

# **Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědecká fakulta**  
Katedra analytické chemie



## **STANOVENÍ ROZDĚLOVACÍCH KOEFICIENTŮ V SYSTÉMU LIPOSOM – VODA VOLTAMETRICKÝMI METODAMI**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor práce:

Bc. Radek Jerga

Vedoucí práce:

RNDr. Jana Skopalová, Ph.D

Studijní program:

N1407 Chemie

Studijní obor:

Analytická chemie

Forma studia:

Prezenční

Olomouc 2020

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl 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 .....

Chtěl bych poděkovat vedoucí mé diplomové práce RNDr. Janě Skopalové, Ph.D. za veškerou pomoc a rady během experimentální činnosti i během sepsování této práce. Dále bych chtěl poděkovat doc. RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D. za jeho rady k experimentům a za tvorbu rozdělovacích aparatur. Nakonec bych rád poděkoval Bc. Veronice Müllerové a Bc. Veronice Taláškové za jejich pomoc při přípravě vzorků a poskytnutí jimi naměřených HPLC a GC/MS dat.

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

## Bibliografická identifikace

Autor	Bc. Radek Jerga
Název práce	Stanovení rozdělovacích koeficientů v systému liposom-voda voltametrickými metodami
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce	RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	Diplomová práce se zabývá vývojem experimentální metody stanovení rozdělovacích koeficientů eugenolu, thymolu a karvakrolu v systému liposom-voda s využitím voltametrie jako kvantifikační metody pro dané analyty. Byly nalezeny vhodné parametry pro diferenčně pulzní voltametrickou analýzu studovaných látek a pro metodu určení jejich rozdělovacích koeficientů. Dělení probíhalo v aparatuře obsahující vodný roztok asolectinových liposomů a analytu, který byl polopropustnou membránou oddělen od vody, do níž analyt difundoval a v níž byl následně voltametricky stanoven. Z množství látky stanoveného ve vodné fázi a celkového množství látky byly vypočteny hodnoty rozdělovacích koeficientů $\log K_{lw} = 2,30$ pro eugenol, 2,92 pro thymol a 2,76 pro karvakrol.
Klíčová slova	rozdělovací koeficient, liposomy, voltametrie
Počet stran	66
Jazyk	Český

## **Bibliographic identification**

Author	Bc. Radek Jerga
Title	Determination of partition coefficients in liposome-water system using voltammetry techniques
Type of thesis	Master's
Department	Department of Analytical Chemistry
Supervisor	RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.
The year of presentation	2020
Abstract	<p>The aim of master's thesis was to develop a method for the determination of partition coefficients of eugenol, thymol and carvacrol in the liposome-water system, using voltammetry as a quantification method. Suitable parameters were found for differential pulse voltammetric analysis of the studied phenols and for their partition between liposomal and aqueous phases. The partition of the analyte was performed in a device containing an aqueous solution of asolectin liposomes and the analyte that was separated from clean water by semipermeable membrane. Free analyte diffused through this membrane into water and was subsequently determined voltammetrically. From the amount of analyte determined in the aqueous phase and its total amount, the values of the partition coefficients <math>\log K_{lw} = 2.30</math> for eugenol, 2.92 for thymol and 2.76 for carvacrol were calculated.</p>
Keywords	partition coefficient, liposomes, voltammetry
Number of pages	66
Language	Czech

# OBSAH

Seznam použitých zkratk a symbolů .....	8
Seznam obrázků .....	9
Seznam příloh .....	10
Úvod.....	11
2 Teoretická část .....	12
2.1 Rozdělovací koeficienty .....	12
2.1.1 Stanovení rozdělovacích koeficientů .....	13
2.1.2 Využití rozdělovacích koeficientů .....	14
2.2 Liposomy.....	15
2.2.1 Asolectin .....	16
2.3 Eugenol .....	17
2.3.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti .....	18
2.3.2 Možnosti využití .....	18
2.3.3 Metody stanovení .....	19
2.4 Thymol .....	20
2.4.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti .....	20
2.4.2 Možnosti využití .....	21
2.4.3 Metody stanovení .....	21
2.5 Karvakrol.....	22
2.5.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti .....	23
2.5.2 Možnosti využití .....	23
2.5.3 Metody stanovení .....	24
2.6 Voltametrické metody.....	25
2.6.1 Diferenčně pulzní voltametrie.....	25
2.6.2 Voltametrie fenolů .....	26
3 Experimentální část.....	28
3.1 Použité chemikálie .....	28

3.2 Příprava roztoků .....	28
3.3 Použité přístroje .....	28
3.4 Experimentální postupy .....	29
3.4.1 Příprava vzorků pro určení rozdělovacích koeficientů .....	29
3.4.2 Diferenčně pulzní voltametrie.....	30
3.4.3 Hmotnostní spektrometrie.....	30
4 Výsledky a diskuze .....	31
4.1 Voltametrická metoda pro stanovení eugenolu, thymolu a karvakrolu .....	31
4.1.1 Vliv pH roztoku .....	31
4.1.2 Vliv přítomnosti asolectinu na proudovou odezvu eugenolu.....	33
4.1.3 Kalibrační závislosti.....	33
4.2 Metoda stanovení rozdělovacích koeficientů.....	36
4.2.1 Výpočet rozdělovacího koeficientu .....	36
4.3 Testování vlivu různých podmínek na rozdělovací koeficienty .....	38
4.3.1 Volba vhodného typu membrány.....	38
4.3.2 Časová závislost rozdělování .....	39
4.3.3 Koncentrační závislost rozdělovacích koeficientů eugenolu.....	41
4.4 Stanovení rozdělovacích koeficientů .....	44
4.4.1 Rozdělovací koeficient eugenolu .....	45
4.4.2 Rozdělovací koeficient thymolu .....	46
4.4.3 Rozdělovací koeficient karvakrolu .....	47
4.5 Srovnání rozdělovacích koeficientů stanovených metodami DPV, HPLC a GC/MS .....	48
5 Závěr .....	50
Seznam použité literatury .....	52

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

BDDE	bórem dopovaná diamantová elektroda
BR pufr	Britton-Robinsonův pufr
DPV	diferenčně pulzní voltametrie
ESI	ionizace elektrosprejem
GC	plynová chromatografie
GCE	elektroda ze skelného uhlíku (z angl. <i>Glassy Carbon Electrode</i> )
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LOD	mez detekce (z angl. <i>Limit of Detection</i> )
LOQ	mez stanovitelnosti (z angl. <i>Limit of Quantification</i> )
MS	hmotnostní spektrometrie
QuEChERS	metoda disperzní extrakce tuhou fází (z angl. <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i> )
PC	polykarbonát
RSD	relativní směrodatná odchylka
SPE	extrakce tuhou fází (z angl. <i>Solid Phase Extraction</i> )
SPME	mikroextrakce tuhou fází (z angl. <i>Solid Phase Microextraction</i> )
SWV	square-wave voltametrie
$c_e$	koncentrace volné látky v eugenolové fázi
$c_L$	koncentrace látky v liposomech
$m_c$	celkové množství látky na začátku experimentu
$m_e$	hmotnost volné látky v roztoku
$m_L$	množství látky v liposomech
$m_z$	množství látky odpovídající ztrátám látky na membráně
$K$	rozdělovací koeficient
$pK_a$	disociační konstanta
$K_{lw}$	rozdělovací koeficient v systému liposom-voda
$K_{ow}$	rozdělovací koeficient v systému oktanol-voda
$K_{lec-b}$	rozdělovací koeficient v systému lecitin-pufr
$R$	párový korelační koeficient
$s$	výběrová směrodatná odchylka
$V_L$	objem liposomů v roztoku



## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Struktura liposomu .....	16
Obr. 2 Chemická struktura eugenolu .....	17
Obr. 3 Chemická struktura thymolu .....	20
Obr. 4 Oxidace o-methoxyfenolu za vzniku 3,3'-dimethoxydifenoquinonu (A) nebo o-benzochinonu (B) .....	27
Obr. 5 Rozdělovací aparatura – nahoře s kovovým pouzdem, dole s plastovým.....	30
Obr. 6 Závislost proudu a potenciálu DPV píku eugenolu (o koncentraci $24 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) na pH BR pufru .....	31
Obr. 7 Závislost proudové odezvy na pH BR pufru pro thymol a karvakrol (o koncentraci $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) .....	32
Obr. 8 Závislost potenciálu DPV píku thymolu a karvakrolu (o koncentraci $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) na pH BR pufru.....	32
Obr. 9 Proudové odezvy roztoku eugenolu o koncentraci $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ s různým obsahem asolectinu v roztoku .....	33
Obr. 10 Kalibrační závislost eugenolu vytvořená zprůměrováním pěti kalibračních závislostí .....	34
Obr. 11 Kalibrační závislost thymolu vytvořená zprůměrováním tří kalibračních závislostí .....	34
Obr. 12 Kalibrační závislost karvakrolu vytvořená zprůměrováním dvou kalibračních závislostí .....	35
Obr. 13 Kalibrační závislost asolectinu (vyhodnocován ion $833 \text{ m/z}$ ) změřená metodou MS .....	38
Obr. 14 Koncentrace eugenolu ve slepém vzorku (bez asolectinu) o počáteční koncentraci $62,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ v závislosti na době třepáním podpořené difúze do vody přes polopropustnou membránu. RA – roztok analytu, RV – roztok vody .....	40

Obr. 15 Koncentrace eugenolu po 48 hodinové třepáním podpořené difúzi přes polopropustnou membránu (z celulosy) změřené v roztoku vody (průměry ze 4 měření), v závislosti na počáteční koncentraci eugenolu v roztoku analytu obsahujícím asolectin ..	41
Obr. 16 Koncentrace eugenolu změřené v roztoku vody (RV) a roztoku analytu (RA) po 48 hodinové třepáním podpořené difúzi přes polopropustnou celulosovou membránu (průměry ze 4 měření), v závislosti na počáteční koncentraci eugenolu v roztoku analytu bez asolectinu ..	42
Obr. 17 Rozdělovací koeficienty eugenolu v závislosti na vstupní koncentraci eugenolu dávkovaného do roztoku ..	43
Obr. 18 Srovnání rozdělovacích koeficientů vypočtených podle rovnice (6) se započtením ztrát a podle rovnice (8) nezahrnující ztráty látky na nylonové membráně ..	44
Obr. 19 Rozdělovací koeficienty eugenolu v systému liposom-voda ..	45
Obr. 20 Rozdělovací koeficienty thymolu v systému liposom-voda ..	46
Obr. 21 Rozdělovací koeficienty karvakrolu v systému liposom-voda ..	47

## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 Fragmentační spektrum iontu o m/z 833 odpovídající linolyl-palmitoyl fosfatidylinositolu ..	58
Příloha 2 Koncentrace eugenolu po 48 hodinové třepáním podpořené difúzi přes polopropustnou nylonovou membránu změřené v roztoku vody (průměry ze 4 měření), v závislosti na počáteční koncentraci eugenolu v roztoku analytu obsahujícím asolectin ..	59
Příloha 3 Koncentrace eugenolu změřená v roztoku vody (RV) a roztoku analytu (RA) po 48 hodinové třepáním podpořené difúzi přes polopropustnou nylonovou membránu (průměr ze 4 měření), v závislosti na počáteční koncentraci eugenolu v roztoku analytu bez asolectinu ..	60
Příloha 4 Srovnávací grafy rozdělovacích koeficientů eugenolu v systému liposom-voda změřených pomocí HPLC, EC a GC ..	61
Příloha 5 Srovnávací grafy rozdělovacích koeficientů thymolu v systému liposom-voda změřených pomocí HPLC, EC a GC ..	63
Příloha 6 Srovnávací grafy rozdělovacích koeficientů karvakrolu v systému liposom-voda změřených pomocí HPLC, EC a GC ..	65

## ÚVOD

Rozdělovací koeficient je parametr látky popisující její schopnost rozdělovat se mezi organickou a vodnou fází. Tím umožňuje popsat lipofilitu dané látky, tedy její schopnost interakce s fosfolipidy, což je důležité zejména pro léčiva, protože ta v organismech interagují s buněčnými membránami tvořenými právě fosfolipidovými dvojvrstvami. K určování tohoto parametru je nejčastěji využíván systém oktanol-voda, který do jisté míry umožňuje simulaci těchto fosfolipidů svým složením – oktanol obsahuje polární i nepolární část. Nedostatkem tohoto systému jsou interakce dané látky s oktanolem, kdy se projevují pouze hydrofobní interakce.

Dnes se již často pro určování rozdělovacích koeficientů využívá systému liposom-voda, který lépe simuluje buněčné membrány, navíc svým složením umožňuje zapojení jak hydrofobních, tak elektrostatických interakcí. Liposomy jsou kulovité útvary tvořené dvojvrstvou fosfolipidů, které mají polární část orientovanou do okolního polárního prostředí a do vnitřního polárního prostředí, zatímco jejich nepolární uhlovodíkové řetězce tvoří nepolární meziprostor. V praxi se liposomy často využívají k transportu léčiv, která jsou uzavřena uvnitř liposomu, který poté v organismu interaguje s buněčnou membránou a léčivo tak přechází dovnitř buňky. Proto je tento systém výhodný, jelikož umožňuje určit schopnost liposomu uzavírat v sobě látku, která má sloužit například jako zmíněné léčivo.

Eugenol, thymol a karvakrol jsou přírodní látky, které své uplatnění již odedávna našly jako součást různých typů koření, ovšem kromě toho byly také využívány v medicíně hlavně pro své dezinfekční účinky. Jejich chemická struktura a přítomnost oxidovatelných center umožňuje využití voltametrických metod k jejich kvantitativnímu stanovení.

Cílem této práce bylo vyvinout vhodnou experimentální metodu pro stanovení rozdělovacích koeficientů eugenolu, thymolu a karvakrolu v systému liposom-voda za využití asolectinu jako zdroje liposomů a diferenčně pulzní voltametrie ke kvantifikaci daných látek.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Rozdělovací koeficienty

Popisují schopnost látky rozdělovat se mezi vodnou a organickou fází. Rozdělovací koeficient  $K_D$  (nebo také rozdělovací konstanta) je definován jako poměr rovnovážných koncentrací elektroneutrální formy látky v organické a vodné fázi (rovnice 1). Lze se setkat také s rozdělovacím (distribučním) poměrem  $D$ , který je poměrem celkového množství látky ve všech jejích formách za rovnovážného stavu. Počítá se tedy s rovnovážným rozdělením elektroneutrální formy mezi vodnou a organickou fází, a zároveň s rovnovážnou disociací látky ve vodné fázi. Pokud bychom například uvažovali organickou kyselinu HA, pro kterou se ustavuje rovnováha:



lze oba koeficienty vyjádřit jako:

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

$$D = \frac{[HA]_{\text{org}}}{[HA]_{\text{aq}} + [A^-]_{\text{aq}}} \quad (2)$$

Z těchto rozdílů také vyplývá, že rozdělovací koeficient je nezávislý na pH, kdežto distribuční koeficient je na pH závislý, protože disociace látky je ovlivněna hodnotou pH roztoku a disociační konstantou látky [1]. Pro přehlednější porovnávání a práci s koeficienty se obvykle uvádějí v logaritmickém tvaru  $\log K$  a  $\log D$ .

Jak bylo řečeno, rozdělovací koeficient se určuje v systému dvou fází – vodné a organické. Organickou fází mohou být nejrůznější rozpouštědla nemísitelná s vodou, nejčastěji se však setkáváme se systémem oktanol/voda ( $\log K_{ow}$ ). Hlavním důvodem je využití tohoto systému jako biologického modelu, čili rozdělování mezi vodné fáze a „biofáze“ v organismech. Oktanol se do určité míry podobá fosfolipidům a proteinům, protože obsahuje polární hlavičku a nepolární ocásek, navíc může vytvářet vodíkové můstky a amfifilitu podobnou zmíněným fosfolipidům a proteinům, které se nacházejí v buněčných stěnách [2,3].

### 2.1.1 Stanovení rozdělovacích koeficientů

Používané metody lze rozdělit na teoretické a experimentální. V teoretických metodách se rozdělovací koeficient predikuje výpočtem. Pro soustavu oktanol/voda lze nalézt například regresní model zahrnující některé parametry popisující molekulu – její povrch, objem, hmotnost a rozdělení hustoty náboje na atomech dusíku a kyslíku ve struktuře molekuly. Toho lze využít pro přesné odhady rozdělovacích koeficientů složitých molekul [4].

Experimentální metody můžeme rozdělit na přímé a nepřímé. Přímé metody jsou založeny na vytřepávání látky z vodné do organické fáze a následné analýze obsahu dané látky v obou fázích. Kromě obvyklých metod jako je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s UV detekcí, UV/VIS spektrometrie, plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (GC-MS), se lze setkat s potenciometrickou titrací. Při té se využívá rozdělování neutrálních molekul nebo iontových párů s následným určením disociační konstanty analytu pomocí přídavek titračních činidel. Rozdělovací koeficient se poté určí pomocí vhodného softwaru [3]. Nevýhodou přímých metod je jejich časová náročnost, potřeba většího množství čistých látek, omezený dynamický rozsah a složitá automatizace [5].

Nepřímé metody jsou založeny na chromatografickém měření. Metoda vychází ze změření několika látek (chemicky podobných studované látky) se známými rozdělovacími koeficienty. Poté je vytvořena kalibrační závislost z jejich rozdělovacích koeficientů a retenčních parametrů. Analyzovaná látka je poté změřena za stejných podmínek a z retenčních parametrů se pomocí kalibrační závislosti určí rozdělovací koeficient [3,5,6]. Nejčastěji se využívá HPLC na reverzních fázích v izokratickém nebo gradientovém módu. Ke stanovení je zapotřebí pokrýt rozsah mobilních fází s různým obsahem organické fáze. To je problémem při izokratickém měření, kdy je nutné předem odhadnout lipofilitu měřené látky, navíc je nutno provést několik měření, což prodlužuje dobu analýzy. Gradientové metody jsou tedy jednodušší, protože se obsah organické složky mobilní fáze zvyšuje průběžně během analýzy [3,7].

Kromě reverzních fází se v dnešní době objevují také tzv. biomimetické stacionární fáze obsahující proteiny imobilizované na silikagelu. Tyto fáze lépe napodobují biologické membrány a stanovené rozdělovací koeficienty jsou tak bližší skutečným koeficientům v organismu [3,7]. Aplikovat lze i další separační metody, například kapilární elektroforézu. Poole a spol. [5] popisují využití mikroemulzní elektrokinetické

chromatografie, kde mikroemulze sestává z dodecylsulfátu sodného, butanolu a heptanu. Metoda je aplikovatelná na neutrální látky, ale také slabé kyseliny a báze, kdy se využívá měření v pufrech při pH 3 nebo 10, navíc je vhodná pro automatizaci a velké množství vzorků.

Jinou metodu stanovení lze nalézt v publikaci Mandala a kol. [8], kteří stanovili rozdělovací koeficienty pomocí cyklické voltametrie. Principem je sledování rozdělování elektrochemické sondy (látka schopná redoxní reakce) mezi povrchově aktivní látkou v micelární/nemicelární formě a vodou.

Jednou z důležitých metod pro stanovení rozdělovacích koeficientů je využití systému liposom/voda.

### 2.1.2 Využití rozdělovacích koeficientů

Základním využitím je optimalizace extrakčních podmínek, kdy se pomocí distribučních křivek dá určit množství extrakčních kroků potřebných k oddělení dané látky od nečistot. Dále lze rozdělovací koeficienty využít k určení rovnovážných konstant chemické reakce, například reakce aldehydu a aminu při tvorbě Schiffových bazí [9].

Důležité jsou však rozdělovací koeficienty pro určování lipofilicity látek, tedy jejich afinity k lipofilnímu prostředí. To je zásadní pro popis chování léčiv v organismu, jejich schopnost procházet skrz fosfolipidové membrány buněk a tedy jejich účinnost. Jak již bylo zmíněno, pro simulaci fosfolipidů se nejčastěji využívá oktanol se svými podobnými vlastnostmi. Je však důležité zmínit, že u velmi lipofilních látek nelze systém oktanol/voda k popisu chování léčiv v organismu využít [3]. Příkladem využití rozdělovacího koeficientu oktanol/voda je určení možnosti transportu látek skrz hematoencefalickou bariéru v mozku v závislosti na jejich  $\log K_{ow}$  a molekulární hmotnosti. Tuto informaci lze následně aplikovat pro syntézu léčiv centrální nervové soustavy nebo chemoterapeutických léčiv mozkových nádorů [2,10].

