

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Eva Bláhová

Vývoj voltametrických metod pro detekci cholesterolu a jeho
prekursoru lathosterolu

Development of voltammetric methods for detection of
cholesterol and its precursor lathosterol

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Karolina Schwarzová, Ph.D.

Praha 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 16. 6. 2021

Podpis

Poděkování:

Tímto chci poděkovat své školitelce, paní docentce Schwarzové, za pomoc a rady při práci v laboratoři i na tomto textu, a zvláště za podporu při studiu. Dále také děkuji panu docentu Nesměrákovi za pomoc a ochotu.

Práce byla řešena s finanční podporou Grantové agentury České republiky (projekt GAČR 19-11268S).

Abstrakt

Cholesterol je nezastupitelný sterol vyskytující se v živočišných buňkách, lathosterol je jedním z jeho prekursorů. Prvním cílem této práce je vývoj metody stanovení cholesterolu po extrakci kapalina-kapalina z mléčných matric metodou diferenční pulzní voltametrie na elektrodě z borem dopovaného diamantu v prostředí kyseliny chloristé v acetonitrilu, kde cholesterol poskytuje ireverzibilní odezvu v anodické oblasti při potenciálu mezi +1300 a +1600 mV v závislosti na obsahu vody. Byla ověřena i možnost spektrofotometrického stanovení pomocí Abell-Kendallový metody. Druhým cílem je studium voltametrického chování lathosterolu na elektrodách z borem dopovaného diamantu a skelného uhlíku pomocí metod cyklické voltametrie a diferenční pulzní voltametrie především v prostředí kyseliny chloristé, ale i chloristanu sodného, kde lathosterol poskytuje ireverzibilní anodickou odezvu s potenciálem okolo +1650 mV na elektrodě z borem dopovaného diamantu, resp. s potenciálem +1350 mV na elektrodě ze skelného uhlíku. Také byl zkoumán vliv dalších kyselin na odezvu lathosterolu – sírové, dusičné a fosforečné. Byl studován vliv obsahu vody v měřeném roztoku a vliv rychlosti polarizace na odezvu lathosterolu. Dále byla měřena koncentrační závislost lathosterolu metodou diferenční pulzní voltametrie po optimalizaci jejích parametrů. Byly vypočteny limity detekce, a to $4,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ pro borem dopovanou diamantovou elektrodu a $4,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ pro elektrodu ze skelného uhlíku.

Klíčová slova: Cholesterol, lathosterol, borem dopovaná diamantová elektroda, voltametrie, extrakce kapalina-kapalina

Abstract

Cholesterol is an irreplaceable sterol found in animal cells, lathosterol is one of its precursors. The first aim of this Thesis is to develop a method for determining cholesterol after liquid-liquid extraction from milk matrices by differential pulse voltammetry on a boron doped diamond electrode in the presence of perchloric acid in acetonitrile where cholesterol provides an irreversible anodic response at the potential between +1300 and +1600 mV depending on the water content. The second aim is a study of the voltammetric behavior of lathosterol on boron doped diamond and glassy carbon electrodes using cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry mainly in perchloric acid but also sodium perchlorate where lathosterol provides an irreversible anodic response at the potential of about +1650 mV on the boron doped diamond electrode and at the potential of +1350 mV on a glassy carbon electrode. The effect of other acids – sulfuric, nitric and phosphoric – on the response of lathosterol was also investigated. The influence of the water content in the measured solution and the influence of the polarization rate on the response of lathosterol were studied. Furthermore, the calibration dependence of lathosterol was measured using differential pulse voltammetry after optimization of its parameters. Detection limits were calculated, $4,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ for the boron doped diamond electrode and $4,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ for the glassy carbon electrode.

Keywords: Cholesterol, lathosterol, boron doped diamond electrode, voltammetry, liquid-liquid extraction

Obsah

Abstrakt	5
Abstract	6
Použité zkratky	9
1. Teoretická část	10
1.1 Cíl práce	10
1.2 Studované látky	10
1.2.1 Cholesterol	11
1.2.2 Lathosterol.....	11
1.3 Extrakce cholesterolu	13
1.4 Borem dopovaný diamant	14
1.4.1 Příprava diamantových filmů	15
1.4.2 Elektrochemické vlastnosti BDDE.....	16
1.5 Skelný uhlík	18
1.5.1 Příprava a vlastnosti skelného uhlíku.....	18
1.5.2 Elektrochemické vlastnosti skelného uhlíku	19
1.6 Metody pro stanovení cholesterolu	20
1.6.1 Chromatografické metody.....	20
1.6.2 Enzymové metody a biosenzory	21
1.6.3 Kolorimetrické metody	22
1.7 Metody pro stanovení lathosterolu.....	23
2. Experimentální část.....	25
2.1 Příprava roztoků a použité chemikálie	25
2.2 Aparatura.....	26
2.2.1 Voltametrická měření.....	26
2.2.2 Spektrofotometrická měření.....	27
2.3 Pracovní postup a použité metody	27
2.3.1 Extrakce cholesterolu z mléčných matric.....	27
2.3.2 Voltametrická měření cholesterolu	28
2.3.3 Spektrofotometrická měření cholesterolu	28
2.3.4 Voltametrická měření lathosterolu	29
2.3.5 Zpracování dat.....	29
3. Výsledky a diskuze	30
3.1 Stanovení cholesterolu v mléčných matricích.....	30
3.2 Voltametrie lathosterolu.....	35
3.2.1 Vliv obsahu vody na odezvu lathosterolu	38

3.2.2 Vliv anorganických kyselin v měřeném roztoku na odezvu lathosterolu.....	40
3.2.3 Porovnání vlivu kyseliny chloristé a chloristanu sodného jako základního elektrolytu na odezvu lathosterolu	43
3.2.4 Vliv rychlosti polarizace na odezvu lathosterolu	45
3.2.5 Optimalizace parametrů DPV pro měření koncentrační závislosti lathosterolu.....	48
3.2.6 Měření koncentrační závislosti lathosterolu.....	52
4. Závěr	54
5. Literatura	56

Použité zkratky

BDD	borem dopovaný diamant
BDDE	elektroda z borem dopovaného diamantu
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
CHIT	chitosan dopovaný nanočásticemi
CNT	uhlíkové nanotrubičky
CV	cyklická voltametrie
CVD	chemická depozice par
DAD	detektor s diodovým polem (Diode Array Detector)
DPV	diferenční pulsní voltametrie
ECD	elektrochemický detektor
GCE	elektroda ze skelného uhlíku (Glassy Carbon Electrode)
LC	kapalinová chromatografie
<i>LOD</i>	limit detekce (Limit of Detection)
<i>LOQ</i>	limit kvantifikace (Limit of Quantitation)
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
PDDA	poly(diallyldimethylammonium chlorid)
TMS	trimethylsilyl chlorid

1. Teoretická část

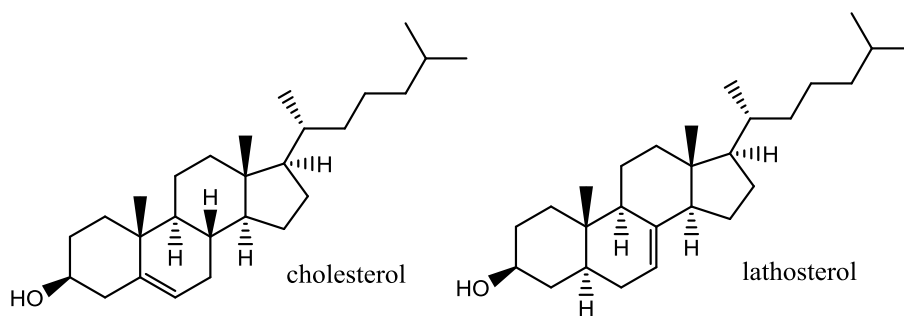
1.1 Cíl práce

Cholesterol je nezastupitelná molekula přítomná prakticky ve všech živočišných buňkách. Jeho stanovení je důležité nejen pro klinická vyšetření, ale též například pro kontrolu kvality potravin. Stejně tak důležitou roli jako cholesterol hraje jeho prekurzor lathosterol. Schopnost jeho stanovení poskytuje informace o poruchách biosyntézy cholesterolu.

Cílem této práce je v první části vývoj voltametrické metody ke stanovení cholesterolu v mléčných matricích pomocí elektrody z borem dopovaného diamantu, což navazuje na bakalářskou práci autorky, která se zabývala studiem voltametrického chování cholesterolu na elektrodě ze skelného uhlíku. Ve druhé části je cílem studium voltametrického chování lathosterolu v prostředí acetonitrilu a silné kyseliny za použití elektrody z borem dopovaného diamantu a elektrody ze skelného uhlíku a využití elektrochemické oxidace lathosterolu k jeho stanovení. Práce je součástí širšího projektu řešeného v UNESCO Laboratoři elektrochemie životního prostředí na Katedře analytické chemie, který je věnován studiu elektrochemických vlastností steroidních sloučenin a využití elektroanalytických metod pro jejich detekci.

1.2 Studované látky

Cholesterol i jeho prekurzor lathosterol patří do skupiny sterolů, amfipatických molekul biosyntetizovaných z izoprenových jednotek. Jejich molekuly se skládají ze steroidního jádra, na kterém je navázána polární hydroxylová skupina na uhlíku C₃ a nepolární postranní řetězec na uhlíku C₁₇ a dále obsahují methylové skupiny navázané na uhlíky C₁₀ a C₁₃. Lathosterol (Δ^5) se od cholesterolu (Δ^7) odlišuje polohou dvojně vazby, jak je patrné z obr. 1.1.



Obr. 1.1 Porovnání struktur cholesterolu a lathosterolu.

1.2.1 Cholesterol

Cholesterol je molekula univerzálně přítomná v živočišných buňkách. Je významný, jelikož zachovává fluiditu membrány, strukturu mikrodomén a permeabilitu. Je prekurzorem žlučových kyselin, steroidních hormonů, lipoproteinů a vitamínu D. Kromě toho je velmi důležitý pro zárodečný vývoj savců [1]. Primárním prekurzorem pro biosyntézu sterolů je acetyl koenzym A, který je hlavním katabolickým produktem sacharidů, mastných kyselin a aminokyselin. Biosyntéza zahrnuje řadu kroků. První fází je syntéza mevalonátu, z nějž v dalších krocích vzniká isopentyldifosfát. Z něj poté kondenzačními reakcemi vznikne skvalen. V poslední části biosyntézy dochází k epoxidaci skvalenu a následně cyklizačním reakcím, které vedou ke vzniku lanosterolu. Z lanosterolu vzniká cholesterol buď přes intermediát desmosterol, nebo 7-dehydrocholesterol [2].

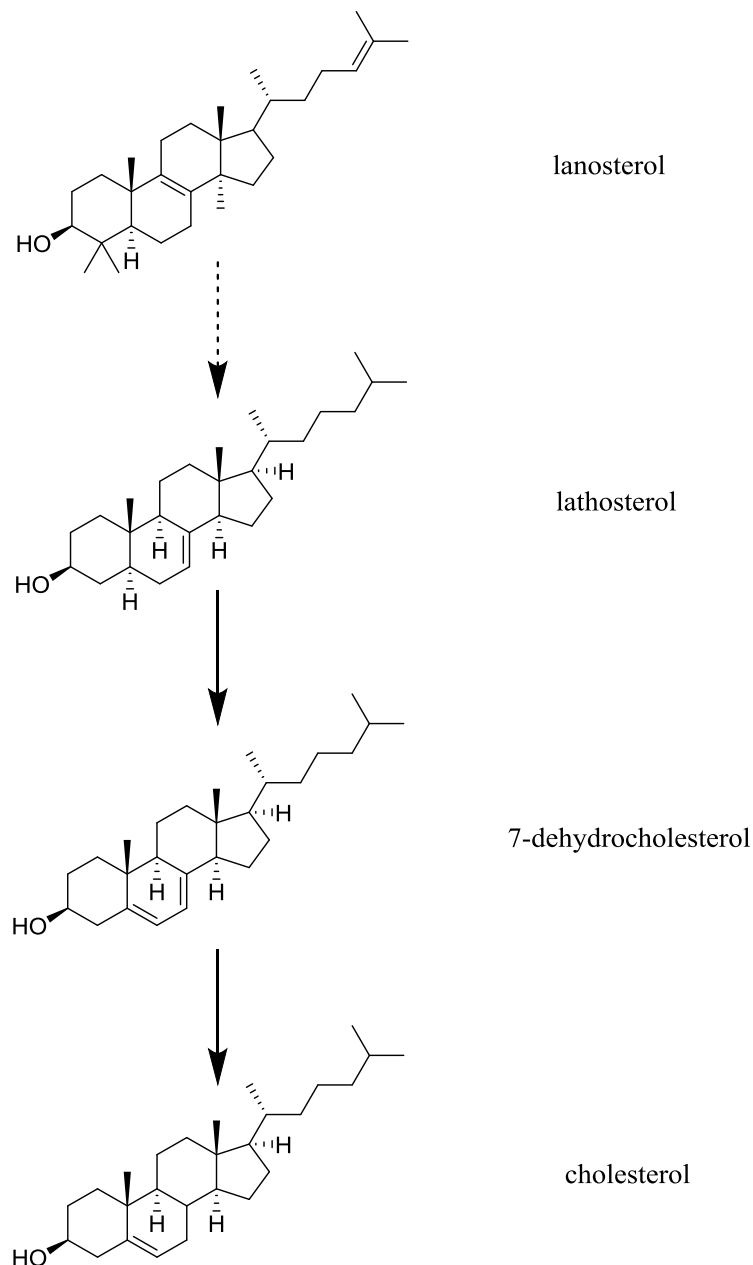
V bakalářských pracích [3,4] byly zkoumány elektrochemické vlastnosti cholesterolu v kyselině chloristé v acetonitrilu na elektrodách z borem dopovaného diamantu (BDDE) a skelného uhlíku (GCE). Bylo zjištěno, že cholesterol poskytuje ireverzibilní odezvu v anodické oblasti s potenciálem v závislosti na obsahu vody mezi +1200 a +1400 mV na GCE, a mezi +1300 a +1600 mV na BDDE. Se zvyšujícím se obsahem vody docházelo k posunu potenciálů vrcholů pík směrem k méně pozitivním hodnotám.

1.2.2 Lathosterol

Lathosterol, neboli cholesta-7-en-3 β -ol, je součástí biosyntetické dráhy cholesterolu. Je jedním z intermediátů v závěrečné fázi biosyntézy cholesterolu, kdy se lanosterol

přeměňuje řadou enzymově katalyzovaných reakcí na cholesterol [5]. Tato biosyntetická dráha je schematicky naznačena na obr. 1.2.

Cholesterol má nezastupitelnou funkci nejen v normálním fungování buněk, ale také v zárodečném vývoji. Proto poruchy jeho biosyntézy způsobují řadu defektů ve vývoji nervové soustavy a anomálie ve struktuře mozku, opěrné soustavy a kůže. Nejznámějším syndromem je Smith-Lemli-Opitzův syndrom, autozomálně recesivní onemocnění způsobené defektem v enzymu přeměňujícím 7-dehydrocholesterol na cholesterol (3 β -hydroxysterol Δ^7 reduktasa). Výskyt toho syndromu je ve většině oblastí u 1 z 20000 novorozenců [6]. Lathosterol konkrétně je diagnostickým indikátorem poruchy zvané lathosterolosa. Jde o velmi vzácné autozomálně recesivní onemocnění zapříčiněné poruchou enzymu přeměňujícího lathosterol na 7-dehydrocholesterol (3 β -hydroxysterol Δ^5 desaturasa). Lathosterolosa se vyznačuje zvýšenou hladinou lathosterolu v krvi, fibroblastech nebo lymfocytech [7]. Projevy lathosterolosity jsou mikrocefalie, bitemporální zúžení, defekty nervové trubice, vrozený šedý zákal, poruchy růstu, mentální postižení a onemocnění jater [7,8]. Případů lathosterolosity bylo zatím diagnostikováno a publikováno pouze několik.



Obr. 1.2 Schéma přeměny lanosterolu na cholesterol.

1.3 Extrakce cholesterolu

Pro stanovení cholesterolu v biologických materiálech je nejprve nutná jejich úprava, která obvykle zahrnuje extrakci lipidů, separaci cholesterolu od interferujících složek nebo jeho uvolnění do volné formy a stanovení izolovaného cholesterolu. Než byla zavedena saponifikace, bylo nutné do procesu vždy zahrnout jako první krok přípravy vzorku extrakci lipidů. Předpokládalo se, že pro lepší extrakci cholesterolu ze vzorků

potravin, kde je obvykle vázán k řadě dalších složek jako lipoproteiny, proteiny a fosfolipidy, je třeba použít směs polárních a nepolárních rozpouštědel a mnohonásobnou extrakci k uvolnění cholesterolu z membrán. Bylo však zjištěno, že k izolování cholesterolu s dostatečným výtěžkem ze složitých matic potravin jednoduchou extrakcí hexanem, popřípadě toluenem, je vhodná saponifikace – buď extrahovaných lipidů, nebo přímá saponifikace vzorku [9,10]. Hexan je pro extrakci upřednostňován, jelikož je ve srovnání s toluenem méně polární, což zabraňuje tvorbě emulze [11]. Pravděpodobně saponifikace, nikoli extrakce, totiž hraje roli v uvolnění cholesterolu od ostatních složek, především těch, které udržují cholesterol navázaný v membránách. Pokud je cholesterol jediným měřeným analytem, používá se přímá saponifikace vzorku [9,10].

Přímá saponifikace je vhodná i pro detekci cholesterolu v mléčných výrobcích. Oproti saponifikaci extrahovaných lipidů je výhodná vzhledem k lepšímu výtěžku, úspoře času a spotřebě rozpouštědel [12].

Pro přímou saponifikaci je nejvhodnější použít ethanolový roztok KOH o koncentraci v rozmezí 0,33 – 0,5 mol l⁻¹, teplotní rozmezí 55 – 75 °C a časové rozmezí 15 – 60 minut. Delší čas saponifikace může způsobit ztráty cholesterolu [9].

1.4 Borem dopovaný diamant

Uhlíkové elektrody, především elektrody z borem dopovaného diamantu, se staly v posledních letech běžně užívaným elektrodovým materiálem v různých elektrochemických technologiích zahrnujících destrukci organických polutantů v odpadních vodách, elektrosyntézu, zařízení pro uchování energie a elektroanalýzu. Mezi výhodné vlastnosti BDDE patří například široké potenciálové okno, chemická inertnost, vysoká stabilita a odolnost vůči deaktivaci [13].

