

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Analytická chemie



Bc. Lucie Dostálková

STANOVENÍ CHOLESTEROLU, 7-DEHYDROCHOLESTEROLU A  
CHOLEKALCIFEROLU METODOU HPLC SE  
SPEKTROFOTOMETRICKOU A ELEKTROCHEMICKOU DETEKČÍ

Determination of cholesterol, 7-dehydrocholesterol and cholecalciferol by  
HPLC with spectrophotometric and electrochemical detection

Diplomová práce

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

Praha 2023

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto 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.

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

V Praze dne 18. května 2023.

Tato práce vznikla s podporou Grantové agentury České republiky (projekt 19-11268S).

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat své školitelce doc. RNDr. Karolině Schwarzové, Ph.D. za vstřícný přístup, věcné připomínky a za odborné vedení mé diplomové práce. Také bych ráda poděkovala Mgr. Kristýně Jelšíkové za pomoc při práci v laboratoři. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za podporu při studiu.

## Abstrakt

Obsahem této práce je ověření možnosti současného stanovení tří strukturálně příbuzných biologicky aktivních látek (cholesterol, 7-dehydrocholesterol a cholekalciferol) po předchozí separaci vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a následné elektrochemické (na borem dopované diamantové elektrodě) a spektrofotometrické detekci, které byly v práci porovnávány. Byl zkoumán vliv obsahu vody v mobilní fázi (v rozsahu 0–10 %) na retenční faktor analytů a jejich odezvu pro oba typy detektorů. Při všech zkoumaných obsazích vody byly analyty separovány až na základní linii. Při zvyšujícím se obsahu vody se zvyšoval retenční faktor analytů a také proud pozadí pro vyšší kladné detekční potenciály. Na základě zaznamenaných hydrodynamických voltamogramů byl určen optimální detekční potenciál + 1,8 V. Optimální vlnová délka pro spektrofotometrickou detekci byla 200 nm. Koncentrační závislost byla naměřena v prostředí 50 mmol l<sup>-1</sup> chloristanu sodného v acetonitrilu ve směsi s vodou (95:5, v/v). Nižší hodnoty limitů detekce poskytoval spektrofotometrický detektor oproti elektrochemickému, který měl limit detekce cholesterolu 2,3 μmol l<sup>-1</sup>, 7-dehydrocholesterolu 1,4 μmol l<sup>-1</sup> a cholekalciferolu 0,6 μmol l<sup>-1</sup>. Po extrakci analytů z modelového roztoku umělého séra a vzorku plodové vody bylo zjištěno, že při spektrofotometrické detekci je na záznamu chromatogramu mnohem více interferujících složek než při elektrochemické detekci, která je díky tomu značně selektivnější.

Klíčová slova: 7-dehydrocholesterol, borem dopovaná diamantová elektroda, cholekalciferol, cholesterol, elektrochemická detekce, spektrofotometrická detekce, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

## Abstract

The aim of this thesis is to verify the possibility of simultaneous determination of three structurally related biologically active substances (cholesterol, 7-dehydrocholesterol and cholecalciferol) after previous separation by high-performance liquid chromatography followed by electrochemical (on a boron-doped diamond electrode) and spectrophotometric detection, which were compared in this work. The influence of the water content in the mobile phase (in the range of 0-10 %) on the retention factor of the analytes and their response for both types of detectors was investigated. Using all mentioned water contents, the analytes baseline-separated. As the water content increased, the retention factor of the analytes increased as well as the background current for higher positive detection potentials. Based on the recorded hydrodynamic voltammograms, the optimum detection potential + 1.8 V was chosen. The optimum wavelength for spectrophotometric detection was 200 nm. The concentration dependence was measured in an of 50 mmol l<sup>-1</sup> sodium perchlorate in acetonitrile mixed with water (95:5, v/v). The spectrophotometric detector provided lower detection limits compared with the electrochemical detector, which had detection limits of 2.3 μmol l<sup>-1</sup> for cholesterol, 1.4 μmol l<sup>-1</sup> for 7-dehydrocholesterol and 0.6 μmol l<sup>-1</sup> for cholecalciferol. After extraction of the analytes from the artificial serum model solutions and the amniotic fluid sample, it was found that there are many more interfering components in the chromatogram record during spectrophotometric detection than during electrochemical detection, which is thus considerably more selective.

Key words: 7-dehydrocholesterol, boron doped diamond electrode, cholecalciferol, cholesterol, high performance liquid chromatography, electrochemical detection, spectrophotometric detection

# Obsah

<b>1. Teoretická část .....</b>	<b>10</b>
1.1. Cíl práce .....	10
1.2. Studované látky.....	10
1.2.1. Cholesterol .....	11
1.2.2. 7-dehydrocholesterol.....	14
1.2.3. Cholekalciferol.....	14
1.3. Elektrochemická aktivita studovaných látek a jejich oxidační mechanismus.....	16
1.4. Fyzikálně-chemické vlastnosti studovaných látek.....	18
1.5. Analytické metody stanovení studovaných látek.....	19
1.5.1. Stanovení cholesterolu .....	19
1.5.2. Stanovení 7-dehydrocholesterolu.....	22
1.5.3. Stanovení cholekalciferolu.....	24
1.6. Extrakce lipidů .....	25
1.7. Borem dopovaný diamant .....	27
1.7.1. Příprava BDDE a úprava jejich povrchu.....	28
1.7.2. Využití BDDE v elektroanalýze .....	29
<b>2. Experimentální část.....</b>	<b>30</b>
2.1. Použité chemikálie a příprava roztoků.....	30
2.2. Aparatura.....	31
2.3. Pracovní postupy .....	32
2.4. Extrakce analytů z umělého séra a plodové vody .....	32
2.5. Vyhodnocení výsledků.....	34
<b>3. Výsledky a diskuze .....</b>	<b>35</b>

3.1.	Vliv obsahu vody v mobilní fázi na retenční faktor analytů.....	35
3.2.	Optimalizace elektrochemické detekce.....	37
3.3.	Optimalizace spektrofotometrické detekce.....	42
3.4.	Koncentrační závislost analytů .....	44
3.5.	Stanovení analytů v umělém séru .....	50
3.6.	Stanovení analytů v plodové vodě .....	55
<b>4.</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>59</b>
<b>5.</b>	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>61</b>

## Seznam použitých zkratk

BDD	borem dopovaný diamant
BDDE	borem dopovaná diamantová elektroda
$c$	molární koncentrace
$c_{st}$	koncentrace přídatku standardu
CVD	chemická depozice par (chemical vapour deposition)
DAD	detektor s diodovým polem (diode array detector)
DPV	diferenční pulzní voltametrie
ED	elektrochemický detektor
$E_{det}$	detekční potenciál
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
$h_p$	výška píku
Ch	cholesterol
$I_p$	výška proudu píku
$I_{poz}$	proud pozadí
$k_{ret}$	retenční faktor
$\lambda_{det}$	vlnové délka detekce
LDR	lineární dynamický rozsah (linear dynamic range)
LOD	limit detekce (limit of detection)
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)



SIM	sledování vybraných iontů (selected ions monitoring)
SLOS	Smith-Lemli-Opitzův syndrom
TOF	průletový analyzátor (time of flight)
UV	ultrafialová oblast spektra
$R$	korelační koeficient
$RSD$	relativní směrodatná odchylka (relative standard deviation)
$\varphi_{H_2O}$	procentuální objemový zlomek vody

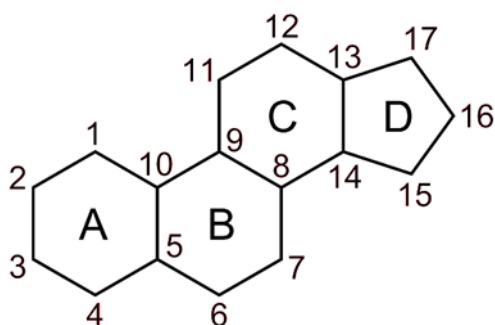
# 1. Teoretická část

## 1.1. Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo ověřit možnost současného stanovení tří biologicky aktivních látek – cholesterolu (Ch), 7-dehydrocholesterolu a cholekalciferolu po předchozí separaci na HPLC a vzájemné porovnání spektrofotometrické a elektrochemické detekce (ED) s použitím borem dopované diamantové elektrody (BDDE). V poslední části práce byla ověřena možnost stanovení analytů v biologických vzorcích plodové vody.

## 1.2. Studované látky

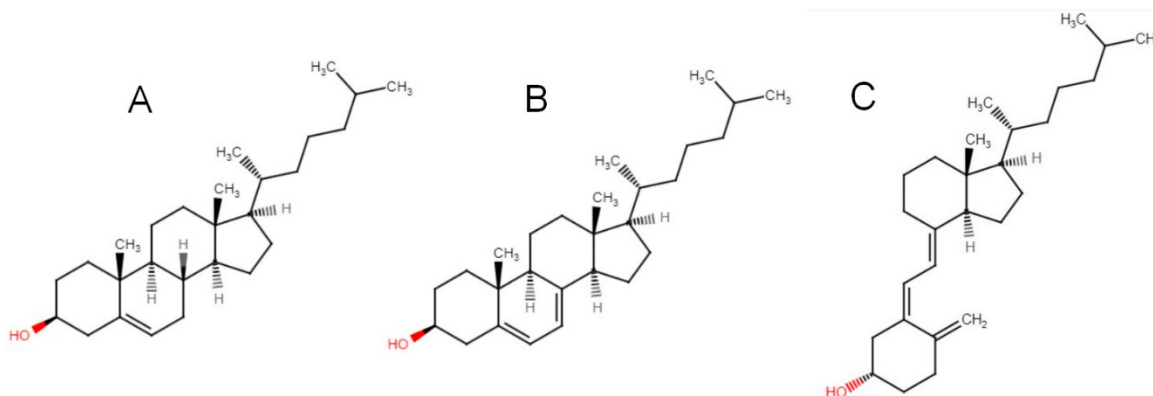
Steroidy jsou farmakologicky i fyziologicky významné látky vyskytující se u živočichů, rostlin i hub. Základní stavební kostrou jsou čtyři nasycené uhlovodíkové kruhy, jejichž struktura (steran) je uvedena na obrázku 1.1. Steroidní sloučeniny se dělí do třech hlavních skupin, a to steroly, žlučové kyseliny a steroidní hormony [1].



Obr. 1.1 Struktura steranu.

Steroly jsou řazeny z biochemického pohledu mezi lipidy, ale chemicky to jsou vlastně alkoholy, protože mají na C<sub>3</sub> v poloze  $\beta$  hydroxylovou skupinu. Navíc mají minimálně jednu dvojnou vazbu v kruhu B nebo v postranním řetězci, který je připojený na C<sub>17</sub>. Steroly jsou amfipatické kvůli tomu, že již zmíněná hydroxylová skupina je polární a zbytek alifatického řetězce nepolární. Steroly jsou dále děleny podle výskytu na zoosteroly (živočišné), fytosteroly (rostlinné) a mykosteroly (v houbách a plísních) [1]. Mezi zoosteroly se řadí látky studované v této diplomové práci, a to 7-dehydrocholesterol a cholesterol, o kterých bude v dalších kapitolách pojednáno podrobněji.

Třetí studovaná látka, cholekalciferol, je strukturně podobná steroidním sloučeninám. Řadí se mezi sekosteroidy, protože na rozdíl od sterolů má jeden otevřený kruh. Mezi C<sub>8</sub> a C<sub>19</sub> je systém tří konjugovaných dvojných vazeb. Cholekalciferol známý jako vitamin D<sub>3</sub> je neaktivní formou vitamínu D. Struktury cholesterolu, 7-dehydrocholesterolu a cholekalciferolu jsou znázorněny na obrázku 1.2.



Obr. 1.2 Struktura cholesterolu (A), 7-dehydrocholesterolu (B) a cholekalciferolu (C).

### 1.2.1. Cholesterol

Cholesterol [cholest-5-en-3-ol (3-beta)] je sterol vyskytující se ve všech živočišných tkáních, zejména v nervové. Vyskytuje se výhradně v eukaryotických buňkách. Buněčné membrány živočichů obsahují podstatně více cholesterolu než membrány rostlin, v těch je cholesterol obvykle nahrazen jinými steroly, například stigmasterolem nebo  $\beta$ -sitosterolem. Cholesterol je důležitou složkou buněčné membrány kvůli regulaci její fluidity [1].

Tělo jej může přijímat buď ze stravy (exogenně) nebo jeho syntéza probíhá v játrech, střevech, či v kůži *de novo* (endogenně) [2]. Většina cholesterolu je poté zabudována do lipidové vrstvy buněčné membrány nebo je přeměněna na žlučové kyseliny. Menší množství cholesterolu je přeměněno na steroidní hormony, jako kalcitriol, glukokortikoidy, mineralokortikoidy a další [1]. Pro buněčnou membránu je cholesterol základní strukturní složkou. Díky němu je totiž zajištěna její správná propustnost a tekutost. Tekutost membrány výrazně ovlivňuje její funkce. Pokud se zvýší, zvýší se také její propustnost pro vodu a další malé hydrofilní molekuly [3].

Cholesterol nemůže v krvi existovat samostatně, protože se v ní kvůli svému hydrofobnímu jádru nerozpouští. Je proto vázán na lipoproteinové částice, které jsou schopny transportovat lipidy krví. Lipoproteiny jsou částice, jejichž vnitřní část obsahuje jádro bohaté na lipidy (triacylglyceroly nebo estery cholesterolu) a nepolární skupiny aminokyselin amfipatického proteinu. Polární skupiny aminokyselin tohoto proteinu jsou orientovány na vnější části, což činí tuto částici rozpustnou ve vodě. Na povrchu lipoproteinu jsou navíc apolipoproteiny, které slouží jako ligandy pro receptory na povrchu buněk, a tím napomáhají k vytvoření vazby a následnému přijetí lipoproteinů do buňky [2].

Biosyntéza cholesterolu, jak již bylo zmíněno, probíhá v cytosolu, a to především jaterních buněk [3]. Celý proces syntézy je poměrně složitý a dá se rozdělit do pěti jednotlivých kroků. Zjednodušené schéma biosyntézy cholesterolu je zobrazeno na obr. 1.3.

Prvním krokem je kondenzační reakce dvou molekul acetylkoenzymu A za vzniku acetoacetylkoenzymu A, která je katalyzovaná *cytosolickou thiolázou*. Molekula acetoacetylkoenzymu A kondenzuje s další molekulou acetylkoenzymu A za vzniku HMG-koenzymu A katalyzovanou *HMG-koenzym A syntázou* (HMG – 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl). Tento meziproduct je následně *HMG-koenzym A reduktázou* redukován NADPH (nikotinamidadeninukleotidfosfát) na melavonát [3].