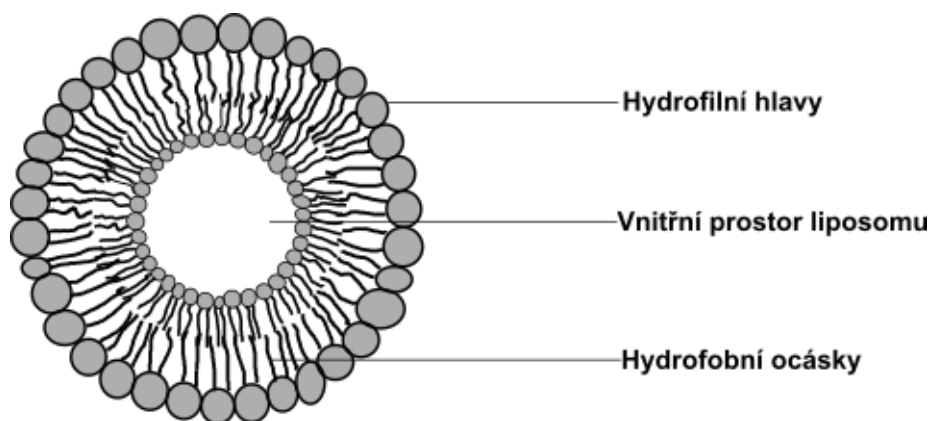
Důležitou vlastností rozdělovacích koeficientů v systému oktanol/voda je jejich dobrá korelace s biologickou aktivitou nepolárních léčiv. Oktanol může interagovat s léčivem hydrofobními interakcemi a tvorbou vodíkové vazby, avšak nemůže napodobit iontové interakce membránových fosfolipidů s léčivem iontové povahy. Pro charakterizaci biodostupnosti iontových léčiv se lépe osvědčilo jejich rozdělování v systému liposom/voda [11]. Rodrigues a spol. [12] popisují dva systémy liposom/voda, kdy jeden

tvorí aniontové liposomy a druhý zwitterionové liposomy. Při sledování rozdělovacích koeficientů léčiv neutrálních při fyziologickém pH bylo dosaženo podobných hodnot v obou systémech. Rozdíl byl u léčiv, která se při daném pH vyskytují v iontové formě, kdy kation více interagoval s aniontovým liposomem, kdežto anion měl mnohem větší rozdělovací koeficient v systému s zwitterionovým liposomem. Proto jsou systémy s liposomy výhodnější k simulacím rozdělování léčiv v organismech, jelikož kromě hydrofobních interakcí umožňují zohlednit také elektrostatické interakce hydrofobních iontových sloučenin s náboji fosfolipidů.

## 2.2 Liposomy

Jedná se o kulovité útvary, které si lze představit jako vázky naplněné kapalinou. Tyto vázky jsou tvořeny amfifilními molekulami fosfolipidů uspořádanými do dvojvrstvy. Molekuly fosfolipidů mají polární (hydrofilní) hlavičku a nepolární (hydrofobní) ocásek. To je příčinou jejich seskupování do dvojvrstev v polárním prostředí, kdy se hydrofobní ocásky orientují vůči sobě a interagují spolu uvnitř dvojvrstvy, zatímco hydrofilní hlavičky jsou orientovány do vnějšího prostředí a současně dovnitř liposomu, ve kterém je uzavřena polární kapalina (Obr. 1). Na stejném principu fungují buněčné membrány v organismech, ve kterých je nejčastějším fosfolipidem fosfatidylcholin. Více o problematice fosfolipidových membrán a tvorbě liposomů popisuje ve své bakalářské práci Müllerová [13].

Liposomy se dělí na několik druhů v závislosti na velikosti samotného liposomu a na počtu dvojvrstev, kdy nejjednodušší (a nejdůležitější pro praktické a analytické využití) obsahují pouze jednu dvojvrstvu. Vícevrstvé liposomy si lze představit jako cibuli, kdy uvnitř většího je uzavřeno několik jednovrstvých liposomů (s jednou dvojvrstvou), které jsou od sebe odděleny polárním prostředím [13,14].



**Obr. 1** Struktura liposomu

Liposomy jsou v praxi využívány k transportu léčiv v organismu. K tomu napomáhají jejich vlastnosti, tedy že fosfolipidová dvojvrstva je selektivně propustná a vnitřek liposomu je vyplněn polární kapalinou. Navíc jejich podobnost s buněčnými membránami způsobuje jejich dobrou odbouratelnost a biokompatibilitu, tudíž je nenapadá imunitní systém. Výhodou je možnost transportu daného léčiva přímo k cílovým buňkám, což je důležité například u léčby rakoviny. Samotná léčivá látka může být do liposomu vpravena pasivně při tvorbě liposomů nebo aktivně již do vzniklých liposomů. Zatímco hydrofilní léčiva vstupují do vnitřního prostoru liposomu naplněného polární kapalinou, hydrofobní léčiva procházejí pouze hydrofobní vnitřní částí dvojvrstvy. Nejčastějším mechanismem interakce liposomu a buňky je pak jednoduchá adsorpce, kdy dochází k transportu látky z liposomu do buňky skrz buněčnou stěnu, nebo dochází k následné endocytóze, kdy celý liposom projde do buňky a látka se uvolňuje až uvnitř [13,14]. Liposomy jsou tedy důležitým nástrojem pro farmacii a představují jednu z možností, jak léčiva účinně dostat do buněk.

### 2.2.1 Asolectin

Asolectin je komerční označení pro směs přírodních fosfolipidů získaných ze sójových bobů, kde majoritní složku (alespoň 25 % obsahu) představuje fosfatidylcholin (lecitin). Dále obsahuje přibližně stejné množství fosfatidylethanolaminu (cefalin) a fosfatidylinositolu. Minoritními složkami jsou další fosfolipidy a polární lipidy s různým obsahem nasycených a nenasycených mastných kyselin. GC/MS analýzou byla zjištěna přítomnost 23 mastných kyselin, přičemž nejvíce zastoupenou je kyselina linolová (51,34 %), dále kyselina palmitová (23,72 %) a kyselina olejová (15,48 %). Jediné dvě další kyseliny s obsahem nad 1 % jsou kyselina stearová (5,29 %) a kyselina vakcenová

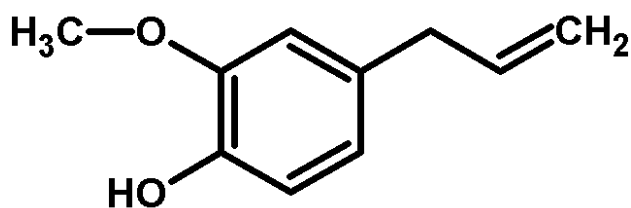


(1,87 %). Ostatní mastné kyseliny jsou zastoupeny ve stopovém množství. Mastné kyseliny pak představují téměř 67 % hmotnosti asolectinu (bráno jako hmotnostní zlomek acylových skupin v asolectinu) [15].

Důležitým parametrem asolectinu je jeho kritická liposomální koncentrace, tedy koncentrace, při které dochází ke vzniku liposomů v roztoku. Ta byla experimentálně stanovena na  $1,24 \text{ g l}^{-1}$  [16]. Samotná příprava liposomů sestává obvykle ze tří kroků (začíná přípravou vodné a fosfolipidové fáze, poté následuje samotná tvorba liposomů a posledním krokem je změna tvaru, velikosti a struktury liposomů, aby byly co nejvíce uniformní). Procesů tvorby liposomů je několik, ovšem ty nejběžnější pracují s organickými rozpouštědly, jejichž zbytky znečišťují vzniklé liposomy, což je nežádoucí pro jejich analytické využití. Proto byla vyvinuta metoda spontánní revesikulace založená na postupném přidávání koncentrovaného roztoku fosfolipidů do roztoku vodné fáze. Obecným omezením této metody je rozpustnost fosfolipidů ve vodě. Proto se zde dobře uplatní přírodní lipidové směsi obsažené v asolectinu, které mají ve vodě relativně dobrou rozpustnost [17,18]. Výhodou asolectinu je také skutečnost, že i přes své různorodé složení z různých fosfolipidů dochází při koncentracích  $4\text{--}8 \text{ g l}^{-1}$  ke vzniku téměř uniformních liposomů podobných vlastností [19].

### 2.3 Eugenol

Chemicky 2-methoxy-4-(prop-2-en-1-yl)fenol, je monoterpenoid vyskytující se v přírodních esenciálních olejích, např. ve skořici, hřebíčku, muškátovém oříšku nebo v bazalce [20]. Rostliny si jej stejně jako ostatní fenypropeny syntetizují a udržují hlavně ve vegetativních částech jako ochranu proti býložravcům, parazitickým bakteriím, houbám nebo proti hmyzu [21]. Nejvíce je obsažen v hřebíčku (hřebíčkovce kořenný), ze kterého byl poprvé extrahován a získal jméno podle jeho latinského názvu *Eugenia caryophyllata* [22].



**Obr. 2** Chemická struktura eugenolu

### 2.3.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Jedná se o těkavou kapalnou látku žluté barvy s molární hmotností  $164,20 \text{ g mol}^{-1}$ , teplotou tání  $-9,1 \text{ }^\circ\text{C}$  a teplotou varu  $253,2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Přítomnost fenolického vodíku způsobuje slabou kyselost sloučeniny s  $\text{p}K_a = 10,19$ . Je částečně rozpustný ve vodě a dobře rozpustný v organických rozpouštědlech. Rozdělovací koeficient v systému oktanol-voda je  $\log K_{ow} = 2,27$  [22,23] a v systému lecitin-pufir  $\log K_{lec-b} = 2,20$  [24].

### 2.3.2 Možnosti využití

V přirozené formě jako složka koření (hřebíčku, skořice, muškátového oříšku, bobkového listu) se uplatňuje zejména v potravinářství. Čistý eugenol se využívá jako biokonzervant potravin. Zajímavé je také použití eugenolového extraktu jako náhrady hořčice v majonéze, která má stejné senzoričké vlastnosti jako normální majonéza, ale má lepší nutriční hodnoty, zejména antioxidační účinky [25]. Mimo potravinářství se díky svému aroma využívá jako přísada do kosmetiky [21,22].

Velké uplatnění však eugenol díky svým antibakteriálním, antiseptickým, antioxidačním a anestetickým účinkům našel v medicíně. Příkladem může být jeho použití v ústních vodách nebo ve směsi s oxidem zinečnatým ve stomatologii jako dočasná výplň zubu [26].

Antibakteriální účinnost se projevuje u mnoha typů bakterií, např. známá *Escherichia Coli*, *Klebsiella pneumoniae* (způsobující zápal plic) nebo *Streptococcus pyogenes* způsobující nejrůznější infekce. Mechanismus spočívá v narušení buněčné membrány, případně v narušení/zabránění vzniku ochranného biofilmu bakterie, který ji chrání před imunitním systémem hostitele. Eugenol navíc působí synergisticky s některými antibiotiky (vankomycin,  $\beta$ -laktam), takže zvyšuje jejich účinnost [22,27,28]. Antibakteriální účinky eugenolu však nejsou studovány pouze v souvislosti s lidmi, ale sleduje se například jeho vliv na bakterie nebezpečné pro ryby, u kterých dokáže pomoci s léčbou či prevencí nemocí [29]. U ryb jsou také popsány anestetické účinky eugenolu, které se využívají při jejich transportu k odbourání stresu, čímž se zabrání možnému úhynu ryb [30,31].

Slibné se ukazují možnosti využití eugenolu v medicíně také při léčbě rakoviny. Byla u něj pozorována iniciace apoptózy (programované smrti) buněk rakoviny prsu, což představuje možnost léčby využitím přírodní látky, oproti zavedeným chemoterapiím,

kteře obecně působí negativně na pacientův organismus řadou nepříznivých vedlejších účinků [32]. Podobně byl sledován pozitivní účinek kombinace eugenolu a dakarbazinu, které byly pro transport v organismu uzavřeny v liposomech pokrytých kyselinou hyaluronovou, při léčbě zhoubných melanomů. Eugenol inhibuje protein survivin, který je nadměrně produkován melanomickými buňkami a způsobuje narušení apoptózy nemocných buněk, která se uměle vyvolává některými druhy chemoterapie [33].

Výše uvedené je jen stručný přehled možných využití eugenolu. Ačkoliv má pozitivní vlastnosti, ve vyšších dávkách může být nebezpečný a toxický, hlavně pro děti [27,34]. Proto je důležité hledat vhodné metody jeho analýzy.

### **2.3.3 Metody stanovení**

Nejběžnější jsou metody analýzy eugenolu pomocí HPLC s využitím UV detekce, vzhledem k fenolické povaze látky a přítomnosti konjugovaného systému. Cantalapiedra a spol. [35] popisují využití reverzních fází a UV detekce pro stanovení eugenolu přímo v esenciálních olejích. Autoři UV detekci doplnili také o amperometrickou detekci s pracovní elektrodou ze skelného uhlíku (GCE), a také o coulometrickou detekci s porézní uhlíkovou pracovní elektrodou. Mez detekce (LOD) a přesnost amperometrického detektoru byly srovnatelné s UV, coulometrický detektor dosahoval dokonce lepší LOD, navíc byly elektrochemické detektory selektivnější a vykazovaly nižší šum. Podobně lze najít příklad detekce eugenolu ve skořici, kdy jeho stopové množství nebylo UV detektorem zachyceno, ale elektrochemickým detektorem ano [36].

Elektrochemickou analýzu lze provádět i samostatně bez HPLC separace, ovšem problémem mohou být interference ostatních složek matrice vzorku. Ty nemusejí být problémem vždy, například při využití obyčejné grafitové tuhy do pentelky byly sledovány pouze interference jodidů [34]. Podobně Tonello a kol. [37] využili čistou GCE ke stanovení eugenolu, thymolu a karvakrolu v medu. Ačkoliv tyto tři látky vykazují na voltamogramu překrývající se píky, lze je samostatně kvantifikovat s využitím chemometrických nástrojů.

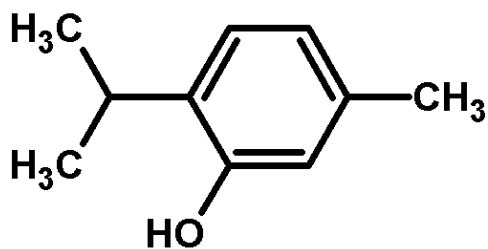
Pro lepší selektivitu a současně také vyšší proudové odezvy, citlivost, atd. se využívají různé modifikace pracovních elektrod. Příkladem může být modifikace GCE oxidem ceričitým vykazující vysokou a selektivní odezvu na eugenol obsažený v esenciálních olejích a kořeni hřebíčku [38]. Obdobně lze GCE modifikovat mědí dopovanými zlatými nanočásticemi, kdy elektroda prokazovala selektivní odezvu na

eugenol ve vzorcích koření [39]. Zajímavou metodou je využití uhlíkové černi (pigment založený na uhlíkových sazích), která je ukotvena na GCE pomocí roztoku dihexadecyl hydrogenfosfátu společně s malým množstvím vzorku [40].

Vzhledem k těkavosti sloučeniny je jako vhodná metoda používána GC, nejčastěji ve spojení s MS detekcí. V návaznosti na využití eugenolu jako antibakteriální či anestetické látky pro ryby existují GC-MS metody pro stanovení eugenolu v rybách. Problémem této analýzy jsou ovšem matriční efekty, které se liší v závislosti na druhu ryby. Jedním z řešení je kompenzace matričních efektů s využitím stabilního izotopu (např. deuteriovaného eugenolu) jako vnitřního standardu a kombinací GC-MS s vhodnou předúpravou vzorku, např. SPE [41] nebo její modifikací zvanou QuEChERS [42].

## 2.4 Thymol

Jedná se o další přirozeně se vyskytující fenolický monoterpenoid, chemickým názvem 5-methyl-2-(propan-2-yl)fenol. Jeho největší výskyt je v esenciálním oleji rostliny *Thymus Vulgaris* neboli v tymiánu obecném (známém též jako mateřídouška) [43], dále pak například v bazalce či oreganu [44].



Obr. 3 Chemická struktura thymolu

### 2.4.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Thymol je v čistém stavu bílá krystalická látka s molární hmotností  $150,22 \text{ g mol}^{-1}$ , s teplotou varu  $232,5 \text{ °C}$  a teplotou tání  $51,5 \text{ °C}$ . Kvůli své hydrofobicitě je špatně rozpustný ve vodě, čemuž odpovídají i jeho rozdělovací koeficienty  $\log K_{ow} = 3,30$  [45] a  $\log K_{lec-b} = 2,90$  [24]. Je dobře rozpustný v alkoholech a dalších organických rozpouštědlech. Stejně jako eugenol je to slabá kyselina s  $pK_a = 10,62$  a deprotonace hydroxyskupiny napomáhá jeho dobré rozpustnosti v silně alkalických vodných roztocích [45,46].

### 2.4.2 Možnosti využití

Jelikož se jedná o další fenolický monoterpenoid, jsou jeho vlastnosti a účinky podobné eugenolu. Také thymol je obsažen v kořeni, např. tymiánu a oreganu, používaném v potravinářství, ale najde zde také uplatnění jako konzervační látka, kdy se využívá jeho antimikrobiálních, antioxidantních a fungicidních účinků [44]. Specifickým příkladem může být ochrana manga po sklizni, kdy thymol funguje jako přírodní fungicid. Ty jsou v dnešní době chemických postřiků vítanou alternativou [47]. Byliny obsahující thymol jsou však využívány již po staletí, za zmínku stojí jejich využití starověkými Egypťany pro balzamování mumii [46].

Antimikrobiální, antioxidantní a další vlastnosti thymolu jsou důležité pro farmaceutické využití. Bývá obsažen v desinfekčních prostředcích, můžeme jej také nalézt jako součást nosních sprejů a dalších léků působících proti respiračním problémům, a také v mnoha dalších antibakteriálních lécích [43,48]. Jeho antimikrobiální aktivita byla porovnávána s aktivitou karvakrolu, *trans*-skořicové kyseliny, eugenolu a diacetylu proti *E. Coli* a salmonelle, kdy právě thymol byl nejvíce efektivní [44]. Navíc byl thymol testován ve spojitosti ochrany buněk slinivky břišní před nepříznivými účinky ketoprofenu. Testy prokázaly, že antioxidantní a anti-apoptické účinky thymolu téměř eliminovaly jakékoliv poškození slinivky [49].

Problémem farmaceutického využití je však špatná rozpustnost thymolu ve vodě a navíc jeho nepříjemná chuť. Proto jsou testovány různé metody pro distribuci léčiv na bázi thymolu v těle. Například byla prokázána jeho interakce s  $\beta$ -cyklodextrinem, který napomáhá distribuci, zvyšuje rychlost absorpce látky v těle, ale stále poskytuje dostatečně dlouhý biologický poločas, aby denní dávky léčiva mohly být malé [50].

### 2.4.3 Metody stanovení

Obdobně jako u eugenolu se využívá těkavosti látky k jejímu stanovení plynovou chromatografií s hmotnostně spektrometrickou detekcí. Lze například sledovat stopová množství thymolu v mléce a plasmě krav při aplikaci headspace-SPME [51]. Další separační možností je HPLC, opět s využitím UV detektoru, například pro přímé stanovení thymolu v tymiánové tinktuře [52]. Kromě UV detekce je možné využívat také elektrochemické detekční systémy, například s již zmíněnou GCE jako pracovní elektrodou ke stanovení obsahu fenolických látek v tymiánu [53] nebo pro stanovení thymolu ve vzorcích medu, kdy elektrochemický detektor nabízí snížení detekčních a kvantifikačních limitů 300–900krát oproti UV detekci [54].

Zajímavou metodou analýzy thymolu a karvakrolu (izomery) v esenciálních olejích je spektrofotometrické stanovení založené na tvorbě zlatých nanočástic v závislosti na pH. Tonello a kol. [55] zjistili, že obě látky redukují  $\text{Au}^{3+}$  na  $\text{Au}^0$  za tvorby zlatých nanočástic při pH 12, ale při pH nižším než 11 je tvoří jen karvakrol. To nabízí možnost diferenčního stanovení a odlišení těchto dvou izomerů.

Vedle elektrochemické detekce v HPLC lze pro analýzu thymolu využít i další elektroanalytické metody. Například square-wave voltametrie (SWV) s bórem dopovanou diamantovou elektrodou (BDDE) byla použita ke stanovení thymolu v esenciálním oleji koptského kmínu [56]. Opět se lze často setkat s nejrůznější modifikovanými elektrodami pro zlepšení citlivosti a selektivity analýzy hlavně u vzorků se složitější matricí. Piech a Paczosa-Bator [57] modifikovali GCE nafionem a vícevrstevnými uhlíkovými nanotrubicemi pro stanovení stopových množství thymolu v moči, ústní vodě a tekutém antihypertenzivu, kdy první vzorek nebyl nijak upravován, další dva byly pouze ředěny. Karboxylované vícevrstevné uhlíkové nanotrubičky ukotvené na GCE popisují také Ziyatdinova a kolektiv [58], kteří tuto elektrodu modifikovali různými povrchově aktivními látkami. Jako nejvhodnější se při analýze thymolu v léčivech projevila modifikace dodecylsulfátem sodným, který pomáhá zvětšit povrch elektrody, čímž dochází ke zvýšení odezvy.

U modifikovaných elektrod se mohou objevovat problémy s reprodukovatelností měření, pokud nejsou dostatečně odstraněny naadsorbované nečistoty a produkty elektrochemické reakce z povrchu elektrody. Z tohoto důvodu může být mnohdy výhodnější použití elektrod, u kterých je obnova povrchu snadná a nedochází k narušení modifikátoru. Příkladem mohou být uhlíkové pastové elektrody, u kterých dochází k obnově povrchu jednoduchým vytlačáním pasty ze zásobníku a odříznutím již použité části. Pro stanovení thymolu je možné tyto elektrody modifikovat nanozeolity obsahujícími mangan, které zvětšují povrch elektrody a mají katalytický účinek [59].

## 2.5 Karvakrol

Jedná se o poziční izomer thymolu, chemickým názvem 2-methyl-5-(propan-2-yl)fenol. Vzhledem k podobnosti s thymolem se často vyskytuje společně s ním, v přírodě jej nalezneme hlavně v esenciálním oleji oregana (rostlina dobromysl), dále také v majoránce, řeřiše či tymiánu. Současně má také podobné vlastnosti a účinky jako thymol [60].