Diamant je extrémně tvrdý materiál s vysokým elektrickým odporem, chemickou inertností, optickou průhledností a nejvyšší známou tepelnou vodivostí [14]. Atomy uhlíku jsou v diamantu v tetraedrickém uspořádání, každý atom uhlíku je vázán ke čtyřem sousedním atomům pomocí sp³ hybridizovaných orbitalů. Jednotlivé vrstvy se opakují ve vzorci ABCABC, tedy každá třetí vrstva je shodná. Tato struktura je zásadně odlišná od struktury grafitové, která se skládá z sp² hybridizovaných kruhů, kde se každý atom uhlíku váže ke třem sousedním atomům uhlíku. V grafitové struktuře se

vrstvy opakují v sekvenci ABAB, tedy každá druhá vrstva je shodná [15]. V BDD filmech jsou některé atomy uhlíku nahrazeny atomy nečistot – boru. Atomy boru, které se chovají jako akceptory elektronů, vytváří vodivý pás na energetické hladině zhruba o 0,35 eV vyšší, než je okraj valenčního pásu. Právě proto může diamant, jinak jeden z nejlepších izolantů, získat v závislosti na koncentraci obsaženého boru polovodičové až polokovové vlastnosti, a je tudíž využitelný pro elektrochemická měření [16]. Elektrickou vodivost diamantových filmů lze zvýšit i použitím jiných dopantů, např. atomů fosforu nebo dusíku [17].

1.4.1 Příprava diamantových filmů

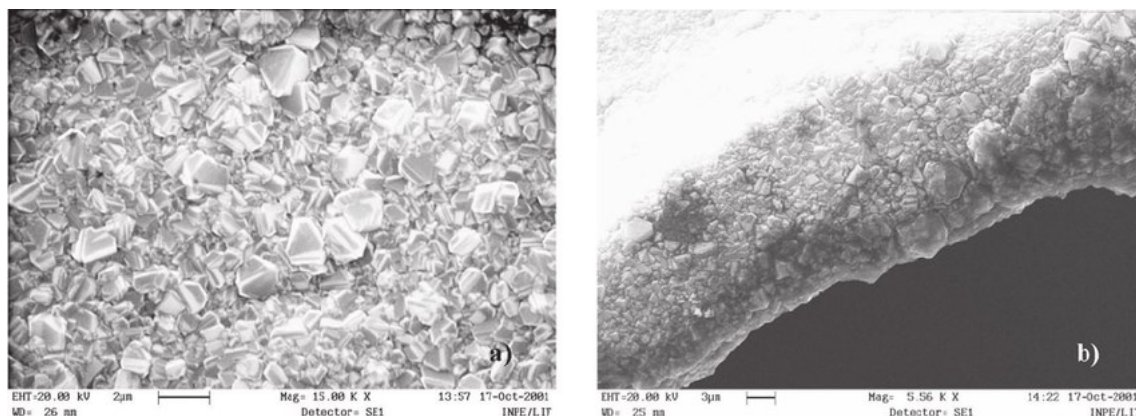
Diamantové filmy dopované borem se připravují chemickou depozicí par (CVD). Existují různé techniky, např. použití žhaveného vlákna, mikrovlnného ohřevu nebo pomocí plasmu [17,18]. V těchto procesech je plyn obsahující uhlík energeticky aktivován k rozložení molekul na radikály. Nejčastěji je k depozici používána směs methanu a vodíku. Metody se liší především ve způsobu, jakým je dosaženo aktivace plynu. Typické podmínky jsou poměr objemu C/H 0,5 – 2 %, tlak 10 – 100 torr, teplota substrátu 800 – 1000 °C, výkon mikrovlnného zdroje 1000 – 1300 W, popřípadě teplota žhaveného vlákna přibližně 2100 °C. Film krystalizuje rychlostí 0,1 – 1 μm/h, přičemž pro kontinuální pokrytí substrátu je třeba přibližně 1 μm [16,18].

Dopování borem je uskutečněno buď přidávkem diboranu do směsi plynů, nebo přidávkem hexagonálního nitridu boru, ze kterého je diboran uvolňován interakcí s atomárním vodíkem. Atomární vodík hraje důležitou roli při obou metodách, jelikož zabraňuje uhlíku na povrchu filmu přecházet z sp^3 hybridizované diamantové mikrostruktury na sp^2 hybridizovanou grafitovou mikrostrukturu, tedy potlačuje formování nediamantových uhlíkových nečistot [16,18].

Jako substrát se nejčastěji používá i přes svoji křehkost křemíková destička, lze však použít i molybden, wolfram, titan, niob, tantal nebo skelný uhlík [18,19]. Substrát se předpřipravuje čištěním sérií rozpouštědel a následně leštěním diamantovým práškem. Ulpělé částice diamantu poté slouží jako krystalizační centra pro růst filmu [16].

K charakterizaci morfologických, optických, chemických a elektronových vlastností BDD filmů se používají analytické metody jako skenovací elektronová mikroskopie, Ramanova spektroskopie nebo rastrovací tunelová mikroskopie [16]. Na obr. 1.3 jsou

zobrazeny snímky povrchu a okraje vzorku BDD filmu získané pomocí skenovací elektronové mikroskopie.



Obr. 1.3 Snímky povrchu a okraje vzorku BDD filmu získané pomocí skenovací elektronové mikroskopie (dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Scanning-electron-micrographs-of-boron-doped-diamond-film-a-superficial-vision-b_fig1_26371573).

1.4.2 Elektrochemické vlastnosti BDDE

BDDE vykazují několik technologicky významných vlastností. Mají velmi široké potenciálové okno ve vodných i nevodných prostředích. Potenciálové okno je definované jako rozdíl potenciálů, při kterých anodický i katodický proud dosahuje hodnoty $50 \mu\text{A}$; pro BDDE je jeho šířka přibližně $3,5 \text{ V}$ (ve srovnání s elektrodou ze skelného uhlíku je přibližně o 1 V širší). Šířka potenciálového okna se ovšem může snížit v závislosti na kvalitě BDD filmu a na obsažených nediamantových sp^2 uhlíkových nečistotách. BDDE vykazují vysokou stabilitu a odolnost vůči korozi v kyselých i zásaditých prostředích. Povrch elektrody je inertní, má poměrně nízké adsorpční schopnosti a dobře odolává pasivaci. Proud pozadí a kapacita elektrické dvojvrstvy je až o řád nižší než u elektrod ze skelného uhlíku. Rozhraní diamant – elektrolyt je téměř dokonale polarizovatelné [19].

Chování a vlastnosti povrchu BDDE závisí na jeho terminaci. BDD film získaný pomocí CVD je především H-terminovaný. H-terminované povrchy jsou hydrofobní s negativní elektronovou afinitou, a vykazují relativně vysokou povrchovou vodivost. O-terminované povrchy jsou hydrofilní s pozitivní elektronovou afinitou a nízkou vodivostí. To, jakým způsobem je povrch terminován, závisí na typu elektrochemické a mechanické předúpravy. Z H-terminovaných povrchů lze vytvořit oxidované povrchy

pomocí anodické polarizace při vysoké proudové hustotě či použitím vysoce pozitivních potenciálů v oblasti anodického rozkladu vody, kdy vznikají hydroxylové radikály [20]. Oxidace probíhá sledem reakcí s přímým přenosem elektronů a reakcemi s hydroxylovým radikálem za vzniku karbonylových a karboxylových skupin [21]. Naopak H-terminované povrchy lze získat použitím vysokých negativních potenciálů či negativních proudových hustot, kdy dochází k vývoji vodíku [13]. Funkční skupiny na povrchu BDDE mají silný vliv na přenos náboje v anodických i katodických reakcích. Zavedení kyslíkatých skupin může kinetiku některých reakcí inhibovat, zatímco u jiných typů ji usnadnit; elektrochemická odezva látek závisí na tom, zda byl povrch elektrody před měřením polarizován anodicky nebo katodicky. Změna povrchu elektrody může ovlivnit reprodukovatelnost a terminace povrchu BDDE též ovlivňuje adsorpci organických molekul [21,22].

Předúprava povrchu BDDE je zásadním kritériem ovlivňujícím kinetiku elektronového přenosu. O-terminované povrchy jsou voleny pro široké potenciálové okno v oblasti pozitivních potenciálů a pro možnost *in situ* anodické předúpravy. Tyto povrchy jsou preferovány pro analyty, které během oxidace polymerují, a tím pasivují elektrodový povrch. Vzniklý polymerní film blokující elektrodu lze *in situ* odstranit vložení kladného potenciálu v oblasti anodického rozkladu vody, kdy vznikají hydroxylové radikály neselektivně oxidující všechny látky. H-terminované povrchy zase umožňují detekci látek, které neposkytují dostačující signál na O-terminovaném povrchu. Nárůst proudové odezvy při užití diferenčních pulzních technik je způsoben rychlejší kinetikou přenosu náboje na H-terminovaném povrchu než na O-terminovaném povrchu díky vyšší povrchové vodivosti H-terminovaných povrchů. Pro předúprava povrchu elektrody pomocí mechanického leštění platí, že změny v elektrochemickém chování sloučenin jsou spjaty především s mechanickým odstraněním sp^2 uhlíků přítomných na povrchu elektrody, které nesou kyslíkové funkční skupiny. Stejně jako anodická a katodická předúprava, i mechanická předúprava zajišťuje zvýšení odezvy, zároveň ale také vede k nejnižšímu proudu pozadí [13].

BDDE vykazují pro anorganické redoxní markery jako je $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ reverzibilní až quasireverzibilní kinetiku elektronového přenosu. Odolávají deaktivaci a adsorpci polárních molekul lépe než elektrody ze skelného uhlíku, které jsou kvůli svému sp^2 charakteru a přítomnosti polárních skupin na jejich povrchu k pasivaci náchylné. Díky

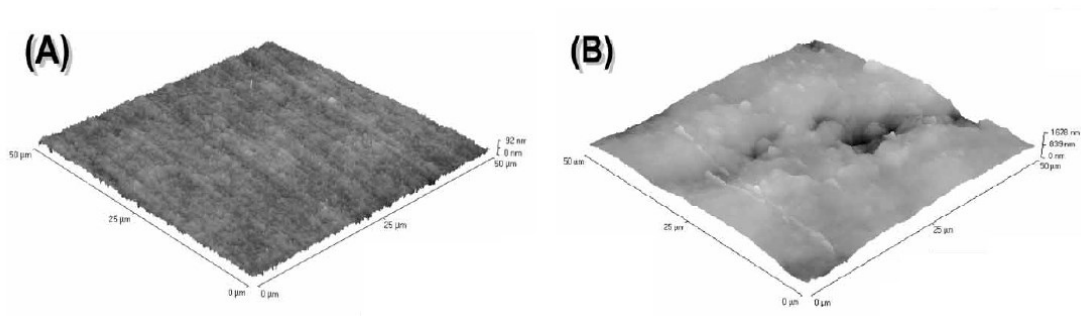
této odolnosti jsou BDDE vhodnější k použití pro elektroanalytická měření organických látek, které mají tendenci se na elektrodový povrch adsorbovat [16,23].

1.5 Skelný uhlík

Elektroda ze skelného uhlíku je stejně jako BDDE běžně užívanou elektrodou pro různé elektrochemické aplikace. Přestože BDDE má řadu výhod, GCE rovněž disponuje dobrými elektrochemickými vlastnostmi, jako je například široké potenciálové okno, chemická inertnost a kompatibilita s běžnými rozpouštědly, a zároveň je cenově dostupnější [24].

1.5.1 Příprava a vlastnosti skelného uhlíku

Skelný uhlík je připravován vystavením organických prekurzorů sériím zahřívání v inertní atmosféře při teplotách až 3000 °C. Organickými substráty pyrolyzovanými s největším výtěžkem (okolo 50 %) jsou například fenolformaldehyd, polyvinylalkohol nebo polyakrylonitril [25]. Skelný uhlík je neprostupný pro plyny, chemicky extrémně inertní a vysoce odolný vůči kyselinám, penetraci kyslíku a též je mechanicky odolný. Struktura povrchu skelného uhlíku je tvořena „řetízky“ grafitových plošek náhodně organizovaných v prostoru [24,26]. Čím náhodněji jsou grafitové plošky orientované, tím je uhlíková struktura kompaktnější [27]. Jak je zmíněno v kapitole 1.4, atomy uhlíku v grafitu jsou všechny sp^2 hybridizované, na rozdíl od sp^3 hybridizovaných atomů uhlíku v diamantu. To má vliv na rozdíl mezi strukturou skelného uhlíku a BDD filmu, jak je zobrazeno v obr. 1.4, kde je povrch BDD filmu mnohem víc strukturovaný [28]. Struktura závisí na teplotě použité při přípravě. Při teplotě 1000 °C je struktura vysoce neuspořádaná a mikroporézní, zatímco při teplotě 3000 °C jsou póry větší [29]. Práce [29] také na základě zkoumání skelného uhlíku pomocí transmisní elektronové mikroskopie s vysokým rozlišením předpokládá, že skelný uhlík obsahuje mikrostruktury příbuzné fullerenu, vysvětlující jeho nízkou reaktivitu v porovnání s negrafitujícími uhlíky, porozitu, a též by mohla vysvětlovat jeho adsorpční vlastnosti.



Obr. 1.4 Znáznornění struktury povrchu BDD filmu (A) a skelného filmu (B) použitím techniky mikroskopie atomárních sil. Převzato a upraveno z [28].

1.5.2 Elektrochemické vlastnosti skelného uhlíku

Elektrochemická odezva skelného uhlíku je významně ovlivněna stavem svého povrchu, zejména výskytem povrchových funkčních skupin uhlík-kyslík. Leštěním povrchu lze dosáhnout změny koncentrace těchto povrchových funkčních skupin, a tím zvýšení povrchové aktivity. Přítomnost povrchových funkčních skupin slouží k usnadnění elektrodoových reakcí [27].

Rychlost elektronového přenosu je na elektrodě ze skelného uhlíku menší než na elektrodách kovových. Existují však metody pro zvýšení rychlosti řady redoxních reakcí na GCE. Ty zahrnují různé způsoby aktivace, například leštěním elektrodoového povrchu, zahříváním na vysoké teploty či různými chemickými a elektrochemickými předúpravami [30].

Běžně užívanou metodou aktivace je čištění a leštění elektrodoového povrchu abrazivou jako je alumina [31]. Obvykle je třeba po čištění ulpělé částice aluminy na elektrodě odstranit, jinak hrozí špatná reprodukovatelnost odezvy. Podle práce [31] je lze však i využít, například pro stanovení katecholů, jelikož tyto ulpělé částice aluminy katechol silně adsorbují a katalyzují jeho oxidaci. Další metodou značně zlepšující elektrochemické vlastnosti GCE je její zahřívání na 500 °C při sníženém tlaku [32]. Chemickou metodou čištění je například redukce jodičnanem nebo ponoření do kyseliny chromové, které zlepšuje reprodukovatelnost [33].

1.6 Metody pro stanovení cholesterolu

Krátké shrnutí příkladů metod používaných ke stanovení cholesterolu bylo uvedeno již v bakalářské práci autorky [3]. V této podkapitole následuje jeho rozšíření a doplnění.

1.6.1 Chromatografické metody

Pro rutinní analýzu je běžně užívanou metodou ke stanovení cholesterolu plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem, které ovšem musí předcházet derivatizace. Často užívaná je i vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s různými detektory, jelikož cholesterol je často třeba oddělit od dalších látek. Preferované detektory pro HPLC jsou nedestruktivní detektory jako například UV/VIS detektor či detektor s diodovým polem (DAD). Tyto detektory však mají vysoké limity detekce, protože cholesterol ve své molekule neobsahuje významný chromofor. Pokročilejší metody jako je hmotnostní spektrometr (MS) jsou užívány hlavně pro kontrolu rutinních analýz [9]. Příklady instrumentálních metod jsou uvedeny v tab. 1.1.

Tab. 1.1 Příklady instrumentálních metod užívaných ke stanovení cholesterolu s příslušnými limity detekce (*LOD*). Převzato a doplněno z [3].

Metoda-detektor	Matrice	Derivatizace	<i>LOD</i> (nmol l⁻¹)	Ref.
GC-MS	Plodová voda	Pyridin + BSTFA*	10	[34]
GC-FID	Tabák	Pyridin + BSTFA*	259	[35]
GC-FID	Mléko	—	13,4 – 38,0	[36]
HPLC-MS	Olivový olej	—	0,32 – 2,36	[37]
HPLC-DAD	Léčiva založená na liposomech	—	$2,87 \cdot 10^4$	[38]
HPLC-UV	Mléko	—	$3,88 \cdot 10^3$	[39]

* *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid

1.6.2 Enzymové metody a biosenzory

Velké pozornosti se dostává vývoji biosenzorů, které rovněž využívají cholesterol oxidasy, jejíž reakce s cholesterolem produkuje peroxid vodíku. Biosenzory jsou zařízení schopná zajistit specifickou a kvantitativní analytickou informaci využitím biologického prvku, tedy například enzymu, který je imobilizován v přímém kontaktu s elektrochemickým prvkem zajišťujícím převod biochemické informace na elektrický signál. Jejich hlavními výhodami jsou specifčnost, malá velikost, schopnost neustálého sledování koncentrace analytu v dané matrici a možnost měřit analyt bez použití reagentu [40].

Enzymy v biosenzorech jsou imobilizovány na pevných látkách, anorganických i organických, tzv. matricích. Důležité je, aby byl daný film přizpůsobivý pro různá prostředí, především odolný široké škále pH, teploty a iontové síly. Stabilita imobilizační techniky určuje citlivost a spolehlivost signálu biosenzoru. Běžně užívanými materiály pro tvorbu filmů k ukotvení enzymů jsou například vodivé polymery [41], karbonové nanotrubičky [42] nebo nanočástice [43]. Taková modifikace pracovní elektrody jí poskytuje různé výhodné vlastnosti oproti nemodifikované elektrodě, jako je například vyšší citlivost, ale také větší rozsah detekce, lepší odolnost či životnost biosenzoru [44].

Biochemický signál může být převeden na měřitelný signál různými způsoby. V elektrochemických biosenzorech je to amperometricky, potenciometricky či konduktometricky. Nejběžněji jsou používány techniky cyklická voltametrie a amperometrie [40]. Vývoj je nejvíce soustředěn na amperometrické biosenzory, neboť jsou nejčastěji užívanými biosenzory v monitorování a diagnostických testech v klinických analýzách. Výhodami elektrochemických biosenzorů oproti jiným sensorům (např. optickým, kalorimetrickým) jsou rychlost odezvy, konstrukční jednoduchost a nižší cena [45]. Naopak nevýhodou může být kontaminace povrchu biosenzoru [46].

Příklady různých elektrochemických biosenzorů pro stanovení cholesterolu využívajících cholesterol oxidasu a jejich vlastnosti jsou uvedeny v tab. 1.2.

Tab. 1.2 Příklady různých elektrochemických biosenzorů pro stanovení cholesterolu. Převzato a upraveno z [40].

