

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie

Stanovení karvakrolu pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí

Bakalářská práce
studijního oboru Klinická a toxikologická analýza

Praha 2010

Jana Mužíková

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky Mgr. Hany Dejmkové, a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

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

V Praze dne

.....

Podpis

Ráda bych poděkovala své školitelce Mgr. Hance Dejmkové za skvělé vedení mé práce. Děkuji ji za poskytnuté rady a připomínky k mé práci, a hlavně za čas, který mi věnovala.

Dále bych ráda poděkovala své rodině za podporu, kterou mi poskytovala během celého studia.

Tato bakalářská práce vznikla s finanční podporou MŠMT ČR (projekt MSM0021620857, RP14/63 a LC06O35).

Abstrakt

Tato práce se zabývá stanovením karvakrolu ve směsi s eugenolem a thymolem pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí. Jako pracovní elektroda byla použita uhlíková pastová elektroda. K separaci byly použity kolony Kromasil-C18, 250x4,6 mm. Pro srovnání byla ještě vedle elektrochemické detekce použita UV spektrofotometrická detekce při vlnové délce 275 nm. Byly stanoveny optimální podmínky separace: mobilní fáze složená z acetonitrilu a fosforečnanového pufru v poměru 60:40, optimální pH pufru bylo pH 4. Jako optimální potenciál pracovní elektrody při elektrochemické detekci byl nalezen potenciál +1,1 V. Na základě získaných informací byly proměřeny kalibrační závislosti, ze kterých byly zjištěny meze stanovitelnosti. Mez stanovitelnosti pro karvakrol byla $9,6 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ při použití UV spektrofotometrické detekce a $4,0 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ při použití elektrochemické detekce.

Klíčová slova:

eugenol

elektrochemická detekce

karvakrol

thymol

uhlíková pastová elektroda

UV spektrofotometrická detekce

vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Abstract

This thesis deals with determination of a mixture of carvacrol with thymol and eugenol by HPLC with electrochemical detection. Carbon paste electrode was used as the working electrode. The separation was performed on Kromasil-C18, 250x4,6 mm column. For the comparison, UV spectrophotometric detection at 275 nm was used besides electrochemical detection. Optimal separation conditions were found: mobile phase consisting of acetonitrile and phosphate buffer in ratio 60:40, the optimal buffer pH was pH 4. As the optimum potential of working electrode during electrochemical detection, potential +1.1 V was found. Under the obtained optimal conditions, calibration dependences were measured. Limit of quantification for carvacrol was found to be $9,6 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ using UV spectrophotometric detection and $4,0 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ using electrochemical detection.

Key words:

eugenol

electrochemical detection

carvacrol

thymol

carbon paste electrode

UV spectrophotometric detection

high-performance liquid chromatography

OBSAH

Seznam použitých zkratké.....	8
1. TEORETICKÁ ČÁST	9
1.1 Cíl práce	9
1.2 Vlastnosti terpenů	10
1.3 Eugenol	10
1.3.1 Vlastnosti a výskyt eugenolu	10
1.3.2 Stanovení eugenolu podle Českého lékopisu	10
1.4 Karvakrol a thymol	12
1.4.1 Vlastnosti a výskyt	12
1.4.2 Stanovení thymolu podle Českého lékopisu	12
1.5 Metody stanovení eugenolu, karvakrolu a thymolu	13
1.6 Uhlíková pastová elektroda.....	15
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	16
2.1 Přehled studovaných látek	16
2.2 Reagencie	17
2.3 Použité přístroje	18
2.4 Použité vzorce	19
2.5 Pracovní postupy	20
2.5.1 Stálost zásobních roztoků	20
2.5.2 Optimalizace separace	20
2.5.3 Elektrochemická detekce	20
2.5.4 Voltametrické měření	20
2.5.5 Kalibrační závislosti	21
3. VÝSLEDKY A DISKUZE	22
3.1 Spektrofotometrické studium stálosti zásobních roztoků.....	22
3.2 Optimalizace separace.....	24
3.2.1 Vliv pH mobilní fáze	24
3.2.2 Vliv koncentrace acetonitrilu.....	25
3.3 Vliv pH na odezvu CPE.....	28

3.4 Hydrodynamické voltamogramy	31
3.5 Kalibrační závislosti	32
3.5.1 Spektrofotometrická detekce	32
3.5.2 Elektrochemická detekce	37
4. ZÁVĚR	42
5. Seznam použité literatury	43

Seznam použitých zkratk

<i>A</i>	absorbance
AU	jednotky absorbance
<i>c</i>	molární koncentrace
C.A.S.	Chemical Abstract Services
CPE	uhlíková pastová elektroda
<i>E</i>	potenciál
ED	elektrochemická detekce
GC	plynová chromatografie
FID	plamenový ionizační detektor
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<i>I</i>	elektrický proud
<i>k</i>	retenční faktor
<i>L_D</i>	mez detekce
<i>L_Q</i>	mez stanovitelnosti
<i>M_r</i>	relativní molární hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie
pK _a	záporný logaritmus disociační konstanty
P	rozdělovací koeficient n-oktanol/voda
R _{1,2}	rozlišení píků
R	korelační koeficient
<i>t_r</i>	retenční čas
<i>t_M</i>	mrtvý čas kolony
UV/VIS	ultrafialová a viditelná oblast spektra
<i>w</i>	šířka píku při základně
<i>w_{1/2}</i>	šířka píku v polovině výšky

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Cíl práce

Eugenol, thymol a karvakrol jsou součástí esenciálních olejů rostlin. Vyskytují se v léčivech, extraktech z rostlin, dalších přípravcích a mají význam jako antibakteriální látky. Proto je zapotřebí nalézt vhodné podmínky umožňující jejich stanovení v nízkých koncentracích a komplikovaných maticích.

Cílem této bakalářské práce bylo stanovení karvakrolu ve směsi spolu s eugenolem a thymolem pomocí HPLC. Nejprve bylo zapotřebí nalézt vhodné podmínky separace směsi eugenolu, thymolu a karvakrolu pomocí HPLC. Dále se tato práce zabývala nalezením vhodných podmínek pro elektrochemickou detekci studovaných látek na uhlíkové pastové elektrodě a dosažení co nejnižší meze detekce.

1.2 Vlastnosti terpenů

Terpeny patří do velmi rozsáhlé třídy uhlovodíků a jsou primární složkou esenciálních olejů rostlin. Rostlinné terpenoidy jsou používány převážně kvůli svému aroma, jsou používány ke konzervaci a do kosmetických přípravků. Významnou roli hrají v bylinné léčbě a v současné době jsou zkoumány pro své antibakteriální, protinádorové a další účinky využitelné v lékařství. Některé terpeny působí jako regulátory rostlinného růstu a jsou významnými zprostředkovateli vzájemné komunikace mezi rostlinami a hmyzem. Terpeny přispívají např. k vůni skořice, hřebíčku, citronu nebo zázvoru.^{1,2}

1.3 Eugenol

1.3.1 Vlastnosti a výskyt eugenolu

Eugenol má dezinfekční a antibakteriální účinky.³ Vyskytuje se v některých bylinách, se kterými se u nás běžně setkáváme. Pro příklad lze uvést řebříček obecný. Pro medicínské účely slouží kvetoucí natě, které obsahují nejvyšší podíl éterických olejů – eugenol, kafr a cineol. Díky působení obsažených éterických olejů dochází ke zmírnění zánětů a uvolnění křečí, bylina působí také antibakteriálně. Další bylinou je hřebíčkovec kořený, jedná se o léčivou rostlinu s protizánětlivými a analgetickými účinky. Obsažený eugenol funguje jako lokální anestetikum a zároveň vykazuje antiseptické vlastnosti. Dalšími bylinami, které obsahují eugenol jsou např. mateřídouška obecná, dobromysl obecná či skořicovník cejlonský.⁴

1.3.2 Stanovení eugenolu podle Českého lékopisu⁵

Vlastnosti:

Bezbarvá nebo světle žlutá čirá kapalina, na vzduchu tmavnoucí, výrazného pachu po hřebíčku. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v 70% ethanolu, prakticky nerozpustný v glycerolu, mísitelný s kyselinou octovou, s 96% ethanollem, s etherem, s mastnými oleji a s dichlormethanem.

Zkoušky totožnosti:

- A. Proveďte se tenkovrstvá chromatografie za použití desky s vrstvou silikagelu F₂₅₄ pro TLC R.

Zkoušený roztok. 50 µl se rozpustí v 96% ethanolu a zředí se jím na 25 ml.

Porovnávací roztok. 50 µl eugenolu CRL se rozpustí v 96% ethanolu a zředí se jím na 25 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl obou roztoků a vyvíjí se směs objemových dílů ethylacetatu R a toluenu R (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu studeného vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Vrstva se postříká anisaldehydem RS a suší se 10 min při 100 °C až 105 °C.

Příbuzné látky: -stanoví se plynovou chromatografií

Zkoušený roztok. 1,00 g se rozpustí v ethanolu R a zředí se jím na 5, 0 ml.

Porovnávací roztok (a). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí ethanolem R na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 50 mg vanilinu R se rozpustí v 1,0 ml zkoušeného roztoku a zředí se ethanolem R na 5 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- křemenné kapilární kolony délky 30 m a vnitřního průměru 0,25 mm s vnitřním povrchem pokrytým polyfenylmethylsiloxanem R (tloušťka filmu 0,25 µm)
- helia pro chromatografii R jako nosného plynu při průtokové rychlosti 1 ml/min
- plamenoionizačního detektoru
- dělicího poměru 1 : 40

Nastříkne se po 1 µl zkoušeného roztoku a porovnávacích roztoků (a) a (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je relativní retenční čas vanilinu vzhledem k eugenolu nejméně 1,1. Vypočítá se obsah příbuzných látek v procentech z ploch píků na chromatogramu zkoušeného roztoku metodou vnitřní normalizace. Nepřihlíží se k píkům rozpouštědla a k píkům s plochou menší než 0,05násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Obsah příbuzných látek s relativním retenčním časem větším než 2,0 vzhledem k hlavnímu píku není větší než 1,0 %; obsah jiných příbuzných látek není větší než 0,5 %; celkový obsah příbuzných látek není větší než 3,0 %.