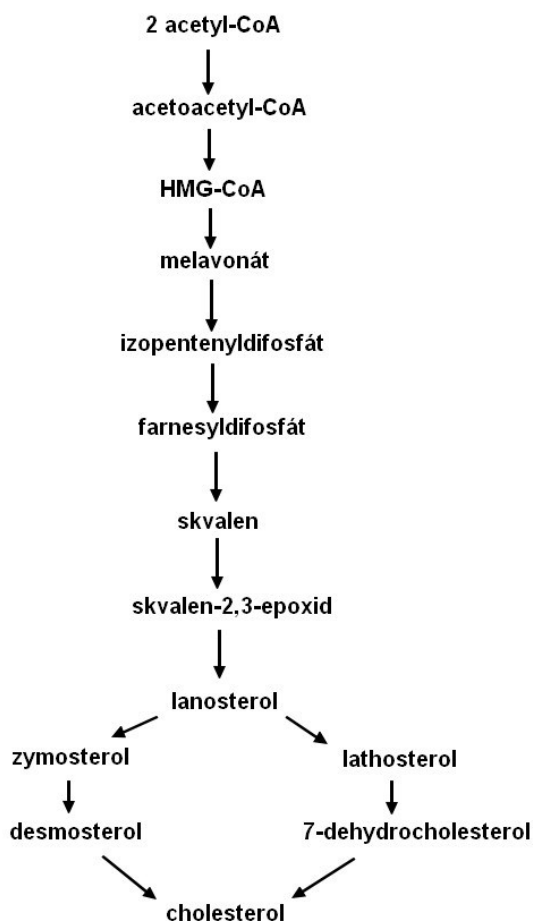
Druhý krok zahrnuje tvorbu isoprenoidních jednotek, kdy melavonát vzniklý v předchozím kroku je postupně fosforylován kinázami v přítomnosti adenosintrifosfátu. Po následné dekarboxylaci vznikne aktivní isoprenoidní jednotka isopentenylidifosfát [3].

Ve třetím kroku isopentenylidifosfát podléhá isomeraci, následné kondenzaci a přidáním dalšího isopentenylidifosfátu vzniká farnesyldifosfát. Tento meziproduct podléhá dimerizaci za vzniku skvalenu [1].

Ve čtvrtém kroku je skvalen přeměněn na skvalen-2,3-epoxid za katalýzy *skvalen epoxidázou* v endoplazmatickém retikulu. Následuje přeskupení methylové skupiny při cyklizaci, kterou katalyzuje *oxidoskvalen-lanosterol-cyklaza* [3], při které dochází ke spotřebě molekuly kyslíku [1] za vzniku lanosterolu.

Přeměna lanosterolu na cholesterol probíhá v membráně endoplazmatického retikula a je možná dvěma způsoby, přes meziprodukt desmosterol nebo 7-dehydrocholesterol. V prvním případě je lanosterol přeměněn na zymosterol odstraněním methylových skupin na lanosterolu. Posunutím dvojné vazby dochází ke vzniku desmosterolu a následně redukcí dvojné vazby postranního řetězce desmosterolu vznikne cholesterol [3].

V druhém případě dochází k přeměně lanosterolu přes meziprodukty na lathosterol. Vzniklý lathosterol podléhá dehydrogenační reakci za vzniku 7-dehydrocholesterolu katalyzovanou *lathosterol oxidázou*. Následně se 7-dehydrocholesterol redukuje za katalýzy *7-dehydrocholesterolreduktázou* na konečný produkt, a to cholesterol [4]. Právě mutace tohoto enzymu vede ke vzniku Smith-Lemli-Opitzova syndromu (SLOS), o kterém je pojednáno v následující kapitole.



Obr. 1.3 Zjednodušené schéma biosyntézy cholesterolu (převzato a upraveno [5]).

## 1.2.2. 7-dehydrocholesterol

Jak už bylo zmíněno v předchozí kapitole, syntéza cholesterolu probíhá přes řadu meziproductů, mezi něž se řadí 7-dehydrocholesterol. Tato přeměna je katalyzována enzymem *7-dehydrocholesterolreduktázou*. Pokud dojde ke genové mutaci tohoto enzymu, jeho katalytická aktivita je snížena, a to vede ke hromadění 7-dehydrocholesterolu a neobvykle snížené hladině cholesterolu ve tkáních. Toto onemocnění se nazývá Smith-Lemli-Opitzův syndrom a řadí se mezi autosomálně recesivní onemocnění [6]. Proto je 7-dehydrocholesterol důležitým biomarkerem této nemoci a spolehlivá metoda detekce jeho zvýšených koncentrací v tělních tekutinách jako krevní plazma nebo plodová voda je důležitá pro spolehlivou diagnostiku a monitorování léčby SLOS [7,8].

Mezi klinické projevy SLOS patří mentální retardace, mikrocefalie, rozštěpové vady obličeje a patra, nebo abnormality končetin. Výskyt tohoto onemocnění se odhaduje na 1 z 20 000 narozených dětí [4].

Vedle cholesterolu je 7-dehydrocholesterol také důležitým prekurzorem cholekalciferolu, na který se mění v kůži vlivem ultrafialového záření [1].

## 1.2.3. Cholekalciferol

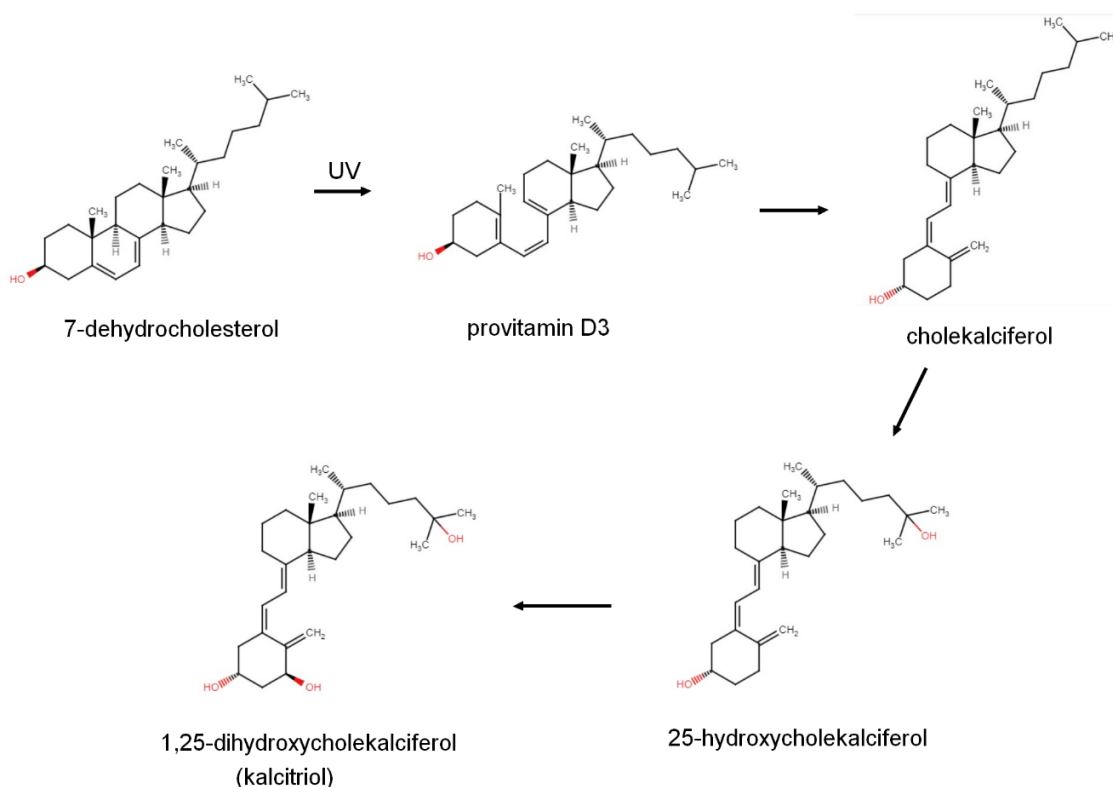
Cholekalciferol, známý také jako vitamin D<sub>3</sub>, je jedna z neaktivních forem vitamínu D, který je rozpustný v tucích [9]. Nejprve ze 7-dehydrocholesterolu vzniká v kůži po expozici ultrafialovým zářením [3] (290-315 nm) provitamin D<sub>3</sub>. Dochází k absorpci energie dvojnými vazbami, jejich přeskupení a otevření kruhu B ve steranovém skeletu za vzniku provitamínu D<sub>3</sub>. Ten je zachycen v lipidové dvojvrstvě plazmatické membrány [10]. Během několika hodin vlivem dalších reakcí vznikne termodynamicky stabilnější cholekalciferol, který je absorbován do krevního oběhu [3]. Další forma, vitamin D<sub>2</sub>, známý jako ergokalciferol se tvoří z ergosterolu opět působením ultrafialového záření [9].

Obě formy tohoto vitamínu jsou biologicky neaktivní. Proto je cholekalciferol enzymaticky přeměněn dvěma postupnými hydroxylacemi na biologicky aktivní 1,25-dihydroxycholekalciferol známý jako kalcitriol [9]. Syntéza kalcitriolu probíhá nejprve v játrech za vzniku 25-hydroxyderivátu, který se navázaný na globulin uvolňuje

do krevního oběhu. Poté se v ledvinách tento 25-hydroxyderivát dále hydroxyluje na konečný produkt kalcitriol, vysoce aktivní formu vitamínu D [3]. Zjednodušené schéma biosyntézy kalcitriolu je znázorněno na obr. 1.4.

Kalcitriol se řadí mezi steroidní hormony. Podporuje absorpci vápenatých iontů ve střevním epitelu, a tím zvyšuje jejich koncentraci v krevní plazmě, díky čemuž se vápenaté ionty ukládají v kostech a zubech. Nedostatek kalcitriolu může u dětí způsobovat křivici, projevující se zpomalením růstu a deformací kostí. Prevence tohoto onemocnění je vystavování pokožky slunečnímu záření nebo konzumace potravin bohatých na živočišné tuky [9]. U dospělých jedinců jeho nedostatek snižuje množství minerálů v kostech, a tím urychluje osteoporózu [10].

Protože je vitamin D rozpustný v tucích, hromadí se v tukové tkáni. To může vést k intoxikaci projevující se kalcifikací měkkých tkání, vznikem ledvinových kamenů a následně selháním ledvin [9].



Obr. 1.4 Schéma biosyntézy kalcitriolu (upraveno dle [10]).

### 1.3. Elektrochemická aktivita studovaných látek a jejich oxidační mechanismus

Vzhledem k tomu, že samotné steroidní jádro je elektrochemicky neaktivní, jsou elektrochemické vlastnosti sterolů a jim příbuzných látek závislé na přítomných funkčních skupinách nebo násobných vazbách v tomto steroidním jádře. Steroly obsahující jednu dvojnou vazbu ve steroidním skeletu, jako například cholesterol, jsou elektrochemicky aktivní jen na specifických elektrodových materiálech poskytujících dostatečně široké potenciálové okno v oblasti kladných potenciálů. Proto byl dlouhou dobu cholesterol považován za elektrochemicky neaktivní sloučeninu [11]. V odborné literatuře byla jeho přímá elektrochemická oxidace popsána teprve v roce 2005 [12].

Studiu elektrochemických vlastností steroidních sloučenin a využití elektroanalytických metod pro jejich detekci se zabývá UNESCO Laboratoř elektrochemie životního prostředí [11,13,14].

V molekule cholesterolu je více funkčních skupin, které mohou být oxidovány, jsou to hydroxylová skupina na C<sub>3</sub>, dvojná vazby mezi C<sub>5</sub> a C<sub>6</sub>, uhlík v allylové poloze nebo uhlík C<sub>25</sub> v postranním řetězci. Jaká skupina bude konkrétně oxidována, závisí na reakčních podmínkách (rozpuštědle, základním elektrolytu, vlastnostech elektrodového materiálu a vloženém potenciálu). Výťažky oxidačních produktů cholesterolu se pohybují pod 30 %. Takto nízké hodnoty jsou pravděpodobně zapříčiněny nutností vložení relativně vysokého kladného potenciálu [15].

Kowalski a spol. [12] zkoumali oxidační mechanismus cholesterolu na platinové elektrodě v prostředí bezvodé kyseliny octové s přísadkou 0,4 mol l<sup>-1</sup> chloristanu sodného a 0,1 mol l<sup>-1</sup> octanu sodného jako základního elektrolytu. Cholesterol se oxidoval přednostně na uhlíku C<sub>7</sub> v allylové poloze za vzniku acetoxyderivátů cholesterolu, konkrétně 7 $\alpha$ -acetoxycholesterolu a 7 $\beta$ -acetoxycholesterolu v poměru 10:3. Přenosem dvou elektronů vzniká karbokation, na který se následně naváže acetát sloužící jako nukleofil. Příčina převažující  $\alpha$  formy ve směsi oxidačních produktů je zřejmě stericky méně bráněná strana steroidního skeletu.

V bakalářských pracích [16,17] byla studována elektrochemická aktivita cholesterolu v prostředí kyseliny chloristé v acetonitrilu. Tato silná minerální kyselina



dokáže cholesterol dehydratovat na produkt s lepší elektrochemickou aktivitou. Bylo zjištěno, že na elektrodě ze skelného uhlíku se cholesterol oxiduje při + 1,4 V vs. Ag/AgNO<sub>3</sub> v acetonitrilu a na borem dopovaném diamantu při + 1,3 až 1,6 V vs. Ag/AgNO<sub>3</sub> v acetonitrilu v závislosti na obsahu vody. S vyšším obsahem vody v základním elektrolytu se potenciál píku cholesterolu posouval k nižším hodnotám. Dále bylo zjištěno, že tato reakce je ireverzibilní.

Mechanismus elektrochemické oxidace 7-dehydrocholesterolu nebyl dosud v literatuře dostatečně popsán, pravděpodobně zahrnuje uvolnění jednoho elektronu z konjugovaného systému dvojných vazeb, za vzniku karbokationtu a následným navázáním přítomných nukleofilů (vody nebo acetonitrilu) [14].

Práce [14] popisuje možnost přímé oxidace 7-dehydrocholesterolu v prostředí základního elektrolytu chloristanu sodného v acetonitrilu na borem dopované diamantové elektrodě. Anodický signál 7-dehydrocholesterolu byl zaznamenán při cca + 0,8 V vs. Ag/AgNO<sub>3</sub> v acetonitrilu. Při použití kyseliny chloristé jako základního elektrolytu se signál v čase zmenšoval, a navíc došlo k vyskytnutí se dalšího píku při cca + 1,0 V vs. Ag/AgNO<sub>3</sub> v acetonitrilu. Signál je možné zaznamenat i na elektrodě ze skelného uhlíku nebo platinové elektrodě.

V diplomové práci [18], která zkoumala elektrochemické chování 7-dehydrocholesterolu bylo zjištěno, že při použití kyseliny chloristé v acetonitrilu jako základního elektrolytu dochází k nejvyšší proudové odezvě této látky při přidávku 5 % vody.

Za obdobných podmínek jako při studiu 7-dehydrocholesterolu bylo v diplomové práci [19] zjištěno, že jemu příbuzná látka cholekalciferol je elektrochemicky aktivní, a v prostředí 0,1 mol l<sup>-1</sup> chloristanu sodného v acetonitrilu se na borem dopované diamantové elektrodě oxiduje při + 0,7 V vs. Ag/AgNO<sub>3</sub> v acetonitrilu.

Nallbani a spol. [20] objasnili mechanismus elektrochemické oxidace cholekalciferolu na elektrodě ze skelného uhlíku v základním elektrolytu 0,1 mol l<sup>-1</sup> chloristanu lithného ve směsném prostředí ethanolu a vody (1:1, v/v). Oxidace cholekalciferolu zahrnuje dva jednoelektronové přenosy delokalizovaných elektronů systému tří konjugovaných dvojných vazeb mezi C<sub>8</sub> až C<sub>19</sub>. Poté následuje hydroxylace

vzniklých karbokationtů za vzniku hydroxyderivátu jako oxidačního produktu cholekalciferolu.

