

# **Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědecká fakulta**  
Katedra analytické chemie



## **STANOVENÍ ROZDĚLOVACÍCH KOEFICIENTŮ V SYSTÉMU LIPOSOM - VODA VYSOKOÚČINNOU KAPALINOVOU CHROMATOGRAFIÍ**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor práce:

Bc. Veronika Müllerová

Vedoucí práce:

RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.

Studijní program:

N1407 Chemie

Studijní obor:

Analytická chemie

Olomouc 2020

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. 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 .....

.....

Veronika Müllerová

Chtěla bych poděkovat vedoucí své diplomové práce RNDr. Janě Skopalové Ph.D. za všechny rady, připomínky a znalosti, které mi předala. Děkuji také Bc. Veronice Taláškové a Bc. Radku Jergovi za velmi cennou pomoc při práci v laboratoři, a také za neustálý optimismus při řešení jakýchkoliv problémů souvisejících s naší prací. Ráda bych poděkovala své rodině a přátelům za podporu během celého studia. Děkuji i Katedře analytické chemie za umožnění studia a vypracování této práce.

Tato závěrečná práce byla finančně podpořena Interní grantovou agenturou UP (IGA\_PrF\_2019\_028 a IGA\_PrF\_2020\_030).

## **Bibliografická identifikace**

Autor	Bc. Veronika Müllerová
Název práce	Stanovení rozdělovacích koeficientů v systému liposom - voda vysokoučinnou kapalinovou chromatografií
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce	RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	Diplomová práce se zabývá stanovením rozdělovacích koeficientů eugenolu, karvakrolu a thymolu v systému liposom-voda metodou HPLC. Byly testovány různé časy třepání roztoků v rozdělovací aparatuře a také různé vstupní koncentrace analyzovaných látek v rozsahu 1,25–62,5 µg/ml. Jako nejlepší byla vybrána koncentrace 62,5 µg/ml a čas třepání 48 hodin. Pro rozdělovací experiment byly vybrány celulosová a nylonová membrána pro permeaci analytů z prostředí roztoku s asolectinovými liposomy do čisté vody. Analýzou vodných roztoků byly zjištěny koncentrace daných látek a z nich byly vypočteny rozdělovací koeficienty. Výsledné hodnoty byly srovnány s rozdělovacími koeficienty získanými z metod GC/MS a diferenční pulzní voltametrie (DPV). Bylo zjištěno, že pro stanovení rozdělovacích koeficientů lze použít všechny zmíněné metody.
Klíčová slova	rozdělovací koeficient, eugenol, thymol, karvakrol, HPLC, asolectin
Počet stran	57
Jazyk	Český

## **Bibliographic identification**

Author	Bc. Veronika Müllerová
Title	Determination of partition coefficients in the liposome - water system by high performance liquid chromatography
Type of thesis	Master's
Department	Department of Analytical Chemistry
Supervisor	RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.
The year of presentation	2020
Abstract	<p>The master's thesis deals with the determination of partition coefficients of eugenol, carvacrol and thymol in the liposome-water system by HPLC. Different shaking times for the solutions in the partitioning apparatus and different input concentrations of the analytes in the range of 1,25–62,5 µg/ml were tested. A concentration of 62,5 µg/ml and a shaking time of 48 hours were chosen as the best. Cellulose and nylon membrane were selected in the experiment for permeation of the analytes from a solution containing asolectin liposomes to pure water behind the membrane. Concentrations of the analytes were determined by analysing the liposome-free aqueous solutions and partition coefficients were calculated from these concentrations. The results were compared with partition coefficients obtained from GC/MS and differential pulse voltammetry (DPV). It was found that all mentioned methods can be used for the determination of partition coefficients.</p>
Keywords	partition coefficient, eugenol, thymol, carvacrol, HPLC, asolectin
Number of pages	57
Language	Czech

# OBSAH

Seznam použitých zkratk	8
Seznam příloh	9
1 Úvod	10
2 Teoretická část	11
2.1 Rozdělovací koeficienty	11
2.1.1 Stanovení rozdělovacích koeficientů v systému n-oktanol/voda	11
2.1.2 Stanovení rozdělovacích koeficientů v systému liposom-voda	13
2.1.3 Využití rozdělovacích koeficientů	15
2.2 Liposomy	16
2.2.1 Využití liposomů	16
2.2.2 Klasifikace a příprava liposomů	17
2.3 Studované látky	19
2.3.1 Eugenol	20
2.3.2 Thymol	22
2.3.3 Karvakrol	23
3 Experimentální část	25
3.1 Přístrojové vybavení	25
3.2 Použité chemikálie	25
3.3 Příprava roztoků	25
3.4 Experimentální postupy	26
3.4.1 Sestavení rozdělovací aparatury	26
3.4.2 Časová závislost rozdělování eugenolu	27
3.4.3 Koncentrační závislost rozdělování eugenolu	27
3.4.4 Stanovení rozdělovacích koeficientů	27
3.4.5 Podmínky HPLC analýzy	27
3.4.6 Výpočet rozdělovacích koeficientů	28
4 Výsledky a diskuse	29
4.1 Optimalizace složení mobilní fáze	29

4.1.1 Eugenol .....	29
4.1.2 Thymol .....	29
4.1.3 Karvakrol .....	30
4.2 Kalibrační meze .....	31
4.3 Výběr vhodného typu membrány pro rozdělování.....	31
4.4 Časová závislost rozdělování eugenolu .....	32
4.5 Koncentrační závislost rozdělování eugenolu.....	33
4.6 Stanovení rozdělovacích koeficientů .....	35
4.6.1 Eugenol .....	35
4.6.2 Thymol .....	36
4.6.3 Karvakrol .....	38
4.7 Srovnání metod HPLC, GC/MS a voltametrických metod pro stanovení rozdělovacích koeficientů .....	39
4.7.1 Eugenol .....	39
4.7.2 Thymol .....	40
4.7.3 Karvakrol .....	42
5 Závěr .....	45
Seznam použité literatury .....	47
Přílohy.....	54

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADME	absorpce, distribuce, metabolismus, eliminace
DDT	dichlordifenyltrichlorethan
GUV	obří unilamelární vezikuly
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IAM	imobilizovaná umělá fosfolipidová membrána
LEKC	liposomální elektrokinetická chromatografie
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
LUV	velké unilamelární vezikuly
MF	mobilní fáze
MLV	multilamelární vezikuly
MS	hmotnostní spektrometrie
MVV	multivezikulární vezikuly
MWCO	mezní hodnota molekulové hmotnosti (molekul zadržovaných membránou)
OUV	oligolamelární vezikuly
PC	polykarbonát
PCB	polychlorované bifenyly
QSPR	kvantitativní vztahy mezi strukturou a aktivitou
RP	reverzní fáze
RSD	relativní směrodatná odchylka
SPI	izolovaný sójový protein
SUV	malé unilamelární vezikuly
THF	tetrahydrofuran
UV	ultrafialový



# SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Absorpční spektra thymolu a karvakrolu s vyznačenými absorpčními maximy

Příloha 2: Srovnání rozdělovacích koeficientů eugenolu získaných metodami HPLC, DPV a GC/MS s celulosovou membránou

Příloha 3: Srovnání rozdělovacích koeficientů eugenolu získaných metodami HPLC, DPV a GC/MS s nylonovou membránou

Příloha 4: Srovnání rozdělovacích koeficientů thymolu získaných metodami HPLC, DPV a GC/MS s celulosovou membránou

Příloha 5: Srovnání rozdělovacích koeficientů thymolu získaných metodami HPLC, DPV a GC/MS s nylonovou membránou

Příloha 6: Srovnání rozdělovacích koeficientů karvakrolu získaných metodami HPLC, DPV a GC/MS s celulosovou membránou

Příloha 7: Srovnání rozdělovacích koeficientů karvakrolu získaných metodami HPLC, DPV a GC/MS s nylonovou membránou

# 1 ÚVOD

Rozdělovací koeficient je definován jako poměr rovnovážných koncentrací látky ve dvou nemísitelných fázích. Ve většině případů se jedná o systém fází n-oktanolu a vody, pro které se také nejčastěji stanovuje. Existuje mnoho metod stanovení rozdělovacích koeficientů v tomto systému, mezi které patří například metoda „shake-flask“, metoda „slow-stirring“, odvození z HPLC retenčních dat, případně teoretické výpočetní metody. Pomocí rozdělovacích koeficientů se často určuje lipofilita látek.

System n-oktanol-voda však nemusí být nejvhodnější pro farmaceutické studie, kde je třeba studovat interakce léčivých látek s buněčnými membránami. Pro tento účel je namísto n-oktanolu vhodnější použití liposomů, které jsou schopny zohledňovat i iontové interakce, protože mnohá léčiva se v organismu vyskytují v ionizované formě.

Eugenol, thymol a karvakrol jsou fenolické látky, které se využívají ve farmaceutických aplikacích díky svým dobrým antimikrobiálním, analgetickým, a v některých případech i anestetickým vlastnostem. Mnohdy se využívají také jako aditiva v kosmetických přípravcích a v potravinách. Antibakteriální účinek těchto látek silně závisí na rozdělovacím koeficientu, kdy se zvyšujícím se rozdělovacím koeficientem narůstá baktericidní aktivita.

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout vhodnou metodu HPLC pro experimentální stanovení rozdělovacích koeficientů výše zmíněných látek v systému liposom-voda. Následně byly rozdělovací koeficienty získané touto metodou srovnány s GC/MS a voltametrickými metodami pro posouzení vhodnosti každé z metod pro tento účel.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Rozdělovací koeficienty

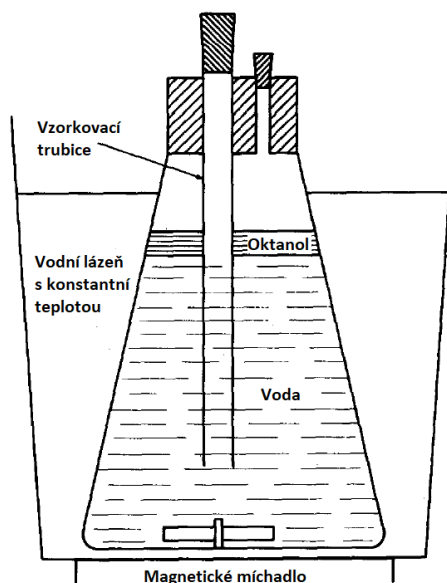
Rozdělovací (distribuční) koeficient nebo také rozdělovací konstanta ( $K_D$ ) představuje poměr rovnovážných koncentrací látky ve směsi dvou nemísitelných fází, nejčastěji vodné a organické. Je definován jako

$$K_D = \frac{[A]_{org}}{[A]_{aq}} \quad (1)$$

kde  $[A]_{org}$  je koncentrace dané látky v organické fázi a  $[A]_{aq}$  je její koncentrace ve vodné fázi [1]. Jedná se o bezrozměrnou veličinu a mnohdy se vyjadřuje v logaritmickém tvaru jako  $\log K_D$ . Koeficienty se nejběžněji určují v systému n-oktanol/voda ( $\log K_{ow}$ ) [2].

#### 2.1.1 Stanovení rozdělovacích koeficientů v systému n-oktanol/voda

Existuje několik možných způsobů pro stanovení  $\log K_{ow}$ . Prvním způsobem je metoda „shake-flask“, která spočívá v roztřepávání analytu v baňce nebo dělicí nálevce s n-oktanolem a vodou s následným stanovením analytu v obou fázích vhodnou metodou. Tato technika je však nevýhodná pro svoji časovou náročnost, dále kvůli možným interferencím způsobeným nečistotami z rozpouštědla nebo rozpuštěné látky a také z důvodu obtížné regulace teploty [3]. Metoda zároveň není vhodná pro přesná stanovení u látek s vysokou lipofilitou, tj. s hodnotou  $\log K_{ow} > 5$ , protože u nich dochází k tvorbě oktanolových emulzí ve vodě a vzniklé kapičky oktanolu způsobují zvýšení koncentrace analytu ve vodné fázi. Jako řešení tohoto problému byla popsána technika „slow-stirring“, která je vylepšením metody shake-flask. Její provedení je zobrazeno na obrázku 1. V této metodě dochází k ustavení rovnováhy mezi oktanolem a vodou za stálého míchání pomocí magnetického míchadla. Tím se zabrání vzniku oktanolových kapiček ve vodě. Důležitým faktorem je i kontrola teploty, která má také vliv na vznik emulze. Pro odběr vzorku z vodné fáze je zde přítomna vzorkovací trubička. Nedochozí tedy ke kontaminaci vzorku jako při použití pipet, které po kontaktu s oktanolem mohou znečistit vodnou fázi. Tato metoda zároveň poskytuje vysoce reprodukovatelné výsledky. Nevýhodou této metody je však opět časová náročnost [4].



Obrázek 1. Aparatura pro určování rozdělovacího koeficientu metodou „slow-stirring“ [4]

Nejpoužívanější technikou pro experimentální odhad rozdělovacího koeficientu se stala vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC) [5]. Stanovení touto technikou je silně závislé na retenci analytu, a tedy i na kapacitním faktoru  $k'$ . Tato závislost je pro různé dělicí systémy dána Collanderovým [6] vztahem:

$$\log K_{ow} = a \log k' + b \quad (2)$$

kde  $a$  a  $b$  jsou empirické konstanty charakterizující příslušná rozpouštědla. Kapacitní faktor však pro daný analyt a použitou stacionární fází (nejčastěji C18) závisí na složení mobilní fáze. Proto bylo rozhodnuto, že by  $k'$  měl být stanoven za použití čisté vody jako eluentu ( $k_w$ ), aby se dělicí proces co nejvíce přiblížil rozdělování v dělicí nálevce (metoda shake-flask), tedy aby závisel pouze na struktuře a polaritě analytu. V praxi ovšem čistá voda není vhodná jako mobilní fáze vzhledem ke své nízké eluční síle a používá se ve směsi s méně polárním rozpouštědlem. Pro zjištění hodnoty  $k_w$  je pak třeba stanovit  $k'$  pro mobilní fáze s různým obsahem organického rozpouštědla a výsledné hodnoty extrapolovat na nulový obsah tohoto rozpouštědla [7]. Přepočet  $k'$  na  $k_w$  je dán vztahem:

$$\log k' = \log k_w - S\varphi \quad (3)$$

kde  $\varphi$  je objemový zlomek organického rozpouštědla v mobilní fázi a  $S$  odpovídá síle čistého organického rozpouštědla [8].

Stanovení  $\log K_{ow}$  z HPLC retenčních dat má několik výhod. K analýze stačí pouze malé množství vzorku, není třeba stanovovat koncentraci analytu a také při separaci dojde k oddělení hlavní složky od případných kontaminantů. Metoda je současně velmi rychlá,

přesná a reprodukovatelná [9]. Velkou výhodou je také možnost plné automatizovatelnosti metody [10].

Kromě experimentálních technik stanovení  $\log K_{ow}$  existují také techniky výpočetní a teoretické, které jsou známé pod zkratkou QSPR („quantitative structure property relationships“). Prvním typem jsou metody založené na výpočtu z příspěvků atomů a fragmentů dané molekuly. Jako příklad lze uvést metodu XLOGP3. Výpočetní model je založen na dvou korekčních faktorech a systému 87 fragmentů. V této metodě se používá knihovna 8199 referenčních sloučenin s měřenými experimentálními hodnotami  $\log K_{ow}$ . Vstupní struktura dané sloučeniny je porovnávána se strukturami molekul v knihovně, aby byla nalezena co nejpodobnější referenční struktura. Na fragmenty vstupní struktury, které se liší od fragmentů referenční struktury, se aplikují opravy a tím se získá odhad  $\log K_{ow}$  dané sloučeniny. Z tohoto důvodu je přesnost kalkulace dána podobností testované molekuly se sloučeninami v databázi použitými v algoritmu pro výpočet  $\log K_{ow}$ . Tato metoda pak nemusí poskytovat přesné výsledky například pro izomery nebo různé konformace stejné molekuly [11]. Dále lze rozdělovací koeficienty určit z Gibbsových volných energií solvatace analytu v obou fázích. Příkladem jsou metody SMD a COSMO-RS [12]. Pro danou teplotu  $T$  platí pro výpočet  $\log K_{ow}$  následující vztah:

$$\log K_{ow} = \frac{\Delta G}{2,303RT} \quad (4)$$

kde  $\Delta G$  je rozdíl Gibbsových volných energií solvatace analytu ve vodě a v n-oktanolu. Standardně se pro stanovení  $\Delta G$  používá simulace molekulární dynamiky a simulace Monte Carlo [13]. Tato metoda je výhodná nejen pro stanovení  $\log K_{ow}$ , ale i pro sledování termodynamického chování sloučenin v rozpouštědlech a současně poskytuje užitečné informace o fyzikálně-chemických vlastnostech daných látek [14].