1.4 Karvakrol a thymol

1.4.1 Výskyt a vlastnosti

Karvakrol a thymol jsou příbuzné látky, a proto se vyskytují pohromadě. Mají antibakteriální a antiseptické účinky.³ Jsou obsaženy v mnoha bylinách, se kterými se běžně setkáváme. Pro příklad lze uvést dobromysl obecnou. Nať dobromyslu obsahuje 0,2 – 1,5 % silice, především karvakrol, thymol a 1,8-cineol, které podporují trávení, uvolňují křeče a přinášejí celkové uklidnění. Dále lze uvést mateřídoušku obecnou. Mateřídouška je významným prostředkem proti kašli. Kvetoucí nať obsahuje éterické oleje, které ničí choroboplodné zárodky a uvolňují křeče. Jejich hlavní složky představuje thymol a karvakrol a doplňují je ještě saponiny. Thymol a karvakrol potlačují růst bakterií, virů i hub, činí tak krátký proces s nejběžnějšími původci infekčních onemocnění dýchacích cest.⁴ Thymol je navíc účinné antiseptikum, uplatňuje se v zubním lékařství, při výrobě past a ústních vod, jako prostředek odstraňující zápach. Ve velkých dávkách je však toxický, poškozuje štítnou žlázu. Karvakrol můžeme dále nalézt např. v saturejce zahradní, řebříčku obecném či kmínu.⁶

Dalšími přípravky, které karvakrol či thymol obsahují jsou různé doplňky stravy, čaje a rostlinné extrakty. Karvakrol a thymol také tvoří složky mastí, používaných při revmatismu.⁴

1.4.2 Stanovení thymolu podle Českého lékopisu⁵

Vlastnosti:

Bezbarvé krystaly. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v 96% ethanolu a v etheru, snadno rozpustný v silicích a mastných olejích, mírně rozpustný v glycerolu. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Příbuzné látky: -provede se plynová chromatografie

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v lihu 96% R a zředí se jím na 10,0 ml.

Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí lihem 96% R na 100 ml.

Porovnávací roztok (b). 1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí lihem 96% R na 10 ml.

Porovnávací roztok (c). 5 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí lihem 96% R na 10 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- skleněné nebo ocelové kolony délky 4 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné křemelinou pro plynovou chromatografii R impregnovanou směsí vhodnou pro dělení volných mastných kyselin
- dusíku pro chromatografii R jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min
- plamenoionizačního detektoru

Teplota kolony se udržuje na 80 °C, teplota vstřikovacího prostoru na 250 °C a teplota detektoru na 300 °C.

Nastříkne se odděleně po 1 µl každého roztoku. Po 2 min se zvýší teplota kolony rychlostí 8 °C/min na 240 °C, při níž se udržuje 15 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je poměr signálu k šumu nejméně 5. Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch píků, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c).

1.5 Metody stanovení eugenolu, karvakrolu a thymolu

Eugenol, karvakrol a thymol jsou deriváty monoterpenů, které mají význam v lékařství. Studované látky mohou být izolovány různými metodami, např. lisováním, destilací s vodní parou nebo extrakcí do organického rozpouštědla.²

Studované látky se nacházejí v potravinách i farmaceutikách, proto bylo publikováno mnoho metod, které popisují jejich stanovení v různých matricích. Ke stanovení studovaných látek se používá řada instrumentálních metod, např. spektrometrické⁷ a elektrochemické⁸, nad kterými ovšem převládají metody separační, především chromatografické. Mezi nejpoužívanější chromatografické metody patří plynová chromatografie^{9,10} a vysokoúčinná kapalinová chromatografie¹¹⁻¹⁴. K detekci

studovaných látek v plynové chromatografii je možné použít např. hmotnostní detektor¹⁵ či plamenově ionizační detektor^{9,10}. Přehled vybraných prací zabývajících se stanovením studovaných látek je uveden v tab.1.1.

Tab.1.1 Přehled vybraných prací zabývajících se stanovením eugenolu, karvakrolu a thymolu.

analyt	metoda	mez detekce L_D (g)	citace
eugenol	HPLC UV detekce, $\lambda=280$ nm	$1 \cdot 10^{-9}$	11
eugenol	GC detektor: FID	-	9
eugenol	IR-spektrometrie	-	7
eugenol	GC-MS	$0,02 \cdot 10^{-6}$	15
karvakrol, thymol	HPLC UV detekce, $\lambda=283$ nm	karvakrol: $0,02 \cdot 10^{-6}$ thymol: $0,15 \cdot 10^{-6}$	14
karvakrol, thymol,	HPLC UV detekce, $\lambda=220$ nm a $\lambda=283$ nm	karvakrol: $0,02 \cdot 10^{-6}$ (220 nm) $0,12 \cdot 10^{-6}$ (283 nm) thymol: $0,02 \cdot 10^{-6}$ (220 nm) $0,10 \cdot 10^{-6}$ (283 nm)	13
karvakrol, thymol	HPLC ED detekce	karvakrol: $10 \cdot 10^{-9}$ thymol: $14 \cdot 10^{-9}$	12
karvakrol, thymol	GC detektor: FID	karvakrol: $0,23 \cdot 10^{-3}$ thymol: $1,87 \cdot 10^{-3}$	10
karvakrol, thymol	diferenční pulsní voltametrie	$0,04 \cdot 10^{-6}$	8

1.6 Uhlíková pastová elektroda

Uhlíkové pastové elektrody (CPE) jsou běžně a široce užívány v současné elektrochemii a umožňují detekci oxidovatelných i redukovatelných látek ve vodném i nevodném prostředí. CPE jsou v moderní elektroanalýze využívány především pro své atraktivní vlastnosti, spojené s variabilitou volby jejich složení, kdy zvláště modifikace chemickými či biologickými činidly významně zvyšuje selektivitu i citlivost elektrochemických metod stanovení organických i anorganických analytů.¹⁶

CPE jsou tvořeny uhlíkovou pastou. Uhlíková pasta je připravena ze dvou složek, a to z uhlíkového prášku a vhodného kapalného pojiva. Uhlík může být ve formě spektroskopického grafitu či skelného uhlíku. Pojivo je lipofilní organická kapalina (např. parafinový či silikonový olej). Uhlíkový prášek by měl mít danou velikost částic, čistotu i sorpční schopnost. Pojivo by mělo být málo těkavé, nemísitelné s vodnými roztoky a mělo by být chemicky i elektrochemicky inertní.^{17,18} Uhlíkovou pastu lze snadno modifikovat přimícháním vhodného modifikátoru. Způsobů modifikace je mnoho, dá se modifikovat uhlíkový prášek, pojivo, ale i povrch elektrody.¹⁹

V našem případě byla pasta připravena homogenizací v třecí misce. Tato směs se plní do těla elektrody tak, aby nevznikly vzduchové bubliny a pasta byla v celém objemu těla elektrody. Naplněná elektroda se nenechává volně na vzduchu, protože zvolna vysychá. Mezi měřeními se elektroda přechovává ponořená koncem do destilované vody. Výhodou CPE je nižší zbytkový proud a snadná obnova povrchu výměnou pasty.^{20,21}

2.EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přehled studovaných látek

Eugenol (99%, Janssen Chimica, Belgie)

systematický název: 2-methoxy-4-allylphenol

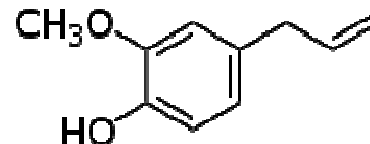
$C_{10}H_{12}O_2$

C.A.S číslo: 97-53-0

$M_r = 164,20$

$\log P = 2,204 \pm 0,235$

$pK_a = 10,29 \pm 0,18$



Karvakrol (98%, Sigma-Aldrich, Německo)

systematický název: 5-isopropyl-2-methylfenol

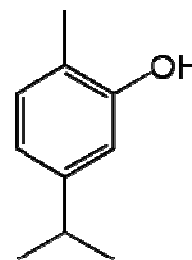
$C_{10}H_{14}O$

C.A.S číslo: 499-75-2

$M_r = 150, 217$

$\log P = 3,281 \pm 0,204$

$pK_a = 10,37 \pm 0,10$



Thymol (Thymolum, Tamda a.s., Olomouc)

systematický název: 2-isopropyl-5-methylfenol

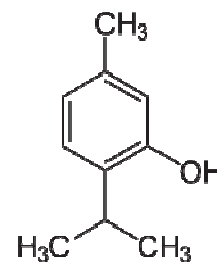
$C_{10}H_{14}O$

C.A.S číslo: 89-83-8

$M_r = 150, 22$

$\log P = 3,281 \pm 0,204$

$pK_a = 10,59 \pm 0,10$



Zásobní roztoky těchto látek o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ byly připraveny rozpustěním přesně odváženého množství dané látky v methanolu či acetonitrilu. Roztoky o nižších koncentracích byly získány přesným ředěním zásobních roztoků.

2.2 Reagencie

- acetonitril (gradient grade, Lichrosolv, Merck, Německo)
- methanol (for HPLC, Lach-Ner, Neratovice)
- hydrogenfosforečnan sodný (p.a., Lachema a.s., Neratovice)
- kyselina fosforečná (p.a., Lach-Ner, Neratovice)
- hydroxid sodný (p.a., Lach-Ner, Neratovice)
- dusičnan draselný (p.a., Lachema n.p., Brno)
- minerální olej (Fluka Biochemika, Švýcarsko)
- mikrokuličky skelného uhlíku (Alpha Aesar, USA)
- deionizovaná voda (Millipore Q-plus systém, Millipore, USA)

Mobilní fáze byly připraveny smísením příslušných objemových dílů vodné složky a methanolu či acetonitrilu. pH mobilní fáze bylo upravováno pomocí fosforečnanového pufru. Pufry byly tvořeny 0,01 mol dm⁻³ hydrogenfosforečnanem sodným, jehož pH bylo upraveno na požadovanou hodnotu koncentrovanou kyselinou fosforečnou či 0,2 mol dm⁻³ hydroxidem sodným.