#### 1.4. Fyzikálně-chemické vlastnosti studovaných látek

Fyzikálně-chemické vlastnosti studovaných látek jsou uvedeny v tabulce 1.1.

Cholesterol je bílá až slabě žlutá krystalická látka bez zápachu. Je rozpustný v organických rozpouštědlech jako aceton, dioxan a ethylacetát, dále v tucích nebo vodných roztocích žlučových kyselin. Ve vodě je téměř nerozpustný [21].

7-dehydrocholesterol je pevná látka. Je rozpustný v organických rozpouštědlech jako ethanol, chloroform nebo ethylacetát. Ve vodě je téměř nerozpustný a v dimethylsulfoxidu málo rozpustný [22].

Cholekalciferol známý jako vitamin D<sub>3</sub> je jemná bezbarvá krystalická látka bez zápachu. Je rozpustný v organických rozpouštědlech jako methanol, aceton nebo ethylacetát. Ve vodě je téměř nerozpustný. Je citlivý na vlhkost a světlo a na vzduchu se rozkládá [23].

Tab. 1.1 Molekulová hmotnost, teplota tání a rozpustnost cholesterolu, 7-dehydrocholesterolu a cholekalciferolu ve vodě.

	<b>Molekulová hmotnost</b> (g mol <sup>-1</sup> )	<b>Teplota tání</b> (°C)	<b>Rozpustnost ve vodě při 25 °C</b> (mg l <sup>-1</sup> )	<b>Ref.</b>
Cholesterol	386,7	148,0	0,095	[21]
7-dehydrocholesterol	384,6	150,5	0,15	[22]
Cholekalciferol	384,6	84,5	0,38	[23]

## 1.5. Analytické metody stanovení studovaných látek

### 1.5.1. Stanovení cholesterolu

Pro stanovení cholesterolu bylo vyvinuto velké množství metod. Lze je rozdělit na klasické analytické metody založené na chemické reakci, enzymatické metody používané často v testovacích soupravách a metody analytické instrumentální analýzy, u kterých je většinou nutný předchozí separační krok pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) nebo plynové chromatografie (GC). Jelikož vysoké hodnoty cholesterolu jsou považovány za biomarker mnoha kardiovaskulárních chorob [24] (infarkt myokardu, vysoký krevní tlak, diabetes II. typu) a naopak nízké za biomarker SLOS [8], je žádoucí vyvinout spolehlivou analytickou metodu pro jeho detekci. Hodnota koncentrace celkového cholesterolu, tedy suma jak volného, tak esterifikovaného cholesterolu, by se v krevním séru u dospělých lidí měla pohybovat mezi hodnotami 1,8–4,9 mmol l<sup>-1</sup> [24].

V minulosti byla hojně používána modifikovaná Abell-Kendallová metoda [25], zahrnující více kroků včetně dehydratační Liebermann–Bucharovy reakce. Jde o kolorimetrickou metodu, kdy jsou estery cholesterolu nejprve hydrolyzovány hydroxidem draselným v prostředí alkoholu, cholesterol je poté extrahován hexanem (v původní Abell-Kendallově metody byl používán petrolether) a následně dochází k odpaření rozpouštědla. Liebermann-Bucharovo činidlo obsahující anhydrid kyseliny octové a koncentrovanou kyselinou sírovou reaguje s hydroxylovou skupinou volného cholesterolu, dojde k sulfonaci této skupiny a následným dehydratačním reakcím za vzniku dvojných vazeb na steroidním skeletu cholesterolu. Tím se vzniklé produkty stávají detekovatelnými ve viditelné oblasti při vlnové délce přibližně 410 nm [24].

Enzymatické metody pro detekci cholesterolu jsou dnes široce používané v různých testovacích soupravách (biosensory) a automatizovaných analýzách. Biosensory lze rozdělit podle typu detekce na elektrochemické [26,27], spektrofotometrické [28], konduktometrické a další. Základní princip je však u všech stejný, a to hydrolýza esterifikovaného cholesterolu enzymem *cholesterolesteraza* v přítomnosti vody na volný cholesterol. Ten je následně oxidován na cholest-4-en-3-on *cholesteroxidazou*. Díky této reakci vzniká peroxid vodíku, který je následně detegován [24].

Ve srovnání s instrumentálními metodami mají biosensory tu výhodu, že jsou rychlé, relativně citlivé, nevyžadují úpravu vzorku a nákladné přístrojové vybavení [29]. Na druhou stranu je nutné zmínit, že nemusí být vždy jednoznačně selektivní jen pro cholesterol. *Cholesteroloxidáza* může totiž reagovat také s jinými steroly [30], a navíc některé složky v matrici (například kyselina askorbová) mohou zreagovat s peroxidem vodíku, a tím zkreslit výsledek analýzy [24].

Huang a spol. [26] vyvinuli elektrochemický biosensor pro detekci cholesterolu síťotiskovou elektrodou modifikovanou oxidem grafenu a nanočásticemi zlata. Cholesterol byl detekován nepřímo anodickou rozpouštěcí voltametrií, kdy byly detegovány stříbrné ionty, jejichž koncentrace byla přímo úměrná přítomnému cholesterolu. Limit detekce (*LOD*) u této metody byl  $2,6 \mu\text{mol l}^{-1}$ .

Nantaphol a spol. [27] představili biosensor na bázi skelného uhlíku modifikovaný nanočásticemi stříbra s limitem detekce  $2,5 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Tento sensor byl použit pro stanovení cholesterolu v kravském krevním séru, přičemž výtěžek se pohyboval v rozmezí 99,6 až 100,7 %. Navíc bylo zjištěno, že je specifický pro cholesterol a snadno oxidovatelné látky jako kyselina askorbová nebo močová neinterferují.

Álvarez-Sala a spol. uvedli [28] biosensor pro stanovení cholesterolu se spektrofotometrickým detektorem. Vzniklý peroxid vodíku za účasti enzymu přeměňuje přítomný methanol na formaldehyd, ten reaguje s acetylacetonem za vzniku žlutého lutidinového barviva, které je detegováno při vlnové délce 405 nm. Relativní směrodatná odchylka tohoto stanovení byla 3,5–6,7 %. Navíc byl sensor úspěšně validován pro stanovení cholesterolu v mateřském mléce.

Zdaleka nejvíce jsou dnes pro stanovení cholesterolu používány instrumentální analytické techniky zahrnující předchozí separaci na HPLC nebo GC, ve spojení s elektrochemickými [31,32], spektrofotometrickými [33] nebo hmotnostními detektory (MS) [34,35]. Tyto metody jsou obecně ve srovnání s biosensory citlivější a přesnější. Navíc jsou díky chromatografickým kolonám více selektivní, a tak lze cholesterol analyzovat odděleně od ostatních, v mnoha případech velmi strukturně podobných sterolů. Kromě toho, že tyto metody jsou ve srovnání s biosensory nákladné na provoz, je také nutná předchozí úprava vzorku hydrolýzou esterů cholesterolu (zmýdelnění) a extrakcí z vodného prostředí biologického vzorku [24].

Benešová a spol. [13] se zabývali stanovením cholesterolu v mléčných výrobcích metodou diferenční pulzní voltametrie (DPV) ve smíšeném prostředí  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  kyseliny chloristé v acetonitrilu jako základního elektrolytu. Na borem dopované diamantové elektrodě poskytoval cholesterol signál při  $+1,5 \text{ V vs. Ag/AgNO}_3$  v acetonitrilu s limitem detekce  $4,9 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$  a na elektrodě ze skelného uhlíku poskytoval signál při  $+1,4 \text{ V vs. Ag/AgNO}_3$  v acetonitrilu s limitem detekce  $6,1 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ . Po extrakci cholesterolu z mléčných výrobků (mléka a smetany) hexanem byl výtěžek kolem 75 %. Tato metoda je rychlejší a levnější alternativou oproti instrumentálním metodám založeným na hmotnostní detekci.

Hojó a spol. [31] popsali analýzu cholesterolu metodou HPLC-ED, kdy jako detektor byla použita elektroda ze skelného uhlíku a detekční potenciál ( $E_{\text{det}}$ ) byl  $+1,9 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ . Mobilní fáze (MF) obsahovala směs acetonitril : 2-propanol (90 : 10, v/v) s přídavkem  $50 \text{ mmol l}^{-1}$  chloristanu lithného. Limit detekce cholesterolu byl  $0,36 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ . Metoda byla použita pro stanovení cholesterolu v lidském krevním séru s výtěžkem přes 90 %.

Kotani a spol. [32] se zabývali stanovením cholesterolu opět metodou HPLC-ED, pro detekci cholesterolu byla použita BDDE při detekčním potenciálu  $+2,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ . V tomto případě tvořil mobilní fázi čistý acetonitril s přídavkem  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  chloristanu lithného. Limit detekce cholesterolu byl  $8 \text{ nmol l}^{-1}$ . V této práci byl cholesterol také stanoven v různých druzích masných výrobků s výtěžkem přes 90 %.

Stanovení cholesterolu technikou HPLC se používá také v kombinaci se spektrofotometrickým detektorem, nejčastěji při vlnové délce kolem 200 nm, protože tato molekula sice obsahuje chromofor, ale ten jen velmi slabě absorbuje ultrafialové (UV) záření [11]. Singh a spol. [33] se zabývali stanovením cholesterolu v lékových kapslích na bázi liposomu. Vlnová délka detekce byla nastavena na 205 nm, separace probíhala na koloně s reverzními fázemi  $\text{C}_8$  a mobilní fáze obsahovala směs  $50 \text{ mmol l}^{-1}$  fosforečnanomonného pufru ( $\text{pH} = 2,7$ ) a methanolu (15 : 85, v/v). Limit detekce cholesterolu byl  $1,3 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ .

Detekce hmotnostním spektrometrem v kombinaci s technikami HPLC [34] nebo GC [35] je používána také, i přes její vysoké pořizovací náklady, a to díky velmi citlivému stanovení cholesterolu. Při použití techniky GC-MS je nutné cholesterol ve většině případů derivatizovat na těkavý produkt [24]. Palmgrém a spol. [34] vyvinuli metodu pro stanovení cholesterolu a jemu podobných sterolů metodou HPLC-MS v buněčných kulturách. Mobilní fáze obsahovala směs methanolu a vody (90 : 10, v/v) a přídavek 0,2 mmol l<sup>-1</sup> octanu amonného, separace byla provedena na koloně s reverzními fázemi C<sub>8</sub>. Pro hmotnostní detekci byla použita chemická ionizace za atmosférického tlaku. Limit stanovení cholesterolu byl vypočten jako 0,45 μmol l<sup>-1</sup>. Lian a spol. [35] se zabývali stanovením cholesterolu metodou GC-MS po extrakci chloroformem z potkaního krevního séra a derivatizací *bis*(trimethylsilyl)trifluoroacetamidem. Pro hmotnostní detekci byla použita elektronová ionizace. Limit detekce cholesterolu u této metody byl 0,04 μmol l<sup>-1</sup>. Al-Balaa a spol. [36] se zabývali stanovením cholesterolu ve vaječných těstovinách metodou DART-TOF-MS, což je přímá analýza v reálném čase hmotnostním detektorem za použití průletového analyzátoru doby letu. Vzorky byly extrahovány organickým rozpouštědlem (hexanem nebo ethanolem). Tato metoda dokázala snížit dobu analýzy až o 87 % ve srovnání s běžnými metodami. Limit detekce cholesterolu byl 0,03 mg g<sup>-1</sup>.

### 1.5.2. Stanovení 7-dehydrocholesterolu

Zjištění zvýšené hodnoty koncentrace 7-dehydrocholesterolu v plodové vodě [7] nebo krevním séru může pomoci k účinné diagnostice Smith-Lemli-Opitzova syndromu [8]. Stejně jako cholesterol lze 7-dehydrocholesterol stanovit běžnými instrumentálními technikami po předchozí separaci pomocí HPLC [37,38] nebo GC [39]. K detekci je používána hmotnostní spektrometrie [39], spektrofotometrická [37,40] nebo elektrochemická detekce [38]. V UV spektru vykazuje 7-dehydrocholesterol charakteristická absorpční maxima při vlnových délkách 271 nm, 282 nm a 294 nm [40]. Hodnoty koncentrací 7-dehydrocholesterolu jsou u zdravých jedinců velmi nízké, v krevní plazmě běžně pod hodnotou 1 μmol l<sup>-1</sup> [41] a v plodové vodě pod hodnotou 0,3 μmol l<sup>-1</sup> [7]. Pokud pacient trpí SLOS, jsou hodnoty koncentrací v krevní plazmě a plodové vodě až tisíckrát vyšší [39].

Stanovením 7-dehydrocholesterolu v lidské kůži elektrochemickou detekcí v kombinaci s HPLC se zabývali Moody a spol. [38]. Byla použita ampérometrická detekce na elektrodě ze skelného uhlíku při detekčním potenciálu + 1,7 V vs. Ag/AgCl. Jako mobilní fáze sloužila směs methanolu a tetrahydrofuranu s přísávkem 17,5 mmol l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve vodě (95 : 1 : 4, v/v/v). Obsah 7-dehydrocholesterolu byl stanoven v rozmezí 12,1 až 80,6 µg g<sup>-1</sup> (vztaženo na hmotnost sušiny).

Honda a spol. v práci [40] představili jednoduchou a rychlou UV spektrofotometrickou metodu pro detekci 7-dehydrocholesterolu v krevní plazmě a kultivovaných kožních fibroblastech u pacientů se SLOS při vlnové délce detekce 282 nm. Tato metoda má tu výhodu, že není potřeba předchozí extrakce 7-dehydrocholesterolu, protože jeho volná i esterifikovaná forma absorbují při stejné vlnové délce. Limit stanovení byl 5,2–13 µmol l<sup>-1</sup>. I když je tento limit vyšší než u jiných metod, pro stanovení 7-dehydrocholesterolu v krevní plazmě u pacientů se SLOS je dostatečná. Rizzo a spol. [37] se zabývali simultánním stanovením 7-dehydrocholesterolu a vitamínu E v krevní plazmě detektorem s diodovým polem po předchozí separaci na HPLC. Mobilní fáze obsahovala čistý methanol, separace probíhala na koloně C<sub>18</sub> a vlnová délka detekce pro 7-dehydrocholesterol byla 282 nm. U zdravých jedinců byla naměřena koncentrace 7-dehydrocholesterolu v krevní plazmě v rozmezí 0,4–0,5 µmol l<sup>-1</sup> a u pacientů trpících SLOS v rozmezí 59–630 µmol l<sup>-1</sup>.

Kelley popsal v práci [39] stanovení 7-dehydrocholesterolu v krevní plazmě i plodové vodě pomocí metody SIM-GC-MS. Vzorky byly hydrolyzovány hydroxidem draselným v ethanolu a extrahovány hexanem. Jako derivatizační činidlo byl použit *bis*(trimethylsilyl)trifluoroacetamid. Detekce byla provedena v modu sledování vybraných iontů (SIM), která zpravidla vede k vyšší citlivosti. V krevní plazmě a plodové vodě byly naměřeny hodnoty 7-dehydrocholesterolu 0,26 µmol l<sup>-1</sup>, respektive 0,02 µmol l<sup>-1</sup> u zdravých jedinců. U pacientů s diagnostikovaným SLOS byly naměřeny hodnoty v krevní plazmě a plodové vodě 385 µmol l<sup>-1</sup>, respektive 16,4 µmol l<sup>-1</sup>.