Matrice/elektroda	Linearita (mmol l ⁻¹)	LOD (μmol l ⁻¹)	Ref.
Oxidovaný polypyrrol/Pt	0,025 – 0,3	5,7	[47]
Síťotisková grafitová elektroda	2,81 – 13	—	[48]
Ferrokyanid draselný – grafit – teflon	0,01 – 3	6,2	[49]
PDDA*/Au-CNT	0 – 6	200	[42]
CNT*-Pt/grafitová elektroda	4 · 10 ⁻³ – 0,1	1,4	[50]
Pt-CNT-CHIT*/Au	0,01 – 3	5	[51]
Au elektroda	0 – 2,1	60	[52]

*PDDA – poly(diallyldimethylammonium chlorid), CNT – uhlíkové nanotrubičky, CHIT – chitosan dopovaný nanočásticemi

1.6.3 Kolorimetrické metody

Kolorimetrické stanovení cholesterolu pomocí Liebermann-Burchardovy reakce je známo již od konce 19. století. Při této reakci dochází působením směsi acetanhydridu a koncentrované kyseliny sírové ke vzniku modrozeleného produktu. Mechanismus této reakce byl dlouho nejasný. Nyní je však díky metodám jako je *in situ* nukleární magnetická rezonance (díky které lze sledovat zvyšující se hladinu polárních produktů během reakce) známo, že dochází k rychlé přeměně cholesterolu na jeho acetátové a sulfátové deriváty, které jsou pomalu desaturovány sulfonovými kyselinami, kdy nakonec dochází k aromatizaci na steroidním jádru, jehož struktura je zdrojem zabarvení produktu [53].

Provedení stanovení pomocí Liebermann-Burchardovy reakce vyžaduje poměrně specifické podmínky. Práce [54] ukazuje několik faktorů ovlivňujících vznik zabarvení. Jedním z nich je vliv teploty na vznik modrozeleného zbarvení absorbujícím při přibližně 620 nm. Při přidání reagentu při 0 °C se produkt v podstatě netvoří; při vyšších teplotách ano, ale maximální absorbance se liší při různých teplotách v čase od

přidání reagentu. Faktor času tedy rovněž závisí na teplotě. Dalším zkoumaným vlivem bylo vystavení světlu, které má nepříznivý účinek na vývoj zabarvení.

Detekci pomocí spektrofotometrického stanovení produktů Liebermann-Burchardovy reakce využívá Abell-Kendallova metoda pro stanovení cholesterolu ze séra. Užívá však modifikovaného činidla, kdy se ochlazený acethydrid smíchá s koncentrovanou kyselinou octovou, míchá se při nízké teplotě, a poté se přidá koncentrovaná kyselina octová. Činidlo se nechá reagovat s cholesterolem, a vzniklý produkt se poté stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 620 nm [55].

1.7 Metody pro stanovení lathosterolu

Užívanými metodami pro stanovení lathosterolu jsou především instrumentální metody, i když většina z nich vyžaduje derivatizaci lathosterolu pro dosažení dostatečné citlivosti. Velmi důležitou částí stanovení lathosterolu je příprava vzorku, jelikož stanovení je často komplikováno přítomností dalších lipidů, a také nízkou relativní koncentrací vzhledem k cholesterolu. Proces přípravy vzorku může zahrnovat saponifikaci, extrakci na pevné fázi či mikroextrakci na pevné fázi [56]. K derivatizaci se používají různé látky.

Běžnou metodou používanou ke stanovení lathosterolu je stejně jako v případě cholesterolu plynová chromatografie jak ve spojení s hmotnostním spektrometrem, tak s plamenově ionizačním detektorem; dále také kapalinová chromatografie (LC) a HPLC s různými detektory, např. UV nebo elektrochemickým detektorem (ECD). Zmíněná metoda HPLC-ECD je schopna stanovit lathosterol simultánně s cholesterolem i přes jeho daleko menší relativní zastoupení, a to při použití kolony s C-18 reverzní fází jako stacionární fáze, acetonitrilu obsahujícího chloristan lithný jako mobilní fáze a potenciálu detekce +2,8 V vs. Ag/AgCl [57]. Příklady těchto metod jsou uvedeny v tab. 1.3.

Tab. 1.3 Příklady instrumentálních metod užívaných ke stanovení lathosterolu s příslušnými limity detekce (*LOD*).

Metoda-detektor	Matrice	Derivatizace	<i>LOD</i> ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	Ref.
GC-FID	Sérum	Pyridin + BSTFA*	0,5	[58]
GC-MS	Sérum a mozek	TMS*	—	[59]
HPLC-UV	Sérum	4-bromobenzensulfonyl chlorid	1,81	[60]
LC-MS/MS	Sérum	Kyselina pikolinová	—	[61]
HPLC-ECD	Sérum	—	0,03	[57]

*BSTFA – *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid, TMS – trimethylsilyl chlorid

2. Experimentální část

2.1 Příprava roztoků a použité chemikálie

Pro extrakci cholesterolu z mléčných matricí byly připraveny zásobní roztoky hydroxidu draselného o koncentraci $0,4 \text{ mol l}^{-1}$ v ethanolu, a cholesterolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ v isopropanolu.

Pro voltametrická měření byly připraveny roztoky chloristanu sodného o koncentraci $0,5 \text{ mol l}^{-1}$ v acetonitrilu pro meziprostor voltametrické cely, a roztok obsahující dusičnan stříbrný o koncentraci $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ a chloristan sodný o koncentraci 1 mol l^{-1} v acetonitrilu pro prostor referentní elektrody.

Pro spektrofotometrické stanovení cholesterolu byly připraveny roztoky cholesterolu v ethylacetátu o koncentracích $0,1; 0,25; 0,5; 0,75$ a 1 mg ml^{-1} ; a roztoky cholesterolu v koncentrované kyselině octové o koncentracích $0,1; 0,25; 0,35; 0,5 \text{ mg ml}^{-1}$.

Pro studium voltametrického chování lathosterolu byly připraveny zásobní roztoky lathosterolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ v acetonitrilu, a kyseliny chloristé, sírové, dusičné, fosforečné a chloristanu sodného o koncentraci 1 mol l^{-1} v acetonitrilu.

Původ použitých chemikálií je uveden v tab. 2.1. Pokud není uvedeno jinak, byly použité chemikálie analytické čistoty.

Tab. 2.1 Původ použitých chemikálií.

Chemikálie	Původ
KOH, 70% HClO ₄ , acetanhydrid	Penta (Chrudim)
Ethanol, kyselina octová, 96% H ₂ SO ₄ , 65% HNO ₃ , 85% H ₃ PO ₄ , ethylacetát	Lach-Ner (Neratovice)
Cholesterol, hexan	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Merck (Německo)
Acetonitril	Honeywell (Německo)
NaClO ₄ , AgNO ₃	Fluka

Původ stanovovaných vzorků mléčných výrobků je uveden v tab. 2.2.

Tab. 2.2 Typ a původ vzorků použitých ke stanovení cholesterolu.

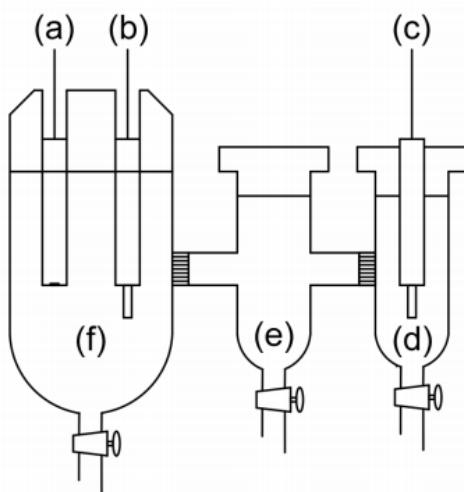
č.	Vzorek	Výrobce
1)	Trvanlivé mléko (1,5 % tuku)	Mlékárna Kunín, Ostrava – Martinov
2)	Trvanlivá smetana do kávy Kapucín (10 % tuku)	Bohušovická mlékárna
3)	Zahuštěné neslazené mléko (7,5 % tuku)	Tatra, Mlékárna Hlinsko
4)	Smetana do kávy (10 % tuku)	Pilos, Mlékárna Hlinsko
5)	Čerstvé mléko (1,5 % tuku)	Pilos, Mlékárna Hlinsko
6)	Polotučné mléko (1,5 % tuku)	Mlékárna Kunín, Ostrava – Martinov

2.2 Aparatura

2.2.1 Voltametrická měření

Pro voltametrická měření byl použit polarograf Eco-Tribo se softwarem Polar.Pro 5.1 (Eco-Trend Plus, Praha). Pro stanovení cholesterolu v mléčných matricích byla jako pracovní elektroda využita elektroda z borem dopovaného diamantu (Windsor Scientific, UK) o průměru disku 3 mm ($S = 7,07 \text{ mm}^2$). Pro studium voltametrického chování lathosterolu byla využita jako pracovní elektroda rovněž BDDE, a také elektroda ze skelného uhlíku (Metrohm, Švýcarsko) o průměru disku 2 mm ($S = 3,14 \text{ mm}^2$). V obou případech byla jako pomocná elektroda užitá platinová elektroda (Elektrochemické detektory, Turnov), a jako referentní elektroda nevodná elektroda dle Pleskova, která je tvořena stříbrným drátkem ponořeným do roztoku obsahujícího dusičnan stříbrný o koncentraci $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ a chloristan sodný o koncentraci 1 mol l^{-1} v acetonitrilu.

Byla užitá speciální voltametrická cela skládající se ze tří částí, které jsou od sebe odděleny fritou (obr. 2.1, převzato z [62]). První z nich je pracovní část, kde je v analyzovaném roztoku ponořena pracovní a pomocná elektroda; druhou částí je meziprostor, který slouží jako solný můstek; třetí část je prostor referentní elektrody.



Obr. 2.1 Schéma použité voltametrické cely, kde (a) je pracovní elektroda, (b) pomocná elektroda, (c) referenční elektroda, (d) prostor referenční elektrody, (e) meziprostor a (f) pracovní prostor.

2.2.2 Spektrofotometrická měření

K spektrofotometrickému stanovení cholesterolu byl použit spektrofotometr Hewlett Packard 8453.

2.3 Pracovní postup a použité metody

2.3.1 Extrakce cholesterolu z mléčných matric

Extrakce kapalina-kapalina byla provedena dle následujícího optimalizovaného postupu vycházejícího z práce [10]. Do zkumavky byl odvážen 1 g vzorku mléčného výrobku (viz tab. 2.2). Následně k němu bylo přidáno 5 ml roztoku KOH v ethanolu o koncentraci $0,4 \text{ mol l}^{-1}$ a mícháno po dobu 1 min. Dále byl vzorek zahříván na vodní lázni na $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 min. Poté se směs nechala vychladnout na pokojovou teplotu. K směsi bylo poté přidáno 5 ml deionizované vody a mícháno 1 min. Směs byla extrahována dvakrát s 10 ml n-hexanu v dělicí nálevce, protřepávání probíhalo po dobu 1 min. Po rozdělení směsi na dvě fáze byla horní hexanová vrstva odebrána. Obě hexanové frakce byly smíchány, a z nich bylo odebráno 5 ml hexanového extraktu a vysušeno pod N_2 .

Kvantifikace byla prováděna metodou přidavku standardu. Byly prováděny tři přidavky standardu, které byly dávkovány přímo do vzorku – extrakce byla prováděna již s

přídavkem. Do tří zkumavek byl odvážen 1 g vzorku, a k němu bylo přidáno 34, 68 a 102 μl standardu (roztok cholesterolu v isopropanolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$) do první, druhé a třetí zkumavky. Další postup byl shodný jako při zpracování samotného vzorku.

2.3.2 Voltametrická měření cholesterolu

Odparek byl rozpuštěn v 5 ml základního elektrolytu (roztok kyseliny chloristé o koncentraci $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ v acetonitrilu s teoretickým obsahem vody 0,43 %, resp. 0,55 % podle měření pomocí titrace dle Karla Fischera [63]). Před každým skenem byla pracovní elektroda vyleštěna pomocí aluminu na leštící destičce (Elektrochemické detektory, Turnov).

Použitou metodou byla diferenční pulzní voltametrie (DPV) s následujícími parametry: výška pulsu +50 mV, šířka pulsu 80 ms, doba vzorkování před vložení pulsu a na jeho konci 20 ms (tj. celková šířka pulsu 100 ms), rychlost polarizace 20 mV s^{-1} .

Vyhodnocení bylo provedeno u různých vzorků buď protažením základní linie, nebo pomocí odečtení proudu základního elektrolytu od hodnoty proudu dané křivky.

Při přepočtu měřené koncentrace standardu ve vzorku pro získání koncentrace cholesterolu v původním vzorku byla předpokládána jednotková hustota daného vzorku.

2.3.3 Spektrofotometrická měření cholesterolu

Pro spektrofotometrické stanovení cholesterolu byly testovány dva postupy: prvním z nich byla metoda uvedena v příručce [64], užívající jako činidlo směs ethylacetátu, acetanhydridu a kyseliny sírové, která ovšem nebyla úspěšná. Proto byla následně využita metoda dle Abell-Kendalla [55].

Bylo připraveno činidlo: 20 ml acetanhydridu bylo odpipetováno do Erlenmeyerovy baňky a vychlazeno v lednici na teplotu nižší než $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Dále byl přidán 1 ml koncentrované kyseliny sírové a baňka byla protřepána a ponechána v lednici dalších 9 min. Poté byl proveden přídavek 10 ml koncentrované kyseliny octové, a činidlo bylo ohřáto na pokojovou teplotu.

Odparek extraktu cholesterolu byl rozpuštěn v 200 μl koncentrované kyseliny octové. K tomuto roztoku bylo přidáno 800 μl činidla a byl míchán zatemněný po dobu 30 min. Poté byl změřen na spektrofotometru při vlnové délce 620 nm.

2.3.4 Voltametrická měření lathosterolu

Měření byla prováděna s roztokem lathosterolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí kyseliny chloristé o koncentraci $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ v acetonitrilu. Obsah vody v měřených roztocích byl 0,55 %. Povrch pracovní elektrody byl před každým měřením obnovován leštěním na leštící destičce pomocí aluminy.

Použité metody byly cyklická voltametrie (CV), DC voltametrie a diferenční pulzní voltametrie. U CV a DC voltametrie byla používána rychlost polarizace 100 mV s^{-1} . V cyklické voltametrii bylo provedeno zpravidla pět skenů, z nichž do grafu byl použit první. U DPV byly použity shodné parametry jako jsou uvedeny v podkapitole 2.3.2.

2.3.5 Zpracování dat

Získání hodnot proudu a potenciálu ve vrcholech píků z naměřených křivek bylo provedeno v programu Polar.Pro 5.1. Bylo provedeno buď protažením základní linie, nebo spojením minim křivky před a za píkem.

Limit detekce (*LOD*) a limit stanovitelnosti (*LOQ*) byly vypočítány podle vztahů

$$\sigma = k_n \cdot R \quad (2.1)$$

$$LOD = \frac{3 \cdot \sigma}{k} \quad (2.2)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot \sigma}{k} \quad (2.3)$$

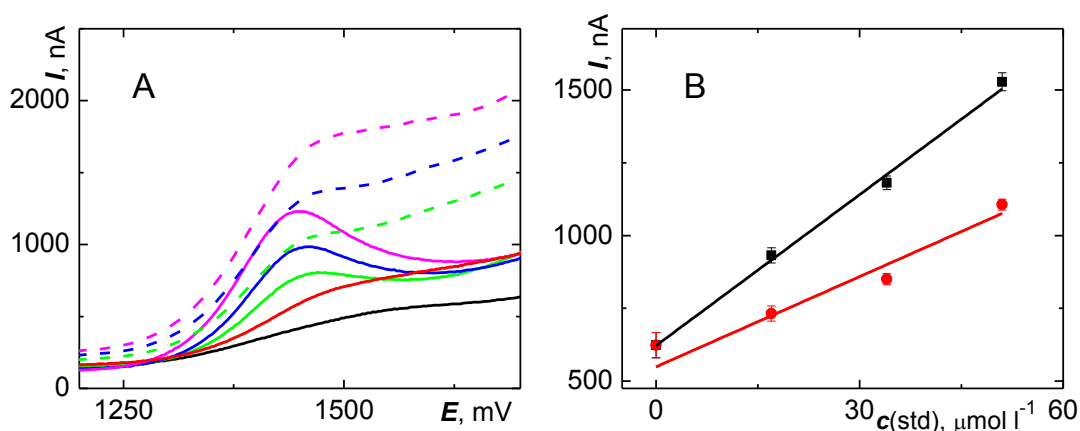
kde σ je směrodatná odchylka výšky proudu (pro nejnižší koncentraci, která poskytovala odezvu), k_n tabelovaná hodnota, R je rozptyl měření a k je směrnice kalibrační závislosti.

3. Výsledky a diskuze

3.1 Stanovení cholesterolu v mléčných matricích

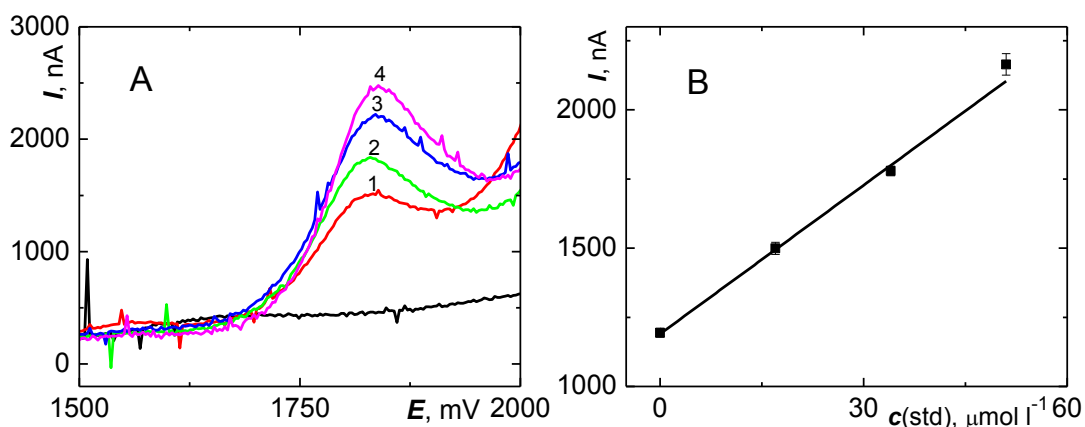
Stanovení cholesterolu z mléčných matric bylo provedeno po extrakci kapalina-kapalina pomocí diferenční pulzní voltametrie, jak je uvedeno v postupu práce v podkapitolách 2.3.1 a 2.3.2. Voltametrická měření probíhala v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ kyseliny chloristé v acetonitrilu obsahující teoreticky 0,43 % vody pocházející ze 70% kyseliny chloristé použité k přípravě zásobního roztoku. Experimentálně změřený obsah vody v tomto prostředí je podle titrace dle Karla Fischera 0,55 % [63].