### 2.1.2 Stanovení rozdělovacích koeficientů v systému liposom-voda

Liposomy jsou díky svým biomimetickým vlastnostem využívány jako alternativa k oktanolu především při farmaceutických studiích interakce léčiv s buněčnými membránami. Mnohá léčiva se v těle vyskytují v ionizované formě. Oproti systému oktanol-voda, který je vhodné použít pouze pro nepolární látky, zahrnují rozdělovací koeficienty v systému liposom-voda ( $\log K_{lw}$ ) také iontové interakce, a proto je použití liposomů namísto oktanolu pro tyto aplikace vhodnější. U ionizovaných látek byly naměřené  $\log K_{lw}$  výrazně vyšší ve srovnání s  $\log K_{ow}$ . Tento fakt poukazuje na snadnější průchod

ionizovaných látek do lipidové membrány, kde dochází k jejich interakci tvorbou iontových vazeb s negativně nabitými fosfátovými skupinami fosfolipidu [15].

Jako jedna z metod stanovení  $\log K_{lw}$  byla popsána liposomální elektrokinetická chromatografie (LEKC). LEKC je založena na technice kapilární elektroforézy, kde jsou liposomy obsaženy v roztoku pufru. Liposomy zde slouží jako pseudostacionární fáze umožňující rozpuštěným látkám s nimi interagovat. Metodu lze využít pro určení  $\log K_{lw}$  elektricky neutrálních látek i iontů. Stanovení  $\log K_{lw}$  je stejně jako u HPLC metod založeno na přímém odvození z retenčních dat. Výhodou této metody je použití menšího množství vzorku, nižší požadavky na čistotu vzorku a možnost automatizace. Oproti HPLC metodám nabízí také vyšší účinnost kolony a kratší dobu analýz. Metoda je dobře využitelná při studiích interakcí léků s biologickými membránami [16].

Další metodou je potenciometrická dvoufázová titrace. Nejprve se analyt ve vodném roztoku titruje standardní kyselinou nebo zásadou, čímž se zjistí disociační konstanta ( $pK_a$ ). Druhá titrace se provádí za přítomnosti lipidové fáze v titrovaném roztoku. Tím se získá zdánlivá disociační konstanta  $pK'_a$ , která se od  $pK_a$  liší v závislosti na poměru objemu organické a vodné fáze [17]. Rozdělovací koeficient protonované formy ( $K^{XH+}$ ) a deprotonované formy ( $K^X$ ) molekuly se vypočítá ze vztahu:

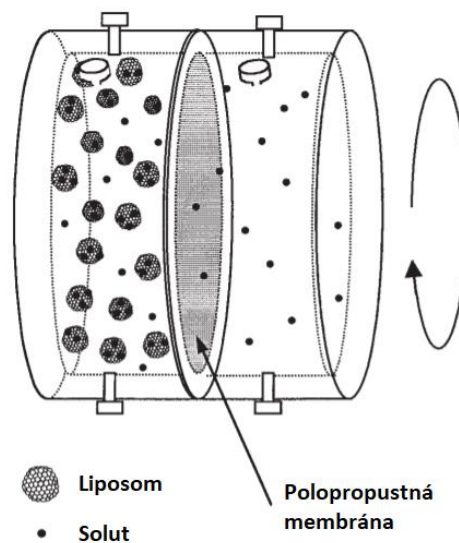
$$pK'_a = pK_a - \log \left( \frac{1 + r \cdot K^X}{1 + r \cdot K^{XH+}} \right) \quad (5)$$

kde  $r$  je poměr objemu organické (lipidové) a vodné fáze v titrovaném roztoku. Pro výpočet je zapotřebí provést nejméně dvě titrace s různou hodnotou  $r$ . Výhodou této metody je její použití v širokém rozsahu hodnot rozdělovacích koeficientů. Také stanovení zdánlivých disociačních konstant látky v lipidové membráně může být zajímavé například pro některé farmaceutické aplikace. [18]

Pro stanovení  $\log K_{lw}$  byla také použita dialyzační technika, jejíž princip je znázorněn na obrázku 2. Dialyzační cela je rozdělena polopropustnou membránou na dvě komory, přičemž suspenze liposomů obsahující rozpuštěnou látku je obsažena v jedné části a roztok pufru je ve druhé části [19]. Polopropustná membrána zajišťuje průchod látky do druhé části cely a naopak zabraňuje průchodu liposomů. Po ustavení rovnováhy mezi oběma fázemi je stanovena koncentrace látky v těchto fázích a následně je spočítán rozdělovací koeficient. Čas potřebný pro dosažení rovnováhy závisí na vlastnostech rozpuštěné látky, lipidů a na dialyzačním systému. Rozdělovací koeficient je vypočítán podle vztahu:

$$\log K = \log \left( \frac{V_{LB} (C_{LB} - C_B)}{V_{Lipo} \cdot C_B} + 1 \right) \quad (6)$$

kde  $C_{LB}$  a  $C_B$  představují koncentraci látky v komoře obsahující liposomy a v komoře s roztokem pufru,  $V_{LB}$  je objem komory obsahující liposomy a  $V_{Lipo}$  představuje objem fosfolipidové fáze. Dialyzační metodou lze velmi dobře posoudit afinitu studované látky k fosfolipidům, avšak vzhledem k existenci různých mechanismů prostupu látky přes membránu nelze touto metodou zcela objasnit způsob jejich interakce. Metoda je současně poměrně časově náročná [18].



Obrázek 2: Dialyzační cela pro rozdělovací experimenty v systému liposom-voda [19]

### 2.1.3 Využití rozdělovacích koeficientů

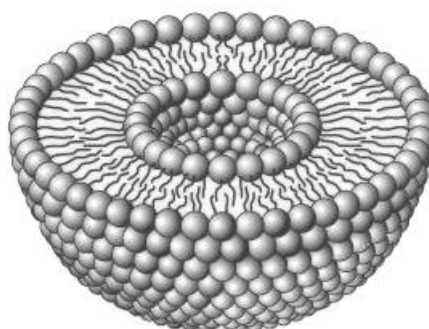
Rozdělovací koeficienty slouží především k posouzení lipofility látek. Lipofilní vlastnosti jsou důležité pro průchod biologickými membránami v organismu a pro hydrofobní interakce s receptory. Z tohoto důvodu je lipofilita jedním z důležitých parametrů při sledování tzv. ADME procesů (tj. absorpce, distribuce, metabolismus a eliminace) například u léčiv. Zároveň je klíčová také při popisu jejich farmakodynamických a toxikologických vlastností [20].

Stejně tak lze toxicitu sledovat i u organických látek znečišťujících životní prostředí, kde se sleduje především jejich biologická dostupnost a rozpad [21]. Většinou se jedná o látky vykazující vysoké biokoncentrační faktory (např. PCB, DDT) [22]. Příkladem je stanovení antropogenních toxických látek v rybách z důvodu posouzení možného vlivu těchto chemikálií na vodní ekosystémy [23,24]. Jako další příklad lze uvést výpočet rozdělovacích koeficientů pesticidů při jejich výměně mezi půdou a vzduchem. Přítomnost

pesticidů ve vzduchu je velkým rizikem zejména pro zemědělské pracovníky, jimž může inhalace pesticidů způsobit vážné zdravotní problémy [25].

## 2.2 Liposomy

Liposomy jsou kulovité útvary o velikosti v řádech nanometrů až mikrometrů, které uvnitř zapouzdřují malý objem vodného roztoku, ve kterém byly suspendovány. Jsou složeny z jedné nebo více lipidových dvojvrstev, nejčastěji fosfolipidů [26]. Na obrázku 3 je znázorněn průřez liposomem s vyobrazenou lipidovou strukturou.



Obrázek 3: Struktura liposomu [27]

Fosfolipidy se skládají z dlouhého uhlovodíkového zbytku mastných kyselin, který je silně hydrofobní, a z polární fosfátové hlavičky, která naopak velmi ochotně interaguje s molekulami vody. Díky těmto amfipatickým vlastnostem jsou fosfolipidy schopny se ve vodném roztoku uspořádat do dvojvrstvy tak, aby uhlovodíkové konce směřovaly k sobě a polární části byly otočeny směrem do vodné fáze. Tyto fosfolipidové dvojvrstvy jsou základní stavební jednotkou všech biologických membrán. Kromě dvojvrstev jsou však fosfolipidy schopny ve vodném roztoku samovolně tvořit také micely nebo právě liposomy [28]. Z tohoto důvodu se liposomy často používají jako umělý model buňky pro studium interakcí mezi membránovými lipidy a biomolekulami nebo pro sledování propustnosti pro některá léčiva nebo ionty [29].

### 2.2.1 Využití liposomů

Liposomy se běžně využívají například v kosmetickém, potravinářském a zemědělském průmyslu pro zapouzdření některých málo stabilních antioxidantů nebo antimikrobiálních a bioaktivních látek. Ty jsou díky uzavření v liposomu chráněné a jejich aktivita není kvůli nízké stabilitě narušena. Nejvíce však nacházejí využití ve farmaceutickém průmyslu, kde slouží jako nosiče léčiv [30]. Díky své biologické inertnosti jsou liposomy schopny dopravit

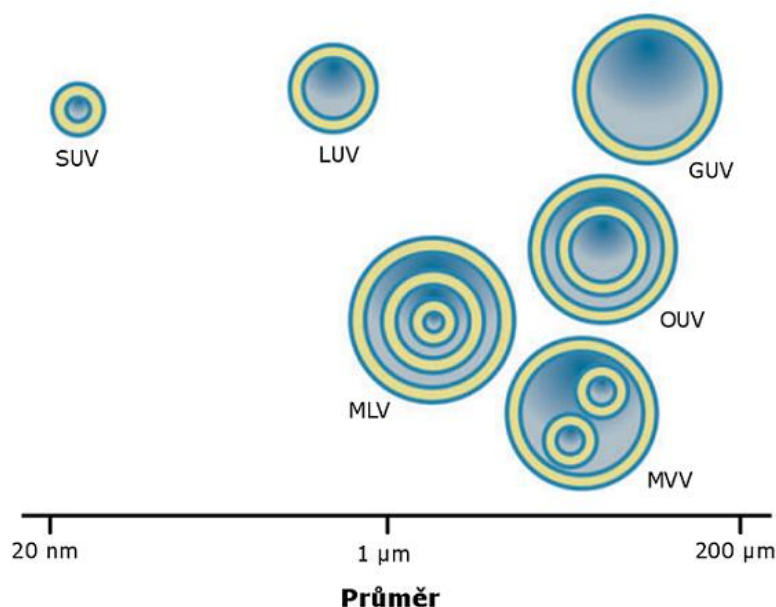


danou léčivou látku na místo působení bez vedlejších účinků. Současně jsou také biokompatibilní, biodegradabilní a netoxické [31]. Často se uplatňují ve výzkumu jako nosiče léků proti rakovině nebo nosiče genů [32]. Například byl testován vliv použití liposomů na lokální léčbu rakoviny kůže. Výsledky ukázaly, že léčivo uzavřené uvnitř liposomu způsobuje výraznou inhibici rakovinných buněk ve srovnání s účinkem volného léku bez použití liposomu [33]. Dále je možné liposomy aplikovat třeba ve vývoji očkovacích vakcín. Do vnitřního prostoru liposomu se uzavře peptidový antigen nebo virový membránový protein. To vyvolá buněčnou imunitní odpověď a vytvoří se trvalá imunita proti patogenu [32]. Příkladem je vývoj vakcíny proti hepatitidě A, která se ukázala díky liposomální enkapsulaci jako velmi efektivní a je nyní dostupná pod názvem Epaxal [34].

Liposomy se uplatňují také v biosenzorech, kde slouží jako převodníky signálu. Díky svému velkému povrchu a vnitřnímu objemu jsou schopny do sebe uzavřít velké množství signálních molekul a tím zesilovat intenzitu signálu. Signálními molekulami mohou být chemiluminiscenční markery, fluorescenční markery, enzymy, cheláty nebo nukleové kyseliny. Kromě zesilovačů signálu mohou liposomy sloužit také jako rozpoznávací prvky, například pro detekci toxinů vylučovaných bakteriemi [35].

### **2.2.2 Klasifikace a příprava liposomů**

Liposomy lze z hlediska jejich průměru a počtu lipidových dvojvrstev (tzv. lamel) rozdělit do několika skupin. Tou první jsou unilamelární vezikuly obsahující pouze jednu dvojvrstvu, které se dále ještě dělí na malé (SUV), velké (LUV) a obří (GUV). Pro výzkum jsou unilamelární vezikuly nejzajímavějším typem liposomu, protože jejich příprava je poměrně snadná a membránové vlastnosti výsledného liposomu jsou dobře popsatelné. Liposomy obsahující více lipidových dvojvrstev se nazývají podle jejich počtu buď oligolamelární (OUV; přibližně 5 lamel) nebo multilamelární vezikuly (MLV; 5–20 lamel). MLV se na rozdíl od unilamelárních vezikul používají více v průmyslových aplikacích než ve výzkumu, a to kvůli odlišným fyzikálním vlastnostem. Poslední skupinou jsou multivezikulární vezikuly (MVV), ve kterých jsou uvnitř uzavřeny další menší liposomy [26,27]. Rozdělení všech typů liposomů podle velikosti a počtu lamel je znázorněno na obrázku 4.



Obrázek 4: Schématické znázornění rozdělení liposomů [26,31]

Existuje mnoho způsobů přípravy liposomů. Při jednotlivých metodách však vznikají liposomy o určitých parametrech, a proto je třeba vybírat způsob přípravy v závislosti na využití získaných liposomů pro konkrétní účel. Například pro aplikace liposomů jako nosiče léčiv je jejich průměr žádoucí v rozmezí 50–200 nm. Proto je obvykle součástí samotné přípravy liposomů i následná sonifikace nebo extruze roztoku přes pórovité membrány z důvodu redukce velikosti a lamelarity [36]. Naopak pro některé aplikace může být výhodné použití liposomů větších velikostí. Existuje metoda pro získání LUV spočívající v rychlém zmrazení SUV a jejich následném pomalém rozmrazování. Při tomto procesu dochází k agregaci SUV a průběžnou sonifikací dojde k roztržení tohoto shluku za vzniku větších LUV [30].

Typickým postupem přípravy liposomů je technika hydratace fosfolipidového filmu. Z roztoku fosfolipidů se za vakua nechá odpařit organické rozpouštědlo, přičemž se na stěně nádoby vytvoří tenký fosfolipidový film. Ten se následně hydratuje vodným roztokem za vzniku suspenze MLV. Z toho roztoku lze dále připravit SUV a LUV extruzí přes polykarbonátové membrány [27].

SUV lze také připravit technikou injekce rozpouštědla. Organické rozpouštědlo obsahující rozpuštěné fosfolipidy (ether nebo ethanol) je rychle vstříkováno do roztoku pufru, přičemž dochází ke spontánní tvorbě SUV. Při injekci ethanolu dochází k jeho rozpouštění ve vodě, a tedy k ředění pod kritickou koncentrací. Tím jsou fosfolipidy donuceny se ve vodné fázi samy shlukovat a vytvářet SUV. V případě injekce etherového

roztoku se SUV ve vodné fázi tvoří z důvodu odpařování etheru. Parametry vzniklých liposomů závisí na koncentraci fosfolipidů v organickém rozpouštědle. Čím je vyšší koncentrace, tím větší velikost a lamelarnitu pozorujeme [36].

Dále byla popsána metoda odpařování reverzní fáze. Ta spočívá v hydrataci roztoku fosfolipidů v organickém rozpouštědle vodným roztokem za stálého míchání. Dochází ke vzniku emulze, z níž je následně za sníženého tlaku odpařena organická fáze [37]. Ve vzniklé vodné suspenzi je obsažena směs LUV a MLV. Nižší koncentrace fosfolipidů ve vodné suspenzi způsobuje vyšší podíl LUV [36].

Liposomy lze připravit i s využitím superkritických fluidních technik. Jednou z nich je metoda využívající superkritické „anti-rozpouštědlo“. Velmi dobré vlastnosti má pro tento účel superkritický oxid uhličitý, který je netoxický, nehořlavý a poměrně levný. Zároveň má nízkou kritickou teplotu i tlak (31 °C; 73,8 bar) a disoluční vlastnosti podobné nepolárním rozpouštědlům. Principem metody je extrakce fosfolipidů z organického rozpouštědla do superkritické fáze, kdy dojde k přesycení lipidů v nadkritickém CO<sub>2</sub> a k jejich následnému vysrážení. Poté se odstraní organické rozpouštědlo kontinuálním přiváděním CO<sub>2</sub> za vzniku velmi jemných lipidových částic. Nakonec přidáním vodné fáze získáme liposomy. Výhodou této metody je absence zbytkového organického rozpouštědla ve výsledném produktu [38].

## 2.3 Studované látky

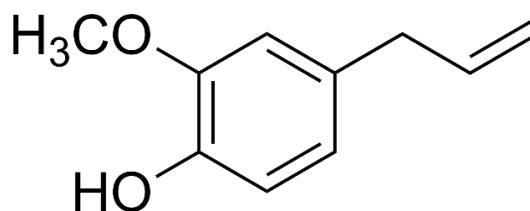
Studovanými látkami byly eugenol, thymol a karvakrol. V tabulce 1 jsou pro přehled shrnuty některé fyzikálně-chemické vlastnosti těchto sloučenin. Všechny hodnoty jsou uvedeny pro teplotu 25 °C.

