

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**STANOVENÍ THYMOLU NA UHLÍKOVÝCH PASTOVÝCH
ELEKTRODÁCH**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

studijního oboru analytická chemie

Praha 2007

Miroslava Cienciala

Za pomoc při realizaci této práce chci poděkovat celé PŘF UK a všem, kteří mi byli nápomocní. Mé největší díky patří Doc. RNDr. Jiřímu Zimovi, CSc., který mi ochotně poskytoval odborné rady a připomínky k mé práci.

Především chci poděkovat své rodině za podporu během celého studia. Nejdůležitější byla pro mě podpora mojí maminky a mého manžela.

Tato práce byla finančně podporována MŠMT ČR (projekt MSM 0021620857 a projekt LC06035) a Grantovou agenturou ČR (grant 203/04/0136). Děkuji.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	6
1. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
1.1. Cíl práce.....	8
1.2. Thymol.....	9
1.2.1. Vlastnosti a výskyt thymolu.....	9
1.2.2. Metody stanovení thymolu.....	12
1.3. Uhlíková pastová elektroda.....	15
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	17
2.1. Použité chemikálie.....	17
2.2. Použité přístroje.....	19
2.3. Pracovní postupy.....	21
2.3.1. Stálost zásobního roztoku thymolu.....	21
2.3.2. HPLC stanovení s elektrochemickou a UV detekcí.....	21
2.3.3. Voltametrické stanovení.....	22
2.4. Použité vzorce.....	23
3. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	24
3.1. Studium stálosti zásobního roztoku thymolu pomocí spektrofotometrie... 24	24
3.2. HPLC stanovení s UV a elektrochemickou detekcí.....	26
3.2.1. Optimalizace stanovení.....	26
3.2.2. Kalibrační závislosti.....	31
3.2.3. Opakovatelnost měření s uhlíkovou pastovou elektrodou pro metodu HPLC.....	41
3.3. Voltametrické stanovení thymolu.....	43
3.3.1. DPV stanovení.....	43
3.3.2. Studium akumulace thymolu na uhlíkové pastové elektrodě.....	48

3.3.3. Opakovatelnost měření na uhlíkové pastové elektrodě pro metodu DPV.....	54
3.4. Stanovení reálných vzorků.....	55
3.4.1. Stanovení thymolu v Septolete®D.....	55
3.4.2. Stanovení thymolu v Mateřídouškovém sirupu.....	62
4. ZÁVĚR.....	66
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	68

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AdS DP	adsorpční rozpouštěcí diferenční pulsní
AdS DPV	adsorpční rozpouštěcí diferenční pulsní voltametrie
AU	jednotky absorbance
BRP	Brittonův-Robinsonův pufr (tlumivý roztok)
CPE	uhlíková pastová elektroda
DP	diferenční pulsní
DPV	diferenční pulsní voltametrie
E	potenciál (jednotky V)
E_p	potenciál píku (jednotky V)
FID	plamenově ionizační detektor
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HPLC-UV	vysokoučinná kapalinová chromatografie s UV detektorem
I	proud (jednotky A)
I_p	proud píku (jednotky A)
k	retenční faktor
K_n	tabelovaný koeficient
L_D	limit detekce (jednotky mol.l ⁻¹)
MS	hmotnostní detektor
N	počet teoretických pater
R^2	druhá mocnina korelačního koeficientu
RP-HPLC	HPLC s reverzní fází
S	směrodatná odchylka
S/N	poměr signálu a šumu
SFME	bezropouštědlová mikrovlnná extrakce
SPME	mikroextrakce tuhou fází
S_r	relativní směrodatná odchylka
t	čas (jednotky min, s)

t_{acc}	doba akumulace (jednotky min, s)
t_M	mrtvý čas kolony (jednotky min, s)
t_R	retenční čas (jednotky min, s)
UV	ultrafialová
VIS	viditelná
$w_{1/2}$	šířka píku v polovině výšky (jednotky min, s)
\bar{x}	aritmetický průměr
zř. BRP	Brittonův-Robinsonův pufr zředěný deioniz. vodou 1:4 (v/v)
α	hladina pravděpodobnosti

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Cíl práce

Předkládaná diplomová práce se zabývá optimalizací stanovení thymolu pomocí uhlíkové pastové elektrody.

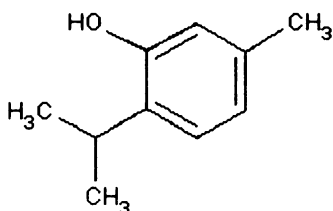
Thymol se vyskytuje nejen v léčivech, ale i v běžně dostupných extraktech z rostlin a dalších přípravcích. Z tohoto důvodu je nutné vyvinout metody jeho stanovení v nízkých koncentracích.

Cílem této práce bylo nalezení podmínek pro DPV a HPLC stanovení thymolu na uhlíkových pastových elektrodách a dosažení co nejnižší meze detekce.

1.2 Thymol

1.2.1 Vlastnosti a výskyt thymolu

Český lékopis¹



Je to 2-isopropyl-5-methylfenol.

Sumární vzorec je $C_{10}H_{14}O$.

Molární hmotnost je $150,22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Vlastnosti

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

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B

Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1. 2).

- A. Teplota tání (2.2.14). $48 \text{ }^{\circ}\text{C}$ až $52 \text{ }^{\circ}\text{C}$.
- B. Infračervené absorpční spektrum(2.2.24) zkoušené látky se shoduje se spektrem thymolu CRL.
- C. 0,2 g se zahřátím rozpustí ve 2 ml *hydroxidu sodného zředěného* RS, přidá se 0,2 ml *chloroformu* R a zahřívá se na vodní lázni; vznikne fialové zbarvení.
- D. Asi 2 mg se rozpustí v 1 ml *kyseliny octové bezvodé* R, přidá se 0,15 ml *kyseliny sírové* R a 0,05 ml *kyseliny dusičné* R; vzniká modrozelené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v 10 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*. Roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze IV (2.2.1) a není zabarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok Č₆ (2.2.2, *Metoda II*)

Kysele reagující látky. K 1,0 g ve 100 ml kuželové zabroušené baňce se skleněnou zátkou se přidá 20 ml *vody R*. Vaří se až do úplného rozpuštění zkoušené látky, ochladí se, baňka se uzavře a intenzivně se 1 min protřepává. Přidá se několik krystalů zkoušené látky pro vyvolání krystalizace, intenzivně se 1 min protřepává a pak se zfiltruje. K 5 ml filtrátu se přidá 0,05 ml *červeně methylové RS* a 0,05 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol.l⁻¹ RS*; vznikne žluté zbarvení.

Příbuzné látky. Provede se plynová chromatografie (2.2.28).

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

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

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

Porovnávací roztok (c). 5 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí 96% *ethanolem 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⁻¹,
- 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⁻¹ 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 pík, 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).

Zbytek po odpaření. 2,00 g se odpaří na vodní lázni a pak se 1 h suší v sušárně při 100 °C až 105 °C; zbytek váží nejvýše 1,0 mg (0,04%).

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech chráněn před světlem.

Vlastnosti a výskyt thymolu

Thymol má antibakteriální², antioxidační³ a dezinfekční účinky.⁴ Je obsažen v mnoha bylinách, se kterými se běžně setkáváme. Pro příklad lze uvést Dobromysl obecnou, kterou jako koření známe pod označením oregano. Nať dobromyslu obsahuje asi 0,2-1,5 % silice (hlavně thymolu, cymolu a karvakrolu).² Další bylinou je Tymjáň obecný, hlavní složkou jeho silice je thymol, který je účinným antiseptikem, slouží zejména v zubním lékařství, při výrobě past a ústních vod, jako prostředek odstraňující zápach. Je však toxický a poškozuje štítnou žlázu.⁵ V neposlední řadě lze uvést Mateřídoušku úzkolistou, která se díky obsahu silic, především thymolu, dává jako obklad proti plísňovým onemocněním kůže.⁵ Studovanou látku ale obsahují i poměrně jedovaté rostliny například Vratič obecný⁵ nebo Rojovník bahenní, který má omamné a psychotropní účinky⁶. Vratič se díky obsahu účinných látek používal k vypuzení střevních parazitů a k vyvolání potratu, dnes již se od jeho požívání upustilo kvůli jeho toxicitě.⁵

Studovaná látka se také přidává do lokálních antiseptik dutiny ústní a hltanu, kde ničí mnohé typy bakterií a některé druhy kvasinek. Jako zástupce těchto léčiv lze jmenovat Hexoraletten N[®] (Parke-Davis, SRN) a Septolete[®] D (Krka, Slovinsko). Thymol se také nachází v halothanu, anestetickém plynu, kam se přidává jako stabilizátor.⁷

Dalšími přípravky, které thymol obsahují jsou různé doplňky stravy, esenciální oleje, čaje a rostlinné extrakty, například Vincentka[®] sirup (léčivé vody, Luhačovice).

Thymol ale nalezneme i v medu, kam se dostane při jeho úpravě proti parazitům (Kleštík včelí).⁸

Silice rostlin se používají při aromaterapiích jako tzv. esenciální oleje, jednou z alternativ jak je extrahovat je bezrozpuštědlová mikrovlnná extrakce (SFME), což je kombinace suché destilace a mikrovlnného ohřevu. Tato metoda má velkou výhodu oproti běžné destilaci v tom, že případná následující analýza nevyžaduje žádné předběžné kroky jako je čištění nebo odstranění rozpouštědla.⁹

Thymol se jako chemická látka využívá i samostatně, například jako účinný prostředek při dezinfekci historických materiálů plynováním. Jako vypařovací fungicid je vhodný pro objekty, u nichž se neprojeví případná barevná změna (třísločiněné usně a dřevo). Po dezinfekci thymolem je nutné některé materiály, zejména pergameny, větrat.⁴

Studovaná látka se dále přidává při balení Hroznového vína do ochranné atmosféry. Přídavek 0,5 ml eugeniku, thymolu nebo mentholu do balení ochrání plody před mikroby a spolu s využitím ochranné atmosféry zvýší kvalitu vína při delším skladování.¹⁰

Dříve thymol nalézal uplatnění i v analytické chemii a to v polarografické analýze pro konzervování roztoků želatiny. Zásobní roztoky želatiny se často kazily a bývaly napadány plísněmi, proto se do něj přidávalo malé množství thymolu.¹¹

1.2.2 Metody stanovení thymolu

Thymol patří k fenolům, které jsou vysoce toxické a proto je jejich analýza v nízkých koncentracích velmi důležitá. Bohužel je analýza těchto sloučenin kvůli jejich vysoké polaritě obtížná. Extrakce fenolických sloučenin z vody rozpouštědlem je zvláště obtížná a výtěžek není uspokojivý. Bylo testováno mnoho různých metod, které se dají použít na rychlou on-line analýzu, především vodných vzorků. Například HPLC lze využít pro přímé měření fenolických sloučenin, ale detekční limity jsou poměrně vysoké, okolo 100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.(cit. 12)

Thymol se nalézá v jídle i farmaceutikách, proto bylo publikováno mnoho metod, které popisují stanovení thymolu v různých matricích. Uvádím pouze některé metody a oblast jejich použití.

V komerčních farmaceutických formách se thymol, fenol, chlorkresol a chlorxylenol stanovuje RP-HPLC, a to dvěma způsoby. Prvním je derivatizace před kolonou pomocí 1-fluor-2, 4-dinitrobenzenu, který slouží jako UV-značkovač. Vzniklé ethery jsou po separaci detegovány při 292 nm. Druhá procedura zahrnuje on-line fotochemickou konverzi po průchodu vzorku kolonou. Detekce probíhá na fluorescenčním a UV diodovém poli.¹³

V halothanu se thymol stanovuje pomocí HPLC-UV⁷, stejnou metodu stanovení lze využít při analýze oleje z černého kmínu. K extrakci je použita předklonka C₁₈ a za ní následuje RP-HPLC a detekce při 254 a 294 nm.¹⁴

Thymol a karvakrol v oleji z černého kmínu autoři stanovili diferenční pulsní voltametrií. Tyto dva isopropylfenoly neseparovali, stanovili jejich celkové množství. Jako pracovní elektrodu použili diskovou elektrodu ze skelného uhlíku a nejlepších výsledků dosáhli měřením v methanolickém roztoku, ve kterém udržovali stálé pH pomocí Sørensenova pufru. Limit detekce stanovili na 0,04 µg.ml⁻¹. (cit. 15)

Dalším ze způsobu stanovení thymolu je SPME-GC-FID. Tento způsob detekce je velmi citlivý a selektivní, lze jím stanovit thymol v řádech ng.l⁻¹, což je koncentrace thymolu v lidské plazmě po požití látek, které ho obsahují. Z lidské plasmy se thymol po enzymatickém rozštěpení jeho sulfátu extrahuje technikou SPME a analyzuje se plynovou chromatografií s plamenově ionizačním detektorem. Mez stanovitelnosti (LOQ) činí 8,1 ng.ml⁻¹. (cit. 16)

Thymol se plynovou chromatografií s plamenově ionizačním detektorem stanovuje také v medu a včelím vosku. K izolování látek, o které se zajímáme, slouží mikroextrakce tuhou fází, extrakce kapalina-kapalina nebo destilace.^{8, 17} Dalším způsobem detekce při

použití plynové chromatografie je MS, takto se stanovuje thymol a jemu podobné látky nalézající se v extraktech rostlin.¹⁸

Pro analýzu rostlinných extraktů se dodnes jako srovnávací metoda užívá tenkovrstvá chromatografie. Srovnání moderních metod tenkovrstvé chromatografie pro tuto problematiku nabízí článek Comparison of planar chromatographic methods (TLC, OPLC, AMD) applied to essential oils of wild thyme and seven chemotypes of thyme.¹⁹

1.3 Uhlíková pastová elektroda

Uhlíkové pastové elektrody (CPE) patří ke zvláštní skupině heterogenních elektrod. Jsou tvořeny uhlíkovou pastou, což je směs připravená z uhlíkového prášku a vhodného kapalného pojiva. Tato směs se plní do elektrodového těla. Přes veškeré výhody jsou tyto elektrody užívány především pro voltametrii, nicméně je lze použít i při amperometrii, coulometrii a potenciometrii. Hlavním důvodem, proč jsou uhlíkové pastové elektrody tak populární, je, že se snadno připravují, a to za velmi nízké náklady. Tyto elektrody se dají využít pro anorganickou i organickou elektroanalýzu i analýzu léčiv a jejich metabolických reziduí v biologických materiálech.^{20, 21}

Uhlíková pastová elektroda byla vyvinuta R. N. Adamsem na přelomu 50. a 60. let minulého století. Původně měla suspenze uhlíkového prášku a kapaliny nahradit rtuťovou elektrodu. Tento systém byl nepoužitelný, ale ukázalo se, že hustší směs těchto látek má zajímavé vlastnosti a lze jí v elektrochemii s výhodou využít.²² Po tomto objevu došlo k pomalému vývoji CPE k čemuž výrazně přispěl i strach z toxicity rtuti. V polovině 60. let minulého století došlo k vývoji modifikovaných past, které našly v pozdější době nejvýraznější uplatnění. Způsobů modifikace past je mnoho, dá se modifikovat grafitový prášek, pojivo ale i jen povrch elektrody.²²

Nemodifikovaná pasta je připravena pouze ze dvou složek, a to z uhlíkového prášku a kapalného pojiva. Uhlík je většinou ve formě spektroskopického grafitu nebo podobných materiálů a pojivo, tedy pastovací kapalina, je lipofilní organická kapalina. K dalším vlastnostem uhlíkového prášku patří to, že by jeho částice měly mít danou velikost, čistotu i sorpční schopnost. Naproti tomu pojivo by mělo být málo těkavé, nemísitelné s vodnými roztoky a mělo by být chemicky i elektrochemicky inertní. Obě tyto složky nepochybně ovlivňují elektrochemické chování CPE jako celku.²¹

Způsobů, jak připravit pastu, je mnoho. Jedním z nich je homogenizace za pomoci třecí misky a tloučku, dalším je homogenizace v porcelánové odpařovací misce.²¹ Při naší práci se osvědčila příprava pasty v odpařovací misce homogenizací tloučkem. Homogenizace je poměrně zdlouhavý proces, vyžaduje nejen trpělivost, ale i

trochu síly tak, aby se pastovací kapalina co nejlépe propojila s uhlíkovým práškem. 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.²³

V současné době je využití uhlíkových past poměrně rozšířené. Uhlíkové pasty mají ve většině užívaných elektrolytů potenciálový rozsah cca -1,5 V až +1,0 V vs. SKE v závislosti na pH prostředí.²³

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité chemikálie

Studovaná látka:

Thymolum (Tamda a. s., Olomouc)

Zásobní roztok o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním přesně odváženého množství látky v methanolu (p.a., Lach-Ner, Neratovice). Roztoky o nižších koncentracích byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku methanolem. Všechny roztoky byly uchovávány v temnu v chladničce za konstantní teploty $5 \text{ }^\circ\text{C}$.

Pro přípravu mobilních fází byl použit methanol (p.a., Lach-Ner, Neratovice). K přípravě vodných roztoků a mobilních fází byla používána deionizovaná voda (Millipore Q-plus System, Millipore, USA).

Brittonovy-Robinsonovy tlumivé roztoky²⁴ o příslušném pH (dále jen BRP) byly připraveny smísením vodného roztoku hydroxidu sodného (p.a., Lachema Brno) o koncentraci $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ s roztokem, který obsahoval kyselinu boritou (p.a., Lachema Brno), kyselinu fosforečnou (85%, $\rho = 1,71 \text{ g.ml}^{-1}$, p.a., Lachema Brno) a kyselinu octovou (98%, $\rho = 1,06 \text{ g.ml}^{-1}$, p.a., Lach-Ner, Neratovice), každou o koncentraci $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$. Pomocí pH metru byl nejprve připraven tlumivý roztok o přibližném pH, který byl zředěn deionizovanou vodou v poměru 1:4 (v/v). Přesné pH bylo po té změřeno pH metrem. Tento zředěný tlumivý roztok je v dalším textu označen jako zř. BRP.

