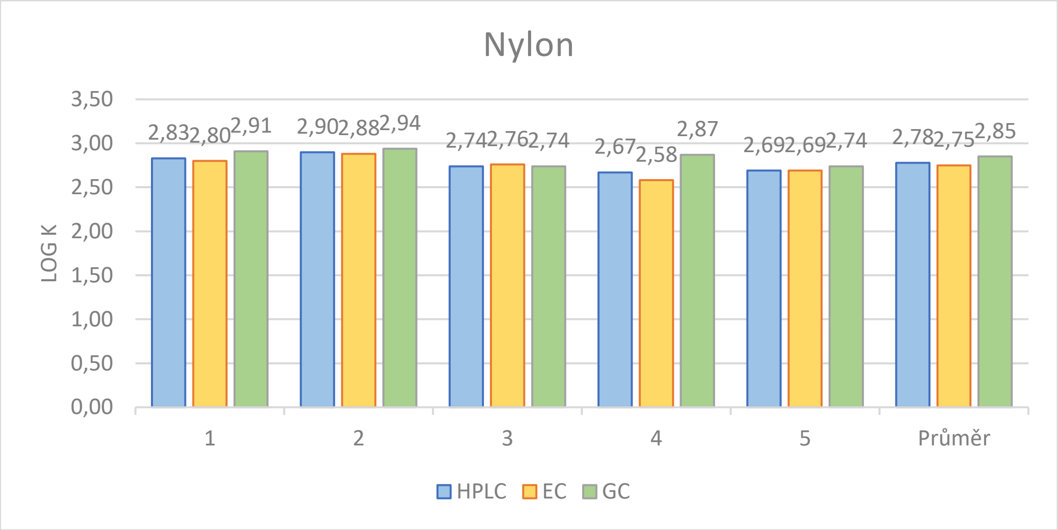
oktanol – voda a spíše odpovídají referenční hodnotě 2,76 získané v systému lecitinový liposom – pufr [42]. Je tedy možné, že karvakrol, podobně jako thymol, prostupuje do liposomů hůře než do oktanolu.

Tabulka 9 - Průměrné hodnoty K karvakrolu získané třemi technikami

Technika	**Celulosa**		**Nylon**		**Obě membrány**		
	Průměr K	**Log. průměru K**	**Průměr K**	**Log. průměru K**	**Průměr K (log. průměru)**	**Sm. odch.**	**RSD [%]**
HPLC	554	2,74	597	2,78	578 (2,76)	108	19
EC	579	2,76	566	2,75	572 (2,76)	110	19
GC	576	2,76	704	2,85	647 (2,81)	139	22



Obrázek 30 - Porovnání hodnot log K karvakrolu za využití celulosové membrány metodami HPLC, voltametrie (EC) a GC



Obrázek 31 - Porovnání hodnot log K karvakrolu za využití nylonové membrány metodami HPLC, voltametrie (EC) a GC

5 ZÁVĚR

Jedním z cílů této diplomové práce bylo za pomoci vyrobené rozdělovací aparatury optimalizovat podmínky metody pro stanovení rozdělovacích koeficientů pro zvolené látky v systému liposom – voda. Nejprve byla na základě experimentu zvolena vhodná semipermeabilní membrána, která od sebe separovala vodnou a liposomální fázi a umožňovala prostup pouze studované látce. S tím byla spojena optimalizace stanovení asolektinu pomocí plynové chromatografie. Následně byla zkoumána vhodná doba pro ustavení rovnováhy studovaných látek mezi fázemi a vliv koncentrace pro stanovení rozdělovacích koeficientů. Tyto parametry byly zkoumány u látky eugenol a dále byly aplikovány pro thymol a karvakrol. Jako vhodná membrána byla zvolena celulosová a nylonová, vhodný čas pro ustavení rovnováhy byl 48 hodin a vhodná minimální koncentrace látky pro spolehlivé stanovení K byla 62,5 μg/ml.

Se znalostmi optimalizačních parametrů bylo dalším cílem stanovit rozdělovací koeficienty zvolených látek, a následně je porovnat s hodnotami, které získali kolegové u stejných vzorků pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a diferenční pulzní voltametrie. S tímto účelem byly provedeny experimenty pro stanovení hodnot K eugenolu, thymolu a karvakrolu v pěti opakováních pro celulosovou a nylonovou membránu. Koncentrace studovaných látek byly v této práci určeny plynovou chromatografií s využitím lineární koncentrační závislosti. Průměrná hodnota K eugenolu činila 278 (log K = 2,44), v případě thymolu činila 560 (log K = 2,75) a v případě karvakrolu činila 647 (log K = 2,81). Tyto hodnoty dobře korespondují s hodnotami od kolegů. Hodnoty K eugenolu odpovídají referenčním hodnotám z literatury, hodnoty K thymolu a karvakrolu jsou o něco nižší než referenční hodnoty z literatury získané pro tyto látky v systému oktanol – voda a lépe korespondují s hodnotami získanými v systému lecitinový liposom – pufr. To může vést k vyslovení hypotézy, že thymol a karvakrol prostupují pasivní difuzí do liposomů hůře než do oktanolu.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Berthod, A. & Carda-Broch, S. Determination of liquid-liquid partition coefficients by separation methods. *J. Chromatogr. A* **1037,** 3–14 (2004).