### 2.5.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Jde o kapalinu s molární hmotností  $150,22 \text{ g mol}^{-1}$ , s teplotou varu  $237,7 \text{ }^\circ\text{C}$  a teplotou tání  $1 \text{ }^\circ\text{C}$ . V systému oktanol-voda se s  $\log K_{ow} = 3,49$  jeví lehce hydrofobnější než thymol, takže je také špatně rozpustný ve vodě, ale dobře rozpustný v alkoholech či alkalických roztocích, navíc je velmi dobře rozpustný v acetonu [61]. Oproti tomu v systému lecitin-pufr má o něco nižší rozdělovací koeficient než thymol  $\log K_{lec-b} = 2,76$  [24].

### 2.5.2 Možnosti využití

Jelikož jde o další fenolický monoterpenoid, jsou jeho vlastnosti srovnatelné s oběma dříve popsanými. Lze nalézt jeho uplatnění ve farmacii jak humánní, tak i veterinární. Byl pozorován pozitivní účinek proti klíšťatům napadajícím psy, kdy sice nemusí docházet ke stoprocentnímu usmrcení klíšťat, ale karvakrol působí na reprodukční buňky samic, čímž lze dosáhnout dlouhodobé kontroly populace. Navíc byly pozorovány repelentní účinky karvakrolu [62]. Co se týká využití na ochranu zdraví lidí, byl například pozorován jeho účinek proti bakteriím z rodu listérie, které způsobují listeriózu. Účinek karvakrolu byl navíc mnohem větší v kombinaci s cymenem, kdy směs obou látek efektivně ničila bakterie v mrkvovém džusu. To vypovídá o možnosti použití ke konzervaci potravin [63].

Účinky karvakrolu pro ochranu potravin byly popsány v různých oblastech. Může se využít jako konzervant u vakuově balené krutí šunky, kde působí na již zmíněné listérie, navíc dokáže zpomalit oxidaci lipidů [64]. Bakterie v potravinách obecně představují velké nebezpečí, hlavně pokud dochází k jejich hromadění (angl. biofouling – hromadění (mikro)organismů na vlhkých površích). Proti tomu se testují různé přírodní látky i esenciální oleje. Pozorováno bylo působení karvakrolu na bakterie stafylokoka, listérie a *E. coli*, který tyto bakterie dokáže zabít a navíc se dá využít k fyzickému odstranění biofilmů těchto bakterií [65]. Zajímavé jsou pak jedlé ochranné filmy, které jsou aplikovány na potraviny, kde působí proti nejrůznějším patogenům. Du a kol. [66] popisují ochranný film vytvořený z rajčatového pyré s přísadkou karvakrolu, který má pozitivní účinek v boji s *E. coli* a to až po dobu tří měsíců skladování při teplotách  $5$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Velká oblast využití je také v zemědělství. Bylo popsáno využití karvakrolu, a současně také eugenolu, jako přírodních fungicidů u čerstvě sklizených vodních melounů. Ošetření těmito látkami se jeví jako slibná přírodní alternativa k použití chemických konzervantů pro zvýšení bezpečnosti a kvality čerstvých plodů připravených k přímé konzumaci [67]. Obdobně byl sledován vliv karvakrolu přidaného do oplachové

vody s ozonem při zpracování sklizeného ledového salátu. Oplachová voda se v zemědělství používá po sklizni k odstranění mechanických nečistot a současně ke snížení mikrobiální zátěže. Karvakrol má v tomto ohledu pozitivní vliv (zde testován účinek proti salmonele) a může sloužit jako bezpečná náhrada běžně používaného chlóru [68]. Účinek karvakrolu však není omezen pouze na jednobuněčné organismy. Byla vypracována studie jeho působení na hlístice, které napadají kořeny rostlin a způsobují snižování úrody. Karvakrol se zde opět osvědčil jako účinný přírodní produkt, který by do budoucna mohl nahradit pesticidy s negativními vlivy na životní prostředí [69].

### 2.5.3 Metody stanovení

Zavedenými metodami pro stanovení karvakrolu jsou opět metody plynové chromatografie. Příkladem může být jeho analýza v esenciálních olejích přidávaných do krmných směsí pro hospodářská zvířata, kde pomáhají jako přírodní náhražka antibiotik. Z těchto směsí se dá karvakrol extrahovat kapalinovou extrakcí za zvýšeného tlaku, a poté analyzovat pomocí GC-MS systému [70]. Vedle GC metod jsou dále používány HPLC metody s UV detekcí, např. pro analýzu oleje z tymiánu [71]. Zajímavou a nedestruktivní metodou je infračervená spektrometrie (techniky zeslabeného úplného odrazu, a měření v blízké oblasti), která byla aplikována k analýze obsahu karvakrolu ve dřevě cypřišku, kde působí fungicidně a insekticidně proti termitům [72].

Vzhledem k podobnosti karvakrolu a thymolu lze očekávat jen malý rozdíl v oxidačních potenciálech při jejich elektrochemickém stanovení. Při měření s BDDE se píky obou látek překrývají [73]. Kowalcze a Jakubowska se zabývali touto problematikou a rozdíl potenciálů, který byl pouze 15 mV, vyřešili aplikací vícerozměrné statistické analýzy, kdy dosáhli přesné kvantifikace obou látek [74]. Je tedy zřejmé, že ač jsou si obě látky podobné, je možné využít elektrochemické metody k jejich rozlišení ve směsi bez potřeby jejich separace či upravených elektrod. Modifikace elektrod je však dnes velmi oblíbená, jak bylo zmíněno v předešlých kapitolách. Lze tak nalézt například tištěné uhlíkové elektrody modifikované nanokompozitem oxidu lanthanitého a oxidu kobaltinato-kobaltitého. Nanokomposit při analýze působí katalyticky na oxidaci karvakrolu a usnadňuje jeho detekci v reálných vzorcích [75].



## 2.6 Voltametrické metody

Jsou založeny na měření závislosti proudu procházejícího pracovní elektrodou, která je ponořena v analyzovaném roztoku, na potenciálu, který je na elektrodu vkládán z vnějšího zdroje. Při vhodném potenciálu dochází k redoxní reakci analytu, při které prochází elektrodou proud, jenž je přímo úměrný koncentraci analytu v roztoku. Nejčastěji se pracuje v tříelektrodovém zapojení, kde kromě zmíněné pracovní elektrody, na které se sleduje redoxní reakce analytu, je v roztoku ještě referenční elektroda (nepolarizovatelná elektroda s konstantním potenciálem) a pomocná elektroda. Mezi pracovní a referenční elektrodou se kontroluje napětí vložené ze zdroje, které způsobuje změnu potenciálu pracovní elektrody (potenciál referenční je konstantní), a to za bezproudového stavu (kvůli ochraně referenční elektrody před její polarizací). Proud prochází mezi pracovní a pomocnou elektrodou. Reakce probíhající na pomocné elektrodě se nesledují [76].

### 2.6.1 Diferenčně pulzní voltametrie

Zkráceně DPV, je jednou z nestacionárních pulzních voltametrických technik. Při této technice je na elektrodu vkládáno napětí lineárně se měnící s časem, a zároveň jsou na ni vkládány potenciálové pulzy o amplitudě 10 až 100 mV s dobou trvání v řádu desítek milisekund. Zaznamenáván je rozdíl proudů změřených těsně před vložením pulzu a na jeho konci. Grafickým výstupem je voltamogram – závislost rozdílu proudů na stejnosměrné složce polarizačního potenciálu. Redoxní reakce analytu se projeví proudovým píkem. Potenciál odpovídající maximu píku (potenciál píku  $E_p$ ) nese kvalitativní analytickou informaci, protože je charakteristický pro danou látku. Výška píku píku (neboli proud píku v jeho maximu,  $i_p$ ) je informací kvantitativní, protože je úměrná koncentraci analytu v roztoku. Potenciálové pulzy u této, ale i dalších metod s pravoúhlým napěťovým pulzem, jako je např. SWV, slouží ke zlepšení poměru signál/šum, protože měření proudu pouze po určité intervaly vede ke snížení vlivu kapacitního proudu, který je hlavním zdrojem šumu ve voltametii [76].

## 2.6.2 Voltametrie fenolů

Fenolické látky jsou analyticky zajímavé zejména díky svým vlastnostem a využití k desinfekci, jako léčiva, konzervanty, apod. jak bylo zmíněno v předchozích kapitolách. Fenoly a jejich deriváty však mají také toxické účinky a jedná se o závažné polutanty hlavně v průmyslových vodách, kvůli jejich nesnadné rozložitelnosti a tudíž obtížnému odstraňování [77]. Proto je důležité vyvíjet spolehlivé metody k jejich stanovení.

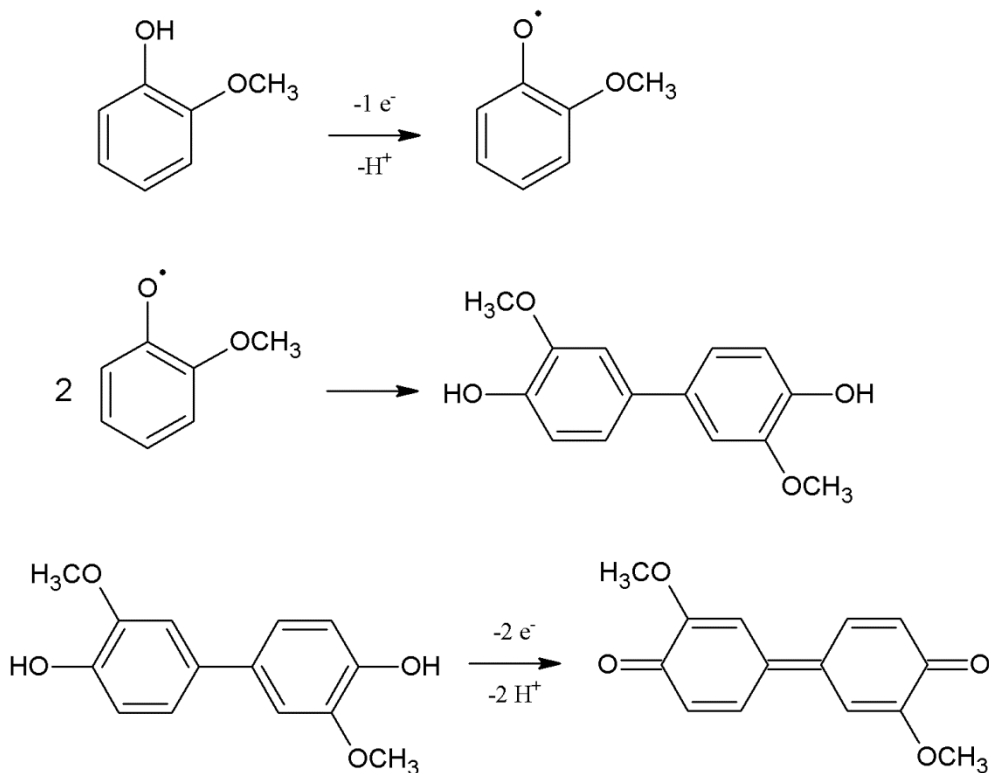
Aplikace voltametrie pro jejich analýzu je vhodná díky přítomnosti snadno oxidovatelné fenolové skupiny. Alifatické hydroxylové skupiny (alkoholů) se elektrochemicky oxidují poměrně hůř. Obecně se fenoly oxidují ireverzibilně jedno-elektronovým přenosem. Jejich oxidační potenciály se zdatelně posouvají do negativnějších oblastí se zvyšujícím se pH v rozmezí pH 5–9, ovšem v kyselejším prostředí jsou potenciály stabilní a na pH téměř nezávislé. Samotná oxidace vede ke vzniku volných fenoxylových radikálů [78]. Radikály interagují s ostatními látkami v roztoku za vzniku produktů nebo dochází k jejich rekombinacím a vzniku dimerů, které se mohou dále oxidovat. V závislosti na podmínkách vznikají buď polymery (při vysokých koncentracích fenolů a v zásaditém prostředí), nebo chinony (při nízkých koncentracích a v kyselém prostředí). Chinony mohou podléhat ještě další oxidaci, při které vznikají karboxylové kyseliny, ovšem tato oxidace je energeticky náročná. Výhodou je však biodegradabilita těchto kyselin, čehož lze využít pro odstranění fenolů z průmyslových vod s využitím elektrochemické oxidace [77]. Naopak vznik polymerních struktur je nežádoucí zejména kvůli následné pasivaci elektrody a ztrátě signálu [79].

Příkladem může být voltametrická oxidace *o*-methoxyfenolu, což je základní strukturální motiv eugenolu. Ta může probíhat dvěma způsoby (Obr. 4). První možností (průběh A) je jedno-elektronová oxidace za vzniku radikálových sloučenin a jejich rekombinace s následnou dvou-elektronovou oxidací za vzniku 3,3'-dimethoxyfenchinonu. Druhá, pouze dvou-elektronová, oxidace vede ke vzniku *o*-benzochinonu (průběh B).

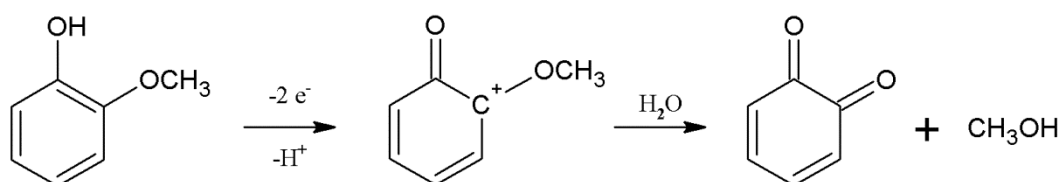
Příkladem využití voltametrie je například sledování obsahu fenolů ve víně. Zde působí fenoly jako antioxidanty a zájem o ně vzrostl se zjištěním, že lidé konzumující víno mají nižší rizikovost srdečních onemocnění. Nejvhodnější elektrodou pro tyto analýzy je GCE, jelikož na jiných materiálech (zlato, platina) interferuje oxidující se ethanol. Při měření proti argentchloridové referenční elektrodě se píky *o*-difenolů vyskytují při

potenciálu 400 mV [80]. Obdobnou aplikací je stanovení celkového obsahu fenolů v potravinách. Zde je také využitelný skelný uhlík, ovšem ten je některými fenoly pasivován. Proto je výhodnější použít BDDE, která je vhodná pro detekci i v komplexních vzorcích, a to i za přítomnosti pasivujících látek [81].

#### Průběh A



#### Průběh B



**Obr. 4** Oxidace *o*-methoxyfenolu za vzniku 3,3'-dimethoxydifenochinonu (A) nebo *o*-benzochinonu (B)

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Použité chemikálie

Studovanými látkami byly thymol (Merck, Kenilworth, NJ, USA), karvakrol 99%, eugenol 99% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo).

K tvorbě liposomů posloužil asolectin ze sójových bobů s obsahem fosfatidylcholinu  $\approx 25\%$  (Fluka, Buchs, Švýcarsko).

Další používané chemikálie byly kyselina orthofosforečná 85% p.a. (Penta, Praha, Česká republika), kyselina octová 99% p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), kyselina boritá p.a. (Lachema, Brno, Česká republika), hydroxid sodný p.a. (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika), acetonitril pro HPLC (VWR International, Fontenay-sous-Bois, Francie).

### 3.2 Příprava roztoků

Základní roztoky eugenolu, karvakrolu a thymolu o koncentraci  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  byly připraveny rozpuštěním příslušného množství látky v deionizované vodě (Millipore,  $18,2 \text{ M}\Omega$ ).

Základní Britton-Robinsonův pufr (BR pufr) byl připraven z kyseliny octové, kyseliny borité a kyseliny fosforečné o koncentracích  $0,04 \text{ mol l}^{-1}$  v destilované vodě. Řada BR pufrů pH 2–8 byla připravena úpravou pH základního pufru titrací 50% (m/m) roztokem hydroxidu sodného.

Roztok asolectinu o koncentraci  $8 \text{ g l}^{-1}$  byl připraven rozpuštěním daného množství látky v deionizované vodě (Millipore,  $18,2 \text{ M}\Omega$ ).

### 3.3 Použité přístroje

Všechna elektrochemická měření byla provedena na potenciostatu/galvanostatu Autolab PGSTAT128N se softwarem Nova ve verzi 2.1 (Metrohm Autolab, Utrecht, Nizozemsko).

Pro hmotnostně spektrometrická měření sloužil hmotnostní spektrometr Agilent 1100 Series LC/MSD Trap (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) s ionizací elektrosprejem (ESI), za použití softwaru DataAnalysis 3.3 (Bruker Daltonik, Leipzig,

Německo). Pro dávkování vzorku sloužila stříkačková pumpa NE-1002X (New Era Pump Systems, Farmingdale, NY, USA).

K dalším činnostem byly využívány třepačka Vibramax 100 (Heidolph, Schwabach, Německo, pH metr inoLab 720 s kombinovanou skleněnou elektrodou SenTix 41 (WTW, Weilheim, Německo), ultrazvuková čistička Sonorex Digitec (Bandelin, Berlín, Německo), analytické váhy ABS 220-4 (KERN, Balingen, Německo) a XSE205 (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA).

### **3.4 Experimentální postupy**

Byly určovány rozdělovací koeficienty eugenolu, thymolu a karvakrolu v systému liposom-voda po definované době rozdělování. Systém pro rozdělování látek sestával ze dvou 4 ml vialek naplněných roztoky, oddělených polopropustnou membránou, které byly třepány definovanou dobu na třepačce, vždy rychlostí 150 rpm.

Celkem byly testovány tři typy polopropustných membrán: polykarbonátová (PC) membrána Nuclepore Track-Etch filtrační membrána (Whatman, Maidstone, Velká Británie) s velikostí pórů 0,05  $\mu\text{m}$ , celulózová dialyzační membrána z regenerované celulózy s tloušťkou stěny 25  $\mu\text{m}$ , průchozí pro látky do molekulové hmotnosti 3500 Da (Fisher Scientific, Hampton, NH, USA) a membrána z nylonu o průměru pórů 0,2  $\mu\text{m}$  (Hahnemühle, Dassel, Německo).

#### **3.4.1 Příprava vzorků pro určení rozdělovacích koeficientů**

Vialky pro třepání byly naplněny roztoky. Jedna vialka obsahovala 3,2 ml deionizované vody, druhá vialka obsahovala 2,8 ml roztoku asolectinu o koncentraci 8  $\text{g l}^{-1}$  (resp. 2,8 ml deionizované vody v případě slepého pokusu) a 0,4 ml roztoku sledované látky o koncentraci 500 nebo 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Celkové vstupní koncentrace analytu ve vialce byly 62,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  nebo 6,25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , koncentrace asolectinu činila 7  $\text{g l}^{-1}$ . Vialky byly spojeny v aparaturce (viz Obr. 5 – jedná se o dvě vialková víčka s vyvrtanými otvory, která jsou zalepena v kovovém nebo plastovém krytu) a odděleny membránou. Vzorky byly poté třepány 48 hodin (není-li uvedeno jinak) a následně analyzovány.



**Obr. 5** Rozdělovací aparatura – nahoře s kovovým pouzdem, dole s plastovým

### 3.4.2 Diferenčně pulzní voltametrie

Všechna měření byla provedena v tříelektrodevém zapojení s využitím pracovní GCE, referenční argentchloridové elektrody Ag|AgCl|1M-KCl, a jako pomocná elektroda sloužil platinový drátek.

K měření byla využita dvoudílná nízkoobjemová elektrochemická cela s roztokem sestávajícím z 200  $\mu\text{l}$  BR pufru a 200  $\mu\text{l}$  měřeného roztoku. Dvě elektrody – pracovní a pomocná – byly umístěny ve vnitřní nádobce s analyzovaným roztokem, referenční elektroda byla ve vnější nádobce se základním BR puftrem. Vodivé spojení roztoků v obou nádobkách zajišťovala fritta z vycoru. Před každou analýzou byl povrch uhlíkového disku pracovní elektrody vyleštěn vodnou suspenzí aluminu (0,05  $\mu\text{m}$ ), poté byla elektroda opláchnuta destilovanou vodou a 1 minutu čištěna v ultrazvuku.

DPV měření eugenolu probíhalo v rozsahu potenciálů -0,1 až +1 V při rychlosti skenu 10  $\text{mV s}^{-1}$ , s modulační amplitudou 50 mV a šířkou pulzu 500 ms.

Stanovení thymolu a karvakrolu se lišilo pouze v rozsahu potenciálů, které zde byly nastaveny od -0,1 do +1,3 V.

### 3.4.3 Hmotnostní spektrometrie

Byla testována koncentrační řada asolectinu 0, 2, 5, 10, 25 a 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Ke sledování množství prošlého asolectinu přes polopropustné membrány bylo využito postupu z kapitoly 3.4.1 s dobou třepání 24 hodin.

Podmínky MS byly následující: teplota sušícího plynu (dusík) 250  $^{\circ}\text{C}$ , rychlost průtoku sušícího plynu 5  $\text{l min}^{-1}$ , tlak ve zmlžovači 15 psi (103 421 Pa), napětí na vstupní kapiláře +3,5 kV obsah acetonitrilu ve vzorku 5 % (v/v), rychlost dávkování vzorku 8  $\mu\text{l min}^{-1}$ , doba snímání spektra 5 minut.