Mobilní fáze byla připravena smísením zř. BRP a methanolu 1:9 (v/v). Z roztoku byl odstraněn vzduch pomocí ultrazvukové čističky. V textu uvedené hodnoty pH jsou hodnoty pH vodné složky mobilní fáze před smícháním a methanolem.

Uhlíková pasta byla připravena homogenizováním 250 mg mikrokuliček skelného uhlíku (průměr 0,4-12 μm , Alpha Aesar, USA) a 90 μl minerálního oleje (Fluka Biochemika, Švýcarsko) v odpařovací misce. Hotová směs byla napěchována do teflonového těla elektrody.

Uhlíková pasta byla z těla elektrody vytlačována pomocí nerezového pístu. Aktivní plocha elektrody byla obnovována otřením vlhkým filtračním papírem.

Reálné vzorky:

Septolete[®] D (Krka, Slovinsko)

Mateřídouškový sirup s vitamínem C (Dr. Müller Pharma, Hradec Králové)

2.2 Použité přístroje

Měření HPLC

Pumpa: vysokotlaká pumpa HPP5001 (Laboratorní přístroje, Praha)

Nástřik byl proveden injekční stříkačkou o objemu 2 ml

Dávkovací smyčka: LCI 30 o objemu 20 μ l (Laboratorní přístroje, Praha)

Kolona: Lichrospher[®] RP-18, 100 (5 μ m), 125x4 mm (Lichro CART)

Elektrochemický detektor: Amperometrický detektor ADLC 2 (Laboratorní přístroje, Praha) pracoval v tříelektrodovém zapojení:

- pracovní elektroda: Uhlíková pastová elektroda (teflonové tělo, nerezový píst, kruhová aktivní plocha o průměru 3 mm)

- referentní elektroda: argentchloridová elektroda s 2 mol.l⁻¹ KCl.

- pomocná elektroda: platinová plíšková elektroda

Programové vybavení: CSW 1.7 (DataApex Ltd.) pracující v prostředí Windows 95 (Microsoft)

pH metr

Digitální měřicí přístroj Conductivity and pH meter 4220 (Jenway, UK) s kombinovanou skleněnou elektrodou (PCH 2411)

Spektrofotometr:

PU 8800 (Philips, UK) s použitím křemenných kyvet o tloušťce 1 mm

Odstranění vzduchu:

ultrazvuková čistička PS 02000A (Powersonic, USA)

Voltametrická měření

Eko-Tribo polarograf (Polaro-Sensors, Praha) pracující v tříelektrodovém zapojení:

- pracovní elektroda: Uhlíková pastová elektroda (teflonové tělo, nerezový píst, kruhová aktivní plocha o průměru 1 mm)

- referentní elektroda: nasycená argentchloridová elektroda

- pomocná elektroda: platinová drátková elektroda

Programové vybavení: Polar Pro verze 4 (Polaro–Senzors, Praha) pracující v prostředí Windows 95 (Microsoft).

2.3 Pracovní postupy

2.3.1 Stálost zásobního roztoku thymolu

Stálost zásobního roztoku studované látky o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ byla studována spektrofotometricky. Absorpční spektrum bylo měřeno v křemenných kyvetách proti methanolu v rozmezí vlnových délek 200 až 700 nm.

2.3.2 HPLC stanovení s elektrochemickou a UV detekcí

Byl měřen roztok thymolu v methanolu, dávkováno bylo 20 μl . Měření bylo provedeno v neinterstatované koloně Lichrospher[®] (Merck), průtok mobilní fáze o daném složení byl $0,5 \text{ ml.min}^{-1}$.

UV detekce thymolu probíhala při 276 nm, což je absorpční maximum této látky⁵. Mrtvý čas kolony byl určen nástřikem vodného roztoku dusičnanu sodného o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$, který byl detegován při 230 nm.

Elektrochemický detektor typu wall-jet byl zapojen sériově za UV detektor. Všechny tři elektrody byly umístěny v mobilní fázi a k povrchu pracovní byl pomocí kapiláry přiveden proud mobilní fáze z kolony. Všechny křivky byly proměřeny nejméně třikrát.

K určení optimálních podmínek stanovení byl dávkován roztok o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ thymolu v methanolu. Byly změřeny hydrodynamické voltamogramy tj. závislosti výšky či plochy píku na potenciálu vloženém na elektrodu. Měření bylo uskutečněno při pH 2,5; 5 a 7. Volba rozsahu pH je založena na možnostech kolony, která neumožňuje použití v zásadité oblasti. Vložený potenciál byl v rozmezí +0,5 V až +1,5 V.

Kalibrační závislosti byly proměřeny v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-4}$ až $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ thymolu v methanolu a zpracovány metodou lineární regrese. Meze detekce L_D (mol.l^{-1}) byly stanoveny jako množství analytu poskytující signál, jehož

výška je rovna trojnásobku absolutní hodnoty šumu $S/N = 3$. Získané hodnoty úseků kalibračních závislostí byly otestovány studentovým t-testem²⁵, zda se na hladině pravděpodobnosti $\alpha = 0,05$ statisticky významně neliší od nuly.

2.3.3 Voltametrické stanovení

Měření bylo provedeno ve voltametrické nádobce, která obsahovala roztoky o dané koncentraci thymolu v 10% methanolu. K danému objemu zásobního roztoku thymolu v methanolu bylo přidáno takové množství methanolu, aby roztok obsahoval vždy 10 % methanolu. Roztok byl doplněn po rysku (10 ml) BRP o daném pH.

Měření bylo provedeno metodou DPV s uhlíkovou pastovou elektrodou jako pracovní elektrodou při vkládaném napětí 0 až +1200 mV s rychlostí polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, výška pulsu byla nastavena na 50 mV a šířka pulsu na 80 ms. Před každým měřením byla klidová doba 10 s.

Při optimalizaci podmínek bylo proměřeno rozmezí pH 2 až 12.

Za optimálních podmínek byly proměřeny koncentrační závislosti od $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ thymolu o optimálním pH k nižším koncentracím.

Při studiu vlivu doby akumulace na výšku píku thymolu metodou AdS DPV byla adsorpce prováděna v míchaném roztoku při potenciálu akumulace 0 mV a koncentraci $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ thymolu.

Všechny křivky ve všech měřeních byly proměřeny alespoň třikrát.

2.4 Použité vzorce

Výpočet retenčního faktoru²⁶

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

Výpočet počtu teoretických pater²⁶

$$N = 5,545 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$$

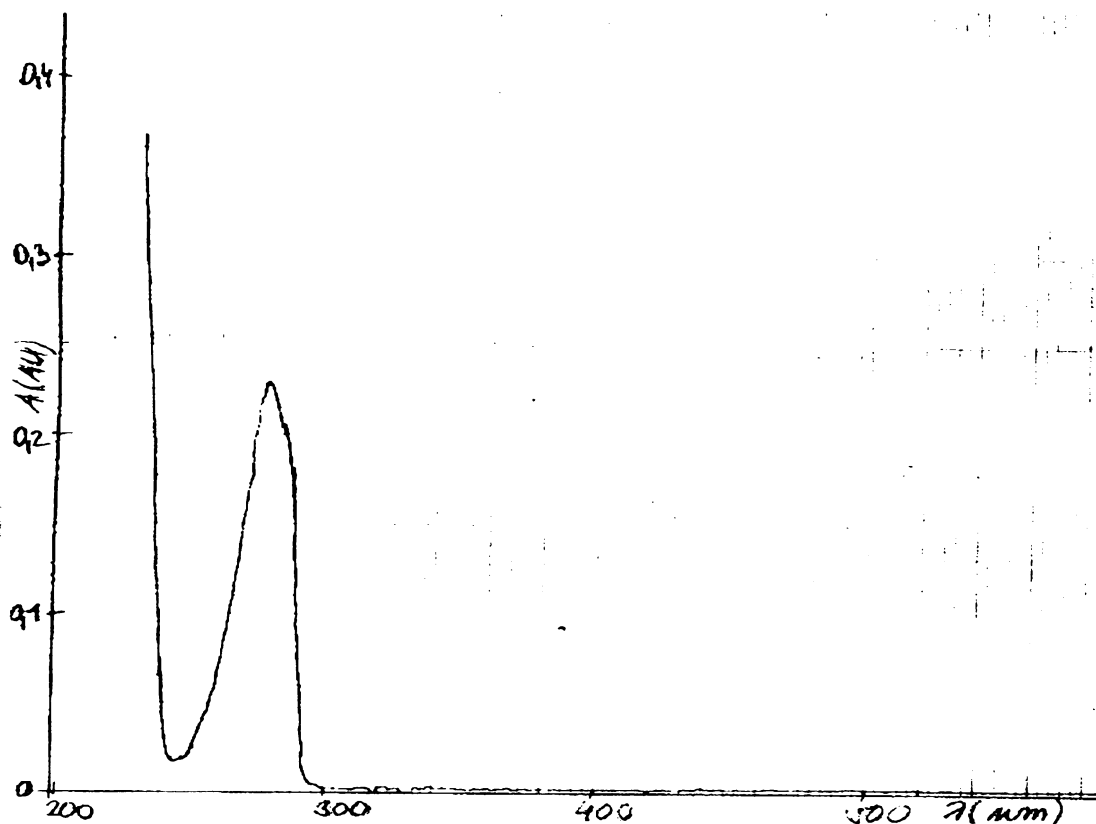
Interval spolehlivosti²⁷

$$\bar{x} \pm R \cdot K_n$$

3. VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Studium stálosti zásobního roztoku thymolu pomocí spektrofotometre

Absorpční spektrum roztoku thymolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ naměřené v rozmezí vlnových délek 200 až 700 nm viz Obr. 3.1



Obr. 3.1 UV/VIS absorpční spektrum thymolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ měřeno v 1mm křemenné kyvetě proti methanolu.

Z absorpčního spektra vyplývá, že změřené absorpční maximum thymolu odpovídá dostupným informacím²⁸ a rovná se 276 nm. Při této vlnové délce byla měřena absorbance zásobního roztoku thymolu, naměřené hodnoty viz Tab. 3.1. Z těchto hodnot vyplývá, že zásobní roztok o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ thymolu

v methanolu je při uchování v chladničce za teploty 5 °C a v temnu stálý nejméně 3,5 měsíce.

Tab. 3.1 Stálost zásobního roztoku o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ thymolu v methanolu při vlnové délce 276 nm.

<i>t</i> (dny)	0	7	15	30	60	95	108
<i>A</i> (AU)	0,230	0,228	0,230	0,227	0,228	0,229	0,227
%	100,9	100,0	100,9	99,5	100,0	100,4	99,5

3.2 HPLC stanovení s UV a elektrochemickou detekcí

3.2.1 Optimalizace podmínek

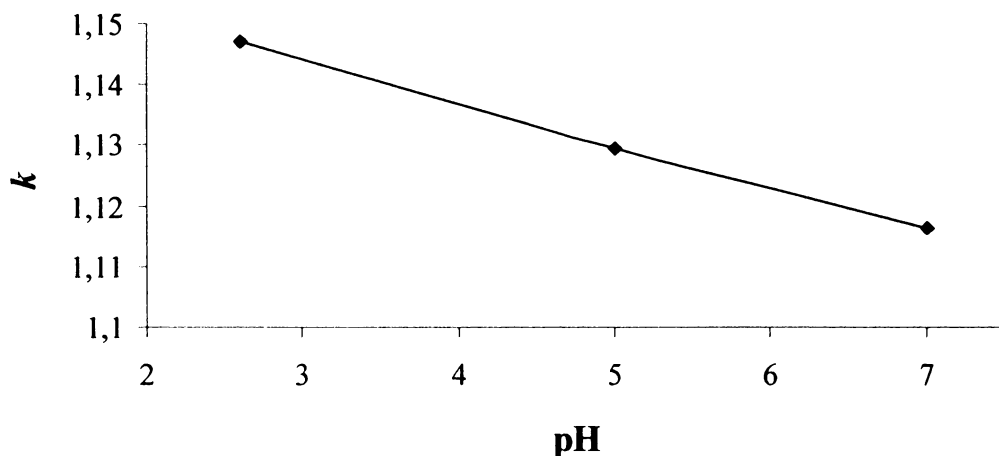
Vliv pH mobilní fáze na retenční charakteristiky

K nalezení optimálních podmínek bylo měření provedeno s mobilní fází o pH 2,5; 5 a 7 s průtokem $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. K detekci byl použit UV/VIS detektor při vlnové délce 276 nm. Mrtvý čas kolony byl určen nadávkováním vodného roztoku dusičnanu sodného o koncentraci $1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, který byl detegován při 230 nm. Mrtvý čas byl 1,41 min. Výsledky měření retenčních charakteristik jsou shrnuty v Tab. 3.2 a v grafické formě jsou uvedeny na Obr. 3.2 a 3.3.

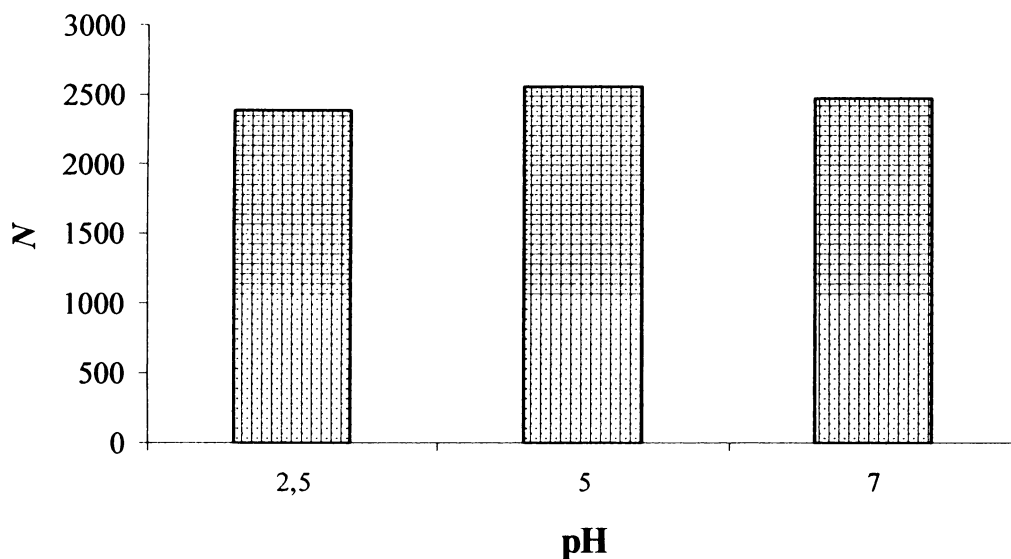
Z výsledků měření je patrné, že pH mobilní fáze nemá téměř žádný vliv na retenční charakteristiky. Počet teoretických pater není vysoký, ale cílem měření nebyla separace, takže tato skutečnost není problémem.

Tab. 3.2 Vliv pH mobilní fáze na retenční charakteristiky thymolu (dávkováno $20 \mu\text{l}$ roztoku o koncentraci $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ thymolu v methanolu, mobilní fáze zř. BRP o daném pH : methanolu 1 : 9(v/v) , $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, kolona Lichrospher® RP-18, 100-5 μm , 125 x 4 mm, UV detekce při 276 nm)

pH	t_R (min)	$w_{1/2}$ (min)	k	N
2,5	3,03	0,15	1,15	2392
5,0	3,00	0,14	1,13	2548
7,0	2,98	0,14	1,12	2477



Obr. 3.2 Závislost retenčního faktoru thymolu na pH mobilní fáze (dávkováno 20 μl roztoku o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ thymolu v methanolu, mobilní fáze zř. BRP o daném pH : methanol 1 : 9 (v/v) , $0,5 \text{ ml.min}^{-1}$, kolona Lichrospher[®] RP – 18, 100 – 5 μm , 125 x 4 mm, UV detekce při 276 nm)

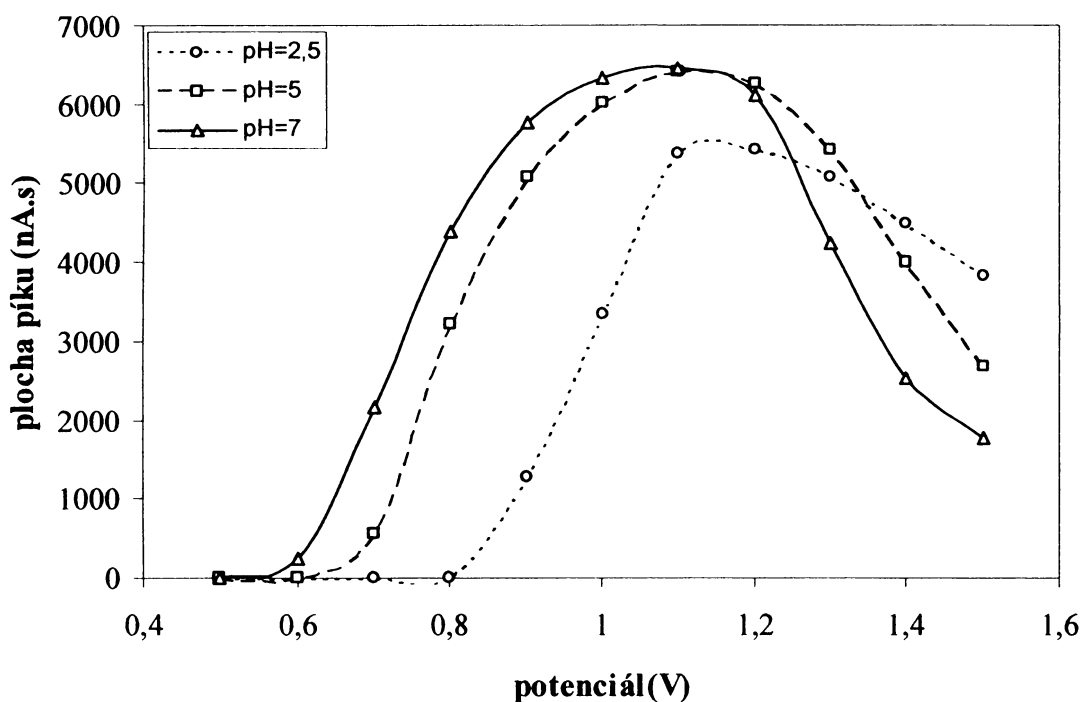


Obr 3.3 Závislost počtu teoretických pater kolony na pH mobilní fáze (dávkováno 20 μl roztoku o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ thymolu v methanolu, mobilní fáze zř. BRP o daném pH : methanol 1 : 9 (v/v) , $0,5 \text{ ml.min}^{-1}$, kolona Lichrospher[®] RP – 18, 100 – 5 μm , 125 x 4 mm, UV detekce při 276 nm)