Se vzorkem č. 1 byl určen výtěžek extrakce. Příslušné DP voltamogramy jsou uvedeny v obr. 3.1. Výtěžek byl určen ze dvou měření, kdy v prvním z nich byly přídavky standardu přidány do vzorku před extrakcí, tedy též prošly extrakcí. Ve druhém měření byly přídavky standardu přidány do již vyextrahovaného vzorku, tedy samy extrakcí nepošly. Z těchto měření byl vypočítán výtěžek ($74,8 \pm 3,8$) %.



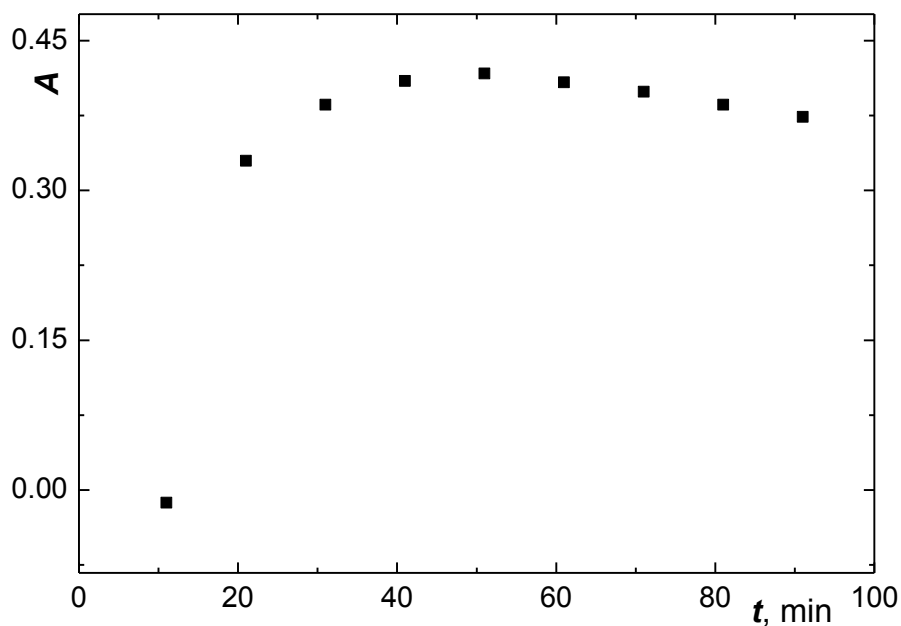
Obr. 3.1 DP voltamogramy (A) pro výpočet výtěžku extrakce ve vzorku č. 1 metodou přídavky standardu. Plné čáry znázorňují přídavky standardu do vzorku před extrakcí, přerušované čáry přídavky standardu po extrakci. Vzorek bez přídavky standardu (červeně); 1. přídavek standardu (zeleně); 2. přídavek standardu (modře); 3. přídavek standardu (fialově). Koncentrace přídavků viz obr. B. Černě je vyznačen základní elektrolyt obsahující HClO_4 o koncentraci $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ v acetonitrilu. Pracovní elektroda BDDE. Vyhodnocení pomocí protažení základní linie. Nejistota měření proudu píku I_p je vyjádřena jako směrodatná odchylka výšky píku I_p ($n = 4$).

Příklad voltamogramů dalšího měření (vzorek č. 2) je uveden na obr. 3.2.



Obr. 3.2 DP voltamogramy (A) pro stanovení cholesterolu ve vzorku č. 2 po extrakci kapalina-kapalina metodou přidavku standardu. (1) Vzorek bez přidavku standardu; (2) 1. přidavek standardu; (3) 2. přidavek standardu; (4) 3. přidavek standardu. Koncentrace přidavků viz obr. B. Černě je vyznačen základní elektrolyt obsahující HClO_4 o koncentraci $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ v acetonitrilu. Pracovní elektroda BDDE. Vyhodnocení pomocí protažení základní linie. Nejistota měření proudu píku I_p je vyjádřena jako směrodatná odchylka výšky píku I_p ($n = 4$).

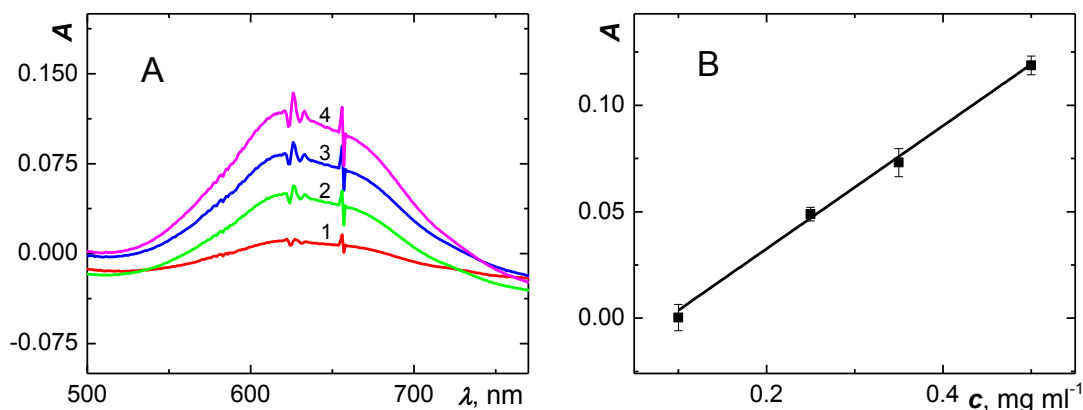
Pro stanovení cholesterolu pomocí spektrofotometrie bylo nejprve třeba tuto metodu optimalizovat. Stabilita signálu byla změřena podle následujícího postupu [64]. Bylo připraveno činidlo smícháním 9 ml ethylacetátu, 4 ml acetanhydridu a 0,8 ml kyseliny sírové. Zkumavka s činidlem byly protřepána a 10 min chlazena na teplotu $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Následně byl přidán roztok standardu cholesterolu o koncentraci 1 mg ml^{-1} a zkumavka byla chlazena ještě 5 min na teplotu $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Absorbance byla měřena vždy po 10 min při vlnové délce 625 nm. Graf závislosti absorbance na čase je uveden v obr. 3.17. Maximální absorbance byla naměřena po 50 min.



Obr. 3.3 Graf závislosti absorbance A produktů reakce cholesterolu o koncentraci 1 mg ml^{-1} s činidlem na čase t .

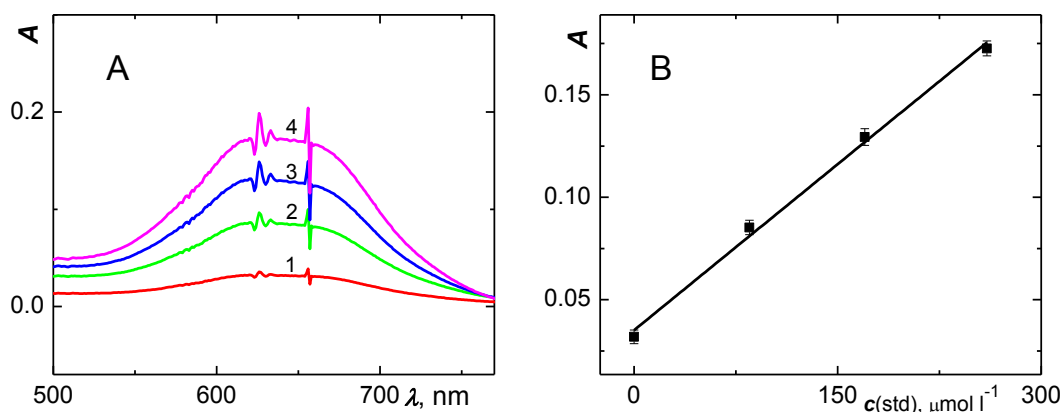
Pomocí postupu uvedeného výše byly následně měřeny kalibrační řady, jak při objemech uvedených výše, tak v desetkrát zmenšeném objemu v mikrozkušavkách Eppendorf. Vzhledem k citlivosti reakce na světlo byly též provedeny pokusy v tmavých mikrozkušavkách či zkumavkách zabalených v alobalu během 50 min vyvíjení zbarvení. Ve všech případech však byly výsledky neuspokojivé, tj. odezva spektrofotometru nebyla opakovatelná.

Proto byl dále zkoumán postup podle Abell-Kendalla, který je uveden v podkapitole 2.3.3, kde se používá činidlo složené z acetanhydridu, kyseliny sírové a octové. Tento postup poskytl daleko spolehlivější výsledky. Pro ověření linearity závislosti absorbance na koncentraci cholesterolu bylo naměřeno spektrum zobrazené na obr. 3.4, kde je uvedeno spolu se získanou kalibrační závislostí.



Obr. 3.4 Absorpční spektrum (A) produktů reakce cholesterolu o koncentraci (1) 0,1; (2) 0,25; (3) 0,35 a (4) 0,5 mg ml⁻¹ a činidla. Kalibrační řada (B) získaná z absorpčního spektra. Nejistota měření absorpčního píku je vyjádřena jako směrodatná odchylka výšky píku ($n = 3$).

Pomocí tohoto postupu byl změřen vzorek č. 6, jehož absorpční spektrum a vyhodnocení tohoto spektra jsou uvedeny v obr. 3.5.



Obr. 3.5 Absorpční spektrum (A) pro stanovení cholesterolu ve vzorku č. 6 po extrakci kapalina-kapalina metodou přidavku standardu. (1) Vzorek bez přidavku standardu; (2) 1. přidavek standardu; (3) 2. přidavek standardu; (4) 3. přidavek standardu. V obr. (B) je závislost absorbance A produktů reakce cholesterolu a činidla na koncentraci standardu cholesterolu ve vzorku č. 6. Nejistota měření absorpčního píku je vyjádřena jako směrodatná odchylka výšky píku ($n = 3$).

Stanovení cholesterolu bylo provedeno v šesti různých vzorcích mléka a smetany, jak shrnuje tab. 3.1, ve které jsou uvedeny výsledky měření.

Tab. 3.1 Shrnutí výsledků stanovení cholesterolu v mléčných matricích.

č. Vzorek	Obsah cholesterolu	Obsah cholesterolu stanovený
	stanovený voltametricky (mg/100 g)	spektrofotometricky (mg/100 g)
1) Trvanlivé mléko Kunín	10,3 ± 1,58	—
2) Smetana do kávy Kapucín	12,8 ± 0,40	—
3) Zahuštěné neslazené mléko Tatra Classic	4,95 ± 0,15	—
4) Smetana do kávy Pilos	29,3 ± 7,50	—
5) Čerstvé mléko Pilos	13,2 ± 0,30	—
6) Polotučné mléko Kunín	2,47 ± 0,23	2,51 ± 0,10

Obsah cholesterolu v mléku se podle literatury pohybuje přibližně v rozmezí 15 až 25 mg/100 g při měření pomocí diferenční pulzní voltametrie [65]. Pomocí plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem mělo stanovované mléko obsah cholesterolu přibližně 12 mg/100 g [66]; v práci [67] 13 mg/100 ml pomocí infračervené spektroskopie i spektrometrické ftalaldehydové metody. Výsledky stanovení cholesterolu provedené v této práci jsou tedy srovnatelné s výsledky získanými pomocí jiných metod.

Pro kontrolu použité metody užívající DPV byla optimalizována spektrofotometrická metoda podle Abell-Kendalla, která u měřeného vzorku poskytla téměř shodný výsledek.

3.2 Voltametrie lathosterolu

Studium voltametrického chování lathosterolu bylo prováděno pomocí elektrody z borem dopovaného diamantu a elektrody ze skelného uhlíku metodami cyklické voltametrie, DC voltametrie a diferenční pulzní voltametrie v prostředí 0,1 mol l⁻¹ kyseliny chloristé v acetonitrilu obsahující 0,55 % vody pocházející ze 70% kyseliny chloristé použité k přípravě zásobního roztoku. Toto prostředí bylo zvoleno na základě poznatku v práci [68], kdy voltametrická odezva žlučových kyselin vzniká na základě dehydratace jejich skeletu v prostředí silné kyseliny. Podobný mechanismus se předpokládá u cholesterolu, u něhož jsou známy dehydratační reakce díky Liebermann-Burchardově reakci (viz kap. 1.6.3). Kromě kyseliny chloristé bylo měření lathosterolu dále prováděno v prostředí 0,1 mol l⁻¹ chloristanu sodného v acetonitrilu.

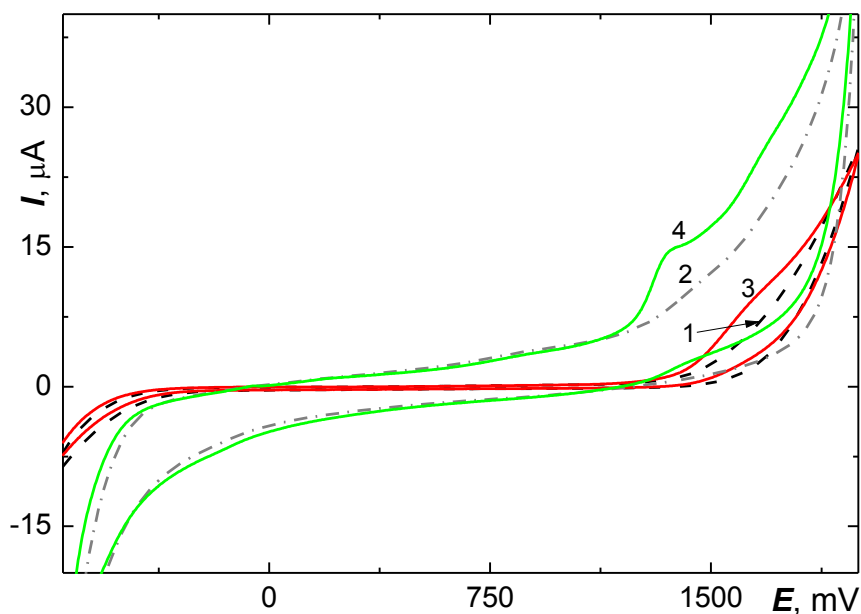
Měření v prostředí 0,1 mol l⁻¹ kyseliny chloristé v acetonitrilu na BDDE bylo zjištěno, že lathosterol poskytuje odezvu při potenciálu okolo +1650 mV. Na GCE poskytuje odezvu okolo +1350 mV. Oba cyklické voltamogramy jsou zobrazeny v obr. 3.6, kde lze pozorovat vyšší nabíjecí proud na GCE. Ze zpětného skenu, na kterém není pozorovatelná katodická odezva, lze usoudit, že elektrochemická oxidace lathosterolu je děj ireverzibilní. Posun potenciálu oxidace na BDDE v porovnání s elektrodami na bázi sp² uhlíku k více pozitivním hodnotám je poměrně častým jevem a je přisuzován pomalejší kinetice přenosu elektronu na heterogenním povrchu BDDE [13].

Porovnáním odezvy lathosterolu s dalšími steroly v prostředí kyseliny chloristé obsahující 0,55 % vody lze říci, že je poloha píku lathosterolu nejvíce podobná poloze píku cholesterolu, který poskytuje odezvu okolo +1600 mV na BDDE [4] a +1400 mV na GCE [3]. Fytosteroly obsahující ve svém steroidním jádře rovněž jednu dvojnou vazbu (Δ^5), tedy stigmasterol a β -sitosterol, poskytují odezvu přibližně +1850 mV na BDDE [69] a +2000 mV na GCE [70]. Fytosterol ergosterol, který obsahuje konjugované dvojně vazby ($\Delta^{5,7}$), má odezvu poněkud odlišnou: poskytuje dva píky, přibližně +1080 mV a +1550 mV na BDDE [69] a +1100 mV a +2000 mV na GCE [70] a u druhého píku dochází na obou elektrodách v čase k jeho nárůstu, zřejmě vlivem probíhající dehydratační reakce. Stejně tak je tomu v případě 7-dehydrocholesterolu, který poskytuje odezvu okolo +825 mV a +975 mV na BDDE [71].

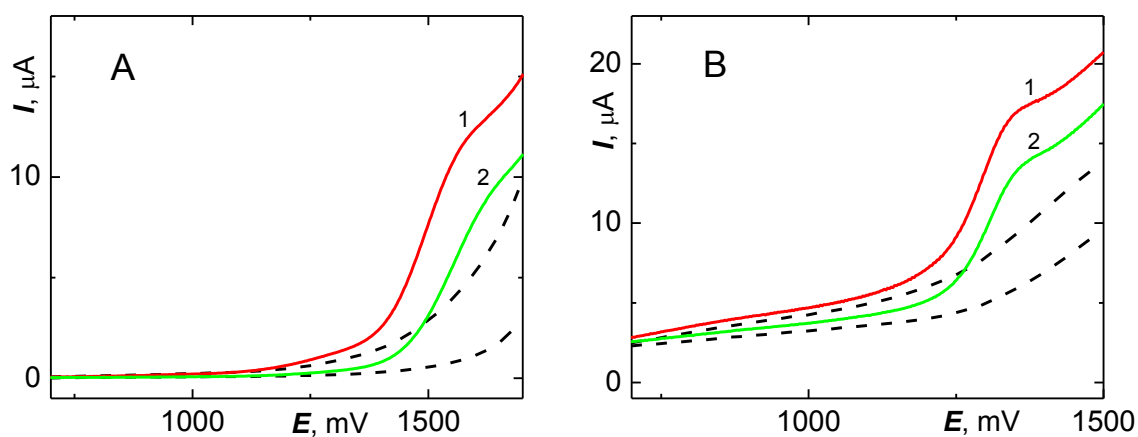
Na obr. 3.7 je znázorněno, jak dochází na obou elektrodách během deseti cyklů k pasivaci jejich povrchu, pokud není povrch elektrody obnovován mezi jednotlivými skeny. Na BDDE došlo vlivem pasivace během deseti následných cyklů k poklesu proudové odezvy o 25 %; na GCE byl pokles proudové odezvy vlivem pasivace 20 %. Na obou elektrodách došlo k mírnému posunu potenciálu směrem k pozitivnějším hodnotám. Ačkoli pasivace není příliš výrazná, pro elektroanalytické metody nebyla opakovatelnost signálu dostačující. Proto byla elektroda před každým skenem leštěna na alumině.

Časová stabilita signálu byla studována na GCE v prostředí 0,1 mol l⁻¹ kyseliny chloristé v acetonitrilu pomocí cyklické voltametrie a diferenční pulzní voltametrie, kdy povrch elektrody byl po každém skenu obnovován leštěním. V tomto prostředí je předpokládáno, že může docházet k dehydratační reakci, tj. úbytku původně přítomného lathosterolu nebo vzniku jiného elektroaktivního produktu. To bylo pozorováno například pro steroly s $\Delta^{5,7}$ konjugovanou dvojnou vazbou, jako je ergosterol či 7-dehydrocholesterol [13]. U žlučových kyselin obsahujících 7 α -hydroxylovou skupinu dochází k dehydrataci a vzniku dvojně vazby, a teprve vzniklé produkty jsou elektroaktivní [63]. Naopak, voltametrická odezva cholesterolu a fytosterolů (stigmasterol, β -sitosterol) je stabilní [4,70].