Uhlíková pasta byla připravena homogenizováním 250 mg mikrokuliček ze skelného uhlíku a 100 µl minerálního oleje. Uhlíková pasta byla napěchována do těla elektrody - bylo použito teflonové tělo o průměru 2 mm s nerezovým pístem.²²

2.3 Použité přístroje

HPLC systém

- vysokotlaká pumpa Beta10 (Ecom, Praha)
- dávkovací smyčka o objemu 20 μl
- kolona: Kromasil-C18, 250x4,6 mm
- UV spektrofotometrický detektor Sapphire 800 (Ecom, Praha)
- amperometrický detektor ADLC 2 (Laboratorní přístroje Praha), který pracoval v tříelektrodevém zapojení s používanými elektrodami:
 - pracovní uhlíková pastová elektroda
 - referenční argentochloridová elektroda s 3 mol dm^{-3} roztokem KCl
 - pomocná platinová elektroda
- programové vybavení: Clarity 2.3. (Data Apex, Praha)

pH metr

- digitální měřicí přístroj Conductivity and pH meter 4330 (Jenway, UK)

spektrofotometr

- Agilent 8453 Diode-Array Spectrophotometr (Nizozemí)

voltametrické měření

- přístroj Eco-Tribo Polarograph (PolaroSensors, Praha)

2.4 Použité vzorce

$$R_{1,2} = \frac{2(t_{r,2} - t_{r,1})}{w_1 + w_2}$$

$$k = \frac{t_r - t_M}{t_M}$$

$R_{1,2}$ rozlišení

$t_{r,1}, t_{r,2}, t_r$ retenční časy

w_1, w_2 šířka píku při základně

k retenční faktor

t_M mrtvý čas

2.5 Pracovní postupy

2.5.1 Stálost zásobních roztoků

Stálost zásobních roztoků o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³ byla studována spektrofotometricky. Absorpční spektrum bylo měřeno v 1 mm křemenných kyvetách proti acetonitrilu v rozmezí vlnových délek 190 až 500 nm.

2.5.2 Optimalizace separace

Separace analytů byla prováděna na netermostatované koloně. K detekci byla použita pouze UV detekce při vlnové délce 275 nm. Mrtvý čas kolony byl určen nástřikem vodného roztoku KNO₃ o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³. Byly měřeny roztoky jednotlivých látek o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³ a směs těchto látek o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³ každé látky. Měření bylo provedeno se studovanými látkami rozpuštěnými v roztoku o stejném složení jako mobilní fáze, tj. směs methanolu nebo acetonitrilu a fosforečnanového pufru.

2.5.3 Elektrochemická detekce

Amperometrický detektor byl sériově zapojen za UV spektrofotometrický detektor a pracoval v tříelektrodovém zapojení v uspořádání wall-jet. Všechny tři elektrody byly ponořeny v přepadové nádobce s mobilní fází.

Při optimalizaci elektrochemické detekce byly používány optimální podmínky separace, tedy mobilní fáze tvořená acetonitrilem a fosforečnanovým pufrem o pH 4 v poměru 60:40.

Hydrodynamické voltamogramy daných látek byly proměřeny pomocí nástřiku směsi těchto látek o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³. Vložený potenciál byl +0,5 V až +1,4 V.

2.5.4 Voltametrické měření

Měření bylo provedeno ve voltametrické nádobce, do které byly ponořeny všechny tři elektrody – pracovní uhlíková pastová elektroda, referentní argentschloridová elektroda a pomocná platinová elektroda. Nádobka obsahovala roztok dané látky o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³, připravený vhodným naředěním zásobního roztoku dané látky pomocí acetonitrilu a fosforečnanového pufru o daném

pH v poměru 60:40 (V/V). Měření bylo provedeno metodou DCV při rychlosti skenu 20 mV s^{-1} a vkládaném potenciálu 0 až 1400 mV. Bylo proměřeno rozmezí pH 2 až 7.

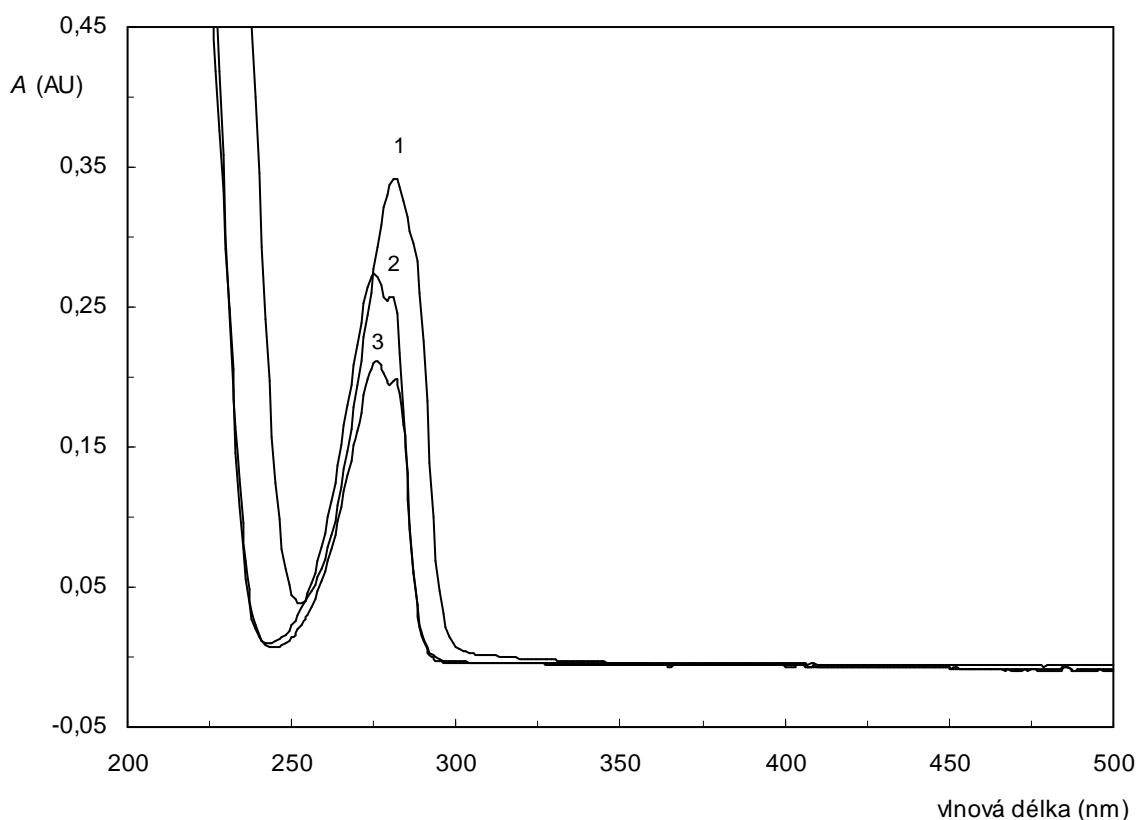
2.5.5 Kalibrační závislosti

Kalibrační závislosti byly proměřeny v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ až $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ směsi eugenolu, karvakrolu a thymolu v acetonitrilu a byly zpracovány metodou lineární regrese. Byly proměřeny pomocí UV spektrofotometrické i amperometrické detekce za optimálních podmínek separace.

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Spektrofotometrické studium stálosti zásobních roztoků

Absorpční spektrum zásobních roztoků eugenolu, thymolu a karvakrolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ v acetonitrilu bylo měřeno v rozmezí vlnových délek 190 až 500 nm (viz.obr. 3.1). Při absorpčních maximech studovaných látek jsme sledovali jejich stálost, naměřené hodnoty jsou shrnuty v tab.3.1. Z naměřených dat vyplývá, že zásobní roztoky eugenolu, karvakrolu a thymolu jsou stále nejméně 74 dní.



Obr. 3.1 UV/VIS absorpční spektrum eugenolu (1), karvakrolu (2) a thymolu (3) o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ v acetonitrilu (měřeno v 1 mm křemenných kyvetách proti acetonitrilu).

Tab.3.1 Stálost zásobních roztoků studovaných látek o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³ v acetonitrilu měřené při vlnových délkách absorpčních maxim.

t(dny)	eugenol ($\lambda=282$ nm)		karvakrol ($\lambda=275$ nm)		thymol ($\lambda=276$ nm)	
	A (AU)	%	A (AU)	%	A (AU)	%
0	0,341	100,0	0,274	100,0	0,212	100,0
5	0,347	101,8	0,281	102,6	0,213	100,5
11	0,349	102,3	0,277	101,1	0,223	105,2
31	0,341	100,0	0,279	101,8	0,211	99,5
51	0,329	96,5	0,284	103,6	0,215	101,4
74	0,352	103,2	0,293	106,9	0,222	104,7

3.2 Optimalizace separace

3.2.1 Vliv pH mobilní fáze

Prvním krokem při optimalizaci separace eugenolu, thymolu a karvakrolu bylo zjištění vhodného pH vodné složky mobilní fáze. Byly proměřeny hodnoty pH 2,5; 4 a 6. Měření bylo prováděno v mobilní fázi methanol a fosforečnanový pufr o daném pH v poměru 80:20 (V/V).

V každé mobilní fázi byly naměřeny chromatogramy jednotlivých látek a jejich směsi v methanolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³. Mrtvý čas kolony 1,717 min byl určen pomocí nástřiku vodného roztoku KNO₃ o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³.

Retenční časy a kapacitní faktory při jednotlivých pH mobilní fáze jsou shrnuty v tab.3.2. Z výsledků měření je patrné, že pH mobilní fáze nemá téměř žádný vliv na retenční charakteristiky studovaných látek.

Tab.3.2 Vliv pH mobilní fáze na retenční charakteristiky eugenolu, karvakrolu a thymolu (dávkováno 20 µl roztoku jednotlivých látek a jejich směsi o $c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³ v methanolu, mob.fáze methanol a fosforečnanový pufr o daném pH v poměru 80:20, kolona: Kromasil-C18, 250x4,6 mm , UV detekce 275 nm).

pH	eugenol		karvakrol		thymol	
	t _r (min)	k	t _r (min)	k	t _r (min)	k
2,5	2,29	1,33	3,99	2,33	4,14	2,41
4	2,24	1,31	3,94	2,31	4,11	2,38
6	2,26	1,32	3,94	2,31	4,10	2,37

3.2.2 Vliv koncentrace acetonitrilu

Při separaci studovaných látek prováděné s použitím methanolu, jako organického modifikátoru mobilní fáze, nedošlo k rozdělení všech látek ve směsi. Proto byl testován jako modifikátor acetonitril.