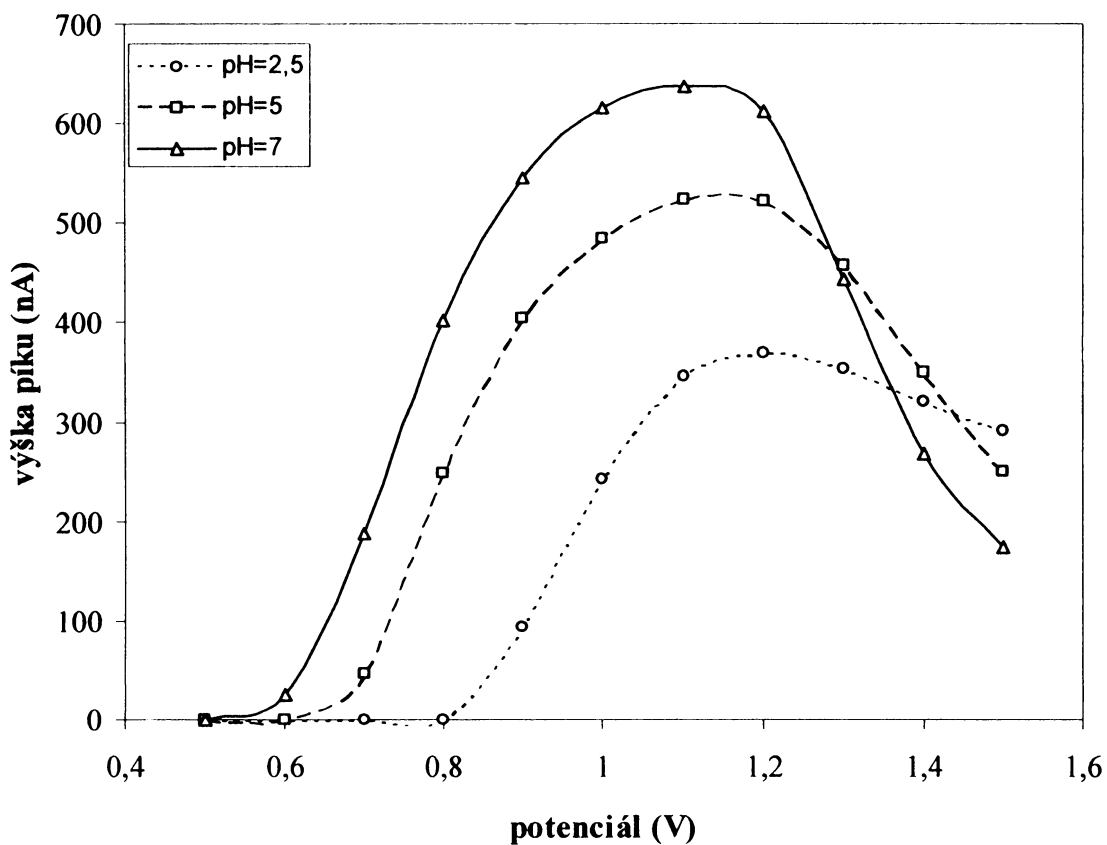
Hydrodynamické voltamogramy

K optimalizaci stanovení je nutné znát nejen optimální pH, ale i optimální potenciál pracovní elektrody. Ten se určil pomocí hydrodynamických voltamogramů tj. závislosti výšky či plochy píku na potenciálu vkládaném na elektrodu. Měření bylo provedeno pro pH mobilní fáze 2,5; 5 a 7. Hodnoty potenciálů pracovní elektrody byly v rozmezí +0,5 V až +1,5 V. Dávkován byl roztok o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ thymolu v methanolu. Hydrodynamické voltamogramy thymolu jsou uvedeny na Obr.3.4 a 3.5.

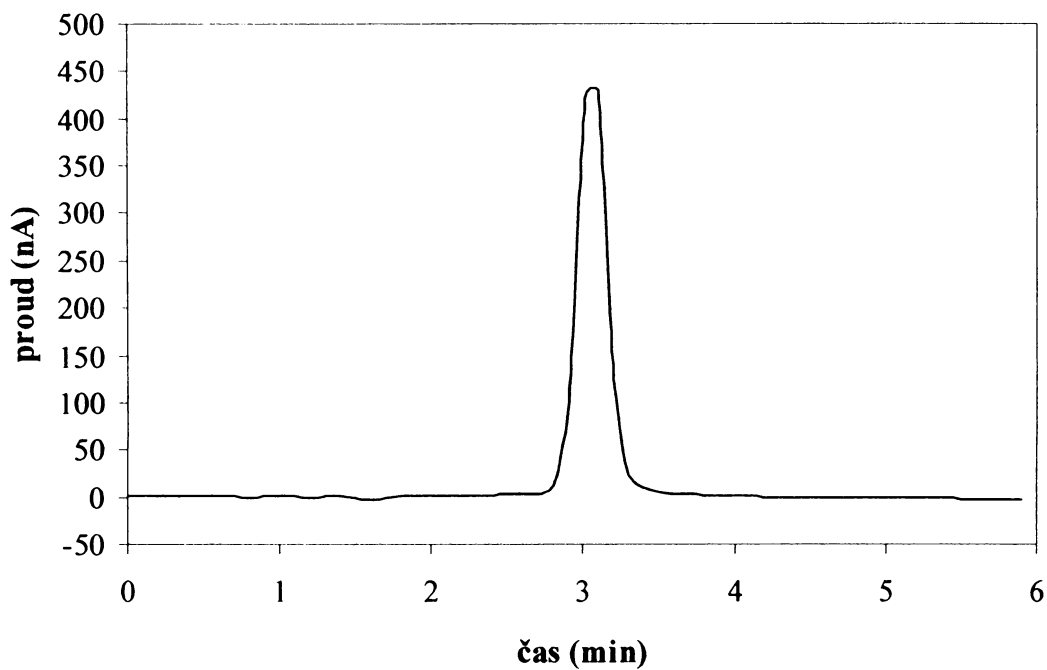
Jako optimální podmínky stanovení thymolu pro další měření byly vyhodnoceny potenciál +1,1 V a pH mobilní fáze 7, chromatogram při těchto podmínkách je znázorněn na Obr.3.6.



Obr. 3.4 Hydrodynamické voltamogramy thymolu vyhodnocené z ploch píků (dávkováno 20 μl roztoku o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ thymolu v methanolu, mobilní fáze zř. BRP o daném pH : methanol 1 : 9 (v/v) , 0,5 ml.min⁻¹, kolona Lichrospher® RP – 18, 100 – 5 μm , 125 x 4 mm, elektrochemická detekce na CPE)



Obr. 3.5 Hydrodynamické voltamogramy thymolu vyhodnocené z výšek píků (dávkováno 20 μl roztoku o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ thymolu v methanolu, mobilní fáze zř. BRP o daném pH : methanol 1 : 9 (v/v)), $0,5 \text{ ml.min}^{-1}$, kolona Lichrospher[®] RP – 18, $100 - 5 \mu\text{m}$, $125 \times 4 \text{ mm}$, elektrochemická detekce na CPE)



Obr. 3.6. Chromatogram thymolu při +1,1 V a pH = 7 (amperometrická detekce na CPE, dávkováno 20 μ l roztoku o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol.l⁻¹ thymolu v methanolu, mobilní fáze zř. BRP : methanol 1 : 9 (v/v)), 0,5 ml.min⁻¹, kolona Lichrospher® RP – 18, 100 – 5 μ m, 125 x 4 mm)

3.2.2 Kalibrační závislosti

Zjištěné optimální podmínky tzn. +1,1 V a pH mobilní fáze rovno 7 byly využity pro změření kalibračních závislostí thymolu v methanolu. Dávkováno bylo 20 μl roztoku thymolu v methanolu. Měření probíhalo za podmínek uvedených v kapitole 2.3.2.

Spektrofotometrická detekce

UV detekce probíhala při 276 nm. Proměřeny byly koncentrace v rozmezí $8 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$, nižší koncentrace již nebylo možné vyhodnotit.

Změřené kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese, vyhodnocení bylo provedeno z ploch i výšek píků. Vypočtené parametry kalibračních závislostí jsou uvedeny v Tab. 3.3 a 3.4. Celkové kalibrační křivky vyhodnocené z ploch resp. výšek píků jsou na Obr. 3.7 a 3.8.. Z naměřených údajů je patrné, že kalibrační křivky jsou lineární v celé měřené oblasti, druhá mocnina korelačních koeficientů se pohybuje v rozmezí hodnot 0,9992 až 1,0000. Na Obr. 3.9 a 3.10 jsou znázorněny kalibrační křivky v celém koncentračním rozmezí v logaritmické formě, tato data prokazují linearitu závislostí, protože hodnota jejich směrnic je blízká jedné. Otestováním úseků na hladině pravděpodobnosti $\alpha = 0,05$, bylo zjištěno, že se statisticky neliší od nuly.

Mez detekce, která byla vypočtena jako koncentrace odpovídající trojnásobku absolutní hodnoty šumu, byla $6,7 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$.

Tab. 3.3 Parametry kalibračních závislostí thymolu pro HPLC stanovení se spektrofotometrickou detekcí při 276 nm – vyhodnoceno z ploch píků.

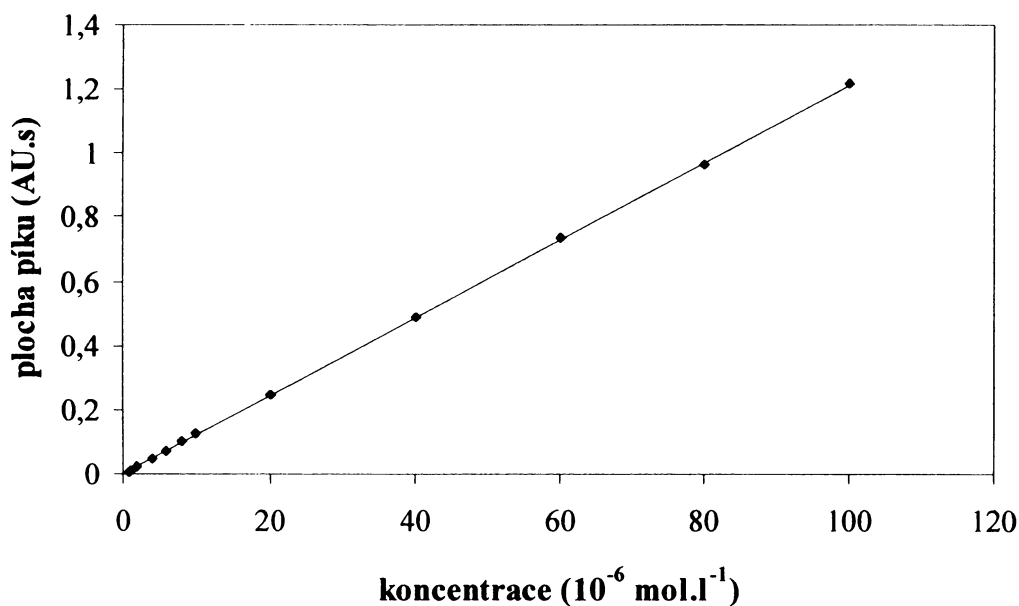
Koncentrační rozmezí (mol.l^{-1})	Směrnice (AU.s.l.mol^{-1})	Úsek (mAU.s)	R^2
$2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	12072	+6,00	0,9999
$8 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$	13091	-3,08	0,9992

Parametry logaritmické závislosti plochy píku na koncentraci roztoku thymolu:
směrnice : 1,05, úsek : +7,30, $R^2 = 0,9965$.

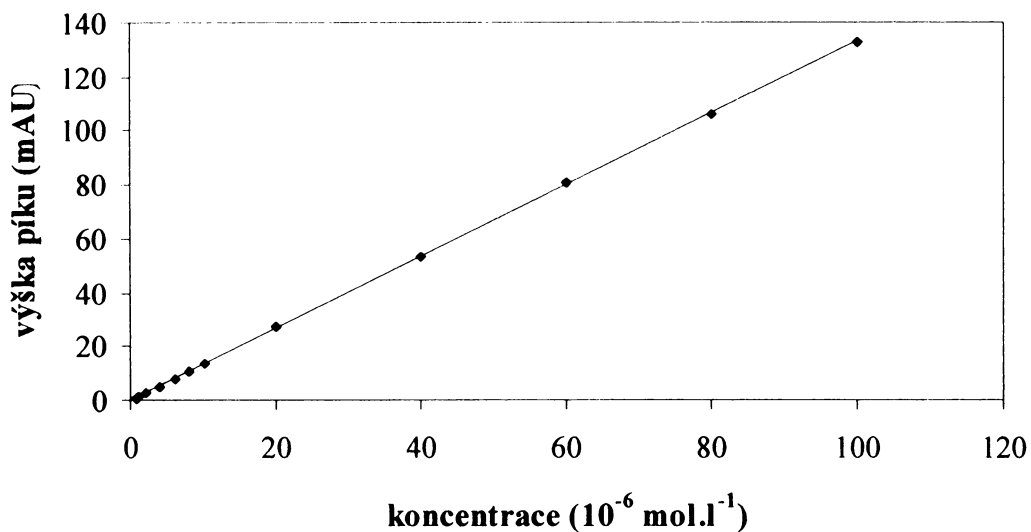
Tab. 3.4 Parametry kalibračních závislostí thymolu pro HPLC stanovení se spektrofotometrickou detekcí při 276 nm – vyhodnoceno z výšek píků

Koncentrační rozmezí (mol.l^{-1})	Směrnice (AU.s.l.mol^{-1})	Úsek (mAU.s)	R^2
$2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	1319	+1,04	1,0000
$8 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$	1362	-0,02	0,9992

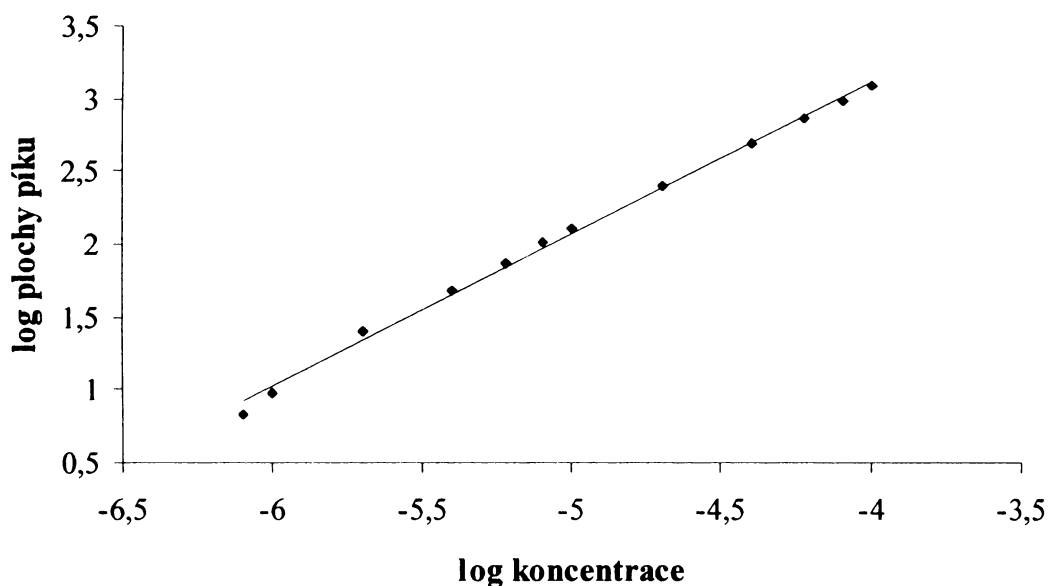
Parametry logaritmické závislosti výšky píku na koncentraci roztoku thymolu:
směrnice : 1,00, úsek : +6,14, $R^2 = 0,9994$.