V případě lathosterolu ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol l⁻¹ v acetonitrilu) byl anodický signál v průběhu 60 minut stabilní na obou elektrodách. Při CV byla průměrná hodnota výšky píku (4326 ± 107) nA (RSD 2,5 %), u DPV byla průměrná hodnota výšky píku (339 ± 122) nA (RSD 3,6 %), pokud byla elektroda před každým skenem leštěna.



Obr. 3.6 Cyklické voltamogramy základního elektrolytu měřené na pracovní elektrodě (1) BDDE a (2) GCE; a lathosterolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ kyseliny chloristé v acetonitrilu s obsahem vody $0,55 \%$ na pracovní elektrodě (3) BDDE a (4) GCE.

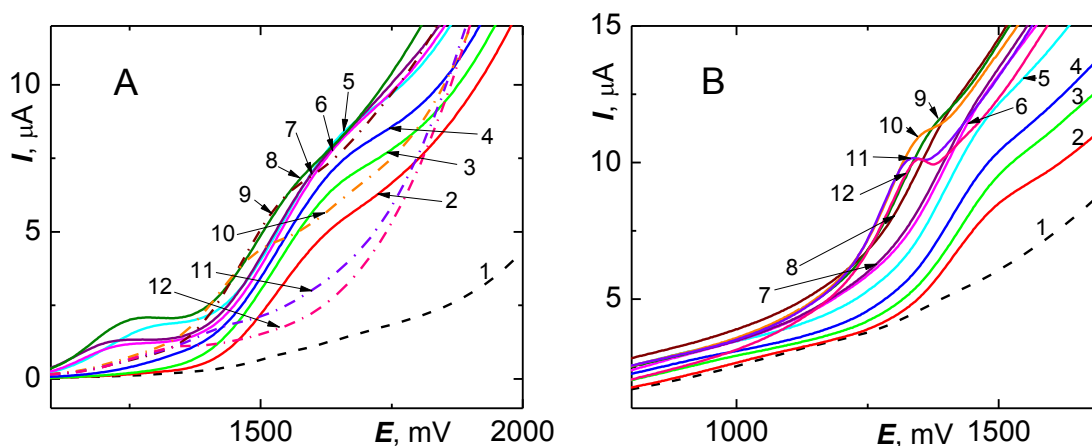


Obr. 3.7 Anodické skeny znázorňující pasivaci (A) BDDE a (B) GCE v deseti následných cyklech při cyklické voltametii lathosterolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ kyseliny chloristé v acetonitrilu s obsahem vody $0,55 \%$. (1) první sken, (2) desátý sken; přerušovaně jsou vyznačeny anodické skeny základního elektrolytu.

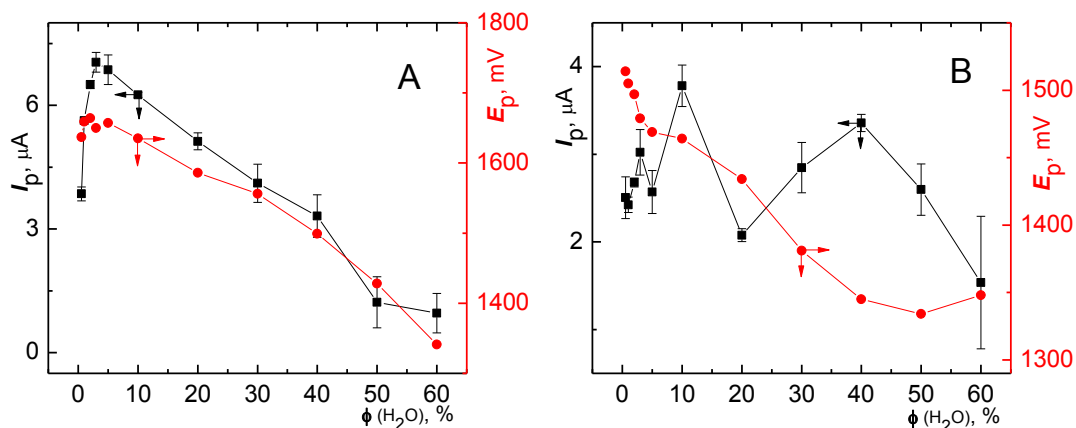
3.2.1 Vliv obsahu vody na odezvu lathosterolu

Na voltametrickou odezvu sterolů má obsah vody v měřeném roztoku značný vliv. Jak je uvedeno výše, u primárních žlučových kyselin dochází ke vzniku odezvy vlivem dehydratační reakce, a tak při zvýšeném zastoupení vody dojde k potlačení dehydratační reakce, a tím pádem k poklesu proudové odezvy. Při větším než 10% objemovém zastoupení vody již není anodický signál žlučových kyselin na voltamogramech vyvinut [68]. U cholesterolu je jeho signál rovněž ovlivněn obsahem vody v měřeném roztoku. Tento vliv se projevuje jinak na BDDE, kde dochází při vyšším zastoupení vody v základním elektrolytu k poklesu proudové odezvy a posunu potenciálu vrcholu píku směrem k méně pozitivním hodnotám [4], a jinak na GCE, kde naopak dochází k jistému nárůstu proudové odezvy, zřejmě vlivem intenzivnější adsorpce předpokládaných produktů dehydratační reakce na povrch elektrody [3].

Studium vlivu obsahu vody v měřeném roztoku na odezvu lathosterolu bylo provedeno v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ kyseliny chloristé v acetonitrilu s následujícími obsahy vody: 0,55 %; 1 %; 2 %; 3 %; 5 %; 10 %; 20 %; 30 %; 40 %; 50 % a 60 %. Voltamogramy získané na BDDE a GCE jsou uvedeny v obr. 3.24, závislost výšek píků a potenciálů vrcholů píku na obsahu vody v obr. 3.8.



Obr. 3.8 Vliv obsahu vody na odezvu lathosterolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ kyseliny chloristé v acetonitrilu. Pracovní elektroda (A) BDDE a (B) GCE. (1) Základní elektrolyt v obsahu vody 0,55 %, lathosterol v základním elektrolytu v obsahu vody (2) 0,55 %, (3) 1 %, (4) 2 %, (5) 3 %, (6) 5 %, (7) 10 %, (8) 20 %, (9) 30 %, (10) 40 %, (11) 50 % a (12) 60 %.



Obr. 3.9 Závislost výšek píků I_p (■) a potenciálů vrcholů píků E_p (●) lathosterolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1} na obsahu vody Φ v prostředí kyseliny chloristé v acetonitrilu o koncentraci $0,1$ mol l^{-1} . Pracovní elektroda (A) BDDE a (B) GCE. Nejistota měření proudu píku I_p je vyjádřena jako směrodatná odchylka výšky píku I_p ($n = 4$).

Z dat získaných měření na BDDE lze říci, že nejprve proudová odezva lathosterolu s rostoucím zastoupením vody vzrůstá, a to do 3% obsahu vody. Odezva vzrostla z původních cca 3900 nA až na hodnotu přibližně 7100 nA, což je 80% nárůst. Do tohoto obsahu vody má voltamogram poměrně dobře vyhodnotitelný tvar vlny. Při vyšším obsahu se vlna více ztrácí v úniku základního elektrolytu a proudová odezva lathosterolu se postupně snižuje, u 60 % vody až na hodnotu cca 1000 nA, dochází tedy k poklesu o 75 % oproti původní hodnotě při minimálním obsahu vody. Ovšem v prostředí obsahujícím 60 % již byly pozorovatelné vysrážené vločky lathosterolu, u 50% obsahu vody lze též předpokládat srážení, ačkoli nebylo okem viditelné. Potenciál vrcholu píku rovněž lehce vzrůstá z původní hodnoty cca +1640 mV na +1670 mV v prostředí obsahujícím 3 % vody, a poté klesá vždy o 30 až 50 mV při přidavku 10 % vody směrem k méně pozitivním hodnotám až na cca +1340 mV. V prostředích s obsahem vody 3 % a více lze pozorovat výskyt druhého píku s méně pozitivním potenciálem okolo +1220 až +1300 mV. Celkově lze tedy konstatovat, že pro analytické využití je vhodnější nižší obsah vody v acetonitrilu do 3 %.

Z měření na GCE lze taktéž pozorovat zvýšení proudové odezvy z cca 2500 nA při minimálním obsahu vody při 3% obsahu vody, kdy stejně jako na BDDE mají křivky tvar dobře vyhodnotitelné vlny. Pro vyšší obsahy vody do 30 % se vlna opět více ztrácí v úniku základního elektrolytu a její výška fluktuuje přibližně v rozsahu (3000 ± 800) nA a je obtížně vyhodnotitelná. Při obsazích vody 50 % a 60 % dochází ke snížení

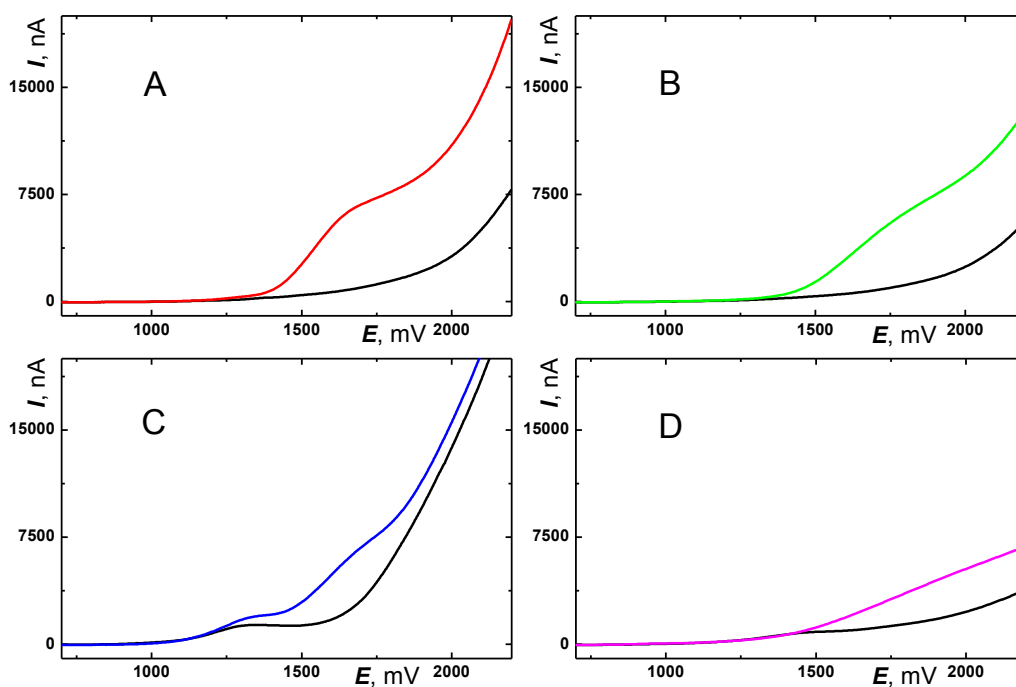
odezvy, což může být způsobeno vysrážením lathosterolu. Tento trend je shodný s odezvou cholesterolu na GCE. Zároveň lze při vyšších obsazích vody (40, 50 a 60 %) pozorovat, že odezva lathosterolu má výraznější proudové maximum. Se zvyšujícím se obsahem vody dochází ke kontinuálnímu posunu hodnot potenciálu vrcholů píku z původních přibližně +1510 mV na cca +1330 mV v obsahu vody 50 %.

Z porovnání směrodatné odchylky pro I_p pro obě elektrody (viz obr. 3.9) vyplývá, že odezva je opakovatelnější na BDDE, která je tedy vhodnější pro analytické účely.

3.2.2 Vliv anorganických kyselin v měřeném roztoku na odezvu lathosterolu

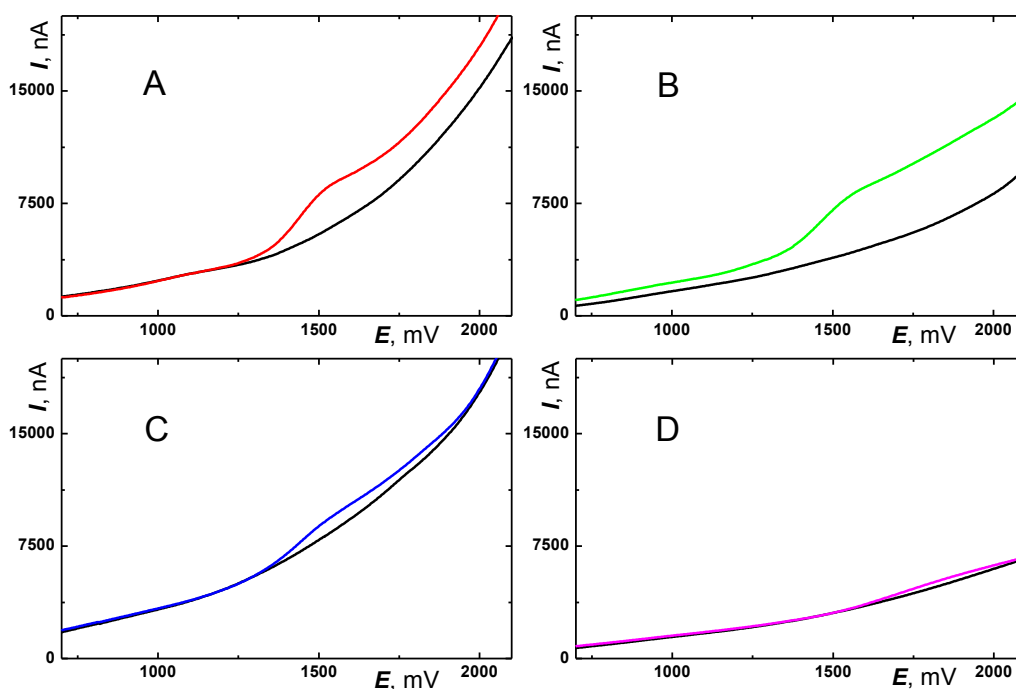
Kromě kyseliny chloristé byl zkoumán vliv obsahu jiných anorganických kyselin na odezvu lathosterolu, a to kyseliny sírové, dusičné a fosforečné. Tato měření byla provedena na obou elektrodách pomocí DC voltametrie. Naměřené voltamogramy jsou uvedeny v obr. 3.10 a 3.11.

V použitých kyselinách se vyskytuje jisté procento vody, jehož původ je v koncentrovaných kyselinách použitých pro přípravu roztoků. Jak bylo již zmíněno, v prostředí kyseliny chloristé o koncentraci $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ se vyskytuje 0,55 % vody. Ve stejně koncentrované kyselině sírové je to 0,04 %, v dusičné 0,34 % a ve fosforečné 0,17 %.



Obr. 3.10 DC voltamogramy lathosterolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ kyseliny v acetonitrilu: (A) kyselina chloristá (obsah vody 0,55 %), (B) kyselina sírová (obsah vody 0,04 %), (C) kyselina dusičná (obsah vody 0,34 %) a (D) kyselina fosforečná (obsah vody 0,17 %). Barevně jsou vyznačeny voltamogramy lathosterolu, černě základního elektrolytu. Pracovní elektroda BDDE.

V obr. 3.10A je zobrazen DC voltamogram lathosterolu v prostředí kyseliny chloristé naměřený na BDDE. Potenciál vrcholu píku je přibližně +1670 mV. Proudová odezva je srovnatelná s tou získanou v prostředí kyseliny sírové (obr. 3.10B). Potenciál oxidace lathosterolu je ovšem posunut na cca +1820 mV. V prostředí kyseliny dusičné (obr. 3.10C) dochází k 30% poklesu odezvy v porovnání s prostředím kyseliny chloristé a sírové. V obr. 3.10D je zobrazen voltamogram lathosterolu v kyselině fosforečné. Při potenciálech kladnějších než +1500 mV dochází k nárůstu proudu, pík však není zřetelný.



Obr. 3.11 DC voltamogramy lathosterolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol Γ^{-1} v prostředí 0,1 mol Γ^{-1} kyseliny v acetonitrilu: (A) kyselina chloristá (obsah vody 0,55 %), (B) kyselina sírová (obsah vody 0,04 %), (C) kyselina dusičná (obsah vody 0,34 %) a (D) kyselina fosforečná (obsah vody 0,17 %). Barevně jsou vyznačeny voltamogramy lathosterolu, černě základního elektrolytu. Pracovní elektroda GCE.

Z DC voltamogramů naměřených na GCE lze pozorovat, že odezva lathosterolu je opět srovnatelná v prostředí kyseliny chloristé (obr. 3.11A), která se vyskytuje při potenciálu +1540 mV, s odezvou v kyselině sírové (obr. 3.11B), jejíž potenciál je mírně posunutý na +1590 mV. V kyselině dusičné (obr. 3.11C) se nízký pík vyskytuje při potenciálu cca +1560 mV, ovšem jeho výška je méně než třetinová oproti předchozím dvěma kyselinám. Naopak v kyselině fosforečné (obr. 3.11D) odezva v podstatě vidět není.

Z těchto měření byla pro obě pracovní elektrody jako nejvhodnější kyselina v základním elektrolytu vyhodnocena kyselina chloristá, jelikož v ní lathosterol poskytuje nejzřetelnější pík a zároveň nejvyšší proudovou odezvu. Další alternativou je kyselina sírová, pro kterou byla obzvláště na GCE získána porovnatelná odezva.

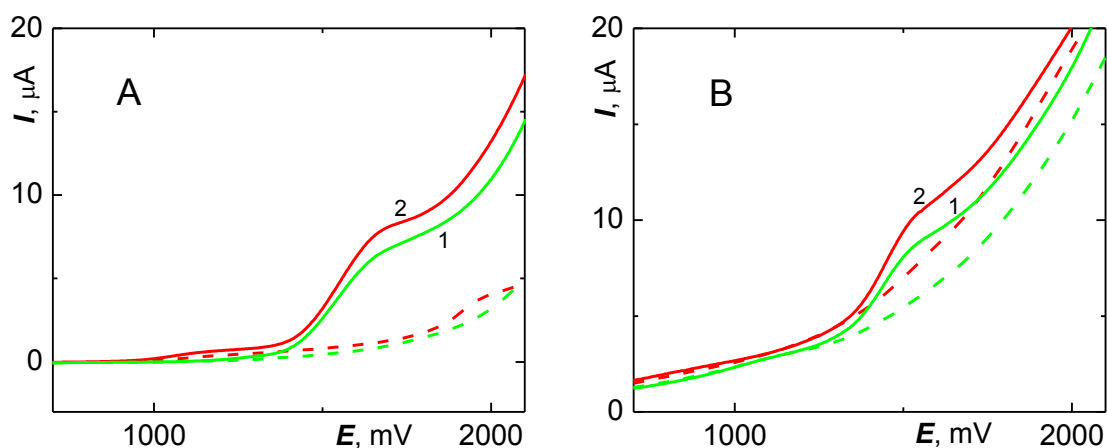
3.2.3 Porovnání vlivu kyseliny chloristé a chloristanu sodného jako základního elektrolytu na odezvu lathosterolu

Kyselina chloristá je velmi silná kyselina a oxidační činidlo, dráždivá pro kůži a způsobující vážné poškození očí. Proto byl testován jako základní elektrolyt i chloristan sodný. Na obou elektrodách byl měřen rozdíl vlivu kyseliny chloristé a chloristanu sodného na odezvu lathosterolu pomocí DC i diferenční pulzní voltametrie.