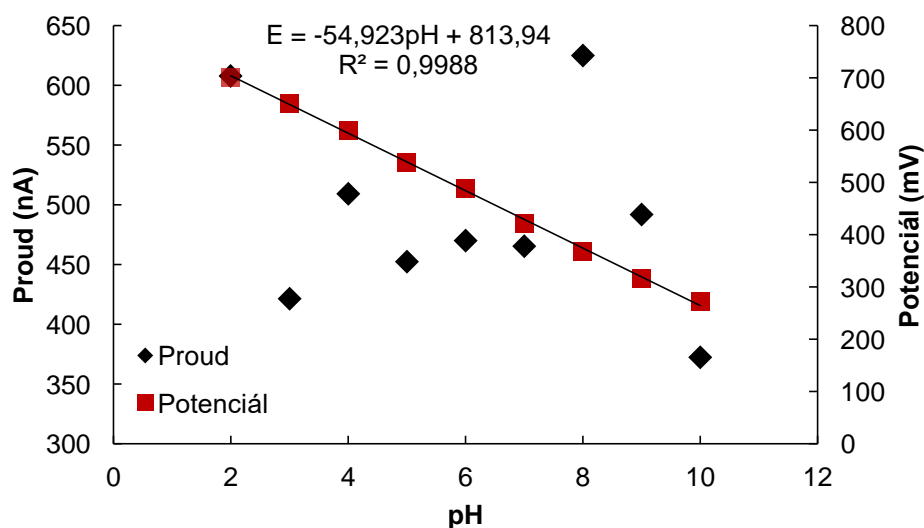
## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Voltametrická metoda pro stanovení eugenolu, thymolu a karvakrolu

Aby bylo možné aplikovat voltametrickou metodu pro stanovení rozdělovacích koeficientů, byl nejprve testován vliv pH roztoku na proudovou odezvu všech analytů, u eugenolu byl navíc sledován vliv asolectinu na kvantitativní vlastnosti DPV píku eugenolu.

#### 4.1.1 Vliv pH roztoku

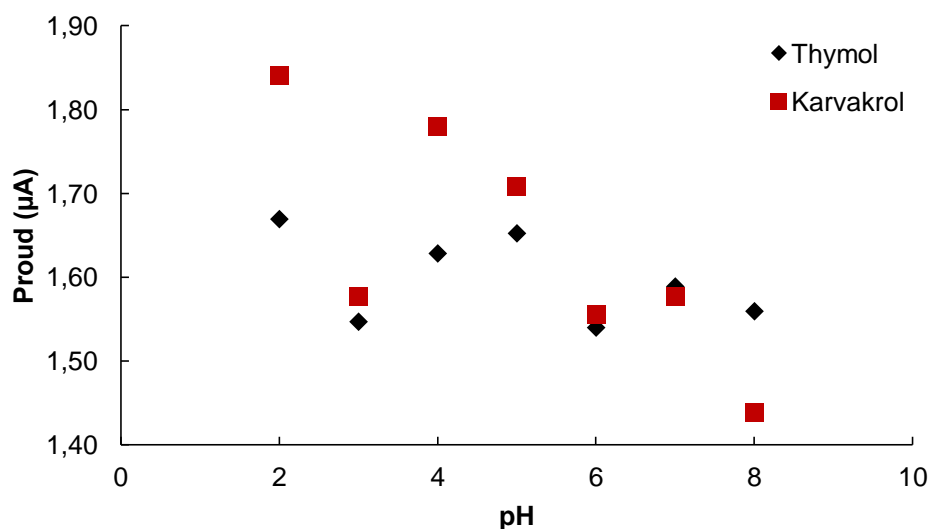
Při hledání vhodných podmínek pro voltametrickou analýzu eugenolu byla sledována závislost výšky DPV píku na pH BR pufru v rozmezí hodnot 2–10 (Obr. 6). Nejvyšší odezva byla zaznamenána při pH 8, které bylo vybráno jako nejvhodnější pro všechna další měření. Při tomto pH se pík eugenolu vyskytuje kolem potenciálu 370 mV. Pokles potenciálu píku s rostoucím pH byl lineární se směrnici -55 mV/pH, což odpovídá reakci, které se účastní stejný počet protonů a elektronů.



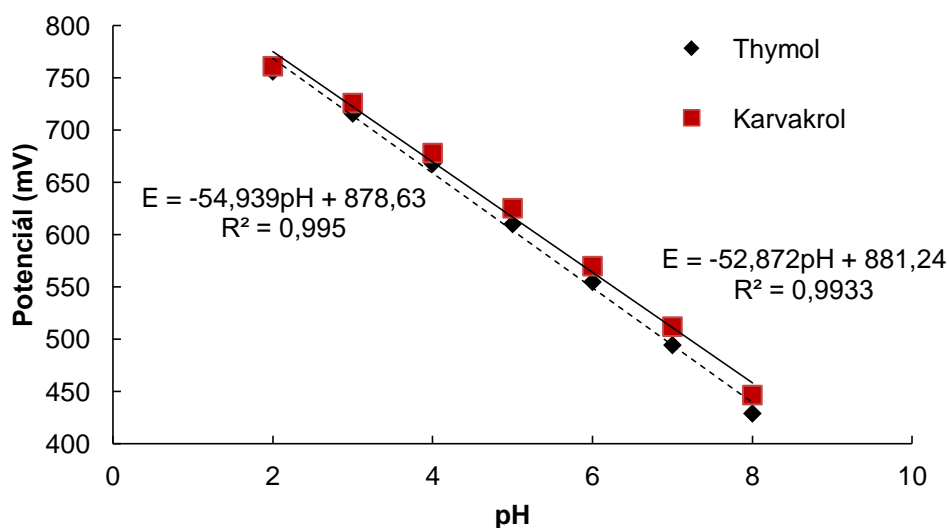
**Obr. 6** Závislost proudu a potenciálu DPV píku eugenolu (o koncentraci  $24 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) na pH BR pufru

V případě thymolu a karvakrolu se stejně jako u eugenolu jedná o fenolické látky, jejich elektrochemická odezva byla ovšem odlišná. Nejvyšších proudů totiž bylo dosaženo při pH 2 (Obr. 7), což je velká změna oproti alkalickému pH 8 pro eugenol. Při pH = 2 se

potenciál píku thymolu pohybuje okolo 756 mV, pro karvakrol je potenciál mírně vyšší s hodnotou kolem 761 mV. Potenciál DPV píku eugenolu při pH roztoku 2 je 700 mV, což představuje rozdíl přibližně 60 mV od potenciálů thymolu a karvakrolu. Při jejich současné analýze by tudíž došlo k částečnému překrytí píků, ovšem stále by bylo možné rozeznat eugenol od thymolu/karvakrolu. Stejně jako v případě eugenolu se redoxní reakce thymolu a karvakrolu účastní stejný počet protonů a elektronů, protože pokles potenciálů při vzrůstajícím pH byl lineární se směrnici -53 mV/pH pro karvakrol a -55 mV/pH pro thymol (Obr. 8).



**Obr. 7** Závislost proudové odezvy na pH BR pufru pro thymol a karvakrol (o koncentraci  $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ )

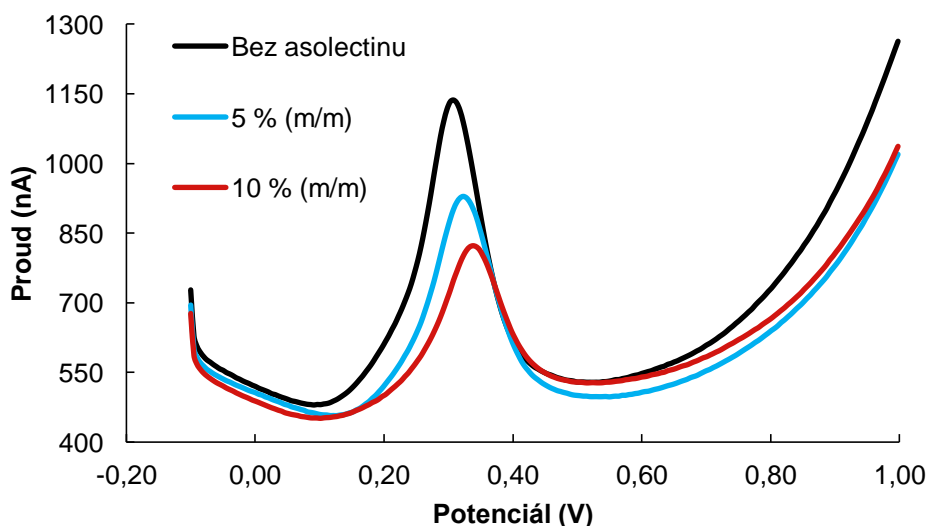


**Obr. 8** Závislost potenciálu DPV píku thymolu a karvakrolu (o koncentraci  $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) na pH BR pufru



#### 4.1.2 Vliv přítomnosti asolectinu na proudovou odezvu eugenolu

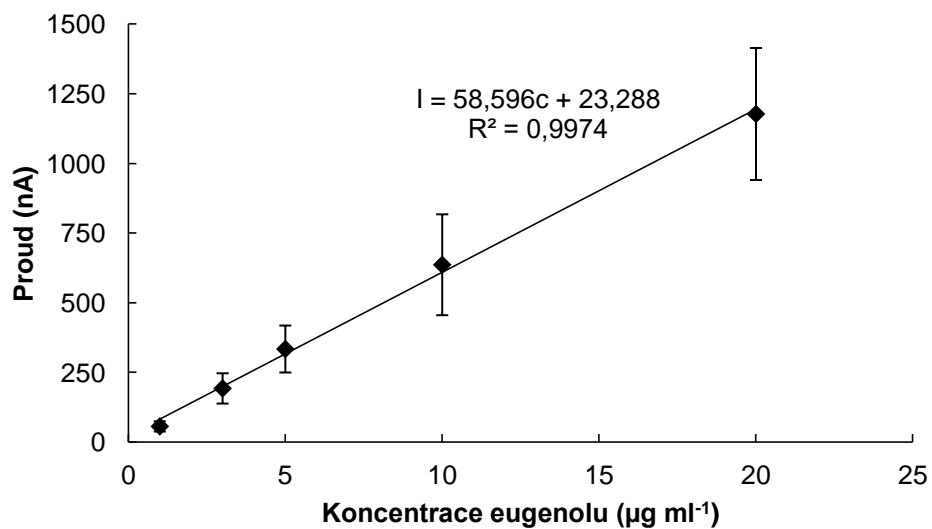
Na eugenolu (koncentrace  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) byl testován vliv obsahu asolectinu na proudovou odezvu. Jak je vidět na Obr. 9, pík eugenolu v roztoku bez asolectinu dosáhl proudové odezvy kolem 650 nA. Po přidavku 5 % (m/m) asolectinu došlo ke snížení tohoto proudu na hodnotu 450 nA. Další přidavek na celkový obsah 10 % (m/m) vedl k dalšímu snížení na 350 nA. Je tedy zřejmé, že asolectin má negativní vliv na kvantitativní voltametrickou analýzu, protože jeho přítomnost způsobuje pokles proudové odezvy fenolu v důsledku pasivace povrchu elektrody fosfolipidy. To byl také jeden z důvodů, proč nebyl stanovován eugenol (ani thymol a karvakrol) v roztoku s asolectinem, ale pouze v roztoku vody za polopropustnou membránou.



**Obr. 9** Proudové odezvy roztoku eugenolu o koncentraci  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$  s různým obsahem asolectinu v roztoku

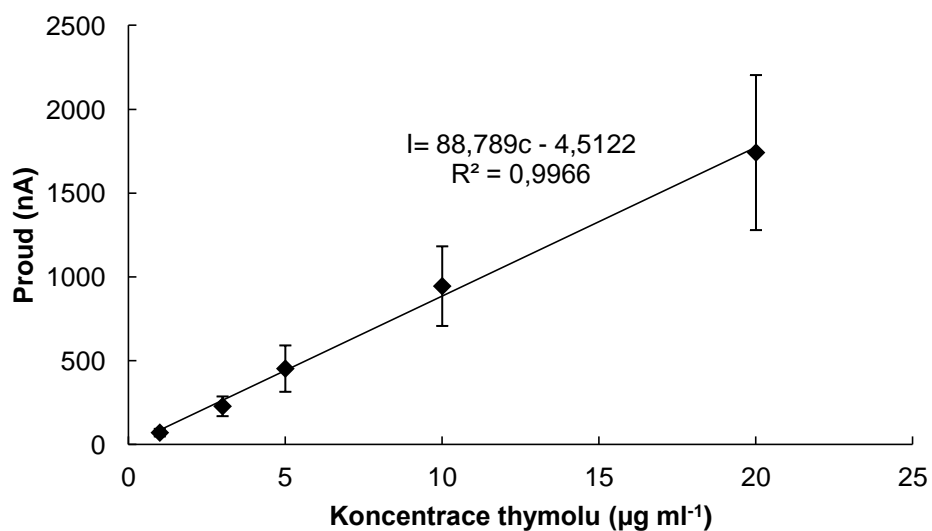
#### 4.1.3 Kalibrační závislosti

Kalibrační závislost eugenolu na Obr. 10 byla vytvořena z pěti nezávislých kalibračních závislostí měřených v různých dnech, které byly zprůměrovány. Vykazuje dobrou linearitu a opakovatelnost DPV měření pro tuto látku.



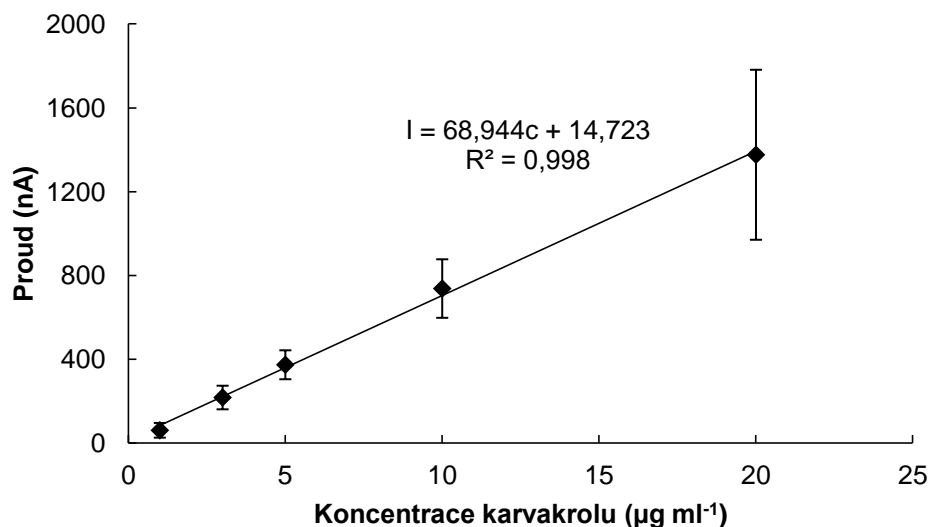
**Obr. 10** Kalibrační závislost eugenolu vytvořená zprůměrováním pěti kalibračních závislostí

Na Obr. 11 je kalibrační závislost thymolu. V tomto případě byly použity tři nezávislé kalibrační závislosti, přičemž výsledná průměrná závislost opět vykazuje dobrou linearitu a opakovatelnost DPV měření thymolu.



**Obr. 11** Kalibrační závislost thymolu vytvořená zprůměrováním tří kalibračních závislostí

U karvakrolu je situace obdobná jako u thymolu. Kalibrační závislost vytvořená zprůměrováním dvou nezávislých kalibračních závislostí je na Obr. 12. Opět vykazuje dobrou linearitu i opakovatelnost.



**Obr. 12** Kalibrační závislost karvakrolu vytvořená zprůměrováním dvou kalibračních závislostí

V Tab. I jsou regresní parametry všech tří látek a z nich vypočtené meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) pomocí rovnic 3 a 4:

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

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot s_b}{a} \quad (4)$$

kde  $s_b$  je výběrový odhad směrodatné odchylky úseku přímky a  $a$  je směrnice regresní přímky.

**Tab. I** Parametry regresních kalibračních přímek eugenolu, thymolu, karvakrolu a jejich kalibrační meze

Látka	Směrnice $a \pm s_a$ (nA ml $\mu\text{g}^{-1}$ )	Úsek $b \pm s_b$ (nA)	R	LOD ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )
Eugenol	$58,60 \pm 1,35$	$23,29 \pm 14,00$	0,9987	0,717	2,389
Thymol	$88,79 \pm 2,34$	$-4,51 \pm 24,21$	0,9983	0,818	2,727
Karvakrol	$68,94 \pm 1,38$	$14,72 \pm 14,33$	0,9990	0,623	2,078

## 4.2 Metoda stanovení rozdělovacích koeficientů

Základním předpokladem při stanovení rozdělovacích koeficientů systému liposom-voda byla tvorba liposomů, ve kterých je část studované látky uzavřena. Rozdělovací aparatura sestávala ze dvou vialek oddělených polopropustnou membránou, kdy jedna vialka obsahovala liposomální asolectinovou fázi s rozdělovanou látkou (analytem) a druhá vialka obsahovala deionizovanou vodu. Poté byla definovaná doba ustavována rovnováha za mírného třepání, a následně byla stanovena koncentrace analytu v roztoku vody za polopropustnou membránou. Předpokladem bylo, že tato membrána umožnila difúzi analytu z roztoku asolectinu do roztoku vody ve vialce za membránou a zároveň zabránila pronikání liposomů do tohoto roztoku. Za předpokladu dosažení rovnováhy během rozdělování, tedy že 50 % volné formy analytu prošlo skrze membránu, odpovídá zjištěné množství látky polovině celkového množství volné látky, která se nacházela ve vialce s asolectinem. Jelikož současně známe celkové množství látky přidané do roztoku asolectinu, můžeme jednoduše určit množství látky uzavřené v liposomech a současně vypočítat její rozdělovací koeficient mezi liposomy a vodou.

Využití asolectinu k tvorbě liposomů vychází z jeho dobré rozpustnosti ve vodě, čehož lze využít při metodě spontánní revesikulace (viz kapitola 2.2.1). Problémem je zde vliv asolectinu na DPV signál analyzovaných látek (viz kapitola 4.1.2), což byl jeden z důvodů, proč byly analyty stanovovány v roztoku deionizované vody za membránou po dosažení rovnováhy. Dalším důvodem je nemožnost rozlišit volný analyt od analytu vázaného v liposomech (na elektrodě by kromě pasivace fosfolipidy mohlo docházet také k narušení struktury liposomů a k oxidaci uvolněné látky).

### 4.2.1 Výpočet rozdělovacího koeficientu

Pro vialky rozdělovací aparatury byly zavedeny dva pojmy. Vialka, do níž je na začátku přidána studovaná látka (a v případě samotného vzorku také asolectin), je označena jako roztok analytu. Druhá vialka s čistou vodou, do níž látka difunduje, je označena jako roztok vody.

Základním předpokladem rozdělování je vznik liposomů v roztoku. Jak již bylo zmíněno, kritická liposomální koncentrace asolectinu je  $1,24 \text{ g l}^{-1}$ . Proto byl při experimentech využíván roztok o výsledné koncentraci asolectinu  $7 \text{ g l}^{-1}$ . Za použití

hustoty asolectinových liposomů  $1,028 \text{ g ml}^{-1}$  [19] zjistíme objem liposomů v roztoku  $V_L = 2,179 \cdot 10^{-2} \text{ ml}$ .

Další parametr získáme analýzou slepých pokusů, které neobsahují asolectin. Zde tedy dochází k difúzi sledované látky z roztoku analytu přes polopropustnou membránu do roztoku vody (čistá voda) až do ustavení rovnováhy (vyrovnání koncentrací). Předpokladem je, že v rovnováze obsahují oba roztoky, oddělené membránou, shodné množství látky, jejíž součet má odpovídat celkovému množství látky na počátku experimentu  $m_c = 200 \text{ } \mu\text{g}$  (při vstupní koncentraci  $62,5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ ), resp.  $20 \text{ } \mu\text{g}$  (při vstupní koncentraci  $6,25 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Rozdíl mezi celkovým množstvím analytu na začátku a po ustavení rovnováhy v obou roztocích oddělených membránou odpovídá množství látky, které se zadrželo na/v membráně, případně na stěnách vialek ( $m_z$ ). Při výpočtech byl tento parametr brán jako průměr ze všech opakování slepých pokusů.

Analýzou roztoku vody po třepání vzorku s asolectinem byla zjištěna koncentrace analytu ve vodné fázi (za membránou), která současně odpovídá koncentraci zbylé látky v roztoku analytu, která není vázána v liposomech. Tato koncentrace má symbol  $c_e$  a současně z tohoto údaje získáme hmotnost látky v roztoku  $m_e$ , která prošla do vialky s vodou. Hmotnost volné látky v obou vialkách pak bude  $2m_e$ .

