

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

---



**STANOVENÍ PROPYL GALLÁTU  
POMOCÍ UHLÍKOVÉ PASTOVÉ ELEKTRODY**  
DETERMINATION OF PROPYL GALLATE ON  
CARBON PASTE ELECTRODE

Diplomová práce

studijního oboru Klinická a toxikologická analýza

Praha 2010

Marie Vysoká

## **Abstrakt**

Propylgallát (PG) je významný syntetický antioxidant a konzervant. K jeho stanovení na uhlíkové pastové elektrodě (CPE) byla použita metoda diferenční pulsní voltametrie (DPV) a vysokoučinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED) a HPLC s UV spektrometrickou detekcí (HPLC-UV). Metodou DPV v prostředí Brittonova-Robinsonova pufru (pH 5) a methanolu (20 %, V/V) byly proměřeny koncentrační závislosti a mez detekce stanovena na  $0,61 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Pomocí HPLC v mobilní fázi o složení  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosfátový pufr (pH 4) a methanol (50 %, V/V), s potenciálem pracovní elektrody  $E = +0,8 \text{ V}$  a detekční vlnovou délkou  $\lambda = 280 \text{ nm}$  byly proměřeny kalibrační závislosti a mez detekce stanovena na  $0,39 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  pro HPLC-ED a  $4,95 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  pro HPLC-UV. Následně byl PG po ověření extrakčního postupu stanoven ve vzorku rostlinného oleje. Zjištěná koncentrace odpovídá  $3,2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  oleje a je v souladu s povolenými limity.

### **Klíčová hesla:**

Antioxidant

Voltametrie

HPLC

### **Klíčová slova:**

Propylgallát

Uhlíkové pastové elektrody

Diferenční pulsní voltametrie

HPLC s elektrochemickou a UV detekcí

## Abstract

Propyl gallate (PG) is a significant synthetic antioxidant and preservative. Its determination has been studied at carbon paste electrode (CPE) using differential pulse voltammetry (DPV) and high performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED) and with UV spectrometric detection (HPLC-UV). Concentration dependences were measured in the media of Britton-Robinson buffer (pH 5) and methanol (20 %, v/v) by DPV and the limit of detection  $0,61 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  was obtained. Using HPLC with a mobile phase consisting of  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  phosphate buffer (pH 4) and methanol (50 %, v/v) with potential of working electrode  $E = +0,8 \text{ V}$  and detection wavelength  $\lambda = 280 \text{ nm}$ , concentration dependences were measured. Limit of detection was determined to  $0,39 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  for HPLC-ED and  $4,95 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  for HPLC-UV. After verification of the extraction procedure PG was determined in vegetable oil. The resulting value of  $3,2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  corresponds with permitted limits.

## Key Words Plus:

Antioxidant

Voltammetry

HPLC

## Key Words:

Propyl gallate

Carbon paste electrodes

Differential pulse voltammetry

HPLC with electrochemical and UV detection

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Prof. RNDr. Jiřího Zimy, CSc. a konzultantky Mgr. Hany Dejmkové, a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 20. dubna 2010

Marie Vysoká

*V úvodu své diplomové práce bych ráda poděkovala všem, co mi pomohli při jejím vypracování, zvláště pak své konzultantce Mgr. Haně Dejmkové za její velice cenné odborné rady, trpělivost a pomoc při jejím vypracování a konzultace při sepisování. Nelze opomenout ani mé rodiče, kteří mě podporovali a umožnili mi studium.*

*Vypracování této diplomové práce bylo finančně podpořeno MŠMT České republiky (projekty č. LC 0603, MSM 0021620857 a RP 14/63).*

*Marie Vysoká*

## Obsah

<b>1. Teoretická část</b> .....	<b>9</b>
1.1 Úvod .....	9
1.2 Potravinová aditiva .....	10
1.2.1 Antioxidanty .....	10
1.3 Propylgallát.....	12
1.4 Metody stanovení PG .....	14
1.5 Uhlíková pastová elektroda .....	16
<b>2. Experimentální část</b> .....	<b>19</b>
2.1 Studovaná látka .....	19
2.2 Reagencie.....	20
2.3 Aparatura .....	21
2.3.1 Voltametrie .....	21
2.3.2 HPLC s UV a elektrochemickou detekcí.....	21
2.3.3 Ostatní používaná zařízení.....	22
2.4 Pracovní postupy .....	23
2.4.1 Voltametrické stanovení .....	23
2.4.2 HPLC stanovení s UV a elektrochemickou detekcí .....	23
2.4.3 Stanovení PG v modelovém a reálném vzorku .....	24
<b>3. Voltametrické stanovení</b> .....	<b>25</b>
3.1 Vliv pH BR pufru na voltametrické chování PG.....	25
3.2 Opakovatelnost měření PG na CPE.....	28
3.3 Vliv akumulace PG na CPE .....	30
3.4 Koncentrační závislosti PG .....	31
<b>4. HPLC stanovení s UV a elektrochemickou detekcí</b> .....	<b>37</b>
4.1 Optimalizace HPLC stanovení PG .....	37
4.2 Koncentrační závislosti PG .....	39
<b>5. Stanovení PG v reálném vzorku</b> .....	<b>48</b>
5.1 Extrakce PG z modelového vzorku .....	48
5.2 Stanovení PG v reálném vzorku .....	49
<b>6. Závěr</b> .....	<b>52</b>
<b>7. Použitá literatura</b> .....	<b>54</b>

## Seznam použitých zkratk a symbolů

AMP	amperometrie
AdSV	adsorptivní rozpouštěcí voltametrie
BHA	butylovaný hydroxyanisol
BHT	butylovaný hydroxytoluen
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
$c$	koncentrace
CA	chronoamperometrie
CCA	chronocoulometrie
CE	kapilární elektroforéza
CV	cyklická voltametrie
C.A.S.	Chemical Abstract Services
CPE	uhlíková pastová elektroda
CSV	katodická rozpouštěcí voltametrie
DAD	detektor s diodovým polem
DPV	diferenční pulsní voltametrie
EC <sub>50</sub>	efektivní koncentrace při které reaguje 50 % jedinců ze souboru
ED	elektrochemická detekce
ESA	elektrochemická rozpouštěcí voltametrie
$E_p$	potenciál píku
FIA	průtoková injekční analýza
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
$h_p$	výška píku
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC-MS	vysokoučinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
$I_p$	proud píku
$\lambda$	vlnová délka
$L_D$	mez detekce
$L_{1,2}$	interval spolehlivosti
LSV	voltametrie s lineárním nárůstem potenciálu
MECC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
MeOH	methanol
$M_r$	relativní molekulová hmotnost
NOAEL	koncentrace při které ještě není pozorovatelný žádný nežádoucí účinek
p.a.	pro analýzu
POT	rovnovážná potenciometrie
PG	propylgallát
RP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
$\rho$	hustota
$s$	směrodatná odchylka
$s_r$	relativní směrodatná odchylka
SWV	square-wave voltametrie
$t$	čas
TBHQ	terciární butylhydrochinon
UV	ultrafialová oblast
VIS	viditelná oblast



# 1. Teoretická část

## 1.1 Úvod

Propylgallát (PG) je významný syntetický antioxidant a konzervant. Antioxidanty jsou látky, které prodlužují trvanlivost potravin tak, že je chrání před znehodnocením oxidací, jejímž projevem je žluknutí tuků a snadno se oxidujících látek. Účelově byly antioxidanty při výrobě potravin použity poprvé před první světovou válkou. Zpočátku byly používány přírodní antioxidanty, až poté se začaly používat antioxidanty syntetické, a to díky jejich nižší ceně, nižšímu potřebnému množství, ale hlavně díky jejich vyšším antioxidantním účinkům.<sup>1</sup>

Předkládaná diplomová práce se zabývá hledáním a následným využitím optimálních podmínek vhodných pro stanovení PG pomocí uhlíkové pastové elektrody (CPE). Ke stanovení PG byly použity metody diferenční pulsní voltametrie (DPV) a HPLC s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED) a HPLC s UV detekcí (HPLC-UV). Cílem bylo dosažení co nejnižších mezí detekce a porovnání HPLC-ED a HPLC-UV s DPV. Dalším cílem bylo stanovení PG v reálném vzorku.

## 1.2 Potravinová aditiva

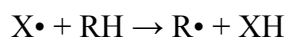
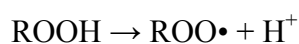
Potravinářské aditivní látky jsou chemické sloučeniny, které jsou do potravin záměrně přidávány, ať už při jejich výrobě, zpracování, skladování nebo balení, za účelem zlepšení nebo upravení jejich vlastností, zejména kvality. Nejčastější důvod použití aditiv je prodloužení trvanlivosti, zlepšení vůně, chuti, barvy, textury, výživové hodnoty, technologických vlastností aj. Používání aditiv je limitované s ohledem na zdravotní nezávadnost co do druhů a množství, podmínek jejich použití, určením potravin a potravinových surovin, kde se mohou vyskytovat, dále vymezením požadavků na jejich čistotu a identitu, požadavků mikrobiologických a požadavků na jejich deklaraci na obalech potravin.<sup>2</sup> Legislativní předpisy ČR rozeznávají přídatné látky, pomocné látky, látky určené k aromatizaci a potravní doplňky.<sup>3</sup> Přídatné látky se dále dělí na 26 kategorií, ale z hlediska mé diplomové práce jsou důležité syntetické antioxidanty, mezi které se řadí právě propylgallát.

### 1.2.1 Antioxidanty

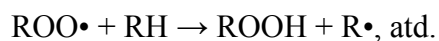
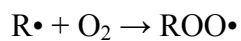
Antioxidanty jsou látky, které prodlužují trvanlivost potravin tak, že je chrání před znehodnocením oxidací.<sup>4</sup> Oxidace je obecně považována za nejčastěji se vyskytující formu degradace tuků vedoucí k žluknutí a vzniku nepříjemného zápachu. To pak snižuje trvanlivost a výživovou hodnotu potravin. Lipidy se v potravinách vyskytují nejčastěji ve formě triacylglycerolů, což jsou estery mastných kyselin a glycerolu.<sup>5</sup> Za oxidaci jsou pak zodpovědné mastné kyseliny, které obsahují dvojné vazby oddělené methylenem (-CH<sub>2</sub>-).

Oxidace lipidů je řetězová reakce poskytující neustálý přísun volných radikálů (ROO•; RO•; OH•) vzniklých během tvorby peroxidů z mastných kyselin, které působí další oxidaci (viz následující reakce).<sup>6</sup>

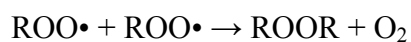
1. Zahájení (iniciace)



2. Šíření (propagace)



3. Ukončení (terminace)



Antioxidanty se dají rozdělit na syntetické a přírodní. Mezi přírodní patří vitamin E, kyselina močová, vitamin C a jiné látky.<sup>6</sup> Vzhledem k jejich malé stabilitě se však v potravinářském průmyslu preferují syntetické fenolické antioxidanty, jako je propylgallát (PG), terciární butylhydrochinon (TBHQ), butylovaný hydroxyanisol (BHA) a butylovaný hydroxytoluen (BHT).<sup>7</sup>

## 1.3 Propylgallát

Jak už bylo výše řečeno, propylgallát (E 310) je primární syntetický antioxidant.<sup>8</sup> Již více než šedesát let se syntetické fenolické antioxidanty záměrně přidávají do komerčních směsí jako jsou přísady do olejů a tuků chránící potraviny před žluknutím, do kosmetických přípravků a farmaceutických preparátů.<sup>7</sup> Slouží k zachování čerstvosti, nutričních hodnot, chuti a barvy potravin. Lze ho použít i jako konzervant.<sup>9</sup>

Propylgallát je bílý prášek bez zápachu a s jemně hořkou chutí. Běžně je absorbován v gastrointestinálním traktu. Dostupné záznamy naznačují, že estery gallátů, jako je propylgallát, jsou v těle karboxylesterasou hydrolyzovány na gallovou kyselinu a 4-*O*-methylgallovou kyselinu. Mimo to je propylgallát autooxidací přeměňován v dimer a ellagovou kyselinu. Volné gallové kyseliny nebo konjugované deriváty 4-*O*-methylgallové kyseliny jsou společně s glukuronidovou kyselinou vylučovány močí.<sup>10</sup>

V mnoha státech je obsah fenolických antioxidantů ve spotřebních potravinách striktně limitován, ale záleží na každé vládě jednotlivého státu.<sup>7</sup> Používání PG Evropskou unií a dalšími státy schváleno je a PG je hodnocen jako bezpečný.<sup>10</sup>

V České republice je používání PG v množství do 200 mg·kg<sup>-1</sup> povoleno u tuků a olejů na smažení, rybích tuků, drůbežního sádla, sádla a lojů. Neměl by se ale používat do tuků určených ke smažení, neboť se při teplotě okolo 150 °C rozpadá. Dále se používá v množství do 200 mg·kg<sup>-1</sup> do sypkých směsí pro přípravu moučníků, majonéz, studených omáček, dehydrovaného masa, kořenících přípravků, sušeného mléka do prodejních automatů, a také i do dehydrovaných přípravků pro polévky a vývary. Nejnižší povolené množství 25 mg·kg<sup>-1</sup> je používáno u sušených brambor a nejvyšší 1000 mg·kg<sup>-1</sup> u vonných silic.<sup>11, 12</sup> Akutní orální toxicita u myší, krys, křečků a králíků se pohybuje v rozmezí od 2000 do 3000 mg·kg<sup>-1</sup> živé váhy.<sup>10</sup>

Běžně se používá samostatně nebo v kombinaci s BHT a BHA,<sup>13</sup> díky jejich synergickým účinkům. Velký synergismus vykazuje směs BHA-BHT a BHA-PG.<sup>8</sup>

V současnosti se o škodlivosti nebo naopak významnosti syntetických fenolických antioxidantů vedou spory. V loňském roce byl publikován článek<sup>14</sup> o velkém významu těchto látek v medicíně v souvislosti s rakovinou, jelikož jsou potenciálně schopné inhibovat nebo předcházet karcinogenezi, a to pro ně zcela typickým mechanismem. Snižují tak riziko nebo/a průběh určitých typů rakoviny, neboť v dnešní době se zvyšuje

zájem o prevenci před nespočetnými nemocemi způsobenými hlavně výskytem volných radikálů.<sup>14</sup> Například propylgallát spolu s BHA a BHT je přidáván do kosmetických přípravků chránících pokožku před volnými radikály, které vznikají v pokožce vlivem radiace, pesticidů, kouře atd., a tím ji chrání před možností vzniku rakoviny kůže.<sup>15</sup> Ale na druhé straně byly od roku 1988 podezřívány z poškozování jater a karcinogeneze u laboratorních zvířat<sup>7</sup> a u PG byly dokonce prokázány toxické a mutagenní účinky u lidí.<sup>13</sup>

Při přecitlivosti může vyvolávat i řadu alergických reakcí,<sup>16</sup> podráždění žaludku a vyrážky na kůži při vnějším kontaktu.<sup>17</sup> Tato přídatná látka by se neměla používat u kojenců a dětí do 3 let.<sup>18</sup>

Z hlediska ochrany životního prostředí není PG považován za primární polutant, ale právě díky jeho širokému využití od potravinářského až po farmaceutický průmysl může být vylučován do odpadních vod, kde může vyvolávat ekotoxikologický efekt. Pro chemii životního prostředí se tak ve vodním systému stává problémem, a proto byl zkoumán jeho toxický efekt na 4 různých trofických úrovních a stanoveny hodnoty EC<sub>50</sub> a NOAEL, které potvrdily odlišnou citlivost různých organismů na PG. Následně ve směrnicích EU pro klasifikaci, balení a označování nebezpečných látek byl PG na základě těchto výsledků označen jako „R51“ toxický pro vodní systémy.<sup>10</sup>

Mimo to PG a jeho příbuzné galláty mají i jiné účinky, jako je inhibice dýchacího řetězce parazita *Trypanosoma cruzi*, antimikrobiální aktivitu proti *Escherichia coli*, toxicita vůči krysím hepatocytům.<sup>19</sup>

## 1.4 Metody stanovení PG

Jelikož zvýšený obsah syntetických antioxidantů může být toxický, je výzkum nových analytických metod pro rychlé stanovení těchto látek velmi důležitý.<sup>20</sup>

První použitou metodou ke stanovení v různých vzorcích jídla byla kolorimetrie a spektrofotometrie. Ke stanovování syntetických antioxidantů se dnes využívají hlavně chromatografické a elektrochemické metody mající všeobecně vysokou citlivost a selektivitu.<sup>13</sup> PG je nejčastěji stanovován spolu s BHA, BHT a TBHQ, jelikož kombinace dvou syntetických antioxidantů je mnohem efektivnější a tudíž se často vyskytují ve směsích.<sup>20</sup> Nejčastěji analyzovanými vzorky jsou různé jedlé oleje, margaríny, bujóny, dehydratované výrobky, ale i kosmetické přípravky (tělová mléka, krémy, koupelové oleje, balzámy na rty).