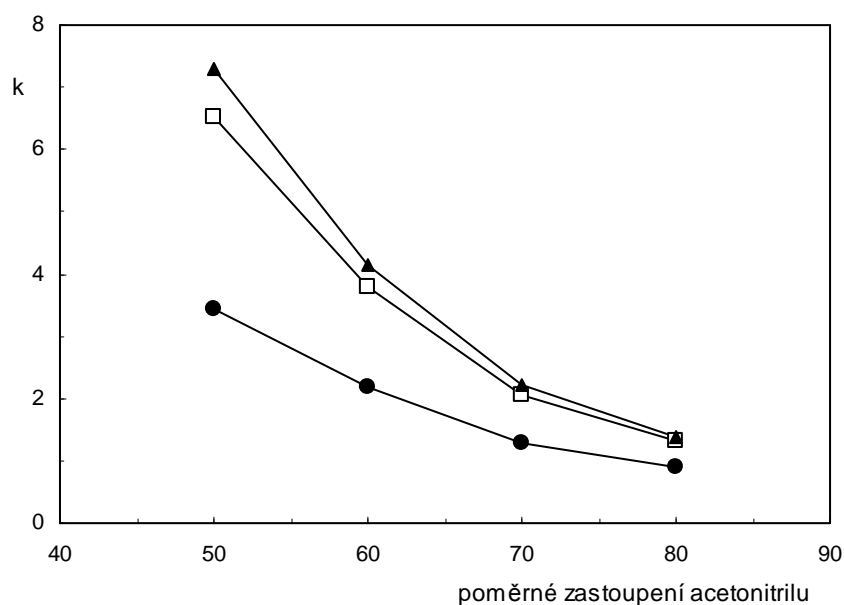
Dalším krokem při optimalizaci separace bylo nalezení optimálního obsahu acetonitrilu v mobilní fázi. Měření bylo prováděno v mobilní fázi složené z acetonitrilu a fosforečnanového pufru o pH 4 v poměru 80:20, 70:30, 60:40, 50:50 (V/V). Ostatní podmínky byly stejné jako v pododdíle 3.2.1.

Rozlišení stoupá se snižujícím se obsahem acetonitrilu, ale zároveň se prodlužuje doba analýzy. V prostředí mobilní fáze složené z acetonitrilu a fosforečnanového pufru v poměru 80:20 (V/V) nedošlo k separaci karvakrolu a thymolu. V prostředí mobilní fáze o poměru acetonitrilu a fosforečnanového pufru 70:30 (V/V) došlo ke zlepšení separace, ale k dokonalému oddělení látek nedošlo. Nejlepšího rozdělení látek bylo dosaženo v prostředí mobilní fáze o poměru acetonitrilu a fosforečnanového pufru 50:50 (V/V), tato mobilní fáze se však k dalšímu měření nepoužívala z důvodu dlouhé doby trvání analýzy. Kompromisu mezi rozlišením separovaných látek a dobou trvání analýzy bylo dosaženo v prostředí mobilní fáze tvořené acetonitrem a fosforečnanovým pufrům v poměru 60:40 (V/V). Proto byla tato mobilní fáze zvolena jako optimální a byla při ní prováděna všechna další měření. Chromatogram změřený za optimálních podmínek je znázorněný na obr. 3.3.

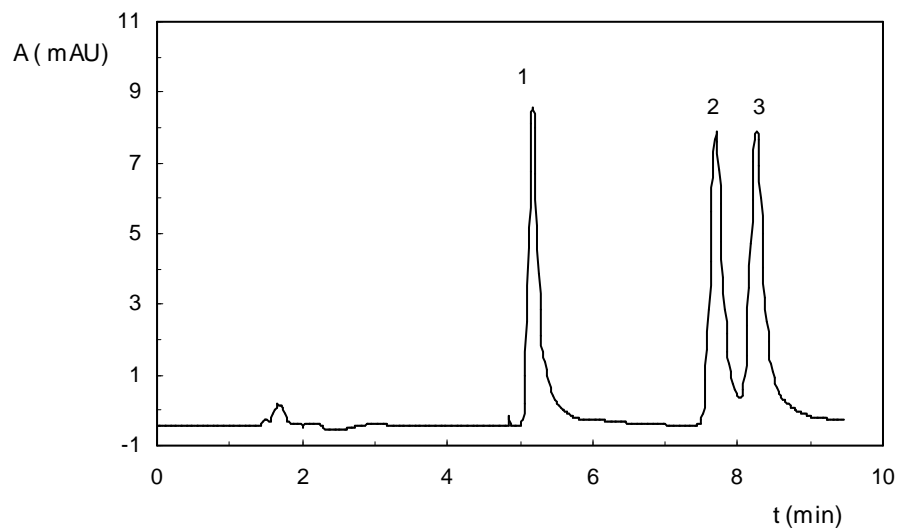
Získané retenční časy a kapacitní faktory pro studované látky jsou shrnuty v tab. 3.3. Grafické znázornění závislosti kapacitních faktorů studovaných látek na obsahu acetonitrilu v mobilní fázi je znázorněno na obr. 3.2.

Tab. 3.3 Vliv obsahu acetonitrilu v mobilní fázi na retenční charakteristiky eugenolu, karvakrolu a thymolu. Kolona Kromasil-C18, 250x4,6 mm, dávkováno 20 μ l roztoku směsi v mobilní fázi o $c=1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} , mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 4 v příslušném poměru, UV detekce při 275 nm.

acetonitril : fosf. pufr (V/V)	eugenol		karvakrol		thymol	
	t_r' (min)	k	t_r' (min)	k	t_r' (min)	k
80:20	1,54	0,91	2,25	1,31	2,38	1,38
70:30	2,19	1,28	2,56	2,06	3,82	2,22
60:40	3,76	2,19	6,51	3,79	7,11	4,13
50:50	5,91	3,44	11,22	6,54	12,52	7,29



Obr. 3.2 Závislost kapacitního faktoru eugenolu (●), karvakrolu (□) a thymolu (▲) na obsahu acetonitrilu v mobilní fázi. Kolona Kromasil-C18, 250x4,6 mm, dávkováno 20 μ l roztoku směsi v mobilní fázi o $c=1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} , mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 4 v příslušném poměru, UV detekce při 275 nm.



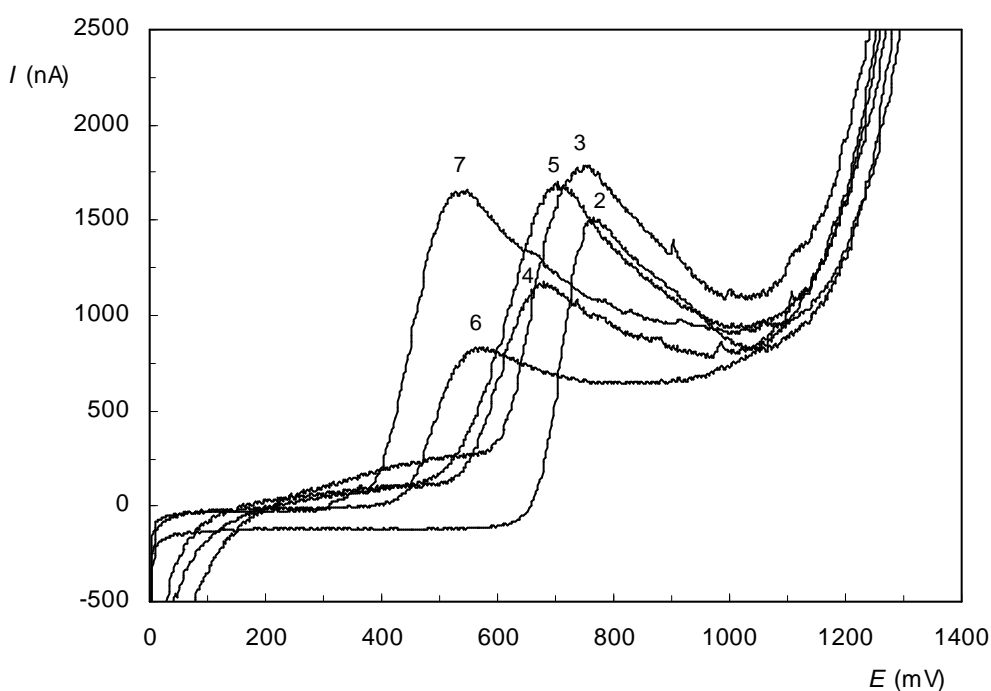
Obr. 3.3 Chromatogram směsi eugenolu (1), karvakrolu (2) a thymolu (3) změřený za optimálního obsahu acetonitrilu v mobilní fázi. Kolona Kromasil-C18, 250x4,6 mm, dávkováno 20 μl roztoku směsi v mobilní fázi o $c=1\cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} , mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 4 v poměru 60:40 (V/V), UV detekce při 275 nm.

3.3 Vliv pH na odezvu CPE

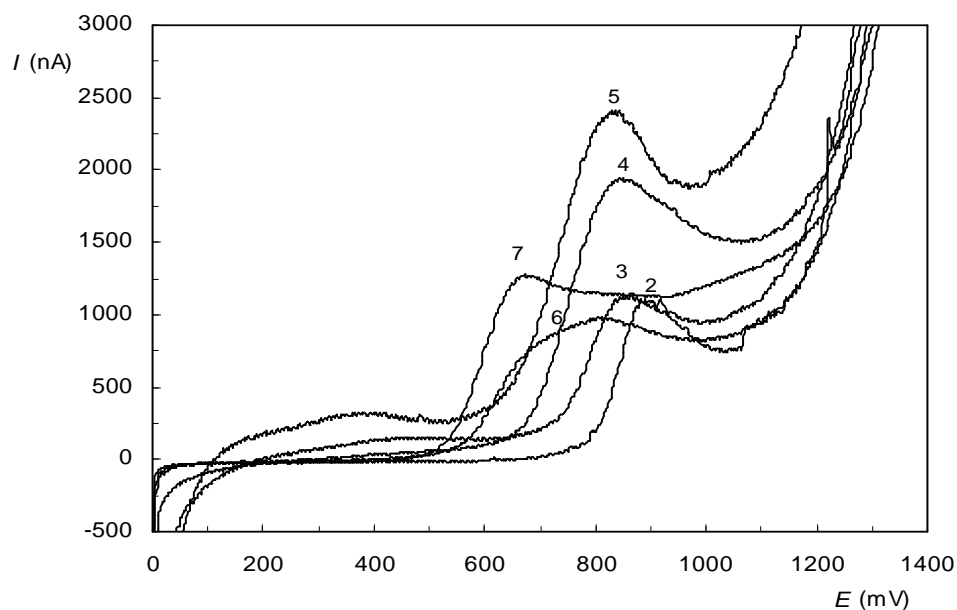
Fakt, že pH mobilní fáze neovlivňuje separační parametry studovaných látek, nám umožňuje přizpůsobit pH mobilní fáze z hlediska optimálních podmínek detekce. Pro zrychlení a zjednodušení práce byla k prozkoumání vlivu pH na odezvu CPE použita DC voltametrie. Vliv pH na voltametrické chování eugenolu, karvakrolu a thymolu byl sledován v prostředí acetonitrilu a fosforečnanového pufru o pH v rozmezí 2 až 7 smíchané v poměru 60:40 (V/V). Voltametrické křivky byly naměřeny za podmínek uvedených v pododdíle 2.5.4. Koncentrace studovaných látek byly $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$.