Tabulka 1: Fyzikálně-chemické vlastnosti eugenolu, thymolu a karvakrolu [39–41]

	Eugenol	Thymol	Karvakrol
Molární hmotnost (g/mol)	164,20	150,22	150,22
Teplota varu (°C)	253,2	232,5	237,7
Teplota tání (°C)	-9,1	51,5	1,0
Rozpustnost ve vodě (g/l)	2,460	0,098	1,250
Disociační konstanta p <i>K</i> <sub>a</sub>	10,19	10,62	10,42
Rozdělovací koeficient log <i>K</i> <sub>ow</sub> (experimentálně stanovený)	2,27	3,30	3,49

### 2.3.1 Eugenol

Eugenol, systematickým názvem 4-allyl-2-methoxyfenol, je fenolická sloučenina běžně se vyskytující v hřebíčku, méně pak také ve skořici, bazalce a muškátovém oříšku. Jeho struktura je zobrazena na obrázku 5. Eugenol je zodpovědný za typickou vůni hřebíčku a získává se ve formě esenciálního oleje izolací ze stromu *Eugenia carophyllata* (Hřebíčkovec kořený). Vzhledem se jedná o světle žlutou kapalinu [42].



Obrázek 5: Struktura eugenolu

Eugenol se velmi často využívá jako dochucovací látka při pečení, vaření, do nápojů, je obsažen v cukrovinách, mražených mléčných výrobcích a také v kosmetice [42]. Farmakologické studie u eugenolu prokázaly antistresové, antimykotické, antigenotoxické a antikarcinogenní účinky [43]. Dále se používá v zubní praxi pro úlevu od bolesti například při přecitlivělosti zubů nebo zánětů zubní dřeně. Kromě svých analgetických účinků však může působit i dráždivě a připomíná účinky kapsaicinu [44].

Eugenol navíc vykazuje vynikající baktericidní účinky proti celé řadě organismů. Mechanismem baktericidního účinku je narušení cytoplazmatické membrány bakterie, čímž dochází ke zvýšení její permeability. Následuje rozsáhlý únik iontů a dalších buněčných složek včetně intracelulárních proteinů, což ve výsledku způsobuje buněčnou smrt [45].

G. N. Reiner a kol. testovali lipofilní vlastnosti pěti různých fenolických látek (eugenol, thymol, karvakrol, propofol, chlorothymol) působících na receptory GABA<sub>A</sub>. Tyto receptory jsou iontovými kanály, které zprostředkovávají rychlou synaptickou inhibici v centrálním nervovém systému. Zmíněné látky pak na tento receptor působí jako allosterické modulátory, případně při vyšších koncentracích mají přímý účinek na otevření kanálu. Testovanými parametry byly rozdělovací koeficient  $\log K_{ow}$ , retenční data z HPLC za použití stacionární fáze C18 a IAM (imobilizovaná umělá fosfolipidová membrána) a rozdělovací koeficienty ve fosfolipidových liposomech. Rozdělovací koeficienty byly stanovovány v systémech oktanol-voda a liposom-pufr, matematickou kalkulací z atomových příspěvků a metodou shake-flask s následným spektrofotometrickým stanovením. Rozdělovací koeficienty eugenolu, thymolu a karvakrolu určené v systému

lecitin-pufr (tzn. fosfolipid-pufr) jsou uvedeny v tabulce 2. Výsledky korelace všech výše zmíněných veličin prokázaly vysokou schopnost daných látek interagovat s fosfolipidovými membránami. Současně bylo zjištěno, že hodnoty získané měřením na koloně IAM byly kvantitativně nejbližší rozdělovacím koeficientům stanoveným v liposomech. Důvodem je schopnost kolony IAM zprostředkovat stejné molekulární interakce, jako jsou ve fosfolipidových membránách. Také skutečnost, že všechny sledované látky interagují s membránami, naznačuje změnu lipidového prostředí kolem GABA<sub>A</sub> receptoru způsobenou právě touto interakcí. Tato zjištění dále pomohou při studiu působení různých léčiv, toxických látek a kovů na funkci tohoto receptoru [46].

Tabulka 2: Rozdělovací koeficienty určené v systému lecitin-pufr ( $\log P_{lec-b}$ ) [46]

	Eugenol	Thymol	Karvakrol
$\log P_{lec-b}$	2,20	2,90	2,76

M. Chen a kol. zkoumali pomocí rozdělovacích koeficientů vliv teploty na uvolňování eugenolu a isoeugenolu z SPI filmu (film na bázi izolovaného sójového proteinu) do olivového oleje metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) se spektrofotometrickou detekcí. Bylo prokázáno, že filmy nesoucí tyto dvě látky mají určitou antibakteriální aktivitu, a proto se používají např. pro balení ovoce, zeleniny, nebo masných výrobků. Pro analýzu byla použita reverzní fáze C18 s parametry 150 mm × 4,6 mm a vlnová délka byla nastavena na 280 nm. Byla použita gradientová eluce s průtokem 1 ml/min. Počáteční složení mobilní fáze (MF) bylo 25 % acetonitril:75 % voda a konečné složení MF bylo 50 % acetonitril:50 % voda. Rozdělovací koeficienty byly vypočteny jako podíl koncentrace látek v SPI filmu a v simulované potravíně, tzn. v oleji. Bylo zjištěno, že rozdělovací koeficienty lineárně klesaly s teplotou v rozmezí 5 °C–60 °C. Tyto výsledky jsou důležité v mnoha aplikacích, jako je řízené uvolňování léčiv nebo konzervování potravin, kde se sleduje migrace aditiv z potravinových obalů do samotných potravin, např. při teplotách v chladničce nebo pokojových teplotách. Olivový olej pak slouží jako simulační model dané potraviny [47].

Stanovení eugenolu metodou HPLC popisuje také M. Osanloo a kol. Ve své studii srovnávali larvicidní aktivitu esenciálního oleje z hřebíčku s aktivitou čistého eugenolu proti komárům *Anopheles stephensi*, kteří jsou přenašeči malárie. Analýza byla provedena na reverzní stacionární fázi C18 s parametry 300 mm × 3,9 mm. Spektrofotometrická detekce probíhala při vlnové délce 280 nm. Mobilní fází byla směs methanol:voda v poměru

80:20 (v/v) a průtok byl nastaven na 1 ml/min. Výsledky studie ukázaly, že použití esenciálního oleje jako larvicidu je vhodnější než použití samotného eugenolu. Důvodem je jeho nižší cena a také fakt, že se skládá z několika různých složek a je u něj tedy menší riziko vzniku rezistence [48].

Yun a kol. vyvinuli a validovali postup pro stanovení eugenolu v hřebíčku metodou HPLC s detektorem diodového pole. Jako mobilní fáze byla testována směs methanol:voda s různým procentuálním zastoupením obou složek, přičemž jako nejvhodnější se jevil poměr 60:40 (v/v). Byla použita isokratická eluce a kolona s reverzní fází C18 a parametry 250 mm × 4,6 mm. Průtoková rychlost byla nastavena na 0,8 ml/min a teplota kolony byla udržována na 30 °C. UV detekce byla provedena při vlnové délce 280 nm. Bylo zjištěno, že metoda je lineární v rozmezí 12,5–1000 ng/ml s velmi vysokým koeficientem determinace ( $R^2 > 0,9999$ ). Byla stanovena celková průměrná výtěžnost eugenolu 103,7 % s relativní směrodatnou odchylkou (RSD) 0,52 %. Dále byla stanovena mez detekce (LOD) eugenolu 0,81 ng/ml a mez stanovitelnosti (LOQ) 2,47 ng/ml [49].

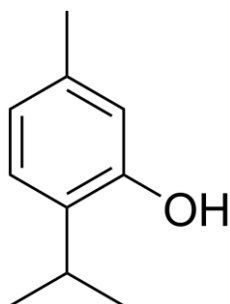
### 2.3.2 Thymol

Thymol je monoterpenový fenol, který je hlavní složkou olejů extrahovaných z mnoha bylin jako je tymián, oregano a saturejka horská. Systematicky se jedná o 2-isopropyl-5-methylfenol (obrázek 6) [50]. Má antibakteriální, protizánětlivé a antimykotické účinky a lze jej použít také jako lokální anestetikum [51]. Často se využívá jako vonná složka v kosmetických přípravcích a osvěžovačích vzduchu, dále pak jako insekticid, fungicid a také jako konzervant v léčivech [52].

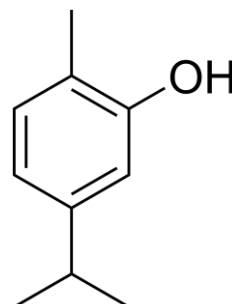
Podobně jako v případě eugenolu byla i pro thymol provedena studie, kdy byl testován vliv teploty na jeho uvolňování z SPI filmu do olivového oleje. HPLC podmínky byly totožné s výjimkou vlnové délky, kdy se měřilo při 230 nm. Stejně tak rozdělovací koeficienty byly vypočteny stejným způsobem. Bylo dosaženo stejných výsledků a rozdělovací koeficienty opět klesaly s rostoucí teplotou [53].

T. Angelo a kol. popsali a validovali jednoduchou a přesnou HPLC metodu stanovení thymolu pro účely studia kožní penetrace, např. pro kosmetické nebo dermatologické přípravky. Pro validační testy byla zvolena separace na reverzní fází C18 (300 mm × 3,9 mm). Byla testována různá složení MF a rychlosti průtoku, přičemž jako nejvhodnější byla zvolena MF o složení acetonitril:voda v poměru 35:65 (v/v) a průtok 1,5 ml/min. Spektrofotometrická detekce probíhala při vlnové délce 278 nm. Byla stanovena

mez detekce 0,05 µg/ml a mez stanovitelnosti 0,14 µg/ml. Linearita byla prokázána v rozmezí koncentrací 0,5–15,0 µg/ml. Metoda je robustní a její výtěžnost z kožních vrstev převyšuje 90 %. Validace ověřila, že metoda je vhodná pro selektivní stanovení thymolu i přes přítomnost možných interferentů v kožní matrici [54].



Obrázek 6: Struktura thymolu



Obrázek 7: Struktura karvakrolu

### 2.3.3 Karvakrol

Karvakrol (5-isopropyl-2-methylfenol) je strukturním izomerem thymolu a je obsažen v esenciálních olejích získávaných z oregana, tymiánu, majoránky a saturejky zahradní. Jeho strukturu lze vidět na obrázku 7. Karvakrol má dále také antimutagení, protinádorové a antigenotoxické účinky [55]. Stejně jako thymol má i výrazné antimikrobiální účinky a působí proti bakteriím, kvasinkám a plísním [56]. Vzhledem k těmto vlastnostem nalézají obě látky stejně jako eugenol využití ve výrobě aktivních potravinových obalů působících proti růstu škodlivých patogenů v potravině [57]. V samotných potravinách pak slouží i jako konzervanty a dochucovadla [52,56].

Mechanismus jejich antibakteriálního účinku je stejný jako v případě eugenolu [58,59]. Také bylo zjištěno, že na antibakteriální aktivitu všech tří látek má největší vliv rozdělovací koeficient. Čím je hodnota  $\log K$  vyšší, tím účinnější je inhibice bakteriálního růstu [60].

Thymol i karvakrol mají silné antioxidační účinky. Jsou schopny inhibovat peroxidaci lipidů, která je způsobena volnými radikály a vede k oxidační destrukci buněčných membrán. To zapříčiní buněčnou smrt a dochází ke vzniku toxických metabolitů a dalších volných radikálů, které reagují s dalšími molekulami lipidů a vzniká řetězová reakce [61].

Vzhledem ke strukturním podobnostem karvakrolu s thymolem a jejich současnému výskytu v přírodních látkách jsou často popisovány studie, kde se obě látky stanovují

najednou. Příkladem je optimalizace HPLC metody pro jejich stanovení ve standardech a následně v tymiánové tinktuře. Jako stacionární fáze byla použita C18 s parametry 250 mm × 4,6 mm. Eluce probíhala v isokratickém módu s MF o složení acetonitril:voda v poměru 50:50 (v/v) a s průtokem 1 ml/min. Spektrofotometrický detektor pracoval při vlnové délce 274 nm. I přes podobné retenční časy obou látek došlo k velmi dobrému rozlišení jejich píků v chromatogramu. Byly stanoveny LOD a LOQ pro obě látky. Pro thymol byla hodnota LOD 0,17 ng/ml a LOQ 0,567 ng/ml a pro karvakrol byla hodnota LOD 0,161 ng/ml a LOQ 0,535 ng/ml. Výhodou metody je, že nevyžaduje komplikovanou přípravu vzorku a lze ji použít pro standardní kontroly obsahu thymolu a karvakrolu v daném produktu [62].

Další navržená metoda pro stanovení karvakrolu a thymolu popisuje HPLC systém s reverzní fází C18 (250 mm × 4,6 mm) a UV detekcí při 277 nm. Jako MF byla testována směs methanolu (MeOH) a vody v různých poměrech. Také byl zkoumán vliv přídavku tetrahydrofuranu (THF) do MF na rozlišení. Bylo zjištěno, že při použití samotné směsi MeOH a vody nebylo možné dostatečně rozlišit oba píky a proto jako nejvhodnější byla zvolena MF o složení MeOH:H<sub>2</sub>O:THF (50:50:22). Průtok MF byl nastaven na 1 ml/min. Tato metoda byla využita pro stanovení obou látek v tymiánu jakožto surovém materiálu pro případnou výrobu léčiv [63].



## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Přístrojové vybavení

Všechny analýzy byly provedeny na HPLC přístroji série UltiMate 3000 (Thermo Scientific Dionex) s UV detektorem a softwarem Chromeleon 7. Byla použita kolona Phenomenex Gemini 5 U C18 (150 mm × 4.6 mm × 5 μm).

Pro veškeré navážky byly použity váhy XSE205 Dual Range (Mettler Toledo, Columbus, Ohio, USA).

### 3.2 Použité chemikálie

Jako zdroj fosfolipidů pro tvorbu liposomů v roztoku byl použit asolectin (Fluka, Buchs, Švýcarsko). Jedná se o směs fosfolipidů, která se získává ze sójových bobů. Asolectin obsahuje zhruba stejné podíly lecitinu (~25 %), cefalinu a fosfatidylinositolu spolu s malými množstvími jiných fosfolipidů a polárních lipidů. Zastoupení mastných kyselin je asi 24 % nasycených, 14 % mononenasycených a 62 % polynenasycených mastných kyselin.

Analyzovanými sloučeninami byly karvakrol 99 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), thymol (Merck, Kenilworth, New Jersey, USA) a eugenol 99 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo).

Další použitou chemikálií byl methanol pro HPLC (Honeywell, Charlotte, Severní Karolína, USA) jako složka mobilní fáze.

### 3.3 Příprava roztoků

Všechny roztoky byly připraveny z výše zmíněných chemikálií rozpuštěním příslušného množství dané látky v deionizované vodě (Milipore, 18,2 MΩ). Roztok asolectinu měl koncentraci 8 g/l. Pro analýzu eugenolu byly připraveny zásobní roztoky o koncentracích 10, 25, 50, 100, 250 a 500 μg/ml. Zásobní roztoky thymolu a karvakrolu měly koncentraci 500 μg/ml. Z důvodu zhoršené rozpustnosti thymolu ve vodě bylo nutné pro jeho úplné rozpuštění připravený roztok zahřát, případně sonifikovat v ultrazvukové lázni (Sonic 6, Polsonic, Varšava, Polsko). Ze zásobních roztoků pak byly připraveny kalibrační řady v rozsahu koncentrací 1–40 μg/ml pro všechny tři látky.

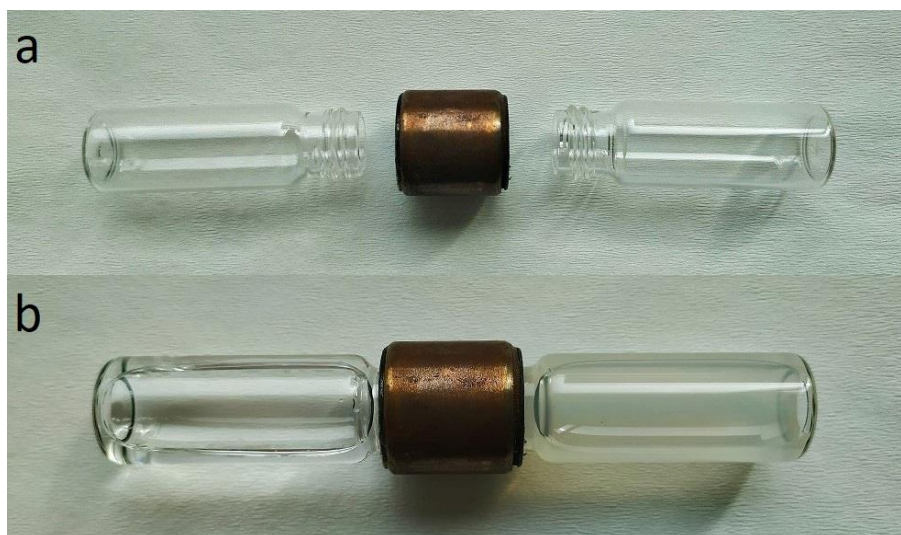
Roztok asolectinu byl připraven nejprve rozpuštěním odpovídajícího množství látky v menším objemu vody. Následně byl roztok po dobu 48 hodin třepán na třepačce

Vibramax 100 (Heidolph, Schwabach, Německo) rychlostí 100 rpm a nakonec byl doplněn deionizovanou vodou po rysku.