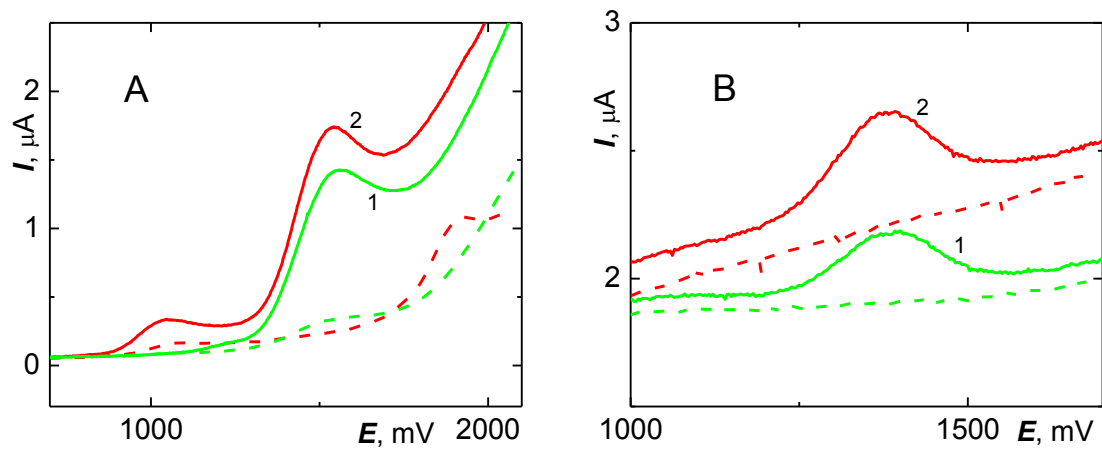
Na BDDE byl zjištěn nárůst proudové odezvy v prostředí chloristanu sodného oproti kyselině chloristé o cca 17 % pomocí DC voltametrie (obr. 3.12A) a cca 35 % pomocí DPV (obr. 3.13A). Při obou měřeních se vyskytuje další pík s potenciálem přibližně +1150 mV. Je dobře pozorovatelný v DP voltamogramu. Jeho proudová odezva dosahuje přibližně 10 % odezvy druhého píku s potenciálem +1680 mV.

Při měření na GCE pomocí DC voltametrie (obr. 3.12B) je odezva lathosterolu v prostředí kyseliny chloristé i její sodné soli podobná. Nárůst o 60 % v prostředí chloristanu sodného oproti odezvě v kyselině chloristé lze pozorovat v DP voltamogramu (obr. 3.13B).

Jelikož lathosterol poskytuje v chloristanu sodném větší odezvu, byla v tomto prostředí provedena i následující měření.



Obr. 3.12 DC voltamogramy lathosterolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí (1) $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ kyseliny chloristé v acetonitrilu a (2) $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristanu sodném v acetonitrilu. Přerušovanou čarou jsou vyznačeny příslušné křivky základního elektrolytu. Pracovní elektroda (A) BDDE a (B) GCE.



Obr. 3.13 DP voltamogramy lathosterolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí (1) $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ kyseliny chloristé v acetonitrilu a (2) $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristanu sodném v acetonitrilu. Přerušovanou čarou jsou vyznačeny příslušné křivky základního elektrolytu. Pracovní elektroda (A) BDDE a (B) GCE.

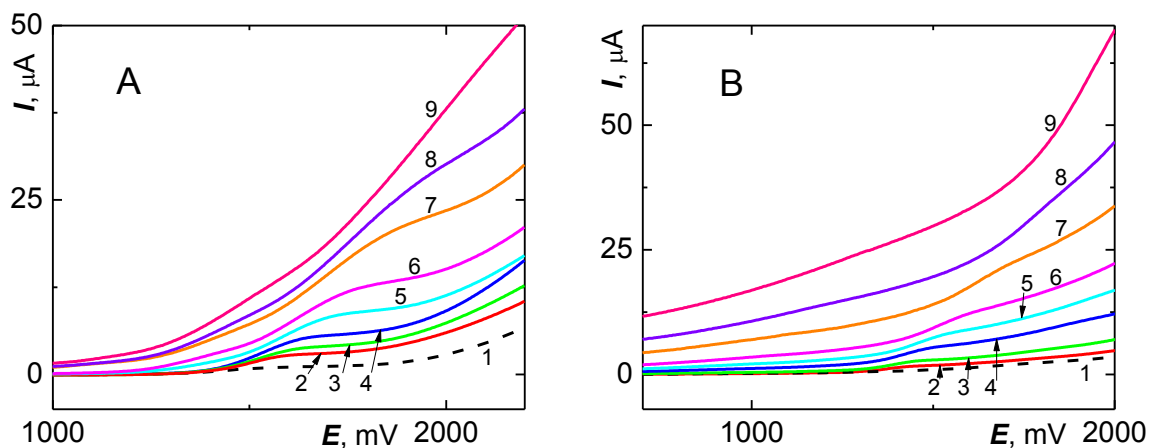
3.2.4 Vliv rychlosti polarizace na odezvu lathosterolu

Vliv rychlosti polarizace na odezvu lathosterolu byl studován v prostředí kyseliny chloristé a chloristanu sodného v acetonitrilu pomocí BDDE a GCE metodou cyklické voltametrie (obr 3.14 a 3.16, grafy závislostí výšky píku lathosterolu I_p na druhé odmocnině rychlosti polarizace $v^{1/2}$ jsou uvedeny v obr. 3.15 a 3.17, parametry těchto závislostí v tab. 3.2). Obecně lze shrnout, že při měření na obou elektrodách bylo zjištěno, že se zvyšující se rychlostí polarizace dochází k nárůstu proudové odezvy, která má tvar vlny. Při nejvyšších rychlostech však vlna přechází v kontinuální nárůst proudu, a je tak obtížně vyhodnotitelná, především na GCE. Na obou elektrodách dochází k posunu potenciálu vrcholů píku směrem k pozitivnějším hodnotám. Na BDDE se potenciál pohybuje v rozmezí +1580 až +1930 mV v kyselině chloristé, v chloristanu sodném poskytuje dva píky – 1. pík má potenciál +1140 až 1240 mV, 2. pík +1500 až +1680 mV. Na GCE v prostředí kyseliny chloristé potenciál vzrůstá z +1420 k +1830 mV, v chloristanu sodném od +1370 na +1450 mV.

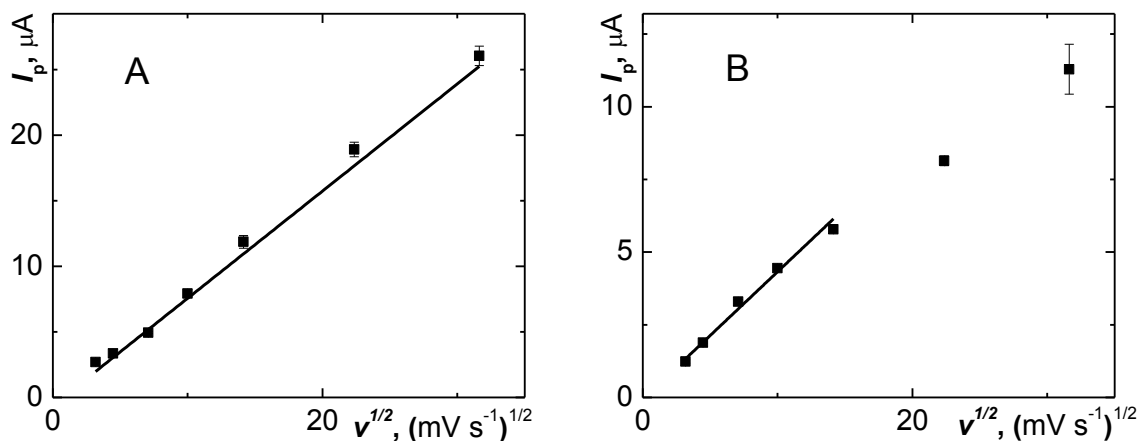
Závislosti výšky píku lathosterolu I_p na druhé odmocnině rychlosti polarizace $v^{1/2}$ jsou při nižších rychlostech polarizace lineární, ovšem při nejvyšších rychlostech se objevuje nelinearita a větší chyba měření, která může být způsobena tím, že maxima křivek jsou nezřetelná. Lze soudit, že elektrochemická reakce lathosterolu je v obou prostředích řízena difuzí.

Tab. 3.2 Parametry závislosti výšky píku I_p lathosterolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1} na druhé odmocnině rychlosti polarizace $v^{1/2}$ v prostředí 0,1 mol l^{-1} kyseliny chloristé a chloristanu sodného v acetonitrilu.

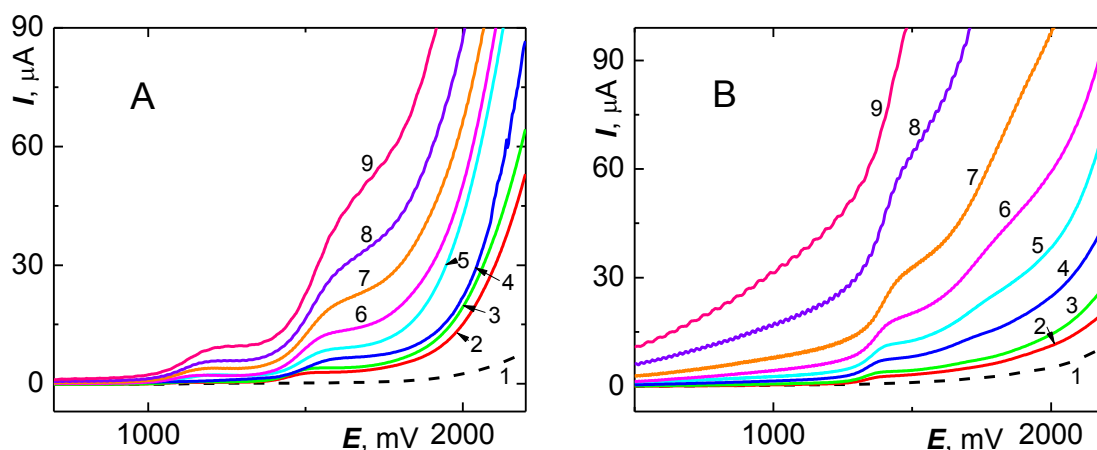
Základní elektrolyt	Elektroda	Rozsah rychlostí (mV s ⁻¹)	Směrnice (nA s ^{1/2} mV ^{-1/2})	Úsek (nA)
HClO ₄	BDDE	10 – 1000	817±57	-611±431
	GCE	10 – 200	439±27	-62±164
NaClO ₄	BDDE (1. pík)	10 – 2000	149±3	-286±522
	BDDE (2. pík)	10 – 1000	940±24	-123±44
	GCE	10 – 200	761±38	-365±235



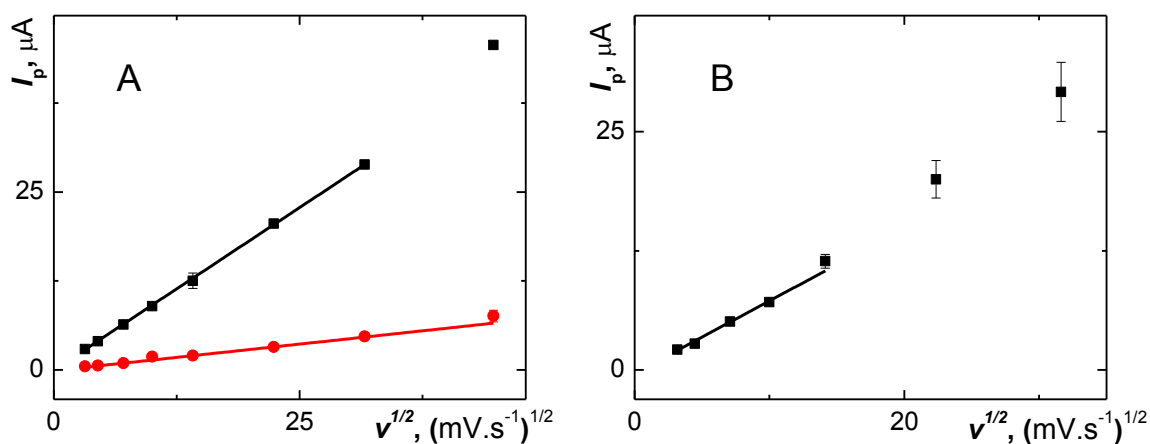
Obr. 3.14 Anodické skeny cyklických voltamogramů rychlostní závislosti odezvy lathosterolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ kyseliny chloristé v acetonitrilu (obsah vody $0,55 \%$). (1) Základní elektrolyt při rychlosti polarizace 10 mV s^{-1} , odezva lathosterolu při rychlosti polarizace: (2) 10, (3) 20, (4) 50, (5) 100, (6) 200, (7) 500, (8) 1000 a (9) 2000 mV s^{-1} . Pracovní elektroda (A) BDDE a (B) GCE.



Obr. 3.15 Závislost výšky píku I_p lathosterolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ na druhé odmocnině rychlosti polarizace $v^{1/2}$ v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ kyseliny chloristé v acetonitrilu (obsah vody $0,55 \%$). Pracovní elektroda (A) BDDE a (B) GCE. Nejistota měření proudu píku I_p je vyjádřena jako směrodatná odchylka výšky píku I_p ($n = 4$).



Obr. 3.16 Anodické skeny cyklických voltamogramů rychlostní závislosti odezvy lathosterolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristanu sodného v acetonitrilu. (1) Základní elektrolyt při rychlosti polarizace 10 mV s^{-1} , odezva lathosterolu při rychlosti polarizace: (2) 10, (3) 20, (4) 50, (5) 100, (6) 200, (7) 500, (8) 1000 a (9) 2000 mV s^{-1} . Pracovní elektroda (A) BDDE a (B) GCE.



Obr. 3.17 Závislost výšky píků I_p lathosterolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ na druhé odmocnině rychlosti polarizace $v^{1/2}$ v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristanu sodného v acetonitrilu. Pracovní elektroda (A) BDDE (1. pík (●), 2. pík (■)) a (B) GCE. Nejistota měření proudu píků I_p je vyjádřena jako směrodatná odchylka výšky píků ($n = 4$).

3.2.5 Optimalizace parametrů DPV pro měření koncentrační závislosti lathosterolu

Pro měření koncentrační závislosti byly nejprve optimalizovány parametry diferenční pulzní voltametrie na obou elektrodách v prostředí chloristanu sodného v acetonitrilu. Měření vlivu výšky pulzu h v rozsahu 10 až 100 mV na odezvu lathosterolu jsou zpracována na obr. 3.18 – 3.20, měření vlivu šířky pulzu t_p v rozsahu 40 až 140 ms na obr. 3.21 – 3.23.

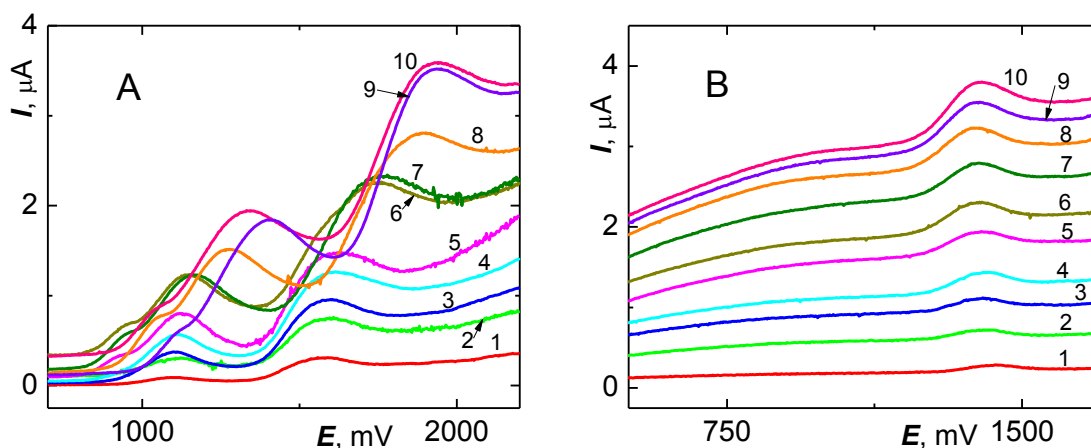
Na BDDE se vzrůstající výškou pulzu narůstala výška prvního i druhého píku (obr. 3.19A) a potenciál vrcholů obou píků se posouval ke kladnějším hodnotám (obr. 3.20). Při vyšších výškách pulzu se však DP voltamogram nevracel na úroveň základní linie. Jako optimální byla vyhodnocena původní použitá výška pulzu +50 mV, kdy je stále dostatečná výška píku, a DP voltamogram se alespoň částečně vrací na základní linii.

Se vzrůstající šířkou píku (obr. 3.22A) dochází u 2. píku nejprve k mírnému poklesu proudové odezvy (nejnižší při šířce pulzu 100 ms), a poté k mírnému nárůstu. 1. pík se při vyšších šířkách pulzu ztrácí. U obou píků také dochází se zvyšující se šířkou pulzu k poklesu potenciálu (obr. 3.23A). Jako optimální byla zvolena šířka pulzu 80 ms.