Získané voltametrické křivky jednotlivých látek jsou znázorněny na obr. 3.4, 3.5 a 3.6. Závislost výšky píku jednotlivých látek na pH fosforečnanového pufru je znázorněna na obr. 3.7.

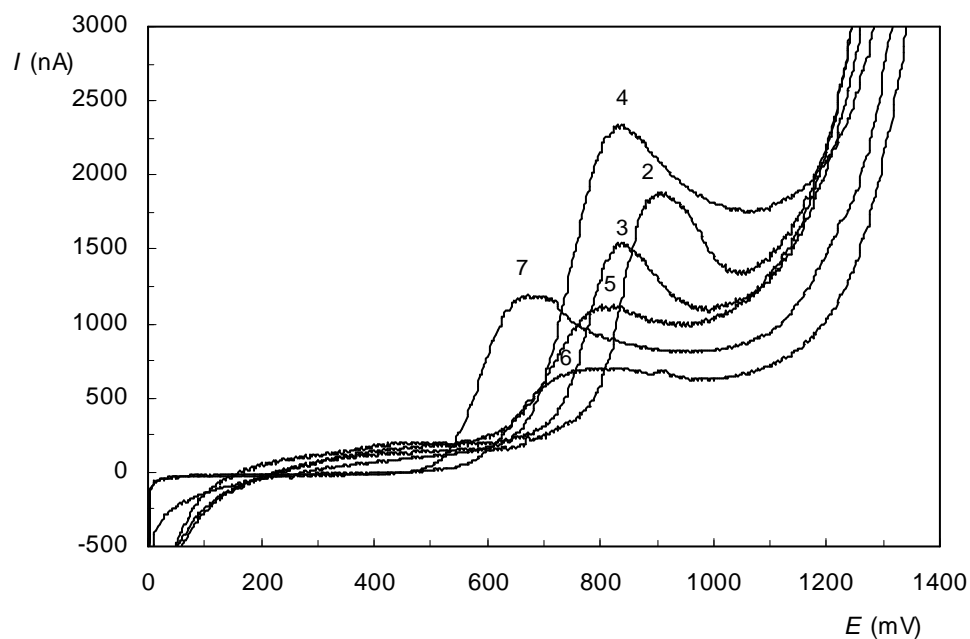
Pro měření koncentračních závislostí bylo zvoleno $\text{pH} = 4$. Je to z toho důvodu, že při $\text{pH} = 4$ poskytují karvakrol a thymol maximální odezvu.



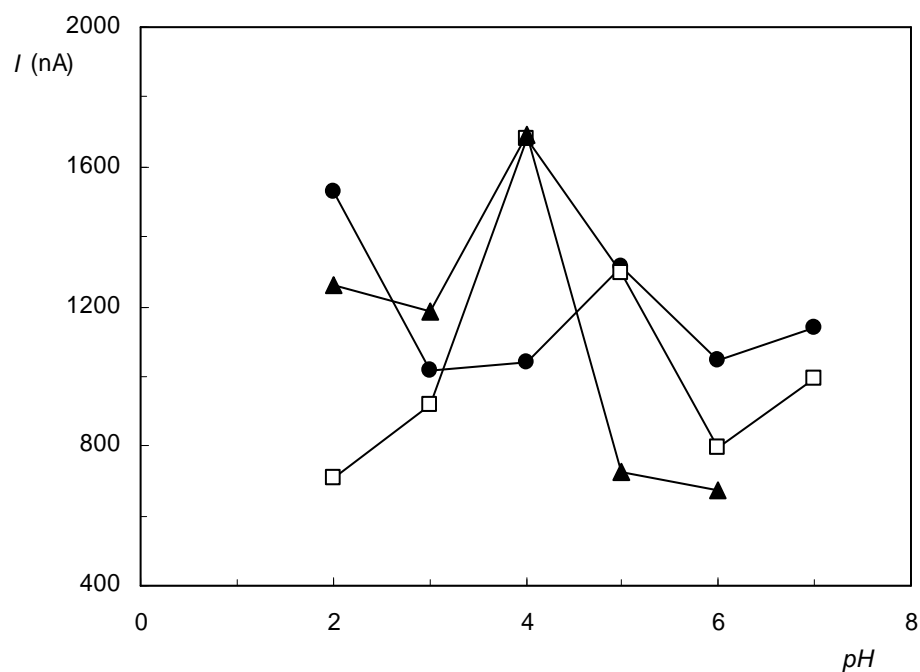
Obr. 3.4 DC voltamogramy eugenolu o $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ v prostředí acetonitrilu a fosforečnanového pufru o pH v rozmezí 2 až 7 v poměru 60:40 (V/V). Číslo křivek odpovídají hodnotám pH.



Obr. 3.5 DC voltamogramy karvakrolu o $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ v prostředí acetonitrilu a fosforečnanového pufru o pH v rozmezí 2 až 7 v poměru 60:40 (V/V). Čísła křivek odpovídají hodnotám pH.



Obr. 3.6 DC voltamogramy thymolu o $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ v prostředí acetonitrilu a fosforečnanového pufru o pH v rozmezí 2 až 7 v poměru 60:40 (V/V). Čísła křivek odpovídají hodnotám pH.



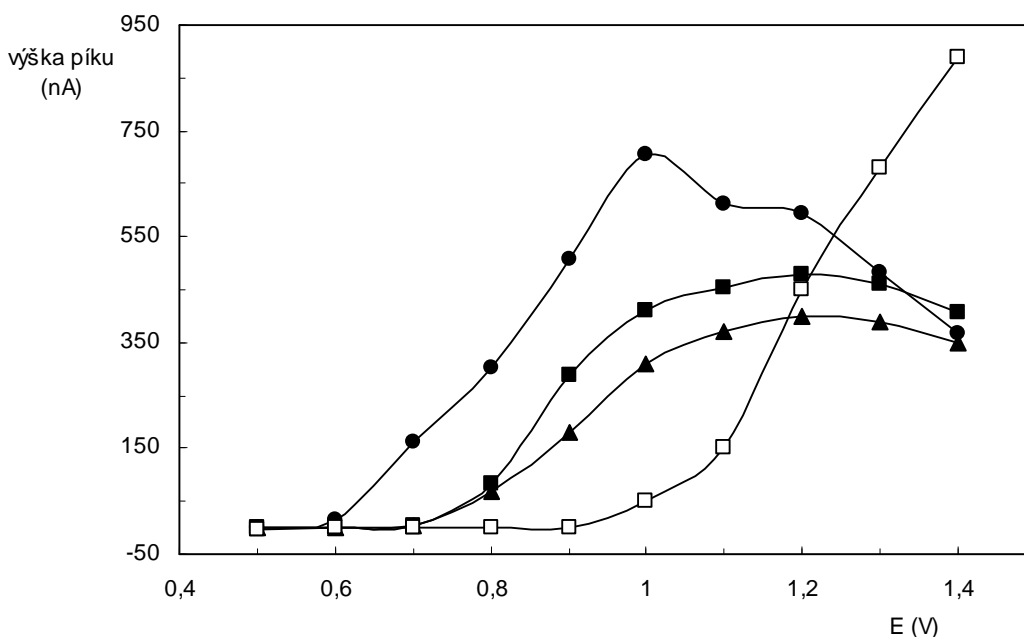
Obr. 3.7 Grafické znázornění závislosti výšky píku eugenolu (●), karvakrolu (□) a thymolu (▲) na pH. Měřeno DC voltametrií v prostředí fosforečnanového pufru o pH v rozmezí 2 až 7. Vkládaný potenciál 0 až +1400 mV.

3.4 Hydrodynamické voltamogramy

Optimální elektrochemické detekční podmínky byly získány na základě proměření hydrodynamických voltamogramů jednotlivých látek, tedy závislosti výšky píku na potenciálu vkládaném na elektrodu. Hydrodynamické voltamogramy eugenolu, thymolu a karvakrolu byly měřeny při podmínkách nalezených při optimalizaci separace, tedy mobilní fáze tvořená acetonitrilem a fosforečnanovým pufrům o pH 4 v poměru 60:40 (V/V).

Proměřovány byly hodnoty vkládaného potenciálu v rozmezí +0,5 V až +1,4 V. Dávkován byl roztok směsi eugenolu, karvakrolu a thymolu v acetonitrilu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$.

Získané hydrodynamické voltamogramy pro jednotlivé látky jsou ukázány na obr. 3.8. Jako optimální potenciál byl vyhodnocen potenciál +1,1 V, kde již všechny látky dosáhly maximální odezvy, ale ještě nedošlo ke zvýšení proudového pozadí.



Obr. 3.8 Hydrodynamické voltamogramy eugenolu (●), karvakrolu (■), thymolu (▲) a pozadí (□). Kolona Kromasil-C18, 250x4,6 mm, dávkováno 20 μl roztoku směsi v mobilní fázi o $c=1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 4 v poměru 60:40 (V/V).

3.5 Kalibrační závislosti

3.5.1 Spektrofotometrická detekce

Spektrofotometrická detekce byla měřena při 275 nm. Byly proměřeny kalibrační závislosti studovaných látek v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³ až $2 \cdot 10^{-7}$ mol dm⁻³.

Změřené kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Parametry závislostí jednotlivých látek získané vyhodnocením z ploch a výšek píků z naměřených chromatogramů jsou shrnuty v tab. 3.4 a 3.5. Dosažené meze stanovitelnosti L_Q a meze detekce L_D , které byly stanoveny jako množství analytu poskytující signál, jehož výška je rovna desetinásobku či trojnásobku absolutní hodnoty šumu jsou uvedeny v tab. 3.6. Absolutní hodnota šumu byla 0,012 mAU. Kalibrační křivky vyhodnocené z ploch, resp. výšek píků v příslušném koncentračním rozmezí jsou znázorněny na obr. 3.9 a 3.10. Série chromatogramů směsi studovaných látek, kde je znázorněn pokles píků se snižující se koncentrací je zobrazena na obr. 3.11.