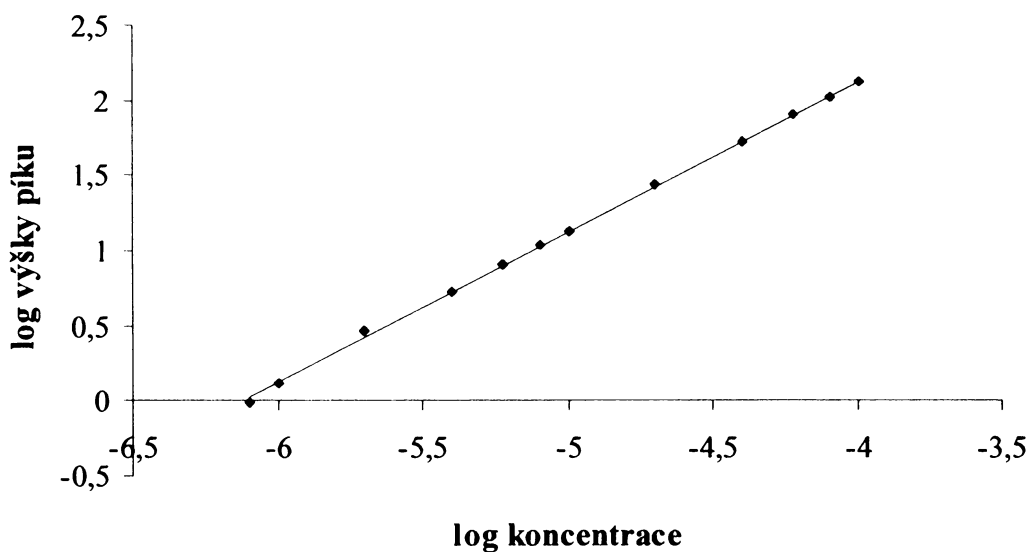
Obr. 3.7 Kalibrační závislost thymolu vyhodnocená z ploch píků v koncentračním rozmezí $8 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ pro UV detekci při 276 nm (dávkováno 20 μl roztoku thymolu v methanolu, mobilní fáze zř. BRP o $\text{pH} = 7$: methanol 1 : 9 (v/v), $0,5 \text{ ml.min}^{-1}$, kolona Lichrospher[®] RP – 18, $100 - 5 \mu\text{m}$, $125 \times 4 \text{ mm}$)



Obr. 3.8 Kalibrační závislost thymolu vyhodnocená z výšek píků v koncentračním rozmezí $8 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ pro UV detekci při 276 nm (dávkováno 20 μl roztoku thymolu v methanolu, mobilní fáze zř. BRP o $\text{pH} = 7$: methanol 1 : 9 (v/v), $0,5 \text{ ml.min}^{-1}$, kolona Lichrospher[®] RP – 18, $100 - 5 \mu\text{m}$, $125 \times 4 \text{ mm}$)



Obr. 3.9 Kalibrační závislost thymolu v logaritmicke formě vyhodnocená z ploch píků v koncentračním rozmezí $8 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ pro UV detekci při 276 nm (dávkováno 20 μl roztoku thymolu v methanolu, mobilní fáze zř. BRP o $\text{pH} = 7$: methanol 1 : 9 (v/v), $0,5 \text{ ml.min}^{-1}$, kolona Lichrospher[®] RP – 18, $100 - 5 \mu\text{m}$, $125 \times 4 \text{ mm}$)



Obr. 3.9 Kalibrační závislost thymolu v logaritmické formě vyhodnocená z výšek píků v koncentračním rozmezí $8 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol.l⁻¹ pro UV detekci při 276 nm (dávkováno 20 µl roztoku thymolu v methanolu, mobilní fáze zř. BRP o pH = 7 : methanol 1 : 9 (v/v), 0,5 ml.min⁻¹, kolona Lichrospher® RP – 18, 100 – 5 µm, 125 x 4 mm)

Elektrochemická detekce

Zároveň se spektrofotometrickou detekcí byla prováděna i elektrochemická detekce za použití uhlíkové pastové elektrody jako pracovní elektrody. Na tuto elektrodu byl vložen optimální pracovní potenciál +1,1 V. U mobilní fáze bylo nastaveno pH = 7, které je optimální pro stanovení thymolu. Proměřováno bylo koncentrační rozmezí $4 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol.l⁻¹, nižší koncentrace již nebylo možné vyhodnotit.

Změřené kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese, vyhodnocení bylo provedeno z ploch i výšek píků. Parametry závislostí viz Tab. 3.5 a 3.6. Celkové kalibrační křivky vyhodnocené z ploch resp. výšek píků viz Obr. 3.11 a 3.12. Z naměřených údajů je patrné, že kalibrační křivky jsou lineární v celé změřené oblasti, druhá mocnina korelačních koeficientů se pohybuje v rozmezí hodnot 0,9917 až 1,0000. Na Obr. 3.13 a 3.14 jsou znázorněny kalibrační křivky v celém koncentračním rozmezí v logaritmické formě, tato data prokazují linearitu závislostí, protože hodnota jejich směrnic je blízká jedné. Otestováním úseků na hladině pravděpodobnosti $\alpha = 0,05$, bylo zjištěno, že se statisticky významně neliší od nuly.

Mez detekce, která byla vypočtena jako koncentrace odpovídající trojnásobku absolutní hodnoty šumu, byla $2,9 \cdot 10^{-7}$ mol.l⁻¹.

Porovná-li se meze detekce pro spektrofotometrickou a elektrochemickou metodu detekce, je zřejmé, že detekci na uhlíkové pastové elektrodě bylo dosaženo lepších výsledků.

Tab. 3.5 Parametry kalibračních závislostí thymolu pro HPLC stanovení s amperometrickou detekcí na CPE – vyhodnoceno z ploch píků.

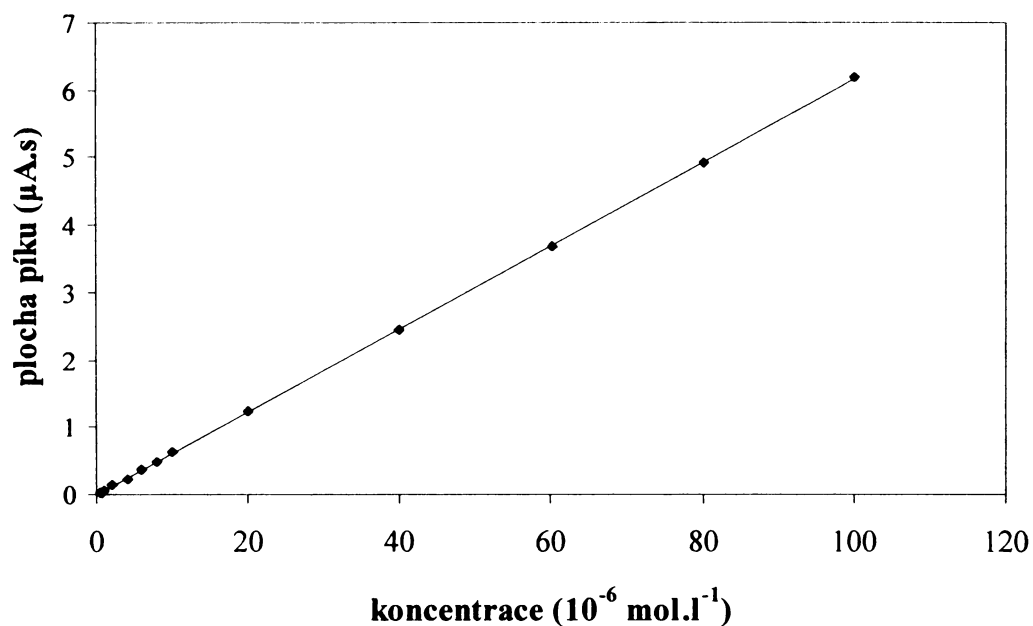
Koncentrační rozmezí (mol.l ⁻¹)	Směrnice (μA.s.l.mol ⁻¹)	Úsek (nA.s)	R ²
2.10 ⁻⁵ – 1.10 ⁻⁴	62076	-27,93	0,9999
2.10 ⁻⁶ – 1.10 ⁻⁵	62549	-1,98	0,9988
4.10 ⁻⁷ – 1.10 ⁻⁶	56011	-3,63	0,9957

Parametry logaritmické závislosti plochy píku na koncentraci roztoku thymolu:
směrnice : 1,04, úsek : +7,97, R² = 0,9988.

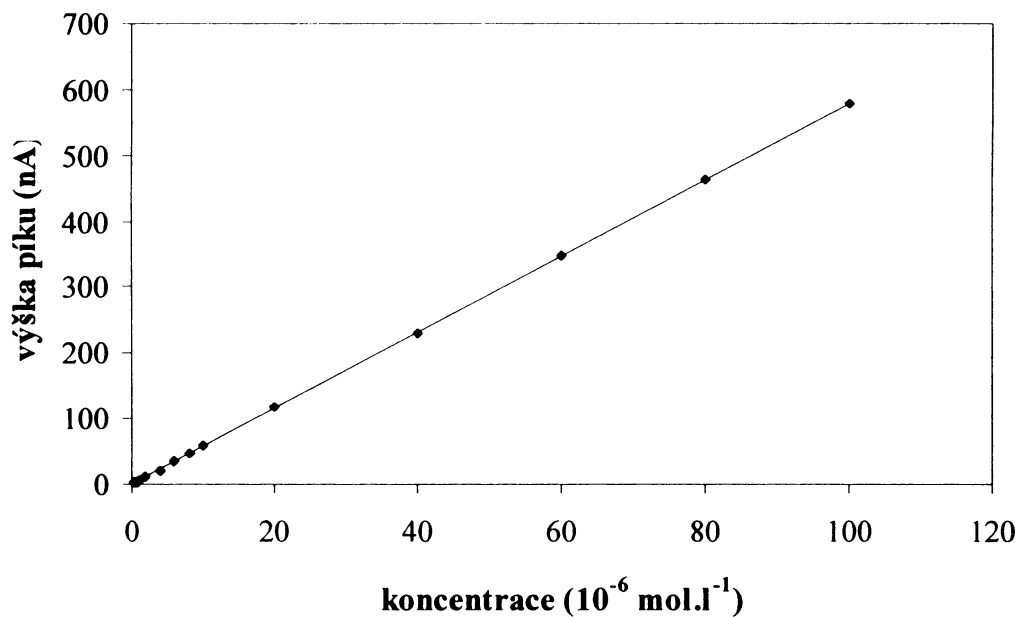
Tab. 4.4. Parametry kalibračních závislostí thymolu pro HPLC stanovení se amperometrickou detekcí na CPE – vyhodnoceno z výšek píků

Koncentrační rozmezí (mol.l ⁻¹)	Směrnice (μA.s.l.mol ⁻¹)	Úsek (nA.s)	R ²
2.10 ⁻⁵ – 1.10 ⁻⁴	5767	+2,00	1,0000
2.10 ⁻⁶ – 1.10 ⁻⁵	5810	-0,08	0,9984
4.10 ⁻⁷ – 1.10 ⁻⁶	5390	+0,02	0,9917

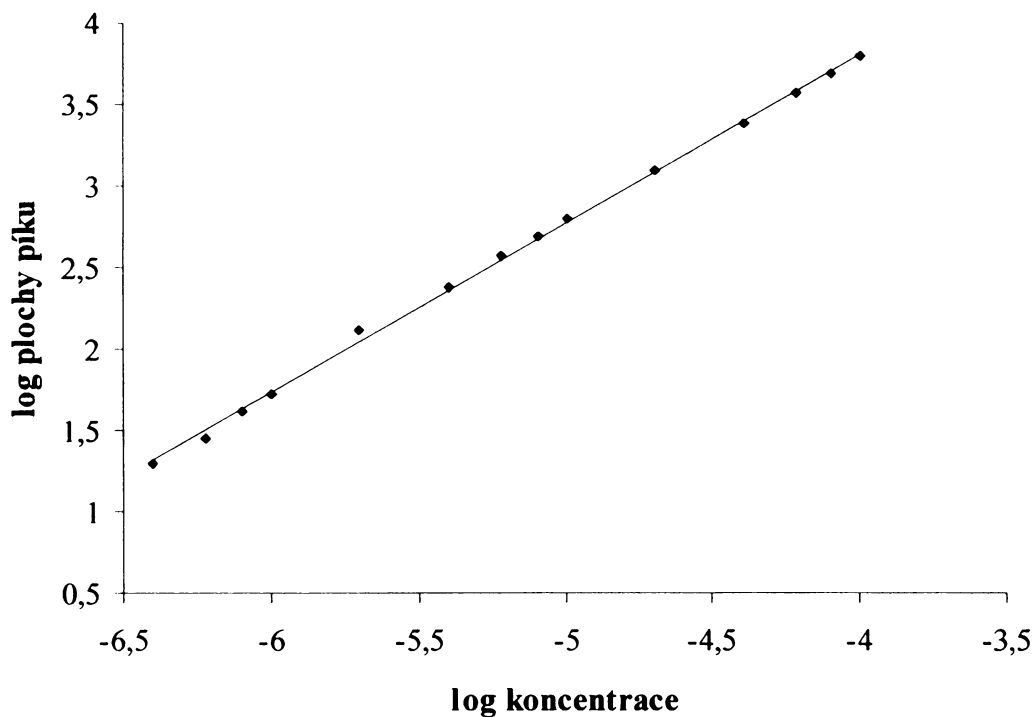
Parametry logaritmické závislosti výšky píku na koncentraci roztoku thymolu:
směrnice : 1,01, úsek : +6,81, R² = 0,9996.



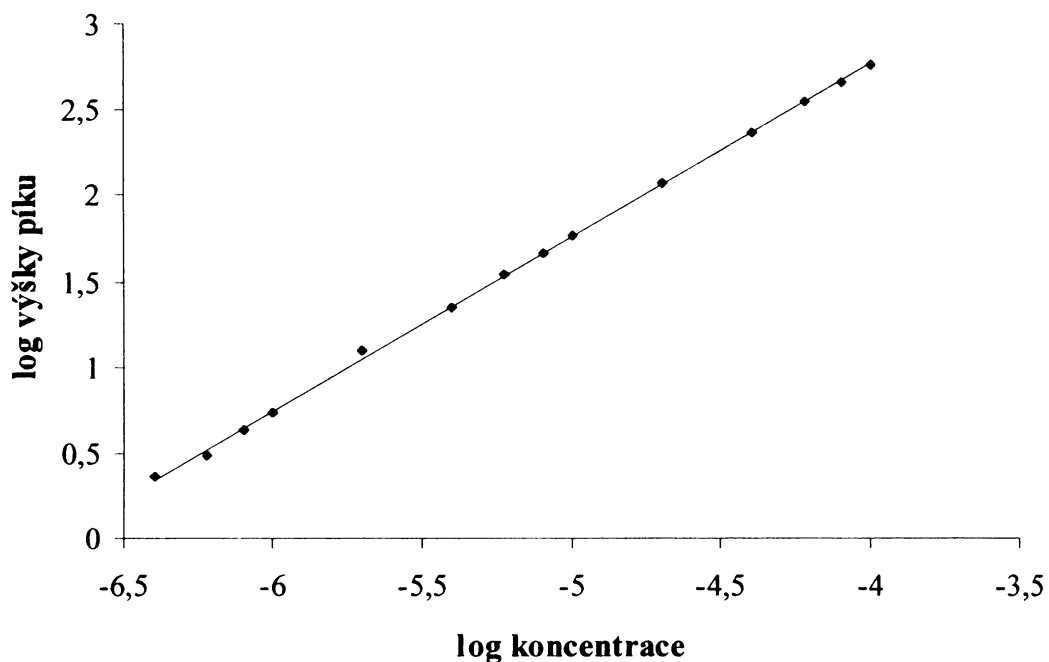
Obr. 3.11 Kalibrační závislost thymolu vyhodnocená z ploch píků v koncentračním rozmezí $4\cdot 10^{-7}$ až $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro amperometrickou detekci na CPE při potenciálu +1,1 V (mobilní fáze zř. BRP o pH = 7 : methanol 1 : 9 (v/v), $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, dávkováno $20 \mu\text{l}$ roztoku thymolu v methanolu, kolona Lichrospher[®] RP – 18, 100 – 5 μm , 125 x 4 mm)



Obr. 3.12 Kalibrační závislost thymolu vyhodnocená z výšek píků v koncentračním rozmezí $4 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ pro amperometrickou detekci na CPE při potenciálu +1,1 V (mobilní fáze zř. BRP o pH = 7 : methanol 1 : 9 (v/v), $0,5 \text{ ml.min}^{-1}$, dávkováno $20 \mu\text{l}$ roztoku thymolu v methanolu, kolona Lichrospher[®] RP – 18, $100 - 5 \mu\text{m}$, $125 \times 4 \text{ mm}$)



Obr. 3.13 Kalibrační závislost thymolu v logaritmické formě vyhodnocená z ploch píků v koncentračním rozmezí $4 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol.l⁻¹ pro amperometrickou detekci na CPE při potenciálu +1,1 V (dávkováno 20 μ l roztoku thymolu v methanolu, mobilní fáze zř. BRP o pH = 7 : methanol 1 : 9 (v/v), 0,5 ml.min⁻¹, kolona Lichrospher[®] RP – 18, 100 – 5 μ m, 125 x 4 mm)



Obr. 3.14 Kalibrační závislost thymolu v logaritmické formě vyhodnocená z výšek píků v koncentračním rozmezí $4 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol.l⁻¹ pro amperometrickou detekci na CPE při potenciálu +1,1 V (dávkováno 20 µl roztoku thymolu v methanolu, mobilní fáze zř. BRP o pH = 7 : methanol 1 : 9 (v/v), 0,5 ml.min⁻¹, kolona Lichrospher® RP – 18, 100 – 5 µm, 125 x 4 mm)

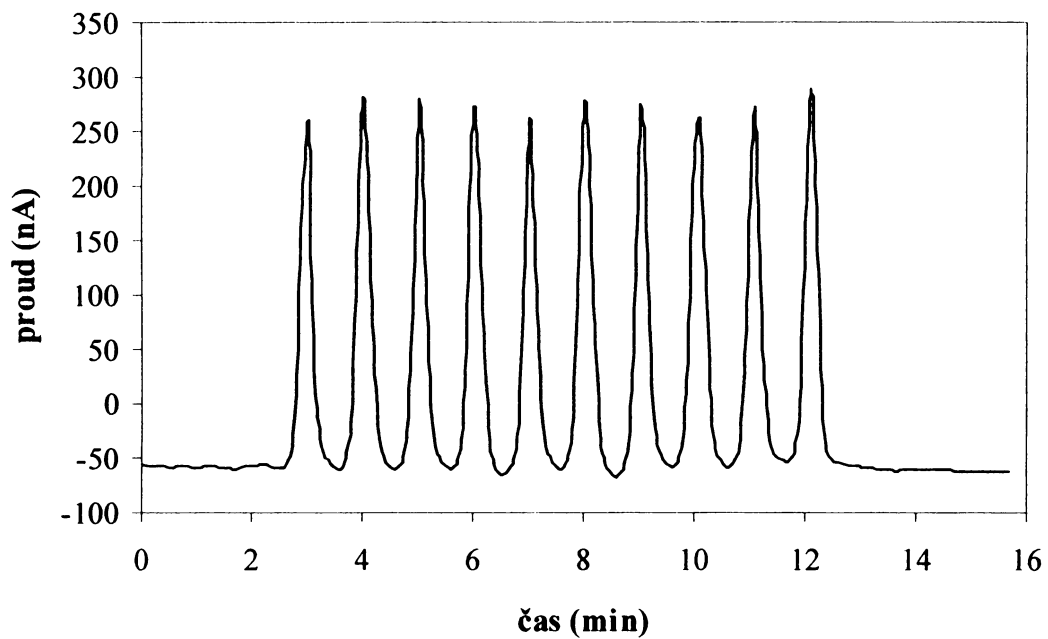
3.2.3 Opakovatelnost měření s uhlíkovou pastovou elektrodou pro metodu HPLC

Za optimálních podmínek měření byla zjištěna opakovatelnost měření elektrochemické detekce. Dávkováno bylo 20 μl roztoku o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ thymolu v methanolu v intervalech jedné minuty. Výsledky jsou zaznamenány a vyhodnoceny do Tab. 3.7 a záznam chromatogramu je na Obr. 3.15.