### 3.4 Experimentální postupy

#### 3.4.1 Sestavení rozdělovací aparatury

Aby bylo možné stanovit rozdělovací koeficienty v systému liposom-voda, bylo zapotřebí vyrobit aparaturu oddělující vodnou fázi a fázi obsahující liposomy s analyzovanou látkou. Tato aparatura (obrázek 8) byla složena ze dvou 4ml vialek spojených šroubovacími víčky N13 s otvorem o průměru 8,8 mm, která byla k sobě slepena epoxidovým lepidlem a vložena do kovového nebo plastového pouzdra. Byl použit epoxid značky Epoxiceys standard (Ceys, Český Brod, Česká republika). Z jedné strany byl otvor ve víčku překryt membránou umožňující permeaci analytů z prostředí jedné vialky do druhé. Požadovaný kruhový tvar membrány s průměrem 13 mm byl získán vyřezáním pomocí korkovrtu. Byly použity nylonová membrána s průměrem pórů 0,2  $\mu\text{m}$  (Hahnemühle, Dassel, Německo), dialyzační celulosová membrána Fisherbrand s MWCO 3500 Dalton (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) a polykarbonátová (PC) Nuclepore Track-Etched membrána s velikostí pórů 0,05  $\mu\text{m}$  (Whatman, Maidstone, Velká Británie).



Obrázek 8: a) Jednotlivé části rozdělovací aparatury, b) složená rozdělovací aparatura s roztokem asolectinu a roztokem analytu v pravé části a deionizovanou vodou v levé části

Do jedné vialky byl napipetován objem 2,8 ml roztoku asolectinu a 0,4 ml zásobního roztoku analyzované látky. Výsledný objem ve vialce byl tedy 3,2 ml. Pro srovnání byla provedena také analýza slepých pokusů, u kterých byl roztok asolectinu nahrazen 2,8 ml

deionizované vody. Ve druhé vialce bylo vždy 3,2 ml deionizované vody. Vialky byly zašroubovány spojeným víčkem a připravená aparatura byla upevněna na třepačce, kde byly vzorky třepány rychlostí 150 rpm po různou dobu v rozmezí 1–48 hodin. Analyzovány pak byly vždy pouze vodné roztoky u vzorků s přidáním asolectinem a u slepých pokusů roztoky z obou vialek.

### **3.4.2 Časová závislost rozdělování eugenolu**

Pro eugenol byl proveden experiment, kdy byl sledován vliv doby třepání na ustavení rovnováhy mezi oběma fázemi. Celkově bylo testováno 7 různých dob třepání, konkrétně 1, 4, 10, 17, 24, 36 a 48 hodin. Pro tento experiment byla vybrána koncentrace zásobního roztoku eugenolu 500 µg/ml odpovídající jeho celkové počáteční koncentraci ve vialce 62,5 µg/ml. Byly použity membrány z nylonu a celulosy.

### **3.4.3 Koncentrační závislost rozdělování eugenolu**

Bylo testováno, zda mají různé koncentrace zásobního roztoku eugenolu vliv na výsledný rozdělovací koeficient. Byly připraveny koncentrace zásobního roztoku 10, 25, 50, 100, 250 a 500 µg/ml. Výsledné vstupní koncentrace analytu ve vialce s asolectinem pak byly 1,25, 3,125, 6,25, 12,5, 31,25 a 62,5 µg/ml. Pro tento účel byla vybrána doba třepání 48 hodin. Experiment byl proveden za použití nylonové a celulosové membrány.

### **3.4.4 Stanovení rozdělovacích koeficientů**

Zásobní roztoky dávkované do vialek měly koncentraci 500 µg/ml (koncentrace ve vialce 62,5 µg/ml) pro všechny tři látky. Rozdělovací aparatury byly třepány po dobu 48 hodin, použité membrány byly z nylonu a celulosy. Rozdělovací aparatury byly připraveny v pěti opakováních jak pro vzorky s asolectinem, tak i pro slepé pokusy.

### **3.4.5 Podmínky HPLC analýzy**

Pro všechny analyzované látky bylo nejprve testováno optimální složení mobilní fáze s různým poměrem složek methanolu a vody. Pro analýzu eugenolu byla vybrána mobilní fáze o složení methanol:voda v poměru 60:40 (v:v). Při analýze karvakrolu a thymolu byl poměr obou složek 70:30 (v:v). Průtok MF byl nastaven na 0,3 ml/min. Vzorek byl do přístroje dávkován mikrostříkačkou Hamilton (Chromservis, Praha, Česká republika). Dávkovaný objem byl 10 µl.

Spektrofotometrická detekce eugenolu probíhala při vlnové délce 280 nm. Tato hodnota byla zvolena pro její časté použití v dřívějších studiích zaměřujících se na eugenol, které jsou popsány v rešeršní části této práce. Pro karvakrol byla vybrána vlnová délka 273 nm a pro thymol 274 nm. Tyto hodnoty byly zvoleny jako absorpční maxima po proměření UV spektra obou látek (příloha 1).

### 3.4.6 Výpočet rozdělovacích koeficientů

Rozdělovací koeficienty všech látek byly vypočteny podle následujícího postupu. Analýzou slepých pokusů byl zjištěn obsah sledované látky v obou vodných roztocích oddělených membránou. Odečtením tohoto množství od celkového vstupního množství látky v roztoku  $m_c$  (přidaného do vialky s liposomální fází) se získá množství látky zachycené na membráně  $m_z$ .

Ve vodné fázi oddělené membránou od liposomální fáze byla stanovena koncentrace dané látky  $c_w$ . Tato koncentrace se dle předpokladu po ustavení rovnováhy rovná koncentraci volné látky ve vodné fázi ve vialce s liposomy  $c_w$ . Z této koncentrace bylo pro danou látku vypočteno její množství ve vodné fázi za membránou  $m_w$ . Množství látky uzavřené v liposomech  $m_l$  se pak zjistí odečtením celkového množství látky ve vodné fázi na obou stranách membrány ( $2m_w$ ) a množství zachyceného na membráně  $m_z$  od celkového vstupního množství přidané látky v roztoku  $m_c$ .

Z hustoty a koncentrace asolectinu byl spočítán objem liposomů ve vialce ( $V_l$ ). Nakonec byla vypočtena koncentrace látky v liposomech ( $c_l$ ) jako podíl množství látky uvnitř liposomů ( $m_l$ ) a objemu liposomů ( $V_l$ ). Výsledný rozdělovací koeficient se pak získá jako podíl koncentrace látky v liposomech a koncentrace volné látky ve vodné fázi. Pro popsany výpočet platí následující rovnice:

$$c_l = \frac{m_l}{V_l} = \frac{m_c - m_z - 2m_w}{V_l} \quad (7)$$

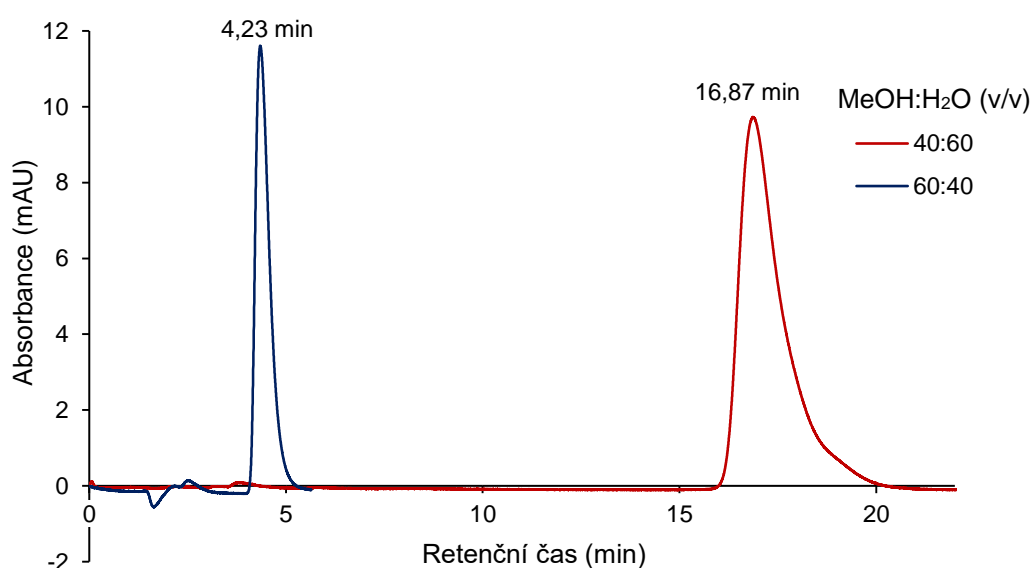
$$\log K_{lw} = \log \frac{c_l}{c_w} \quad (8)$$

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1 Optimalizace složení mobilní fáze

#### 4.1.1 Eugenol

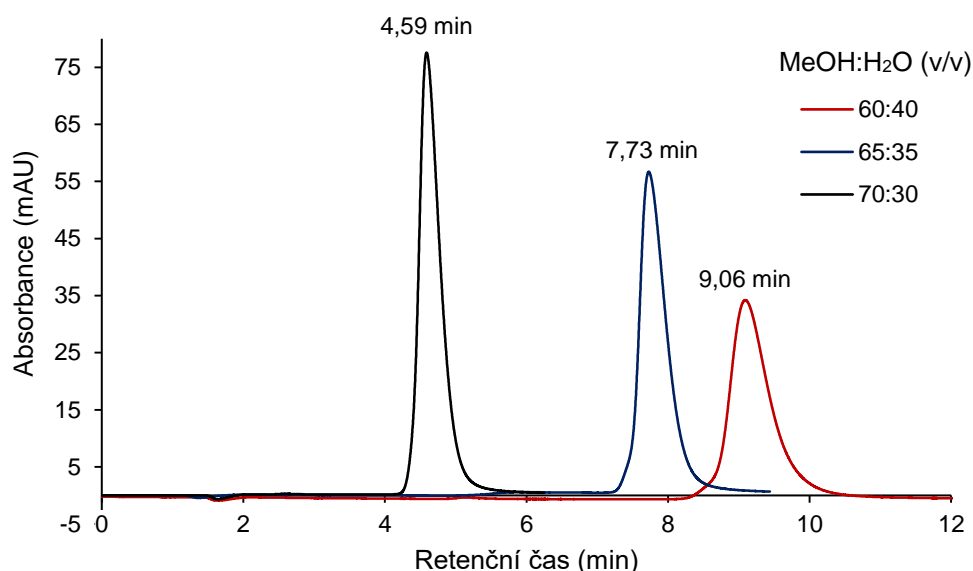
Pro eugenol byla nejprve testována MF v poměru methanolu a vody 40:60 (v/v). Retenční čas se při této analýze pohyboval kolem 17. minuty (obrázek 9). Při použití MF s obráceným poměrem složek bylo dosaženo mnohem nižší retence analytu (necelých 5 minut). Pro následující analýzy bylo tedy vybráno složení MF v poměru 60:40 (MeOH:H<sub>2</sub>O; v/v).



Obrázek 9: Chromatogramy eugenolu při různém složení MF

#### 4.1.2 Thymol

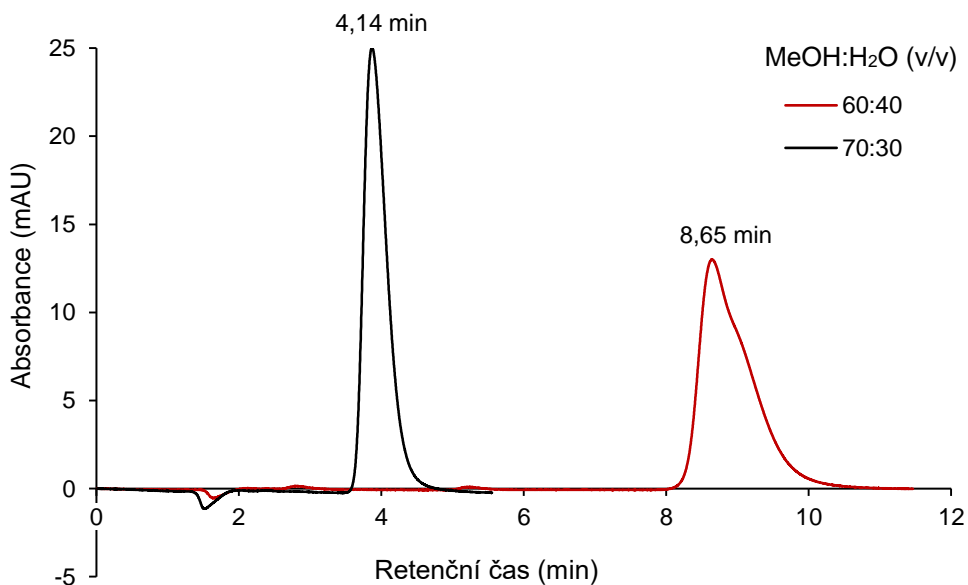
Pro thymol byla testována tři různá složení mobilní fáze. Při analýze s poměrem složek MF 60:40 (v/v) byla retence thymolu nejvyšší a pohybovala se kolem 9. minuty. S rostoucím obsahem methanolu docházelo jako u eugenolu ke zvyšování eluční síly MF a při poměru 65:35 se retenční čas snížil o necelé 2 minuty. Optimálního retenčního času bylo dosaženo s MF o složení MeOH:H<sub>2</sub>O v poměru 70:30 (v/v). Naměřené chromatogramy lze vidět na obrázku 10.



Obrázek 10: Chromatogramy thymolu při různém složení MF

#### 4.1.3 Karvakrol

Testování retence karvakrolu vycházelo z výsledků optimalizace MF pro thymol. Byla vyzkoušena MF o složení MeOH:H<sub>2</sub>O v poměru 60:40 pro kontrolu s retenčními časy thymolu. Vzhledem k jejich podobnosti (obrázek 11) byl vynechán test MF s poměrem 65:35 a rovnou byla testována MF o složení MeOH:H<sub>2</sub>O v poměru 70:30 (v/v). Tato MF byla také pro analýzu karvakrolu zvolena jako nejvhodnější a retenční čas byl přibližně 4 minuty.



Obrázek 11: Chromatogramy karvakrolu při různém složení MF

## 4.2 Kalibrační meze

V tabulce 3 jsou uvedeny parametry regresních kalibračních přímek. Z těchto parametrů byly vypočteny meze detekce a meze stanovitelnosti. Pro oba výpočty platí následující dvě rovnice:

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot s_b}{a} \quad (9)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot s_b}{a} \quad (10)$$

kde  $a$  je směrnice přímky a  $s_b$  je výběrový odhad směrodatné odchylky úseku přímky. Kalibrace byla lineární v koncentračním rozsahu 1–40  $\mu\text{g/ml}$ .

*Tabulka 3: Parametry regresních kalibračních přímek eugenolu, thymolu a karvakrolu s vypočtenými limity detekce a stanovitelnosti*

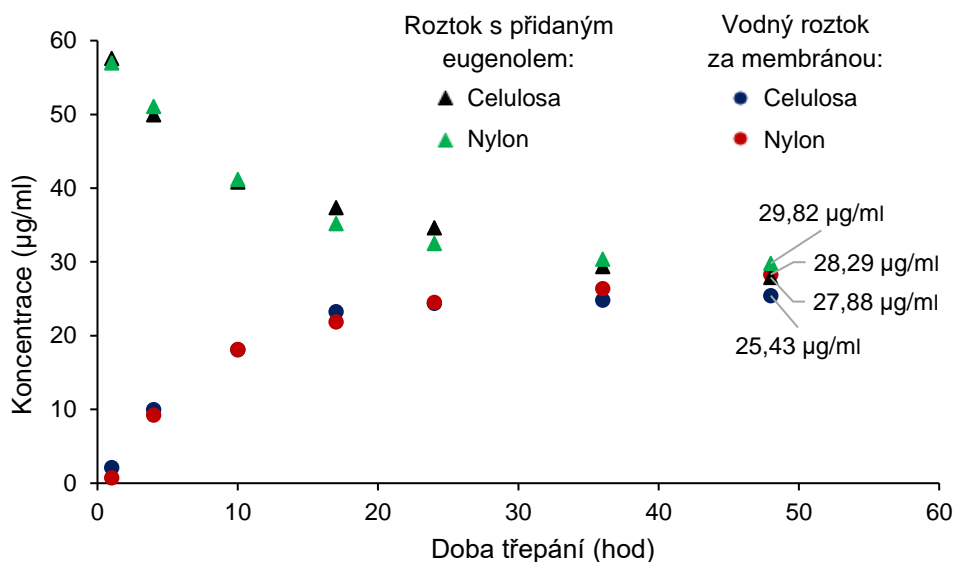
	Směrnice (mAU.s.ml/ug)	Úsek (mAU.s)	R	LOD ( $\mu\text{g/ml}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/ml}$ )
Eugenol	$0,5340 \pm 0,0017$	$0,0268 \pm 0,0330$	1	0,1854	0,6181
Thymol	$0,4166 \pm 0,0044$	$0,1239 \pm 0,0837$	0,9997	0,6025	2,0084
Karvakrol	$0,3350 \pm 0,0031$	$0,1420 \pm 0,0579$	0,9998	0,5181	1,7270

## 4.3 Výběr vhodného typu membrány pro rozdělování

Byla testována možnost použití všech tří typů membrán (nylonová, celulosová, PC) pro rozdělovací experimenty. Pomocí MS a GC/MS byl sledován průchod asolectinu přes zmíněné membrány po 24hodinovém třepání. Bylo zjištěno, že přes PC membránu prochází přibližně 80krát více asolectinu než přes membrány z nylonu a celulosy, což není žádoucí pro následnou analýzu sledovaných látek. Pro stanovení rozdělovacích koeficientů byly tedy použity pouze nylonové a celulosové membrány. Veškeré postupy a výsledky těchto experimentů jsou popsány v pracích Bc. Radka Jergy [64] a Bc. Veroniky Taláškové [65]. Na tyto práce bude odkazováno ještě v kapitole 4.7 při srovnání metod HPLC, GC/MS a voltametrických metod pro stanovení rozdělovacích koeficientů.