Gelzo a spol. [42] představili rutinní stanovení 7-dehydrocholesterolu v suché krevní kapce (dried blood spot) metodou plynové chromatografie s plamenově ionizační detekcí po předchozí extrakci hexanem. Výhodou této metody je, že vzorky nemusely být

díky speciální kapilární koloně derivatizovány. Limit detekce 7-dehydrocholesterolu byl  $9,4 \mu\text{mol l}^{-1}$ .

### 1.5.3. Stanovení cholekalciferolu

Stanovení cholekalciferolu je v literatuře popsáno jak s použitím elektrochemických [20,43,44] a spektrofotometrických [45] detekčních metod, tak detekcí hmotnostní spektrometrií [46], a často s předřazeným separačním krokem pomocí HPLC [45] nebo GC [46]. V souvislosti se spektrofotometrickou detekcí je důležité zmínit, že cholekalciferol poskytuje dvě absorpční maxima v UV oblasti při vlnových délkách 221 nm a 266 nm [19].

Nalbanni a spol. [20] vyvinuli metodu voltametrického stanovení cholekalciferolu na elektrodě ze skelného uhlíku ve směsném prostředí ethanolu a vody (1:1, v/v) s přídavkem  $0,05 \text{ mol l}^{-1}$  chloristanu lithného jako základního elektrolytu. Cholekalciferol byl detekován pomocí DPV při potenciálu + 0,9 V vs. Ag/AgCl ( $3 \text{ mol l}^{-1}$  KCl). Limit detekce byl  $0,80 \mu\text{mol l}^{-1}$ . V další práci se Men a spol. [44] zabývali stanovením cholekalciferolu na elektrodě ze skelného uhlíku modifikovanou nanokompozity zlata a paladia. Základní elektrolyt obsahoval směs ethanolu a vody (40 : 60, v/v) s přídavkem  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  chloristanu lithného. Cholekalciferol byl detekován pomocí DPV při potenciálu + 0,8 V vs. Ag/AgCl ( $3 \text{ mol l}^{-1}$  KCl) s limitem detekce  $0,18 \mu\text{mol l}^{-1}$ .

Durovic a spol. [43] vyvinuli metodu pro stanovení cholekalciferolu pomocí square-wave voltametrie na borem dopované diamantové elektrodě. Jako základní elektrolyt byl použit  $20 \text{ mmol l}^{-1}$  Brittonův-Robinsonův pufr o pH = 5,0. Cholekalciferol byl detekován při potenciálu + 1,0 V vs. Ag/AgCl ( $3,5 \text{ mol l}^{-1}$  KCl) s limitem detekce  $0,17 \mu\text{mol l}^{-1}$ .

Perales a spol. [47] se zabývali elektrochemickou detekcí cholekalciferolu po předchozí separaci na HPLC s reverzními fázemi. Mobilní fáze obsahovala směsné prostředí methanolu a vody (92 : 8, v/v) s přídavkem  $2,5 \text{ mmol l}^{-1}$  kyseliny octové a  $2,5 \text{ mmol l}^{-1}$  octanu sodného jako základního elektrolytu. Cholekalciferol byl stanoven ve vzorku kojeneckého mléka po předchozí extrakci hexanem při detekčním potenciálu + 1,45 V. Limit detekce cholekalciferolu byl 48 ng na 100 g vzorku.



Blanco a spol. [45] vyvinuli metodu pro simultánní stanovení vitaminů a provitaminů rozpustných v tucích (včetně cholekalciferolu) pomocí UV detekce po předchozí separaci na HPLC s reverzními fázemi v mléce. Separace probíhala v gradientovém modu za použití dvou mobilních fází, přičemž jedna obsahovala směs methanolu a vody (99 : 1, v/v), a druhá směs methanolu a tetrahydrofuranu (70 : 30, v/v). Vlnové délka detekce cholekalciferolu byla 264 nm, limit detekce 0,3 ng a výtěžkem v mléce kolem 90 %.

Jeong a spol. [46] se zabývali stanovením vitaminů (včetně cholekalciferolu) pomocí GC-MS v kosmetických produktech. Analyty byly derivatizovány *bis*-trimethylsilyltrifluoroacetamid-trichloromethylsilanem a separovány na křemenné kapilární koloně. Detekce probíhala na hmotnostním spektrometru v modu SIM. Limit detekce cholekalciferolu byl 285 pg s výtěžkem ve vlasovém přípravku 78 %.

Diplomová práce [19] se zabývala simultánní detekcí cholesterolu, 7-dehydrocholesterolu a cholekalciferolu v krevní plazmě a séru za pomoci separace na HPLC a elektrochemické detekce na BDDE a elektrodě ze skelného uhlíku. Jelikož se cholesterol oxidoval při příliš vysokém potenciálu, byla jeho odezva zaznamenána pouze na BDDE. Obecně je totiž známé, že elektroda ze skelného uhlíku má ve srovnání s borem dopovaným diamantem zkrácené potenciálové okno v oblasti kladných potenciálů. Separace probíhala na koloně s reverzní fází Hypersil GOLD™ C<sub>18</sub> a mobilní fáze obsahovala směsné prostředí acetonitrilu a vody (95:5, v/v) s přidavkem 50 mmol l<sup>-1</sup> chloristanu sodného. Detekční potenciál byl zvolen na základě hydrodynamických voltamogramů + 1,8 V vs. Ag/AgNO<sub>3</sub> v acetonitrilu. Limit detekce byl pro cholesterol 3,27 μmol l<sup>-1</sup>, pro 7-dehydrocholesterol 4,63 μmol l<sup>-1</sup> a pro cholekalciferol 4,09 μmol l<sup>-1</sup>. Dále byla elektrochemická detekce porovnána se spektrofotometrickou při vlnové délce 200 nm. Bylo zjištěno, že při elektrochemické detekci se biologických vzorcích krevní plazmy a séra objevuje méně interferentů než při spektrofotometrickém stanovení, a je tak selektivnější.

## 1.6. Extrakce lipidů

Extrakce lipidů z biologických vzorků je zásadní pro jejich správné a přesné stanovení. Skládá se z narušení struktury biomakromolekul (zejména lipoproteinů), oddělení lipidů od interferujících složek, rozpuštění lipidů a zejména u cholesterolu

uvolnění do jeho volné formy nenavázané ve formě esteru. Jelikož mezi lipidy řadíme velké množství strukturně rozdílných látek, je náročné provést účinnou extrakci pomocí jednoho kroku. Obvykle se používá směs polárních a nepolárních organických rozpouštědel. Polární rozpouštědlo je schopné narušit strukturu lipoproteinů a zároveň rozpustit polární lipidy, například glycerolfosfolipidy. Nepolární rozpouštědlo dokáže naopak rozpustit neutrální lipidy [48].

Při analýze biologických tkání je také důležitým krokem rozpad složité buněčné membrány živočišných nebo rostlinných buněk. Rozpad těchto složitých struktur usnadňuje proniknutí směsi extrakčního rozpouštědla k lipidům. Toho lze dosáhnout různými mechanickými [49], chemickými [50] nebo enzymatickými [51] předúpravami vzorku.

V současné době jsou pro extrakci lipidů nejvíce používány metody dle Folcha [52] pro živočišné tkáně, a dle Bligh-Dyera [53] pro tělní tekutiny. Obě tyto metody vyvinuté již v 50. letech 20. století používají jako extrakční činidlo směs chloroformu a methanolu. Při extrakci metodou dle Folcha je použita extrakční směs chloroformu, methanolu a vody v poměrech 2:1:0,75 (v/v/v), a objem extrakční směsi je dvacetkrát větší než objem vzorku. Extrakční směs metodou dle Bligh-Dyera obsahuje chloroform, methanol a vodu v poměrech 1:1:0,09 (v/v/v), a objem extrakční směsi je pouze čtyřikrát větší než objem vzorku. Při použití metody dle Folcha se navíc do vodné fáze přidávají soli (CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> nebo NaCl) pro vyčištění extraktů [48].

Protože metody dle Folcha, a Bligh-Dyera používají chlorovaná rozpouštědla, byly v průběhu let tendence tyto metody modifikovat rozpouštědly bezpečnějšími pro životní prostředí. Smedes [54] použil pro extrakci lipidů směs isopropanolu, cyklohexanu a vody v poměrech 8:10:11 (v/v/v). Ve srovnání s Bligh-Dyerovou metodou bylo zjištěno [55], že Smedesova metoda poskytuje nižší výtěžky extrakce v lidském krevním séru zapříčiněné pravděpodobně vysokým podílem lipoproteinů, které mají polární charakter.

Retra a spol. [56] modifikovali Bligh-Dyerovu metodu tím, že přidali do chloroformové fáze extrakční směsi 0,5 % 6 mol l<sup>-1</sup> kyseliny chlorovodíkové. Okyselení extrakční směsi totiž pomáhá narušit iontové interakce nabitých polárních lipidů s lipoproteiny a tím zvýšit účinnost extrakce [48].

## 1.7. Borem dopovaný diamant

Uhlík je výjimečný prvek díky své vlastnosti kovalentně se vázat různě hybridizovanými orbitaly. Díky tomu se může vyskytovat v mnohačetných alotropních modifikacích. V přírodě se vyskytují pouze dvě – grafit a diamant. Zatímco v grafitu má uhlík hybridizaci  $sp^2$ , ve struktuře diamantu má hybridizaci  $sp^3$ , to znamená, že každý atom uhlíku je vázán kovalentní vazbou k dalším čtyřem sousedním atomům. Uhlíky jsou navíc relativně malé a lehké atomy a v kombinaci s již zmíněnou  $sp^3$  hybridizací je zajištěna vysoká tvrdost a tepelná vodivost diamantu [57].

Přírodní diamant nemůže být pro svůj příliš vysoký elektrický odpor použit jako elektrodový materiál. Právě proto musí být dopován některým z vhodných prvků [58]. Mezi takové patří bor, dusík nebo fosfor. Nejčastěji se však k dopaci používán bor, díky vysoké elektrické vodivosti výsledného elektrodového materiálu [57]. Navíc má nízkou aktivační energii (0,37 eV) [59]. Koncentrace boru v diamantu by měla být více jak  $10^{20}$  atomů boru na  $cm^3$  [60]. Dostatečná míra dopace je zásadní pro dosažení dobré vodivosti a rychlého přenosu elektronů [61].

Borem dopované diamantové elektrody jsou široce používány v mnoha oblastech. Kromě elektroanalýzy, o které bude pojednáno v kapitole 1.7.2, se také používají k elektrochemické degradaci organickým polutantů a dezinfekci vody v čistírnách odpadních vod [62]. Mimo to jsou také využívány pro redukci oxidu uhličitého v palivových článcích nebo ke konstrukci zařízení pro ukládání energie [57].

Pokud je v základním elektrolytu nebo mobilní fázi přítomna voda, tak při dosažení dostatečně vysokého kladného potenciálu se začne proud pozadí exponenciálně zvyšovat. Pak dochází na BDDE k oxidaci vody za vzniku hydroxylového radikálu [57] podle rovnice:



### 1.7.1. Příprava BDDE a úprava jejich povrchu

Jedním ze způsobů přípravy borem dopovaných diamantových (BDD) elektrod je metoda HPHT (high pressure high temperature) kde se, jak už název napovídá, za vysokých tlaků a teplot přemění grafit spolu se zárodečným krystalem na syntetický diamant [57].

Mnohem častější metodou přípravy je chemická depozice par (CVD). V reakční komoře obsahující uhlovodíkový plyn (obvykle methan) a vodík, se za současného přidávání diboranu (případně trimethylboranu [59]) jako zdroje boru, na substrátu vytvářejí krystaly diamantu. Tyto plyny musí být aktivovány plazmovými nebo tepelnými procesy [57]. Diamant připravený takovýmto způsobem je díky vodíku přítomném v reakční směsi tzv. H – terminovaný, vykazuje hydrofobní povrch, který je na vzduchu stabilní po několik měsíců, než se začne postupně oxidovat [60].

Při přípravě elektrody metodou CVD se pro růst diamantových filmů používají různé typy substrátů. Nejčastěji je to křemíková destička, mezi jejíž nevýhody patří značná křehkost [62], proto ji nelze v čistém stavu použít pro výrobu velkoplošných elektrod dosahující rozměru až 1 m<sup>2</sup>. V takovém případě jsou použity kovové substráty, jako je titan, niob, tantal nebo molybden [59]. Dále může být jako substrát použit také skelný uhlík [62].

Elektrochemické vlastnosti BDD elektrod jsou výrazně ovlivněny úpravou jejich povrchu [63]. Pokud je H–terminovaný povrch částečně nebo plně oxidován, dojde k navázání skupin obsahující atom kyslíku, a takový povrch se označuje jako O–terminovaný [57]. Jedním ze způsobů, jak dosáhnout takto upraveného povrchu, je anodická oxidace v elektrolytu silné minerální kyseliny, kdy se na elektrodu vloží vyšší kladný aktivační potenciál, než při kterém probíhá anodický rozklad vody (dle rovnice 1) a to více než +2,0 V po dobu několika sekund až minut [64]. Dochází k tvorbě hydroxylových radikálů, díky nimž jsou na povrch elektrody zavedeny kyslík obsahující funkční skupiny (např. alkoholová, etherová, karbonylová). Takový povrch je hydrofilní a má pozitivní elektronovou afinitu [57]. Konverze O–terminovaného povrchu zpět na H–terminovaný povrch elektrody lze katodickou aktivací vložením vysokého záporného potenciálu v kyselém prostředí [59].

Další možností úpravy povrchu BDD elektrod je mechanické leštění suspenzí oxidu hlinitého na leštící podložce. Leštění se provádí po dobu několika sekund až minut, aby se účinně odstranily vrstvy vzniklé pasivací. Bylo zjištěno, že mechanicky leštěné BDD elektrody poskytují rychlejší kinetiku přenosu elektronu redoxního markeru  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  ve srovnání s neleštěným povrchem [65].

### 1.7.2. Využití BDDE v elektroanalýze

Borem dopované diamantové elektrody mají v elektroanalytické chemii důležité zastoupení. Rozsah jejich potenciálového okna je přibližně 3 V (v závislosti na typu rozpouštědla) a mohou být použity v oblasti jak kladných, tak záporných potenciálů [62]. Ovšem v oblasti záporných potenciálů jsou elektrody na bázi rtuti stále nenahraditelné [66]. Šířka potenciálového okna v BDDE se zmenšuje se stoupajícím počtem uhlíků v hybridizaci  $sp^2$  [62]. V porovnání s další velmi často používanou elektrodou, a to ze skelného uhlíku, která má potenciálové okno v oblasti kladných potenciálů kratší, je možné pomocí BDDE stanovit organické látky s relativně vysokým potenciálem oxidace. Například na elektrodě ze skelného uhlíku nelze bez použití specifických podmínek (silná minerální kyselina jako dehydratační činidlo [17]) stanovit cholesterol, oproti tomu na BDDE to díky širokému potenciálovému oknu možné je [19].