Stanovené relativní směrodatné odchylky byly 1,8 % pro plochu píku a 4,7 % pro výšku píku.

Tab. 3.7 Opakovatelnost měření elektrochemické detekce (dávkováno 20 μl roztoku o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ thymolu v methanolu, potenciál na CPE +1,1 V, mobilní fáze: zř. BRP o pH = 7 : methanol 1 : 9 (v/v), 0,5 ml.min^{-1} , kolona Lichrospher[®] RP – 18, 100 – 5 μm , 125 x 4 mm)

pík	plocha píku (nA.s)	výška píku (nA)
1	5373	399
2	5539	399
3	5500	415
4	5349	391
5	5320	363
6	5514	398
7	5520	405
8	5576	384
9	5452	367
10	5282	427
průměr	5442	395
<i>S</i>	98	19
<i>Sr</i>	1,8 %	4,7 %



Obr.3.15 Chromatogram opakovatelnosti měření elektrochemické detekce (dávkováno 20 μl roztoku o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ thymolu v methanolu, potenciál na CPE +1,1 V, mobilní fáze: zř. BRP o $\text{pH} = 7$: methanol 1 : 9 (v/v), $0,5 \text{ ml.min}^{-1}$, kolona Lichrospher[®] RP – 18, 100 – 5 μm , 125 x 4 mm)

3.3 Voltametrické stanovení thymolu

3.3.1 DPV stanovení

Vliv pH na voltametrické chování thymolu

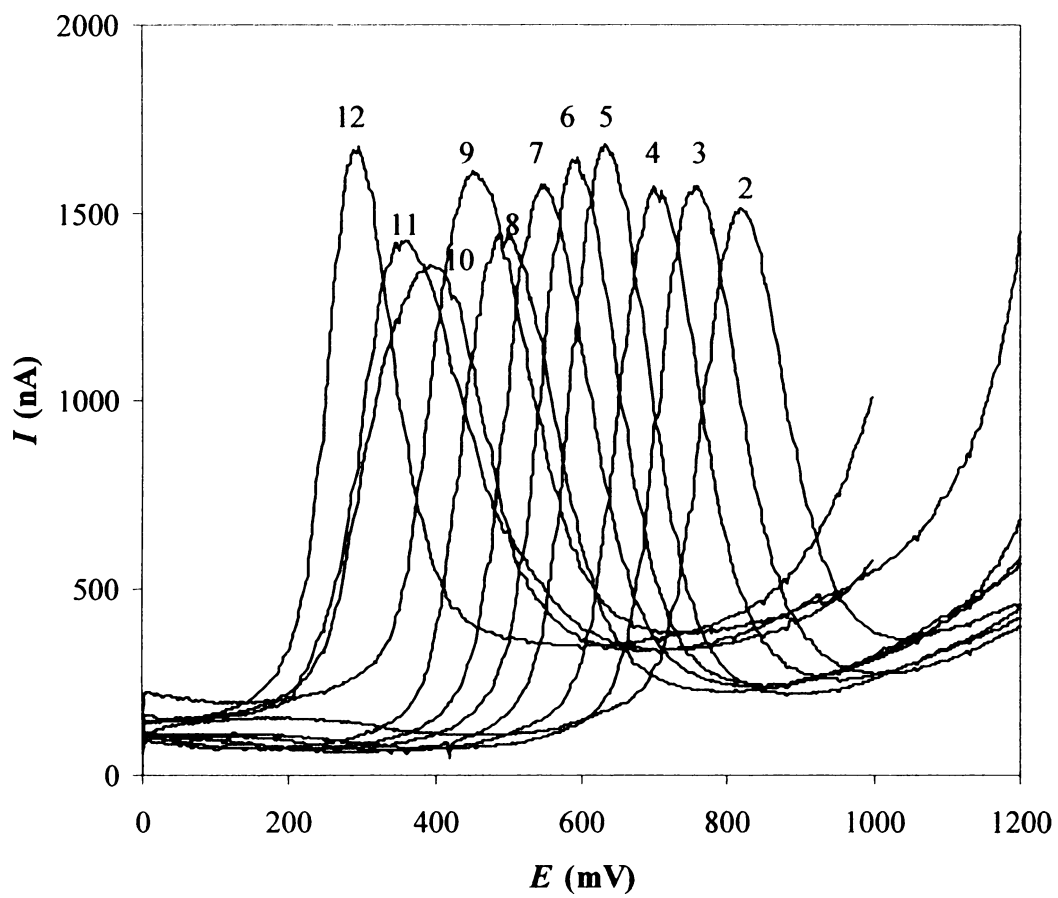
Vliv pH na voltametrické chování thymolu při diferenční pulsní voltametii na uhlíkové pastové elektrodě byl sledován v prostředí BRP o pH v rozmezí 2 až 12. Voltametrické křivky byly naměřeny za podmínek uvedených v kapitole 2.3.3. Koncentrace studované látky byla $1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$.

Získané křivky jsou zobrazeny na Obr. 3.16. Závislosti výšky a potenciálu píku na pH jsou uvedeny v Tab. 3.8. Z naměřených dat je patrné, že potenciál píku (E_p) thymolu se s rostoucím pH posunuje k negativnějším hodnotám. Závislost polohy píku na pH lze vyjádřit vztahem $E_p \text{ (mV)} = -50,3\text{pH} + 900,5$, druhá mocnina korelačního koeficientu je 0,9957, přičemž tento vztah byl vypočítán metodou lineární regrese. Výška píků se výrazně nemění.

Pro měření koncentračních závislostí bylo vybráno $\text{pH} = 4$.

Tab. 3.8 Závislost výšky píku (I_p) a potenciálu píku (E_p) na pH BRP pro thymol o koncentraci $1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$. Měřeno metodou DPV na CPE.

pH	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
I_p (nA)	1464	1553	1533	1648	1626	1543	1486	1576	1359	1427	1600
E_p (mV)	817	756	701	627	588	542	498	449	396	361	298



Obr. 3.16 DP voltamogramy thymolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ v prostředí BRP o pH 12 (kř. 12) až pH 2 (kř. 2)

Koncentrační závislost thymolu

Koncentrační závislosti thymolu byly proměřeny v prostředí BRP o pH 4 v rozmezí koncentrace $1 \cdot 10^{-4}$ až $2 \cdot 10^{-7}$ mol.l⁻¹, nižší hodnoty koncentrace již nebylo možné vyhodnotit. Křivky byly zaznamenány v potenciálovém rozsahu +0 mV až +1000 mV. Za těchto podmínek byla dosažena mez detekce $2 \cdot 10^{-7}$ mol.l⁻¹.

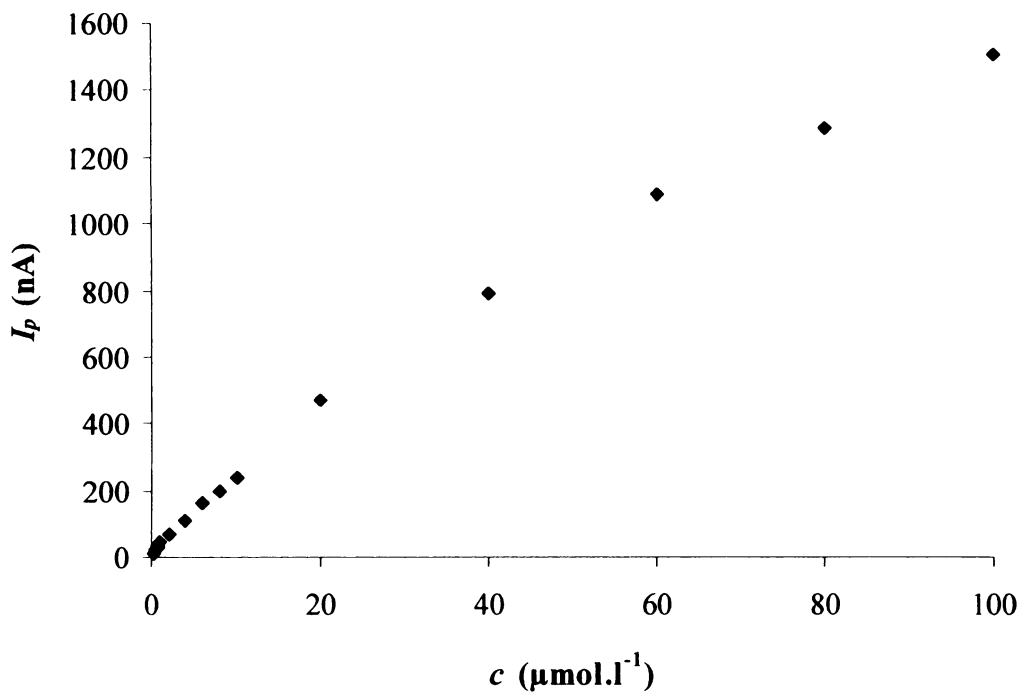
Kalibrační křivku v celém měřeném koncentračním rozmezí viz na Obr. 3.17 a její logaritmickou formu viz Obr. 3.18. Jak je zřejmé z parametrů logaritmické kalibrační křivky (směrnice byla rovna 0,787) i z Obr. 3.17, kalibrační křivka thymolu v prostředí BRP o pH = 4 není v celém rozsahu koncentrací lineární. Jednotlivé řády kalibračního rozmezí však lze proložit přímkou, parametry kalibračních závislostí jednotlivých řádů jsou uvedeny Tab. 3.9. Druhá mocnina korelačního koeficientu se pohybuje v rozmezí 0,9903 až 0,9961.

Vybrané DP voltamogramy jsou zobrazeny na Obr. 3.19.

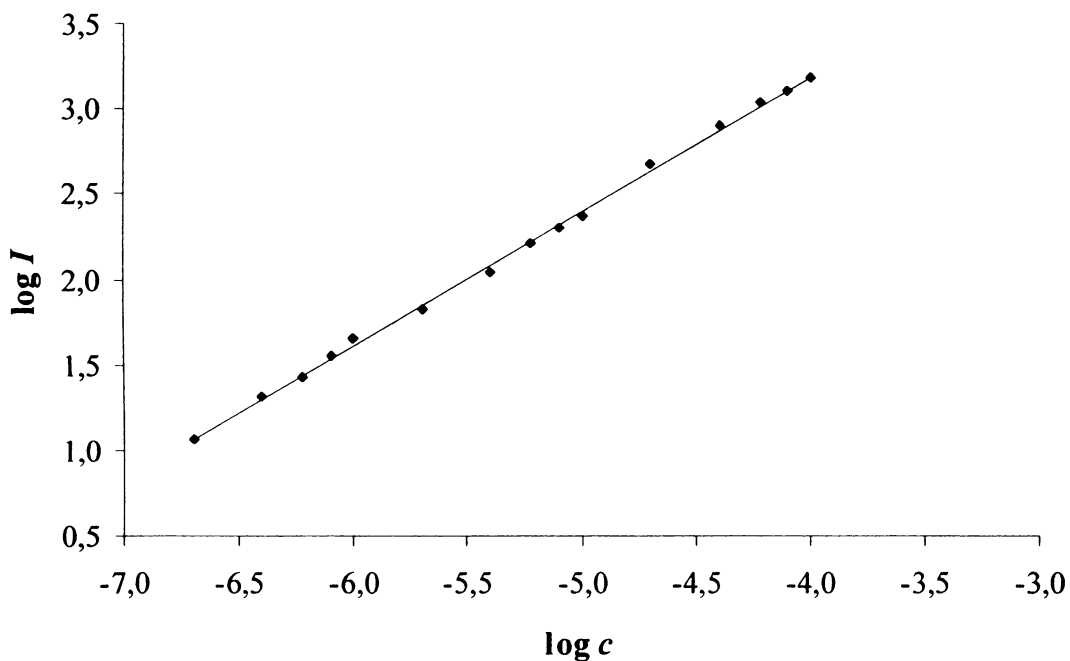
Tab. 3.9 Parametry kalibračních závislostí stanovení thymolu metodou DPV na CPE v prostředí BRP o pH = 4

Koncentrační rozmezí (mol.l ⁻¹)	Směrnice (mA.l.mol ⁻¹)	Úsek (nA)	R ²
$2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	12,83	258,1	0,9903
$2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	21,30	26,2	0,9961
$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	40,92	3,4	0,9944

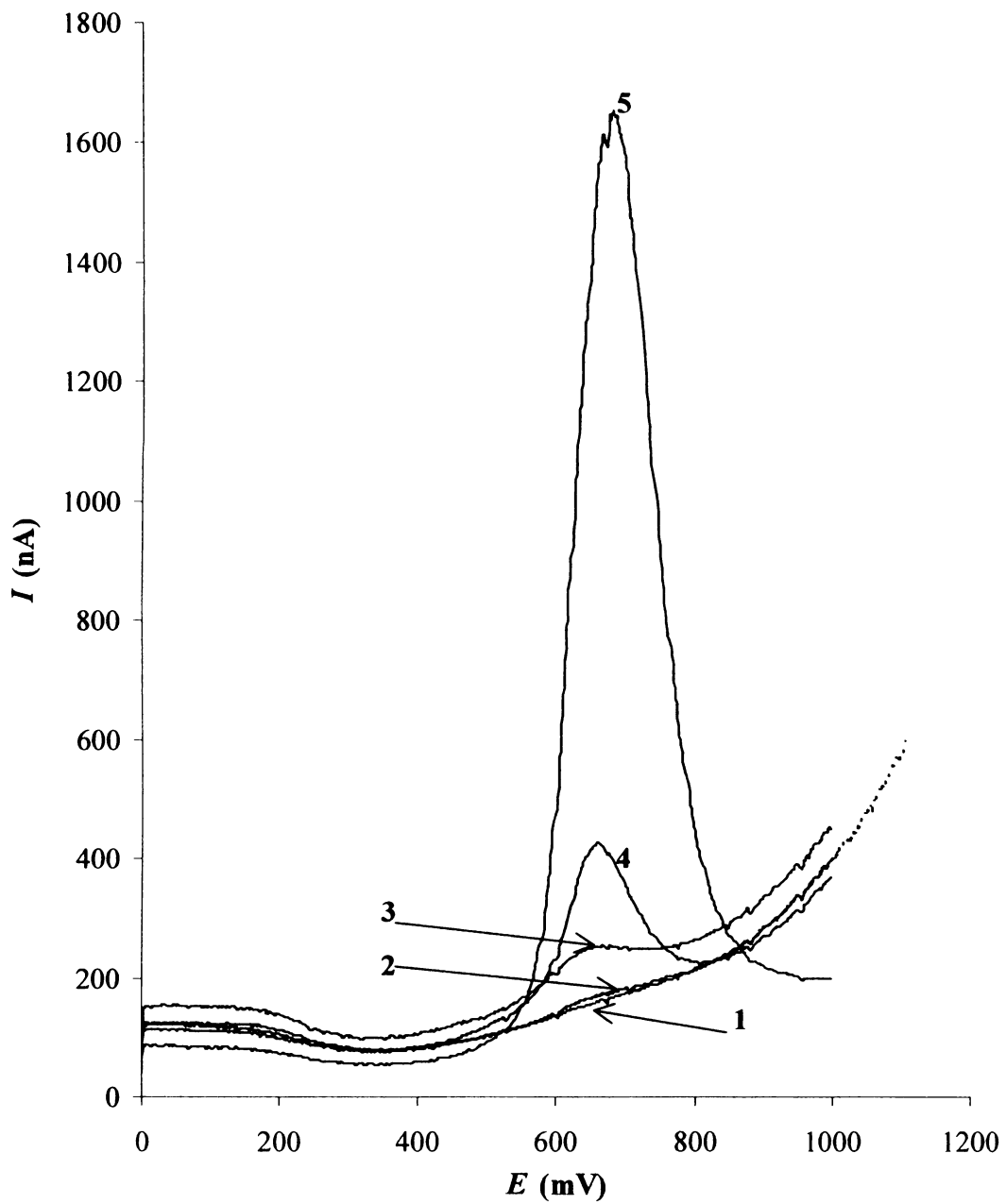
Parametry logaritmické závislosti výšky píku na koncentraci roztoku thymolu: směrnice : 0,787, úsek : +6,33, R² = 0,9985.