Pomocí těchto parametrů zjistíme množství látky v liposomech  $m_L$ , její koncentraci v liposomech  $c_L$  a následně rozdělovací koeficient  $K_{lw}$ :

$$c_L = \frac{m_L}{V_L} = \frac{m_c - m_z - 2 \cdot m_e}{V_L} \quad (5)$$

$$K_{lw} = \frac{c_L}{c_e} \quad (6)$$

Během experimentů se slepými pokusy byl pozorován velký rozptyl hodnot  $m_z$  mezi jednotlivými vzorky, kdy se ztráty pohybovaly od 5 do 40 %. Při některých experimentech byly získány dokonce záporné hodnoty. To vedlo k zavedení druhého výpočtu, kdy je koeficient  $m_z$  vynechán a je vypočítán rozdělovací koeficient bez započtení ztrát na membráně  $K_{lwx}$ :

$$c_{Lx} = \frac{m_L}{V_L} = \frac{m_c - 2 \cdot m_e}{V_L} \quad (7)$$

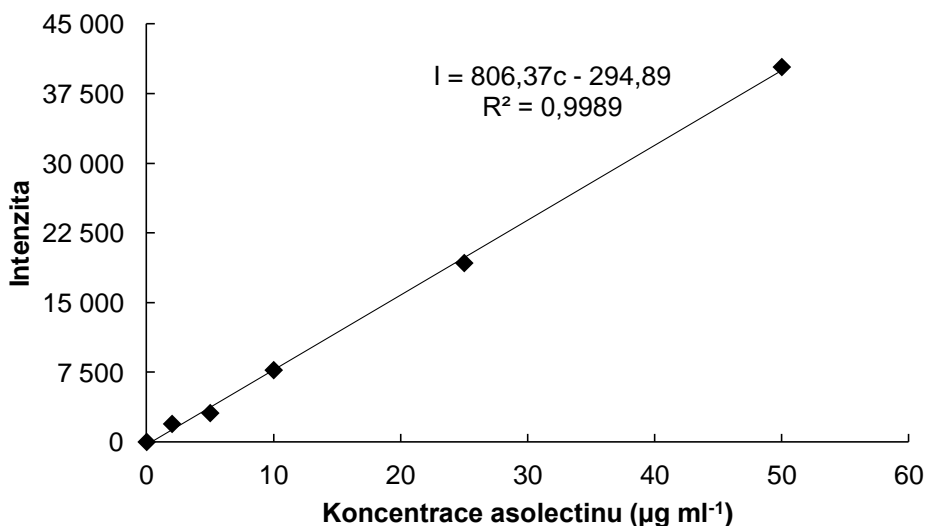
$$K_{lwx} = \frac{c_{Lx}}{c_e} \quad (8)$$

### 4.3 Testování vlivu různých podmínek na rozdělovací koeficienty

Pro možnou aplikaci popsané metody stanovení rozdělovacích koeficientů byl testován vliv některých experimentálních podmínek na výsledný rozdělovací koeficient. Pomocí MS analýzy bylo sledováno množství prošlého asolectinu přes jednotlivé membrány (celulosovou, nylonovou a polykarbonátovou). Voltametrická metoda byla použita pro určení doby potřebné k ustavení rovnováhy (během rozdělování eugenolu metodou třepáním podpořené difúze) a vlivu koncentrace eugenolu na výsledný rozdělovací koeficient.

#### 4.3.1 Volba vhodného typu membrány

Dřívější experimenty prokázaly, že malá část asolectinu prochází přes polopropustnou membránu (v případě membrány z nylonu jde o množství nepřesahující 1 % [16]), což by mohlo mít vliv na elektrochemická měření. Proto byla použita MS analýza ke sledování množství prošlého asolectinu jednotlivými polopropustnými membránami. Vzhledem k množství látek v asolectinu byl pro potřebu kalibrační závislosti vybrán nejintenzivnější pík fosfolipidu o  $m/z$  833. Da odpovídající linolyl-palmitoyl fosfatidylinositolu (fragmentové spektrum tohoto iontu je uvedeno v *Příloze 1*). Na Obr. 13 je kalibrační závislost asolectinu vykazující dobrou linearitu ve velkém rozsahu.



**Obr. 13** Kalibrační závislost asolectinu (vyhodnocován ion 833  $m/z$ ) změřená metodou MS

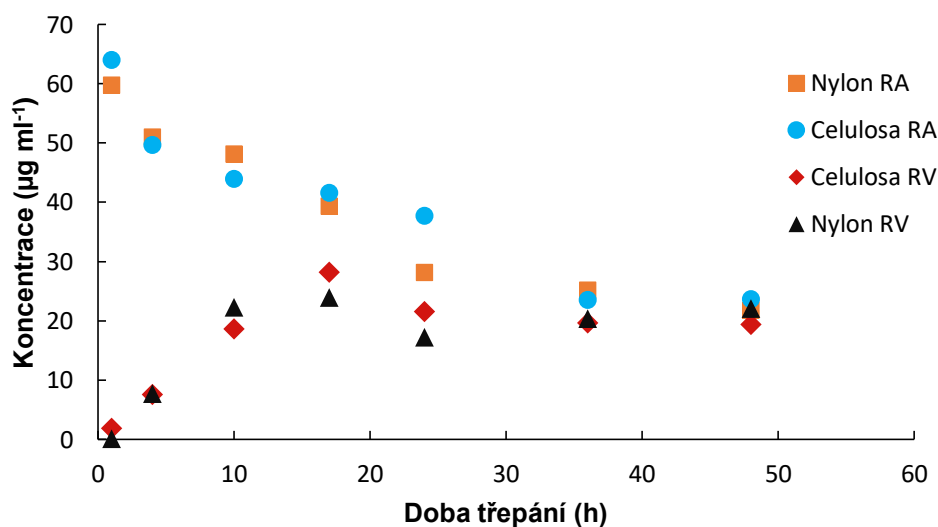
Koncentrace asolectinu změřené v roztocích vody po 24 hodinové třepáním podpořené difúzi přes jednotlivé polopropustné membrány jsou uvedeny v Tab. II (průměry ze dvou opakování). Množství asolectinu prošlého přes celulosovu a nylonovou membránou je téměř shodné a nepřekračuje 0,18 % celkové koncentrace asolectinu v roztoku analytu na počátku experimentu. U polykarbonátové membrány však asolectinu prochází mnohonásobně více, průměrná hodnota uvedená v tabulce odpovídá 18,01 % z celkové koncentrace  $7 \text{ g l}^{-1}$  asolectinu na počátku experimentu. Průměrně tak přes PC membránou prochází asi 80krát více asolectinu než přes membrány z celulosy a nylonu. Z tohoto důvodu a vzhledem k obtížnější manipulaci s PC membránou byly pro všechny experimenty využívány pouze membrány z celulosy a nylonu.

**Tab. II** Naměřené koncentrace asolectinu prošlého z roztoku analytu (eugenol, koncentrace 6,25 a 62,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) do roztoku vody přes jednotlivé polopropustné membrány (C – celulosovou, N – nylonovou a PC – polykarbonátovou). Průměrováno ze dvou měření

Vzorek	C6,25	C62,5	N6,25	N62,5	PC6,25	PC62,5
$c_{\text{asolectin}}$ ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	11,21	7,85	11,00	12,29	1260,70	461,77

#### 4.3.2 Časová závislost rozdělování

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit dobu potřebnou pro ustavení rovnováhy v roztocích při třepáním podpořené difúzi eugenolu přes polopropustnou membránou. Třepání probíhalo 1, 4, 10, 17, 24, 36 a 48 hodin a byly použity membrány z celulózy a nylonu. Ukázka změny koncentrace eugenolu v slepém vzorku (bez přítomnosti asolectinu, počáteční koncentrace eugenolu byla  $62,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) je na Obr. 14. Koncentrace eugenolu klesala relativně shodně u obou membrán s rozdílem vzorku s dobou třepání 24 hodin, ovšem zde může jít i o náhodné chyby měření. Po 36 a 48 hodinách ustavování rovnováhy byly koncentrace eugenolu prakticky konstantní, což ukazuje na dosažení stavu blízkého rovnováže.



**Obr. 14** Koncentrace eugenolu ve slepém vzorku (bez asolectinu) o počáteční koncentraci  $62,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  v závislosti na době třepáním podpořené difúze do vody přes polopropustnou membránu. RA – roztok analytu, RV – roztok vody

V Tab. III jsou uvedeny hodnoty rozdělovacích koeficientů a jejich logaritmy vypočítané pro všechny vzorky z časové řady. U vzorku s celulosovou membránou a dobou třepání 24 h je zřetelná odchylka, kdy se rozdělovací koeficient zvýšil v jinak klesající řadě. Tento skok může být způsoben chybou měření či špatnou přípravou vzorku. Výsledná hodnota  $\log K_{lw} = 2,26$  pro celulosu a dobu třepání 48 hodin se nejvíce blíží rozdělovacímu koeficientu eugenolu v systému lecitin-pufr  $\log K_{lec-b} = 2,20$  [24]. U nylonu se nejvíce blíží doba 36 hodin s  $\log K_{lw} = 2,32$ , ovšem  $\log K_{lw} = 2,37$  u 48 hodin třepání se liší pouze nepatrně. Jako nejvhodnější doba rozdělování bylo vybráno 48 hodin, přičemž není nutné tento čas zvýšit, jelikož už v rozmezí 36 a 48 hodin jsou koncentrace téměř konstantní.

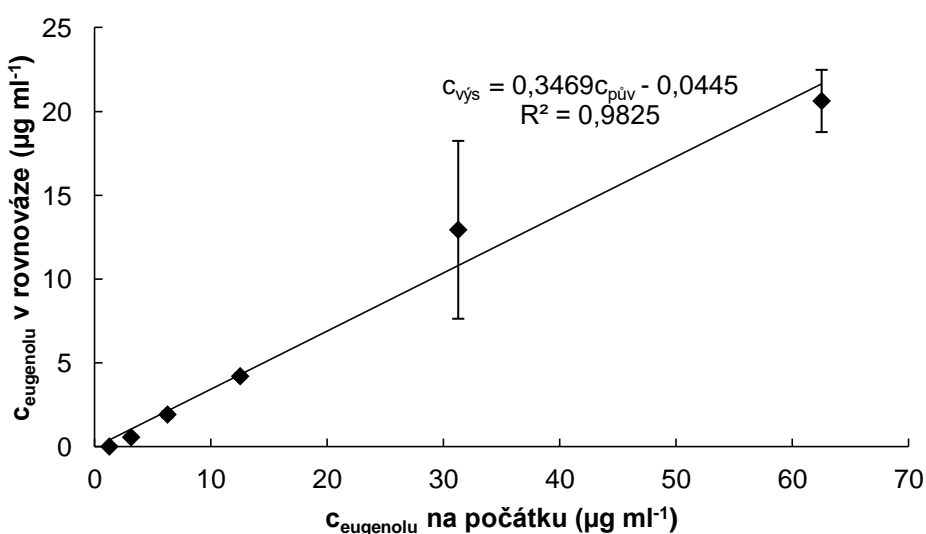
**Tab. III** Rozdělovací koeficienty eugenolu v systému liposom-voda v závislosti na době třepání vzorku

	Doba třepání (h)	1	4	10	17	24	36	48
Celulosa	$K_{lw}$	13 229	1 609	1 693	515	699	315	184
	$\log K_{lw}$	4,12	3,21	3,23	2,71	2,84	2,50	2,26
Nylon	$K_{lw}$	13 691	1 684	1 854	515	389	207	237
	$\log K_{lw}$	4,14	3,23	3,27	2,71	2,59	2,32	2,37



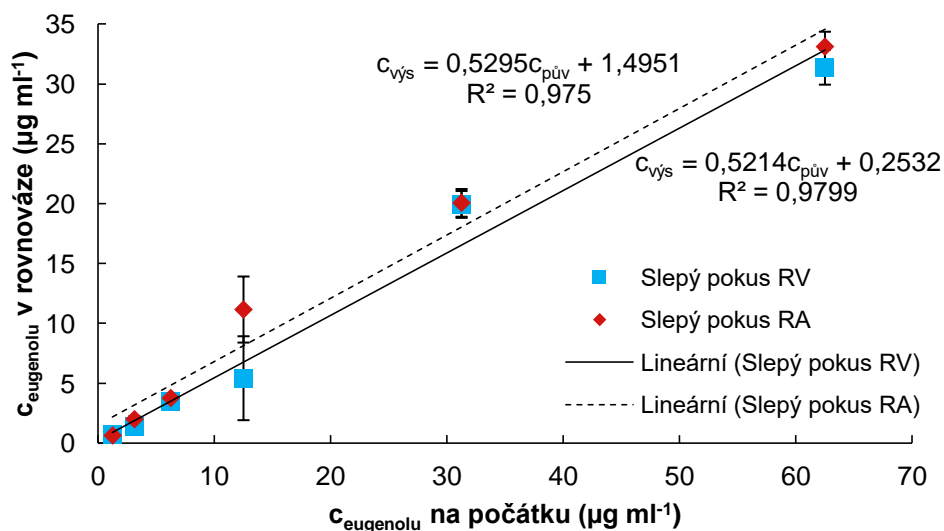
### 4.3.3 Koncentrační závislost rozdělovacích koeficientů eugenolu

Dalším experimentem bylo sledování vlivu vstupní koncentrace eugenolu na výsledný rozdělovací koeficient. Tyto koncentrace ve vialce s asolectinem byly 1,25; 3,125; 6,25; 12,5; 31,25 a 62,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . U celulosové membrány byl po dosažení rovnováhy (po 48 hodinách třepáním podpořené difúze) ve vzorcích s asolectinem pozorován téměř lineární nárůst koncentrací eugenolu, které byly změřeny v roztoku vody (Obr. 15). Stejná situace jde vidět v případě slepých vzorků bez asolectinu na Obr. 16, kdy byly měřeny koncentrace eugenolu po dosažení rovnováhy v obou vialkách rozdělovací aparatury. Se zvyšující se počáteční koncentrací eugenolu docházelo k lineárnímu nárůstu výsledné koncentrace jak v roztoku analytu, tak v roztoku vody, přičemž se tyto koncentrace liší pouze nepatrně (s výjimkou roztoku o koncentraci 12,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), což prokazuje vyrovnání koncentrací po 48 hodinové difúzi a tedy praktické dosažení rovnováhy.



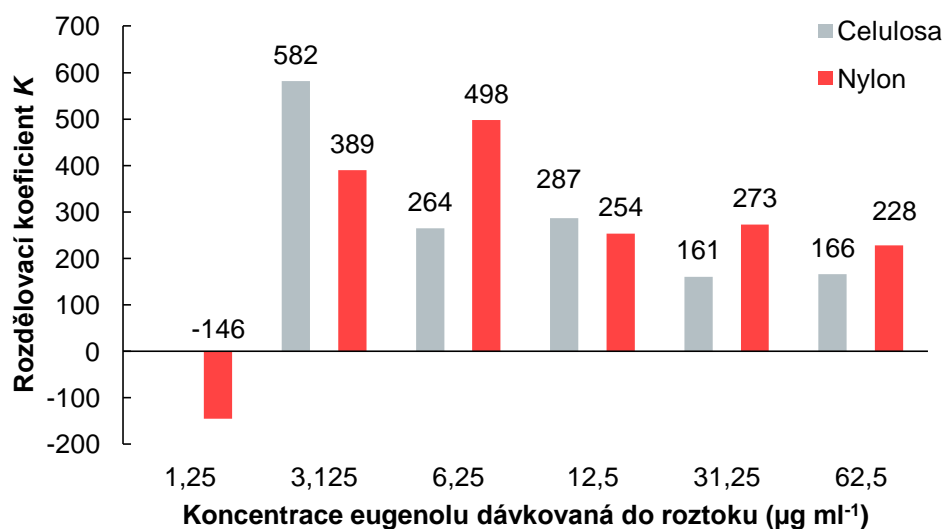
**Obr. 15** Koncentrace eugenolu po 48 hodinové třepáním podpořené difúzi přes polopropustnou membránu (z celulosy) změřené v roztoku vody (průměry ze 4 měření), v závislosti na počáteční koncentraci eugenolu v roztoku analytu obsahujícím asolectin

V případě membrány z nylonu byla situace obdobná (viz Příloha 2 a Příloha 3), kdy koncentrace eugenolu po dosažení rovnovážného stavu mezi oběma vialkami rostla lineárně s počáteční koncentrací eugenolu v roztoku analytu, u slepých pokusů se pak proložené lineární závislosti téměř překrývaly, stejně tak se všechny zjištěné koncentrace v obou vialkách téměř shodovaly, což dokazuje praktické dosažení rovnováhy.



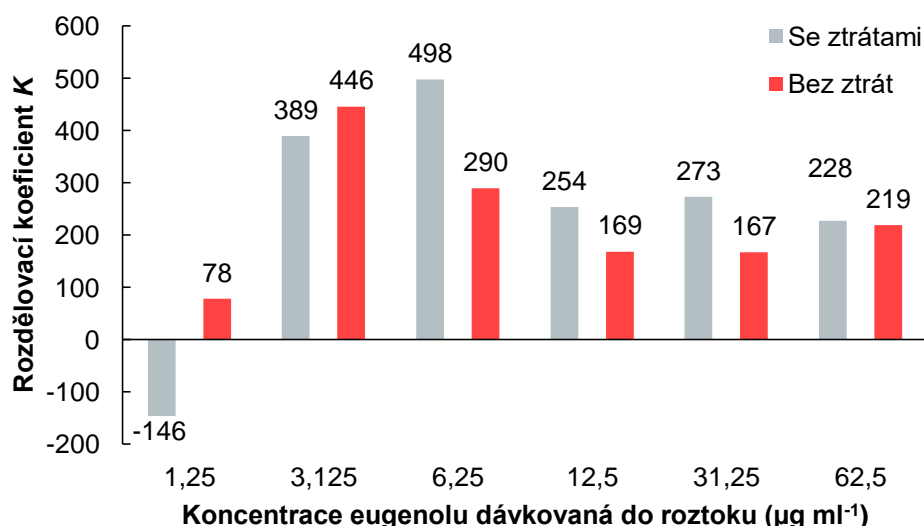
**Obr. 16** Koncentrace eugenolu změřené v roztoku vody (RV) a roztoku analytu (RA) po 48 hodinové třepání podpořené difúzí přes polopropustnou celulosovou membránu (průměry ze 4 měření), v závislosti na počáteční koncentraci eugenolu v roztoku analytu bez asolectinu

Vypočítané rozdělovací koeficienty se liší v rámci jednotlivých koncentrací u daných membrán, ovšem liší se také mezi oběma membránami. Pro nylonovou membránu se u vstupních koncentrací 12,5; 31,25 a 62,5 µg ml<sup>-1</sup> výsledné rozdělovací koeficienty téměř nelišily (aritmetický průměr a výběrová směrodatná odchylka těchto tří rozdělovacích koeficientů jsou  $K_{lw} = 252$  a  $s = 22,77$ ,  $RSD = 9,1$  %). Nižší koncentrace vykazovaly mnohem vyšší hodnoty  $K_{lw}$ , nejnižší koncentrace navíc poskytovala záporný rozdělovací koeficient. Tyto problémy jsou způsobeny nízkou měřenou koncentrací kolem meze detekce DPV metody a lze tak jen s obtížemi rozlišit pík od šumu. Tento problém se týká výchozích koncentrací eugenolu v rozdělovacích experimentech 1,25, resp. 3,125 µg ml<sup>-1</sup>, kdy je v analyzované vodné fázi po ustavení rovnováhy koncentrace ještě nejméně dvakrát menší. V případě celulosy je situace podobná s tím rozdílem, že u nejnižší koncentrace dosáhl rozdělovací koeficient hodnoty nad 7000 (proto není uveden v grafu). Rozdíly jsou pak také v ostatních koncentracích, kdy rozdělovací koeficienty u koncentrací 6,25 a 12,5 µg ml<sup>-1</sup> odpovídají rozdělovacím koeficientům vyšších koncentrací u nylonové membrány, rozdělovací koeficienty 161 a 166 u koncentrací 31,25 a 62,5 µg ml<sup>-1</sup> pak nejbližší odpovídají rozdělovacímu koeficientu eugenolu v systému lecitin-pufří  $\log K_{lec-b} = 2,20$  (což odpovídá  $K_{lec-b} = 158$ ) [24].



**Obr. 17** Rozdělovací koeficienty eugenolu v závislosti na vstupní koncentraci eugenolu dávkovaného do roztoku

Jak bylo zmíněno v kapitole 4.2.1, při výpočtu rozdělovacích koeficientů může docházet k velkému rozptylu hodnoty  $m_z$  představující ztráty analyzované látky na membráně, případně dalších částech dělicí aparatury. Vzhledem k tomu, že pro výpočet rozdělovacích koeficientů na Obr. 17 bylo  $m_z$  pouze ze dvou opakování slepých vzorků, byly tyto rozdělovací koeficienty přepočítány s vyloučením parametru  $m_z$  za použití rovnic (7) a (8). Pro ukázkou byly vybrány výsledky z nylonové membrány. Uvedeny jsou na Obr. 18, kdy je zřejmé, že některé koeficienty tato změna ovlivnila nepatrně (koncentrace 3,125 a 62,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), kdežto jiné mohou být ovlivněny zásadně (koncentrace 1,25 a 6,25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Pozitivní však bylo posunutí rozdělovacího koeficientu pro 6,25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  na hodnotu 290, která koresponduje s původními hodnotami získanými pro vyšší koncentrace eugenolu. U těchto koncentrací pak došlo ke snížení rozdělovacího koeficientu na hodnoty, které se více blíží rozdělovacímu koeficientu eugenolu v systému lecitin-pufř ( $\log K_{\text{lec-b}} = 2,20$ ;  $K_{\text{lec-b}} = 158$  [24]).



**Obr. 18** Srovnání rozdělovacích koeficientů vypočtených podle rovnice (6) se započtením ztrát a podle rovnice (8) nezahrnující ztráty látky na nylonové membráně

Ze všech výsledků získaných v tomto experimentu vyplývá, že počáteční koncentrace eugenolu nemá zásadní vliv na výsledný rozdělovací koeficient, pokud se nepohybujeme kolem nízkých koncentrací blízkých LOD použité analytické metody. Proto byla zvolena jednotná koncentrace  $62,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  pro další experimenty s eugenolem, ale také s thymolem a karvakrolem. Současně byl zjištěn určitý vliv parametru  $m_z$  při výpočtech rozdělovacích koeficientů. Tento parametr může různě ovlivňovat výsledný rozdělovací koeficient a to jak pozitivně, tak i negativně. Proto se může zdát, že výpočet nezahrnující tento parametr je ve výsledku přesnější, ovšem prakticky není nutné jej vypouštět. Problémem byla v tomto experimentu skutečnost, že byla provedena pouze dvě opakování a je tedy problematické určit odlehlý výsledek. Pro určení  $m_z$  je tedy zásadní více opakování, které umožní případné určení odlehklých výsledků a jejich vyloučení z pracovního souboru.