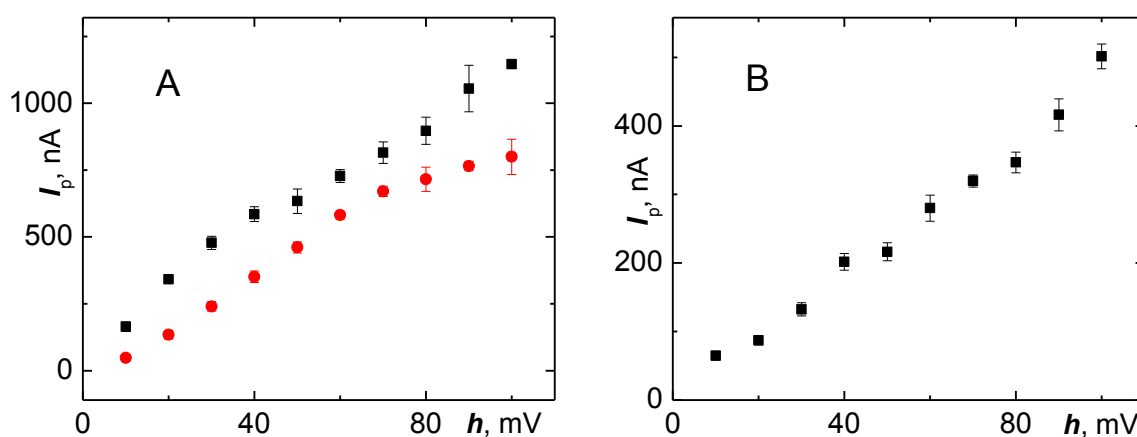
Také na GCE se vzrůstající výškou pulzu narůstala výška píku (obr. 3.19B), potenciál však zůstával přibližně stejný. Jako optimální byla opět vyhodnocena výška pulzu +50 mV.

Se zvyšující se šířkou pulzu se výška píku stále pohybovala v rozmezí přibližně +250 až +350 nA, také se však objevuje druhý pík s potenciálem přibližně +2000 mV, jehož výška je nejvyšší při šířkách pulzu 100 a 120 ms, a poté opět klesá (obr. 3.22B). Potenciál obou těchto píků klesá v intervalu šířek pulzu 40 – 80 ms, při vyšších šířkách pulzu je už přibližně stejný (obr. 3.23B).

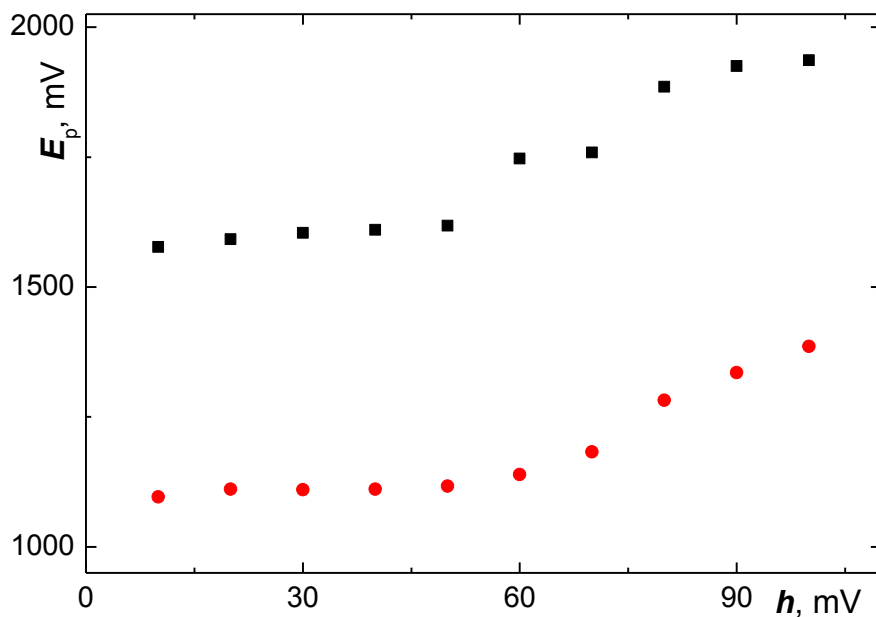
Pro obě elektrody byly tedy jako optimální hodnoty parametrů diferenční pulzní voltametrie vyhodnoceny výška pulsu +50 mV a šířka pulsu 80 ms.



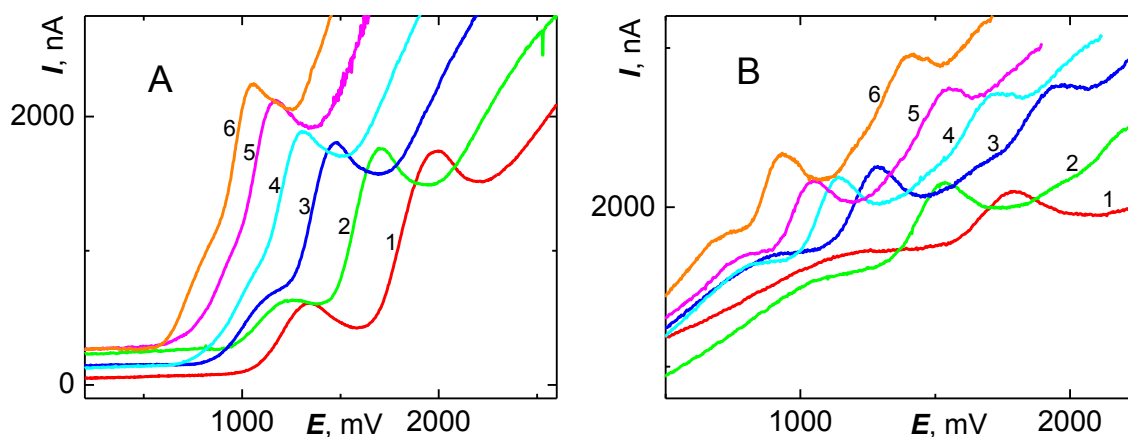
Obr. 3.18 DP voltamogramy pro optimalizaci výšky pulzu h pro měření lathosterolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristanu sodného. Výška pulzu: (1) 10, (2) 20, (3) 30, (4) 40, (5) 50, (6) 60, (7) 70, (8) 80, (9) 90 a (10) 100 mV. Pracovní elektroda (A) BDDE a (B) GCE.



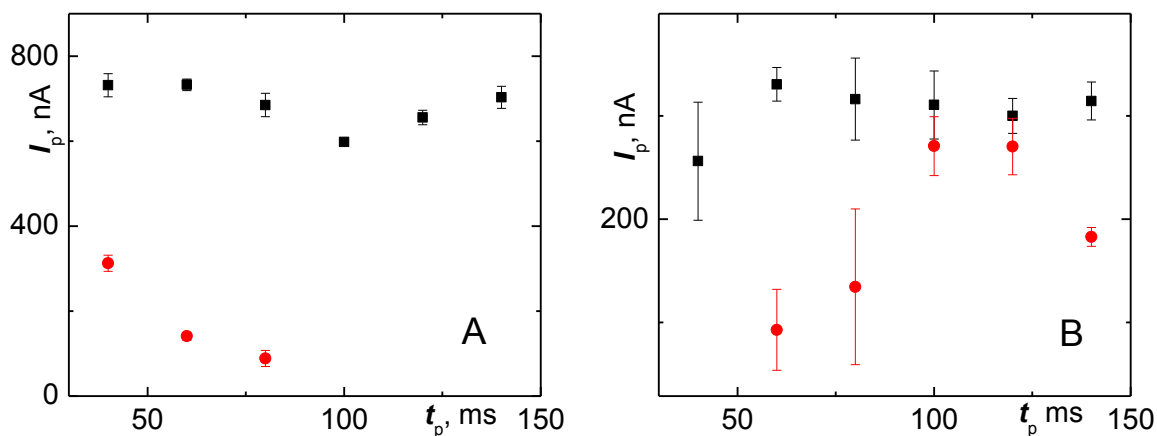
Obr. 3.19 Závislost výšky píku I_p lathosterolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ na výšce pulzu h v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristanu sodného v acetonitrilu. Pracovní elektroda (A) BDDE (1. pík (●), 2. pík (■)) a (B) GCE. Nejistota měření proudu píku I_p je vyjádřena jako směrodatná odchylka výšky píku I_p ($n = 4$).



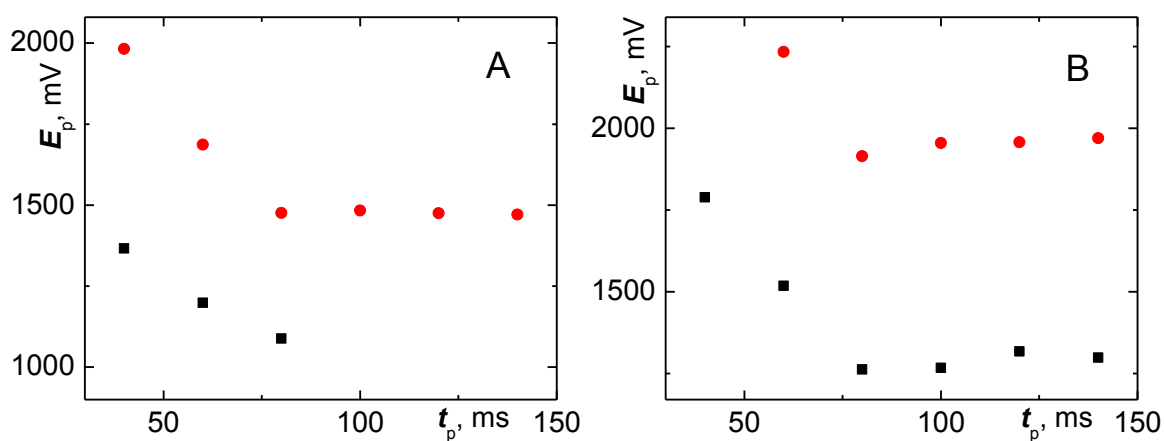
Obr. 3.20 Závislost potenciálu vrcholu píku E_p lathosterolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ na výšce pulzu h v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristanu sodného v acetonitrilu. Značení: 1. pík (●), 2. pík (■). Pracovní elektroda BDDE.



Obr. 3.21 Optimalizace šířky pulzu t_p pro měření lathosterolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristanu sodného pomocí DPV. Šířka pulzu: (1) 40, (2) 60, (3) 80, (4) 100, (5) 120 a (6) 140 ms. Pracovní elektroda (A) BDDE a (B) GCE.



Obr. 3.22 Závislost výšky píku I_p lathosterolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ na šířce pulzu t_p v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristanu sodného v acetonitrilu. Značení: 1. pík (●), 2. pík (■). Pracovní elektroda (A) BDDE a (B) GCE. Nejistota měření proudu píku I_p je vyjádřena jako směrodatná odchylka výšky píku I_p ($n = 4$).



Obr. 3.23 Závislost potenciálu vrcholu píku E_p lathosterolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ na šířce pulzu t_p v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristanu sodného v acetonitrilu. Značení: 1. pík (●), 2. pík (■). Pracovní elektroda (A) BDDE a (B) GCE.

3.2.6 Měření koncentrační závislosti lathosterolu

Koncentrační závislost lathosterolu byla měřena v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristanu sodného v acetonitrilu metodou DPV v rozsahu koncentrací $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ na BDDE, resp. $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ na GCE. Použité parametry DPV byly zvoleny s ohledem k předchozí optimalizaci, tedy výška pulsu $+50 \text{ mV}$ a šířka pulsu 80 ms . DP voltamogramy jsou uvedeny na obr. 3.24A pro BDDE a na obr. 3.25A pro GCE.

Kalibrační závislost naměřená na BDDE byla lineární v rozsahu $6 \cdot 10^{-6}$ až $6 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ (obr. 3.24B), koncentrační závislost naměřená pomocí GCE byla lineární v celém rozsahu měřených koncentrací (obr. 3.25B). V tab. 3.3 jsou uvedeny parametry těchto závislostí včetně *LOD* a *LOQ* vypočítaných podle rovnic 2.1, 2.2 a 2.3.

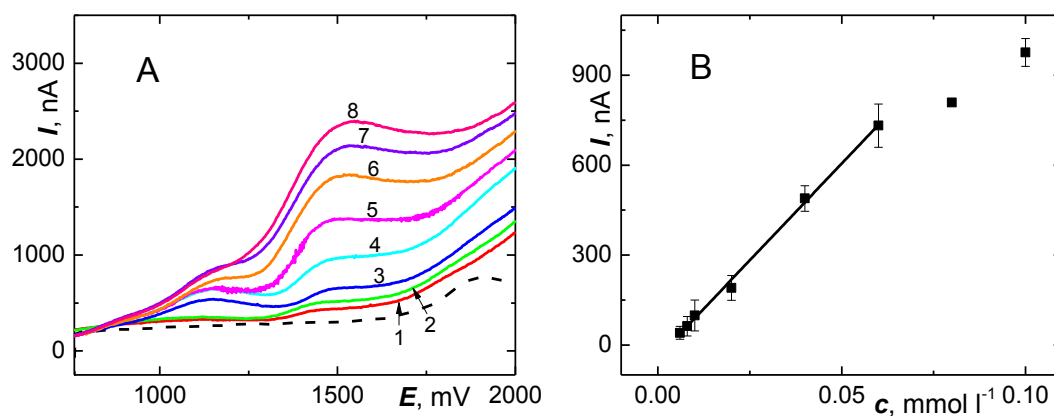
Tab. 3.3 Parametry koncentračních závislostí lathosterolu naměřených na BDDE a GCE v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristanu sodného v acetonitrilu a vypočtených *LOD* a *LOQ*.

Elektroda	Směrnice ($\text{nA l } \mu\text{mol}^{-1}$)	Úsek (nA)	<i>R</i>	<i>LOD</i> ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	<i>LOQ</i> ($\mu\text{mol l}^{-1}$)
BDDE	$12,90 \pm 0,39$	$-40,2 \pm 7,9$	0,9978	4,8	16,1
GCE	$5,42 \pm 0,26$	$4,3 \pm 9,3$	0,9932	4,5	15,1

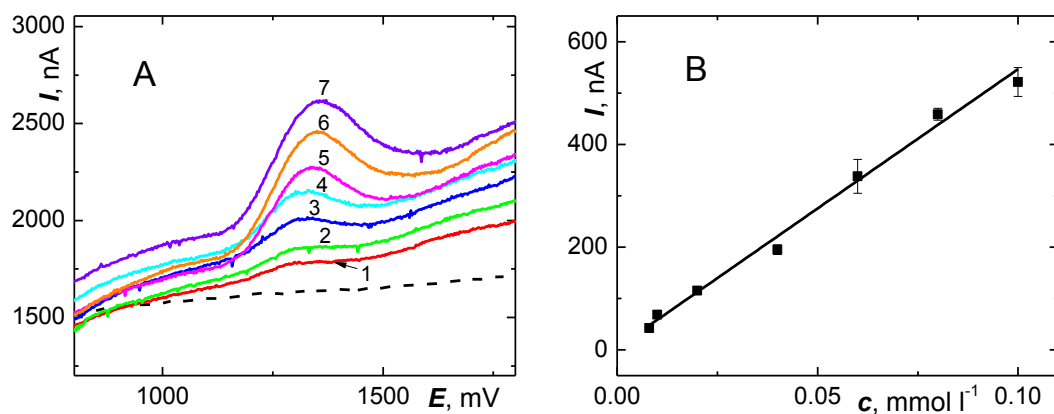
Měření na BDDE byla získána vyšší směrnice kalibrační závislosti, tedy citlivost. Parametry *LOD* a *LOQ* jsou však obdobné pro obě elektrody, jelikož při měření na BDDE měly pro nejnížší měřenou koncentraci hodnoty I_p menší opakovatelnost než na GCE. Oba vypočtené limity detekce jsou mírně nižší než limity detekce získané experimentálně (nejnížší měřitelné koncentrace lathosterolu odlišitelné od šumu), které jsou $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ pro BDDE a $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ pro GCE.

Ve srovnání s limity detekce dosaženými pomocí jiných metod, které jsou uvedeny v podkapitole 1.7, je limit detekce této metody stanovení lathosterolu řádově srovnatelný s *LOD* při stanovení pomocí HPLC-UV [60]; je vyšší než *LOD* při stanovení pomocí GC-FID [61] či HPLC-ECD [57] (tyto dohledané limity detekce se týkají stanovení v séru, relevantní hodnoty čistě pro metodu detekce nebyly uvedeny). Na druhou stranu,

zde uvedená metoda GC-FID vyžaduje derivatizaci lathosterolu; HPLC-ECD je zase časově náročná vzhledem k poměrně dlouhému retenčnímu času lathosterolu.



Obr. 3.24 DP voltamogramy (A) a koncentrační závislost (B) lathosterolu v prostředí 0,1 mol l⁻¹ chloristanu sodného v acetonitrilu. Koncentrace lathosterolu (1) 6·10⁻⁶, (2) 8·10⁻⁶, (3) 1·10⁻⁵, (4) 2·10⁻⁵, (5) 4·10⁻⁵, (6) 6·10⁻⁵, (7) 8·10⁻⁵ a (8) 1·10⁻⁴ mol l⁻¹. Přerušovaně vyznačen roztok základního elektrolytu. Nejistota měření vyjádřená jako směrodatná odchylka výšky píku I_p ($n = 5$). Pracovní elektroda BDDE.



Obr. 3.25 DP voltamogramy (A) a koncentrační závislost (B) lathosterolu v prostředí 0,1 mol l⁻¹ chloristanu sodného v acetonitrilu. Koncentrace lathosterolu (1) 8·10⁻⁶, (2) 1·10⁻⁵, (3) 2·10⁻⁵, (4) 4·10⁻⁵, (5) 6·10⁻⁵, (6) 8·10⁻⁵ a (7) 1·10⁻⁴ mol l⁻¹. Přerušovaně vyznačen roztok základního elektrolytu. Nejistota měření vyjádřená jako směrodatná odchylka výšky píku I_p ($n = 5$). Pracovní elektroda GCE.

4. Závěr

V první části této práce byla vypracována metoda stanovení cholesterolu v mléčných matricích po jejich extrakci kapalina-kapalina pomocí diferenční pulzní voltametrie v prostředí kyseliny chloristé v acetonitrilu na elektrodě z borem dopovaného diamantu. Pomocí této metody byl stanoven obsah cholesterolu v šesti vzorcích mléka nebo méně tučné smetany; při analýze tučnějších vzorků byly získané voltamogramy nevyhodnotitelné. Výsledky se pohybují v rozmezí přibližně 2 – 30 mg/100 g, což jsou výsledky srovnatelné s těmi uvedenými v literatuře. Tato metoda byla ověřena pomocí spektrofotometrie metodou dle Abell-Kendalla, která u vybraného vzorku poskytla téměř shodný výsledek.

Ve druhé části se tato práce zabývala studiem voltametrického chování lathosterolu v prostředí kyseliny chloristé a chloristanu sodného v acetonitrilu na elektrodách z borem dopovaného diamantu a ze skelného uhlíku. Lathosterol v prostředí kyseliny chloristé v acetonitrilu poskytuje ireverzibilní odezvu v anodické oblasti s potenciálem okolo +1650 mV na BDDE, resp. s potenciálem +1350 mV na GCE. Odezva lathosterolu je v průběhu 60 min stabilní.