2. Esteves, F., Moutinho, C. & Matos, C. Correlation between octanol/water and liposome/water distribution coefficients and drug absorption of a set of pharmacologically active compounds. *J. Liposome Res.* **2104,** 83–93 (2013).

3. Van Balen, G. P. *et al.* Liposome/Water Lipophilicity: Methods, Information Content, and Pharmaceutical Applications. *Med. Res. Rev.* **24,** 299–324 (2004).

4. Müllerová, V., Stanovení rozdělovacích koeficientů v systému liposom - voda vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií, diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2020.

5. Jerga, R., Stanovení rozdělovacích koeficientů v systému liposom - voda voltametrickými metodami, diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2020.

6. Klouda, P., Moderní analytické metody, nakladatelství Pavko, Ostrava 2013.

7. Churáček, J., Analytická separace látek, SNTL - Nakladatelství technické literatury, Praha 1990.

8. Leo, A., Hansch, C., Elkins, D., Law, A. H. & Behavior, B. N. Partition coefficients and their uses. *Chem. Rev.* **71,** (1971).

9. Poole, S. K. & Poole, C. F. Separation methods for estimating octanol-water partiotion coefficients. *J. Chromatogr. B* **797,** 3–19 (2003).

10. Gobas, F. A. P. C., Lahittete, J. M., Garofalo, G., Shiu, W. Y. & Mackay, D. A Novel Method for Measuring Membrane-Water Partition Coefficients of Hydrophobic Organic Chemicals: Comparison with 1-Octanol-Water Partitioning. *J. Pharm. Sci.* **77,** 265–272 (1988).

11. Schwarzenbach, Ä. P. & Westall, J. C. Evaluation of Liposome - Water Partitioning of Organic Acids and Bases. 1. Development of a Sorption Model. *Environ. Sci. Technol.* **34,** 3954–3961 (2000).

12. OECD/OCDE. Partiotion Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method. *OECD*

Guidel. Test. Chem. **107,** Paris (1995).

13. OECD/OCDE. Partition Coefficient (1-Octanol/Water): Slow-Stirring Method. *OECD Guidel. Test. Chem.* **123,** Paris (2006).

14. OECD/OCDE. Partition Coefficient (n-octanol/water), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method. *OECD Guidel. Test. Chem.* **117,** Paris (2004).

15. Dearden, J. C. & Bresnen, G. M. The Measurement of Partition Coefficients. *Quant. Struct. Relationships* **7,** 133–144 (1988).

16. Davis, S. S., Elson, G., Tomlinson, E., Harrison, G. & Dearden, J. C. The rapid determination of partition coefficient data using a continuous solvent extraction system. *Chem. Ind.* 677–683 (1976).

17. Escher, B. I. & Schwarzenbach, R. P. Partitioning of Substituted Phenols in Liposome - Water, Biomembrane - Water, and Octanol - Water Systems. *Environ. Sci. Technol.* **30,** 260–270 (1996).

18. Schwarzenbach, Ä. P. & Westall, J. C. Evaluation of Liposome - Water Partitioning of Organic Acids and Bases. 2. Comparison of Experimental Determination Methods. *Environ. Sci. Technol.* **34,** 3962–3968 (2000).

19. Danielsson, L.-G. & Zhang, Y.-H. Methods for determining n-octanol-water partition constants. *Trends Anal. Chem.* **15,** 188–196 (1996).

20. De Bruijn, J., Busser, F., Seinen, W. & Hermens, J. Determination of octanol/water partiotion coefficients for hydrophobic organic chemicals with the 'slow-stirring' method. *Environ. Toxicol. Chem.* **8,** 499–512 (1989).

21. Woodburn, K. B., Doucette, W. J. & Andren, A. W. Generator Column Determination of Octanol / Water Partition Coefficients for Selected Polychlorinated Biphenyl Congeners. *Environ. Sci. Technol.* **18,** 457–459 (1984).

22. Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W. & Zarghami, N. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res. Lett.* **8,** (2013).

23. Sessa, G. & Weissmann, G. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for

biological membranes. *J. Lipid Res.* **9,** 310–318 (1968).

24. Fernández-Romeo, J. M. & Gómez-Hens, A. The role of liposomes in analytical processes. *Trends Anal. Chem.* **24,** 9–19 (2005).