## 4.4 Časová závislost rozdělování eugenolu

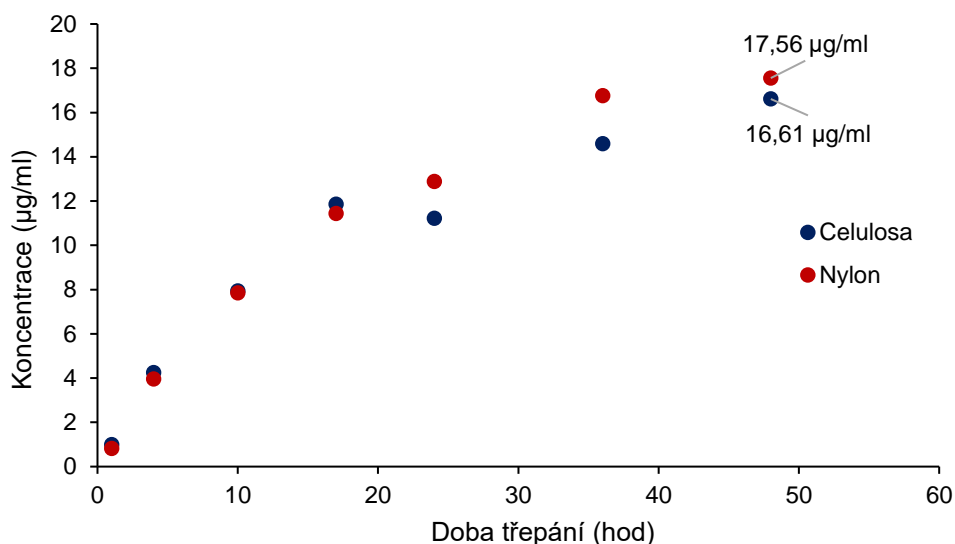
Byl testován vliv doby třepání na ustavení rozdělovací rovnováhy eugenolu mezi fázemi v obou vialkách. Testované třepací časy byly 1, 4, 10, 17, 24, 36 a 48 hodin. Počáteční koncentrace eugenolu přidaného do vody v jedné z vialek při slepém pokusu byla 62,5 µg/ml. Na obrázku 12 lze vidět klesající závislost koncentrace eugenolu ve vialce s přidaným eugenolem při slepém pokusu na době třepání. Snižování koncentrace je způsobeno průchodem eugenolu přes membránu do vody ve druhé vialce. Opačný trend lze pozorovat u roztoku ve druhé vialce, kde byla na počátku experimentu pouze voda. Zde koncentrace eugenolu s rostoucím časem narůstá. Analyzována byla také vodná fáze vzorků obsahujících ve vialce s eugenolem i asolectin, kde docházelo k podobnému nárůstu koncentrace jako u slepého pokusu ve vodném roztoku za membránou (obrázek 13).



Obrázek 12: Koncentrace eugenolu při slepém pokusu v roztoku s přidaným eugenolem a ve vodném roztoku za membránou po různých dobách třepání

Z výsledků experimentu lze usoudit, že nejvhodnější dobou třepání bylo 48 hodin. Kratší třepací časy nestačily na ustavení rovnováhy, což je patrné z grafů na obrázku 12, kdy až po 48 hodinách třepání došlo k dostatečnému vyrovnání koncentrací v roztocích oddělených membránou. Dané koncentrace jsou v grafech vyznačeny. Také lze konstatovat, že dosažené výsledky jsou srovnatelné pro oba použité typy membrán.





Obrázek 13: Koncentrace eugenolu ve vialce s vodným roztokem při rozdělování mezi asolectin a vodu v závislosti na době třepání

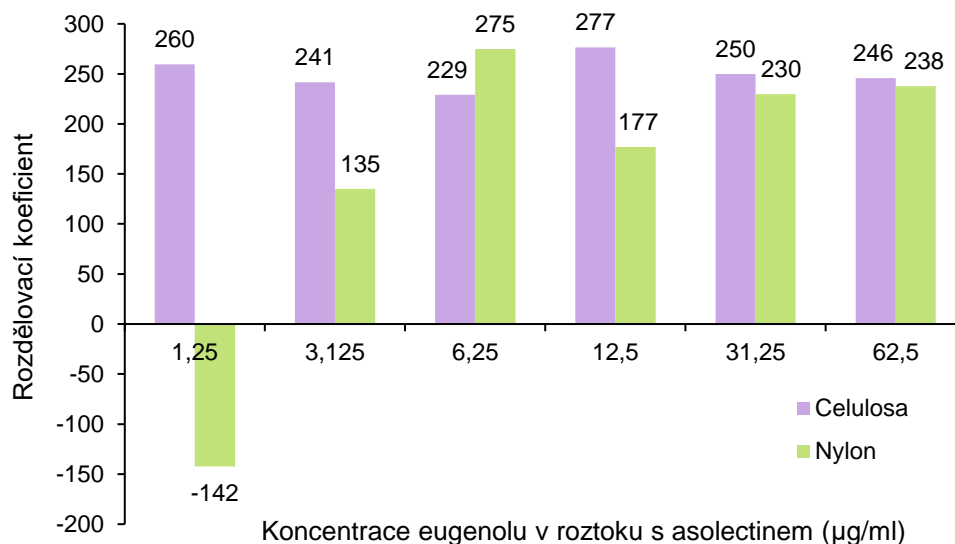
V tabulce 4 jsou uvedeny logaritmy rozdělovacích koeficientů pro jednotlivé časy třepání. Tyto hodnoty také ukazují, že optimální dobou potřebnou pro dosažení rovnováhy je 48 hodin. Rozdělovací koeficienty v tomto čase dosáhly hodnot  $\log K_{lw} = 2,25$  pro celulosovou membránu a  $\log K_{lw} = 2,28$  pro nylonovou membránu, což přibližně odpovídá rozdělovacímu koeficientu eugenolu v systému oktanol-voda ( $\log K_{ow} = 2,27$ ).

Tabulka 4: Logaritmované hodnoty rozdělovacích koeficientů eugenolu vypočtené pro různé doby třepání

Doba třepání (hod)		1	4	10	17	24	36	48
Log $K_{lw}$	Celulosa	3,93	3,25	2,90	2,66	2,68	2,40	2,25
	Nylon	4,00	3,29	2,91	2,64	2,55	2,31	2,28

#### 4.5 Koncentrační závislost rozdělování eugenolu

Byla testována závislost rozdělovacích koeficientů eugenolu na celkové koncentraci eugenolu v roztocích s asolectinem. Počáteční koncentrace eugenolu byly 1,25, 3,125, 6,25, 12,5, 31,25 a 62,5 µg/ml. Z výsledků předchozího experimentu byla zvolena doba třepání 48 hodin. Všechna měření byla provedena ve dvou opakováních a rozdělovací koeficienty byly vypočteny z jejich průměru.



Obrázek 14: Závislost rozdělovacích koeficientů na počátečních koncentracích eugenolu v roztoku s asolectinem

Při rozdělování přes celulosovou membránu byly výsledné rozdělovací koeficienty vzájemně velmi blízké (obrázek 14). Pohybovaly se kolem průměrné hodnoty 250 ( $\log K_{lw} = 2,40$ ) s relativní směrodatnou odchylkou 6,49 %. Za použití nylonové membrány se již hodnoty rozdělovacích koeficientů pro jednotlivé koncentrace poměrně lišily. Relativní odchylka pro hodnoty  $K_{lw}$  byla 26,06 % a po zlogaritmování byl průměr  $\log K_{lw} = 2,31$ . Vypočtený  $\log K_{lw}$  sice více odpovídá rozdělovacímu koeficientu eugenolu v systému oktanol-voda ( $\log K_{ow} = 2,27$ ) ve srovnání s celulosovou membránou, avšak relativní odchylky naznačují, že hodnoty  $K_{lw}$  i  $\log K_{lw}$  byly pro jednotlivé koncentrace velice proměnlivé.

Při nejnižší koncentraci zásobního roztoku 10 µg/ml (počáteční koncentrace ve vialce byla 1,25 µg/ml) byl získán záporný rozdělovací koeficient  $K_{lw} = -142,19$ . Tato hodnota byla z výpočtu průměru a RSD vynechána. Důvodem záporné hodnoty může být nežádoucí průnik asolectinu přes nylonovou membránu do vialky s vodou. Obsah asolectinu, který projde přes membránu, zpravidla nepřesahuje 1 % z celkového množství asolectinu dávkovaného do roztoku [66]. Přítomnost asolectinu v analyzovaném roztoku se projevila širokým píkem, který částečně koeluoval s píkem eugenolu a znemožnil správnou kvantifikaci volného eugenolu ve vodné fázi. Domněnku, že interferující pík souvisí s přítomností asolectinu, potvrdila absence tohoto píku v chromatogramech slepých pokusů provedených s roztokem eugenolu bez asolectinu. Při průchodu asolectinu přes membránu do druhé vialky mohlo také dojít ke zvýšení množství eugenolu v analyzovaném vodném

roztoku. Po dosažení nadhodnoceného množství  $m_w$  do rovnice 7 byla výsledkem záporná koncentrace  $c_l$  a tedy i záporná hodnota  $K_{lw}$ . Rozdělování přes nylonovou membránu tedy poskytuje méně opakovatelné výsledky než u celulosy.

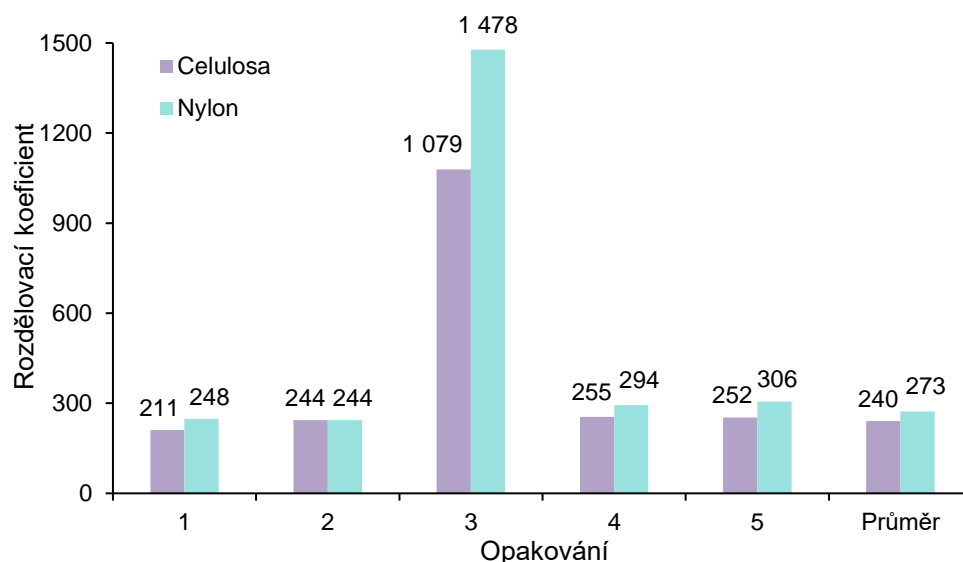
U koncentrací 3,125  $\mu\text{g/ml}$  a 12,5  $\mu\text{g/ml}$  byly pozorovány nižší hodnoty  $K_{lw}$  oproti ostatním koncentracím. Zde se mohl vyskytovat stejný problém s asolectinem, případně mohlo dojít i k chybě při přípravě roztoků pro experiment. Rozdělovací koeficienty pro koncentrace 6,25  $\mu\text{g/ml}$ , 31,25  $\mu\text{g/ml}$  a 62,5  $\mu\text{g/ml}$  jsou pak srovnatelné jak mezi sebou, tak i s výsledky získanými při použití celulosové membrány. Obecně lze tedy říci, že se zvyšující se koncentrací dochází ke snížení rozdílů vypočtených rozdělovacích koeficientů mezi oběma membránami.

Z tohoto experimentu lze tedy usuzovat, že použití celulosové membrány je pro určení rozdělovacích koeficientů vhodnější než membrána nylonová. Důvodem je její nižší propustnost pro asolectin a také větší nezávislost  $K_{lw}$  na koncentraci dávkovaného roztoku eugenolu. I přes tato zjištění byly však pro srovnání v dalších experimentech použity oba typy membrán. Koncentrace eugenolu 62,5  $\mu\text{g/ml}$  byla vybrána jako nejvhodnější pro další experimenty, protože při této koncentraci byl v porovnání s ostatními koncentracemi rozdíl v rozdělovacích koeficientech získaných s oběma membránami nejmenší.

## 4.6 Stanovení rozdělovacích koeficientů

### 4.6.1 Eugenol

Na obrázku 15 je znázorněn graf s hodnotami rozdělovacích koeficientů eugenolu zjištěných pro každé z pěti opakování rozdělovacího experimentu. Z grafu je patrné, že kromě vzorků č.3 bylo dosaženo poměrně opakovatelných výsledků, což je zapříčiněno jak bezchybnou přípravou roztoků a vzorků pro rozdělování, tak i přesnou a správnou metodou HPLC. U vzorků č.3 s oběma použitými membránami byly vypočtené rozdělovací koeficienty přibližně 4krát až 6krát vyšší než u ostatních vzorků. Tento nárůst mohl být způsobem únikem určitého množství roztoku z vialky s roztokem asolectinu a eugenolu kvůli špatnému zalepení a těsnění mezi víčky a pouzdrem. Další příčinou mohla být vzduchová bublina u membrány, která by bránila difuzi eugenolu přes membránu do vody ve druhé vialce. V obou případech by došlo ke snížení koncentrace volného eugenolu v analyzovaném vodném roztoku, což má za následek zvýšení rozdělovacích koeficientů.



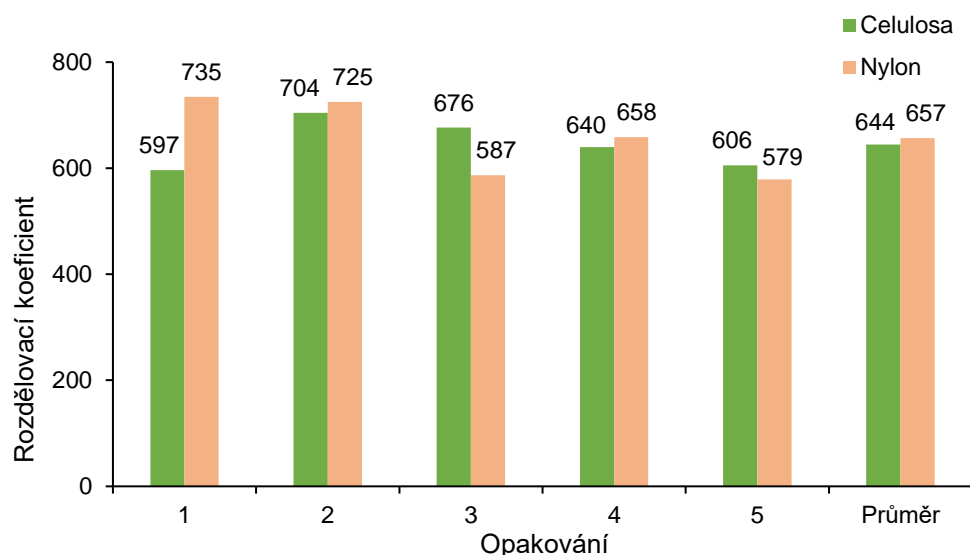
Obrázek 15: Rozdělovací koeficienty eugenolu vypočtené pro jednotlivá opakování a průměrné hodnoty  $K_{lw}$  vypočítané z opakování 1, 2, 4 a 5

Ze získaných výsledků byla vypočtena průměrná hodnota rozdělovacího koeficientu a relativní směrodatná odchylka. Z výpočtu byly vynechány rozdělovací koeficienty vzorků č.3. Průměrná hodnota  $K_{lw}$  byla pro membránu z celulosy 240,3 s RSD = 8,44 %. Pro nylonovou membránu byl průměr  $K_{lw}$  roven 273,0 a RSD byla stanovena 11,54 %. Po zlogaritmování byla průměrná hodnota pro celulosu  $\log K_{lw} = 2,38$  a pro nylon  $\log K_{lw} = 2,44$ . U hodnot  $K_{lw}$  byly pozorovány větší RSD u nylonové membrány než u celulosy. Stejně tak tomu bylo i při experimentu se sledováním závislosti výsledných rozdělovacích koeficientů na vstupní koncentraci eugenolu (kapitola 4.5).