Aplikace chromatografických metod ke stanovení PG je velice rozšířená. Nejvíce používanou chromatografickou metodou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Populární je spojení s UV detekcí,<sup>7, 21, 22</sup> amperometrickou detekcí,<sup>23</sup> ale využívá se i spektrometr s diodovým polem<sup>24, 25</sup> nebo fluorescenční detektor.<sup>25</sup> V několika posledních letech se v analýze kontroly kvality potravin do popředí dostávají techniky jako HPLC-MS.<sup>26</sup>

Aplikována byla také kapilární elektroforéza (CE)<sup>20</sup> a micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC)<sup>15</sup> s amperometrickou detekcí. Jsou to metody rychlé, přesné, efektivní a spojení s elektrochemickým detektorem ještě zvyšuje jejich citlivost a selektivitu.

Použijí-li se derivatizační reakce, lze antioxidanty stanovovat pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostním detektorem (GC-MS).<sup>27</sup>

PG je stanovován i pomocí průtokové injekční analýzy (FIA) ve spojení s amperometrickou a spektrofotometrickou detekcí.<sup>28-30</sup>

Z elektrochemických metod jsou nejdůležitější voltametrická stanovení PG. Nejčastěji je stanovován pomocí diferenční pulsní voltametrie (DPV) a cyklické voltametrie (CV) pomocí elektrody ze skelného uhlíku<sup>8</sup> nebo uhlíkové rotační diskové elektrody.<sup>19,31</sup>

**Tab.1**

Meze detekce některých metod využitých ke stanovení PG.

Metoda stanovení	$L_D$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	literatura
CE	1,1	20
MECC	0,06	15
HPLC-UV	0,3	7
FIA-DAD	0,02	28
FIA-UV	0,84	32
FIA-UV	0,9	33
CV	0,2	29
DPV	0,03	8

**Lékopisné stanovení obsahu<sup>34</sup>**

0,400 g látky se rozpustí ve 150 ml vody zahřáté asi na 70 °C. Roztok se zahřeje k varu a za stálého míchání se přidá 50 ml dusičnan-oxidu bismutitého. Směs se ochladí a kvantitativně převede do odměrné baňky na 250 ml a zředí se na objem roztokem kyseliny dusičné (0,5%). Filtruje se, prvních 20 ml filtrátu se odstraní a provede se chelatometrické stanovení bismutu za použití 100 ml filtrátu. Provede se slepá zkouška.

1 ml 0,1 mol·dm<sup>-3</sup> edetanu disodného odpovídá 21,22 mg C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>.

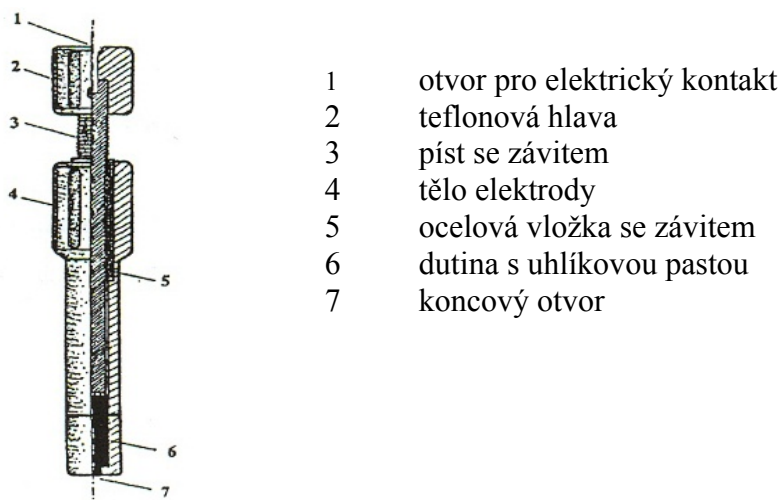
## 1.5 Uhlíková pastová elektroda

Uhlíkové pastové elektrody (CPE) byly zavedeny do analytické chemie profesorem Ralphem N. Adamsem v roce 1958.<sup>35</sup> Původním úmyslem bylo ze směsi uhlíkového prášku a organické kapaliny nemísitelné s vodou vytvořit obdobu rtuťové kapkové elektrody, která by byla vhodná ke sledování oxidačních procesů. Tento záměr sice nevyšel, ovšem po zvýšení podílu uhlíku ve směsi vznikl pastovitý materiál, jehož příznivé vlastnosti jsou v anorganické i organické analýze využívány i dnes.<sup>36</sup>

CPE patří do speciální skupiny heterogenních uhlíkových elektrod.<sup>37</sup> Jsou tvořeny z uhlíkové pasty, složené z uhlíkového prášku a pojiva, naplněné do elektrodového pouzdra (obr. 1). Do dnešního dne byly vyzkoušeny různé typy uhlíkových prášků, a to od běžných spektrálních prášků přes uhlíkové mikrokuličky až k uhlíkovým nanotrubičkám.<sup>36</sup> Požadovanými vlastnostmi uhlíkového prášku je stejná velikost částic a nízká adsorpční schopnost.<sup>38</sup> Stejně tak bylo otestováno velké množství kapalin – organické, anorganické, vodivé, nevodivé. Nejčastěji používanými pastovacími kapalinami jsou minerální oleje, silikonové oleje, parafinové oleje, organofosfáty, nověji iontové kapaliny.<sup>36</sup> Uhlíková pasta může být také modifikována různými látkami a ve srovnání s úpravou pevných elektrod je její modifikace mnohem jednodušší.<sup>37</sup>

Chování řady připravených past se mnohdy ustálí až po určité době (asi 24 hodin), zřejmě v důsledku následné samovolné homogenizace čerstvě připravené směsi. Naplněnou elektrodu není vhodné ponechávat příliš dlouho na vzduchu, neboť pasta zvolna vysychá, proto se přechovává ponořena koncovým otvorem v nádobce s destilovanou vodou.<sup>38</sup>





**Obr. 1**  
 Pouzdro pro uhlíkovou pastovou elektrodu<sup>38</sup>

Uhlíkové pasty mají ve většině užívaných elektrolytů potenciálový rozsah srovnatelný s ostatními pevnými elektrodami.<sup>38</sup> Mezi největší výhody uhlíkových past patří jejich jednoduchá příprava a velmi snadná chemická či biologická modifikovatelnost, nízké kapacitní proudy na těchto elektrodách, snadná obnovitelnost jejich aktivního povrchu i dobrá opakovatelnost a reprodukovatelnost měření. I když se uhlíkové pastové elektrody ve většině případů používají ke studiu oxidačních reakcí – tedy v oblasti kladných potenciálů, je tento materiál využitelný i v oblasti záporných potenciálů, tedy ke studiu redukčních vlastností či ke stanovením založeným na redukcích. U redukčních reakcí je však nutné zvolit metodu, kde neruší v pastách či analyzovaných matricích rozpuštěný kyslík. Možnost využít uhlíkové pasty v oblasti kladných i záporných potenciálů jistě zvyšuje selektivitu používaných metod, přesto však není možné takto jednoduše konkurovat metodám separačním, které před vlastní detekcí dokáží stanovované analyty účinně rozdělit. Řešením splňujícím požadavky na vysokou citlivost a vysokou selektivitu nově vypracovávaných metod je spojení citlivé elektrochemické detekce se separační účinností HPLC, kde lze běžně konkurovat klasické UV detekci, a to za nesrovnatelně nižších investičních nákladů.<sup>36</sup>

CPE lze úspěšně použít pro analýzu anorganických a organických sloučenin,<sup>39</sup> léčiv a jejich metabolických reziduí v biologických materiálech, zejména moči a krvi. Mnohá léčiva, která mají objemné a lipofilní molekuly se snadno akumulují na povrch CPE

adsorpcí, jiná mohou být stanovena díky extrakčním schopnostem uhlíkové pasty. CPE mohou být uplatněna i pro měření v živých tkáních pokusných zvířat.<sup>40</sup>

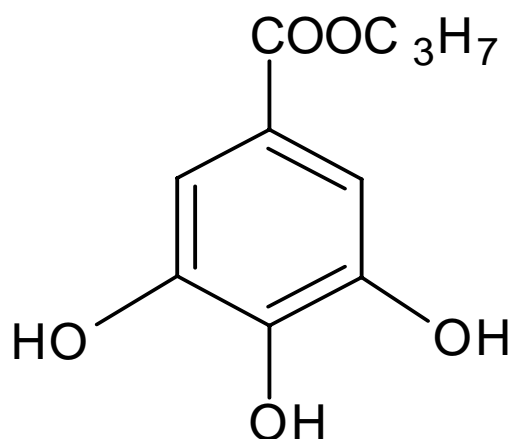
Z elektrochemických metod nejčastěji využívajících uhlíkové pastové elektrody je nutno jmenovat především cyklickou voltametrii (CV), voltametrii s lineárním nárůstem potenciálu (LSV), diferenční pulsní voltametrii (DPV), square-wave voltametrii (SWV), elektrochemickou rozpouštěcí voltametrii (ESA), adsorptivní rozpouštěcí voltametrii (AdSV), katodickou rozpouštěcí voltametrii (CSV), rovnovážnou potenciometrii (POT), amperometrii (AMP), chronoamperometrii (CA), chronocoulometrii (CCA), použití CPE jako elektrochemického detektoru v průtokové analýze (FIA) a vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC).<sup>36</sup>

Meze stanovitelnosti dosažené přímou analýzou na nemodifikovaných CPE jsou obvykle od  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  do  $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Pokud je použita akumulace analytu na povrchu elektrody, mez stanovitelnosti klesá ke koncentraci  $1 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .<sup>41</sup>

## 2. Experimentální část

### 2.1 Studovaná látka

#### Propylgallát



C.A.S. jméno: 3,4,5-Trihydroxybenzoic acid propyl ester

C.A.S. registrační číslo: 121-79-9

Sumární vzorec:  $C_{10}H_{12}O_5$

Synonyma: *n*-propylgallát, propylester kyseliny gallové

$M_r$ : 212,20

Fyzikální stav: bílý nebo téměř bílý krystalický prášek

Rozpustnost: velmi těžko rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v etheru a v 96% ethanolu

Teplota tání: 148-151 °C

## 2.2 Reagencie

**Studovaná látka:** Propylgallát (Sigma)

Zásobní roztok PG o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  byl připraven rozpuštěním 0,0106 g PG v methanolu (p.a., Lach-Ner, Neratovice). Roztoky o nižších koncentracích byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku. Všechny roztoky byly uchovávány v temnu v chladu při konstantní teplotě a po dobu 1 měsíce.<sup>7</sup>

**Mobilní fáze a tlumivé roztoky:**

Brittonovy-Robinsonovy (BR) tlumivé roztoky<sup>42</sup> o příslušném pH byly připraveny smísením vodného roztoku hydroxidu sodného (p.a., Lachema Brno) o koncentraci  $0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  s roztokem obsahujícím kyselinu boritou (p.a., Lachema Brno), kyselinu fosforečnou (85 %,  $\rho = 1,71 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , p.a., Lachema Brno) a kyselinu octovou (98 %,  $\rho = 1,06 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , p.a., Lach-Ner, Neratovice), každou o koncentraci  $0,04 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Přesná hodnota pH byla měřena pH metrem.

Fosfátový pufr byl tvořen  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  dihydrogenfosforečnanem sodným, jehož pH bylo upraveno na požadovanou hodnotu koncentrovanou kyselinou fosforečnou nebo roztokem hydroxidu sodného o koncentraci  $0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Mobilní fáze pro HPLC byla připravena smísením methanolu (pro HPLC, Lach-Ner, Neratovice) a fosfátového pufru (pH 2,4; 4 a 6) v příslušném množství a pro DPV smísením methanolu (p.a., Lach-Ner, Neratovice) a Brittonova-Robinsonova pufru (pH 2 až 12) v příslušném množství.

Pro přípravu vodných roztoků byla použita deionizovaná voda (Millipore Q-plus systém, Millipore, USA).

**Příprava CPE:**

Uhlíková pasta byla připravena smísením 250 mg uhlíkových mikrokuliček skelného uhlíku o průměru 0,4 – 12  $\mu\text{m}$  (Alpha Paesar, USA) a 90  $\mu\text{l}$  minerálního oleje (Fluka Biochemika, Švýcarsko) a naplněna do teflonového pouzdra.<sup>43</sup>

**Reálný vzorek:**

Jako reálný vzorek byl použit rostlinný olej - směs řepkového, nízkoerukového a slunečnicového oleje (Lukana, Česká republika).

## 2.3 Aparatura

### 2.3.1 Voltametrie

**Sestava:** Eco Tribo polarograf s programem Polar Pro verze 4 (Polaro-Sensors, spol.s.r.o., Praha) pracující v prostředí Windows XP (Microsoft)

**Elektrody:**

- pracovní uhlíková pastová elektroda, aktivní plocha kruhová o průměru 2 mm
- referentní argentchloridová elektroda s  $3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  KCl (RAE 113)
- pomocná platinová plíšková elektroda (ETP CZ P004-05)

### 2.3.2 HPLC s UV a elektrochemickou detekcí

**Kolona:** LiChroCART<sup>®</sup> 125-4, Superspher 100, RP-18 (Merck, Německo)

**Pumpa:** vysokotlaká pumpa HPP 5001 (Laboratorní přístroje, Praha)

**Dávkovač:** DKP 2209 se smyčkou 10  $\mu\text{l}$ , plnění bylo prováděno injekční stříkačkou

**Detektory:**

- *Spektrofotometrický UV/VIS detektor* LCD 2083 (Laboratorní přístroje, Praha)
- *Ampérometrický detektor* ADLC 2 (Laboratorní přístroje, Praha)

**Programové vybavení:** CSW 32, pracující v prostředí Windows 98 (Microsoft)

Při elektrochemické detekci byl použit detektor typu wall-jet, který pracoval v tříelektrodovém zapojení s uhlíkovou pastovou elektrodou jako pracovní elektrodou, referentní argentchloridovou elektrodou a pomocnou platinovou plíškovou elektrodou.