Další výhodou BDDE oproti elektrodě ze skelného uhlíku je odolnost vůči pasivaci [66] a adsorpci polárních látek [57], což je výhodné pro použití v environmentálních a dalších komplexních maticích [66]. Navíc má nižší a stabilní proud pozadí, který zlepšuje poměr signálu a šumu, a to vede k nižšímu limitu detekce stanovovaných látek [57]. Díky tvrdosti diamantu jsou BDDE vhodné k použití v extrémních podmínkách, například při vysokém tlaku a teplotě, nebo v koncentrovaných kyselinách a hydroxidech [66].

Diamant je také biokompatibilní, tím nevyvolává nežádoucí odezvu organismů a lze ho tak použít jako biosensor v živých tkáních [66]. V práci [67] byl představen levný a flexibilní elektrodový systém pro sledování změn bioelektrického potenciálu v rostlinách.

## 2. Experimentální část

### 2.1. Použité chemikálie a příprava roztoků

Měření byla prováděna s těmito látkami: cholesterol (Sigma-Aldrich, USA, čistota  $\geq 99\%$ ), 7-dehydrocholesterol (Sigma-Aldrich, USA, čistota  $\geq 95\%$ ), cholekalciferol (Sigma-Aldrich, USA, čistota  $\geq 98\%$ ), acetonitril (Honeywell, Německo, čistota  $\geq 99,9\%$ ), methanol (Honeywell, Německo), chloroform (Penta, Chrudim, ČR), chloristan sodný bezvodý (Fluka, Švýcarsko), dusičnan stříbrný (Fluka, Švýcarsko), chlorid sodný (Lach-Ner, Neratovice, ČR), chlorid draselný (Lach-Ner, Neratovice, ČR), chlorid vápenatý (Penta, Chrudim, ČR), glukosa (Sigma-Aldrich, USA), albumin (Sigma-Aldrich, USA) a močovina (Sigma-Aldrich, USA). Pokud není uvedeno jinak, všechny látky dosahovaly analytické čistoty. Pro přípravu mobilní fáze a extrakční směsi byla použita deionizovaná voda (rezistivita  $18,2\text{ M}\Omega\text{ cm}$ , systém Milli-Q Plus, Millipore, USA).

Byly připraveny zásobní roztoky cholesterolu, 7-dehydrocholesterolu a cholekalciferolu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}\text{ mol l}^{-1}$  v acetonitrilu a v methanolu. Dále byl připraven zásobní roztok chloristanu sodného o koncentraci  $1\text{ mol l}^{-1}$  v acetonitrilu. Mobilní fáze s různým procentuálním zastoupením vody byla připravena smícháním zásobního roztoku chloristanu sodného rozpuštěného v acetonitrilu o výsledné koncentraci v MF  $0,05\text{ mol l}^{-1}$ , příslušného objemu deionizované vody (50 ml v případě 10% mobilní fáze) a doplněním acetonitrilu po rysku 500ml odměrné baňky.

Roztok do referentní nevodné elektrody dle Pleskova byl připraven z chloristanu sodného o koncentraci  $1\text{ mol l}^{-1}$  a dusičnanu stříbrného o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2}\text{ mol l}^{-1}$  v acetonitrilu. Dále byl připraven roztok umělého séra v deionizované vodě, jehož složení je uvedeno v tab. 2.1. Všechny výše uvedené roztoky byly uchovávány v lednici. Vzorky plodové vody byly získány na Ústavu pro péči o matku a dítě v Praze–Podolí.

Tab. 2.1 Složení umělého séra.

složka	$c$ (mmol l <sup>-1</sup> )	složka	$c$ (mmol l <sup>-1</sup> )
KCl	4,5	glukosa	4,7
CaCl <sub>2</sub>	5,0	močovina	2,5
NaCl	145	albumin	0,015

## 2.2. Aparatura

Chromatografická měření (optimalizace a kalibrace) byla prováděna na přístroji LachChrom Elite (Merck-Hitachi, Německo) se softwarem EZChrom Elite a detektorem s diodovým polem (DAD) (L-2450). Měření vzorků umělého séra a plodové vody byla prováděna na přístroji L-7000 (Merck-Hitachi, Německo) se softwarem Chromatography Data Station Software verze 4.0 a UV detekcí (L-7400).

Pro separaci byla použita kolona Hypersil GOLD<sup>TM</sup> C18 (Thermo Scientific), o rozměrech 100×4,6 mm a hrubostí zrn 5 μm. Dávkovaný objem byl při optimalizaci a kalibraci 50 μl, a při analýze vzorků umělého séra a plodové vody 40 μl. Průtoková rychlost mobilní fáze byla u všech měření 1 ml min<sup>-1</sup>. Ampérometrická detekce, která se nacházela za UV detektorem byla prováděna ve wall-jet tříelektrodovém uspořádání a byla řízena ampérometrickým detektorem (Potenciostat ADLC2, Laboratorní přístroje Praha).

Jako pracovní elektrody byly používány dvě borem dopované diamantové elektrody stejného výrobce (BioLogic Science Instruments, Seyssinet-Pariset, Francie) o průměru disku 3 mm, s označením BBDE<sup>1</sup> (měření optimalizace při 6-10 % vody v MF) a BDDE<sup>2</sup> (měření optimalizace při 0-5 % vody v MF, kalibrace, a analýza umělého séra a plodové vody).

Jako referentní elektroda byla používána nevodná elektroda dle Pleskova, která je tvořena stříbrným drátkem ponořeným do roztoku chloristanu sodného ( $c = 1 \text{ mol l}^{-1}$ ) a dusičnanu stříbrného ( $c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ ) v acetonitrilu. Jako pomocná elektroda byl

použit platinový drátek (Elektrochemické detektory, Turnov, ČR). Ke změření absorpčních spekter byl použit spektrofotometr Hewlett Packard 8453 a křemenná kyveta o optické délce 1 cm. Byla použita centrifuga Sorvall ST 8 Centrifuge (Thermo Fischer Scientific).

### **2.3. Pracovní postupy**

Na začátku každého pracovního dne byla BDDE leštěna suspenzí oxidu hlinitého a vody na leštící destičce po dobu 1 minuty. Do detekční cely byl nalit roztok mobilní fáze a byly zapojeny příslušné elektrody k detektoru. Na začátku každého pracovního dne byla kolona promývána mobilní fází po dobu 15 minut pro ustálení proudu pozadí.

Byly připraveny mobilní fáze s různým procentuálním zastoupením vody (0–10 %). Pro každou jednotlivou MF byl zaznamenán hydrodynamický voltamogram pro všechny analyty ( $c = 25 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) v rozsahu měřených potenciálů od + 0,6 V do + 2,0 V po kroku 0,1 V, včetně proudu pozadí. Proud pozadí při daném složení mobilní fáze byl určen jako průměrná hodnota dvou bodů před a za píky. Nástřik byl prováděn dávkovací smyčky se směsí analytů rozpuštěných v acetonitrilu. Frekvence vzorkování proudu byla 5 Hz. Pro každou MF byly také zaznamenány výšky píků analytů spektrofotometrického detektoru o vlnové délce 200 nm.

### **2.4. Extrakce analytů z umělého séra a plodové vody**

Extrakce analytů byla provedena metodou Bligh-Dyera [53]. V případě extrakce z umělého séra bylo do zkumavky napipetováno 1,5 ml roztoku umělého séra (buď bez nebo s přidavkem analytů rozpuštěných v methanolu), 1,875 ml chloroformu a 3,875 ml methanolu. Od objemu methanolu bylo odečteno množství methanolu přítomné v přidavku standardů. Poté byla zkumavka 1 minutu protřepávána na vortexu. Následně bylo do zkumavky napipetováno 1,875 ml chloroformu a 1,875 ml deionizované vody, a zkumavka byla 1 minutu protřepána na vortexu kvůli vzniku difáze. Ze zkumavky byla odebrána spodní chloroformová fáze a při 62,5 °C byla odpařena do sucha pod proudem dusíku. Odparek byl následně rekonstituován v 1 ml mobilní fáze, a tím došlo k zakoncentrování analytu o 50 %.

Extrakce analytů z plodové vody probíhala obdobným způsobem. Kvůli malému množství biologického vzorku bylo do zkumavky napipetováno 0,8 ml vzorku plodové



vody (buď bez nebo s přidavkem standardů rozpuštěných v methanolu), 1 ml chloroformu a 2 ml methanolu a opět byla zkumavka protřepávána 1 minutu na vortexu. V další části extrakce bylo napipetováno 1 ml chloroformu a 1 ml vody. Pro vznik difáze bylo potřeba obsah zkumavky odstředit na centrifuze po dobu 5 minut při 3000 rpm. Další postup byl stejný jako při extrakci z umělého séra. Odparek byl rekonstituován v 0,8 ml mobilní fáze, tj. ve stejném objemu jako byl původní objem vzorku.

Kvantifikace v modelovém roztoku umělého séra a vzorku plodové vody byla provedena metodou přidavku standardu. Standardy rozpuštěné v methanolu byly přidávány přímo do roztoku umělého séra nebo plodové vody – extrakce byla prováděna již s přidavkem.

Do roztoku umělého séra byly přidány standardy analytů pro výslednou koncentraci cholekalciferolu a 7-dehydrocholesterolu  $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ , a cholesterolu –  $c = 50 \mu\text{mol l}^{-1}$ . K těmto modelovým vzorkům vzorků byly přidány celkem 2 přidavky standardu vždy o dvakrát větší koncentraci, tzn. celková koncentrace cholekalciferolu a 7-dehydrocholesterolu v roztoku 1. a 2. přidavku byla  $20 \mu\text{mol l}^{-1}$ , respektive  $30 \mu\text{mol l}^{-1}$ , celková koncentrace cholesterolu v roztoku 1. a 2. přidavku byla  $100 \mu\text{mol l}^{-1}$ , respektive  $150 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Díky zakoncentrování analytů byly výsledné koncentrace ve vzorku a roztocích přidavků v umělém séru tedy  $15, 30$  a  $45 \mu\text{mol l}^{-1}$  pro cholekalciferol a 7-dehydrocholesterol a  $75, 150$  a  $225 \mu\text{mol l}^{-1}$  pro cholesterol.

Vzorek plodové vody byl naspikován standardem cholekalciferolu a 7-dehydrocholesterolu na koncentraci  $14,6 \mu\text{mol l}^{-1}$ . K tomuto naspikovanému vzorku byly poté přidány 2 přidavky všech analytů. Pro cholekalciferol a 7-dehydrocholesterol byla koncentrace 1. a 2. přidavku  $15,8 \mu\text{mol l}^{-1}$ , respektive  $43,1 \mu\text{mol l}^{-1}$ . V případě cholesterolu, který je ve vzorku přirozeně přítomen v koncentraci vyšší než *LOD* a nebyl tudíž spikován, byla koncentrace 1. a 2. přidavku  $69,6 \mu\text{mol l}^{-1}$ , respektive  $139,7 \mu\text{mol l}^{-1}$ .

Extrakce analytů z umělého séra a plodové vody byla provedena vždy třikrát, přičemž každý vzorek byl změřen dvakrát za sebou. Z těchto celkem šesti měření byla vypočtena směrodatná odchylka a chybová úsečka v programu Microsoft Excel. Všechny chybové úsečky v bodových závislostech odpovídají intervalu spolehlivosti na hladině významnosti 0,05.

## 2.5. Vyhodnocení výsledků

Vyhodnocení výšek chromatografických píků ( $I_p$  pro elektrochemickou detekci a  $h_p$  pro spektrofotometrickou detekci) bylo provedeno v příslušných programech spojením minim po stranách píku. Odezvy spektrofotometrického detektoru jsou uváděny v základních jednotkách absorbance AU. Meze detekce byly vypočteny třemi způsoby podle rovnic 2, 3 a 4, kde  $k$  je hodnota směrnice dané kalibrační přímkou,  $s_{10}$  je směrodatná odchylka výšky signálu pro 10 opakovaných měření,  $h$  je výška šumu základní linie a  $s_{ED}$  je standardní chyba úseku kalibrační přímkou. Tyto limity detekce byly následně porovnány.

$$LOD = \frac{3 \cdot s_{10}}{k} \quad (2)$$

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

$$LOD = \frac{3 \cdot s_{ED}}{k} \quad (4)$$

Měření při optimalizaci metody byla provedena třikrát a měření koncentračních závislostí bylo provedeno čtyřikrát, z těchto hodnot byl následně vybrán medián. Směrodatné odchylky a chybové úsečky byly vypočteny v programu Microsoft Excel.

Pro zpracování naměřených dat a tvorbu grafů byly používány programy Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA) a OriginPro 2016 (OriginLab, USA).

### 3. Výsledky a diskuze

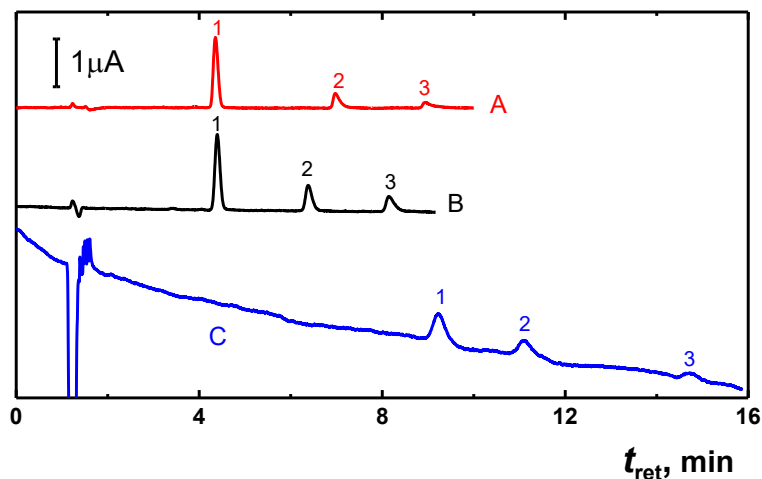
#### 3.1. Vliv obsahu vody v mobilní fázi na retenční faktor analytů

V biologických vzorcích jako krevní plazma a plodová voda se vyskytuje velké množství interferentů, které mohou překrýt signál stanovované látky. Díky úpravě poměru organické složky a vody v mobilní fázi lze měnit retenční časy analytů, a tím umožnit vyhodnocení signálu, pokud by se překrýval se signálem interferentu. Pokud se totiž v mobilní fázi zvyšuje obsah složky, která je více polární než původní složení mobilní fáze, hydrofobní látky jsou zadržovány více na nepolární stacionární fázi. Byl tedy zkoumán vliv obsahu vody v MF na retenci a separaci analytů.