Z průměrných hodnot  $\log K_{lw}$  byly vypočteny relativní odchylky od hodnoty rozdělovacího koeficientu eugenolu v systému oktanol-voda ( $\log K_{ow} = 2,27$ ), které byly 4,85 % pro celulosu a 7,49 % pro nylon.

#### 4.6.2 Thymol

Vypočtené rozdělovací koeficienty thymolu z pěti opakovaných měření jsou znázorněny na obrázku 16. Bylo dosaženo velmi podobné opakovatelnosti výsledků jako v případě eugenolu. Průměrná hodnota  $K_{lw}$  při rozdělování s celulosovou membránou byla 644,5 s relativní odchylkou 7,12 % (u eugenolu byla RSD = 8,44 %). S nylonovou membránou byla průměrná hodnota  $K_{lw}$  pro thymol rovna 656,6 s relativní odchylkou 11,20 % (pro eugenol byla RSD = 11,54 %).



Obrázek 16: Rozdělovací koeficienty thymolu vypočtené pro jednotlivá opakování a průměrné hodnoty  $K_{lw}$  vypočítané z pěti opakování

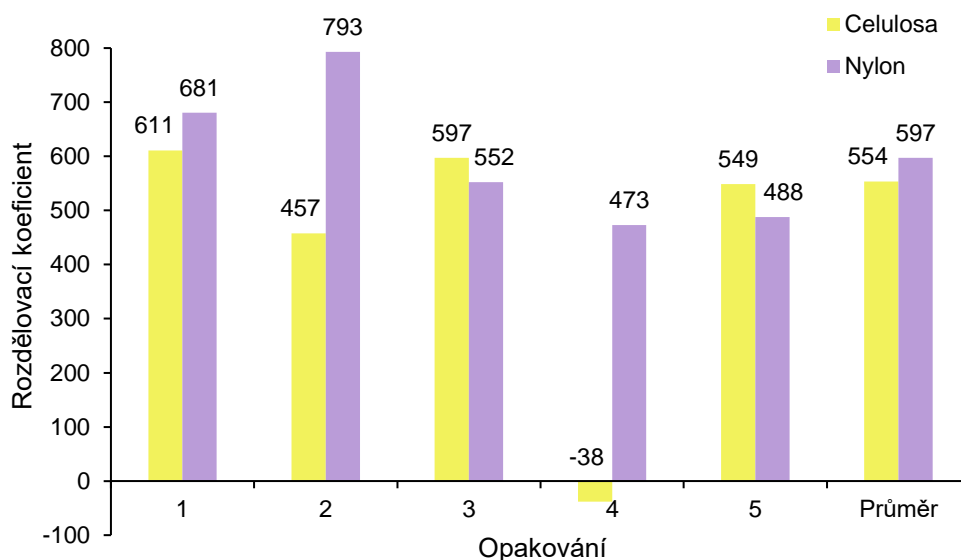
U nylonové membrány byly opět pozorovány větší odchylky ve srovnání s celulosovou membránou, jak již bylo popsáno v předchozích kapitolách. Lze také konstatovat, že získané rozdělovací koeficienty jsou srovnatelné i při porovnání obou typů membrán.

Ve srovnání s hodnotou rozdělovacího koeficientu thymolu v systému oktanol-voda ( $\log K_{ow} = 3,30$ ) se koeficienty získané v tomto experimentu poměrně liší. Průměrná hodnota  $\log K_{lw}$  byla 2,81 pro celulosu a 2,82 pro nylon. Od hodnoty  $\log K_{ow}$  se tento koeficient liší o 14,85 % u celulosy a o 14,55 % u nylonu. Důvodem může být odlišný typ interakce thymolu s fosfolipidy uvnitř liposomu oproti interakcím s oktanolem. Odchylka může být také způsobena i špatnou rozpustností thymolu ve vodě.

Mnohem lépe se však zjištěné  $\log K_{lw}$  thymolu shodují s hodnotami  $\log P_{lec-b} = 2,90$  z publikace [46]. Odchylka od této hodnoty je pak pro celulosu 3,10 % a 2,76 % pro nylon. Důvodem větší shody je velmi podobné složení asolectinu a fosfolipidové fáze použité k určení rozdělovacího koeficientu  $\log P_{lec-b}$  v práci [46], která byla připravena z komerčního sjeového lecitinu tvořeného směsí fosfolipidů, zejména fosfatidylcholinu, fosfatidylethanolaminu a fosfatidylinositolu, dále obsahovala triglyceridy, glykolipidy, sacharidy, steroly, volné mastné kyseliny, barviva a další minoritní složky.

### 4.6.3 Karvakrol

Všechny získané hodnoty  $K_{hw}$  lze vidět na obrázku 17. U vzorku č.4 došlo pravděpodobně k chybnému zašroubování vialek, což mělo za následek promíchání roztoků v obou vialkách. To způsobilo trojnásobné zvýšení koncentrace karvakrolu v analyzovaném vodném roztoku a následně i záporný rozdělovací koeficient. Tato hodnota nebyla zahrnuta ve výpočtu relativních odchylek.



Obrázek 17: Rozdělovací koeficienty karvakrolu vypočtené pro jednotlivá opakování a průměrné hodnoty  $K_{hw}$  vypočítané z opakování 1, 2, 3 a 5 pro celulosu a z pěti opakování pro nylon

U karvakrolu byla oproti předchozím dvěma látkám pozorována značně nižší opakovatelnost výsledných rozdělovacích koeficientů. Průměrný rozdělovací koeficient byl 553,6 s RSD = 12,56 % pro celulosu a 597,3 s RSD = 22,88 % pro nylon. Relativní odchylky jsou přibližně dvakrát větší než u eugenolu a thymolu, kde se odchylky pro obě látky pohybovaly kolem 8 % pro celulosu a 11 % pro nylon.

Stejně tak tomu bylo i po zlogaritmování rozdělovacích koeficientů. Průměrné hodnoty byly  $\log K_{hw} = 2,74$  pro celulosu a pro nylon byl průměr  $\log K_{hw} = 2,78$ . Opět byly pozorovány větší relativní směrodatné odchylky při rozdělování s nylonovou membránou ve srovnání s celulosou, jako tomu bylo i u předchozích dvou látek.

Odchylky od hodnoty rozdělovacího koeficientu v systému oktanol-voda ( $\log K_{ow} = 3,49$ ) byly v případě karvakrolu zcela největší. Pro celulosovou membránu byla odchylka 21,49 % a pro membránu z nylonu 20,34 %. Naopak byla zjištěna výborná shoda s hodnotami  $\log P_{lec-b} = 2,76$  z publikace [46], podobně jako u thymolu. Odchylky od této

hodnoty jsou pak pro obě membrány 0,72 %. To potvrzuje domněnku, že oba fenoly (thymol i karvakrol) interagují jinak s fosfolipidy než s oktanolem.

## **4.7 Srovnání metod HPLC, GC/MS a voltametrických metod pro stanovení rozdělovacích koeficientů**

Rozdělovací koeficienty získané metodou HPLC byly srovnány s výsledky získanými z GC/MS a diferenční pulzní voltametrie (DPV). Pro stanovení  $\log K_{lw}$  těmito metodami byly použity stejné chemikálie, postupy přípravy roztoků, rozdělovací aparatura i stejný postup výpočtu rozdělovacích koeficientů jako při stanovení metodou HPLC.

### **4.7.1 Eugenol**

Srovnání rozdělovacích koeficientů eugenolu získaných ze všech tří metod pro obě membrány a jejich relativní směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulkách 5 a 6. Grafy se srovnáním rozdělovacích koeficientů získaných všemi metodami a jejich průměry pro jednotlivá opakování a obě membrány jsou v přílohách 2 a 3. U celulosové membrány poskytovaly všechny metody velmi dobrou opakovatelnost výsledků. Relativní směrodatné odchylky pro metody DPV a GC/MS jsou však o něco vyšší než u přesnější a správnější metody HPLC. Z výpočtu  $\log K_{lw}$  a RSD byly u metod DPV a GC/MS stejně jako u HPLC vynechány vzorky č.3, u kterých byly možné příčiny odchylek popsány v kapitole 4.6.1.

Výsledky získané při rozdělování s nylonovou membránou se při porovnání všech metod liší více než u celulosy. Z výpočtu  $K_{lw}$  byly opět vyřazeny vzorky č.3, jejichž výsledky jsou kvůli možným netěsnostem v rozdělovací aparatuře považovány za nesprávné. Určitou podobnost výsledných rozdělovacích koeficientů lze pozorovat u metod HPLC a DPV, kde nebyly relativní směrodatné odchylky tak odlišné ve srovnání s metodou GC/MS (tabulka 5). Rozdíl v hodnotách  $K_{lw}$  získaných metodou DPV ve srovnání s HPLC (příloha 3) lze pak vysvětlit například nižší citlivostí metody DPV, případně náhodnými chybami měření. Metoda GC/MS poskytovala značně nižší opakovatelnost výsledků. Příčinou může být složitější postup GC analýzy zahrnující několik kroků jako je extrakce, centrifugace a silanizace vzorku.

Tabulka 5: Přehled logaritmičeských hodnot rozdělovacích koeficientů eugenolu v systému liposom-voda určených ze čtyř opakování pro obě membrány třemi metodami a jejich srovnání s hodnotami z literatury

	Celulosa	Nylon
$\log K_{lw}$ – HPLC	2,38	2,44
$\log K_{lw}$ – DPV [64]	2,35	2,24
$\log K_{lw}$ – GC/MS [65]	2,38	2,50
$\log K_{ow}$ [39]	2,27	
$\log P_{lec-b}$ [46]	2,20	

Tabulka 6: Relativní směrodatné odchylky rozdělovacích koeficientů eugenolu určených třemi metodami pro obě membrány

	Celulosa RSD (%)	Nylon RSD (%)
HPLC	8,44	11,54
DPV [64]	14,58	18,17
GC/MS [65]	11,92	70,70

U celulosové membrány se publikované hodnotě  $\log K_{ow}$  nejvíce blížila hodnota  $\log K_{lw} = 2,35$ , které dosáhla metoda DPV s odchylkou 3,52 %. I při rozdělování s nylonovou membránou byl metodou DPV získán rozdělovací koeficient, který se opět nejvíce přiblížil publikované hodnotě. Relativní odchylka byla 1,32 %. Zároveň se téměř shoduje také s rozdělovacím koeficientem v systému lecitin-puftr ( $\log P_{lec-b}$ ) s odchylkou 1,81 %.

Lze tedy konstatovat, že pro stanovení  $\log K_{lw}$  eugenolu můžou být vhodné všechny tři metody při použití celulosové membrány. U nylonové membrány poskytly dobré výsledky metody HPLC a DPV, i přes lehce vyšší RSD u metody DPV.

#### 4.7.2 Thymol

Rozdělovací koeficienty thymolu získané třemi metodami pro obě membrány a jejich srovnání s hodnotami v systémech oktanol-voda a lecitin-puftr jsou uvedeny v tabulce 7. V tabulce 8 jsou pak uvedeny relativní směrodatné odchylky z pěti opakování. V přílohách 4 a 5 jsou grafy znázorňující srovnání všech metod pro stanovení  $K_{lw}$  thymolu s oběma membránami. Při použití celulosové membrány jsou výsledné rozdělovací



koeficienty určené metodou HPLC dobře srovnatelné s GC/MS. Tyto dvě metody se však liší v opakovatelnosti, u metody GC/MS byla relativní směrodatná odchylka téměř třikrát větší. Rozdělovací koeficienty získané metodou DPV jsou vyšší než u metod HPLC a GC/MS. Také relativní odchylka z jednotlivých opakování byla u DPV ze všech metod nejvyšší.

*Tabulka 7: Přehled logaritmických hodnot rozdělovacích koeficientů thymolu v systému liposom-voda určených z pěti opakování pro obě membrány třemi metodami a jejich srovnání s hodnotami z literatury*

	Celulosa	Nylon
$\log K_{lw}$ – HPLC	2,81	2,82
$\log K_{lw}$ – DPV [64]	2,95	2,89
$\log K_{lw}$ – GC/MS [65]	2,80	2,69
$\log K_{ow}$ [40]	3,30	
$\log P_{lec-b}$ [46]	2,90	

*Tabulka 8: Relativní směrodatné odchylky rozdělovacích koeficientů thymolu určených třemi metodami pro obě membrány*

	Celulosa RSD (%)	Nylon RSD (%)
HPLC	7,12	11,20
DPV [64]	20,45	10,52
GC/MS [65]	19,19	22,21

Rozdělování thymolu s nylonovou membránou poskytlo u všech metod rozdílné výsledky, což je patrné jak z logaritmovaných hodnot rozdělovacích koeficientů (tabulka 7), tak i z grafu s průměrnými hodnotami  $K_{lw}$  ze všech opakování (příloha 5). Nejlepší opakovatelnosti dosáhly u nylonové membrány metody DPV a HPLC.

Hodnoty získané metodou DPV u obou použitých membrán se nejvíce přiblížily jak publikované hodnotě v systému oktanol-voda, tak i rozdělovacímu koeficientu v systému lecitin-puf. Relativní odchylka od hodnoty  $\log K_{ow}$  byla 10,61 % pro celulosu a 12,42 % pro nylon. Ve srovnání s hodnotou  $\log P_{lec-b}$  byla odchylka u celulosy 1,72 % a 0,34 % pro nylon.

Pro stanovení  $\log K_{lw}$  thymolu se zdá jako nejvhodnější metoda HPLC díky svým nízkým relativním směrodatným odchylkám. Jediný problém může představovat větší

odchylka výsledků od publikované hodnoty  $\log K_{ow}$  a hodnoty  $\log P_{lec-b}$ , jejíž možné důvody již byly popsány v kapitole 4.6.2 a nemusí tak souviset se samotnou metodou HPLC. Výsledky metody DPV se sice nejvíce přiblížily rozdělovacímu koeficientu v systému oktanol-voda, avšak s použitím celulosové membrány bylo dosaženo poměrně nízké opakovatelnosti. I přesto se však mohlo jednat pouze o náhodné chyby měření a metoda DPV může být pro stanovení  $\log K_{lw}$  thymolu vhodná. Metoda GC/MS kvůli vyšším hodnotám RSD u obou použitých membrán je nejméně vhodná pro stanovení  $\log K_{lw}$ .

### 4.7.3 Karvakrol

Tabulka 9 zobrazuje srovnání  $\log K_{lw}$  karvakrolu určených ze všech metod pro obě membrány. V tabulce 10 jsou uvedeny vypočtené RSD ze čtyř opakování u celulosové membrány a z pěti opakování v případě membrány z nylonu. V přílohách 6 a 7 jsou zobrazeny grafy srovnávající rozdělovací koeficienty ze všech tří metod pro jednotlivá opakování a obě membrány. Z grafu v příloze 6 byly odstraněny rozdělovací koeficienty vzorku č.4 kvůli pravděpodobnému promíchání roztoků na obou stranách celulosové membrány, jak již bylo vysvětleno v kapitole 4.6.3. Tyto hodnoty nebyly použity pro výpočet  $\log K_{lw}$  a RSD.

Při rozdělování přes celulosovou membránu bylo u metod HPLC a DPV dosaženo poměrně opakovatelných výsledků, zatímco u metody GC/MS byla relativní směrodatná odchylka mírně vyšší. Všechny metody však poskytly téměř totožné rozdělovací koeficienty. Při použití nylonové membrány dosáhly podobných výsledků metody HPLC a DPV, avšak jejich hodnoty RSD byly přibližně dvakrát větší než u celulosy. Rozdělovací koeficient získaný metodou GC/MS byl lehce vyšší než u metod HPLC a DPV.

*Tabulka 9: Přehled logaritmických hodnot rozdělovacích koeficientů karvakrolu v systému liposom-voda určených třemi metodami ze čtyř opakování u celulosy a pěti opakování u nylonu, a jejich srovnání s hodnotami z literatury*

	Celulosa	Nylon
$\log K_{lw}$ – HPLC	2,74	2,78
$\log K_{lw}$ – DPV [64]	2,76	2,75
$\log K_{lw}$ – GC/MS [65]	2,76	2,85
$\log K_{ow}$ [41]	3,49	
$\log P_{lec-b}$ [46]	2,76	

Tabulka 10: Relativní směrodatné odchylky rozdělovacích koeficientů karvakrolu určených třemi metodami pro obě membrány

	Celulosa RSD (%)	Nylon RSD (%)
HPLC	12,56	22,88
DPV [64]	11,42	25,47
GC/MS [65]	17,77	21,01

Oproti publikované hodnotě  $\log K_{ow}$  v systému oktanol-voda jsou hodnoty  $\log K_{lw}$  nižší, ale výborně se shodují s hodnotou  $\log P_{lec-b}$ , a to téměř všechny kromě hodnoty získané metodou GC/MS s nylonovou membránou.