Kalibrační závislosti jsou lineární v celé měřené oblasti koncentrací. Korelační koeficienty se pohybují v intervalu 0,9981 až 0,9993. Nejnižší meze stanovitelnosti bylo dosaženo u karvakrolu tj. $9,6 \cdot 10^{-7}$ mol dm⁻³, naopak nejvyšší meze stanovitelnosti bylo dosaženo u thymolu, tj. $1,3 \cdot 10^{-6}$ mol dm⁻³.

Tab.3.4 Parametry kalibračních závislostí pro jednotlivé látky stanovené HPLC se spektrofotometrickou detekcí vyhodnocené z výšek píků. Kolona Kromasil-C18, 250x4,6 mm, dávkováno 20 µl roztoku směsi v mobilní fázi, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 4 v poměru 60:40 (V/V), UV detekce při 275 nm.

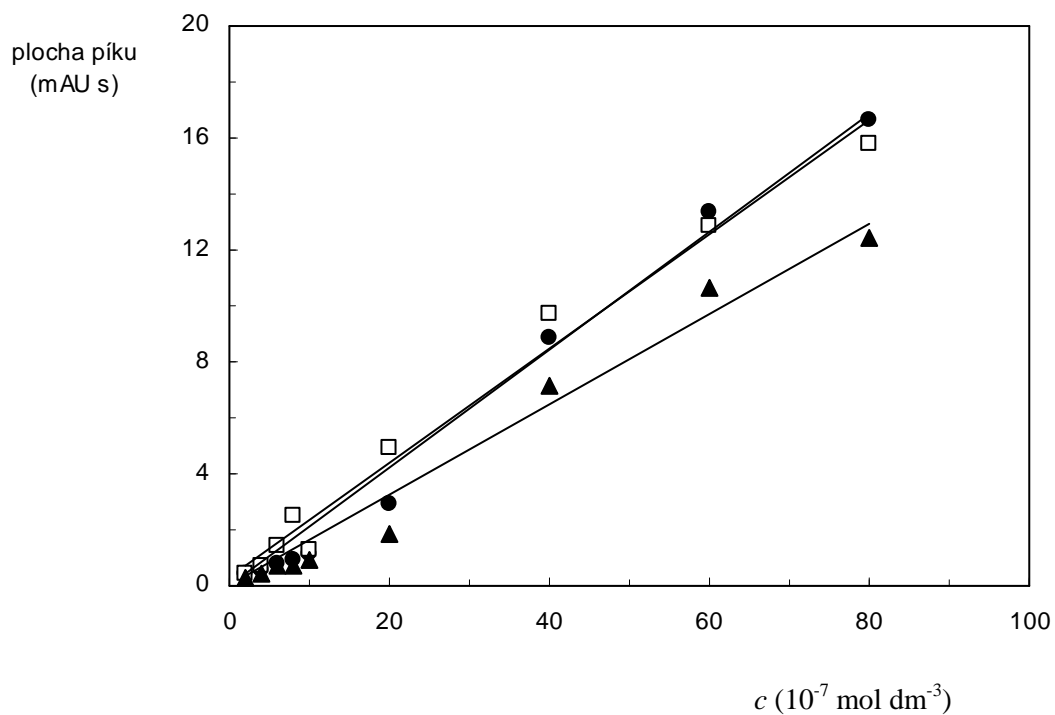
analyt	koncentrační rozsah (mol dm ⁻³)	směrnice (mAU mol dm ⁻³)	úsek (mAU)	korelační koeficient
eugenol	$1 \cdot 10^{-4}$ - $2 \cdot 10^{-7}$	$1,72 \cdot 10^5$	+0,07	0,9993
karvakrol	$1 \cdot 10^{-4}$ - $2 \cdot 10^{-7}$	$1,25 \cdot 10^5$	+0,11	0,9992
thymol	$1 \cdot 10^{-4}$ - $2 \cdot 10^{-7}$	$9,19 \cdot 10^4$	+0,04	0,9992

Tab. 3.5 Parametry kalibračních závislostí pro jednotlivé látky stanovené HPLC se spektrofotometrickou detekcí vyhodnocené z ploch píků. Kolona Kromasil-C18, 250x4,6 mm, dávkováno 20 μ l roztoku směsi v mobilní fázi, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 4 v poměru 60:40 (V/V), UV detekce při 275 nm.

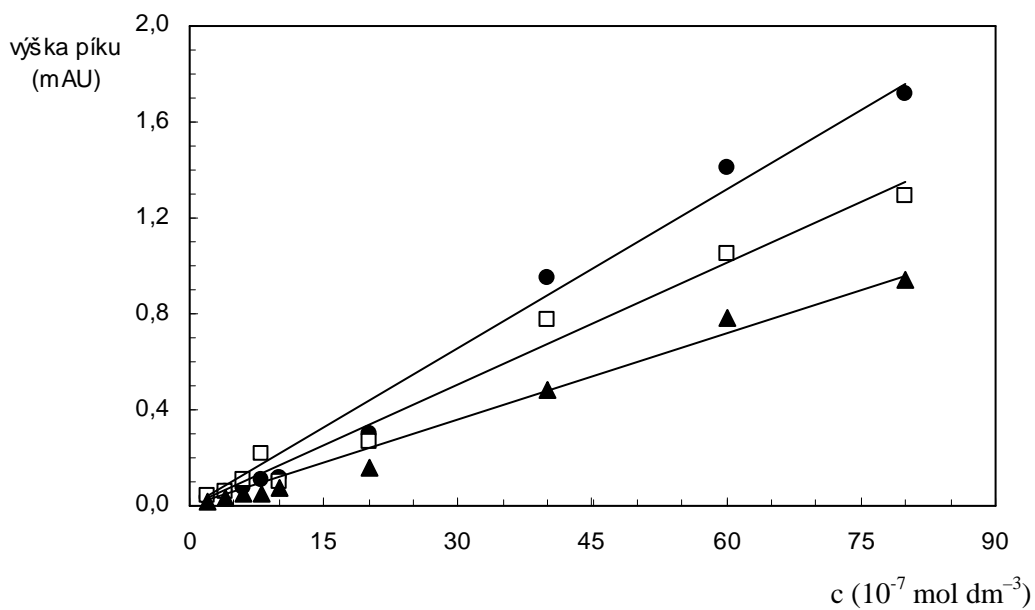
analyt	koncentrační rozsah (mol dm⁻³)	směrnice (mAU s mol dm⁻³)	úsek (mAU s)	korelační koeficient
eugenol	$1 \cdot 10^{-4}$ - $2 \cdot 10^{-7}$	$1,51 \cdot 10^6$	+1,2	0,9992
karvakrol	$1 \cdot 10^{-4}$ - $2 \cdot 10^{-7}$	$1,46 \cdot 10^6$	+1,7	0,9993
thymol	$1 \cdot 10^{-4}$ - $2 \cdot 10^{-7}$	$1,24 \cdot 10^6$	+0,6	0,9981

Tab. 3.6 Meze stanovitelnosti a meze detekce eugenolu, karvakrolu a thymolu zjištěné ze stanovení těchto látek pomocí HPLC se spektrofotometrickou detekcí. Kolona Kromasil-C18, 250x4,6 mm, dávkováno 20 μ l roztoku směsi v mobilní fázi, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 4 v poměru 60:40 (V/V), UV detekce při 275 nm.

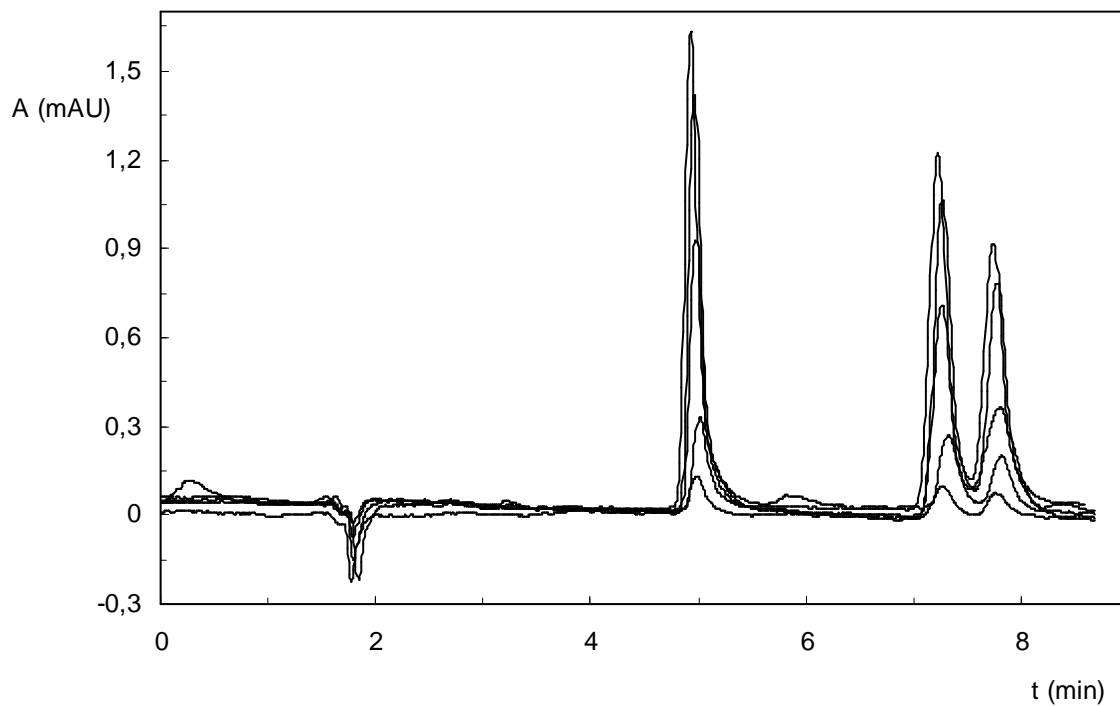
analyt	mez stanovitelnosti L_Q (mol dm⁻³)	mez detekce L_D (mol dm⁻³)
eugenol	$7,1 \cdot 10^{-7}$	$2,1 \cdot 10^{-7}$
karvakrol	$9,6 \cdot 10^{-7}$	$2,9 \cdot 10^{-7}$
thymol	$1,3 \cdot 10^{-6}$	$3,9 \cdot 10^{-7}$



Obr. 3.9 Kalibrační křivky eugenolu (●), karvakrolu (□) a thymolu (▲) vyhodnocené z ploch píků v koncentračním rozmezí $8 \cdot 10^{-6}$ až $2 \cdot 10^{-7}$ mol dm^{-3} . Kolona Kromasil-C18, 250x4,6 mm, dávkováno 20 μl roztoku směsi v mobilní fázi, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 4 v poměru 60:40 (V/V), UV detekce při 275 nm.