Konec kapiláry byl přiveden k povrchu CPE, která byla spolu s referenční a pomocnou elektrodou ponořena v mobilní fázi.

### 2.3.3 Ostatní používaná zařízení

Hodnoty pH roztoků byly měřeny digitálním přístrojem Conductivity and pH meter 4330 (Jenway Ltd., Essex, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou.

Vzduch z roztoků byl odstraňován ultrazvukovou čističkou PSO2000A (Powersonic, USA). Stejná ultrazvuková čistička byla použita pro sonikaci v průběhu extrakce reálného vzorku.

Pro rozdělení vodné a nevodné složky při extrakci reálného vzorku byla použita centrifuga (Chirana, Československo).

## 2.4 Pracovní postupy

### 2.4.1 Voltametrické stanovení

Pro voltametrické stanovení byl objem měřeného vzorku vždy 10 ml. Vzorek byl připraven odpipetováním potřebného množství roztoku studované látky, methanolu (20 %, V/V) a doplněním BR pufrem o požadovaném pH na celkový objem 10 ml. Měření probíhalo za laboratorní teploty. Před každým jednotlivým měřením byl povrch uhlíkové pastové elektrody mechanicky očištěn filtračním papírem navlhčeným destilovanou vodou.

Při optimalizaci podmínek stanovení PG na CPE byla studována závislost odezvy elektrody na pH, vliv pasivace CPE a možnost akumulace PG na CPE.

Při vybraném optimálním pH prostředí byly proměřeny koncentrační závislosti PG v rozmezí od  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  k nižším koncentracím.

Všechna měření probíhala při rychlosti polarizace  $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  a na elektrody byly vkládány pulsy o výšce 50 mV a šířce 100 ms.

Není-li řečeno jinak, byly křivky proměřeny třikrát a získaná data zpracována metodou lineární regrese. Mez detekce  $L_D$  [ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ] byla vypočtena jako koncentrace odpovídající trojnásobku směrodatné odchylky měření nejnižší stanovované koncentrace.

### 2.4.2 HPLC stanovení s UV a elektrochemickou detekcí

Objem měřeného vzorku byl vždy 10 ml. Vzorek byl připraven odpipetováním roztoku stanovované látky a methanolu (50 %, V/V) a doplněním fosfátovým pufrem o požadovaném pH. Vlnová délka UV detektoru byla nastavena na 280 nm. Lineární průtoková rychlost byla  $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

### 2.4.3 Stanovení PG v modelovém a reálném vzorku

Jako modelový vzorek byl použit rostlinný olej. Ve 100 g tohoto oleje bylo rozpuštěno 10 mg práškového propylgallátu a poté bylo odváženo 1,3 g oleje, ke kterému bylo přidáno 5,85 ml methanolu. Vzorek byl ultrasonikován (15 min) a odstředěn na centrifuze (10 min).<sup>7</sup> Vzorky o nižších koncentracích byly připraveny postupným ředěním vzorku oleje. Efektivita extrakce byla ověřena metodou DPV.

Stejným postupem byl připraven i vzorek bez přídavku PG (reálný vzorek) a metodou standardního přídavku byla stanovena jeho koncentrace. Jako standardní roztok pro standardní přídavek byl použit zásobní roztok propylgallátu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , který byl naředěn na požadované koncentrace. Množství propylgallátu bylo spočítáno z výšek píků. Každé stanovení bylo opakováno třikrát a data byla statisticky zpracována. Byla vypočtena směrodatná odchylka, relativní směrodatná odchylka a interval spolehlivosti.



### 3. Voltametrické stanovení

#### 3.1 Vliv pH BR pufru na voltametrické chování PG

Vliv pH BR pufru na voltametrické chování roztoku PG o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  byl sledován ve směsi BR pufru v rozmezí pH 2 až 12 a methanolu (20 %, V/V). Voltametrické křivky byly proměřeny v rozmezí vkládaného napětí od -300 do +1000 mV. Bylo zjištěno, že PG poskytuje v celém rozsahu pH dva píky, přičemž pouze první pík je analyticky vyhodnotitelný. Při pH 2 a 3 se výška prvního píku mění jen nepatrně. Při pH 4 dosahuje maximální výšky a dále při rostoucím pH klesá, zatímco výška druhého píku roste s rostoucím pH. Potenciály obou píků s rostoucím pH klesají. U prvního píku potenciál klesá lineárně od pH 2 až do pH 10. U druhého píku potenciál klesá lineárně od pH 2 až do pH 6 a od pH 8 až do pH 12.

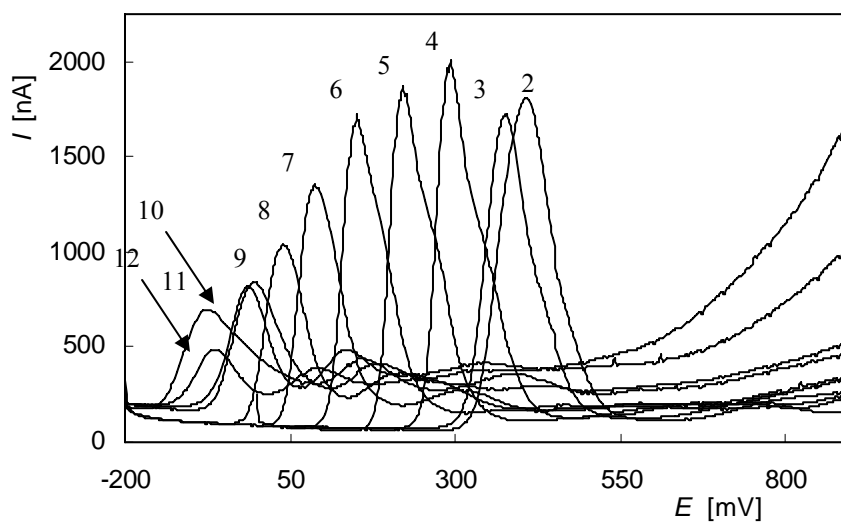
Závislosti potenciálů píků ( $E_p$ ) a proudů píků ( $I_p$ ) na pH jsou uvedeny v tab. 2. Voltametrické křivky jsou znázorněny na obr. 2. Na obr. 3 a 4 jsou znázorněny závislosti proudů píků ( $I_p$ ) a potenciálů píků ( $E_p$ ) na pH.

Jako optimální pH bylo zvoleno pH 5, při kterém je pík nejlépe vyhodnotitelný. Při tomto pH byly proměřeny koncentrační závislosti.

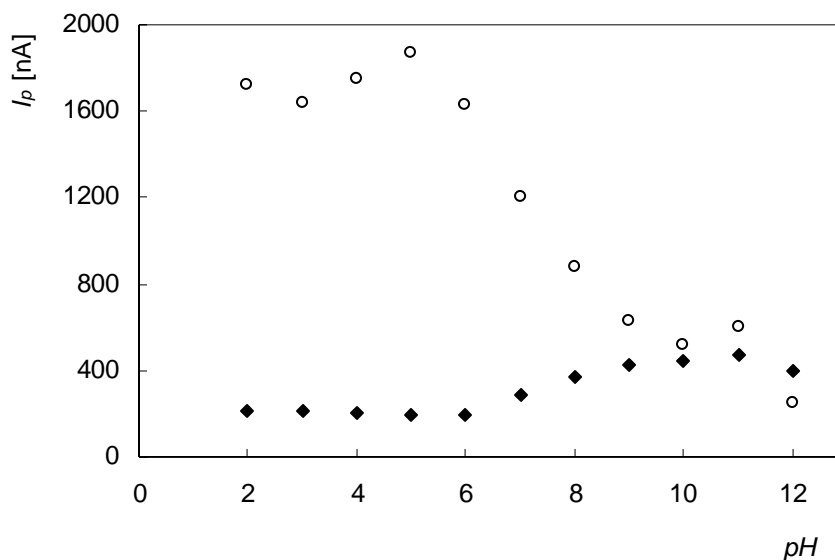
**Tab. 2**

Závislosti proudů píků ( $I_p$ ) a potenciálů píků ( $E_p$ )  $1 \cdot 10^{-4}$  mol·dm<sup>-3</sup> PG pro DPV na CPE v prostředí BR pufru a methanolu (20 %, V/V).

pH BR pufru	$E_p$ [mV]	$I_p$ [nA]	pH BR pufru	$E_p$ [mV]	$I_p$ [nA]
2	416	1718	2	778	209
3	373	1639	3	738	215
4	297	1752	4	666	206
5	225	1871	5	624	196
6	153	1626	6	593	197
7	94	1199	7	318	286
8	41	878	8	220	369
9	-10	629	9	175	424
10	-79	518	10	156	440
11	-18	599	11	138	476
12	-67	253	12	83	400

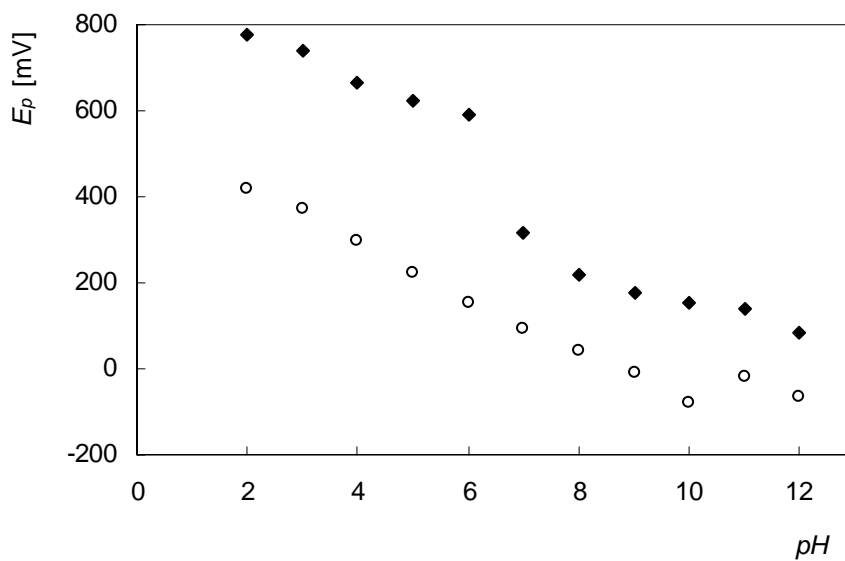
**Obr. 2**

Vliv pH na DP voltamogramy  $1 \cdot 10^{-4}$  mol·dm<sup>-3</sup> PG na CPE v prostředí methanolu (20 %, V/V) a BR pufru o zvoleném pH. Číslo voltamogramu odpovídá pH BR pufru.



**Obr. 3**

Závislosti proudů prvního ( $\circ$ ) a druhého píku ( $\blacklozenge$ ) ( $I_p$ )  $1 \cdot 10^{-4}$  mol·dm<sup>-3</sup> PG pro DPV na CPE na pH v prostředí methanolu (20 %, V/V) a BR pufru pH 2 - 12. Hodnota pH odpovídá hodnotě BR pufru.



**Obr. 4**

Závislosti potenciálů prvního ( $\circ$ ) a druhého píku ( $\blacklozenge$ ) ( $E_p$ )  $1 \cdot 10^{-4}$  mol·dm<sup>-3</sup> PG pro DPV na CPE na pH v prostředí methanolu (20 %, V/V) a BR pufru pH 2 - 12. Hodnota pH odpovídá hodnotě BR pufru.

### 3.2 Opakovatelnost měření PG na CPE

Vliv opakovatelnosti měření PG na CPE byl sledován na roztoku PG o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  v prostředí BR pufru (pH 5) a methanolu (20 %, V/V). Bylo prováděno vždy 15 po sobě následujících měření. V první sérii měření byl povrch CPE mechanicky očištěn před každým následujícím měřením. Výška pulsu byla stanovena na 970,85 nA s  $s_r = 4,22 \%$ , což odpovídá obvyklým hodnotám pro tento typ elektrody.

V tab. 3 je uvedeno statistické vyhodnocení. V druhé sérii bylo měření prováděno bez obnovy povrchu elektrody. Při měření bez obnovy povrchu dochází k pasivaci CPE. Vlivem pasivace CPE došlo během měření ke snížení výšky píku přibližně o 50 %.

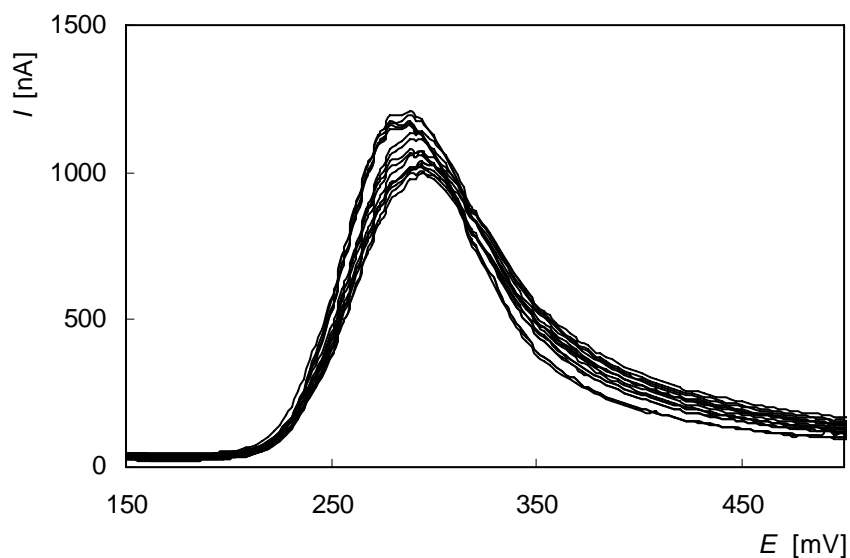
Je proto nutné povrch elektrody před každým následujícím měřením mechanicky očistit.

Na obr. 5 jsou znázorněny voltamogramy 15 následujících měření s mechanickým očištěním povrchu CPE před každým následujícím měřením a na obr. 6 bez mechanického očištění povrchu CPE před každým měřením.