Pro stanovení  $\log K_{lw}$  karvakrolu se jako nejméně vhodná jeví metoda GC/MS stejně jako u předchozích dvou látek. Důvodem jsou vyšší relativní směrodatné odchylky u obou membrán. Metody HPLC a DPV poskytovaly srovnatelnou opakovatelnost u celulosové membrány a při jejím použití jsou vhodné pro stanovení  $\log K_{lw}$  karvakrolu. Rozdíl v logaritmovaných hodnotách  $K_{lw}$  v porovnání s publikovanou hodnotou  $\log K_{ow}$  u metod HPLC a DPV je způsoben výše zmíněnými odlišnými interakcemi karvakrolu s fosfolipidovou fází v porovnání s oktanolem.

Relativní směrodatné odchylky při porovnání obou membrán u všech tří studovaných látek a u všech použitých metod nejsou příliš rozdílné. Vzhledem k této skutečnosti byly pro každou látku a každou metodu zprůměrovány hodnoty rozdělovacích koeficientů ze všech experimentů provedených za odpovídajících podmínek (vstupní koncentrace fenolu 62,5  $\mu\text{g/ml}$ , doba třepání 48 hodin) s oběma membránami a k nim byly vypočteny relativní směrodatné odchylky (tabulky 11 a 12). Bylo dosaženo podobných výsledků jako při posuzování obou membrán samostatně. U eugenolu a thymolu se k oběma publikovaným srovnávacím hodnotám nejvíce přiblížila metoda DPV. V případě eugenolu však byly zjištěné hodnoty blíže k hodnotě  $\log K_{ow}$  než k hodnotě  $\log P_{lec-b}$ . U karvakrolu byla zjištěna výborná shoda u všech metod s hodnotou  $\log P_{lec-b}$ . To opět potvrzuje odlišnou interakci thymolu a karvakrolu s fosfolipidy oproti oktanolu. Lze předpokládat, že na interakcích fenolů s fosfolipidy se vedle hydrofobních interakcí nepolárních uhlovodíkových částí molekuly fenolu s uhlovodíkovými řetězci mastných kyselin fosfolipidu uplatňují repulzní elektrostatické síly mezi polární -OH skupinou fenolu a fosfátovou skupinou fosfolipidu. V systému s oktanolem může naopak docházet k zesílení hydrofobních interakcí uhlovodíkových částí fenolu a oktanolu tvorbou vodíkových můstků mezi -OH skupinami

fenolu a oktanolu. Tyto odlišnosti v interakcích mohou být příčinou nižších hodnot  $\log K_{lw}$  oproti  $\log K_{ow}$  u thymolu a karvakrolu, které mají vhodnější strukturu pro tvorbu vodíkových můstků než eugenol s *o*-methoxyfenolovým skeletem.

*Tabulka 11: Rozdělovací koeficienty studovaných látek získané zprůměrováním všech hodnot (z celulosové i nylonové membrány) změřených třemi metodami a jejich srovnání s referenčními hodnotami*

	Eugenol	Thymol	Karvakrol
$\log K_{lw}$ – HPLC	2,41	2,81	2,76
$\log K_{lw}$ – DPV [64]	2,30	2,92	2,76
$\log K_{lw}$ – GC/MS [65]	2,44	2,75	2,81
$\log P_{ow}$ [39–41]	2,27	3,30	3,49
$\log P_{lec-b}$ [46]	2,20	2,90	2,76

*Tabulka 12: Relativní směrodatné odchylky rozdělovacích koeficientů všech tří látek pro tři metody vypočtené z hodnot získaných dohromady s celulosovou a nylonovou membránou*

	Eugenol RSD (%)	Thymol RSD (%)	Karvakrol RSD (%)
HPLC	11,73	8,94	18,71
DPV [64]	19,76	17,52	19,23
GC/MS [65]	55,64	22,93	21,52

Byla provedena korelační analýza hodnot  $\log K_{lw}$  všech tří studovaných látek (hodnoty z tabulky 10). Získané párové korelační koeficienty byly 0,9906 pro HPLC proti DPV a 0,9614 pro HPLC proti GC. Tyto hodnoty dokazují dobrou shodu výsledků mezi HPLC a oběma srovnávacími metodami.

## 5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo vypracovat HPLC metodu pro stanovení rozdělovacích koeficientů eugenolu, thymolu a karvakrolu v systému liposom-voda, a získané výsledky následně srovnat s metodami GC/MS a diferenční pulzní voltametrií.

Pro HPLC analýzu bylo nejprve třeba optimalizovat složení mobilní fáze. Pro analýzu eugenolu byla vybrána mobilní fáze o složení methanol:voda v poměru 60:40. Pro thymol a karvakrol byly složky MF stejné, avšak v poměru 70:30, který snížil retenci lipofilnějších fenolů. Pro oddělení liposomální a vodné fáze byly vybrány celulosová a nylonová membrána. Polykarbonátová membrána nebyla vhodná z důvodu vysoké propustnosti pro asolectin.

Z regresních parametrů kalibračních přímků byly pro všechny studované látky vypočteny meze detekce a stanovitelnosti. Hodnota LOD byla pro eugenol rovna 0,1854  $\mu\text{g/ml}$  a hodnota LOQ byla 0,6181  $\mu\text{g/ml}$ . U thymolu byla stanovena LOD = 0,6025  $\mu\text{g/ml}$  a LOQ = 2,0084  $\mu\text{g/ml}$ . Pro karvakrol byla LOD rovna 0,5181  $\mu\text{g/ml}$  a LOQ byla 1,7270  $\mu\text{g/ml}$ .

Pro eugenol byla testována závislost doby třepání roztoků v rozdělovací aparatuře na ustavení rovnováhy mezi oběma fázemi. Nejlépe se rovnováha ustavila po 48hodinovém třepání a tato doba byla poté použita při dalších experimentech. Dále byl testován vliv vstupní koncentrace eugenolu na výsledný rozdělovací koeficient. Jako nejvhodnější se jevila nejvyšší testovaná počáteční koncentrace eugenolu v asolectinovém roztoku 62,5  $\mu\text{g/ml}$ .

Při samotném stanovení rozdělovacích koeficientů bylo zjištěno, že pro tento účel se lépe hodí celulosová membrána. Důvodem jsou nižší hodnoty RSD z pěti opakování než u membrány z nylonu, u které byly vyšší RSD způsobeny pravděpodobně průchodem malého množství asolectinu přes membránu, které znemožnilo správnou kvantifikaci analyzovaných látek. Rozdělovací koeficienty eugenolu se od publikované hodnoty pro systém oktanol-voda lišily pouze málo, a to o 4,85 % s celulosovou a o 7,49 % s nylonovou membránou. Odchytky rozdělovacích koeficientů thymolu a karvakrolu od publikovaných hodnot  $\log K_{ow}$  byly značně vyšší než u eugenolu. Mnohem lépe se však shodovaly s rozdělovacím koeficientem v systému lecitin-pufr ( $\log P_{lec-b}$ ). U thymolu byla odchylka od této hodnoty 3,10 % pro celulosu a 2,76 % pro nylon. U karvakrolu byla

pro obě membrány odchylka 0,72 %. Větší podobnost s hodnotou  $\log P_{lec-b}$  je způsobena rozdílným typem interakce thymolu a karvakrolu s fosfolipidy v porovnání s interakcí s oktanolem. Metoda HPLC tedy je vhodná pro stanovení  $\log K_{lw}$  těchto tří látek, především při použití celulosové membrány pro rozdělování.

Rozdělovací koeficienty získané metodou HPLC byly srovnány s výsledky z metod DPV a GC/MS. Bylo zjištěno, že všechny tři metody lze použít pro stanovení  $\log K_{lw}$  v popsané rozdělovací aparatuře s poměrně podobnými výsledky. Metoda HPLC se však ve srovnání s DPV a GC/MS zdá pro tento účel nejvhodnější díky nízkým RSD z jednotlivých opakování.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] K. Záruba: *Analytická chemie 1. díl*. 1. vyd. VŠCHT, Praha, 2016.
- [2] H. Cumming, C. Rücker: Octanol-Water Partition Coefficient Measurement by a Simple  $^1\text{H}$  NMR Method. *ACS Omega*. 2 (2017) 6244–6249.
- [3] B.J. Herbert, J.G. Dorsey: n-Octanol-Water Partition Coefficient Estimation by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *Anal. Chem.* 67 (1995) 744–749.
- [4] D.N. Brooke, A.J. Dobbs, N. Williams: Octanol: Water partition coefficients ( $P$ ): Measurement, estimation, and interpretation, particularly for chemicals with  $P > 10^5$ . *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 11 (1986) 251–260.
- [5] P.B. Ogden, J.G. Dorsey: Reversed phase HPLC with high temperature ethanol/water mobile phases as a green alternative method for the estimation of octanol/water partition coefficients. *J. Chromatogr. A*. 1601 (2019) 243–254.
- [6] R. Collander, M. Lindholm, C.M. Haug, J. Stene, N.A. Sörensen: The Partition of Organic Compounds Between Higher Alcohols and Water. *Acta Chem. Scand.* 5 (1951) 774–780.
- [7] S. Griffin, S.G. Wyllie, J. Markham: Determination of octanol-water partition coefficient for terpenoids using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*. 864 (1999) 221–228.
- [8] Q. Xiang, G. Shan, W. Wu, H. Jin, L. Zhu: Measuring  $\log K_{ow}$  coefficients of neutral species of perfluoroalkyl carboxylic acids using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Environ. Pollut.* 242 (2018) 1283–1290.
- [9] C. Giaginis, F. Tsopeles, A. Tsantili-kakoulidou: The Impact of Lipophilicity in Drug Discovery: Rapid Measurements by Means of Reversed-Phase HPLC. *Ration. Drug Des. Methods Protoc.* 1824 (2018) 217–228.
- [10] C.M. Du, K. Valko, C. Bevan, D. Reynolds, M.H. Abraham: Rapid method for estimating octanol-water partition coefficient ( $\log P_{oct}$ ) from isocratic RP-PHLC and a hydrogen bond acidity term ( $A$ ). *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 24 (2001) 635–649.
- [11] V. Kundi, J. Ho: Predicting Octanol-Water Partition Coefficients: Are Quantum Mechanical Implicit Solvent Models Better than Empirical Fragment-Based

- Methods?. *J. Phys. Chem. B.* 123 (2019) 6810–6822.
- [12] D. Van Der Spoel, S. Manzetti, H. Zhang, A. Klamt: Prediction of Partition Coefficients of Environmental Toxins Using Computational Chemistry Methods. *ACS Omega.* 4 (2019) 13772–13781.
- [13] N. Bhatnagar, G. Kamath, I. Chelst, J.J. Potoff: Direct calculation of 1-octanol-water partition coefficients from adaptive biasing force molecular dynamics simulations. *J. Chem. Phys.* 137 (2012) 014502.
- [14] K. Ogata, M. Hatakeyama, S. Nakamura: Effect of atomic charges on octanol-water partition coefficient using alchemical free energy calculation. *Molecules.* 23 (2018) 425.
- [15] M. Ikonen, L. Murtomäki, K. Kontturi: An electrochemical method for the determination of liposome-water partition coefficients of drugs. *J. Electroanal. Chem.* 602 (2007) 189–194.
- [16] S.T. Burns, M.G. Khaledi: Rapid determination of liposome-water partition coefficients ( $K_{lw}$ ) using Liposome Electrokinetic Chromatography (LEKC). *J. Pharm. Sci.* 91 (2002) 1601–1612.
- [17] M.M.A. Elsayed, U. Vierl, G. Cevc: Accurate potentiometric determination of lipid membrane-water partition coefficients and apparent dissociation constants of ionizable drugs: Electrostatic corrections. *Pharm. Res.* 26 (2009) 1332–1343.
- [18] G.P. Van Balen, C.A.M. Martinet, G. Caron, G. Bouchard, M. Reist, P.M. Carrupt, R. Fruttero, A. Gasco, B. Testa: Liposome/Water Lipophilicity: Methods, Information Content, and Pharmaceutical Applications. *Med. Res. Rev.* 24 (2004) 299–324.
- [19] S.D. Krämer: Liposome/water partitioning: Theory, techniques, and applications., v knize: and R.G. B. Testa, H. van de Waterbeemd, G. Folkers (Ed.), *Pharmacokinetic optimization in drug research: Biological, physicochemical, and computational strategies.* Wiley-VHCA, Zurich, 2001, str. 401–428.
- [20] T. Volná, K. Motyka, J. Hlaváč: Potential of High-Performance Liquid Chromatography for Distribution Coefficient Determination of 3-Hydroxyquinolin-4(1H)-one Derivatives. *Chromatographia.* 79 (2016) 1153–1163.
- [21] G. Hodges, C. Eadsforth, B. Bossuyt, A. Bouvy, M.H. Enrici, M. Geurts, M. Kotthoff, E. Michie, D. Miller, J. Müller, G. Oetter, J. Roberts, D. Schowanek, P. Sun, J.



- Venzmer: A comparison of log  $K_{ow}$  (n-octanol–water partition coefficient) values for non-ionic, anionic, cationic and amphoteric surfactants determined using predictions and experimental methods. *Environ. Sci. Eur.* 31 (2019) 1–18.
- [22] C. Barzanti, R. Evans, J. Fouquet, L. Gouzin, N.M. Howarth, G. Kean, E. Levet, D. Wang, E. Wayemberg, A.A. Yeboah, A. Kraft: Potentiometric determination of octanol-water and liposome-water partition coefficients (log  $P$ ) of ionizable organic compounds. *Tetrahedron Lett.* 48 (2007) 3337–3341.
- [23] K. V. Zolotarev, K. V. Nakhod, A.N. Mikhailov, M. V. Mikhailova: Correlation between LC50 for Adult Fish and Fish Embryos. *Bull. Exp. Biol. Med.* 163 (2017) 749–752.
- [24] N. Klüver, K. Bittermann, B.I. Escher: QSAR for baseline toxicity and classification of specific modes of action of ionizable organic chemicals in the zebrafish embryo toxicity test. *Aquat. Toxicol.* 207 (2019) 110–119.
- [25] M.N. Islam, L. Huang, S.D. Siciliano: Inclusion of molecular descriptors in predictive models improves pesticide soil-air partitioning estimates. *Chemosphere.* 248 (2020) 126031.
- [26] A. Jesorka, O. Orwar: Liposomes: Technologies and Analytical Applications. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 1 (2008) 801–832.
- [27] K. Nováková: Modelové biologické membrány: Jejich charakterizace a využití. *Chem. List.* 109 (2015) 166–175.
- [28] H. Lodish, A. Berk, C.A. Kaiser, M. Krieger, A. Bretscher, H. Ploegh, A. Amon: *Molecular Cell Biology*. 7. vyd. W.H. Freeman & Co., New York, 2013.
- [29] K.A. Edwards, A.J. Baeumner: Liposomes in analyses. *Talanta.* 68 (2006) 1421–1431.
- [30] A. Akbarzadeh, R. Rezaei-sadabady, S. Davaran, S.W. Joo, N. Zarghami: Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res. Lett.* 8 (2013) 102.
- [31] V. Müllerová: Modifikace uhlíkových vláknových elektrod fosfolipidy. Bakalářská práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2018.
- [32] K.S. Ahmed, S.A. Hussein, A.H. Ali, S.A. Korma, Q. Lipeng, C. Jinghua: Liposome: composition, characterisation, preparation, and recent innovation in clinical

- applications. *J. Drug Target.* 27 (2019) 742–761.
- [33] A. Jose, S. Labala, K.M. Ninave, S.K. Gade, V.V.K. Venuganti: Effective Skin Cancer Treatment by Topical Co-delivery of Curcumin and STAT3 siRNA Using Cationic Liposomes. *AAPS PharmSciTech.* 19 (2018) 166–175.
- [34] P.A. Bovier: Epaxal®: A virosomal vaccine to prevent hepatitis A infection. *Expert Rev. Vaccines.* 7 (2008) 1141–1150.
- [35] F. Mazur, M. Bally, B. Städler, R. Chandrawati: Liposomes and lipid bilayers in biosensors. *Adv. Colloid Interface Sci.* 249 (2017) 88–99.
- [36] Y.P. Patil, S. Jadhav: Novel methods for liposome preparation. *Chem. Phys. Lipids.* 177 (2014) 8–18.
- [37] F. Szoka, D. Papahadjopoulos: Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 9 (1980) 467–508.
- [38] Z. Huang, X. Li, T. Zhang, Y. Song, Z. She, J. Li, Y. Deng: Progress involving new techniques for liposome preparation. *Asian J. Pharm. Sci.* 9 (2014) 176–182.
- [39] Eugenol. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3314>, staženo 13. března 2020.
- [40] Thymol. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6989>, staženo 13. března 2020.
- [41] Carvacrol. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10364>, staženo 13. března 2020.
- [42] B. Yogalakshmi, P. Viswanathan, C.V. Anuradha: Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicology.* 268 (2010) 204–212.
- [43] I. Gülçin: Antioxidant activity of eugenol: A structure-activity relationship study. *J. Med. Food.* 14 (2011) 975–985.
- [44] B.H. Yang, Z.G. Piao, Y.B. Kim, C.H. Lee, J.K. Lee, K. Park, J.S. Kim, S.B. Oh: Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by Eugenol. *J. Dent. Res.* 82 (2003) 781–785.
- [45] K.P. Devi, S.A. Nisha, R. Sakthivel, S.K. Pandian: Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular