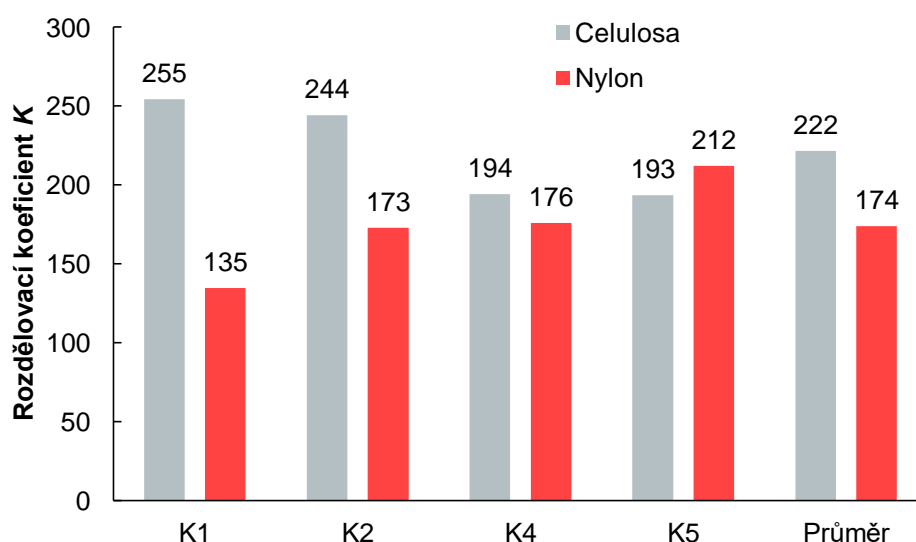
#### 4.4 Stanovení rozdělovacích koeficientů

Na základě testovaných experimentálních podmínek byl sestaven konečný experiment s cílem určit rozdělovací koeficienty eugenolu, thymolu a karvakrolu v systému liposom-voda. Vstupní koncentrace analytů byla  $62,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ , vzorky byly třepány 48 hodin a bylo provedeno 5 opakování s cílem eliminovat odlehlé výsledky slepých vzorků a získat tak co nejpřesnější výsledek ztrát látky na membráně.

#### 4.4.1 Rozdělovací koeficient eugenolu

Vzhledem k netěsnosti membrán (celulosové i nylonové) u vzorků číslo 3 došlo ke kontaminaci roztoku vody asolectinem a eugenolem z roztoku analytu, výsledky proto byly znehodnoceny a nejsou zde uvedeny, k výpočtům střední hodnoty a odchylek byly využity ostatní čtyři měření. Průměrná hodnota rozdělovacího koeficientu vychází z průměru jednotlivých rozdělovacích koeficientů vzorků.

Výsledné rozdělovací koeficienty jsou na Obr. 19 a průměrné hodnoty včetně logaritmů a statistických odhadů rozptylu jsou v Tab. IV. V případě celulosové membrány se rozdělovací koeficienty pohybují v rozmezí přibližně 190–255. V případě nylonové membrány se rozdělovací koeficienty pohybují v rozmezí přibližně 130–215.



**Obr. 19** Rozdělovací koeficienty eugenolu v systému liposom-voda

**Tab. IV** Průměrné hodnoty rozdělovacích koeficientů, jejich logaritmů a statistických hodnot eugenolu v systému liposom-voda pro membrány z celulosy a nylonu

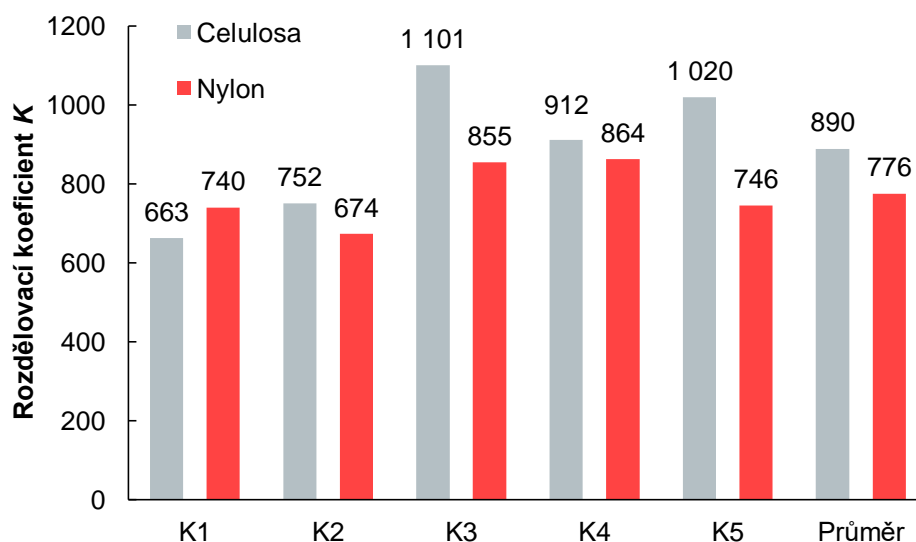
	$K_{lw} \pm s$	RSD (%)	$\log K_{lw}$
celulosa	$222 \pm 32,3$	14,59	2,35
nylon	$174 \pm 31,6$	18,19	2,24

Při srovnání s hodnotou rozdělovacího koeficientu eugenolu v systému lecitin-pufír  $\log K_{lec-b} = 2,20$  je relativní chyba u celulosové membrány 6,82 % a u nylonové 1,82 %. Rozdíly mezi jednotlivými membránami mohou mít více příčin, například u jedné membrány může docházet k průchodu většího množství látky za stejný čas, může docházet

většímu zadržení analytu na povrchu (adsorpce) nebo v objemu (v pórech) membrány, atd. Nejpravděpodobnější příčinou jsou však náhodné chyby při elektrochemickém měření. Odchytky od vztažné hodnoty jsou ovšem malé, proto lze metodu považovat za vhodnou ke stanovení rozdělovacího koeficientu eugenolu.

#### 4.4.2 Rozdělovací koeficient thymolu

U thymolu již byly využity všechny vzorky, hodnoty rozdělovacích koeficientů tedy byly získány z pěti měření a jsou zobrazeny na Obr. 20. Průměrné hodnoty rozdělovacích koeficientů a statistické hodnoty jsou uvedeny v Tab. V. U celulosové membrány lze pozorovat velký rozptyl výsledků, u nylonové membrány je rozptyl o poznání nižší. Pozitivní je v tomto případě podobnost koeficientů u celulosy a nylonu, jejichž logaritmované hodnoty se liší pouze o 6 setin. Co se vztažné hodnoty týče, v systému lecitin-pufir má thymol rozdělovací koeficient  $\log K_{\text{lec-b}} = 2,90$ . Relativní odchylky hodnot v systému liposom-voda jsou oproti této hodnotě 1,72 % pro celulosu a -0,34 % pro nylon, přičemž takto nízké hodnoty opět ukazují na vhodnost metody ke stanovení rozdělovacího koeficientu thymolu.



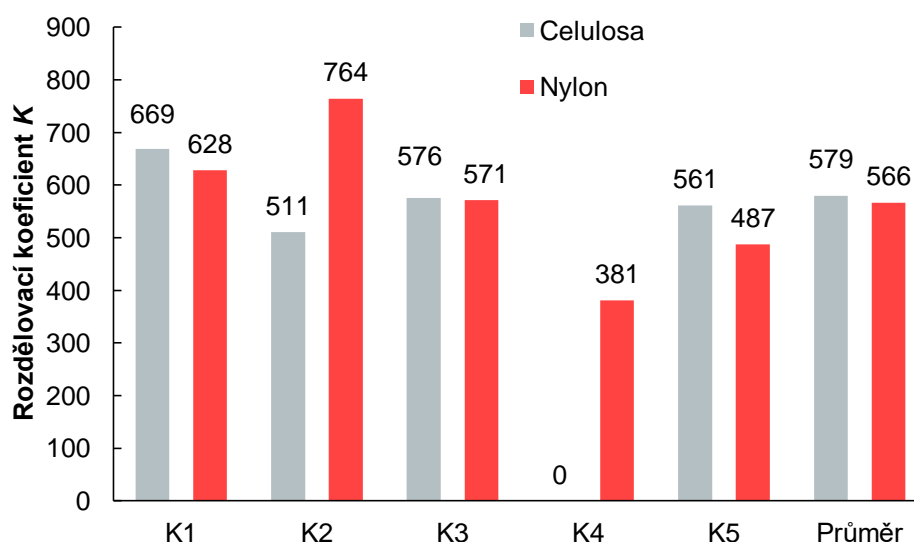
**Obr. 20** Rozdělovací koeficienty thymolu v systému liposom-voda

**Tab. V** Průměrné hodnoty rozdělovacích koeficientů, jejich logaritmů a statistických hodnot thymolu v systému liposom-voda pro membrány z celulosy a nylonu

	$K_{lw} \pm s$	RSD (%)	$\log K_{lw}$
celulosa	$890 \pm 182,0$	20,45	2,95
nylon	$776 \pm 81,6$	10,52	2,89

#### 4.4.3 Rozdělovací koeficient karvakrolu

Při stanovení rozdělovacího koeficientu karvakrolu byl opět vyřazen jeden ze vzorků. U celulosové membrány došlo ke kontaminaci vzorku číslo 4 smícháním roztoků ve vialkách vlivem netěsnosti membrány, proto není vzorek zahrnut ve vyhodnocení a výsledky se vztahují k ostatním čtyřem vzorkům. Vzorky s nylonovou membránou byly všechny v pořádku a jejich odchylky a průměr jsou spočteny ze všech pěti měření (Tab. VI). Rozdělovací koeficienty jednotlivých vzorků jsou na Obr. 21. Opět je vidět velký rozdíl v rozptylech hodnot mezi jednotlivými membránami, kdy je situace horší v případě nylonové membrány. Přesto se však logaritmy průměrných hodnot liší pouze o 1 setinu.



**Obr. 21** Rozdělovací koeficienty karvakrolu v systému liposom-voda

**Tab. VI** Průměrné hodnoty rozdělovacích koeficientů, jejich logaritmů a statistických hodnot karvakrolu v systému liposom-voda pro membrány z celulosy a nylonu

	$K_{lw} \pm s$	RSD (%)	$\log K_{lw}$
celulosa	$579 \pm 66,2$	11,42	2,76
nylon	$566 \pm 144,3$	25,48	2,75

U karvakrolu byla současně ze všech tří látek sledována nejlepší shoda se srovnávací hodnotou ze systému lecitin-pufr. Rozdělovací koeficient v případě celulosové membrány  $\log K_{lw} = 2,76$  se od srovnávací hodnoty  $\log K_{lec-b} = 2,76$  vůbec neliší, rozdělovací koeficient  $\log K_{lw} = 2,75$  při použití nylonové membrány se liší pouze o -0,36 %. Proto i pro tuto látku lze považovat DPV metodu jako vhodnou pro stanovení rozdělovacího koeficientu.

#### **4.5 Srovnání rozdělovacích koeficientů stanovených metodami DPV, HPLC a GC/MS**

Při experimentech v této práci byly vzorky měřeny také dvěma dalšími srovnávacími technikami – HPLC s UV detekcí a GC/MS. Tyto techniky, postupy měření a výsledky jsou detailně popsány v pracích Veroniky Müllerové pro HPLC [82] a Veroniky Taláškové pro GC [83]. Zde budou srovnávány pouze průměrné hodnoty ze všech metod.

K testování shodnosti výsledků poskytovaných všemi metodami byly zjištěny odpovídající párové korelační koeficienty.

Pro srovnání rozdělovacích koeficientů všech tří látek získaných pomocí tří instrumentálních metod, byly použity hodnoty z celulosové i nylonové membrány, ze kterých byla vypočítána jedna průměrná hodnota pro každou látku. Jejich logaritmované hodnoty jsou v Tab. VII (jednotlivé rozdělovací koeficienty pro všechny metody a obě membrány jsou v *Příloze 4* pro eugenol, v *Příloze 5* pro thymol a v *Příloze 6* pro karvakrol). Zejména u thymolu a karvakrolu lze pozorovat výrazné rozdíly mezi rozdělovacími koeficienty v systémech liposom-voda (resp. lecitin-pufr) a oktanol-voda. Ty jsou způsobeny rozdílnými interakcemi daných látek s fosfolipidy a s oktanolem, kdy při interakcích fenolů s fosfolipidy dochází kromě hydrofobních interakcí také k elektrostatickým interakcím mezi polární -OH skupinou a fosfátovou skupinou fosfolipidu. Oproti tomu u oktanolu se uplatňují pouze hydrofobní interakce, ke kterým může přispívat tvorba vodíkových můstků mezi -OH skupinami fenolu a n-oktanolu.



**Tab. VII** Logaritmy rozdělovacích koeficientů eugenolu v systému liposom-voda získané zprůměrováním všech změřených hodnot (z celulosové i nylonové membrány) pro metody DPV, HPLC a GC/MS a literární hodnoty logaritmů rozdělovacích koeficientů pro systémy lecitin-pufr a oktanol-voda

	Eugenol	Thymol	Karvakrol
log $K_{lw}$ – DPV	2,30	2,92	2,76
log $K_{lw}$ – HPLC	2,41	2,81	2,76
log $K_{lw}$ – GC/MS	2,44	2,75	2,81
log $K_{lec-b}$ [24]	2,20	2,90	2,76
log $K_{ow}$ [23]	2,27	3,30	3,49

V Tab. VIII jsou vypočítané hodnoty RSD pro odpovídající látky a metody. U všech tří látek byl nejmenší rozptyl výsledků (nejlepší opakovatelnost) při HPLC měřeních. Naopak v případě GC/MS měření byla zjištěna špatná opakovatelnost u eugenolu, ovšem u thymolu a karvakrolu již byla situace lepší a lze říci, že všechny tři metody poskytují výsledky s dostatečnou reprodukovatelností.

**Tab. VIII** Relativní směrodatné odchylky (RSD) pro hodnoty rozdělovacích koeficientů eugenolu, thymolu a karvakrolu určené metodami HPLC, DPV a GC/MS s použitím celulosové i nylonové membrány (čísla v závorkách udávají počet opakování)

	Eugenol RSD (n = 8) (%)	Thymol RSD (n = 10) (%)	Karvakrol RSD (n = 9) (%)
HPLC	11,73	8,94	18,71
DPV	19,76	17,52	19,23
GC/MS	55,64	22,93	21,52

Při porovnání výsledků DPV metody s výsledky z HPLC a GC/MS analýzy byla provedena korelační analýza výsledných hodnot log  $K_{lw}$  pro všechny 3 látky (z Tab. VII). Statisticky významné párové korelační koeficienty  $R = 0,9906$  pro výsledky z DPV vs. HPLC a  $R = 0,9147$  pro výsledky z DPV vs. GC/MS prokázaly velmi vysokou lineární korelaci rozdělovacích koeficientů určených DPV metodou a oběma chromatografickými metodami.

## 5 ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývá vývojem vhodné metody pro stanovení rozdělovacích koeficientů tří analytů – eugenolu, thymolu a karvakrolu – v systému liposom-voda s využitím elektrochemické analýzy. K tomu bylo potřeba nalézt vhodné podmínky pro voltametrickou analýzu a vhodné experimentální parametry pro rozdělování daných látek. Současně byly zjištěny hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti pro všechny tři látky. Pro eugenol byly  $LOD = 0,72 \mu\text{g ml}^{-1}$  a  $LOQ = 2,39 \mu\text{g ml}^{-1}$ , pro thymol  $LOD = 0,82 \mu\text{g ml}^{-1}$  a  $LOQ = 2,73 \mu\text{g ml}^{-1}$ , pro karvakrol pak  $LOD = 0,62 \mu\text{g ml}^{-1}$  a  $LOQ = 2,08 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

Pro potřeby voltametrického měření metodou diferenčně pulzní voltametrie bylo pro eugenol zvoleno jako nejvhodnější  $\text{pH} = 8$ , pro thymol a karvakrol bylo jako nejvhodnější zvoleno  $\text{pH}$  roztoku 2. Samotná metoda rozdělování látek mezi liposomy a vodnou fází byla realizována v aparatuře tvořené dvěma vialkami – jedna obsahovala asolectinové liposomy a analyt, druhá čistou vodu – oddělenými polopropustnou membránou. Během třepáním podpořené difúze docházelo k rozdělování analytu mezi liposomální a vodnou fází a současně k difúzi volného analytu přes polopropustnou membránu do vodného roztoku. Po ustavení rovnováhy byl analyt stanoven ve vodném roztoku neobsahujícím asolectin, který negativně ovlivňuje kvantifikační možnosti metody (fosfolipidy způsobují pasivaci elektrody).

Byly testovány polopropustné membrány ze tří materiálů – celulosy, nylonu a polykarbonátu. Metodou hmotnostní spektrometrie bylo zjištěno, že během rozdělování prochází přes polykarbonátovou membránu velké množství asolectinu do vodného roztoku, proto tato membrána nebyla použita pro stanovení rozdělovacích koeficientů. Dále byla zjištěna vhodná doba ustalování rovnováhy 48 hodin. Posledním testovaným parametrem byla počáteční koncentrace analytu, kdy byl sledován její vliv na výsledný rozdělovací koeficient. Jako nejvhodnější byla vybrána koncentrace  $62,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  pro všechny tři látky.

K výpočtu rozdělovacích koeficientů ze stanovených koncentrací analytů byly použity dva vztahy, jeden zohledňující ztráty látky na polopropustné membráně a případně na dalších částech rozdělovací aparatury, druhý tyto ztráty nezahrnoval, vzhledem k možnosti velkého rozptylu a zkreslení výsledků ze slepých vzorků. Nakonec byl používán pouze výpočet zahrnující ztráty, k jejichž výpočtu bylo použito výsledků z více opakování slepých pokusů, což umožnilo vyloučení odlehlých hodnot.

Jednotlivé rozdělovací koeficienty se příliš nelišily v závislosti na materiálu polopropustné membrány. Výsledná hodnota rozdělovacího koeficientu eugenolu  $\log K_{lw} = 2,30$  je srovnatelná s publikovanou hodnotou rozdělovacího koeficientu v systému lecitin-pufir  $\log K_{lec-b} = 2,20$  i s rozdělovacím koeficientem v systému oktanol-voda  $\log K_{ow} = 2,27$ .

V případě thymolu byl stanoven koeficient  $\log K_{lw} = 2,92$ . Tato hodnota je téměř shodná se srovnávací hodnotou  $\log K_{lec-b} = 2,90$ , ovšem liší se od hodnoty určené v systému oktanol-voda  $\log K_{ow} = 3,30$ . Podobně se v případě karvakrolu stanovený rozdělovací koeficient  $\log K_{lw} = 2,76$  shoduje se srovnávací hodnotou  $\log K_{lec-b} = 2,76$ . Srovnání s koeficientem v systému oktanol-voda  $\log K_{ow} = 3,49$  však opět ukazuje velké rozdíly. Jelikož jsou thymol a karvakrol poziční izomery, vedou tyto rozdíly k závěru, že interakce těchto dvou látek s fosfolipidovými liposomy jsou odlišné od interakcí s oktánolem, na rozdíl od eugenolu, kde rozdělovací koeficienty ukazují na podobné interakce.

Zajímavým rozdílem je lipofilita všech tří látek. Zatímco v případě systému oktanol-voda se jako nejvíce lipofilní jeví karvakrol, v systému liposom-voda je na základě zjištěných rozdělovacích koeficientů nejvíce lipofilní thymol. Eugenol je pak v obou případech nejméně lipofilní.

Zjištěné rozdělovací koeficienty byly srovnány s dalšími dvěma metodami – HPLC a GC. Korelační analýza prokázala statisticky významnou korelaci výsledků získaných DPV metodou s výsledky z obou chromatografických metod.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] K. Younggil: Partition and Distribution Coefficients, v knize: *Handbook of Essential Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Drug Metabolism for Industrial Scientists*. Springer US, New York, 2002, str. 44–45.
- [2] N. Bodor, P. Buchwald: Recent advances in the brain targeting of neuropharmaceuticals by chemical delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36 (1999) 229–254.
- [3] E. Rutkowska, K. Pająk, J. Krzysztof: Lipophilicity - Methods of Determination and its role in Medicinal Chemistry. *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* 70 (2013) 3–18.
- [4] N. Bodor, Z. Gabanyi, C.K. Wong: A new method for the estimation of partition coefficient. *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 3783–3786.
- [5] S.K. Poole, D. Durham, C. Kibbey: Rapid method for estimating the octanol–water partition coefficient (log Pow) by microemulsion electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 745 (2000) 117–126.
- [6] A. Noble: Partition coefficients (n-octanol—water) for pesticides. *J. Chromatogr. A.* 642 (1993) 3–14.
- [7] K. Valkó: Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution. *J. Chromatogr. A.* 1037 (2004) 299–310.
- [8] A.B. Mandal, B.U. Nair: Cyclic voltammetric technique for the determination of the critical micelle concentration of surfactants, self-diffusion coefficient of micelles, and partition coefficient of an electrochemical probe. *J. Phys. Chem.* 95 (1991) 9008–9013.
- [9] A. Leo, C. Hansch, D. Elkins: Partition coefficients and their uses. *Chem. Rev.* 71 (1971) 525–616.
- [10] V.A. Levin: Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability. *J. Med. Chem.* 23 (1980) 682–684.
- [11] K.-J. Schaper, H. Zhang, O.A. Raevsky: pH-Dependent partitioning of acidic and basic drugs into liposomes – a quantitative structure-activity relationship analysis. *Quant. Struct.-Act. Relatsh.* 20 (2001) 46–54.
- [12] C. Rodrigues, P. Gameiro, S. Reis, B. de Castro: Derivative spectrophotometry as a tool for the determination of drug partition coefficients in waterdimyristoyl-L- $\alpha$ -phosphatidylglycerol (DMPG) liposomes. *Biophys. Chem.* 94 (2001) 97–106.
- [13] V. Müllerová: Modifikace uhlíkových vláknových elektrod fosfolipidy. Bakalářská práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2018.
- [14] M. Gupta, A. Vishwakarma: An updated review on: Liposomes as drug carriers. *Asian J. Pharm. Educ. Res.* 7 (2018) 18–34.
- [15] J. Součková, L. Plačková, J. Skopalová, P. Baizová, L. Čáp, P. Barták: On GC/MS in Phospholipid Research I: Determination of Fatty Acid Profile and Phosphorus Content. *Acta Univ. Palacki. Olomuc. Fac. Rerum Nat. Chem.* 48 (2011) 1–7.