#### Tab. 3

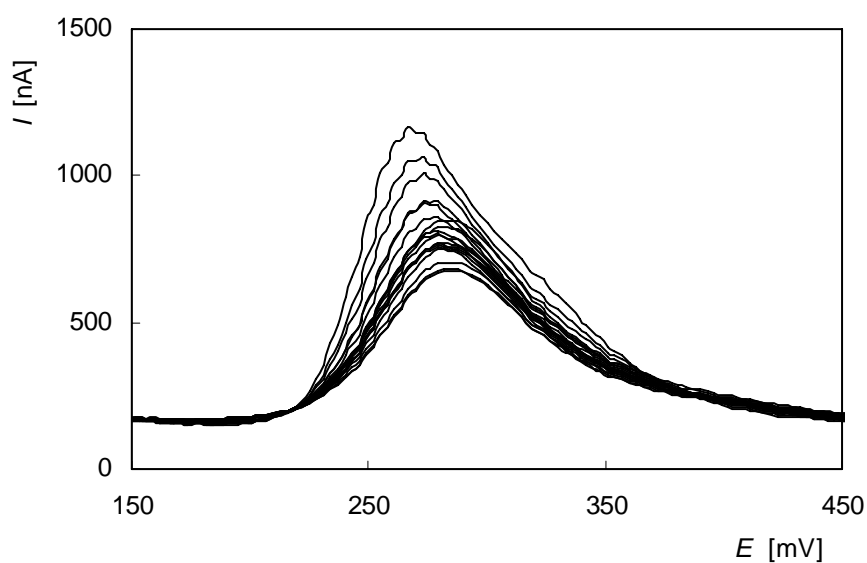
Statistické vyhodnocení opakovatelnosti voltametrického stanovení PG s mechanickým očištěním povrchu CPE metodou DPV v roztoku PG o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  v prostředí BR pufru (pH 5) a methanolu (20 %, V/V).

výška píku [nA]	<b>970,85</b>
$s$ [nA]	40,96
$s_r$ [%]	4,22
$L_{1,2}$ [ $\pm$ nA]	28,98



**Obr. 5**

Voltamogramy 15 následujících měření PG s mechanickým očištěním povrchu CPE, měřeno metodou DPV v roztoku PG o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  v prostředí BR pufru (pH 5) a methanolu (20 %, V/V).

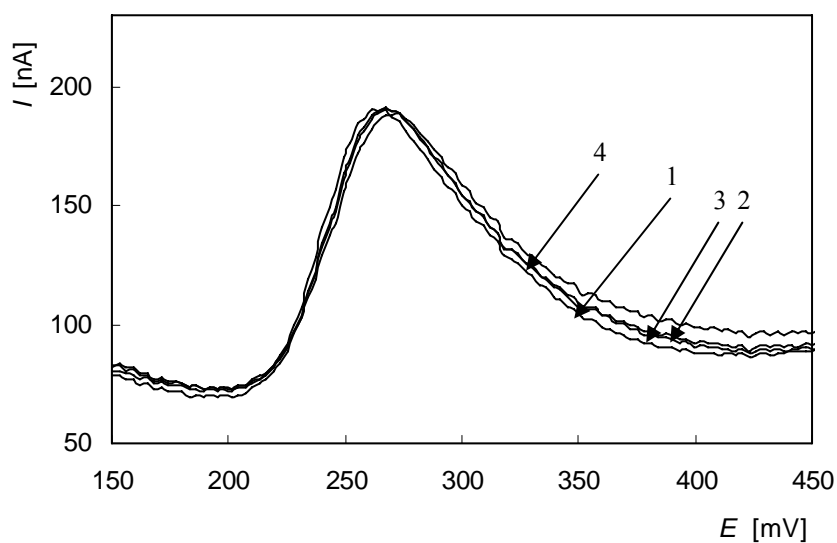


**Obr. 6**

Voltamogramy 15 následujících měření PG bez mechanického očištění povrchu CPE, měřeno metodou DPV v roztoku PG o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  v prostředí BR pufru (pH 5) a methanolu (20 %, V/V).

### 3.3 Vliv akumulace PG na CPE

Ve snaze zvýšit citlivost stanovení byla zkoumána možnost akumulace PG na CPE v míchaném roztoku PG o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  v prostředí methanolu (20 %, V/V) a BR pufru o pH 5 po 1; 3 a 10 minutách. Z voltamogramů (obr. 7) je vidět, že k akumulaci PG na CPE nedochází.



**Obr. 7**

Voltamogramy studia vlivu akumulace PG na povrchu CPE, měřeno metodou DPV v roztoku PG o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  v prostředí methanolu (20 %, V/V) a BR pufru o pH 5. Měřeno v čase 0(1); 1(2); 3(3); 10(4) min.

### 3.4 Koncentrační závislosti PG

Koncentrační závislosti PG byly proměřeny v rozmezí  $1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu (20 %, V/V). Křivky byly zaznamenány v potenciálovém rozsahu od -200 do +1200 mV. Naměřené závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese.

Kalibrační závislosti jsou lineární v celé měřené oblasti koncentrací, korelační koeficient se pohybuje v intervalu 0,9996 až 0,9964. Směrnice logaritmické závislosti linearitu potvrzuje, jelikož se její hodnota blíží jedné. Mez detekce byla stanovena na  $0,61 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Parametry těchto kalibračních křivek stanovení PG metodou DPV jsou uvedeny v tab. 4. V tab. 5 jsou uvedeny parametry přímků v celém koncentračním rozmezí v logaritmické formě. Voltametrické křivky pro koncentrační rozmezí  $1 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $1 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a  $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  jsou uvedeny na obr. 8, 10 a 12. Kalibrační přímků v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a  $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  jsou uvedeny na obr. 9, 11 a 13 a v celém koncentračním rozmezí v logaritmické formě na obr. 14.

**Tab. 4**

Parametry kalibračních přímk stanovení PG metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu (20 %, V/V).

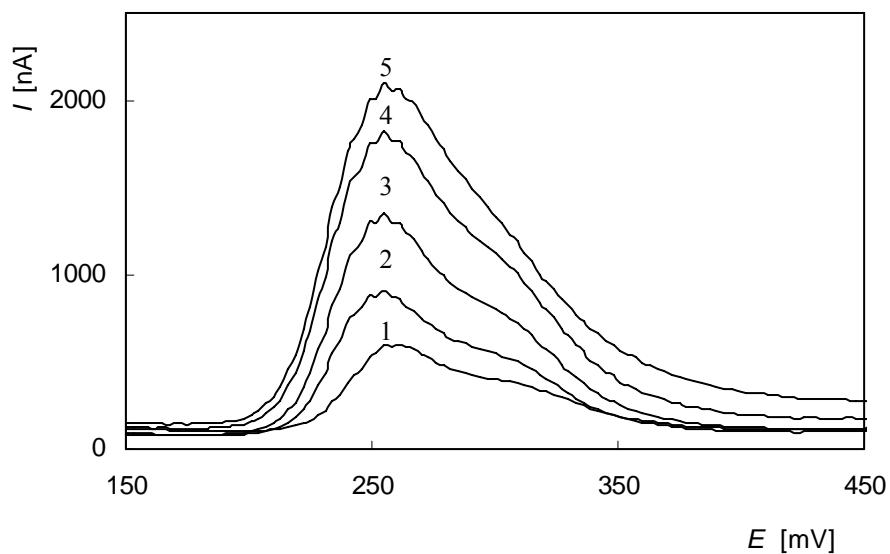
c [mol·dm <sup>-3</sup> ]	úsek [nA]	směrnice [mA·mol <sup>-1</sup> ·dm <sup>3</sup> ]	korelační koeficient	$L_D$ [mol·dm <sup>-3</sup> ]
$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	67,2	87,69	0,9996	----
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	-0,66	22,76	0,9964	----
$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	-0,88	2,11	0,9992	$0,61 \cdot 10^{-7}$

**Tab. 5**

Parametry kalibrační přímky v celém koncentračním rozmezí stanovení PG na CPE metodou DPV v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu (20 %, V/V) v logaritmické formě.

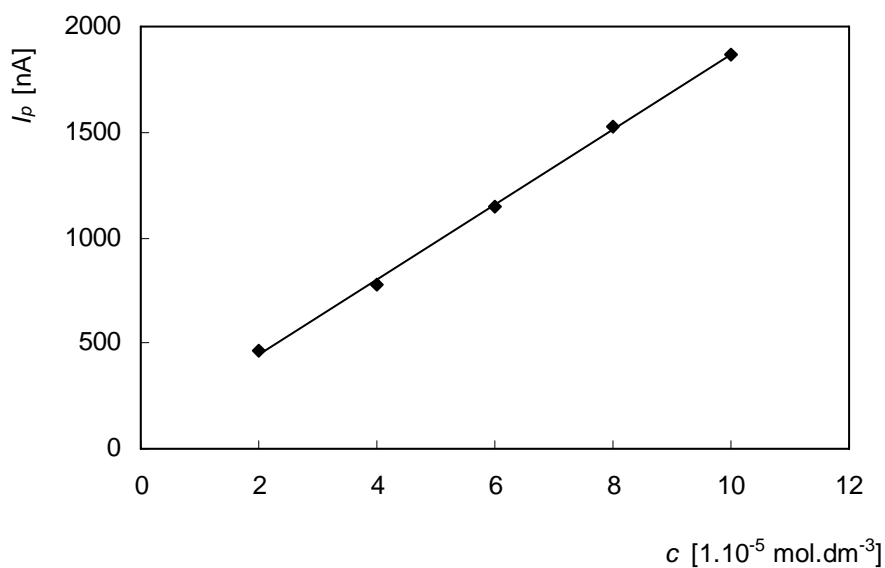
c [mol·dm <sup>-3</sup> ]	úsek	směrnice	korelační koeficient
$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	7,47	1,03	0,9964





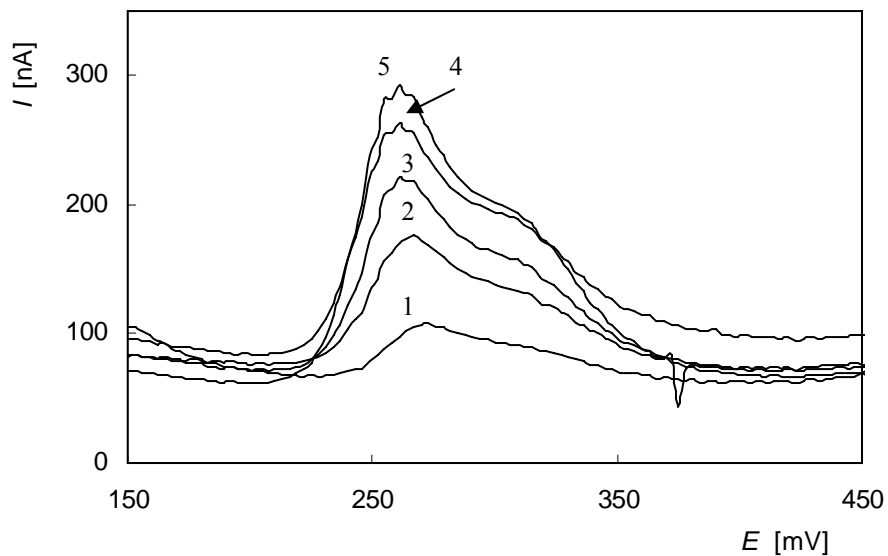
**Obr. 8**

Voltamogramy PG, měřeno metodou DPV na CPE v prostředí methanolu (20 %, V/V) a BR pufru o pH 5. Koncentrace  $2 \cdot 10^{-5}$  (1),  $4 \cdot 10^{-5}$  (2),  $6 \cdot 10^{-5}$  (3),  $8 \cdot 10^{-5}$  (4) a  $1 \cdot 10^{-4}$  mol·dm<sup>-3</sup> (5).



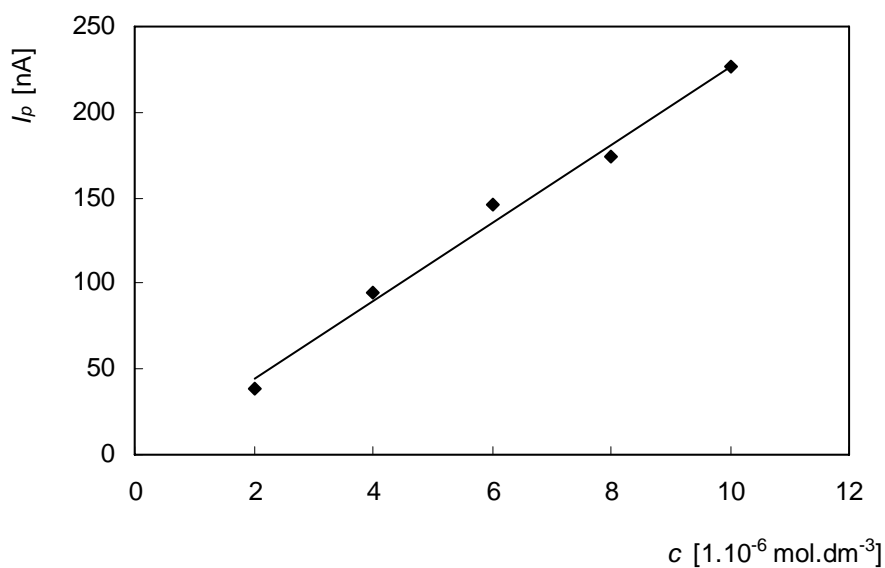
**Obr. 9**

Závislost proudu píku ( $I_p$ ) na koncentraci PG v rozmezí  $1 \cdot 10^{-4}$  -  $2 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>. Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu (20 %, V/V).



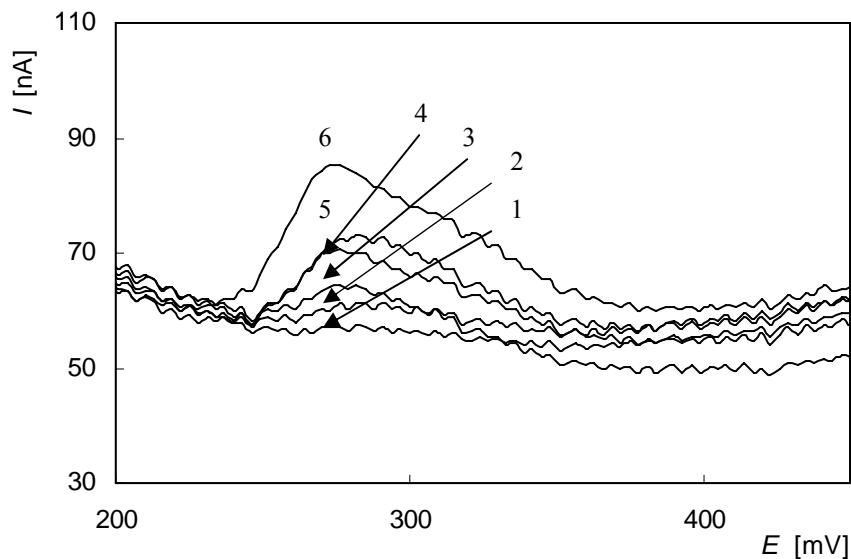
**Obr. 10**

Voltamogramy PG, měřeno metodou DPV na CPE v prostředí methanolu (20 %, V/V) a BR pufru o pH 5. Koncentrace  $2 \cdot 10^{-6}$  (1),  $4 \cdot 10^{-6}$  (2),  $6 \cdot 10^{-6}$  (3),  $8 \cdot 10^{-6}$  (4) a  $1 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup> (5).