Obr. 3.10 Kalibrační křivky eugenolu (●), karvakrolu (□) a thymolu (▲) vyhodnocené z výšek píků v koncentračním rozmezí $8 \cdot 10^{-6}$ až $2 \cdot 10^{-7}$ mol dm⁻³. Kolona Kromasil-C18, 250x4,6 mm, dávkováno 20 μ l roztoku směsi v mobilní fázi, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 4 v poměru 60:40 (V/V), UV detekce při 275 nm.



Obr. 3.11 Série chromatogramů směsi o koncentracích $1 \cdot 10^{-6}$, $2 \cdot 10^{-6}$, $4 \cdot 10^{-6}$, $6 \cdot 10^{-6}$, $8 \cdot 10^{-6}$ mol dm⁻³. Kolona Kromasil-C18, 250x4,6 mm, dávkováno 20 μ l roztoku směsi v mobilní fázi, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 4 v poměru 60:40 (V/V), UV detekce při 275 nm.

3.5.2 Elektrochemická detekce

Spolu se spektrofotometrickou detekcí byly proměřeny i kalibrační závislosti za použití elektrochemické detekce. Elektrochemická detekce probíhala při potenciálu pracovní elektrody +1,1 V. Proměřeny byly kalibrační závislosti v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³ až $2 \cdot 10^{-7}$ mol dm⁻³. Naměřené kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese.

Parametry závislostí jednotlivých látek získané vyhodnocením z ploch a výšek píků z naměřených chromatogramů jsou shrnuty v tab. 3.7 a 3.8. Zjištěné meze stanovitelnosti L_Q a meze detekce L_D pro jednotlivé látky jsou uvedeny v tab. 3.9. L_Q a L_D byly stanoveny jako množství analytu poskytující signál, jehož výška je rovna desetinásobku či trojnásobku absolutní hodnoty šumu. Absolutní hodnota šumu byla 0,016 nA. Kalibrační křivky vyhodnocené z ploch, resp. výšek píků v příslušném koncentračním rozmezí jsou znázorněny na obr. 3.12 a 3.13. Série chromatogramů směsi studovaných látek, kde je znázorněn pokles píku se snižující se koncentrací, je zobrazena na obr. 3.14.

Kalibrační závislosti jsou lineární v celé měřené oblasti koncentrací. Korelační koeficienty se pohybují v intervalu 0,9913 až 0,9946. Nejnižší meze stanovitelnosti bylo dosaženo u thymolu, tj. $5,3 \cdot 10^{-8}$ mol dm⁻³, naopak nejvyšší meze stanovitelnosti bylo dosaženo u eugenolu, tj. $2,1 \cdot 10^{-8}$ mol dm⁻³. Meze stanovitelnosti získané pomocí elektrochemického detektoru jsou přibližně o řád nižší než při použití UV detekce.

Tab. 3.7 Parametry kalibračních závislostí pro jednotlivé látky stanovené HPLC s elektrochemickou detekcí při potenciálu +1,1 V vyhodnocené z výšek píků. Kolona Kromasil-C18, 250x4,6 mm, dávkováno 20 µl roztoku směsi v mobilní fázi, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 4 v poměru 60:40 (V/V).

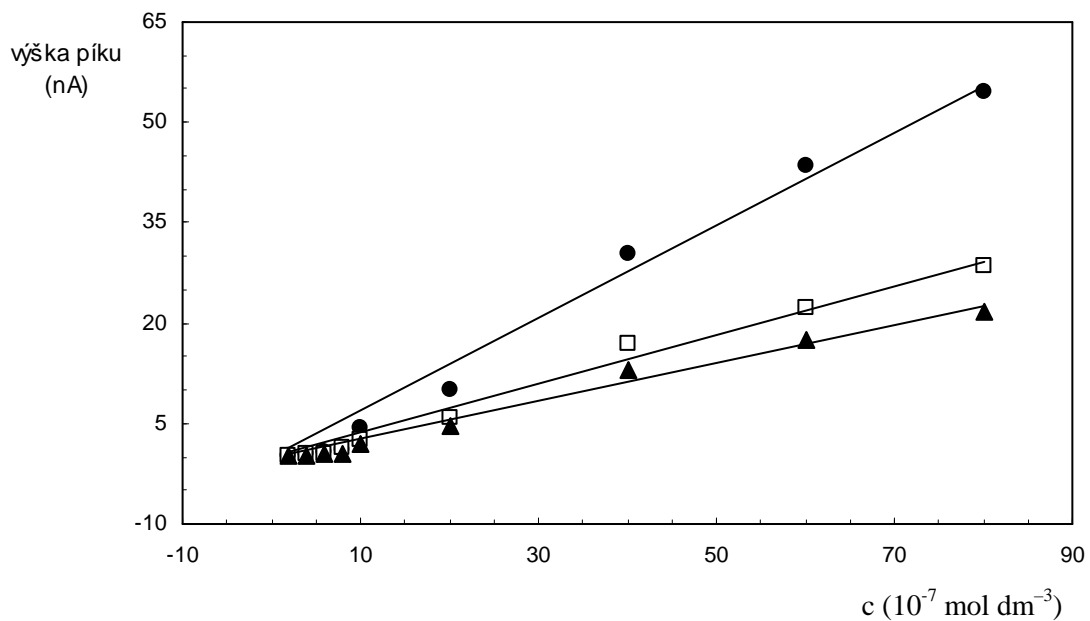
analyt	koncentrační rozsah (mol dm ⁻³)	směrnice (nA mol dm ⁻³)	úsek (nA)	korelační koeficient
eugenol	$1 \cdot 10^{-4}$ - $2 \cdot 10^{-7}$	$8,04 \cdot 10^6$	-15,0	0,9921
karvakrol	$1 \cdot 10^{-4}$ - $2 \cdot 10^{-7}$	$3,98 \cdot 10^6$	-6,7	0,9916
thymol	$1 \cdot 10^{-4}$ - $2 \cdot 10^{-7}$	$3,03 \cdot 10^6$	-5,1	0,9913

Tab. 3.8 Parametry kalibračních závislostí pro jednotlivé látky stanovené HPLC s elektrochemickou detekcí při potenciálu +1,1 V vyhodnocené z ploch píků. Kolona Kromasil-C18, 250x4,6 mm, dávkováno 20 µl roztoku směsi v mobilní fázi, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 4 v poměru 60:40 (V/V).

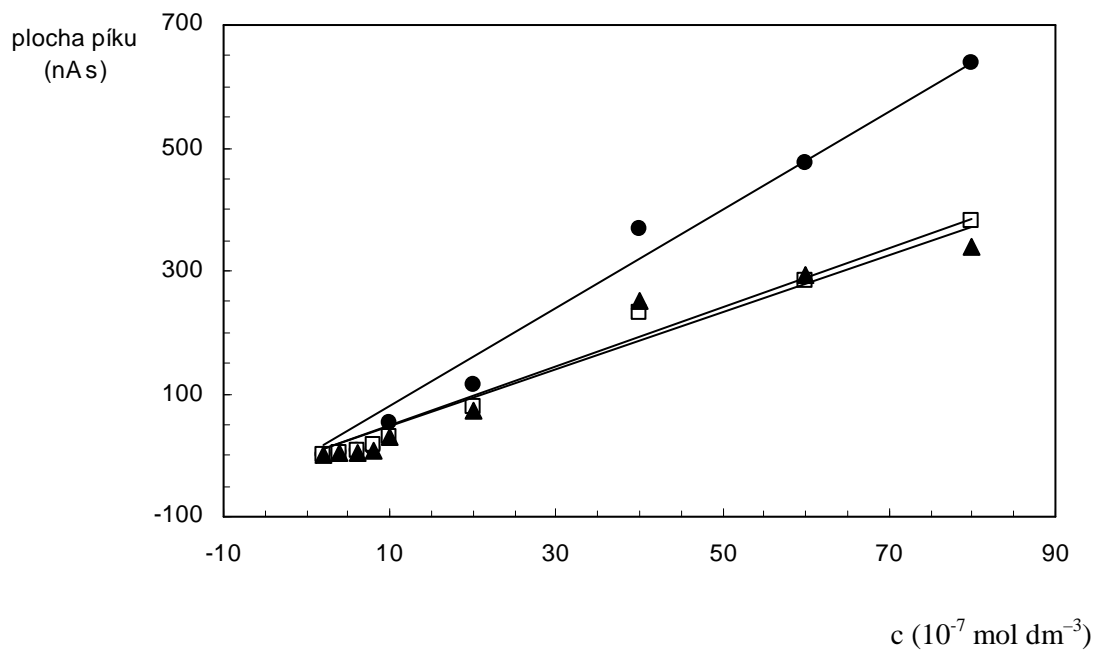
analyt	koncentrační rozsah (mol dm⁻³)	směrnice (nA s mol dm⁻³)	úsek (nA s)	korelační koeficient
eugenol	1·10 ⁻⁴ -2·10 ⁻⁷	8,27·10 ⁷	-141	0,9941
karvakrol	1·10 ⁻⁴ -2·10 ⁻⁷	5,12·10 ⁷	-85	0,9946
thymol	1·10 ⁻⁴ -2·10 ⁻⁷	4,64·10 ⁷	-65	0,9928

Tab. 3.9 Meze stanovitelnosti a meze detekce eugenolu, karvakrolu a thymolu zjištěné ze stanovení těchto látek pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí při potenciálu +1,1 V. Kolona Kromasil-C18, 250x4,6 mm, dávkováno 20 µl roztoku směsi v mobilní fázi, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 4 v poměru 60:40 (V/V).