- [16] 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.
- [17] M. Megová, L. Müller, P. Barták: Spontaneous Revesiculation - New Method for the Preparation of Liposomes. *Acta Univ. Palacki. Olomuc. Fac. Rerum Nat. Chem.* 46 (2007) 7–10.
- [18] J. Součková: Studium liposomů fyzikálně-chemickými metodami. Disertační práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2011.
- [19] J. Součková, J. Skopalová, H. Švecová, L. Čáp, P. Bednář, P. Barták: On GC/MS in Phospholipid Research II: Investigation of Liposome Formation and Liposome - Water Partitioning. *Acta Univ. Palacki. Olomuc. Fac. Rerum Nat. Chem.* 48 (2011) 8–13.
- [20] S.M. Vilas-Boas, V. Pokorný, V. Štejfa, O. Ferreira, S.P. Pinho, K. Růžička, M. Fulem: Vapor pressure and thermophysical properties of eugenol and (+)-carvone. *Fluid Phase Equilibria*. 499 (2019) 112248.
- [21] T.S. Kaufman: The Multiple Faces of Eugenol. A Versatile Starting Material and Building Block for Organic and Bio-Organic Synthesis and a Convenient Precursor Toward Bio-Based Fine Chemicals. *J. Braz. Chem. Soc.* 26 (2015) 1055–1085.
- [22] M.R. Charan Raja: Versatile and Synergistic Potential of Eugenol: A Review. *Pharm. Anal. Acta*. 06 (2015).
- [23] Eugenol (compound). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Eugenol#section=Octanol-Water-Partition-Coefficient>, staženo 29. prosinec 2019.
- [24] 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.
- [25] D. Chatterjee, P. Bhattacharjee: Use of eugenol-lean clove extract as a flavoring agent and natural antioxidant in mayonnaise: product characterization and storage study. *J. Food Sci. Technol.* 52 (2015) 4945–4954.
- [26] R. S Bendre, J. D Rajput: Outlooks on Medicinal Properties of Eugenol and its Synthetic Derivatives. *Nat. Prod. Chem. Res.* 04 (2016).
- [27] S. Mohammadi Nejad, H. Özgüneş, N. Başaran: Pharmacological and Toxicological Properties of Eugenol. *Turk. J. Pharm. Sci.* 14 (2017) 201–206.
- [28] W. Qian, Z. Sun, T. Wang, M. Yang, M. Liu, J. Zhang, Y. Li: Antimicrobial activity of eugenol against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and its effect on biofilms. *Microb. Pathog.* 139 (2020) 103924.
- [29] F.J. Sutili, L.C. Kreutz, M. Noro, L.T. Gressler, B.M. Heinzmann, A.C. de Vargas, B. Baldisserotto: The use of eugenol against *Aeromonas hydrophila* and its effect on hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 157 (2014) 142–148.

- [30] G.C. Favero, W. de S. e Silva, T.P. Boaventura, F. de O. Paes Leme, R.K. Luz: Eugenol or salt to mitigate stress during the transport of juvenile *Lophiosilurus alexandri*, a Neotropical carnivorous freshwater catfish. *Aquaculture*. 512 (2019) 734321.
- [31] C.P.B. de Oliveira, C.H. da P. Lemos, A. Felix e Silva, S.A. de Souza, A.C.L. Albinati, A.O. Lima, C.E. Copatti: Use of eugenol for the anaesthesia and transportation of freshwater angelfish (*Pterophyllum scalare*). *Aquaculture*. 513 (2019) 734409.
- [32] I. Al-Sharif, A. Remmal, A. Aboussekhra: Eugenol triggers apoptosis in breast cancer cells through E2F1/survivin down-regulation. *BMC Cancer*. 13 (2013) 600.
- [33] H. Mishra, P.K. Mishra, Z. Iqbal, M. Jaggi, A. Madaan, K. Bhuyan, N. Gupta, N. Gupta, K. Vats, R. Verma, S. Talegaonkar: Co-Delivery of Eugenol and Dacarbazine by Hyaluronic Acid-Coated Liposomes for Targeted Inhibition of Survivin in Treatment of Resistant Metastatic Melanoma. *Pharmaceutics*. 11 (2019) 163.
- [34] Ö. Sağlam, D.G. Dilgin, B. Ertek, Y. Dilgin: Differential pulse voltammetric determination of eugenol at a pencil graphite electrode. *Mater. Sci. Eng. C*. 60 (2016) 156–162.
- [35] A. Cantalapiedra, M.J. Gismera, M.T. Sevilla, J.R. Procopio: Sensitive and Selective Determination of Phenolic Compounds from Aromatic Plants Using an Electrochemical Detection Coupled with HPLC Method: Sensitive Analysis of Phenols from Aromatic Plants by Hplc-Ec. *Phytochem. Anal.* 25 (2014) 247–254.
- [36] S. Kermasha, M. Goetghebeur, J. Dumont: Separation and characterization of Pepper-Contaminated cinnamon using HPLC analyses. *LWT - Food Sci. Technol.* 27 (1994) 578–582.
- [37] N. Tonello, M.B. Moressi, S.N. Robledo, F. D'Eramo, J.M. Marioli: Square wave voltammetry with multivariate calibration tools for determination of eugenol, carvacrol and thymol in honey. *Talanta*. 158 (2016) 306–314.
- [38] G. Ziyatdinova, E. Ziganshina, S. Romashkina, H. Budnikov: Highly Sensitive Amperometric Sensor for Eugenol Quantification Based on CeO<sub>2</sub> Nanoparticles and Surfactants. *Electroanalysis*. 29 (2017) 1197–1204.
- [39] D. Afzali, S. Zarei, F. Fathirad, A. Mostafavi: Gold nanoparticles modified carbon paste electrode for differential pulse voltammetric determination of eugenol. *Mater. Sci. Eng. C*. 43 (2014) 97–101.
- [40] J.V. Maciel, T.A. Silva, D. Dias, O. Fatibello-Filho: Electroanalytical determination of eugenol in clove oil by voltammetry of immobilized microdroplets. *J. Solid State Electrochem.* 22 (2018) 2277–2285.
- [41] J. Li, H. Liu, C. Wang, L. Wu, D. Liu: Determination of eugenol in fish and shrimp muscle tissue by stable isotope dilution assay and solid-phase extraction coupled gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 6537–6544.
- [42] Y. Liu, X. Ai, L. Li, J. Li, H. Yang: A fast and accurate isotope dilution GC-IT-MS/MS method for determination of eugenol in different tissues of fish: Application to a depletion study in mandarin fish. *Biomed. Chromatogr.* 32 (2018) e4163.

- [43] B. Salehi, A.P. Mishra, I. Shukla, M. Sharifi-Rad, M. del M. Contreras, A. Segura-Carretero, H. Fathi, N.N. Nasrabadi, F. Kobarfard, J. Sharifi-Rad: Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses: Thymol, health and potential uses. *Phytother. Res.* 32 (2018) 1688–1706.
- [44] 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.
- [45] Thymol (compound). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Thymol#section=Octanol-Water-Partition-Coefficient>, staženo 29. prosinac 2019.
- [46] M.F. Nagoor Meeran, H. Javed, H. Al Tae, S. Azimullah, S.K. Ojha: Pharmacological Properties and Molecular Mechanisms of Thymol: Prospects for Its Therapeutic Potential and Pharmaceutical Development. *Front. Pharmacol.* 8 (2017) 380.
- [47] M. Chillet, J. Minier, M. Hoarau, J.-C. Meile: Potential use of thymol to control anthracnose development in mango. *Eur. J. Plant Pathol.* 155 (2019) 943–952.
- [48] G. Zarrini, Z.B. Delgosha, K.M. Moghaddam, A.R. Shahverdi: Post-antibacterial effect of thymol. *Pharm. Biol.* 48 (2010) 633–636.
- [49] G.Y. Deniz: The Protective Effects of Thymol Against Ketoprofen Induced Damages on Pancreatic Acinar and Islet of Langerhans Cells in Rats. *J. Essent. Oil Bear. Plants.* 22 (2019) 604–613.
- [50] M. Nieddu, G. Rassu, G. Boatto, P. Bosi, P. Trevisi, P. Giunchedi, A. Carta, E. Gavini: Improvement of thymol properties by complexation with cyclodextrins: In vitro and in vivo studies. *Carbohydr. Polym.* 102 (2014) 393–399.
- [51] G.M.L. Fiori, P.S. Bonato, M.P.M. Pereira, S.H.T. Contini, A.M.S. Pereira: Determination of Thymol and Carvacrol in Plasma and Milk of Dairy Cows using Solid-Phase Microextraction. *J. Braz. Chem. Soc.* 24 (2013) 837–846.
- [52] 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 Herzeg.* 50 (2018) 1–6.
- [53] K. Schwarz, H. Ernst, W. Ternes: Evaluation of Antioxidative Constituents from Thyme. (b.r.) 7.
- [54] H. Gao, W. Cao, Y. Liang, N. Cheng, B. Wang, J. Zheng: Determination of Thymol and Phenol in Honey by LC with Electrochemical Detection. *Chromatographia.* 72 (2010) 361–363.
- [55] N.V. Tonello, F. D'Eramo, J.M. Marioli, A.G. Crevillen, A. Escarpa: Extraction-free colorimetric determination of thymol and carvacrol isomers in essential oils by pH-dependent formation of gold nanoparticles. *Microchim. Acta.* 185 (2018) 352.
- [56] D.M. Stanković: Sensitive voltammetric determination of thymol in essential oil of *Carum copticum* seeds using boron-doped diamond electrode. *Anal. Biochem.* 486 (2015) 1–4.
- [57] R. Piech, B. Paczosa-Bator: Application of glassy carbon electrode modified with Nafion/MWCNTs for sensitive voltammetric. *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* 72 (2015) 1081–1088.

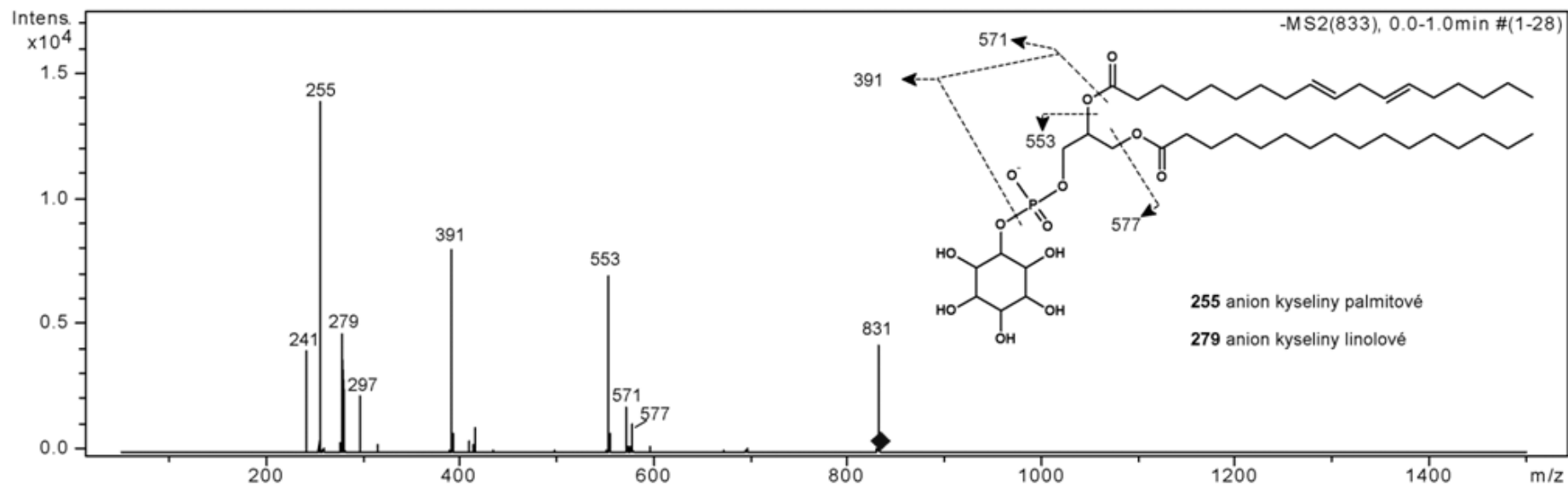
- [58] G.K. Ziyatdinova, S.A. Romashkina, E.R. Ziganshina, H.C. Budnikov: Voltammetric Determinations of Thymol on an Electrode Modified by Coimmobilized Carboxylated Multiwalled Carbon Nanotubes and Surfactants. *J. Anal. Chem.* 73 (2018) 63–70.
- [59] B. Aghamohseni, S.K. Hassaninejad-Darzi, M. Asadollahi-Baboli: A new sensitive voltammetric determination of thymol based on MnY nanozeolite modified carbon paste electrode using response surface methodology. *Microchem. J.* 145 (2019) 819–832.
- [60] E.V.R. Campos, P.L.F. Proença, J.L. Oliveira, A.E.S. Pereira, L.N. de Moraes Ribeiro, F.O. Fernandes, K.C. Gonçalves, R.A. Polanczyk, T. Pasquoto-Stigliani, R. Lima, C.C. Melville, J.F. Della Vechia, D.J. Andrade, L.F. Fraceto: Carvacrol and linalool co-loaded in  $\beta$ -cyclodextrin-grafted chitosan nanoparticles as sustainable biopesticide aiming pest control. *Sci. Rep.* 8 (2018) 7623.
- [61] Carvacrol (compound).  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carvacrol#section=Octanol-Water-Partition-Coefficient>, staženo 4. leden 2020.
- [62] J.R. Lima de Souza, P.R. de Oliveira, L.A. Anholeto, A. Arnosti, E. Daemon, R.N. Remedio, M.I. Camargo-Mathias: Effects of carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* females ticks (Acari: Ixodidae). *Micron.* 116 (2019) 66–72.
- [63] P.M. Periago, B. Delgado, P.S. Fernández, A. Palop: Use of Carvacrol and Cymene To Control Growth and Viability of *Listeria monocytogenes* Cells and Predictions of Survivors Using Frequency Distribution Functions. *J. Food Prot.* 67 (2004) 1408–1416.
- [64] T.L.C. de Oliveira, B.R. de C.L. Junior, A.L.S. Ramos, E.M. Ramos, R.H. Piccoli, M. Cristianini: Phenolic carvacrol as a natural additive to improve the preservative effects of high pressure processing of low-sodium sliced vacuum-packed turkey breast ham. *LWT - Food Sci. Technol.* 64 (2015) 1297–1308.
- [65] L. Espina, D. Berdejo, P. Alfonso, D. García-Gonzalo, R. Pagán: Potential use of carvacrol and citral to inactivate biofilm cells and eliminate biofouling. *Food Control.* 82 (2017) 256–265.
- [66] W.-X. Du, C.W. Olsen, R.J. Avena-Bustillos, T.H. McHugh, C.E. Levin, M. Friedman: Antibacterial Activity against *E. coli* O157:H7, Physical Properties, and Storage Stability of Novel Carvacrol-Containing Edible Tomato Films. *J. Food Sci.* 73 (2008) 378–383.
- [67] M. Mirela, imovi imovi, F. Dela, V. Gradvol, D. Kocevski, H. Pavlovi: Antifungal effect of eugenol and carvacrol against foodborne pathogens *Aspergillus carbonarius* and *Penicillium roqueforti* in improving safety of fresh-cut watermelon. *J. Intercult. Ethnopharmacol.* 3 (2014) 91.
- [68] G. Dev Kumar, S. Ravishankar: Ozonized water with plant antimicrobials: An effective method to inactivate *Salmonella enterica* on iceberg lettuce in the produce wash water. *Environ. Res.* 171 (2019) 213–217.
- [69] E. Nasiou, I.O. Giannakou: The potential use of carvacrol for the control of *Meloidogyne javanica*. *Eur. J. Plant Pathol.* 149 (2017) 415–424.



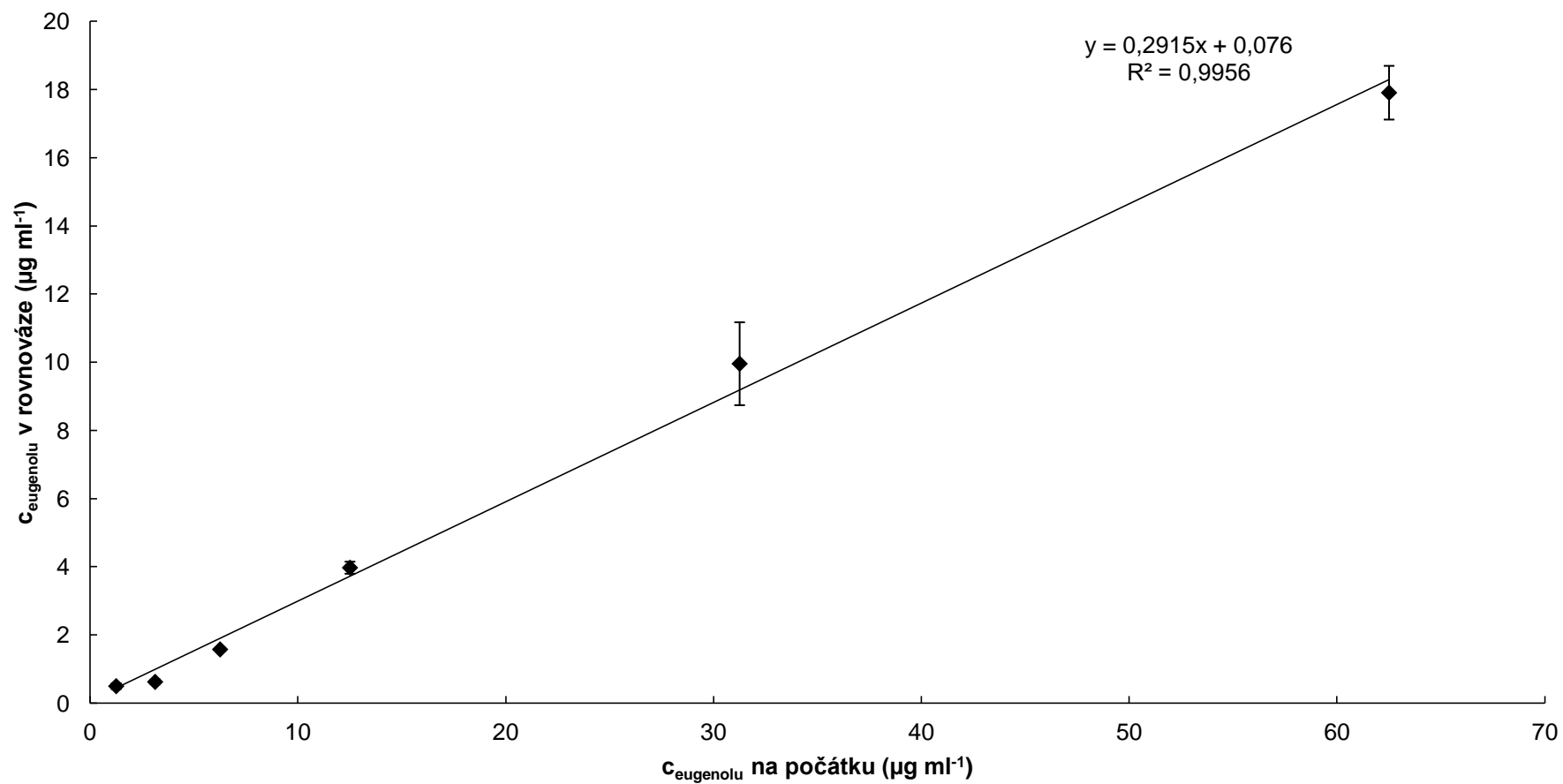
- [70] M. Jiménez-Salcedo, M.T. Tena: Determination of cinnamaldehyde, carvacrol and thymol in feedstuff additives by pressurized liquid extraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1487 (2017) 14–21.
- [71] H. Hajimehdipoor, M. Shekarchi, M. Khanavi, N. Adib, M. Amri: A validated high performance liquid chromatography method for the analysis of thymol and carvacrol in *Thymus vulgaris* L. volatile oil. *Pharmacogn. Mag.* 6 (2010) 154–158.
- [72] S. Lipeh, L.R. Schimleck, J.J. Morrell: Determination of Carvacrol Content in Alaska Yellow Cedar (*Callitropsis nootkatensis*) Extractives. *Bioresources.* 14 (2019) 9928–9944.
- [73] M. Kowalcze, M. Jakubowska: Voltammetric determination of carvacrol on Boron Doped Diamond Electrode. *Anal. Chim. Acta.* 1045 (2019) 98–107.
- [74] M. Kowalcze, M. Jakubowska: Multivariate approach in voltammetric identification and simultaneous determination of eugenol, carvacrol, and thymol on boron-doped diamond electrode. *Monatshefte Für Chem. - Chem. Mon.* 150 (2019) 991–1002.
- [75] S.Z. Mohammadi, H. Beitollahi, T. Rohani, H. Allahabadi: Carvacrol electrochemical reaction characteristics on screen printed electrode modified with La<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite. *J. Electrochem. Sci. Eng.* 9 (2019) 113–123.
- [76] J. Barek, F. Opekar, K. Štulík: Voltametrické a polarografické metody, v knize: *Elektroanalytická chemie*. Karolinum, Praha, 2005, str. 73–120.
- [77] J.L.N. Xavier, E. Ortega, J.Z. Ferreira, A.M. Bernardes, V. Pérez-Herranz: An electrochemical Study of Phenol Oxidation in Acidic Medium. *Int J Electrochem Sci.* 6 (2011) 622–636.
- [78] J.F. Hedenburg, H. Freiser: Anodic Voltammetry of Phenols. *Anal. Chem.* 25 (1953) 1355–1358.
- [79] M. Rozíková, P. Janderka, L. Trnková: The study of monochlorinated phenols using hyphenated electrochemical method. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* 76 (2011) 997–1012.
- [80] P.A. Kilmartin, H. Zou, A.L. Waterhouse: A Cyclic Voltammetry Method Suitable for Characterizing Antioxidant Properties of Wine and Wine Phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 1957–1965.
- [81] H. Dejmková, M. Scampicchio, J. Zima, J. Barek, S. Mannino: Determination of Total Phenols in Foods by Boron Doped Diamond Electrode. *Electroanalysis.* 21 (2009) 1014–1018.
- [82] V. Müllerová: Stanovení rozdělovacích koeficientů v systému liposom - voda vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2020.
- [83] V. Talášková: Stanovení rozdělovacích koeficientů v systému liposom - voda plynovou chromatografií. Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2020.