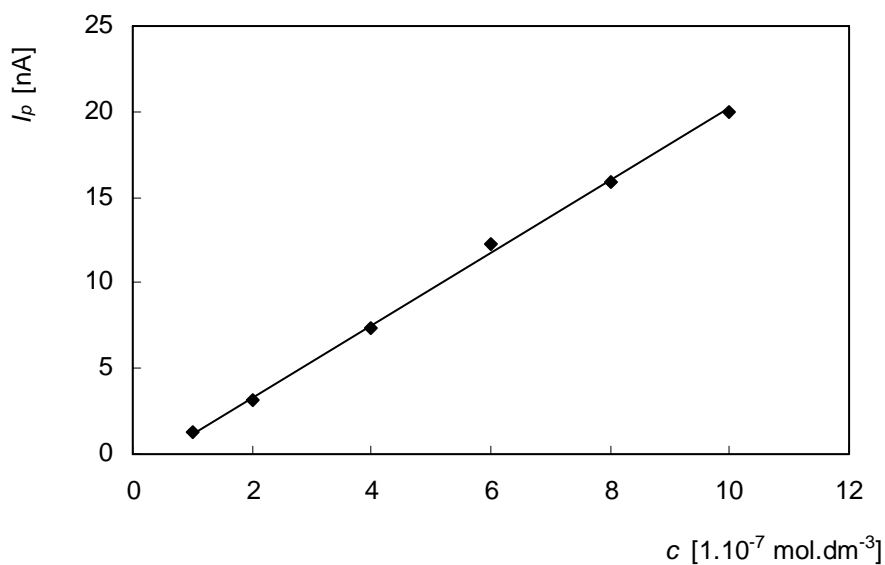
**Obr. 11**

Závislost proudu píku ( $I_p$ ) na koncentraci PG v rozmezí  $1 \cdot 10^{-5}$  -  $2 \cdot 10^{-6}$  mol·dm<sup>-3</sup>. Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu (20 %, V/V).



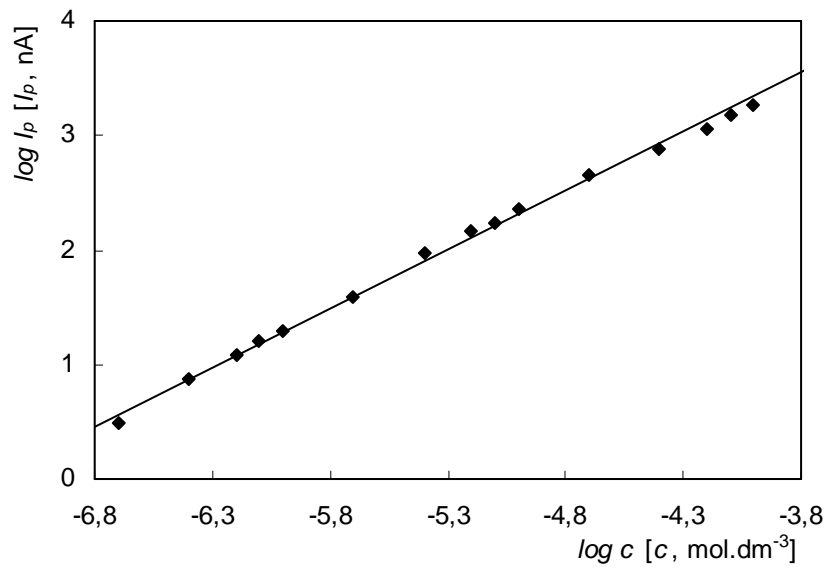
**Obr. 12**

Voltamogramy PG, měřeno metodou DPV na CPE v prostředí methanolu (20 %, V/V) a BR pufru o pH 5. Koncentrace  $1 \cdot 10^{-7}$  (1),  $2 \cdot 10^{-7}$  (2),  $4 \cdot 10^{-7}$  (3),  $6 \cdot 10^{-7}$  (4),  $8 \cdot 10^{-7}$  (5) a  $1 \cdot 10^{-6}$  mol·dm<sup>-3</sup> (6).



**Obr. 13**

Závislost proudu píku ( $I_p$ ) na koncentraci PG v rozmezí  $1 \cdot 10^{-6}$  -  $1 \cdot 10^{-7}$  mol·dm<sup>-3</sup>. Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu (20 %, V/V).



**Obr. 14**

Logaritmická závislost proudu píku ( $I_p$ ) na koncentraci PG v rozmezí  $1 \cdot 10^{-4}$  -  $1 \cdot 10^{-7}$  mol·dm<sup>-3</sup>. Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu (20 %, V/V).

## 4. HPLC stanovení s UV a elektrochemickou detekcí

### 4.1 Optimalizace HPLC stanovení PG

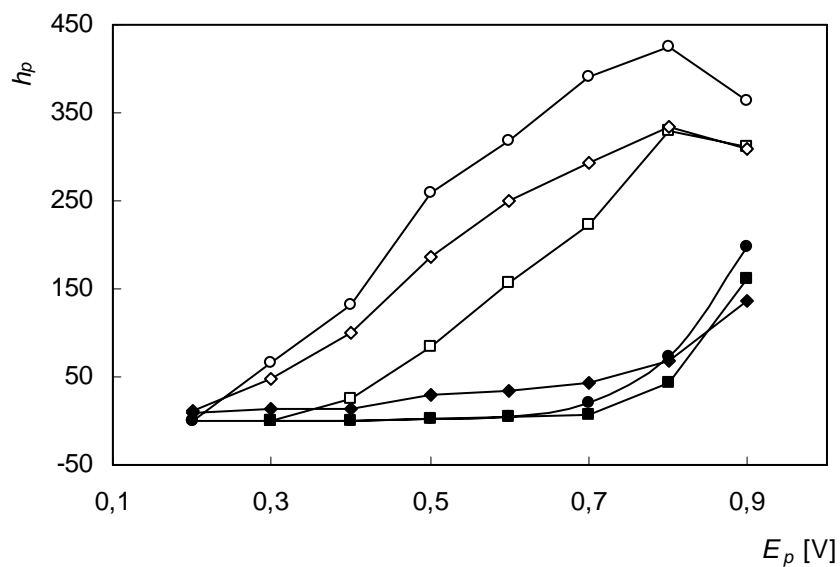
Při hledání vhodných podmínek pro HPLC stanovení PG bylo nejprve nutné zvolit optimální složení mobilní fáze. Jako optimální byla zvolena mobilní fáze s obsahem methanolu (50 %, V/V).

Při použití elektrochemického detektoru je třeba nalézt optimální potenciál pracovní elektrody. Tento potenciál se získá z hydrodynamických voltamogramů, což je závislost výšky píku analytu na potenciálu vkládaném na pracovní elektrodu  $E$  (V). Je třeba nalézt takový potenciál, při němž má stanovovaná látka nejvyšší poměr signálu k šumu detektoru, přičemž šum detektoru vzrůstá s rostoucím pracovním potenciálem.

Na odezvu elektrochemického detektoru má rovněž vliv pH mobilní fáze, není-li tento faktor určující pro separaci analytů. Při optimalizaci podmínek je vhodné k tomuto faktoru přihlédnout.

Hydrodynamické voltamogramy byly proměřeny v oblasti vkládaného potenciálu +0,1 až +0,9 V a při různém pH fosfátového pufru. Pro toto měření byl použit roztok PG o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  v mobilní fázi s obsahem methanolu (50 %, V/V) a  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosfátového pufru o pH 2,5; 4 a 6. Z hydrodynamických voltamogramů (obr. 15) je patrné, že pH fosfátového pufru má vliv na výšku píku. Nejvyšší pík je při použití fosfátového pufru o pH 4, proto byla tato hodnota zvolena pro další měření.

Jako optimální potenciál detekce byl stanoven potenciál +0,8 V, při kterém má pík maximální výšku a přitom ještě nedošlo k nárůstu proudu pozadí a tím i nestabilitě základní linie. Při tomto potenciálu, podílu methanolu (50 %, V/V) a pH 4 byly proměřeny kalibrační závislosti PG. Pro UV detekci byla nastavena vlnová délka detektoru na 280 nm.<sup>7</sup>



**Obr. 15**

Hydrodynamické voltamogramy  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  PG v mobilní fázi obsahující methanol (50 %, V/V) a  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosfátový pufr o pH 2,5 ( $\diamond$ ), 4 ( $\circ$ ) a 6 ( $\square$ ); proud pozadí v prostředí fosfátového pufru o pH 2,5 ( $\blacklozenge$ ), 4 ( $\bullet$ ) a 6 ( $\blacksquare$ ), kolona LiChroCART<sup>®</sup> 125-4, Superspher 100, RP-18,  $F_m = 1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , dávkováno  $10 \mu\text{l}$ .

## 4.2 Koncentrační závislosti PG

Koncentrační závislosti PG byly proměřeny v mobilní fázi 0,01 mol·dm<sup>-3</sup> fosfátový pufr pH 4 - methanol (50 %, V/V) pro HPLC-ED a HPLC-UV v rozmezí koncentrací 1·10<sup>-4</sup> mol·dm<sup>-3</sup> až 1·10<sup>-7</sup> mol·dm<sup>-3</sup>.

Kalibrační závislosti jsou lineární v celé měřené oblasti koncentrací, korelační koeficient se pohybuje v intervalu 0,9947 až 0,9872 pro HPLC-UV a 0,9980 až 0,9886 pro HPLC-ED. Směrnice logaritmických závislostí linearitu potvrzují, jelikož se jejich hodnoty blíží jedné. Mez detekce 0,39·10<sup>-7</sup> mol·dm<sup>-3</sup> dosažená při HPLC-ED je při porovnání meze detekce dosažené metodou DPV (0,61·10<sup>-7</sup> mol·dm<sup>-3</sup>) obdobná, ale korelační koeficienty nedosahují tak dobrých hodnot jako při DPV. U HPLC-UV byla mez detekce stanovena pouze na 4,95·10<sup>-7</sup> mol·dm<sup>-3</sup> a ukazuje se pro stanovení PG nejméně vhodnou. Co se týče časové náročnosti, je použití DPV výhodnější, kdy jedna analýza probíhá v řádech vteřin oproti HPLC, kde se dostáváme do řádů minut.

Parametry kalibračních přímek jsou uvedeny v tab. 6 pro HPLC-UV a v tab. 7 pro HPLC-ED. Parametry přímky v celém koncentračním rozmezí v logaritmické formě jsou uvedeny v tab. 8. Chromatogramy PG v koncentračním rozmezí 1·10<sup>-4</sup> – 2·10<sup>-5</sup> mol·dm<sup>-3</sup>, 1·10<sup>-5</sup> – 2·10<sup>-6</sup> mol·dm<sup>-3</sup> získané pomocí HPLC-UV jsou uvedeny na obr. 16 a 18, kalibrační přímky jsou ukázány na obr. 17 a 19. Chromatogramy získané pomocí HPLC-ED jsou uvedeny na obr. 20, 22 a 24 a příslušné kalibrační přímky na obr. 21, 23 a 25. Logaritmické závislosti jsou uvedeny na obr. 26 pro HPLC-UV a na obr. 27 pro HPLC-ED.

**Tab. 6**

Parametry kalibračních přímek stanovení PG metodou HLPC-UV, vlnová délka 280 nm, mobilní fáze 0,01 mol·dm<sup>-3</sup> fosfátový pufr pH 4 – MeOH (50 %, V/V), kolona LiChroCART® 125-4, Superspher 100, RP-18, F<sub>m</sub> = 1,0 ml·min<sup>-1</sup>, dávkováno 10 µl, vyhodnoceno z výšek píků.

c [mol·dm <sup>-3</sup> ]	úsek [mAU]	směrnice [mAU·mol <sup>-1</sup> ·dm <sup>3</sup> ]	korelační koeficient	L <sub>D</sub> [mol·dm <sup>-3</sup> ]
1·10 <sup>-5</sup> – 1·10 <sup>-4</sup>	-6,87	13,68	0,9872	----
6·10 <sup>-7</sup> – 1·10 <sup>-5</sup>	0,15	0,99	0,9879	4,95·10 <sup>-7</sup>

**Tab. 7**

Parametry kalibračních přímek stanovení PG metodou HLPC-ED, E = +0,8 V, mobilní fáze 0,01 mol·dm<sup>-3</sup> fosfátový pufr pH 4 - MeOH (50 %, V/V), kolona LiChroCART® 125-4, Superspher 100, RP-18, F<sub>m</sub> = 1,0 ml·min<sup>-1</sup>, dávkováno 10 µl, vyhodnoceno z výšek píků.

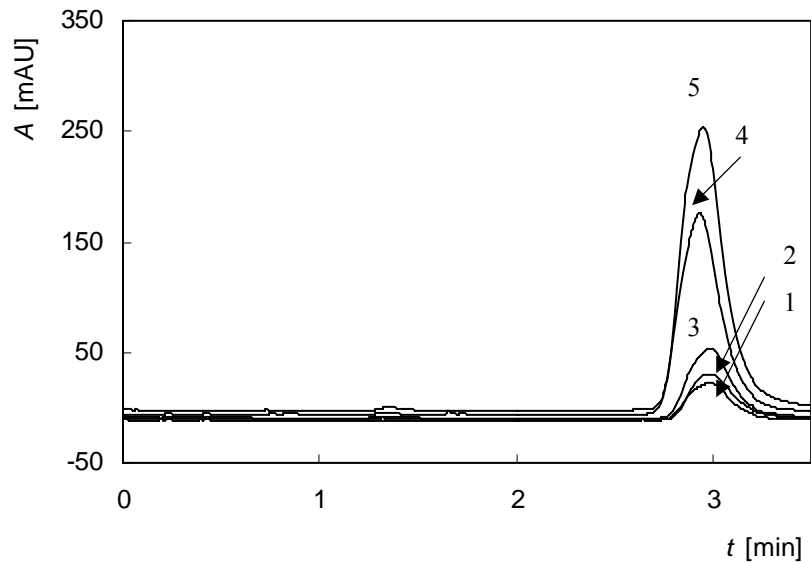
c [mol·dm <sup>-3</sup> ]	úsek [nA]	směrnice [mA·mol <sup>-1</sup> ·dm <sup>3</sup> ]	korelační koeficient	L <sub>D</sub> [mol·dm <sup>-3</sup> ]
1·10 <sup>-5</sup> – 1·10 <sup>-4</sup>	-18,1	25,34	0,9941	----
1·10 <sup>-6</sup> – 1·10 <sup>-5</sup>	-0,03	1,67	0,9980	----
1·10 <sup>-7</sup> – 1·10 <sup>-6</sup>	0,09	0,29	0,9966	0,39·10 <sup>-7</sup>