Obr. 3.17 Závislost výšky píku (I_p) DP voltamogramu thymolu na jeho koncentraci v rozmezí $1 \cdot 10^{-4}$ až $2 \cdot 10^{-7}$ mol.l⁻¹, měřeno v BRP o pH = 4



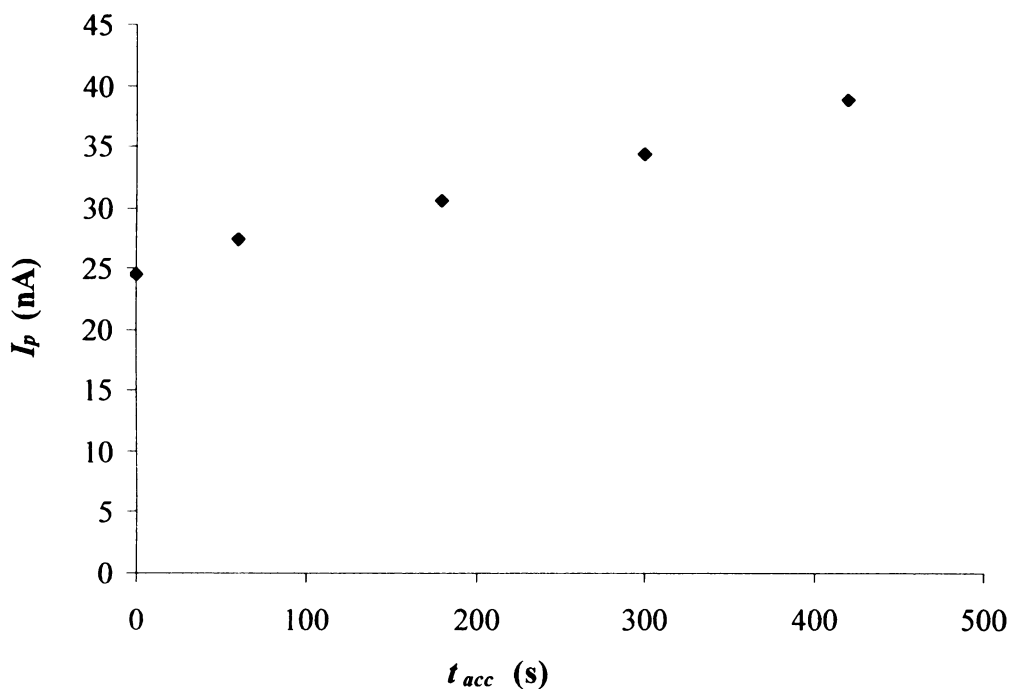
Obr. 3.18 Kalibrační závislost thymolu v logaritmické formě v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-4}$ až $2 \cdot 10^{-7}$ mol.l⁻¹, měřeno metodou DPV v BRP o pH = 4



Obr. 3.19 DP voltamogramy thymolu v BRP o pH 4, $c(\text{thymol}) = 0$ (kř. 1), $1 \cdot 10^{-7}$ (kř. 2), $1 \cdot 10^{-6}$ (kř. 3), $1 \cdot 10^{-5}$ (kř. 4) a $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ (kř. 5)

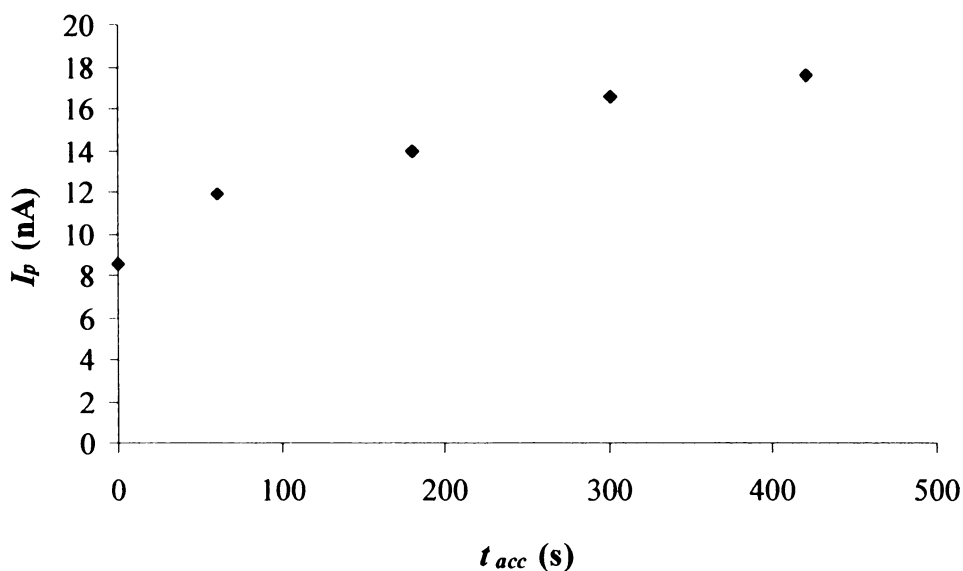
3.3.2 Studium akumulace thymolu na uhlíkové pastové elektrodě

Při snaze o snížení meze detekce byla vyzkoušena metoda AdS DPV. Nejprve byla proměřena závislost akumulace thymolu v míchaném roztoku o koncentraci $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ v 10% methanolu a v prostředí BRP o pH 4 na době akumulace, naměřenou závislost ukazuje Obr. 3.20

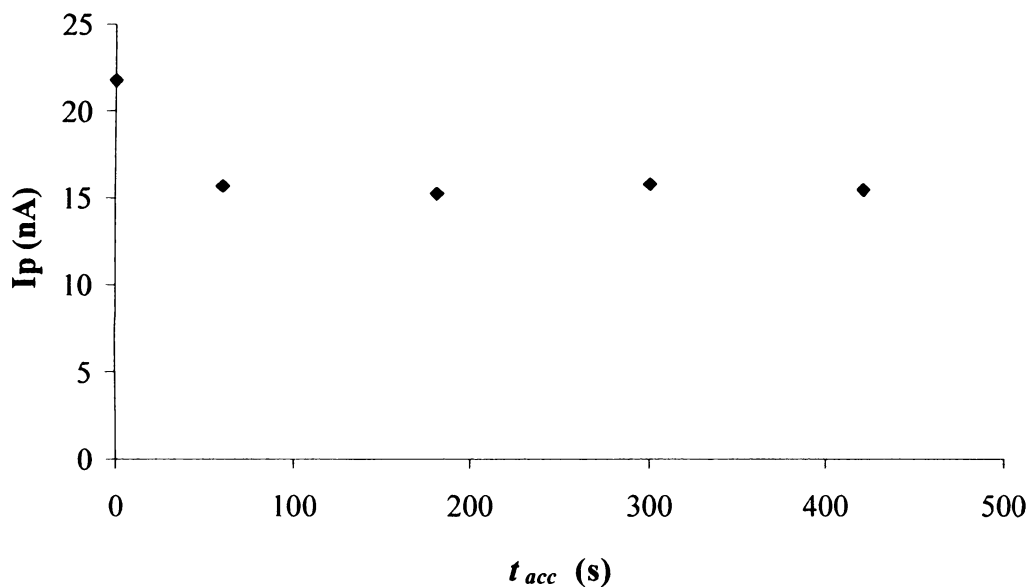


Obr. 3.20 Závislost výšky píku (I_p) thymolu o koncentraci $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ v prostředí BRP o pH 4 na době akumulace (t_{acc}), měření probíhalo metodou AdS DPV při potenciálu akumulace 0 V. Podíl methanolu v měřeném vzorku byl 10%.

Jak je patrné z Obr. 3.20, dochází jen k velmi malé akumulaci thymolu na povrchu uhlíkové pastové elektrody, proto byla změřena závislost akumulace thymolu o koncentraci $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ na době akumulace v prostředí BRP o pH 7 a 12. Naměřené hodnoty ukazují Obr. 3.21 a 3.22.



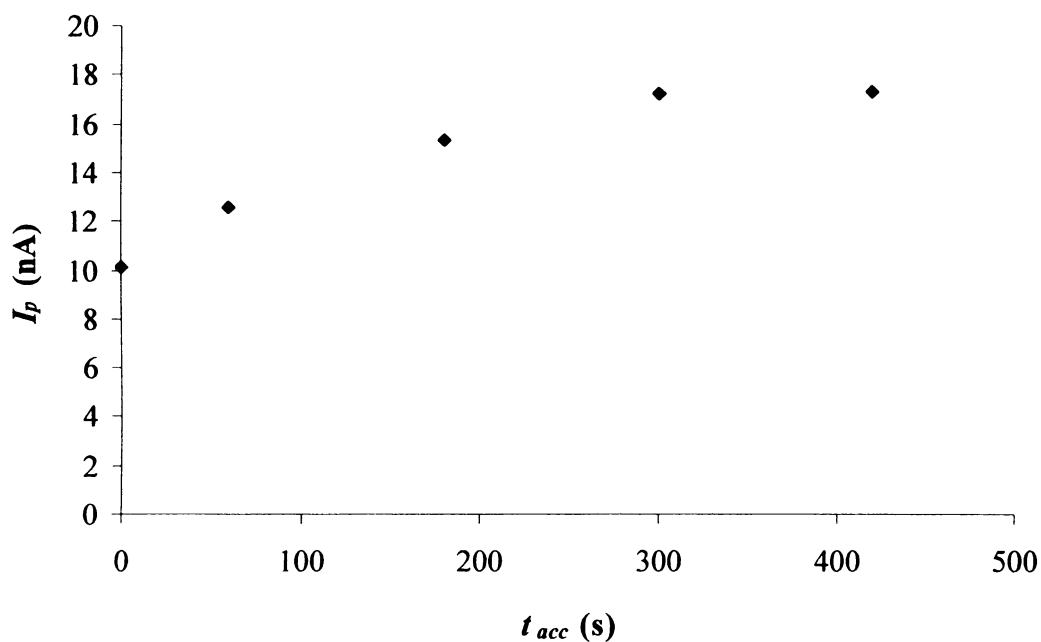
Obr. 3.21 Závislost výšky píku (I_p) thymolu o koncentraci $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ v prostředí BRP o pH 7 na době akumulace (t_{acc}), měření probíhalo metodou AdS DPV při potenciálu akumulace 0 V. Podíl methanolu v měřeném vzorku byl 10 %.



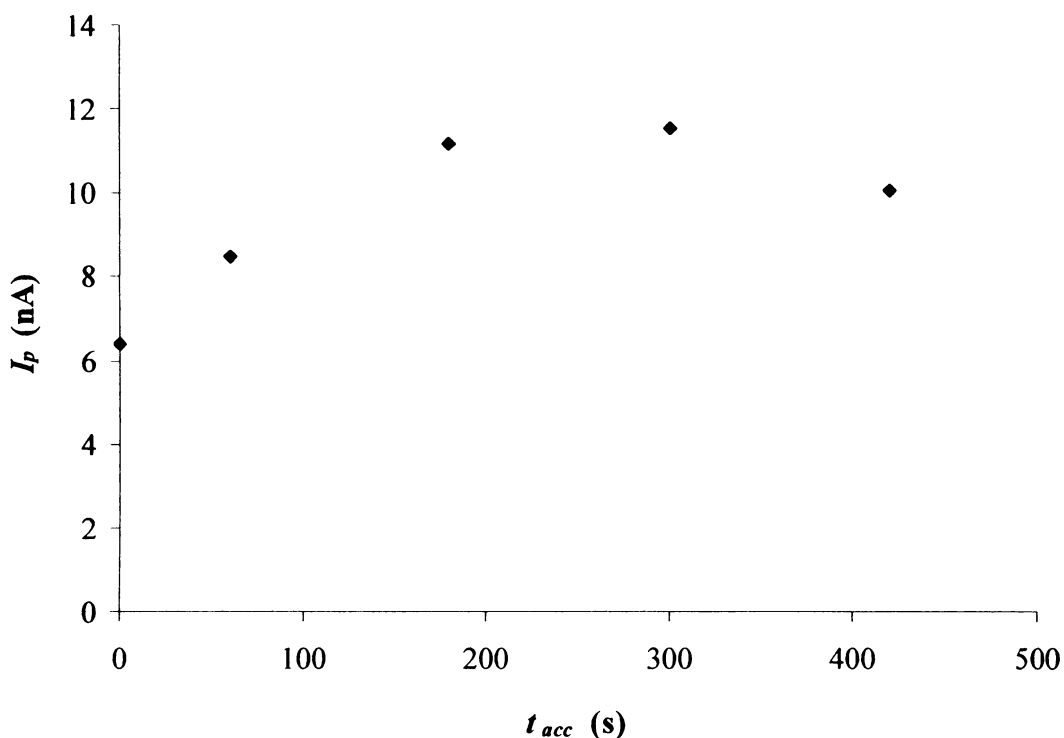
Obr. 3.22 Závislost výšky píku (I_p) thymolu o koncentraci $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ v prostředí BRP o pH 12 na době akumulace (t_{acc}), měření probíhalo metodou AdS DPV při potenciálu akumulace 0 V. Podíl methanolu v měřeném vzorku byl 10 %.

Jak je z obrázků 3.21 a 3.22 patrné, tak ani při těchto podmínkách se akumulace thymolu neprojevila výrazně. Nejvyšší nárůst proudu píku byl zaznamenán při pH 7.

Na povrch uhlíkové pastové elektrody se také adsorbují methanol, který tak může konkurovat thymolu, proto byla další měření provedena v roztocích, které obsahovaly 1 % methanolu (Obr. 3.23) a 5 % methanolu (Obr.3.24), opět v prostředí BRP o pH 7.



Obr. 3.23 Závislost výšky píku (I_p) thymolu o koncentraci $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ v prostředí BRP o pH 7 na době akumulace (t_{acc}), měření probíhalo metodou AdS DPV při potenciálu akumulace 0 V. Podíl methanolu v měřeném vzorku byl 1 %.

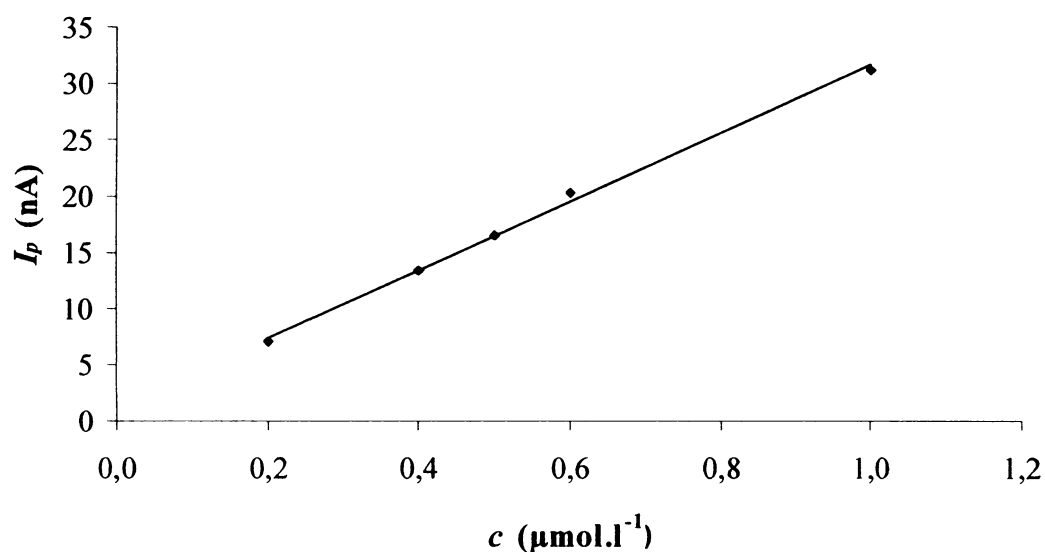


Obr. 3.24 Závislost výšky píku (I_p) thymolu o koncentraci $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ v prostředí BRP o pH 7 na době akumulace (t_{acc}), měření probíhalo metodou AdS DPV při potenciálu akumulace 0 V. Podíl methanolu v měřeném vzorku byl 5 %.

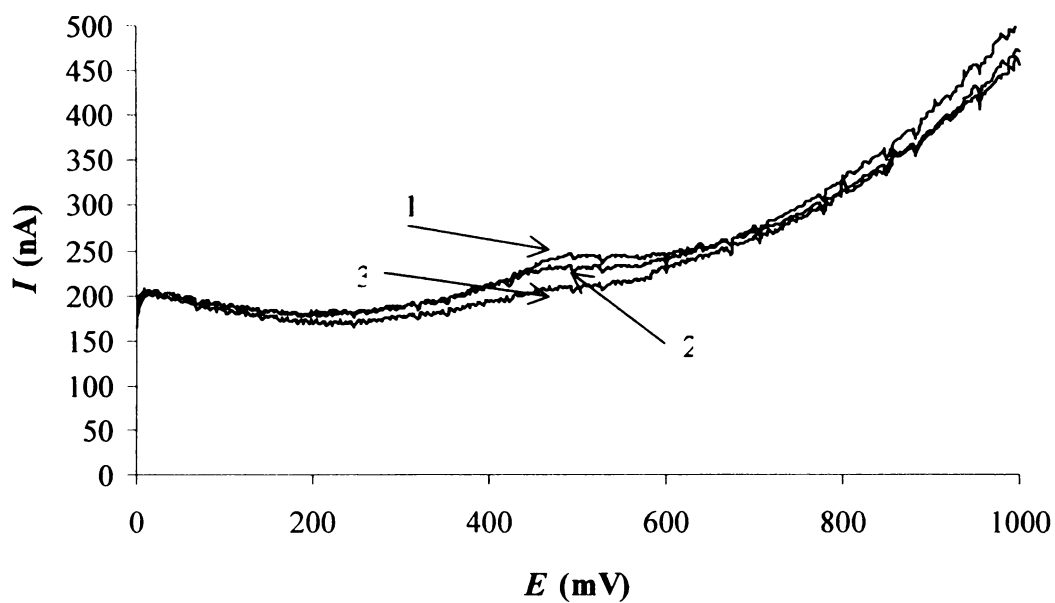
Z obrázků 3.23 a 3.24 je patrné, že ani tato změna podmínek stanovení nenapomohla ke zlepšení dosahovaných výsledků. Proto byly jako nejvýhodnější podmínky stanovení pro změření kalibračních křivek thymolu metodou AdS DPV stanoveny: doba akumulace 300 s, prostředí BRP o pH 7 a 10% podíl methanolu. Bylo proměřeno rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-6}$ až $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ thymolu, u nižších koncentrací se píky již nedaly vyhodnotit, takže se nepodařilo snížit mez detekce. Kalibrační křivka byla vyhodnocena metodou lineární regrese, křivku ukazuje Obr. 3.25 a její parametry jsou vyhodnoceny v Tab. 3.10. Příklady voltamogramů zobrazuje Obr. 3.26.