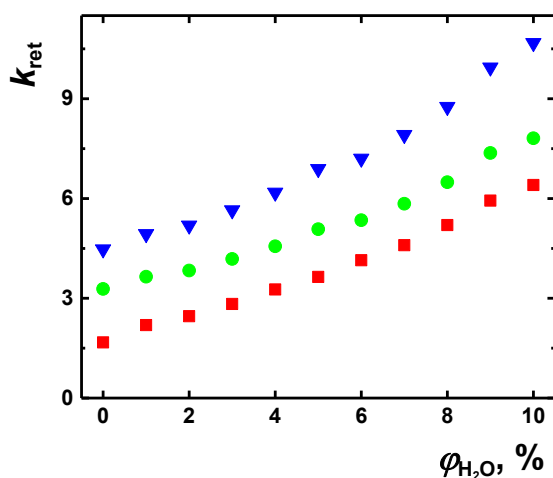
Rozsah zkoumaných obsahů vody v MF byl 0 až 10 % v acetonitrilu s přídavkem 50 mmol l<sup>-1</sup> chloristanu sodného jako základního elektrolytu pro všechny analyty. Na obr. 3.1 jsou zaznamenány ukázkové chromatogramy, s různými obsahy vody v MF, a to 0, 1 a 10 %, při detekčním potenciálu + 1,8 V. Všechny studované látky – cholekalciferol, 7-dehydrocholesterol a cholesterol ( $c = 25 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) byly separovány až na základní linii v celém zkoumaném rozsahu (0-10 %) obsahu vody v mobilní fázi. Dále je z obr. 3.1 vidět, že čím déle je analyt zadržován v koloně, tím se jeho pík více rozmývá a jeho signál zmenšuje.

Při 10 % vody v MF je pík cholesterolu obtížně vyhodnotitelný, a to i při relativně vysoké koncentraci 25  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Z toho důvodu nebyla separace pro vyšší obsah vody než 10 % dále zkoumána.

Na obr 3.2 je zaznamenána závislost retenčního faktoru ( $k_{\text{ret}}$ ) cholekalciferolu, 7-dehydrocholesterolu a cholesterolu na obsahu vody v mobilní fázi ( $\varphi_{\text{H}_2\text{O}}$ ). Jak je z obr. 3.1 a 3.2 vidět, nejprve se z kolony vymýval cholekalciferol, poté 7-dehydrocholesterol a jako poslední cholesterol, což vzhledem k nepolární stacionární fázi souvisí s jeho hydrofobním charakterem. S narůstajícím obsahem vody v MF se zvyšoval retenční faktor analytů, a tím se prodlužovala doba analýzy.



Obr. 3.1 Porovnání chromatogramů (1) cholekalciferolu, (2) 7-dehydrocholesterolu a (3) cholesterolu o koncentraci  $25 \mu\text{mol l}^{-1}$  při obsazích (A) 0; (B) 1 a (C) 10 % vody v MF. Složení mobilní fáze:  $50 \text{ mmol l}^{-1}$   $\text{NaClO}_4$  v acetonitrilu ve směsi s vodou (obsah vody měněn v rozsahu 0–10 %). Detekce elektrochemická na BDDE při  $E_{\text{det}} = +1,8 \text{ V}$ . Průtoková rychlost MF  $1 \text{ ml min}^{-1}$ , dávkovaný objem  $50 \mu\text{l}$ .



Obr. 3.2 Závislost retenčního faktoru  $k_{\text{ret}}$  (■) cholekalciferolu, (●) 7-dehydrocholesterolu a (▼) cholesterolu o koncentraci  $25 \mu\text{mol l}^{-1}$  na obsahu vody v mobilní fázi  $\varphi_{\text{H}_2\text{O}}$  (%). Složení mobilní fáze:  $50 \text{ mmol l}^{-1}$   $\text{NaClO}_4$  v acetonitrilu ve směsi s vodou (obsah vody měněn v rozsahu 0–10 %). Detekce elektrochemická (BDDE) při  $E_{\text{det}} = +1,8 \text{ V}$ . Průtoková rychlost MF  $1 \text{ ml min}^{-1}$ , dávkovaný objem  $50 \mu\text{l}$ .

### 3.2. Optimalizace elektrochemické detekce

Nastavení optimálního detekčního potenciálu je zásadní krok pro stanovení analytů při amperometrických detekcích, kdy je cílem dosáhnout vysokého stupně konverze, a tím zvýšit citlivost měření, zároveň však provádět měření při nízkém proudovém pozadí. Z toho důvodu byly zaznamenány hydrodynamické voltamogramy, což je závislost výšky proudu píku analytu a proudu pozadí na vloženém detekčním potenciálu. Rozsah vkládaných potenciálů je dán šířkou potenciálového okna, které je omezeno reakcemi složek mobilní fáze na konkrétním elektrodovém materiálu. Potenciál byl vkládán bodově s krokem 0,1 V.

Byly zaznamenány hydrodynamické voltamogramy cholekalciferolu, 7-dehydrocholesterolu a cholesterolu ( $c = 25 \mu\text{mol l}^{-1}$ ), každý pro jiné složení mobilní fáze. Mobilní fáze tedy obsahovala 50 mmol  $\text{l}^{-1}$  chloristan sodný v acetonitrilu ve směsi s vodou (obsah vody měněn v rozsah 0–10 %). Vzhledem k tomu, že na BDDE dochází k oxidaci cholekalciferolu a 7-dehydrocholesterolu kolem +0,7 až +0,8 V, a oxidaci cholesterolu kolem +1,4 V [19], byl rozsah vkládaných detekčních potenciálů zvolen od +0,6 V do +2,0 V.

Na obr. 3.3 jsou znázorněny hydrodynamické voltamogramy cholekalciferolu, 7-dehydrocholesterolu a cholesterolu, včetně proudu pozadí, kdy mobilní fáze obsahovala 1, 3, 7 a 9 % vody. Z těchto grafů je patrné, že při vyšším obsahu vody v mobilní fázi dochází k výskytu první rozeznatelné odezvy všech studovaných látek při vyšších kladných detekčních potenciálech, nejvíce je to patrné u cholesterolu. Důvodem je patrně delší zadržení analytů v koloně, tím větší rozmytí chromatografických píků a následná nižší výška píku analytu pro tutéž koncentraci v porovnání s prostředím o menším obsahu vody. Další příčinou je závislost výšky samotných analytů na obsahu vody, kdy např. pro cholesterol výška píku v prostředí s 0,1 mol  $\text{l}^{-1}$  kyseliny chloristé s obsahem vody klesá [13].

Celý výčet hodnot detekčních potenciálů, při kterých došlo k prvním rozeznatelným a nejvyšším odezvám cholekalciferolu, 7-dehydrocholesterolu a cholesterolu v závislosti na obsahu vody v MF je uveden v tab. 3.1.

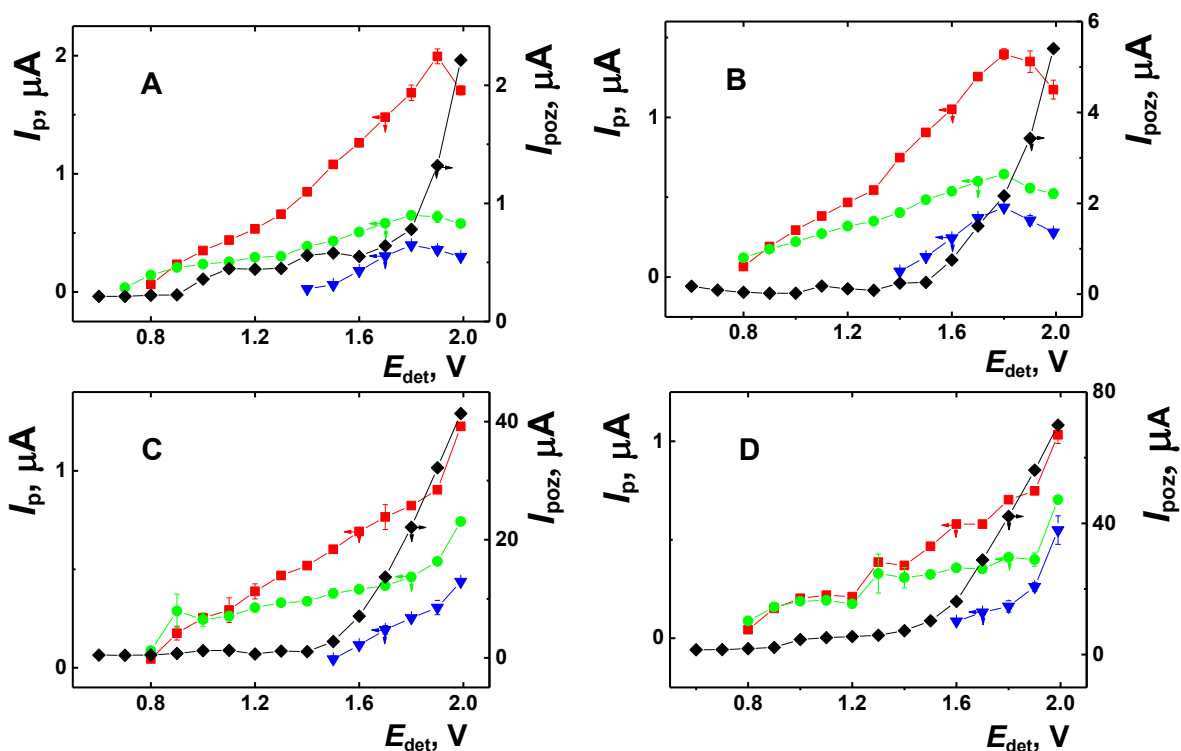
Cholekalciferol lze zaznamenat v rozmezí detekčních potenciálů + 0,8 až + 2,0 V, 7-dehydrocholesterol v rozmezí + 0,7 až + 2,0 V a cholesterol v rozmezí + 1,4 až + 2,0 V, vždy v závislosti na obsahu vody v mobilní fázi. Jak je dále z obr. 3.3 patrné, u všech analytů odezva se zvyšujícím se detekčním potenciálem roste, nejstrměji u cholekalciferolu ve srovnání se 7-dehydrocholesterolem a cholesterolem. Pro obsah vody 0 až 5 % vody v MF je tento nárůst zřejmý do detekčního potenciálu + 1,8 V, dále odezva všech analytů stagnuje až klesá.

Obecně tedy u všech studovaných látek dochází k nejvyšším odezvám kolem detekčních potenciálů + 1,7 až + 2,0 V. Při takto vysokých detekčních potenciálech je však proud výrazně ovlivněn stoupajícím proudem pozadí.

Proud pozadí odpovídá proudu tekoucí pracovní elektrodou, pokud je v kontaktu pouze s mobilní fází. Je logické, že pokud se detekční potenciál vkládaný na elektrodu zvyšuje, roste s ním i proud pozadí, jelikož na pracovní elektrodě dochází k vedlejším reakcím. Obecně to může být rozklad složek mobilní fáze včetně základního elektrolytu. Pokud je tedy v mobilní fázi přítomná voda, tak při dosažení dostatečně vysokého kladného potenciálu se začne proud pozadí exponenciálně zvyšovat. Na BDDE dochází k anodickému rozkladu vody na hydroxylový radikál podle rovnice (1).

Ukázka vlivu obsahu vody na proud pozadí je znázorněna na obr. 3.4. Z těchto grafů je zřejmé, že při zvyšujícím se obsahu vody v mobilní fázi, dochází k nárůstu proudu pozadí při nižších detekčních potenciálech v porovnání s nižšími obsahy vody v MF, a tedy zkrácení potenciálového okna. Důvodem je samozřejmě již zmíněný anodický rozklad vody (rovnice 1). Například pro detekční potenciál + 1,8 V, který byl vybrán jako optimální pro detekci, je rozdíl v proudu pozadí 0,78  $\mu\text{A}$  pro 1 % vody a 42,1  $\mu\text{A}$  pro 9 % vody v MF.

Při vyšším detekčním potenciálu + 1,9 V a + 2,0 V dochází k dalšímu nárůstu proudu pozadí a vyšší nestabilitě základní linie, zároveň není nárůst signálu analytů již výrazný. Poměr signál analytu / proud pozadí tedy klesá, například pro cholekalciferol je pro 9 % vody v MF 0,016 při  $E_{\text{det}} + 1,8 \text{ V}$  a 0,014 při  $E_{\text{det}} + 2,0 \text{ V}$ .

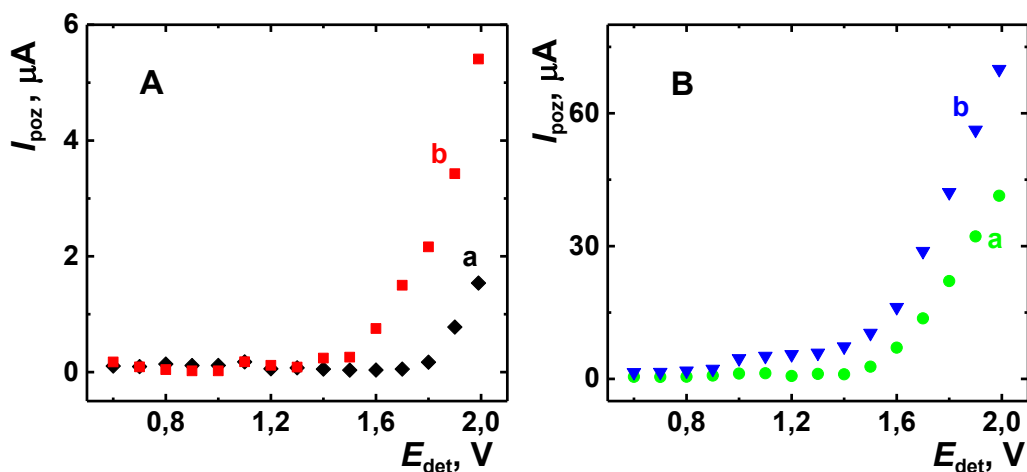


Obr. 3.3 Závislost výšky proudu píku  $I_p$  (■) cholecalciferolu, (●) 7-dehydrocholesterolu a (▼) cholesterolu o koncentraci  $25 \mu\text{mol l}^{-1}$  a (◆) proudu pozadí  $I_{poz}$  na vloženém detekčním potenciálu  $E_{det}$  při (A) 1; (B) 3; (C) 7 a (D) 9 % vody v MF. Mobilní fáze:  $50 \text{ mmol l}^{-1}$   $\text{NaClO}_4$  v acetonitrilu ve směsi s vodou (obsah vody měněn v rozsahu 0–10 %). Detekce elektrochemická na BDDE, rozsah měřených potenciálů +0,6 V až +2,0 V. Průtoková rychlost MF  $1 \text{ ml min}^{-1}$ , dávkovaný objem  $50 \mu\text{l}$ . Chybové úsečky odpovídají hodnotě směrodatné odchylky pro 3 měření.

Tab. 3.1 Hodnoty detekčních potenciálů, při kterých došlo k první rozeznatelné a nejvyšší odezvě cholekalciferolu (D<sub>3</sub>), 7-dehydrocholesterolu (7-DHC) a cholesterolu (Ch) o koncentracích 25 μmol l<sup>-1</sup> v závislosti na obsahu vody v MF. Detekce elektrochemická na BDDE, dávkovaný objem 50 μl.