**Tab. 8**

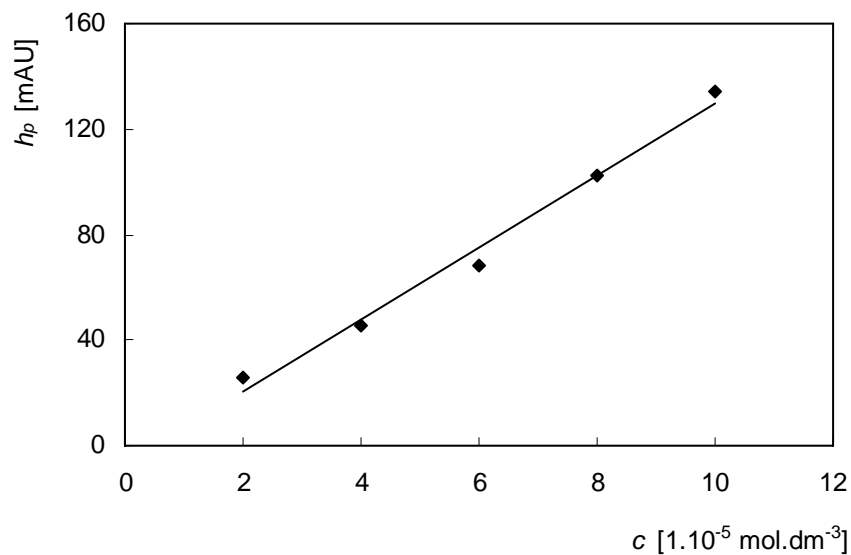
Parametry kalibrační přímky v celém koncentračním rozmezí v logaritmické formě stanovení PG metodou HLPC-ED,  $E = +0,8$  V a HPLC-UV, vlnová délka 280 nm; mobilní fáze  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  fosfátový pufr pH 4 - MeOH (50 %, V/V), kolona LiChroCART<sup>®</sup> 125-4, Superspher 100, RP-18,  $F_m = 1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ; dávkováno  $10 \mu\text{l}$ , vyhodnoceno z výšek píků.

metoda	$c \text{ [mol}\cdot\text{dm}^{-3}]$	úsek	směrnice	korelační koeficient
HPLC-UV	$6\cdot 10^{-7} - 1\cdot 10^{-4}$	6,15	1,02	0,9947
HPLC-ED	$1\cdot 10^{-7} - 1\cdot 10^{-4}$	5,84	0,90	0,9886



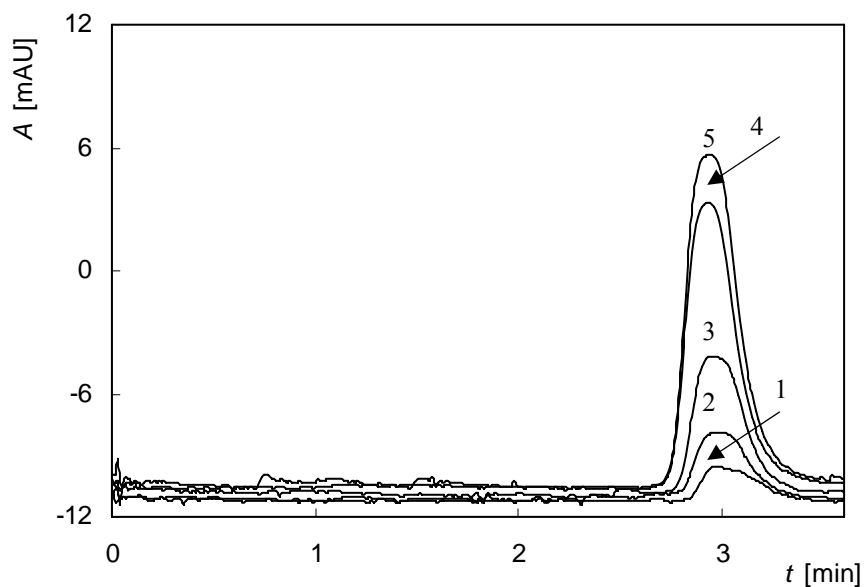
**Obr. 16**

HPLC chromatogram PG v mobilní fázi 0,01 mol·dm<sup>-3</sup> fosfátový pufr pH 4 – methanol (50 %, V/V), kolona LiChroCART<sup>®</sup> 125-4, Superspher 100, RP-18,  $F_m = 1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , dávkováno 10  $\mu\text{l}$ , UV detekce,  $\lambda = 280 \text{ nm}$ ,  $c(\text{PG}) = 2\cdot 10^{-5}$  (1);  $4\cdot 10^{-5}$  (2);  $6\cdot 10^{-5}$  (3);  $8\cdot 10^{-5}$  (4);  $1\cdot 10^{-4}$  (5) mol·dm<sup>-3</sup>.



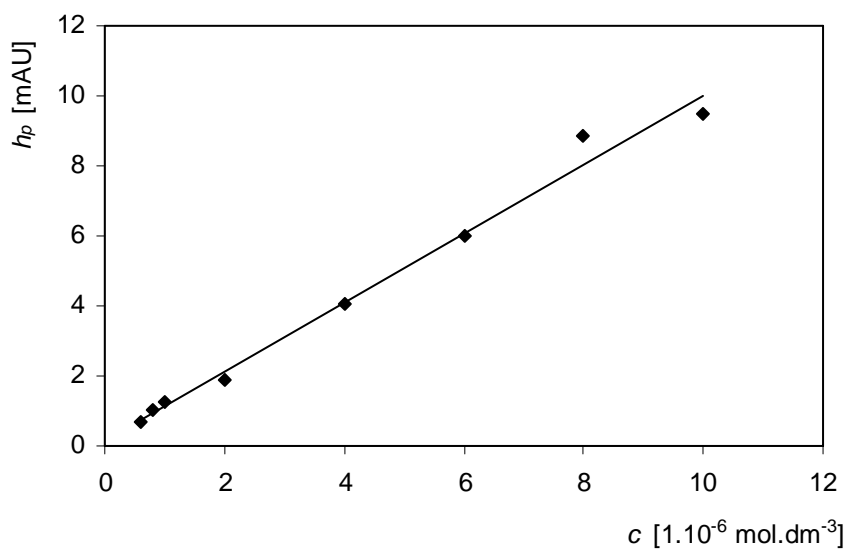
**Obr. 17**

Závislosti výšky píku ( $h_p$ ) na koncentraci PG, koncentrační rozmezí  $(2 - 10)\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , mobilní fáze 0,01 mol·dm<sup>-3</sup> fosfátový pufr pH 4 – methanol (50 %, V/V), kolona LiChroCART<sup>®</sup> 125-4, Superspher 100, RP-18,  $F_m = 1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , dávkováno 10  $\mu\text{l}$ , UV detekce,  $\lambda = 280 \text{ nm}$ .



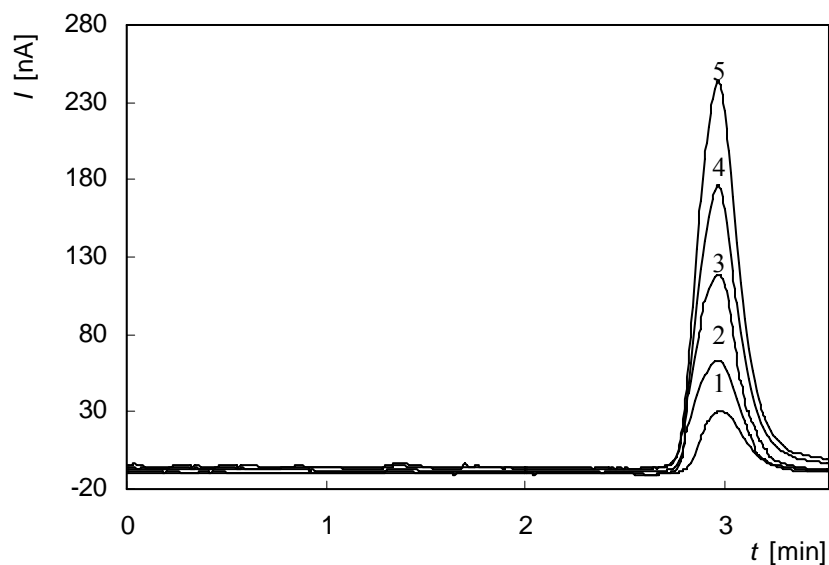
**Obr. 18**

HPLC chromatogram PG v mobilní fázi 0,01 mol·dm<sup>-3</sup> fosfátový pufr pH 4 – methanol (50 %, V/V), kolona LiChroCART<sup>®</sup> 125-4, Superspher 100, RP-18,  $F_m = 1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , dávkováno 10  $\mu\text{l}$ , UV detekce,  $\lambda = 280 \text{ nm}$ ,  $c(\text{PG}) = 2\cdot 10^{-6}$  (1);  $4\cdot 10^{-6}$  (2);  $6\cdot 10^{-6}$  (3);  $8\cdot 10^{-6}$  (4);  $1\cdot 10^{-5}$  (5) mol·dm<sup>-3</sup>.



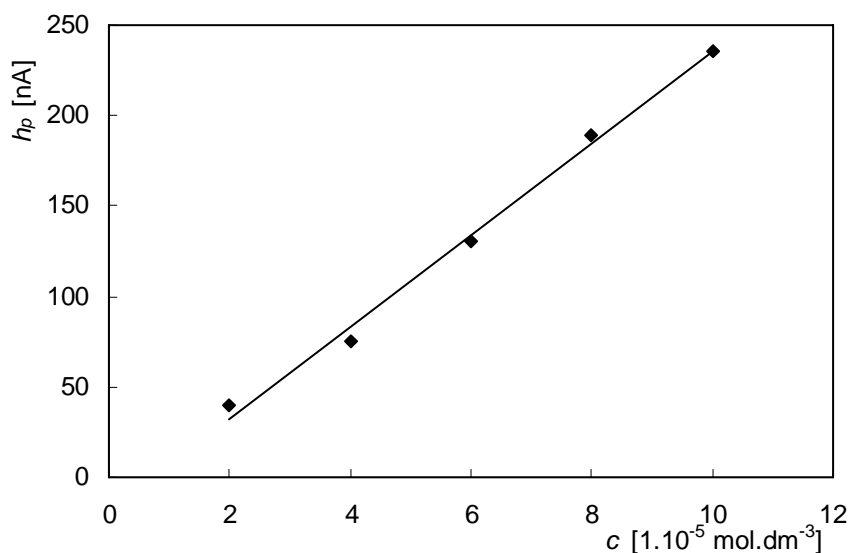
**Obr. 19**

Závislosti výšky píku ( $h_p$ ) na koncentraci PG, koncentrační rozmezí  $(0,6 - 10)\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , mobilní fáze 0,01 mol·dm<sup>-3</sup> fosfátový pufr pH 4 – methanol (50 %, V/V), kolona LiChroCART<sup>®</sup> 125-4, Superspher 100, RP-18,  $F_m = 1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , dávkováno 10  $\mu\text{l}$ , UV detekce,  $\lambda = 280 \text{ nm}$ .



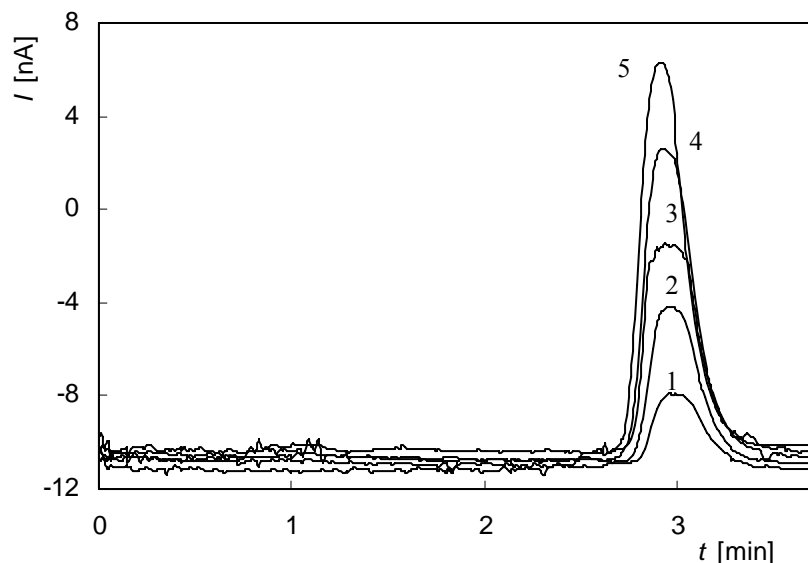
**Obr. 20**

HPLC chromatogram PG v mobilní fázi 0,01 mol·dm<sup>-3</sup> fosfátový pufr pH 4 – methanol (50 %, V/V), kolona LiChroCART<sup>®</sup> 125-4, Superspher 100, RP-18,  $F_m = 1,0$  ml·min<sup>-1</sup>, dávkováno 10  $\mu$ l, elektrochemická detekce s CPE,  $E = +0,8$  V,  $c$  (PG) =  $2 \cdot 10^{-5}$  (1);  $4 \cdot 10^{-5}$  (2);  $6 \cdot 10^{-5}$  (3);  $8 \cdot 10^{-5}$  (4);  $1 \cdot 10^{-4}$  (5) mol·dm<sup>-3</sup>.



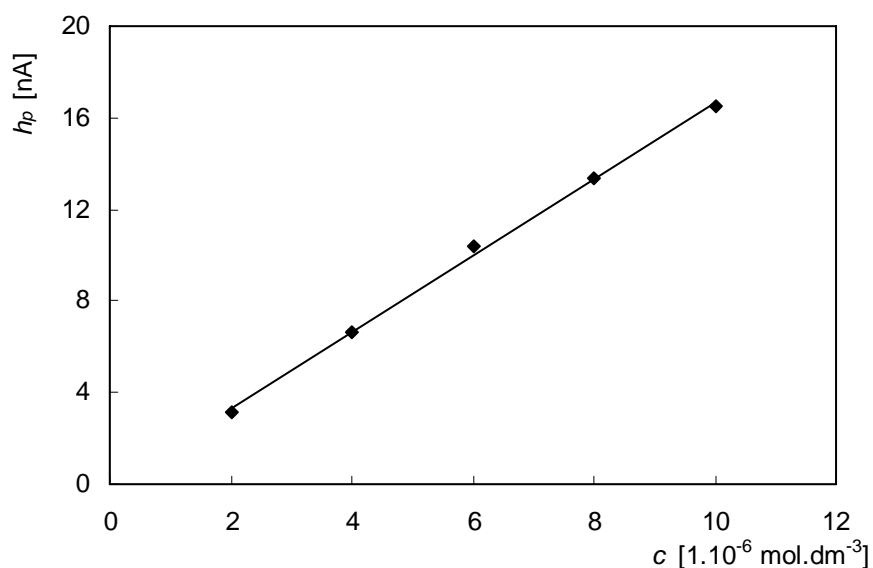
**Obr. 21**

Závislost výšky píku  $h_p$  na koncentraci PG, koncentrační rozmezí  $(2 - 10) \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, mobilní fáze 0,01 mol·dm<sup>-3</sup> fosfátový pufr pH 4 – methanol (50 %, V/V), kolona LiChroCART<sup>®</sup> 125-4, Superspher 100, RP-18,  $F_m = 1$  ml·min<sup>-1</sup>, dávkováno 10  $\mu$ l, elektrochemická detekce s CPE,  $E = +0,8$  V.