Tab. 3.10 Parametry kalibrační závislosti stanovení thymolu metodou AdS DPV v prostředí BRP o pH 7, doba akumulace 300 s, podíl methanolu 10 %, potenciál akumulace 0 V.

Koncentrační rozmezí (mol.l^{-1})	Směrnice (mA.l.mol^{-1})	Úsek (nA)	R^2
$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	30,3	1,36	0,9965



Obr. 3.25 Závislost výšky píku (I_p) na koncentraci thymolu v prostředí BRP o pH 7, měření probíhalo metodou AdS DPV při potenciálu akumulace 0 V a době akumulace 300 s. Podíl methanolu v měřeném vzorku byl 10 %, koncentrační rozmezí $1 \cdot 10^{-6}$ až $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$



Obr. 3.26 Příklady AdS DP voltamogramů thymolu v prostředí BRP o pH 7, potenciál akumulace 0 V a doba akumulace 300 s. Podíl methanolu v měřeném vzorku byl 10 %, křivka 1 - koncentrace $6 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$, křivka 2 - koncentrace $4 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ a křivka 3 - koncentrace $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$

3.3.3 Opakovatelnost měření na uhlíkové pastové elektrodě pro metodu DPV

V prostředí BRP o pH 4 a při obsahu methanolu 10% se měřila opakovatelnost metody. Koncentrace thymolu byla $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$, podmínky stanovení odpovídají popisu z kapitoly 2.3.3. Měření bylo provedeno desetkrát po sobě, přičemž mezi jednotlivými měřeními byl obnoven povrch CPE, k tomu posloužila doba 10 s navíc. Výsledky měření jsou uvedeny Tab. 3.11. Stanovená relativní směrodatná odchylka je 3,11 %.

Tab 3.11 Opakovatelnost měření thymolu metodou DPV v prostředí BRP o pH 4 a 10 % methanolu, koncentrace thymolu byla $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$, povrch elektrody byl obnovován

pík	I_p (nA)
1	12,06
2	11,31
3	12,35
4	11,74
5	11,93
6	11,75
7	12,63
8	11,67
9	11,81
10	11,78
průměr	11,90
S	0,370
Sr	3,11 %

3.4 Stanovení reálných vzorků

3.4.1 Stanovení thymolu v Septolete® D

Stanovení obsahu thymolu v pastilkách Septolete® D bylo provedeno pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí.

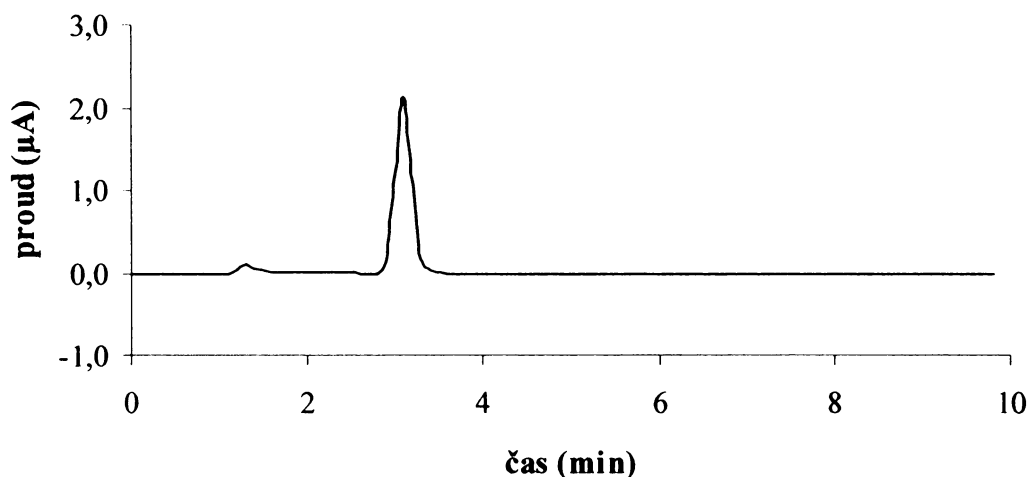
Výrobce uvádí, že jedna pastilka obsahuje 0,6 mg thymolu.

Vliv koncentrace methanolu v mobilní fázi

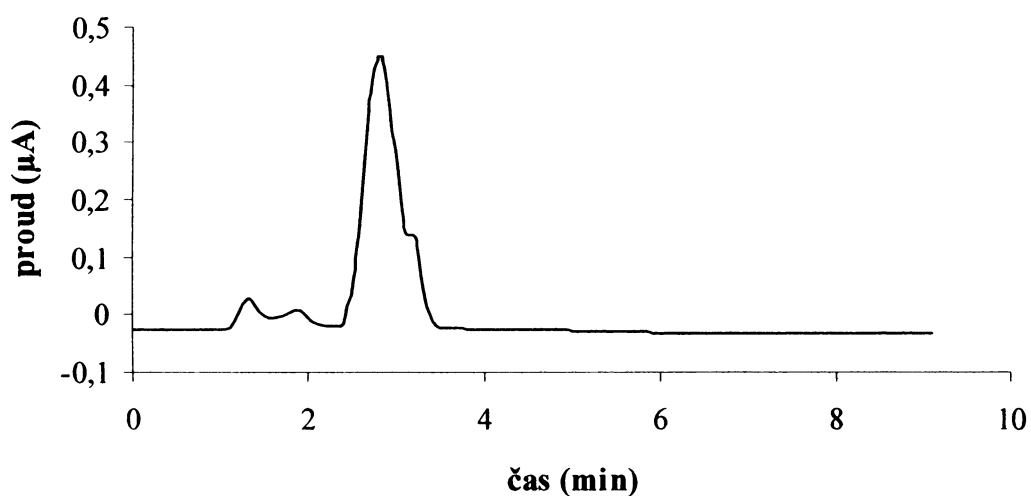
Tabletka Septolete® D byla rozpuštěna v 10 ml 90% a 10% methanolu. Tento zakalený roztok byl přefiltrován (filtrační papír č. 389), ukázalo se, že filtrace zakalení neodstranila, proto se roztok s rozpuštěnou tabletou nechal přes noc dekantovat. Takto ustálený roztok se již podařilo zfiltrovat. Tento postup se opakoval vždy při rozpuštění tabletky. Dávkováno bylo 20 µl čirého roztoku.

Mobilní fáze byla složena ze zř. BRP o pH 7 a methanolu, použitý obsah methanolu byl 90 % a 70 %. Byla použita kolona Lichrospher® RP – 18, 100 – 5 µm, 125 x 4 mm a jako detektor posloužila uhlíková pastová elektroda s vloženým potenciálem +1,1 V.

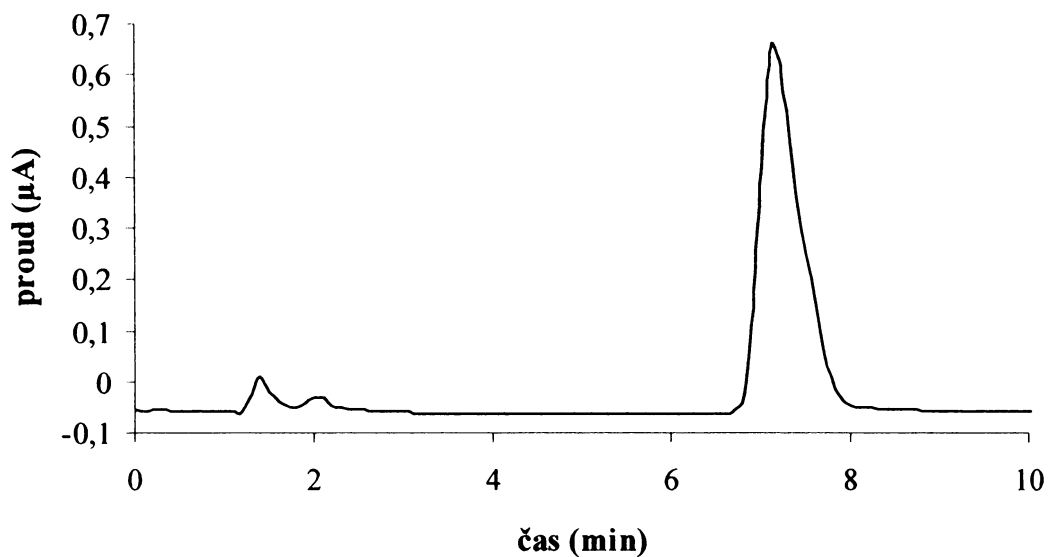
Pro srovnání jsou na Obr. 3.27, 3.28, 3.29 a 3.30 uvedeny chromatogramy se všemi kombinacemi podmínek stanovení. Jako nejvýhodnější byl vyhodnocen podíl methanolu v mobilní fázi 90 % a rozpuštění tablety Septolete® D v 90% roztoku methanolu.



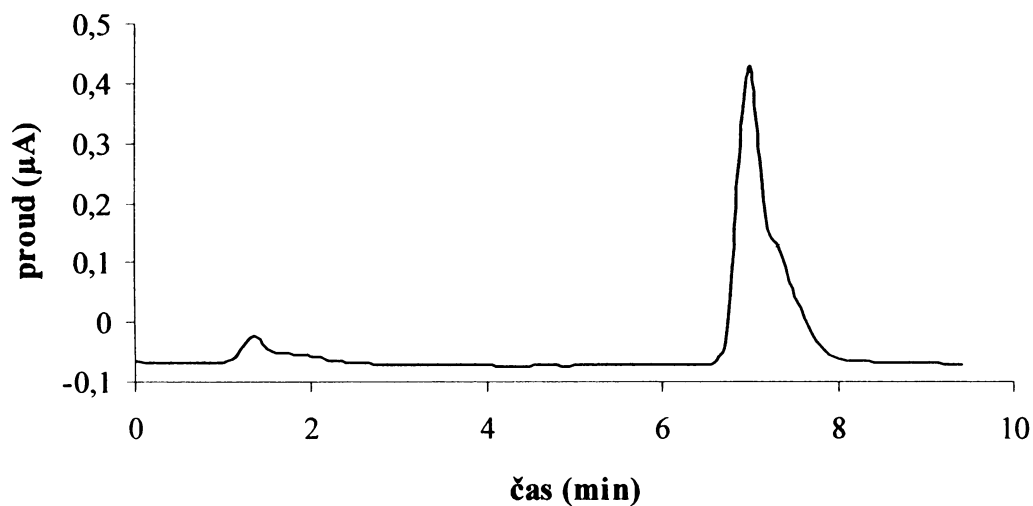
Obr. 3.27 Chromatogram stanovení thymolu v tabletce Septolete[®] D rozpuštěné v 10 ml 90% methanolu, amperometrická detekce na CPE při vloženém potenciálu +1,1 V, dávkováno 20 µl roztoku, mobilní fáze zř. BRP o pH 7 : methanol 1 : 9 (v/v), 0,5 ml.min⁻¹, kolona Lichrospher[®] RP – 18, 100 – 5 µm, 125 x 4 mm)



Obr. 3.28 Chromatogram stanovení thymolu v tabletce Septolete[®] D rozpuštěné v 10 ml 10% methanolu ve vodě, amperometrická detekce na CPE při vloženém potenciálu +1,1 V, dávkováno 20 µl roztoku, mobilní fáze zř. BRP o pH 7 : methanol 1 : 9 (v/v), 0,5 ml.min⁻¹, kolona Lichrospher[®] RP – 18, 100 – 5 µm, 125 x 4 mm



Obr. 3.29 Chromatogram stanovení thymolu v tabletce Septolete® D rozpuštěné v 10 ml 90% methanolu ve vodě, amperometrická detekce na CPE při vloženém potenciálu +1,1 V , dávkováno 20 µl roztoku, mobilní fáze zř. BRP o pH 7 : methanol 3 : 7 (v/v), 0,5 ml.min⁻¹, kolona Lichrospher® RP – 18, 100 – 5 µm, 125 x 4 mm



Obr. 3.30 Chromatogram stanovení thymolu v tabletce Septolete® D rozpuštěné v 10 ml 10% methanolu ve vodě, amperometrická detekce na CPE při vloženém potenciálu +1,1 V , dávkováno 20 µl roztoku, mobilní fáze zř. BRP o pH 7 : methanol 3 : 7 (v/v), 0,5 ml.min⁻¹, kolona Lichrospher® RP – 18, 100 – 5 µm, 125 x 4 mm

Vliv obsahu mentholu na stanovení thymolu

Tabletky Septolete[®] D obsahují kromě thymolu i menthol, který je mu strukturou podobný. Proto bylo metodou HPLC s elektrochemickou detekcí ověřeno, zda přítomnost mentholu v pastilkách neovlivňuje stanovení, tzn. zda se menthol neoxiduje na CPE ve stejný retenční čas jako thymol.

Výrobce udává, že v jedné tabletce Septolete[®] D je obsaženo 1,2 mg mentholu. To znamená, že při rozpuštění tablety v 10 ml 90% methanolu ve vodě je koncentrace mentholu $7,69 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$.

Pro zjištění vlivu mentholu na stanovení thymolu byl připraven roztok mentholu o koncentraci $7,68 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ v 90% methanolu ve vodě. Dávkováno bylo 20 μl tohoto roztoku, mobilní fáze byl zř. BRP o pH 7 s methanolem v poměru 1 : 9 (v/v), 0,5 ml.min⁻¹, měření proběhlo na koloně Lichrospher[®] RP – 18, 100 – 5 μm , 125 x 4 mm. Detekce byla uskutečněna na uhlíkové pastové elektrodě při vloženém potenciálu +1,1 V.

Měřením bylo potvrzeno, že obsah mentholu v pastilkách Septolete[®] D nemá žádný vliv na stanovení thymolu. Po nadávkování roztoku mentholu do HPLC systému nedošlo v následujících 20 min k objevení se žádného signálu na CPE. Z toho lze usuzovat, že na uhlíkové pastové elektrodě nedochází při vloženém potenciálu +1,1 V k oxidaci mentholu.

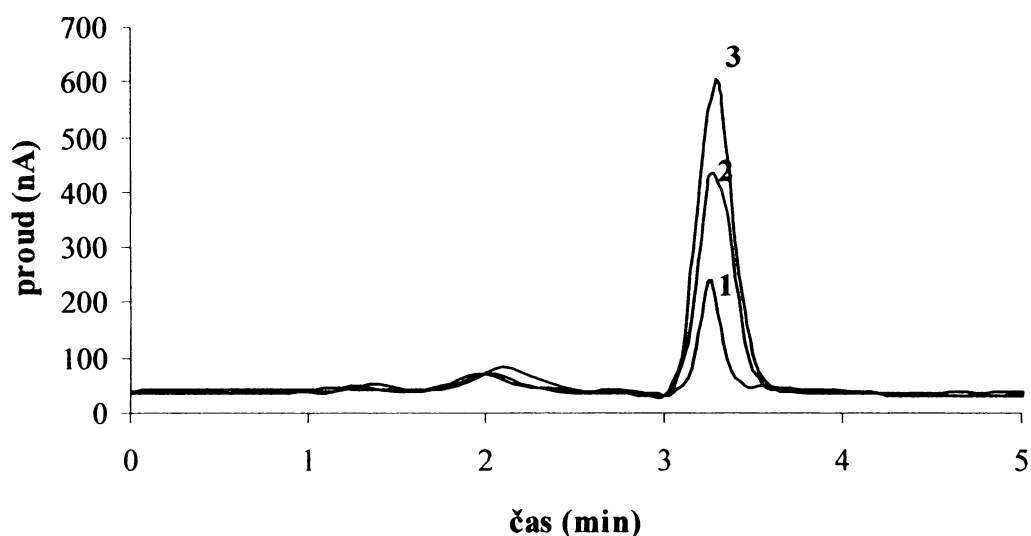
Stanovení obsahu thymolu v pastilkách Septolete® D

Stanovení obsahu thymolu proběhlo metodou HPLC s elektrochemickou detekcí na CPE při vloženém potenciálu +1,1 V na koloně Lichrospher® RP – 18, 100 – 5 µm, 125 x 4 mm. Dávkováno bylo 20 µl roztoku, který byl připraven přefiltrováním roztoku tablety rozpuštěné ve 100 ml 90% methanolu ve vodě. Jako mobilní fáze byla použita směs zř. BRP o pH 7 a methanolu v poměru 1:9 (v/v), 0,5 ml.min⁻¹.

Množství thymolu bylo stanoveno metodou standardního přídatku. Ten byl proveden pomocí nově připraveného roztoku thymolu o koncentraci 1,238.10⁻² mol.l⁻¹ v methanolu. Přídavek byl proveden do 10 ml původního roztoku a činil 32 µl. Byly provedeny 2 standardní přídatky. Množství thymolu v tabletkce bylo vypočítáno pomocí metody lineární extrapolace. Na Obr. 3.31 jsou znázorněny chromatogramy stanovení thymolu v tabletkách Septolete® D bez přídatku a s prvním i druhým přídatkem. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tab. 3.12

Tab. 3.12 Stanovení thymolu v tabletkce Septolete® D metodou standardního přídatku, metoda HPLC s amperometrickou detekcí na CPE při vloženém potenciálu +1,1 V, provedeny 2 standardní přídatky o objemu 32 µl s koncentrací 0,01238 mol.l⁻¹ thymolu v methanolu.

č. přídatku	látkové množství přidaného thymolu.10 ⁷ (mol)	plocha píku (nA.s)
0	0	3008
1	3,9616	5742
2	7,9232	8190



Obr. 3.31 Chromatogramy stanovení thymolu v tabletkě Septolete® D (tableta byla rozpuštěna ve 100 ml 90% methanolu ve vodě, na standardní přídávky bylo odměřeno vždy 10 ml, amperometrická detekce na CPE při vloženém potenciálu +1,1 V, dávkováno 20 μl roztoku, mobilní fáze zř. BRP o pH 7 : methanol 1 : 9 (v/v), 0,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, kolona Lichrospher® RP – 18, 100 – 5 μm , 125 x 4 mm, křivka 1 – 0 ml přidaného thymolu, křivka 2 – přidáno 32 μl thymolu o koncentraci 0,01238 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v methanolu, křivka 3 – přidáno 64 μl thymolu o koncentraci 0,01238 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v methanolu)

V tabletkě bylo zjištěno 0,7 mg thymolu. Pro zkvalitnění výsledku byly proměřeny ještě 4 tabletky. Porovnání naměřených dat u všech pěti tabletek je uvedeno v Tab.3.13. Z naměřených hodnot byl vypočítán interval spolehlivosti¹⁴.