$\phi_{\text{H}_2\text{O}}$ (%)	První odezva při $E_{\text{det}}$ (V)			Nejvyšší odezva při $E_{\text{det}}$ (V)		
	D <sub>3</sub>	7-DHC	Ch	D <sub>3</sub>	7-DHC	Ch
0	0,8	0,7	1,6	1,8	1,7	1,7
1	0,8	0,7	1,4	1,9	1,8	1,8
2	0,8	0,8	1,4	1,8	1,8	1,8
3	0,8	0,8	1,4	1,8	1,8	1,8
4	0,8	0,8	1,4	1,8	1,8	1,8
5	0,8	0,8	1,5	1,9	1,9	1,9
6	0,8	0,8	1,5	2,0	2,0	2,0
7	0,8	0,8	1,5	2,0	2,0	2,0
8	0,8	0,8	1,5	2,0	2,0	2,0
9	0,8	0,8	1,6	2,0	2,0	2,0
10	0,9	0,8	1,6	2,0	2,0	2,0





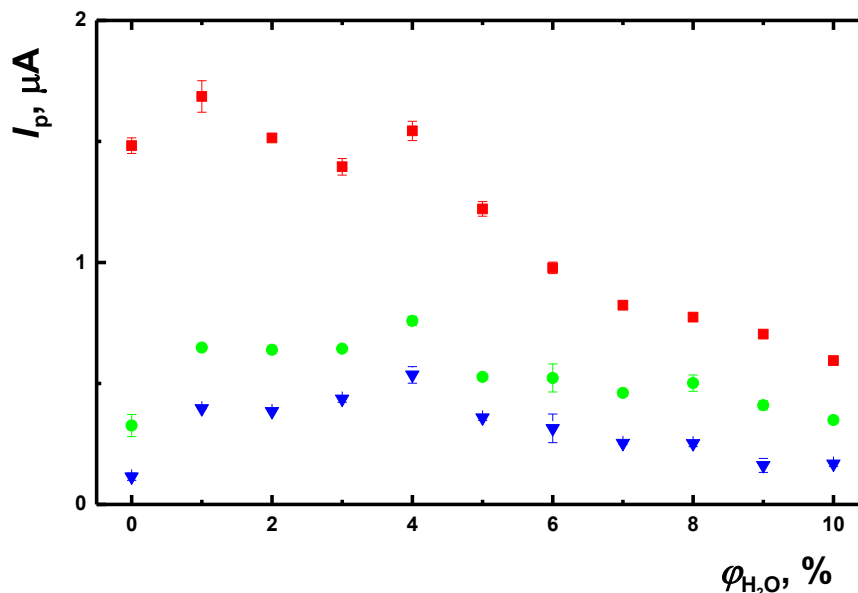
Obr. 3.4 Závislost proudu pozadí  $I_{\text{poz}}$  na vloženém detekčním potenciálu  $E_{\text{det}}$  při (A) (a,  $\blacklozenge$ ) 0 % a (b,  $\blacksquare$ ) 3 %, a (B) (a,  $\bullet$ ) 7 % a (b,  $\blacktriangledown$ ) 9 % vody v MF. Mobilní fáze: 50 mmol l<sup>-1</sup> NaClO<sub>4</sub> v acetonitrilu ve směsi s vodou (obsah vody měněn v rozsahu 0–10 %). Detekce elektrochemická na BDDE, rozsah měřených potenciálů +0,6 V až +2,0 V. Průtoková rychlost MF 1 ml min<sup>-1</sup>.

Pro přehlednost jsou na obr. 3.5 zobrazeny závislosti výšek chromatografických píků cholekalciferolu, 7-dehydrocholesterolu a cholesterolu ( $c = 25 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) pro elektrochemický detektor při optimálním detekčním potenciálu +1,8 V na obsahu vody v mobilní fázi, který byl měněn v rozsahu od 0 do 10 %. Z obr. 3.5 je zřejmé, že odezva cholekalciferolu s rostoucím obsahem vody v mobilní fázi prudce klesá a odezvy 7-dehydrocholesterolu a cholesterolu do 4 % vody v MF fluktuují a od 5 % vody v MF dochází k poklesu. V předchozích pracích [13,14], které se taktéž zabývaly stanovením cholesterolu a 7-dehydrocholesterolu, ovšem voltametricky, bylo zjištěno, že se zvyšujícím se obsahem vody v základním elektrolytu odezva těchto látek klesá i ve vsádkovém uspořádání.

V práci [19] za použití diferenční pulzní voltametrie poskytoval 7-dehydrocholesterol nejvyšší odezvy při 2 a 5 % vody v základním elektrolytu obsahujícím 0,1 mol l<sup>-1</sup> chloristan sodný v acetonitrilu.

I když by mohl být určen optimální obsah vody v mobilní fázi z nejvyšších hodnot proudových odezev při detekčním potenciálu +1,8 V, tak na výběr vhodného složení MF

má také konkrétní matrice, obsahující interferenty, které mohou překrýt signál analytu. Proto bude toto optimální množství vody zvoleno podle retenčních časů studovaných látek a přítomných interferentů.



Obr. 3.5 Závislost výšky proudu píku  $I_p$  (■) cholecalciferolu, (●) 7-dehydrocholesterolu a (▼) cholesterolu o koncentracích  $25 \mu\text{mol l}^{-1}$  na obsahu vody  $\phi_{\text{H}_2\text{O}}$  v MF. Obsah mobilní fáze:  $50 \text{ mmol l}^{-1}$   $\text{NaClO}_4$  v acetonitrilu ve směsi s vodou (obsah vody byl měněn v rozsahu 0–10 %). Detekce elektrochemická na BDDE při  $E_{\text{det}} + 1,8 \text{ V}$ . Průtoková rychlost MF  $1 \text{ ml min}^{-1}$ , dávkovaný objem  $50 \mu\text{l}$ . Chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce pro 3 měření.

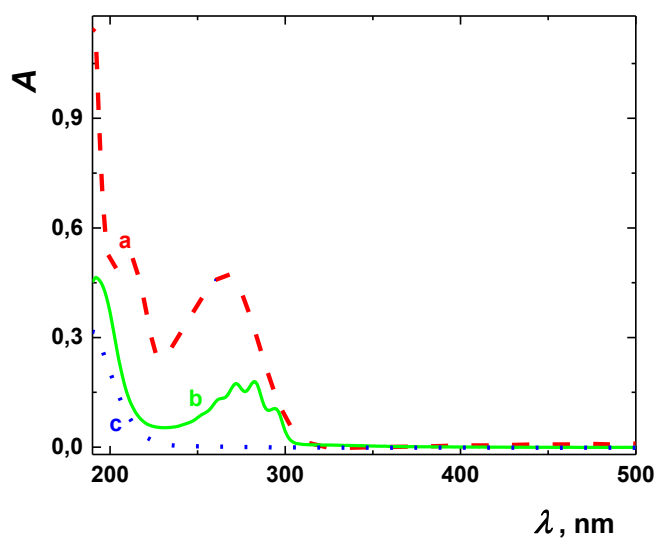
### 3.3. Optimalizace spektrofotometrické detekce

Vliv obsahu vody v mobilní fázi na odezvu studovaných látek (cholecalciferolu, 7-dehydrocholesterolu a cholesterolu) byl zkoumán také pro spektrofotometrický detektor. Vlnová délka detekce byla vybrána na hraně UV spektra při 200 nm, a to zejména kvůli cholesterolu, který absorbuje pouze kolem této oblasti vlnových délek, jak je ukázáno na obr 3.6. Na tomto obrázku jsou znázorněna také UV spektra cholecalciferolu, který poskytuje absorpční maxima při vlnových délkách 213 nm a 267 nm, a 7-dehydrocholesterolu poskytující absorpční maxima při vlnových délkách 272 nm, 283 nm a 295 nm.

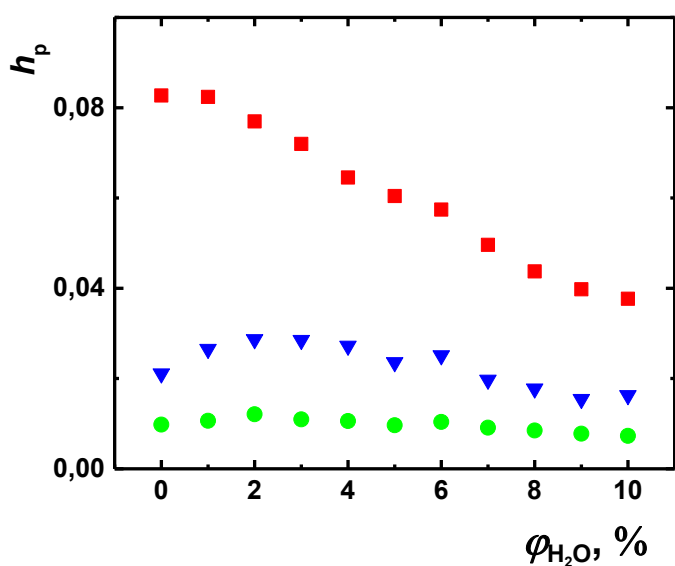
Kvůli porovnání citlivosti stanovení budou koncentrační závislosti cholekalciferolu a 7-dehydrocholesterolu kromě vlnové délky 200 nm, naměřena i při 270 nm, kde poskytují absorpční maxima.

Na obr. 3.7 je znázorněna závislost výšky píků  $h_p$  cholekalciferolu, 7-dehydrocholesterolu a cholesterolu na obsahu vody v mobilní fázi v rozmezí 0 až 10 % měřená HPLC s UV detekcí. Mobilní fáze obsahovala 50 mmol l<sup>-1</sup> NaClO<sub>4</sub> v acetonitrilu ve směsi s vodou (obsah vody měněn v rozmezí 0 až 10 %). Koncentrace studovaných látek byla 25 μmol l<sup>-1</sup>.

V souladu s absorpčními spektry (obr. 3.6) poskytuje cholekalciferol nejvyšší odezvu, to je dáno i faktem, že eluuje z kolony jako první a jeho pík se tedy nejméně rozmývá. Při zvyšujícím se obsahu vody v MF odezva cholekalciferolu prudce klesala. Nejvyšší odezva cholesterolu byla zaznamenána při 2 a 3 % vody v MF, při více jak 4% obsahu vody v MF jeho odezva taktéž klesala. 7-dehydrocholesterol poskytoval při vlnové délce detekce 200 nm ve srovnání s cholekalciferolem a cholesterolom nejmenší odezvy absorbance. Nejvyšší odezvy poskytoval při 2 % vody v MF. Od 7 % vody jeho odezva klesala stejně jako u cholesterolu a cholekalciferolu.



Obr. 3.6 Absorpční spektra (a,-- ) cholekalciferolu, (b,-- ) 7-dehydrocholesterolu a (c,...) cholesterolu o koncentraci 25 μmol l<sup>-1</sup> v acetonitrilu. Rozsah vlnových délek 190 až 500 nm. Zaznamenáno v křemenné kyvetě o optické délce 1 cm.



Obr. 3.7 Závislost výšky píku  $h_p$  (■) cholekalciferolu, (●) 7-dehydrocholesterolu a (▼) cholesterolu o koncentraci  $25 \mu\text{mol l}^{-1}$  na obsahu vody  $\varphi_{\text{H}_2\text{O}}$  v MF. Obsah mobilní fáze:  $50 \text{ mmol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$  v acetonitrilu ve směsi s vodou (obsah vody měněn v rozmezí 0–10 %). Spektrofotometrická detekce při vlnové délce 200 nm. Průtoková rychlost MF  $1 \text{ ml min}^{-1}$ , dávkovaný objem  $50 \mu\text{l}$ .

### 3.4. Koncentrační závislost analytů

Koncentrační závislost cholekalciferolu, 7-dehydrocholesterolu a cholesterolu byla naměřena v prostředí mobilní fáze obsahující  $50 \text{ mmol l}^{-1}$  chloristan sodný v acetonitrilu ve směsi s vodou (95:5, v/v). Toto složení mobilní fáze bylo vybráno jako kompromis mezi dostatečně vysokými odezvami analytů a delšími retenčními časy. Pro elektrochemickou detekci byl zvolen na základě hydrodynamických voltamogramů optimální detekční potenciál  $+1,8 \text{ V}$ . Pro spektrofotometrickou detekci byla použita vlnová délka detekce 200 nm a 270 nm.

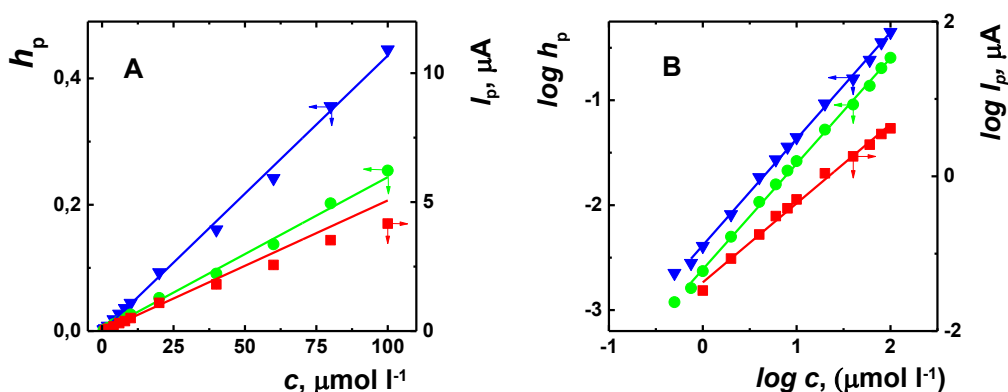
Parametry koncentračních závislostí, včetně hodnot  $LOD$  jsou shrnuty v tab. 3.2. Grafy koncentračních závislostí všech studovaných látek obsahují kromě (A) závislosti výšky píku na koncentraci se směrodatnými odchylkami pro 4 měření, také (B) závislost

logaritmu výšky píku na logaritmu koncentrace pro názornější znázornění celého měřeného koncentračního rozsahu.

Byly porovnány limity detekce (tab. 3.2) vypočteny třemi různými způsoby. První limit detekce označený v této práci jako  $LOD^A$  byl vypočten z deseti opakovaných měření nejnižší koncentrace analytu. Tento způsob je častý například pro voltametrická měření. V HPLC je jeho nevýhodou značná časová náročnost zejména u dlouhých separací. Druhý limit detekce označený jako  $LOD^B$  byl vypočten ze standardní chyby úseku přímky koncentrační závislosti a třetí limit detekce označený jako  $LOD^C$  z výšky šumu pozadí používaný často u chromatografických technik. Přesné způsoby výpočtů  $LOD$  jsou uvedeny v kapitole 2.5.

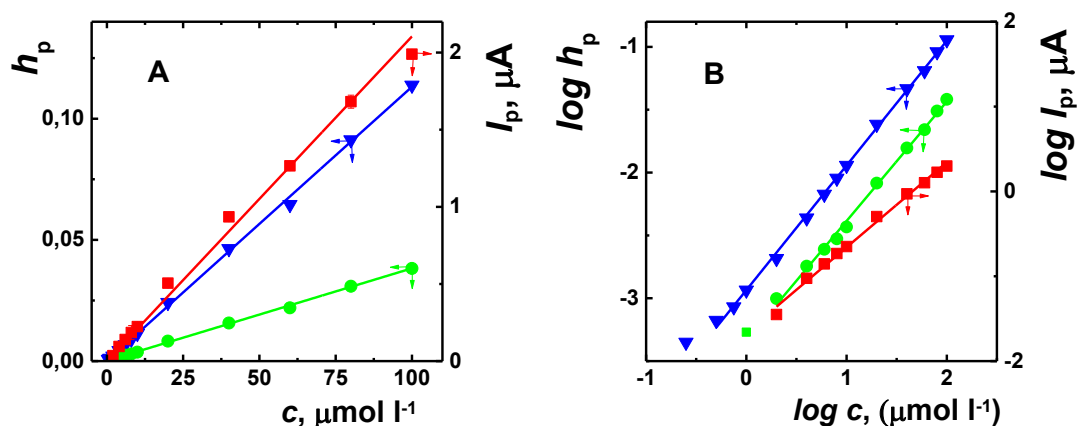
Z tab. 3.2 je zřejmé, že limity detekce se značně liší a nejméně hodnoty vzhledem k nejnižší změřené koncentraci LDR poskytuje třetí uvedený způsob výpočtu, a to z výšky šumu pozadí. Proto byla tato hodnota dále diskutována při hodnocení koncentračních závislostí analytů.