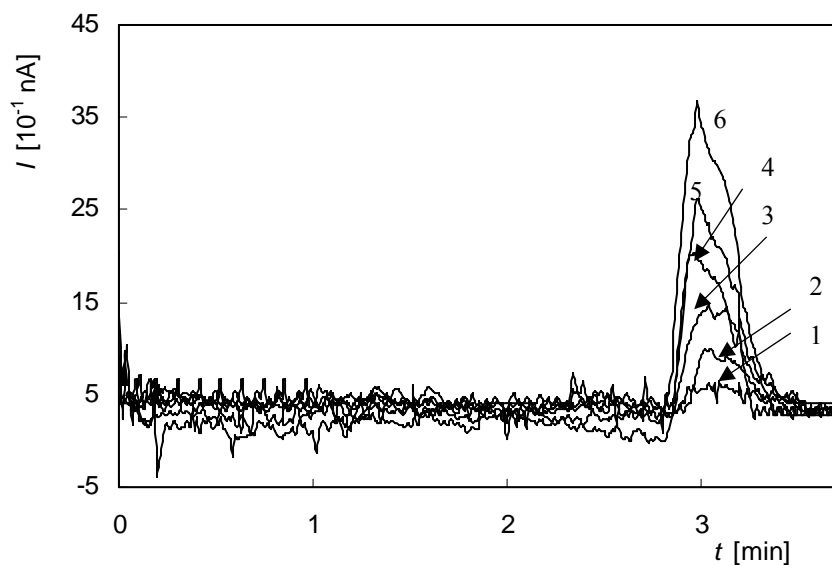
**Obr. 22**

HPLC chromatogram PG v mobilní fázi  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  fosfátový pufr pH 4 – methanol (50 %, V/V), kolona LiChroCART<sup>®</sup> 125-4, Superspher 100, RP-18,  $F_m = 1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , dávkováno  $10 \mu\text{l}$ , elektrochemická detekce s CPE,  $E = +0,8 \text{ V}$ ,  $c(\text{PG}) = 2\cdot 10^{-6}$  (1);  $4\cdot 10^{-6}$  (2);  $6\cdot 10^{-6}$  (3);  $8\cdot 10^{-6}$  (4);  $1\cdot 10^{-5}$  (5)  $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ .



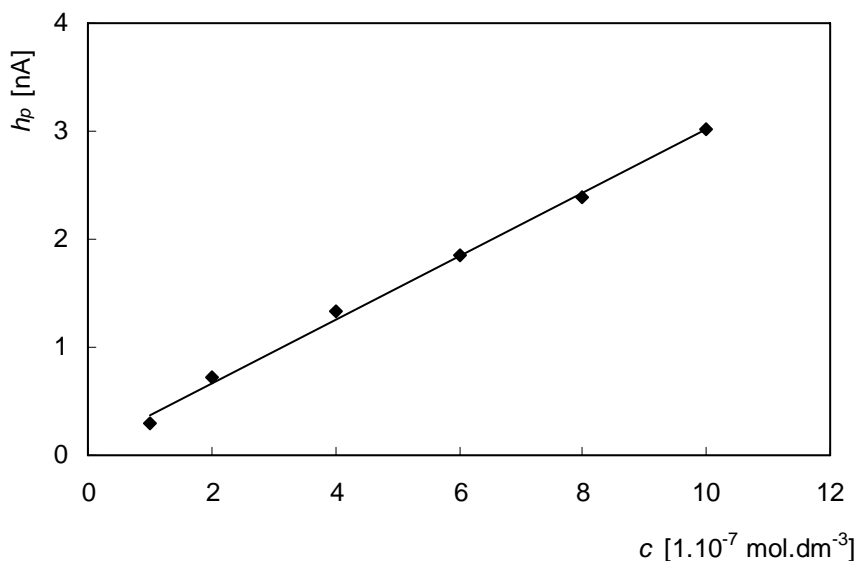
**Obr. 23**

Závislost výšky píku  $h_p$  na koncentraci PG, koncentrační rozmezí  $(2 - 10)\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , mobilní fáze  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  fosfátový pufr pH 4 – methanol (50 %, V/V), kolona LiChroCART<sup>®</sup> 125-4, Superspher 100, RP-18,  $F_m = 1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , dávkováno  $10 \mu\text{l}$ , elektrochemická detekce s CPE,  $E = +0,8 \text{ V}$ .



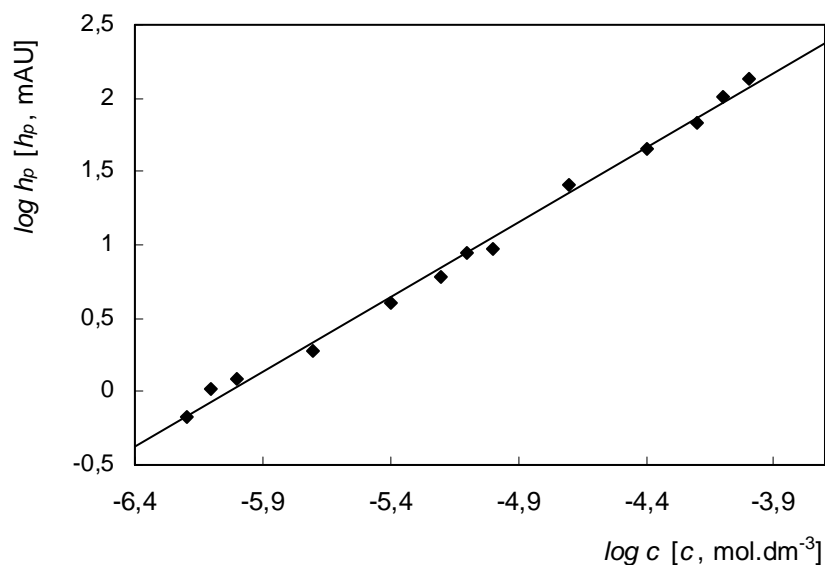
**Obr. 24**

HPLC chromatogram PG v mobilní fázi  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  fosfátový pufr pH 4 – methanol (50 %, V/V), kolona LiChroCART<sup>®</sup> 125-4, Superspher 100, RP-18,  $F_m = 1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , dávkováno  $10 \mu\text{l}$ , elektrochemická detekce s CPE,  $E = +0,8 \text{ V}$ ,  $c(\text{PG}) = 1\cdot 10^{-7}$  (1);  $2\cdot 10^{-7}$  (2);  $4\cdot 10^{-7}$  (3);  $6\cdot 10^{-7}$  (4);  $8\cdot 10^{-7}$  (5);  $1\cdot 10^{-6}$  (6)  $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ .



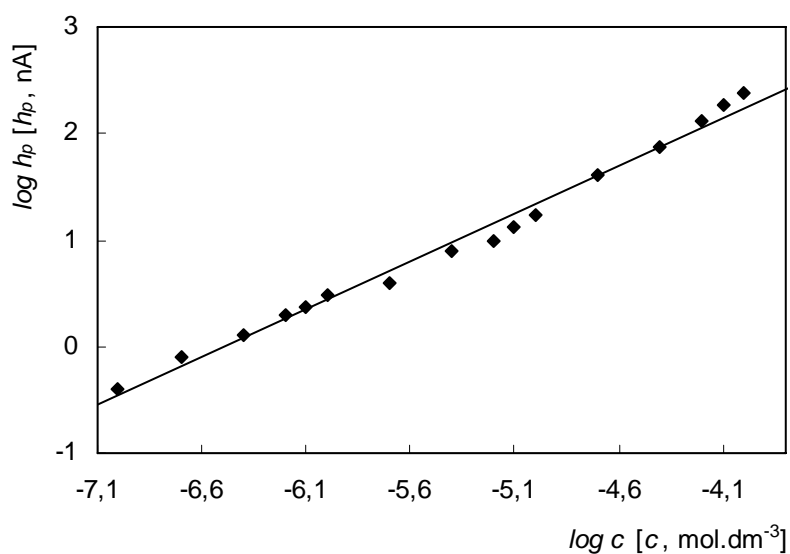
**Obr. 25**

Závislost výšky píku  $h_p$  na koncentraci PG, koncentrační rozmezí  $(1 - 10)\cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , mobilní fáze  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  fosfátový pufr pH 4 – methanol (50 %, V/V), kolona LiChroCART<sup>®</sup> 125-4, Superspher 100, RP-18,  $F_m = 1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , dávkováno  $10 \mu\text{l}$ , elektrochemická detekce s CPE,  $E = +0,8 \text{ V}$ .



**Obr. 26**

Logaritmičká závislost výšky píku ( $h_p$ ) na koncentraci PG, koncentrační rozmezí  $1\cdot 10^{-4}$  -  $6\cdot 10^{-7}$  mol·dm<sup>-3</sup>, mobilní fáze 0,01 mol·dm<sup>-3</sup> fosfátový pufr pH 4 – methanol (50 %, V/V), kolona LiChroCART® 125-4, Superspher 100, RP-18,  $F_m = 1$  ml·min<sup>-1</sup>, dávkováno 10  $\mu$ l, UV detekce,  $\lambda = 280$  nm.



**Obr.27**

Logaritmičká závislost výšky píku  $h_p$  na koncentraci PG, koncentrační rozmezí  $1\cdot 10^{-4}$  -  $1\cdot 10^{-7}$  mol·dm<sup>-3</sup>, mobilní fáze 0,01 mol·dm<sup>-3</sup> fosfátový pufr pH 4 – methanol (50 %, V/V), kolona LiChroCART® 125-4, Superspher 100, RP-18,  $F_m = 1$  ml·min<sup>-1</sup>, dávkováno 10  $\mu$ l, elektrochemická detekce s CPE,  $E = +0,8$  V.

## 5. Stanovení PG v reálném vzorku

### 5.1 Extrakce PG z modelového vzorku

Pro ověření účinnosti extrakčního postupu<sup>7</sup> extrakce PG z modelového vzorku oleje do methanolu byly připraveny vzorky o koncentraci PG  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  ( $95,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  ( $47,8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  ( $9,55 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),  $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  ( $4,78 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), které byly porovnány se vzorky o téže koncentraci připravenými ze zásobního roztoku PG. Výtěžek extrakce byl ověřen pomocí DPV vyhodnocením z výšek píků. Výsledky jsou uvedeny v tab. 9.

**Tab. 9**

Výsledky výtěžku extrakce PG z reálného vzorku oleje.

koncentrace [ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]	DPV [%]
$1 \cdot 10^{-5}$	97
$5 \cdot 10^{-6}$	98
$1 \cdot 10^{-6}$	97
$5 \cdot 10^{-7}$	95



## 5.2 Stanovení PG v reálném vzorku

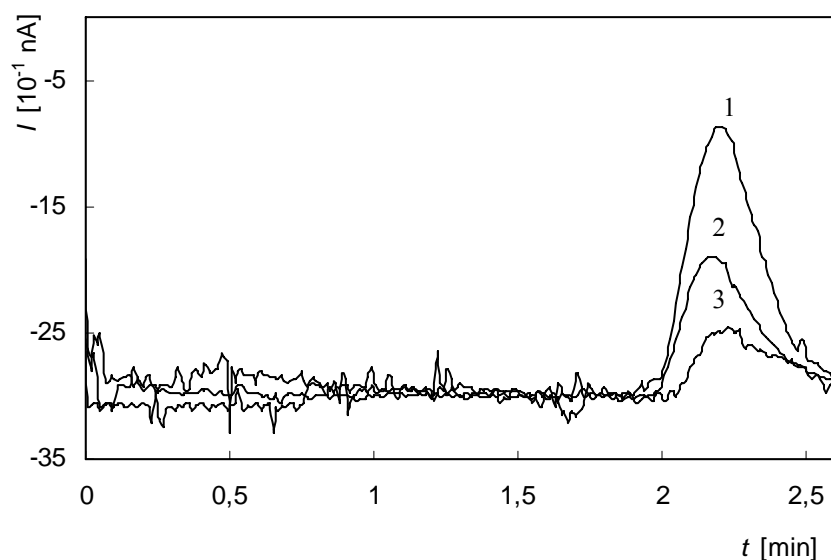
Pro stanovení koncentrace PG v reálném vzorku byla použita metoda standardního přídávku. Vzorky byly analyzovány metodou DPV a HPLC-ED na CPE. Při použití těchto dvou metod byla vypočítána shodná koncentrace PG v reálném vzorku. Povolené množství PG v oleji je do 200 mg·kg<sup>-1</sup> oleje. Zjištěná koncentrace PG v reálném vzorku odpovídá 3,2 mg·kg<sup>-1</sup> oleje a je tedy v souladu s limity. Hodnoty stanovených koncentrací se liší relativní směrodatnou odchylkou. U HPLC-ED činí relativní směrodatná odchylka pouze 3,43 %, naopak u DPV 9,43 %.

Stanovené množství PG a statistické vyhodnocení jsou uvedeny v tab. 10. Na obr. 28 jsou znázorněny chromatogramy PG, resp. na obr. 30 voltamogramy PG. Na obr. 29 (31) jsou pak zobrazeny koncentrační závislosti PG.

**Tab. 10**

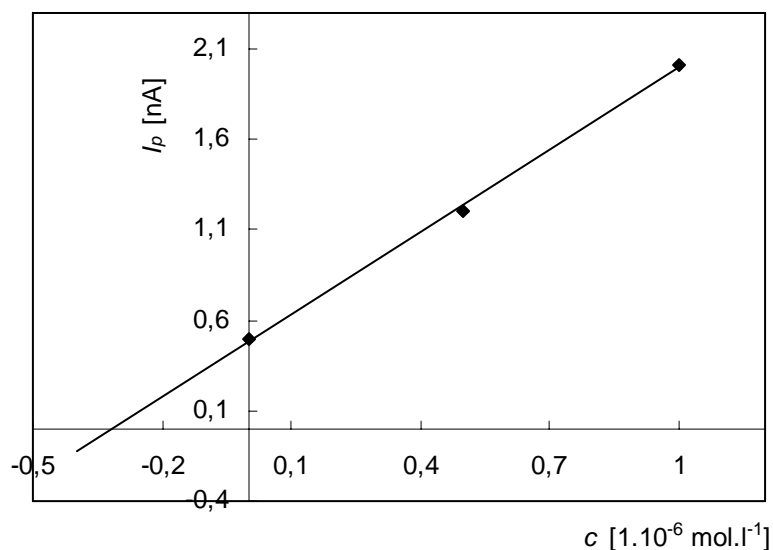
Výsledky stanovení PG v reálném vzorku oleje metodou DPV a HPLC-ED a statistické vyhodnocení.

metoda	DPV	HPLC-ED
Stanovená		
koncentrace PG v oleji [mg·kg <sup>-1</sup> ]	<b>3,20</b>	<b>3,29</b>
<i>s</i> [mg·kg <sup>-1</sup> ]	0,32	0,12
<i>s<sub>r</sub></i> [%]	9,43	3,43
<i>L<sub>1,2</sub></i> [± mg·kg <sup>-1</sup> ]	0,32	0,12



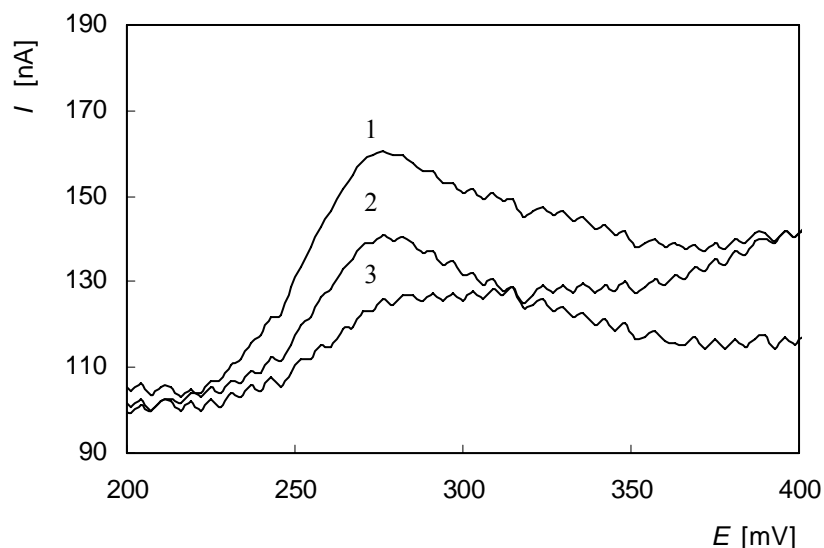
**Obr. 28**

HPLC chromatogramy PG v mobilní fázi  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  fosfátový pufr pH 4 – MeOH (50 %, V/V), kolona LiChroCART<sup>®</sup> 125-4, Superspher 100, RP-18,  $F_m = 1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , dávkováno  $10 \mu\text{l}$ , elektrochemická detekce s CPE,  $E = +0,8 \text{ V}$ , vzorek + standardní přídavek  $1\cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  zásobního roztoku PG (1); vzorek + standardní přídavek  $5\cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  zásobního roztoku PG (2); vzorek bez přídavku (3).