Byl měřen vliv obsahu vody v měřeném roztoku na odezvu lathosterolu. Na BDDE proudová odezva s rostoucím obsahem vody vzrůstá do obsahu vody 3 %, při vyšších obsazích vody odezva klesá a voltamogramy mají obtížně vyhodnotitelný tvar vlny. Na GCE proudová odezva rovněž stoupá s rostoucím obsahem vody do 3 %, při vyšších obsazích proudová odezva kolísá a je též obtížně vyhodnotitelná. Při obsahu vody větším než 50 % se lathosterol v roztoku sráží, proudová odezva je tedy na obou elektrodách menší. Pro analytické účely jsou vhodně roztoky s obsahem vody do 3 %.

Kromě kyseliny chloristé byl testován vliv přítomnosti dalších kyselin v základním elektrolytu na odezvu lathosterolu. Bylo zjištěno, že poskytuje odezvu v kyselině sírové, která je srovnatelná s odezvou v kyselině chloristé, naopak odezvu lathosterol neposkytuje v kyselině dusičné a fosforečné. Dalším prostředím, ve kterém byl lathosterol měřen, je chloristan sodný v acetonitrilu. Lathosterol v tomto prostředí poskytuje signál na obou elektrodách při potenciálu stejném jako v prostředí kyseliny chloristé, proudová odezva je větší. V tomto prostředí byl měřen vliv rychlosti

polarizace na odezvu lathosterolu, kdy bylo zjištěno, že elektrochemická reakce lathosterolu je v obou prostředích řízena difuzí.

Pro měření koncentrační závislosti lathosterolu byly nejprve optimalizovány parametry metody DPV. Koncentrační závislost byla měřena v prostředí chloristanu sodného v acetonitrilu na obou elektrodách. Byly vypočteny limity detekce, a to $4,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ pro BDDE a $4,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ pro GCE.

5. Literatura

- [1] Risley, J. M. Cholesterol Biosynthesis: Lanosterol to Cholesterol. *J. Chem. Educ.* **2002**, *79*, 377.
- [2] Olson, J. A. The Biosynthesis of Cholesterol. *Ergebnisse Der Physiologie Biologischen Chemie Und Experimentellen Pharmakologie*, **1965**, 173–215.
- [3] Bláhová, E. Voltametrické chování cholesterolu na elektrodě ze skelného uhlíku. Bakalářská práce, Univerzita Karlova, Praha, **2019**.
- [4] Yershova, P. Vývoj voltametrických metod pro detekci cholesterolu na bórem dopované diamantové elektrodě. Bakalářská práce, Univerzita Karlova, Praha, **2018**.
- [5] Nes, W. D. Biosynthesis of Cholesterol and Other Sterols. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6423–6451.
- [6] Smith-Lemli-Opitz | RSH Syndrome Overview. *Smith-Lemli-Opitz/ RSH Foundation*. Převzato 10. 6. 2021 z <https://www.smithlemliopitz.org/smith-lemli-opitz-rsh-syndrome-overview/>.
- [7] Kanungo, S.; Soares, N.; He, M.; Steiner, R. D. Sterol Metabolism Disorders and Neurodevelopment-an Update: Sterol Metabolism Disorders and Neurodevelopment. *Dev. Disabil. Res. Rev.* **2013**, *17*, 197–210.
- [8] Calvo, P. L.; Brunati, A.; Spada, M.; Romagnoli, R.; Corso, G.; Parenti, G.; Rossi, M.; Baldi, M.; Carbonaro, G.; David, E.; Pucci, A.; Amoroso, A.; Salizzoni, M. Liver Transplantation in Defects of Cholesterol Biosynthesis: The Case of Lathosterolosis: Liver Transplantation in Defects of Cholesterol Biosynthesis. *Am. J. Transplant.* **2014**, *14*, 960–965.
- [9] Dinh, T. T. N.; Thompson, L. D.; Galyean, M. L.; Brooks, J. C.; Patterson, K. Y.; Boylan, L. M. Cholesterol Content and Methods for Cholesterol Determination in Meat and Poultry. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2011**, *10*, 269–289.
- [10] Albuquerque, T. G.; Oliveira, M. B. P. P.; Sanches-Silva, A.; Costa, H. S. Cholesterol Determination in Foods: Comparison between High Performance and Ultra-High Performance Liquid Chromatography. *Food Chem.* **2016**, *193*, 18–25.
- [11] Gu, C.-H.; Li, H.; Gandhi, R. B.; Raghavan, K. Grouping Solvents by Statistical Analysis of Solvent Property Parameters: Implication to Polymorph Screening. *Int. J. Pharm.* **2004**, *283*, 117–125.
- [12] Richardson, R. K.; Evers, J. M.; Gray, I. K. Determination of Cholesterol in Dairy Products by Whole Sample Saponification. *Int. Dairy J.* **1994**, *4*, 521–532.

- [13] Baluchová, S.; Daňhel, A.; Dejmková, H.; Ostatná, V.; Fojta, M.; Schwarzová-Pecková, K. Recent Progress in the Applications of Boron Doped Diamond Electrodes in Electroanalysis of Organic Compounds and Biomolecules – A Review. *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1077*, 30–66.
- [14] Spitsyn, B. V.; Bouilov, L. L. Diamond And Diamond-Like Films: Deposition from the Vapour Phase, Structure and Properties. *Prog. Crystal Growth and Charact.* **1988**, *17*, 79–170.
- [15] Swain, G. M.; Ramesham, Rajeshuni. The Electrochemical Activity of Boron-Doped Polycrystalline Diamond Thin Film Electrodes. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 345–351.
- [16] Xu, J.; Granger, M. C.; Chen, Q.; Strojek, J. W.; Lister, T. E.; Swain, G. M. Peer Reviewed: Boron-Doped Diamond Thin-Film Electrodes. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 591A-597A.
- [17] Feng, Y.; Lv, J.; Liu, J.; Gao, N.; Peng, H.; Chen, Y. Influence of Boron Concentration on Growth Characteristic and Electro-Catalytic Performance of Boron-Doped Diamond Electrodes Prepared by Direct Current Plasma Chemical Vapor Deposition. *Appl. Surf. Sci.* **2011**, *257*, 3433–3439.
- [18] Cvačka, J.; Swain, G. M.; Berek, J. Stanovení aminonaftalenů a aminobifenylů kapalinovou chromatografií s amperometrickou detekcí na diamantové filmové elektrodě. *Chem. List.* **2002**, *96*, 33–38.
- [19] Panizza, M.; Cerisola, G. Application of Diamond Electrodes to Electrochemical Processes. *Electrochim. Acta* **2005**, *51*, 191–199.
- [20] Girard, H.; Simon, N.; Ballutaud, D.; Herlem, M.; Etcheberry, A. Effect of Anodic and Cathodic Treatments on the Charge Transfer of Boron Doped Diamond Electrodes. *Diam. Relat. Mater.* **2007**, *16*, 316–325.
- [21] Chaplin, B. P.; Hubler, D. K.; Farrell, J. Understanding Anodic Wear at Boron Doped Diamond Film Electrodes. *Electrochim. Acta* **2013**, *89*, 122–131.
- [22] Granger, M. C. The Influence of Surface Interactions on the Reversibility of Ferri/Ferrocyanide at Boron-Doped Diamond Thin-Film Electrodes. *J. Electrochem. Soc.* **1999**, *146*, 4551.
- [23] Musilová, J. Použití diamantových filmových elektrod dopovaných borem pro stanovení organických látek. *Chem Listy* **2009**, *10*.
- [24] Uslu, B.; Ozkan, S. Electroanalytical Application of Carbon Based Electrodes to the Pharmaceuticals. *Anal. Lett.* **2007**, *40*, 817–853.
- [25] Kim, J.; Song, X.; Kinoshita, K.; Madou, M.; White, R. Electrochemical Studies of Carbon Films from Pyrolyzed Photoresist. *J. Electrochem. Soc.* **2019**, *145*, 2314–2319.

- [26] McCreery, R. L. Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2646–2687.
- [27] Gunasingham, H.; Fleet, B. Comparative Study of Glassy Carbon as an Electrode Material. *The Analyst* **1982**, *107*, 896.
- [28] Pedrosa, V. A.; Suffredini, H. B.; Codognoto, L.; Tanimoto, S. T.; Machado, S. A. S.; Avaca, L. A. Carbon Surfaces for Electroanalytical Applications: A Comparative Study. *Anal. Lett.* **2005**, *38*, 1115–1125.
- [29] Harris, P. J. F. New Perspectives on the Structure of Graphitic Carbons. *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* **2005**, *30*, 235–253.
- [30] Wang, J.; Hutchins, L. D. Activation of Glassy Carbon Electrodes by Alternating Current Electrochemical Treatment. *Anal. Chim. Acta* **1985**, *167*, 325–334.
- [31] Zak, J.; Kuwana, T. Electrooxidative Catalysis Using Dispersed Alumina on Glassy Carbon Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5514–5515.
- [32] Stutts, K. J.; Kovach, P. M.; Kuhr, W. G.; Wightman, R. Mark. Enhanced Electrochemical Reversibility at Heat-Treated Glassy Carbon Electrodes. *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 1632–1634.
- [33] Taylor, R. Electrochemical Studies on Glassy Carbon Electrodes I. Electron Transfer Kinetics. *J. Electroanal. Chem.* **1973**, *42*, 347–354.
- [34] Amaral, C.; Gallardo, E.; Rodrigues, R.; Pinto Leite, R.; Quelhas, D.; Tomaz, C.; Cardoso, M. L. Quantitative Analysis of Five Sterols in Amniotic Fluid by GC–MS: Application to the Diagnosis of Cholesterol Biosynthesis Defects. *J. Chromatogr. B* **2010**, *878*, 2130–2136.
- [35] Liu, W.-H.; Ding, B.; Ruan, X.-M.; Xu, H.-T.; Yang, J.; Liu, S.-M. Analysis of Free and Conjugated Phytosterols in Tobacco by an Improved Method Using Gas Chromatography–Flame Ionization Detection. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1163*, 304–311.
- [36] Borkovcová, I.; Janoušková, E.; Dračková, M.; Janštová, B.; Vorlová, L. Determination of Sterols in Dairy Products and Vegetable Fats by HPLC and GC Methods. *Czech J. Food Sci.* **2009**, *27*, S217–S219.
- [37] Canabatediaz, B.; Seguracarretero, A.; Fernandezgutierrez, A.; Belmontevega, A.; Garridofrenich, A.; Martinezvidal, J.; Duranmartos, J. Separation and Determination of Sterols in Olive Oil by HPLC-MS. *Food Chem.* **2007**, *102*, 593–598.
- [38] Bauer, L. C.; Santana, D. de A.; Macedo, M. dos S.; Torres, A. G.; Souza, N. E. de; Simionato, J. I. Method Validation for Simultaneous Determination of Cholesterol and Cholesterol Oxides in Milk by RP-HPLC-DAD. *J. Braz. Chem. Soc.* **2013**.

- [39] Singh, R.; Ajagbe, M.; Bhamidipati, S.; Ahmad, Z.; Ahmad, I. A Rapid Isocratic High-Performance Liquid Chromatography Method for Determination of Cholesterol and 1,2-Dioleoyl-Sn-Glycero-3-Phosphocholine in Liposome-Based Drug Formulations. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1073*, 347–353.
- [40] Arya, S. K.; Datta, M.; Malhotra, B. D. Recent Advances in Cholesterol Biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *23*, 1083–1100.
- [41] Vidal, J. C.; Garcia-Ruiz, E.; Castillo, J. R. Strategies for the Improvement of an Amperometric Cholesterol Biosensor Based on Electropolymerization in Flow Systems: Use of Charge-Transfer Mediators and Platinization of the Electrode. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *24*, 51–63.
- [42] Guo, M.; Chen, J.; Li, J.; Nie, L.; Yao, S. Carbon Nanotubes-Based Amperometric Cholesterol Biosensor Fabricated Through Layer-by-Layer Technique. *Electroanalysis* **2004**, *16*, 1992–1998.
- [43] Zhou, N.; Wang, J.; Chen, T.; Yu, Z.; Li, G. Enlargement of Gold Nanoparticles on the Surface of a Self-Assembled Monolayer Modified Electrode: A Mode in Biosensor Design. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 5227–5230.
- [44] Saxena, U.; Das, A. B. Nanomaterials towards Fabrication of Cholesterol Biosensors: Key Roles and Design Approaches. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *75*, 196–205.
- [45] Mehrvar, M.; Abdi, M. Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors. *Anal. Sci.* **2004**, *20*, 1113–1126.
- [46] Sampath, S.; Lev, O. Electrochemical Oxidation of NADH on Sol–Gel Derived, Surface Renewable, Non-Modified and Mediator Modified Composite-Carbon Electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *446*, 57–65.
- [47] Vidal, J. C.; Garcia, E.; Castillo, J. R. In Situ Preparation of a Cholesterol Biosensor: Entrapment of Cholesterol Oxidase in an Overoxidized Polypyrrole Film Electrodeposited in a Flow System Determination of Total Cholesterol in Serum. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *10*.
- [48] Foster, R.; Cassidy, J.; O'Donoghue, E. Electrochemical Diagnostic Strip Device for Total Cholesterol and Its Subfractions. *Electroanalysis* **2000**, *12*, 716–721.
- [49] Peña, N.; Ruiz, G.; Reviejo, A. J.; Pingarrón, J. M. Graphite–Teflon Composite Bienzyme Electrodes for the Determination of Cholesterol in Reversed Micelles. Application to Food Samples. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1190–1195.
- [50] Qiaocui, S.; Tuzhi, P.; Yunu, Z.; Yang, C. F. An Electrochemical Biosensor with Cholesterol Oxidase/ Sol-Gel Film on a Nanoplatinum/Carbon Nanotube Electrode. *Electroanalysis* **2005**, *17*, 857–861.

- [51] Yang, M.; Yang, Y.; Yang, H.; Shen, G.; Yu, R. Layer-by-Layer Self-Assembled Multilayer Films of Carbon Nanotubes and Platinum Nanoparticles with Polyelectrolyte for the Fabrication of Biosensors. *Biomaterials* **2006**, *27*, 246–255.
- [52] Parra, A.; Casero, E.; Pariente, F.; Vázquez, L.; Lorenzo, E. Cholesterol Oxidase Modified Gold Electrodes as Bioanalytical Devices. *Sens. Actuators B Chem.* **2007**, *124*, 30–37.
- [53] Xiong, Q.; Wilson, W. K.; Pang, J. The Liebermann-Burchard Reaction: Sulfonation, Desaturation, and Rearrangement of Cholesterol in Acid. *Lipids* **2007**, *42*, 87–96.
- [54] Kenny, A. P. The Determination of Cholesterol by the Liebermann-Burchard Reaction. *Biochem. J.* **1952**, *52*, 611–619.
- [55] Abell, L. L.; Levy, B. B.; Brodie, B. B.; Kendall, F. E. A Simplified Method for the Estimation of Total Cholesterol in Serum and Demonstration of Its Specificity. *J. Biol. Chem.* **1952**, *195*, 357–366.
- [56] Luzón-Toro, B.; Zafra-Gómez, A.; Ballesteros, O. Gas Chromatographic–Mass Spectrometric Determination of Brain Levels of α -Cholest-8-En-3 β -Ol (Lathosterol). *J. Chromatogr. B* **2007**, *850*, 177–182.
- [57] Hojo, K.; Hakamata, H.; Kusu, F. Simultaneous Determination of Serum Lathosterol and Cholesterol by Semi-Micro High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, 751–755.
- [58] Phillips, K. M.; Ruggio, D. M.; Bailey, J. A. Precise Quantitative Determination of Phytosterols, Stanols, and Cholesterol Metabolites in Human Serum by Capillary Gas–Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* **1999**, *732*, 17–29.
- [59] Lütjohann, D.; Stroick, M.; Bertsch, T.; Kühl, S.; Lindenthal, B.; Thelen, K.; Andersson, U.; Björkhem, I.; Bergmann, K. von; Fassbender, K. High Doses of Simvastatin, Pravastatin, and Cholesterol Reduce Brain Cholesterol Synthesis in Guinea Pigs. *Steroids* **2004**, *69*, 431–438.
- [60] Halperin, G.; Elisaf, M.; Leitersdorf, E.; Harats, D. A New Method for Determination of Serum Cholesterol by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* **2000**, *742*, 345–352.
- [61] Honda, A.; Yamashita, K.; Miyazaki, H.; Shirai, M.; Ikegami, T.; Xu, G.; Numazawa, M.; Hara, T.; Matsuzaki, Y. Highly Sensitive Analysis of Sterol Profiles in Human Serum by LC-ESI-MS/MS. *J. Lipid Res.* **2008**, *49*, 2063–2073.
- [62] Jan Klouda. Elektrochemická oxidace žlučových kyselin na elektrodách na bázi uhlíku. Možnosti využití v elektroanalýze. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta UK, Praha, **2015**.

- [63] Klouda, J.; Nesměrák, K.; Kočovský, P.; Barek, J.; Schwarzová-Pecková, K. A Novel Voltammetric Approach to the Detection of Primary Bile Acids in Serum Samples. *Bioelectrochemistry* **2020**, *134*, 107539.
- [64] Davídek, J. *Laboratorní Příručka Analýzy Potravin*, 2. vyd.; SNTL – Nakladatelství technické literatury: Praha, **1981**.
- [65] Derina, K.; Korotkova, E.; Taishibekova, Y.; Salkeeva, L.; Kratochvíl, B.; Barek, J. Electrochemical Nonenzymatic Sensor for Cholesterol Determination in Food. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410*, 5085–5092.
- [66] Fletouris, D. J.; Botsoglou, N. A.; Psomas, I. E.; Mantis, A. I. Rapid Determination of Cholesterol in Milk and Milk Products by Direct Saponification and Capillary Gas Chromatography. *J. Dairy Sci.* **1998**, *81*, 2833–2840.
- [67] Paradkar, M. M.; Irudayaraj, J. Determination of Cholesterol in Dairy Products Using Infrared Techniques: 1. FTIR Spectroscopy. *Int. J. Dairy Technol.* **2002**, *55*, 127–132.
- [68] Klouda, J.; Barek, J.; Kočovský, P.; Herl, T.; Matysik, F.-M.; Nesměrák, K.; Schwarzová-Pecková, K. Bile Acids: Electrochemical Oxidation on Bare Electrodes after Acid-Induced Dehydration. *Electrochem. Commun.* **2018**, *86*, 99–103.
- [69] Jelšíková, K. Voltametrie fytosterolů na borem dopované diamantové elektrodě. Bakalářská práce, Univerzita Karlova, Praha, **2018**.
- [70] Zelenský, M. Voltametrické chování fytosterolů na elektrodě ze skelného uhlíku. Bakalářská práce, Univerzita Karlova, Praha, **2018**.
- [71] Zárbybnická, A. Voltametrie 7-Dehydrocholesterolu na bórem dopované diamantové elektrodě. Bakalářská práce, Univerzita Karlova, Praha, **2018**.