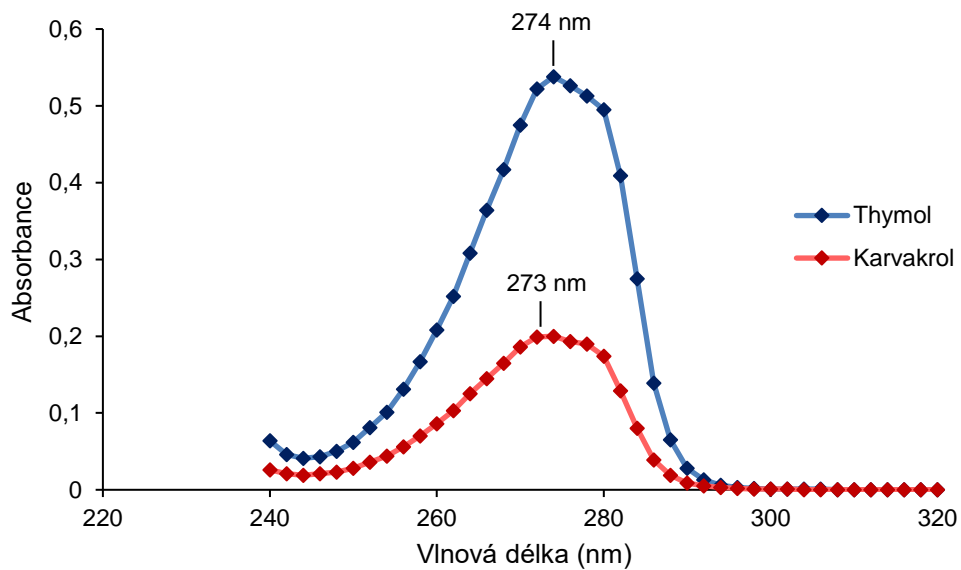
- membrane. *J. Ethnopharmacol.* 130 (2010) 107–115.
- [46] G.N. Reiner, D.O. Labuckas, D.A. García: Lipophilicity of some GABAergic phenols and related compounds determined by HPLC and partition coefficients in different systems. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 686–691.
- [47] M. Chen, Z.W. Wang, C.Y. Hu, J.L. Wang: Effects of Temperature on Release of Eugenol and Isoeugenol from Soy Protein Isolate Films into Simulated Fatty Food. *Packag. Technol. Sci.* 25 (2012) 485–492.
- [48] M. Osanloo, M.M. Sedaghat, F. Esmaeili, A. Amani: Larvicidal Activity of Essential Oil of *Syzygium aromaticum* (Clove) in Comparison with Its Major Constituent, Eugenol, against *Anopheles stephensi*. 12 (2018) 361–369.
- [49] S.M. Yun, M.H. Lee, K.J. Lee, H.O. Ku, S.W. Son, Y.S. Joo: Quantitative analysis of eugenol in clove extract by a validated HPLC method. *J. AOAC Int.* 93 (2010) 1806–1810.
- [50] A. Wattanasatcha, S. Rengpipat, S. Wanichwecharungruang: Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent. *Int. J. Pharm.* 434 (2012) 360–365.
- [51] K.R. Riella, R.R. Marinho, J.S. Santos, R.N. Pereira-Filho, J.C. Cardoso, R.L.C. Albuquerque-Junior, S.M. Thomazzi: Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. *J. Ethnopharmacol.* 143 (2012) 656–663.
- [52] A. Marchese, I.E. Orhan, M. Daglia, R. Barbieri, A. Di Lorenzo, S.F. Nabavi, O. Gortzi, M. Izadi, S.M. Nabavi: Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chem.* 210 (2016) 402–414.
- [53] C.Y. Hu, M. Chen, Z.W. Wang: Release of Thymol, Cinnamaldehyde and Vanillin from Soy Protein Isolate Films into Olive Oil. *Packag. Technol. Sci.* 25 (2012) 97–106.
- [54] T. Angelo, F.Q. Pires, G.M. Gelfuso, J.K.R. da Silva, T. Gratieri, M.S.S. Cunha-Filho: Development and validation of a selective HPLC-UV method for thymol determination in skin permeation experiments. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1022 (2016) 81–86.
- [55] K. Can Baser: Biological and Pharmacological Activities of Carvacrol and Carvacrol Bearing Essential Oils. *Curr. Pharm. Des.* 14 (2008) 3106–3119.

- [56] C.C. Liolios, O. Gortzi, S. Lalas, J. Tsaknis, I. Chinou: Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chem.* 112 (2009) 77–83.
- [57] A. Guarda, J.F. Rubilar, J. Miltz, M.J. Galotto: The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *Int. J. Food Microbiol.* 146 (2011) 144–150.
- [58] D. Trombetta, F. Castelli, M.G. Sarpietro, V. Venuti, M. Cristani, C. Daniele, A. Saija, G. Mazzanti, G. Bisignano: Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (2005) 2474–2478.
- [59] A. Marchese, C.R. Arciola, E. Coppo, R. Barbieri, D. Barreca, S. Chebaibi, E. Sobarzo-Sánchez, S.F. Nabavi, S.M. Nabavi, M. Daglia: The natural plant compound carvacrol as an antimicrobial and anti-biofilm agent: mechanisms, synergies and bio-inspired anti-infective materials. *Biofouling.* 34 (2018) 630–656.
- [60] A. Pernin, F. Dubois-Brissonnet, S. Roux, M. Masson, V. Bosc, M.N. Maillard: Phenolic compounds can delay the oxidation of polyunsaturated fatty acids and the growth of *Listeria monocytogenes*: structure-activity relationships. *J. Sci. Food Agric.* 98 (2018) 5401–5408.
- [61] H. Hashemipour, H. Kermanshahi, A. Golian, T. Veldkamp: Metabolism and nutrition: Effect of thymol and carvacrol feed supplementation on performance, antioxidant enzyme activities, fatty acid composition, digestive enzyme activities, and immune response in broiler chickens. *Poult. Sci.* 92 (2013) 2059–2069.
- [62] M. Dedić, E. Bečić, B. Imamović, N. Žiga, S. Medanhodžić-Vuk, M. Šober: HPLC method for determination the content of thymol and carvacrol in Thyme tincture. *Bull. Chem. Technol. Bosnia Herzegovina.* 50 (2018) 1–6.
- [63] L.I. Alekseeva: Medicinal Plants Determining Thymol and Carvacrol By Reversed-Phase High-Performance. *Pharm. Chem. J.* 43 (2009) 665–667.
- [64] R. Jerga: Stanovení rozdělovacích koeficientů v systému liposom-voda voltametrickými metodami. Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2020.
- [65] V. Talášková: Stanovení rozdělovacích koeficientů v systému liposom-voda plynovou chromatografií. Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2020.
- [66] P. Barták, J. Skopalová, P. Bednář, J. Součková, H. Tomková, J. Rozsypal:

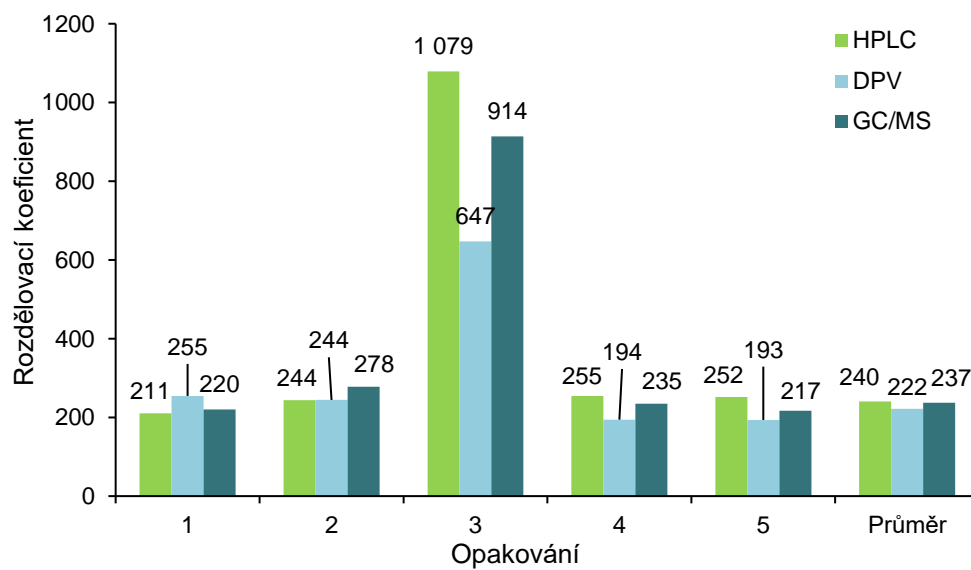
Determination of partition coefficient in liposome - water system: GC/MS approach, v knize: Book of Abstracts. Bratislava: Department of Analytical Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava, Jasná, Slovak Republic, 2018, str. 157.

# PŘÍLOHY

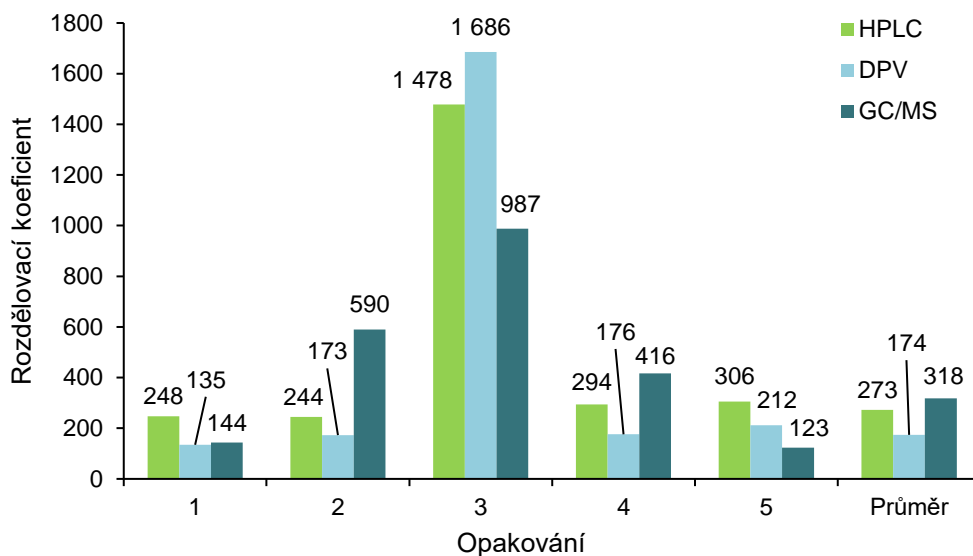
Příloha 1: Absorpční spektra thymolu a karvakrolu s vyznačenými absorpčními maximy



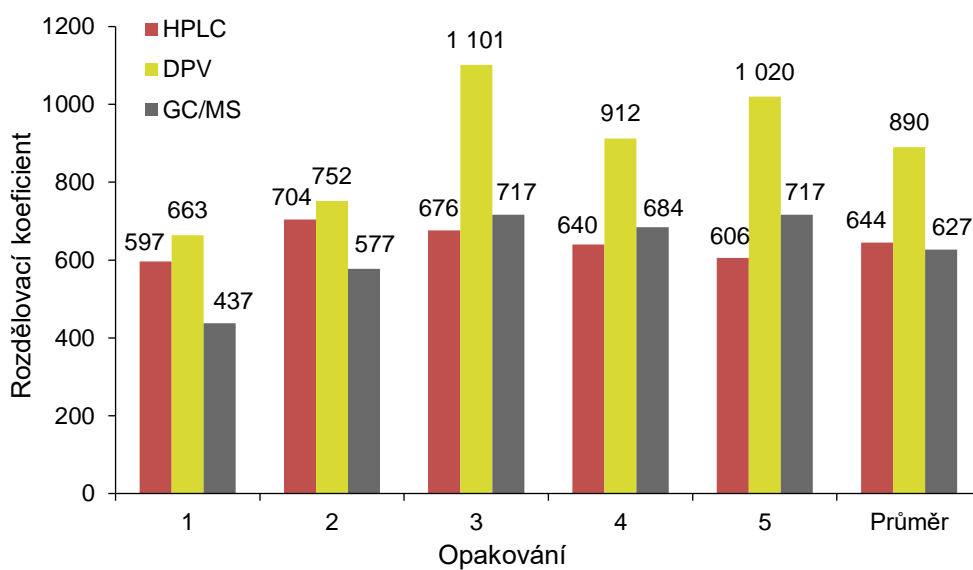
Příloha 2: Srovnání rozdělovacích koeficientů eugenolu získaných metodami HPLC, DPV a GC/MS s celulosovou membránou



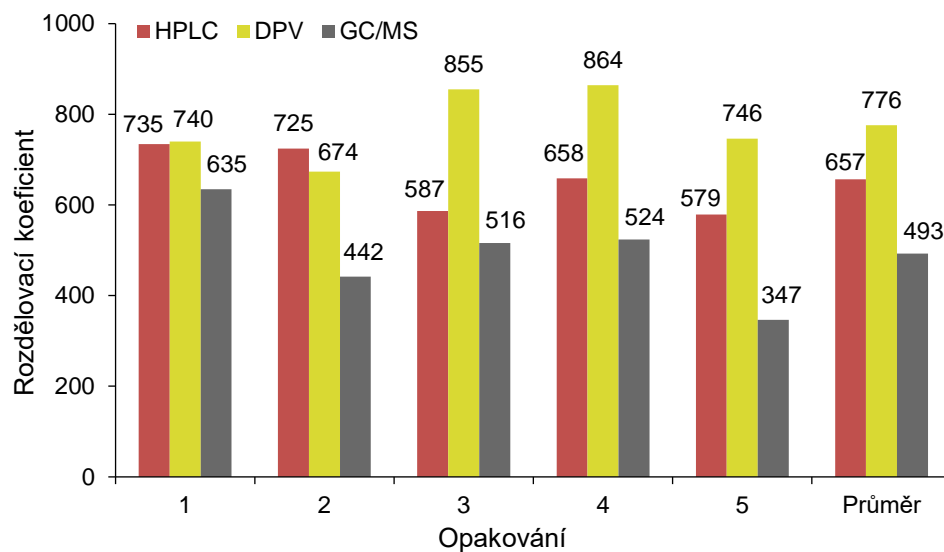
Příloha 3: Srovnání rozdělovacích koeficientů eugenolu získaných metodami HPLC, DPV a GC/MS s nylonovou membránou



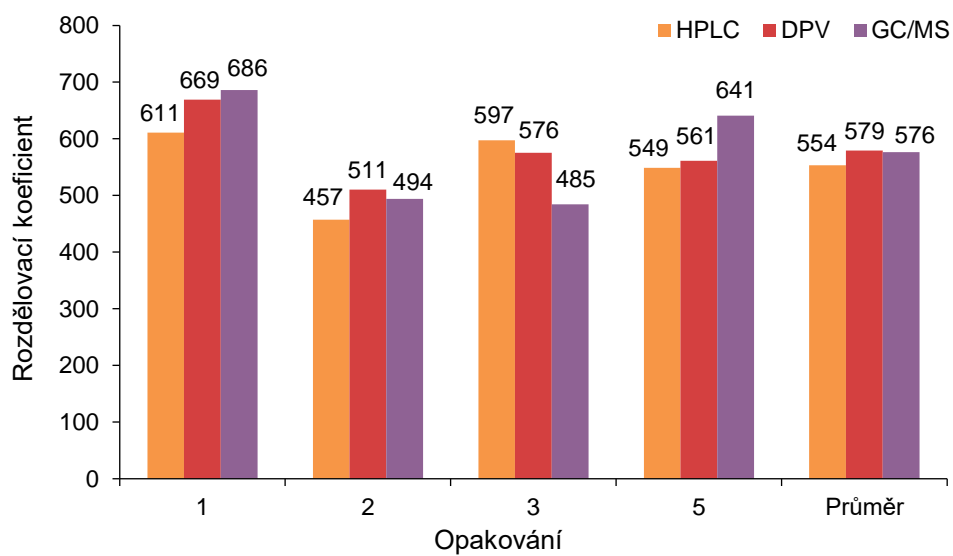
Příloha 4: Srovnání rozdělovacích koeficientů thymolu získaných metodami HPLC, DPV a GC/MS s celulosovou membránou



Příloha 5: Srovnání rozdělovacích koeficientů thymolu získaných metodami HPLC, DPV a GC/MS s nylonovou membránou



Příloha 6: Srovnání rozdělovacích koeficientů karvakrolu získaných metodami HPLC, DPV a GC/MS s celulosovou membránou





Příloha 7: Srovnání rozdělovacích koeficientů karvakrolu získaných metodami HPLC, DPV a GC/MS s nylonovou membránou