**Obr. 29**

Stanovení koncentrace PG v reálném vzorku metodou standardního přídavku. Vyhodnoceno z výšek píku, měřeno metodou HPLC, mobilní fáze  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  fosfátový pufr pH 4 - MeOH (50 %, V/V), kolona LiChroCART<sup>®</sup> 125-4, Superspher 100, RP-18,  $F_m = 1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , dávkováno  $10 \mu\text{l}$ , elektrochemická detekce s CPE,  $E = +0,8 \text{ V}$ .

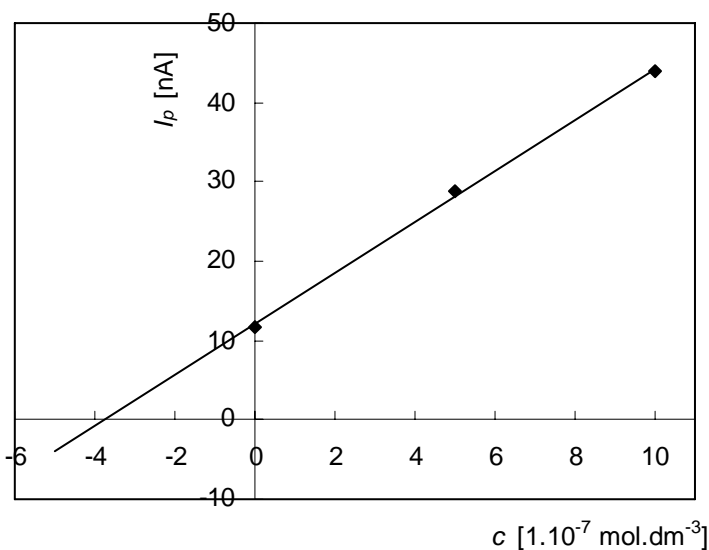


**Obr. 30**

Voltamogramy PG v prostředí BR pufru (pH 5) a methanolu (20 %, V/V), měřeno metodou DPV na CPE;

vzorek + standardní přídavek  $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  zásobního roztoku PG (1);

vzorek + standardní přídavek  $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  zásobního roztoku PG (2); vzorek bez přídavku (3).



**Obr. 31**

Stanovení koncentrace PG v reálném vzorku metodou standardního přídavku. Vyhodnoceno z výšek píků, měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru (pH 5) a methanolu (20 %, V/V).

## 6. Závěr

Bylo prostudováno chování propylgallátu metodami DPV, HPLC-UV a HPLC-ED za použití uhlíkové pastové elektrody.

Metodou DPV na CPE v prostředí methanolu (20 %, V/V) a BR pufru byly naměřeny voltametrické křivky propylgallátu v závislosti na pH. Při optimálním pH 5 byly naměřeny kalibrační závislosti a stanovena mez detekce. Metodami HPLC-UV a HPLC-ED v mobilní fázi o složení 0,01 mol·dm<sup>-3</sup> fosfátový pufr pH 4 - MeOH (50 %, V/V) a potenciálu pracovní elektrody +0,8 V byly naměřeny kalibrační závislosti a stanoveny meze detekce. V tab. 11 jsou uvedeny stanovené meze detekce použitých metod.

**Tab. 11**

Souhrnné srovnání mezí detekce PG metodami DPV, HPLC-ED a HPLC-UV.

metoda	DPV	HPLC-ED	HPLC-UV
$L_D$ [mol·dm <sup>-3</sup> ]	$0,61 \cdot 10^{-7}$	$0,39 \cdot 10^{-7}$	$4,95 \cdot 10^{-7}$

Z tabulky dosažených mezí detekce je patrné, že nejméně citlivou a vhodnou metodou pro stanovení PG je HPLC s UV detekcí. Výsledky dosažené jak DPV, tak HPLC-ED na uhlíkové pastové elektrodě jsou obdobné.

Závěr diplomové práce byl věnován stanovení propylgallátu v reálném vzorku. Jako reálný vzorek byl vybrán rostlinný olej. Bylo ověřeno, že se podařilo vyextrahovat veškeré množství propylgallátu ze vzorku oleje do methanolu. Pro stanovení přesného množství propylgallátu v reálném vzorku byla použita metoda standardního přídatku. Křivky byly naměřeny metodami DPV a HPLC-ED. V tab. 12 jsou uvedeny vypočítané hodnoty, které nepřekračují povolené limity PG v oleji. Jelikož mez detekce pro HPLC-UV není dostatečná pro stanovení PG v reálném vzorku, nebyla pro toto stanovení použita.

**Tab. 12**

Souhrnné srovnání stanoveného množství PG v oleji metodami DPV a HPLC-ED na CPE.

metoda	DPV	HPLC-ED
koncentrace PG v oleji [mg·kg <sup>-1</sup> ]	3,20 ± 0,32	3,29 ± 0,12

## 7. Použitá literatura

1. Youngson, R.: *Antioxidanty*. Praha, Jota 1995.
2. Müllerová, D.: *Zdravá výživa a prevence civilizačních nemocí ve schématech*. Praha, Triton 2003.
3. Velíšek, J.: *Chemie potravin 3*. Tábor, Osis 2002.
4. Klescht, V.; Hrnčíříková, I.; Mandelová, L.: *Éčka v potravinách*. Brno, Computer Press 2007.
5. Pokorný, J.; Schmidt, Š.: Trendy použití přírodních antioxidantů pro stabilizaci tuků a olejů proti oxidačnímu žluknutí. *Vitaminy 2003 – Přírodní antioxidanty a volné radikály*. Pardubice 2003. [www.vitamins.cz](http://www.vitamins.cz) (23.3.2010)
6. Murray, R.K.; Granner, D.K.; Mayes, P.A.; Rowell, V.W.: *Harperova biochemie*, 23. vyd. (4. české vyd.) Jinočany, Nakladatelství H+H 2002.
7. Saad, B.; Sing, Y.Y.; Nawi, M.A.; Hashim, N.; Ali, A.S.M.; Saleh, M.S.; Salaiman, S.F.; Talib, K.M.; Ahmad, K.: Determination of synthetic phenolic antioxidants in food items using reversed-phase HPLC. *Food chemistry* **105**, 389-394 (2007).
8. Diaz, T.G.; Cobanillas, A.G.; Franco, M.F.A.; Salina, F.; Viré, J.C.: Voltammetric behavior and simultaneous determination of antioxidants propyl gallate, butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluen in acidic acetonitrile-water medium using PLS calibration. *Electroanalysis* **7**, 497-505 (1998).
9. Štípek, S. a kolektiv. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. Praha, Grada 2000.
10. Zurita, J.L.; Jobs, Á.; Peso, A.; Salguero, M.; López-Artíguez, M.; Repetto, G.: Ecotoxicological effect of the antioxidant additive propyl gallate in five aquatic systems. *Water Research* **41**, 2599-2611 (2007).
11. Vyhláška č. 4/2008 Sb. Ministerstva zdravotnictví, ze dne 3. ledna 2008, kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. [www.sagit.cz](http://www.sagit.cz). (3.4.2010)
12. *Seznam barviv, konzervantů, emulgátorů a přídatných látek*. [www.emulgatory.cz](http://www.emulgatory.cz). (3.4.2010)

13. Raymundo, M.S.; Paula, M.M.S.; Franco, C.; Fett, R.: Quantitative determination of the phenolic antioxidants using voltammetric techniques. *LWT* **40**, 1133-1139 (2007).
14. Machalo, N.F.L.; Calheiros, R.; Gaspar, A.; Garrido, J.; Borgis, F.; Marques, M.P.M.: Antioxidant phenolic esters with potential anticancer activity: solution equilibria studied by Raman spectroscopy. *J. Raman Spectroscopy* **40**, 80-85 (2009).
15. Guan, Y.; Chu, Q.; Fu, L.; Ye, J.: Determination of antioxidants in cosmetics by micellar electrokinetic capillary chromatography with electrochemical detection. *Journal of chromatography A* **1074**, 201-204 (2005).
16. Perez, A.; Basketter, D.A.; White, I.R.; McFadden, J.: Positive rates to propyl gallate on patch testing: a change in trend. *Contact Dermatitis* **58**, 47-48 (2008).
17. *Databáze éček*. [www.bezkonzervantu.cz](http://www.bezkonzervantu.cz) (5.4.2010)
18. Krmensík, P.: *Éčka (nejen) v potravinách*. [www.biotox.cz](http://www.biotox.cz) (5.4.2010)
19. Gunckel, S.; Santander, P.; Cordano, G.; Ferreira, J.; Munoz, S.; Nunez-Vergara, L.J.; Squella, J.A.: Antioxidant activity of gallates: an electrochemical study in aqueous media. *Chemico-Biological Interactions* **114**, 45-59 (1998).
20. Diany, Q.; Gao, Y.; Xu, Y.; Wang, E.: Capillary electrophoresis-amperometric determination of antioxidant propyl gallate and butylated hydroxyanisole in foods. *Analytical Sciences* **23**, 713-717 (2007).
21. Takemoto, E.; Teixeira Filho, J.; Teixeira, G.H.: Validation of methodology for the simultaneous determination of synthetic antioxidants in vegetable oil, margarine and hydrogenated fats by HPLC/UV. *Quimica Nova* **32**, 1189-1194 (2009).
22. Hongcheng, L.; Qiwan, L.; Zhu, E.; Jiafu, L.; Tingshu, Y.: Matrix solid phase extraction – HPLC determine in oil antioxidant. *Shipin Kexue* **28**, 253-255 (2007). *CA* **149**:244513.
23. Ruiz, M.A.; Garcia-Moreno, E.; Barbar, C.: Determination of phenolic antioxidants by HPLC with amperometric detection at a nickel phthalocyanine polymer modified electrode. *Electroanalysis* **11**, 470-474 (1999).
24. Perrin, Ch.; Meyer, L.: Quantification of synthetic phenolic antioxidants in dry foods by reversed-phase HPLC with photodiode array detection. *Food Chemistry* **77**, 93-100 (2002).

25. Tamao, S.; Kyouko, O.; Takamitsu, M.; Mie, N.; Yutaka, F.; Masashi, Y.; Yoshihiro, S.; Osamu, Y.; Shunji, M.; Hiroyuki, H.: Study of simultaneous analysis methods for phenolic antioxidants by HPLC. *Hiroshima-shi Eisei Kenkyusho Nenpo* **22**, 40-43 (2002). *CA* **141**:365235.
26. Xiu-Qin, L.; Chao, J.; Yan-Yan, S.; Min-Li, Y.; Xiao-Gang, Ch.: Analysis of synthetic antioxidants and preservatives in edible oil by HPLC/TOF-MS. *Food chemistry* **113**, 692-700 (2009).
27. Tsuji, S.; Nakano, M.; Terada, H.; Tamura, Y.; Tonogai, Y.: Determination and confirmation of five phenolic antioxidants in foods by LC/MS and GC/MS. *J. Food Hyg. Soc. Japan* **46**, 63-71 (2005).
28. García-Jiménez, J.F.; Valencia, M.C.; Capitán-Vallvey, L.F.: Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweetener additives in food and cosmetics by flow injection analysis coupled to a monolithic column. *Analytica Chimica Acta* **594**, 226-233 (2007).
29. Riber, J.; de la Fuente, C.; Vazquez, M.D.; Tascón, M.L.; Sánchez Batanero, P.: Electrochemical study of antioxidants at a polypyrrole electrode modified by a nickel phtalocyanine complex. Application to their HPLC separation and to their FIA system detections. *Talanta* **52**, 241-252 (2000).
30. Lague, M.; Rios, A.; Valcarcel, M.: A poly(vinyl chloride) graphite composite electrode for flow-injection amperometric determination of antioxidants. *Analytica Chimica Acta* **395**, 217-223 (1999).
31. Ceballos, C.; Fernández, H.: Synthetic antioxidants determination in lard and vegetable oils by use of voltammetric methods on disk ultramicroelectrodes. *Food Research International* **33**, 357-365 (2000).
32. García-Jiménez, J.F.; Valencia, M.C.; Capitán-Vallvey, L.F.: Simultaneous determination of three antioxidants in food and cosmetics by flow injection coupled to an ultra-short monolithic column. *Journal of Chromatographic Science* **47**, 485-491 (2009).
33. Capitán-Vallvey, L.F.; Valencia, M.C.; Arana Nicolás, E.: Simple resolution of butylated hydroxyanisole and n-propyl gallate in fatty foods and cosmetics samples by flow-injection solid-phase spectrophotometry. *Journal of food science* **68**, 1595-1599 (2003).



34. Český lékopis 1997. [www.lekopis.cz/default.htm](http://www.lekopis.cz/default.htm) (23.2.2010)
35. Adams, R.N.: Carbon paste electrodes. *Analytical Chemistry* **30**, 1576 (1958).
36. Zima, J.: Využití uhlíkových pastových elektrod v analýze léčiv a toxických látek. *Klinická a toxikologická analýza*, VŠCHT, Praha 2008.
37. Švancara, I.; Ogorevc, B.; Hočevar, S.B.; Vytřas, K.: Perspectives of carbon paste electrodes in stripping potentiometry. *Analytical Sciences* **18**, 301-305 (2002).
38. Švancara, I.; Vytřas, K.: Příprava a vlastnosti uhlíkových pastových elektrod. *Chemické Listy* **88**, 138-146 (1994).
39. Kuwana, T.; French, W.G.: Electrooxidation or reduction of organic compounds into aqueous solution using carbon paste electrode. *Analytical Chemistry* **36**, 241-242 (1964).
40. Vytřas, K.; Švancara, I.: Aplikace uhlíkových pastových elektrod v elektroanalýze. *Chemické listy* **88**, 412-422 (1994).
41. Švancara, I.; Vytřas, K.; Barek, J.; Zima, J.: Carbon paste electrodes in modern electroanalysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **31**, 311-345 (2001).
42. Sýkora, V.; Zátka, V.: *Příruční tabulky pro chemiky*. SNTL, Praha 1967.
43. Švancara, I., Metelka, R., Vytřas, K.: *Sensing in Electroanalysis*, Vol. 1, (Eds: Vytřas, K.; Kalcher, K.), University of Pardubice, Pardubice 2005.