# PŘÍLOHY

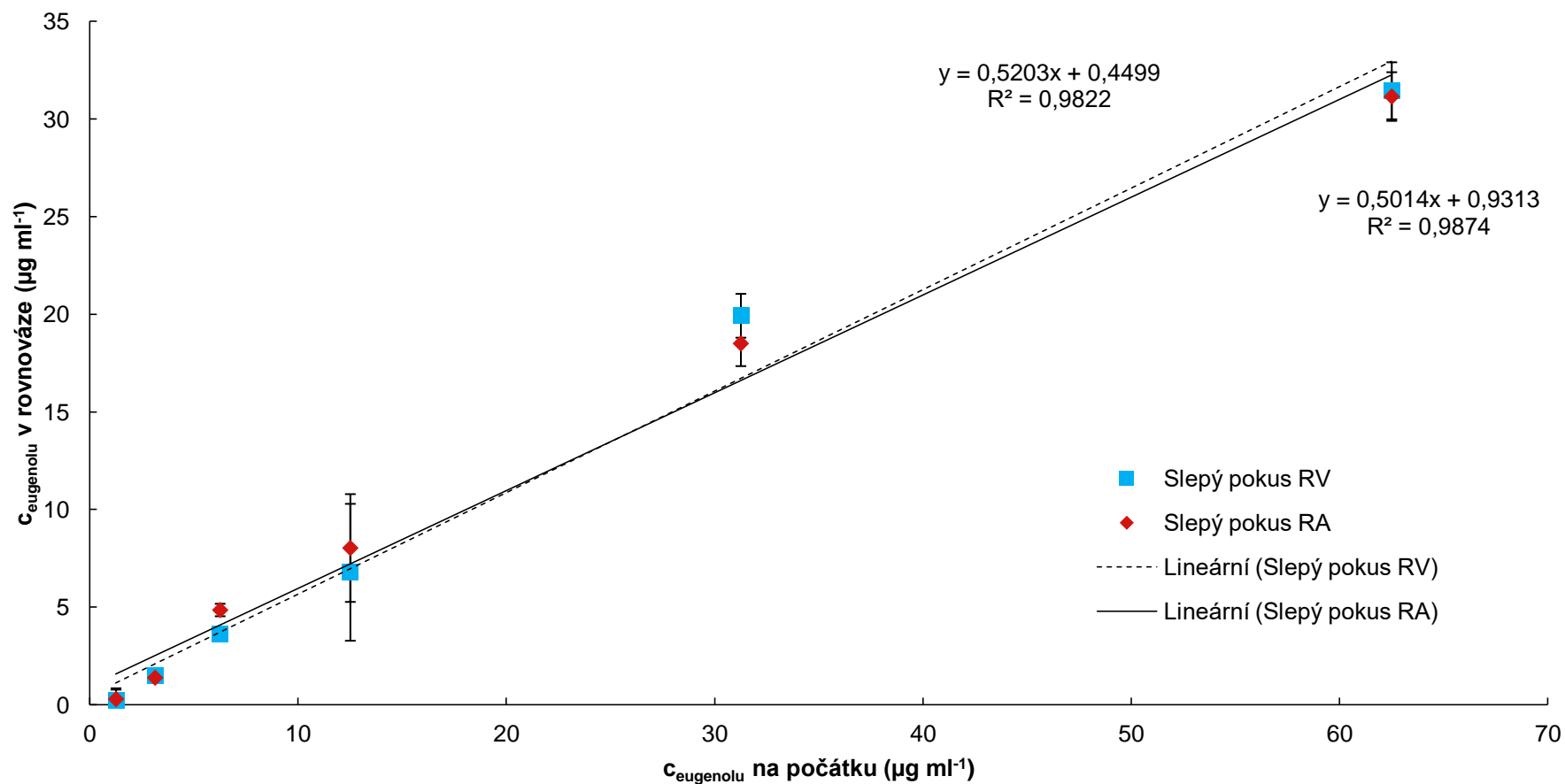
**Příloha 1** Fragmentační spektrum iontu o  $m/z$  833 odpovídající linolyl-palmitoyl fosfatidylinositolu



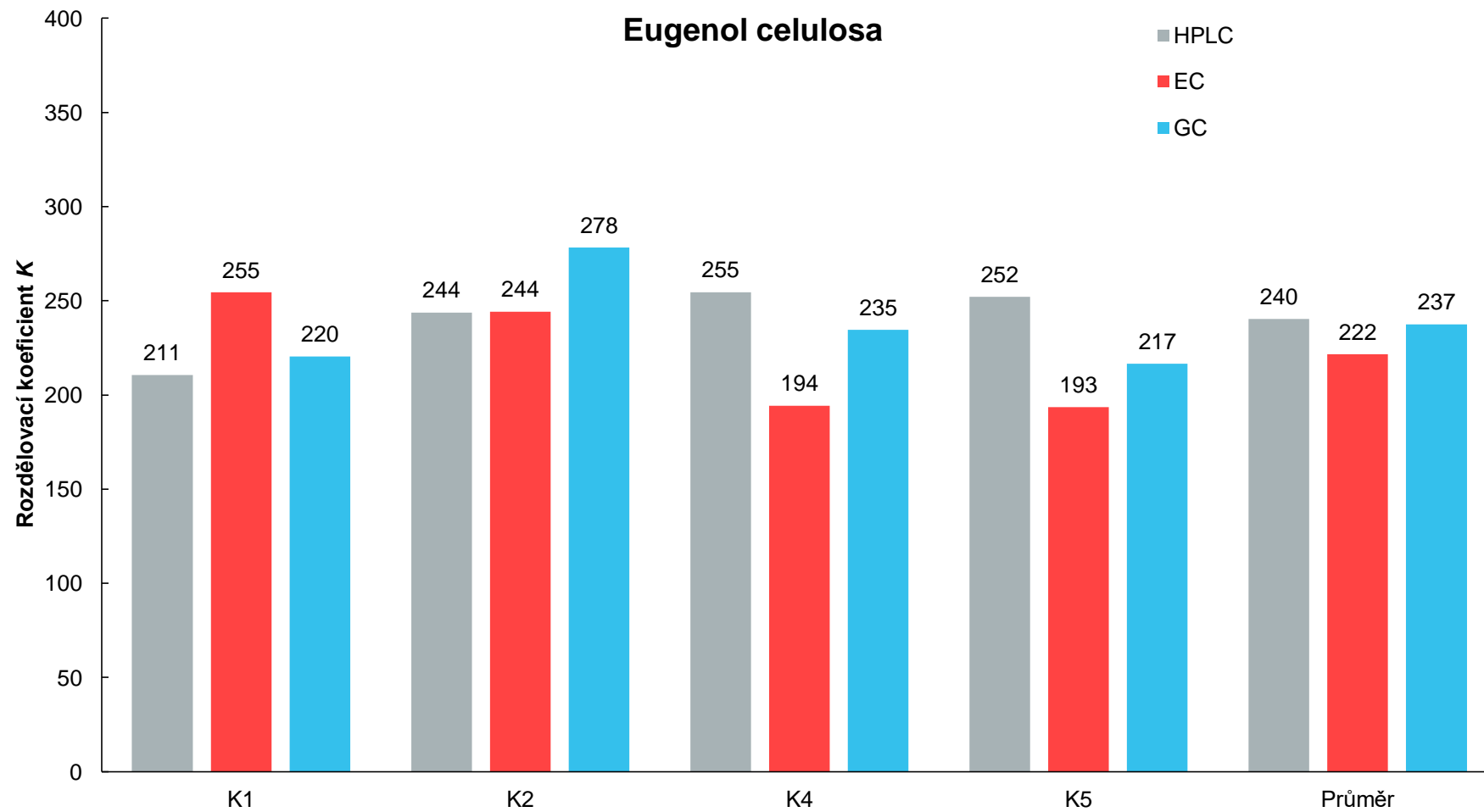
**Příloha 2** Koncentrace eugenolu po 48 hodinové třepání podpořené difúzi přes polopropustnou nylonovou membránu změřené v roztoku vody (průměry ze 4 měření), v závislosti na počáteční koncentraci eugenolu v roztoku analytu obsahujícím asolectin

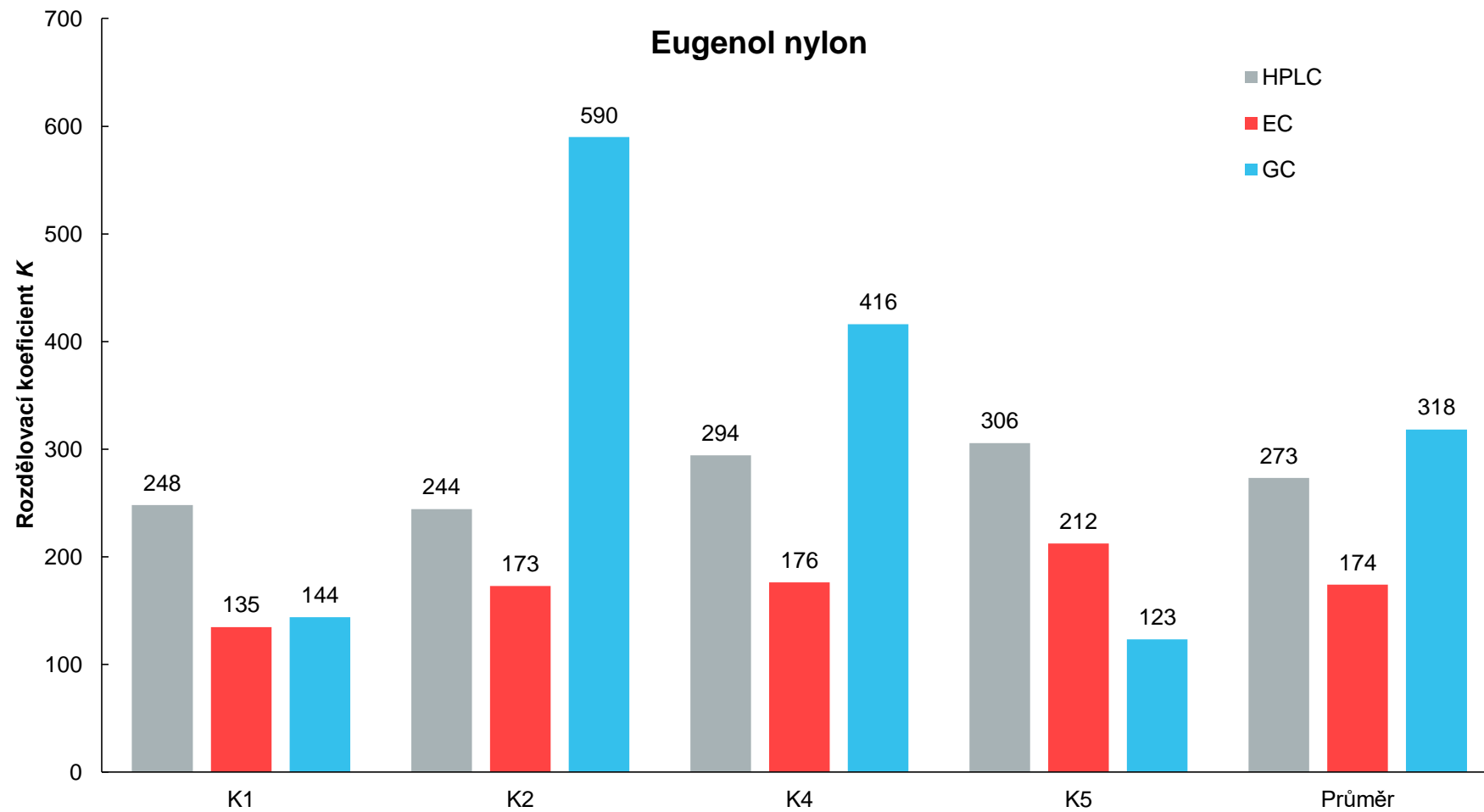


**Příloha 3** Koncentrace eugenolu změřená v roztoku vody (RV) a roztoku analytu (RA) po 48 hodinové třepáním podpořené difúzi přes polopropustnou nylonovou membránu (průměr ze 4 měření), v závislosti na počáteční koncentraci eugenolu v roztoku analytu bez asolectinu

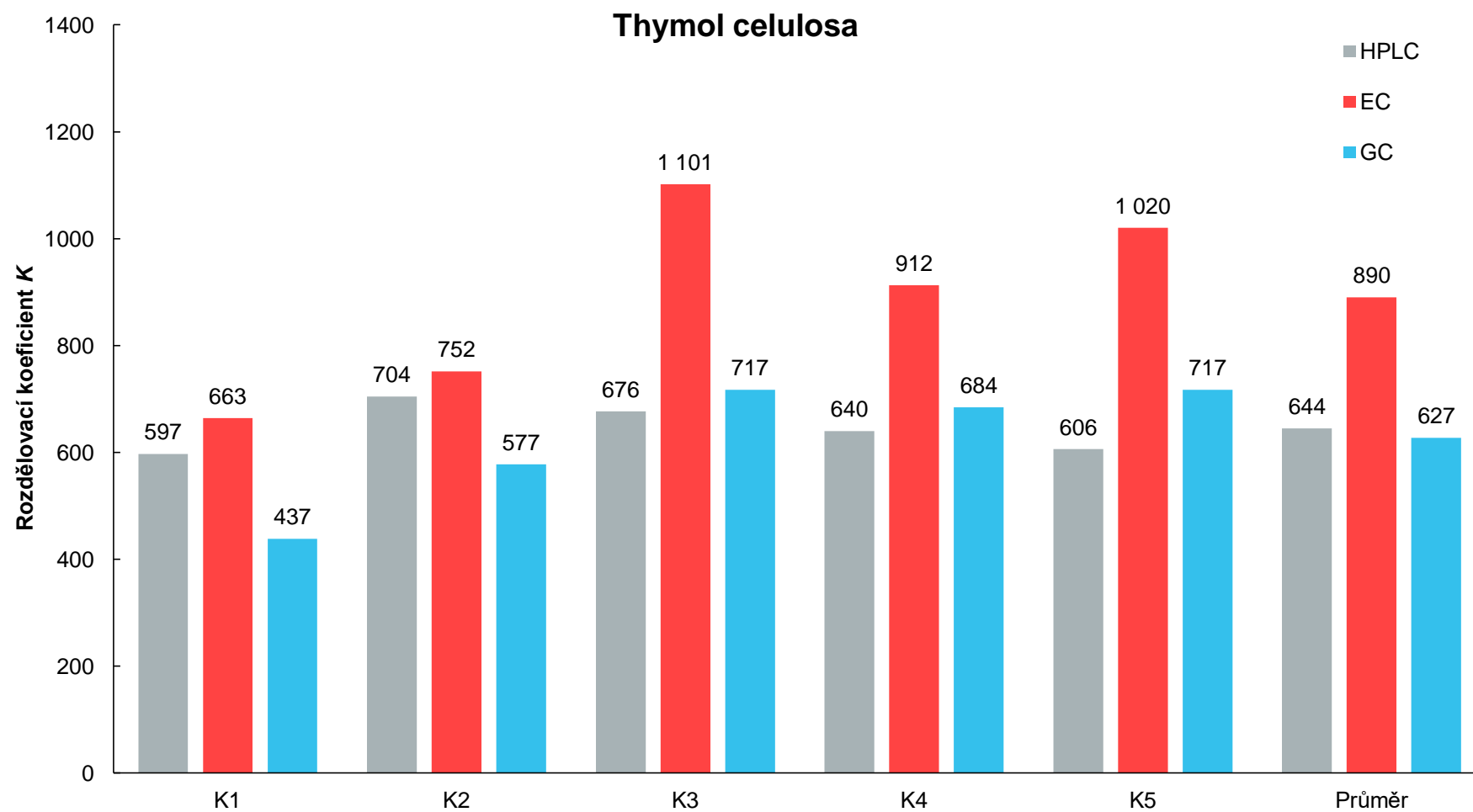


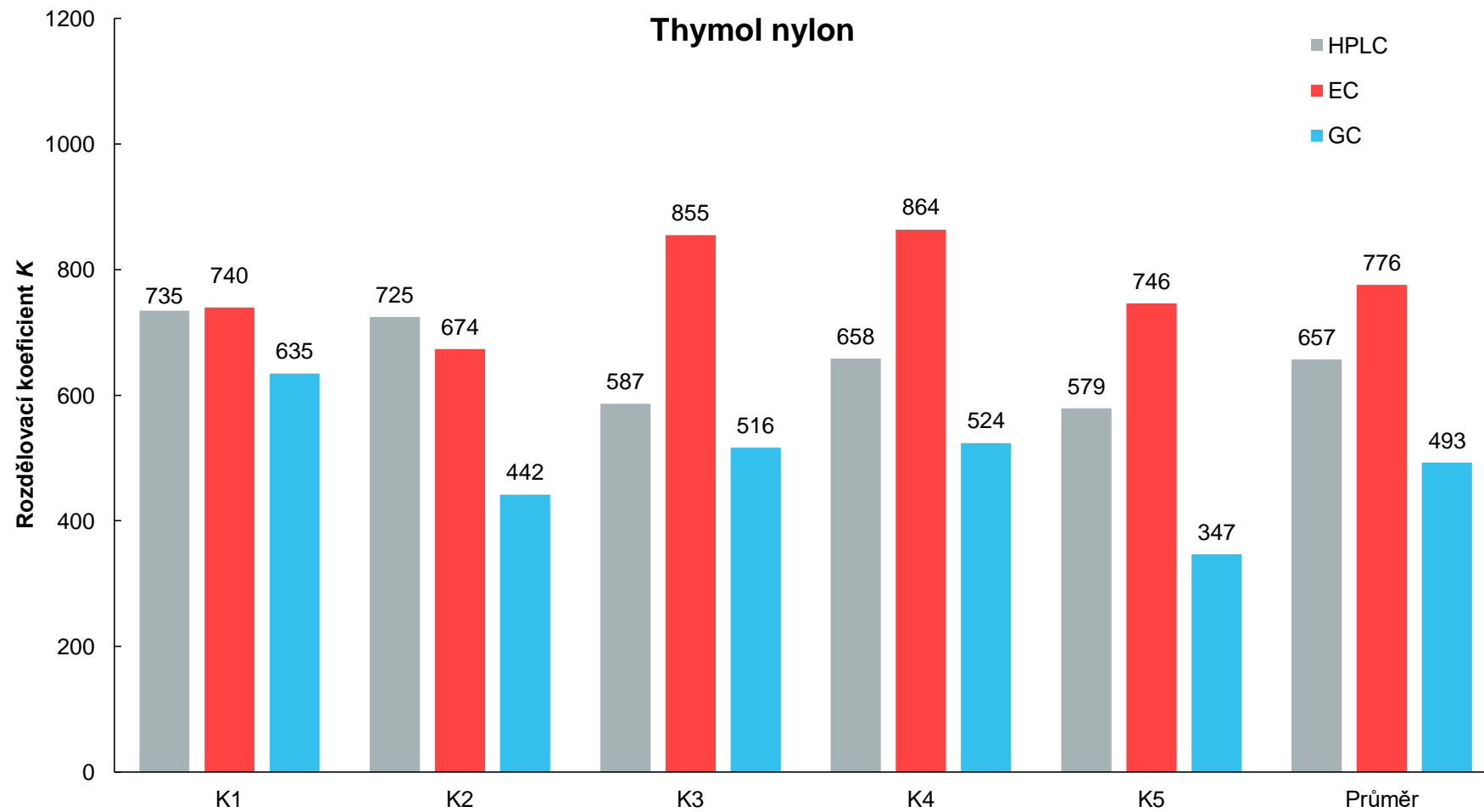
**Příloha 4** Srovnávací grafy rozdělovacích koeficientů eugenolu v systému liposom-voda změřených pomocí HPLC, EC a GC





**Příloha 5** Srovnávací grafy rozdělovacích koeficientů thymolu v systému liposom-voda změřených pomocí HPLC, EC a GC







**Příloha 6** Srovnávací grafy rozdělovacích koeficientů karvakrolu v systému liposom-voda změřených pomocí HPLC, EC a GC