25. Jesorka, A. & Orwar, O. Liposomes: Technologies and Analytical Applications. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **1,** 801–832 (2008).

26. Avdeef, A., Box, K. J., Comer, J. E. A., Hibbert, C. & Tam, K. Y. pH-Metric logP 10. Determination of Liposomal Membrane-Water Partition Coefficients of Ionizable Drugs. *Pharm. Res.* **15,** 209–215 (1998).

27. Burns, S. T. & Khaledi, M. G. Rapid Determination of Liposome – Water Partition Coefficients (Klw) Using Liposome Electrokinetic Chromatography (LEKC). *J. Pharm. Sci.* **91,** 1601–1612 (2002).

28. Rodrigues, C., Gameiro, P., Reis, S. & Lima, J. L. F. C. Derivative spectrophotometry as a tool for the determination of drug partition coefficients in water/dimyristoyl-L-a-phosphatidylglycerol (DMPG) liposomes. *Biophys. Chem.* **94,** 97–106 (2001).

29. Vaes, W. H. J. *et al.* Solid Phase Microextraction as a Tool To Determine Membrane/Water Partition Coefficients and Bioavailable Concentrations in in Vitro Systems. *Chem. Res. Toxicol.* **10,** 1067–1072 (1997).

30. Ventura, K., Eisner, A., Kurečková, K. & Khailová, L. Určení rozdělovacích koeficientů pomocí kombinace Headspace plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. *Chem. Listy* **96,** 990–993 (2002).

31. Součková, J. *et al.* On GC/MS in Phospholipid Research II: Investigation of Liposome Formation and Liposome - Water Partitioning. *Acta Univ. Palacki. Olomuc. Fac. Rerum Nat. Chem.* **48,** 8–13 (2011).

32. Barták P., Skopalová J., Bednář P., Součková J., Tomková H., Rozsypal J.:Determination of partition coefficient in liposome – water system: GC/MS Approach. 24th International Symposium on Separation Sciences (ISSS 2018) & 21st International Conference Ana.

33. Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods

— a review. *Int. J. Food Microbiol.* **94,** 223–253 (2004).

34. Brewer, M. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **10,** 221–247 (2011).

35. Tesařová, E. & Pacáková, V. Gas and High-Performance Liquid Chromatography of Phenols. *Chromatographia* **17,** 269–284 (1983).

36. Griffin, S., Wyllie, S. G. & Markham, J. Determination of octanol – water partition coefficient for terpenoids using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **864,** 221–228 (1999).

37. Chaieb, K. *et al.* The Chemical Composition and Biological Activity of Clove Essential Oil, Eugenia caryophyllata (Syzigium aromaticum L. Myrtaceae): A Short Review. *Phyther. Res.* **506,** 501–506 (2007).

38. Markowitz, K., Moynihan, M., Liu, M. & Kim, S. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol. *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol.* **73,** 729–737 (1992).

39. Fujisawa, S., Atsumi, Z., Kadoma, Y. & Sakagami, H. Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. *Toxicology* **177,** 39–54 (2002).

40. Sangster, J., Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry, Wiley, Chichester, Velká Británie, 1997.

41. Dias, N. C., Nawas, M. I. & Poole, C. F. Evaluation of a reversed-phase column (Supelcosil LC-ABZ) under isocratic and gradient elution conditions for estimating octanol-water partition coefficients. *Analyst* **128,** 427–433 (2003).

42. Reiner, G. N., Labuckas, D. O. & García, D. A. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Lipophilicity of some GABAergic phenols and related compounds determined by HPLC and partition coefficients in different systems. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **49,** 686–691 (2009).

43. Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R. & Di Lorenzo, A. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chem.* **210,** 402–414 (2016).

44. Ezzat Abd El-Hack, M. *et al.* Beneficial impacts of thymol essential oil on health and production of animals, fish and poultry: a review. *J. Essent. Oil Res.* **28,** 365–382 (2016).

45. Sharifi-Rad, M., Varoni, E. M., Iriti, M., Martorell, M. & Setzer, W. N. Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phyther. Res.* **2018,** 1–13 (2018).

46. Ultee, A. *et al.* The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus. *Appl. Environ. Microbiol.* **68,** 1561–1568 (2002).

47. Ivashchuk-Kienbaum, Y. A. Monitoring of the Membrane Potential in Proteoliposomes with Incorporated Cytochrome-c Oxidase Using the Fluorescent Dye Indocyanine. *J. Membr. Biol.* **151,** 247–259 (1996).

48. Součková, J. *et al.* On GC/MS in Phospholipid Research I: Determination of Fatty Acid Profile and Pohosporus Content. *Acta Univ. Palacki. Olomuc. Fac. Rerum Nat. Chem.* **48,** 1–7 (2011).

49. Eder, K. Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *J. Chromatogr. B* **671,** 113–131 (1995).