V jedné tabletkě Septolete® D je $(0,699 \pm 0,023)$ mg thymolu. Tento výsledek se nepřekrývá s hodnotou, kterou udává výrobce. Ale v dostupných informacích o tomto léčivu výrobce nikde neudává svůj interval spolehlivosti, či nějakou odchylku, proto nelze s jistotou tvrdit, že se hodnota obsahu thymolu naměřená metodou HPLC s amperometrickou detekcí nedá srovnat.

Tab. 3.13 Stanovení thymolu v pěti tabletkách Septolete® D, metoda měření HPLC s amperometrickou detekcí na CPE při vloženém potenciálu +1,1 V

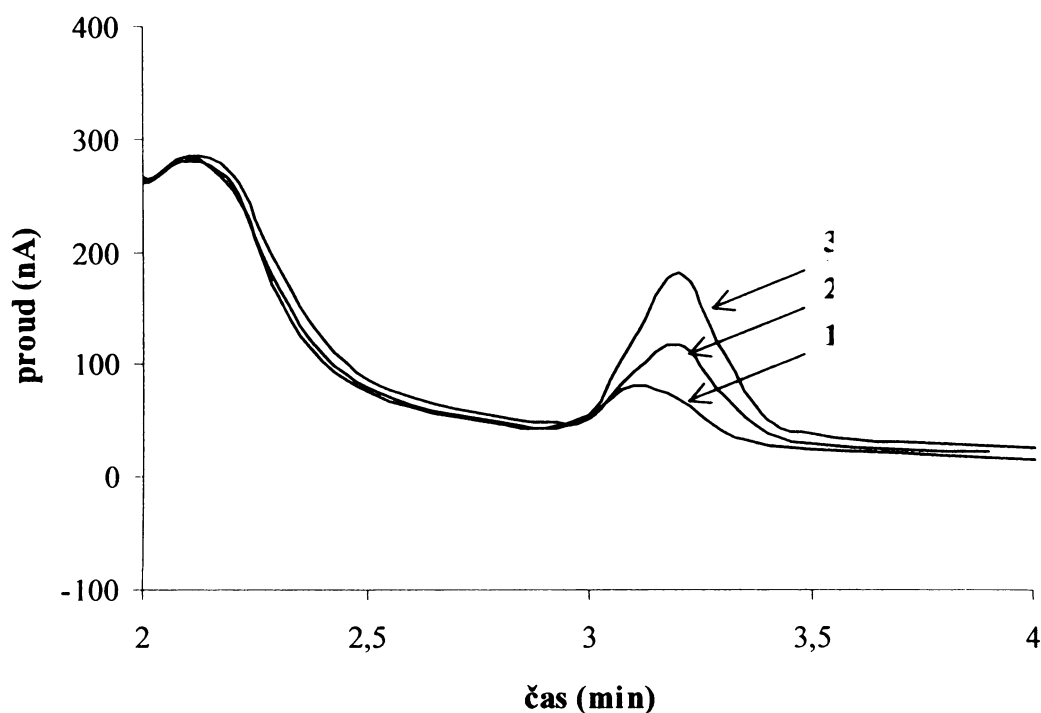
tableta	plocha píku (nA.s)	množství thymolu (mg)
1	1504	0,702
2	1496	0,698
3	1474	0,688
4	1460	0,681
5	1557	0,727

3.4.2 Stanovení thymolu v Mateřídouškovém sirupu

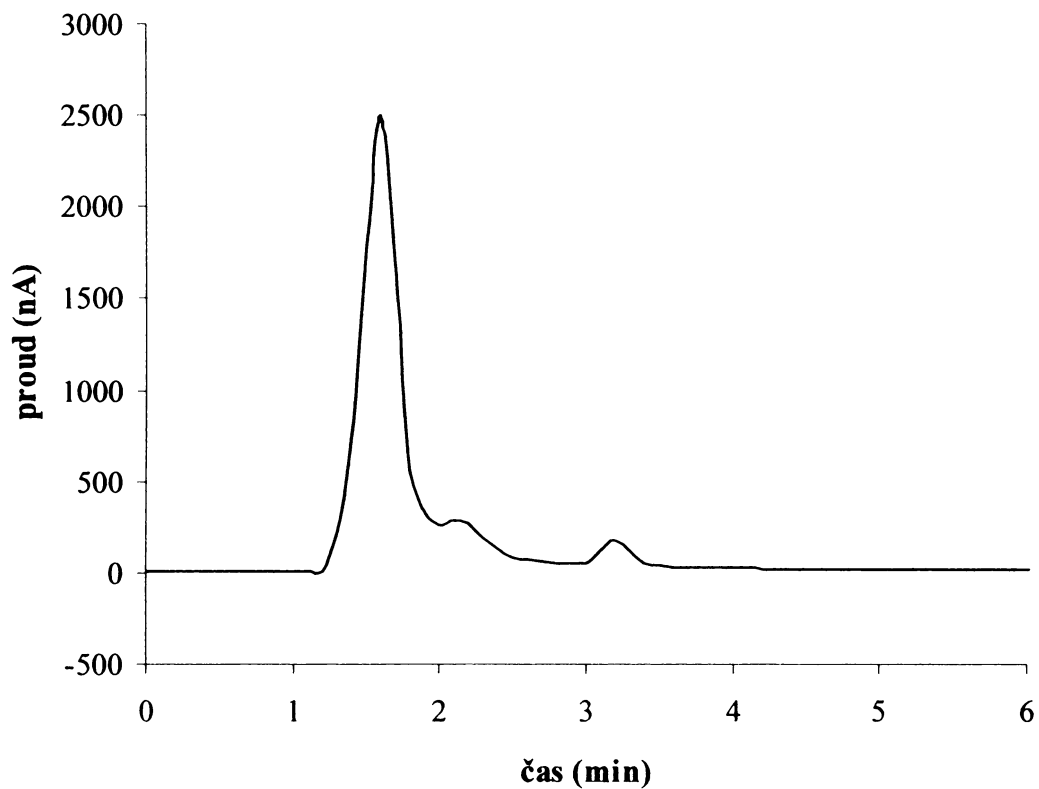
Stanovení koncentrace thymolu v sirupu bylo provedeno pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí. Výrobce obsah thymolu neuvádí.

Stanovení thymolu proběhlo metodou HPLC s elektrochemickou detekcí na CPE při vloženém potenciálu +1,1 V. Použita byla kolona Lichrospher® RP – 18, 100 – 5 µm, 125 x 4 mm. Dávkováno bylo 20 µl roztoku, který byl připraven naředěním 0,5 ml sirupu do 10 ml 90% methanolem. Jako mobilní fáze byla použita směs zř. BRP o pH 7 a methanolu v poměru 1:9 (v/v), 0,5 ml.min⁻¹.

Koncentrace thymolu byla stanovena metodou standardního přídatku. Ten byl proveden pomocí roztoku thymolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ v methanolu. Přídatok byl proveden do 10 ml roztoku sirupu v 90% methanolu a činil 100 µl. Byly provedeny 2 standardní přídatky. Koncentrace thymolu v sirupu byla vypočítána pomocí metody lineární extrapolace. Na Obr. 3.32 jsou znázorněny chromatogramy Mateřídouškového sirupu bez přídatku a s prvním i druhým přídatkem. Pro ilustraci je na Obr. 3.33 zaznamenán celý chromatogram sirupu. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tab. 3.14.



Obr. 3.32 Detail chromatogramu stanovení Mateřídouškového sirupu (0,5 ml sirupu bylo vždy naředěno na 10 ml 90% methanolem ve vodě, amperometrická detekce na CPE při vloženém potenciálu +1,1 V , dávkováno 20 μl roztoku, mobilní fáze zř. BRP o pH 7 : methanol 1 : 9 (v/v), 0,5 ml.min⁻¹, kolona Lichrospher® RP – 18, 100 – 5 μm , 125 x 4 mm, křivka 1 – 0 ml přidaného thymolu, křivka 2 – přidáno 100 μl thymolu o koncentraci 1.10⁻³ mol.l⁻¹ v methanolu, křivka 3 – přidáno 200 μl thymolu o koncentraci 1.10⁻³ mol.l⁻¹ v methanolu)



Obr. 3.33 Chromatogram stanovení thymolu v Mateřídouškovém sirupu (0,5 ml sirupu bylo naředěno na 10 ml 90% methanolem ve vodě, amperometrická detekce na CPE při vloženém potenciálu +1,1 V, dávkováno 20 μ l roztoku, mobilní fáze zř. BRP o pH 7 : methanol 1 : 9 (v/v), 0,5 ml.min⁻¹, kolona Lichrospher® RP – 18, 100 – 5 μ m, 125 x 4 mm)

Tab. 3.14 Stanovení thymolu v Mateřídouškovém sirupu metodou standardního přídávku, měření HPLC s amperometrickou detekcí na CPE při vloženém potenciálu +1,1 V, provedeny 2 standardní přídávky o objemu 100 μl s koncentrací $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ thymolu v methanolu

č. přídávku	látkové množství	plocha píku (nA.s)
	přidaného thymolu. 10^7 (mol)	
0	0	545
1	1	975
2	2	1611

Koncentrace thymolu v dávkovaném vzorku byla $9,59 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. Koncentrace thymolu v Mateřídouškovém sirupu je $1,92 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$. Tuto hodnotu nelze porovnat s daty od výrobce, neboť ten je neuvádí.

4. ZÁVĚR

Byla ověřena stálost zásobního roztoku $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ thymolu v methanolu, který je při uchování v chladničce za teploty $5 \text{ }^\circ\text{C}$ a v temnu stálý nejméně 3,5 měsíce. Z absorpčního spektra vyplývá, že změřené absorpční maximum thymolu odpovídá dostupným informacím²⁸ a rovná se 276 nm .

Byla proměřena závislost retenčních charakteristik thymolu na pH mobilní fáze v reverzním chromatografickém systému s chemicky vázaným oktadecylem s UV spektrofotometrickou detekcí při 276 nm . Z výsledků měření vyplynulo, že pH mobilní fáze nemá téměř žádný vliv na retenční charakteristiky.

Byla prostudována závislost odezvy amperometrického detektoru s uhlíkovou pastovou elektrodou na vloženém potenciálu a pH mobilní fáze.

Byly nalezeny optimální podmínky pro stanovení thymolu na CPE: potenciál $+1,1 \text{ V}$ a pH mobilní fáze 7. Mez detekce byla $2,9 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$. Mez detekce pro stanovení thymolu s UV detekcí při 276 nm , byla $6,7 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$. Porovnájí-li se meze detekce pro spektrofotometrickou a elektrochemickou metodu detekce, je zřejmé, že detekcí na uhlíkové pastové elektrodě bylo dosaženo lepších výsledků.

Za optimálních podmínek měření byla zjištěna opakovatelnost měření elektrochemické detekce. Stanovené relativní směrodatné odchylky byly $1,8 \%$ pro plochu píku a $4,7 \%$ pro výšku píku.

Byly vyhodnoceny optimální podmínky pro stanovení thymolu diferenční pulsní voltametrií na uhlíkové pastové elektrodě. Optimální bylo prostředí BRP o pH 4. Při tomto stanovení bylo dosaženo meze detekce $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ ($0,03 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$). V literatuře nalezneme podobné stanovení metodou DPV na diskové elektrodě ze skelného uhlíku, autoři však stanovovali celkovou sumu isopropylmethylfenolů. Limit detekce byl $0,04 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$. (cit. 15) Výsledky jsou srovnatelné.

Byl prověřen vliv doby akumulace na výšku píku thymolu pro metodu AdS DPV a jako optimální podmínky byly stanoveny: doba akumulace 300 s, prostředí BRP o pH 7 a 10% podíl methanolu. Nedošlo k téměř žádné akumulaci a nepodařilo se snížit mez detekce.

V prostředí BRP o pH 4 a při obsahu methanolu 10 % byla naměřena opakovatelnost stanovení thymolu metodou DPV. Stanovená relativní směrodatná odchylka byla 3,11 %.

Vyvinutá metoda stanovení thymolu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií za použití detekce na uhlíkových pastových elektrodách byla využita při stanovení obsahu thymolu v pastilkách Septolette[®] D a v Mateřídouškovém sirupu. Množství thymolu v jedné pastilce bylo $(0,699 \pm 0,023)$ mg, výrobce udává, že v jedné tabletce je 0,6 mg thymolu, ale neudává žádné rozmezí hodnot, či chybu stanovení. Proto nelze výsledky porovnat. Koncentrace thymolu v sirupu byla $1,92 \cdot 10^{-4}$ mol.l⁻¹, tato hodnota se nedá porovnat s daty od výrobce, ten je totiž neudává.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. *Český lékopis 1997*, 3.díl, léčivé a pomocné látky, Léčivé přípravky. Praha, Grada publishing 1997
2. Opletal, L.; Volák, J.: Rostliny pro zdiví. Praha Aventium 1999
3. Stashenko, E. E.; Puertas, M. A.; Martinez, J. R.: SPME determination of volalite aldehydes for evaluation of in vitro antioxidant activity. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373(1-2), 70-74 (2002)
4. Kučerová, I.; Slezáková, M.; Vosátková, K.: Dezinfekce a dezinfekce historických materiálů plynováním. *Časopis zprávy památkové péče* 59:8, 265-269 (1999)
5. Kresánek, J.: Atlas léčivých rostlin a lesných plodov. Martin, Osveta 1988
6. Atlas rostlin. Dostupné z URL <http://rostliny.prirodou.cz/?rostlina=ledum_palustre> [cit. 1.4.2007]
7. Thomson, R. D.; Carlson, M.: Determination of thymol in halothan anaesthetic preparation by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 7(10), 1199-1206 (1989)
8. Piasenzotto, I.; Gracco, L.; Conte, L. S.; Bogdanov, S.: Application of solid phase microextraction to evaluate traces of thymol in honey. *Apidologie* 33, 545-552 (2002)
9. Lucchesi, M. E.; Chemat, F.; Smadja, J.: An original solvent free microwave extraction of essential oils from spices. *Flavour and Fragrance Journal* 19, 134-138 (2004)
10. Valverde, J. M.; Guilleán, F.; Martiánez-Romero, D.; Castillo, S.; Serrano, M.; Valero, D.: Improvement of table grapes quality and safety by the combination of modified atmosphere packaging and eugenol, menthol, or thymol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 7458-7464 (2005)
11. Spálenka, M.: *Průručka anorganické polarografické analýzy*. Praha, SNTL 1961

12. Ojala, M.; Ketola, R. A.; Virkki, V.; Sorsa, H.; Kotiaho, T.: Determination of phenolic compounds in water using membrane inlet mass spectrometry. *Talanta* 44, 1253-1259 (1997)
13. Gatti, R.; Gioia, M.G.; DiPietra, A. M.; Cavrini, V.: Analysis of phenols in pharmaceuticals by liquid chromatography after pre-column labelling and on-line post-column photochemical derivatization. *Analytica Chimica Acta* 447, 89-99 (2001)
14. Ghosheh, O. A.; Houdi, A. A.; Crooks, P. A.: High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of black seed. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 19(5), 757-762 (1999)
15. Michelitsch, A.; Rittmannsberger, A.; Hüfner, A.; Rückert, U.; Likussar, W.: Determination of isopropylmethylphenols in Black seed oil by differential pulse voltametry. *Phytochemical Analysis* 15, 320-324 (2004)
16. Kohlert, C.; Abel, G.; Schmidt, E.; Veit, M.: Determination of thymol in human plasma by automated headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic analysis. *Journal of Chromatography B* 767, 11-18 (2002)
17. Nozal, M. J.; Bernal, J. L.; Jiménez, J. J.; González, M. J.; Itiges, M.: Extraction of thymol, eucalyptol, menthol and camphor residues from honey and beeswax. *Journal of Chromatography A* 954, 207-215 (2002)
18. Ozel, M. Z.; Gogus, F.; Lewis, A. C.: Subcritical water extraction of essential oils from *Thymbra spicata*. *Food Chemistry* 82, 381-386 (2003)
19. Pothier, J.; Galand, N.; ElOUali, M.; Viel, C.: Comparison of planar chromatographic methods (TLC, OPLC, AMD) applied to essential oil of wild thyme and seven chemotypes of thyme. *Il Farmaco* 56, 505-511 (2001)
20. Švancara, I.; Vytrás, K.: Aplikace uhlíkových pastových elektrod v elektroanalýze. *Chemické Listy* 88, 412-422 (1994)
21. Švancara, I.; Schachl, K.: Testing of unmodified carbon paste electrodes. *Chemické Listy* 93, 490-499 (1999)
22. Švancara, I.; Vytrás, K.; Barek, J.; Zima, J.: Carbon paste electrodes in modern electroanalysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 31(4), 311-345 (2001)

23. Švancara, I.; Vytras, K.: Příprava a vlastnosti uhlíkových pastových elektrod. *Chemické Listy* 88, 138-146 (1994)
24. Vohlídal, J.; Julák, A.; Štulík, K.: *Chemické a analytické tabulky*. Praha, Grada publishing 1999
25. Vláčil, F.: *Příklady z chemické a instrumentální analýzy*. 4. přeprac.a rozš. vyd. Praha, Informatorium 1991
26. Štulík, K. a kol.: *Analytické separační metody*. Praha, Karolinum 2005
27. Coufal, P.; Bosáková, Z.; Čabala, R.; Suchánková, J.; Feltl, L.: *Seminář z analytické chemie. Teorie, příklady, cvičení*. Praha, Karolinum 2003
28. *The Sadtler handbook of ultraviolet spectra*. Simons, W. W. (ed). USA, Sadtler R. L. 1979