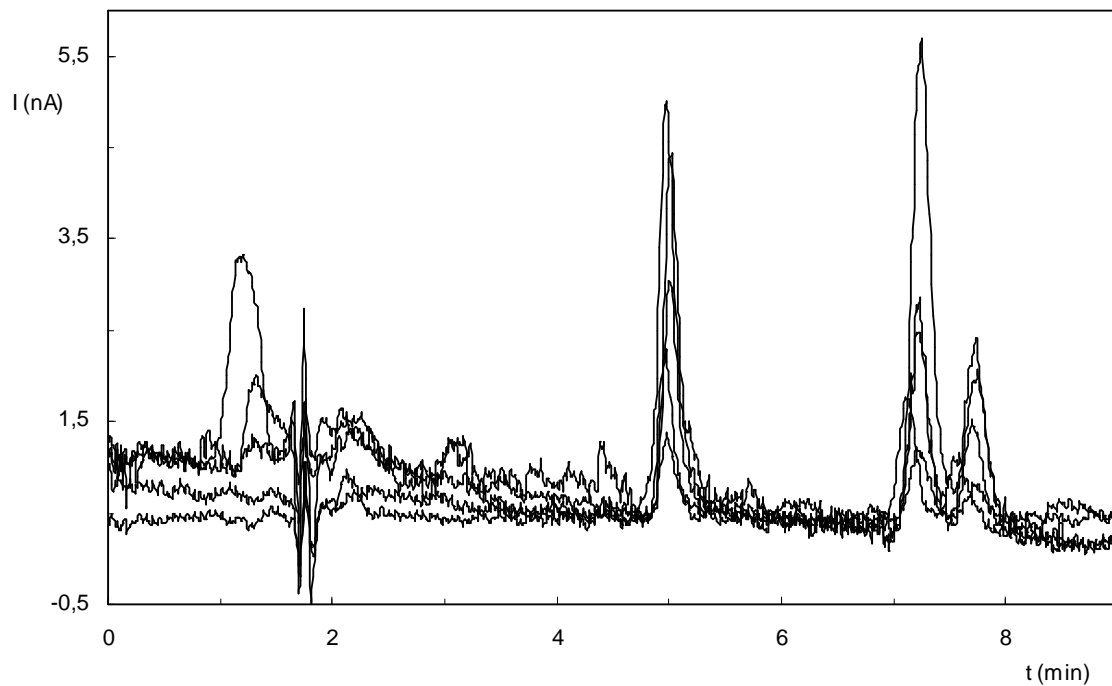
analyt	mez stanovitelnosti L_Q (mol dm⁻³)	mez detekce L_D (mol dm⁻³)
eugenol	2,1·10 ⁻⁸	6,1·10 ⁻⁹
karvakrol	4,0·10 ⁻⁸	1,2·10 ⁻⁸
thymol	5,3·10 ⁻⁸	1,6·10 ⁻⁸



Obr.3.12 Kalibrační křivky eugenolu (●), karvakrolu (□) a thymolu (▲) vyhodnocené z výšek píků v koncentračním rozmezí $8 \cdot 10^{-6}$ až $2 \cdot 10^{-7}$ mol dm⁻³. Kolona Kromasil-C18, 250x4,6 mm, dávkováno 20 μl roztoku směsi v mobilní fázi, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 4 v poměru 60:40 (V/V), elektrochemická detekce při potenciálu +1,1 V.



Obr.3.13 Kalibrační křivky eugenolu (●), karvakrolu (□) a thymolu (▲) vyhodnocené z ploch píků v koncentračním rozmezí $8 \cdot 10^{-6}$ až $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$. Kolona Kromasil-C18, 250x4,6 mm, dávkováno 20 μl roztoku směsi v mobilní fázi, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 4 v poměru 60:40 (V/V), elektrochemická detekce při potenciálu +1,1 V.



Obr.3.14 Série chromatogramů směsi o koncentracích $1 \cdot 10^{-6}$, $8 \cdot 10^{-7}$, $6 \cdot 10^{-7}$, $4 \cdot 10^{-7}$, $2 \cdot 10^{-7}$ v mol dm⁻³. Kolona Kromasil-C18, 250x4,6 mm, dávkováno 20 μl roztoku směsi v mobilní fázi, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 4 v poměru 60:40 (V/V), elektrochemická detekce při potenciálu +1,1 V.

4. Závěr

Bylo prostudováno chromatografické chování eugenolu, karvakrolu a thymolu. Dále byly proměřeny závislosti retenčních charakteristik všech studovaných látek na pH mobilní fáze a na obsahu acetonitrilu v mobilní fázi.

Byly nalezeny optimální podmínky HPLC separace směsi eugenolu, karvakrolu a thymolu s použitím spektrofotometrické detekce: mobilní fáze tvořená acetonitrem a fosforečnanovým pufrům o pH 4 v poměru 60:40 (V/V), detekce probíhala při 275 nm. Za těchto podmínek byly naměřeny kalibrační závislosti, ze kterých byly zjištěny meze stanovitelnosti a meze detekce.

Při elektrochemické detekci byla jako pracovní elektroda použita uhlíková pastová elektroda. Byla prostudována závislost její odezvy na pH a na vloženém potenciálu. Měření probíhalo za optimálních podmínek separace. Jako optimální potenciál byl použit potenciál +1,1 V, vkládaný na pracovní elektrodu. Za těchto podmínek byly naměřeny kalibrační závislosti, ze kterých byly zjištěny meze stanovitelnosti a meze detekce. Zjištěné meze stanovitelnosti jednotlivých látek pro oba způsoby detekce jsou shrnuty v tab. 4.1. Ve srovnání se spektrofotometrickým detektorem jsou meze stanovitelnosti získané pomocí elektrochemického detektoru přibližně o řád nižší.

Tab.4.1 Přehled dosažených mezí stanovitelnosti eugenolu, karvakrolu a thymolu s použitím spektrofotometrické a elektrochemické detekce. Kolona Kromasil-C18, 250x4,6 mm, dávkováno 20 μ l roztoku směsi, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 4 v poměru 60:40 (V/V), UV detekce při 275 nm, ED při potenciálu pracovní uhlíkové pastové elektrody +1,1 V.

analyt	mez stanovitelnosti L_Q (mol dm^{-3})	
	spektrofotometrická detekce	elektrochemická detekce
eugenol	$7,1 \cdot 10^{-7}$	$2,1 \cdot 10^{-8}$
karvakrol	$9,6 \cdot 10^{-7}$	$4,0 \cdot 10^{-8}$
thymol	$1,3 \cdot 10^{-6}$	$5,3 \cdot 10^{-8}$

6. Seznam použité literatury

1. Klouda P.: Základy biochemie. Ostrava 2000.
2. Mlejová, V.; Pavlíková, P.; Dobiáš, B.; Adam, M.; Ventura, K.: Aplikace mikroextrakce tuhou fází pro analýzu bylinných silic. *Chemické listy* **104**, 166-171 (2010).
3. *Český lékopis 2005*, 3.díl: léčivé a pomocné látky, léčivé přípravky. Praha, Grada Publishing 2005.
4. LoCantare, P.; Shanmugaiyah, V.: Antibacterial activity of essential oil components and their potential use in seed disinfection. *Journal of Agricultural and Foodchemistry* **57**, 9454-9461 (2009).
5. Bühringová, U.: *Léčivé rostliny, obsahové látky, zpracování, základní recepty*. Copyright 2007.
6. Magická síla bylin. Dostupné z URL <http://www.leros.cz> [cit.16.5.2010]
7. Sukhomlinova, E.A.; Shormanov V.K.: Determination of eugenol in biological fluids. *Farmatsiya(Moscow)* **1**, 7-10 (2008). CA **2008**:307762.
8. Michelitsch, A.; Rittmannsberger, A.; Hüfner, A.; Rückert, U.; Likussar, W.: Determination of isopropylmethylphenols in Black seed oil by differential pulse voltammetry. *Phytochemical analysis* **15**, 320-324 (2004).
9. Jirovetz, L.; Buchbauer, G.; Ngassaum, M.B.; Eberhardt, R.: Analysis and quality control of the essential oil of the leaves of *Cinnamomum zeylanicum* from Camerroom. *Ernaehrung (Vienna)* **22**, 443-445 (1988).
10. Vahid, K.; AliReza, F.; Reza, A.; Behvar, A.; Mehdi, J-H.: Multivariate optimization of hydrodistillation-headspace solvent microextraction of thymol and carvacrol from *Thymus transcaspicus*. *Talanta* **79**, 695-699 (2009).
11. Chang, M.J.W; Ko, C.Y.; Lin, R.F.; Hsieh, L.L.: Biological monitoring of enviroment exposure to safrole and the Taiwanese betel quid chewing. *Archives of Enviromental contamination and Toxicology* **43**, 432-437(2002). CA **2002**:829647.
12. Newbery, J.E.; Lopez de Haddab, M.P.: Terpenoid analysis II. The separation of some monoterpene alcohols by High-Performance Liquid Chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography* **260**, 173-176 (1983).

13. Newbery, J.E.; Lopez de Haddab, M.P.; Charlwood, K.A.: High-Performance Liquid Chromatography of terpenoid alcohols in essential oils. *Analytica Chimica Acta* **147**, 387-391 (1983).
14. Solinas, V.; Gessa, C.; Falchi Delitala, L.: High-performance liquid chromatographic analysis of carvacrol and thymol in the essential oil of *Thymus capitatus*. *Journal of Chromatography* **219**, 332-337 (1981).
15. Ertan, E.; Aksoy, A.; Guvenc, D.; Yucel, A. Cagin: Determination of eugenol contents of some zinc-oxide-eugenol based dental cements. *Asian Journal of Chemistry* **19**, 3105-3112 (2007). *CA* **2008**:101702.
16. Zima, J.; Barek, J.: Uhlíkové pastové elektrody-možnosti a omezení v analýze organických látek. *Chemické listy* **98**, 440-446 (2004).
17. Švancara, I.; Vytřas, K.: Aplikace uhlíkových pastových elektrod v elektroanalýze. *Chemické listy* **88**, 412-424 (1999).
18. Švancara, I.; Schachl, K.: Testing of unmodified carbon paste electrodes. *Chemické listy* **93**, 440-499 (1999).
19. Švancara, I.; Vytřas, K.; Barek, J.; Zima, J.: Carbon paste electrodes in modern electroanalysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **39**, 204-227 (2009).
20. Švancara, I.; Vytřas, K.: Příprava a vlastnosti uhlíkových pastových elektrod. *Chemické listy* **88**, 138-146 (1994).
21. Zýka, J.: *Nové směry v analytické chemii*. SNTL, Praha 1988.
22. Švancara, I.; Metelka, R.; Vytřas, K.: *Sensing in electroanalysis*. Vol.1. University of Pardubice. Pardubice 2005.