Byla porovnávána koncentrační závislost cholekalciferolu naměřená pro elektrochemický detektor při  $E_{det} + 1,8$  V v rozsahu koncentrací  $1-100 \mu\text{mol l}^{-1}$  a pro spektrofotometrický detektor při  $\lambda_{det}$  200 nm a 270 nm v rozsahu koncentrací  $0,25-100 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Grafy koncentrační závislosti cholekalciferolu jsou uvedené na obr. 3.8. Koncentrační závislost byla pro elektrochemický detektor lineární v celém rozsahu měřených koncentrací, naopak pro obě vlnové délky spektrofotometrické detekce byla lineární v rozsahu  $0,5-100 \mu\text{mol l}^{-1}$  jak ukazuje obr. 3.8B. Nejvyšší citlivost, tedy největší hodnotu směrnice koncentrační závislosti vykazuje cholekalciferol pro spektrofotometrickou detekci při  $\lambda_{det}$  270 nm, oproti detekci při  $\lambda_{det}$  200 nm. Směrnice stanovené při elektrochemické a spektrofotometrické detekci nejde navzájem porovnat kvůli rozdílným jednotkám, z vypočtených hodnot limitů detekce je však zřejmé, že elektrochemická detekce poskytuje vyšší hodnoty  $LOD$  přibližně o řád než spektrofotometrická detekce při  $\lambda_{det}$  270 nm.



Obr. 3.8 (A) Koncentrační závislost a (B) logaritmičká koncentrační závislost cholekalciferolu v prostředí mobilní fáze o složení: 50 mmol l<sup>-1</sup> NaClO<sub>4</sub> v acetonitrilu ve směsi s vodou (95:5, v/v). Detekce spektrofotometrická o vlnových délkách detekce (●) 200 nm a (▼) 270 nm a (■) elektrochemická detekce (BDDE) o detekčním potenciálu + 1,8 V. Průtoková rychlost MF 1 ml min<sup>-1</sup>, dávkovaný objem 50  $\mu\text{l}$ . Chybové úsečky odpovídají hodnotě směrodatné odchylky pro 4 měření.

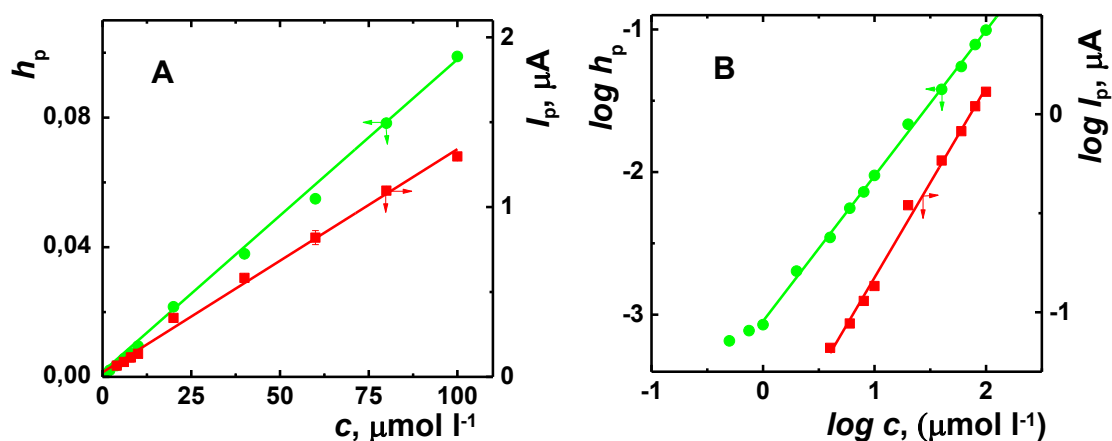
Koncentrační závislost 7-dehydrocholesterolu byla naměřena pro elektrochemický detektor při  $E_{\text{det}} + 1,8 \text{ V}$  v rozsahu koncentrací 2–100  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , pro spektrofotometrický detektor při  $\lambda_{\text{det}} 200 \text{ nm}$  v rozsahu koncentrací 1–100  $\mu\text{mol l}^{-1}$  a  $\lambda_{\text{det}} 270 \text{ nm}$  v rozsahu koncentrací 0,25–100  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Grafy koncentrační závislosti 7-dehydrocholesterolu jsou uvedené na obr. 3.9. Koncentrační závislost pro byla pro elektrochemický detektor lineární v celém rozsahu měřených koncentrací, pro spektrofotometrickou detekci při  $\lambda_{\text{det}} 200 \text{ nm}$  byla lineární v rozsahu 2–100  $\mu\text{mol l}^{-1}$  a při  $\lambda_{\text{det}} 270 \text{ nm}$  byla lineární v rozsahu 0,5–100  $\mu\text{mol l}^{-1}$  jak ukazuje obr. 3.9B. Vyšší citlivost, tedy hodnotu směrnice vykazuje 7-dehydrocholesterol pro spektrofotometrickou detekci při  $\lambda_{\text{det}} 270 \text{ nm}$ , a to přibližně třikrát větší oproti  $\lambda_{\text{det}} 200 \text{ nm}$ . U cholekalciferolu byla tato směrnice přibližně jen dvakrát větší. Nižší limity detekce vykazuje opět detekce spektrofotometrická ve srovnání s elektrochemickou, rozdíly však nejsou tak výrazné jako u cholekalciferolu.



Obr. 3.9 (A) Koncentrační závislost a (B) logaritmická koncentrační závislost 7-dehydrocholesterolu v prostředí mobilní fáze o složení: 50 mmol  $\text{l}^{-1}$   $\text{NaClO}_4$  v acetonitrilu ve směsi s vodou (95:5, v/v). Detekce spektrofotometrická o vlnových délkách detekce (●) 200 nm a (▼) 270 nm a (■) elektrochemická detekce (BDDE) o detekčním potenciálu + 1,8 V. Průtoková rychlost MF 1 ml  $\text{min}^{-1}$ , dávkovaný objem 50  $\mu\text{l}$ . Chybové úsečky odpovídají hodnotě směrodatné odchylky pro 4 měření.

Limity detekce cholekalciferolu jsou za použití spektrofotometrické detekce podobné jako u jiných metod stanovení popsanych v odborné literatuře – 0,18  $\mu\text{mol l}^{-1}$  [20] a 0,17  $\mu\text{mol l}^{-1}$  [43], za použití elektrochemické detekce je  $LOD$  o něco vyšší. U 7-dehydrocholesterolu byly limity detekce jak pro spektrofotometrickou, tak elektrochemickou detekci nižší přibližně o řád než u metod popsanych v odborné literatuře – 5 až 13  $\mu\text{mol l}^{-1}$  [40] a 9,4  $\mu\text{mol l}^{-1}$  [42]. Na druhou stranu v biologických vzorcích jako krevní plazma a plodová voda se 7-dehydrocholesterol vyskytuje ve velmi nízkých koncentracích, a to pod hodnotou 1  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , respektive 0,3  $\mu\text{mol l}^{-1}$  (kapitola 1.4.2), proto  $LOD$  stanovené v této diplomové práci nejsou dostatečné pro spolehlivou kvantifikaci. Pokud by analyzovaná plodová voda, pocházela od matky pacienta trpící SLOS,  $LOD$  stanovené v této práci by byly dostatečné (koncentrace jsou až tisíckrát vyšší než u zdravého jedince).

Koncentrační závislost cholesterolu byla naměřena pro elektrochemický detektor při  $E_{\text{det}} + 1,8 \text{ V}$  v rozsahu koncentrací  $4\text{--}100 \mu\text{mol l}^{-1}$  a pro spektrofotometrický detektor při pouze při jedné vlnové délce  $\lambda_{\text{det}} 200 \text{ nm}$  v rozsahu koncentrací  $0,5\text{--}100 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Grafy koncentračních závislostí pro oba typy detekce jdou uvedeny na obr. 3.10. Jak je dobře na obr. 3.10B vidět, koncentrační závislost cholesterolu byla pro elektrochemický detektor lineární v celém měřeném rozsahu a pro spektrofotometrický detektor byla lineární v rozsahu  $1\text{--}100 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Nižší limit detekce vykazuje stejně jako u cholekalciferolu a 7-dehydrocholesterolu detekce spektrofotometrická. I přesto jsou obě hodnoty limitů detekce cholesterolu získané v této diplomové práci dostatečné pro stanovení v biologických vzorcích jako krevní plazma nebo plodová voda, kde se koncentrace pohybuje mezi  $1,8$  a  $4,9 \text{ mmol l}^{-1}$  [24], respektive  $300 \mu\text{mol l}^{-1}$  [39].



Obr. 3.10 (A) Koncentrační závislost a (B) logaritmická koncentrační závislost cholesterolu v prostředí mobilní fáze o složení  $50 \text{ mmol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$  v acetonitrilu ve směsi s vodou (95:5, v/v). Detekce (●) spektrofotometrická o vlnové délce detekce  $200 \text{ nm}$  a (■) elektrochemická detekce (BDDE) o detekčním potenciálu  $+1,8 \text{ V}$ . Průtoková rychlost MF  $1 \text{ ml min}^{-1}$ , dávkovaný objem  $50 \mu\text{l}$ . Chybové úsečky odpovídají hodnotě směrodatné odchylky pro 4 měření.



Tab. 3.2 Parametry koncentračních závislostí cholekalciferolu (D<sub>3</sub>), 7-dehydrocholesterolu (7-DHC) a cholesterolu (Ch) pro elektrochemickou (ED) a spektrofotometrickou detekci (UV), a vypočtené hodnoty limitů detekce (*LOD*).

analyt	detekce	Měřený rozsah (μmol l <sup>-1</sup> )	<i>LDR</i> (μmol l <sup>-1</sup> )	Směrnice · 10 <sup>3</sup> (*)	Úsek · 10 <sup>3</sup> (**)	<i>R</i>	<i>LOD</i> <sup>A</sup> (μmol l <sup>-1</sup> )	<i>LOD</i> <sup>B</sup> (μmol l <sup>-1</sup> )	<i>LOD</i> <sup>C</sup> (μmol l <sup>-1</sup> )
<b>D<sub>3</sub></b>	ED + 1,8 V	1–100	1–100	50,7 ± 2,3	-5,80 ± 2,10	0,9912	0,4	1,3	0,6
	UV 200 nm	0,25–100	0,5–100	2,44 ± 0,05	-0,02 ± 0,01	0,9981	0,1	0,3	0,2
	UV 270 nm	0,25–100	0,5–100	4,37 ± 0,07	-0,94±0,29	0,9986	0,1	2,0	0,1
<b>7-DHC</b>	ED + 1,8 V	2–100	2–100	21,0 ± 0,3	13,50 ± 7,70	0,9991	1,8	1,1	1,4
	UV 200 nm	1–100	2–100	0,381 ± 0,004	0,12 ± 0,14	0,9996	1,0	1,1	1,0
	UV 270 nm	0,25–100	0,5–100	1,13 ± 0,10	0,06 ± 0,42	0,9996	0,2	1,1	0,3
<b>Ch</b>	ED + 1,8 V	4–100	4–100	13,2 ± 0,4	26,60 ± 14	0,9965	3,3	3,2	2,3
	UV 200 nm	0,5–100	1–100	0,964 ± 0,013	1,58 ± 0,75	0,9991	0,4	2,3	0,4

\* ED— μA l μmol<sup>-1</sup>; UV—l μmol<sup>-1</sup>;

\*\* ED— μA;

*LOD*<sup>A</sup>—limit detekce vypočtený ze směrodatné odchylky 10 opakovaných měření

*LOD*<sup>B</sup>—limit detekce vypočtený ze standardní chyby úseku

*LOD*<sup>C</sup>—limit detekce vypočtený z výšky šumu pozadí

### 3.5. Stanovení analytů v umělém séru

Po optimalizaci podmínek měření a proměření koncentračních závislostí bylo testováno stanovení cholekalciferolu, 7-dehydrocholesterolu a cholesterolu v modelovém roztoku umělého séra po předchozí extrakci (složení umělého séra a postup extrakce popsány v kapitole 2.1 a 2.4). Obsah mobilní fáze byl identický jako u měření koncentračních závislostí: 50 mmol l<sup>-1</sup> chloristan sodný v acetonitrilu ve směsi s vodou (95:5, v/v).

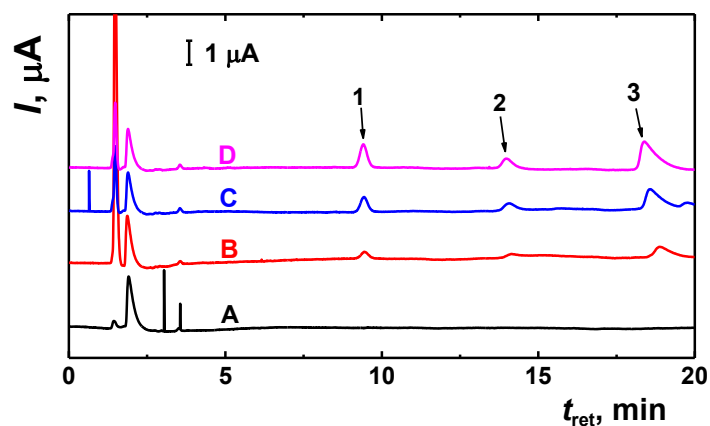
Kvůli zjištění výtěžku extrakce byly do roztoku umělého séra přidány standardy analytů pro dosažení výsledné koncentrace 15 μmol l<sup>-1</sup> pro cholekalciferol a 7-dehydrocholesterol, a 75 μmol l<sup>-1</sup> pro cholesterol. Následně byla s těmito modelovými roztoky umělého séra provedena extrakce ve třech opakováních a odezvy zaznamenané jak elektrochemickou detekcí ( $E_{\text{det}} = +1,8 \text{ V}$ ), tak spektrofotometrickou detekcí ( $\lambda_{\text{det}} = 200 \text{ nm}$ ) byly porovnány s odezvami standardů (o stejné koncentraci) přidávaných do slepého vzorku, tj. již extrahovaného umělého séra. Výsledná hodnota výtěžku byla určena z výtěžků jednotlivých extrakcí jednotlivých analytů pro obě detekce a relativní směrodatné odchylky (RSD) pro tři opakované extrakce jsou uvedeny v tab. 3.3. Nejvyššího výtěžku extrakce je dosaženo u cholesterolu, a to 93,1 % (ED) a 85,6 % (UV). Výtěžek extrakce cholekalciferolu a 7-dehydrocholesterolu dosahovaly podobných hodnot, a to kolem 70 %.

Tab. 3.3 Výtěžek extrakce cholekalciferolu ( $D_3$ ,  $c = 15 \text{ μmol l}^{-1}$ ), 7-dehydrocholesterolu (7-DHC,  $c = 15 \text{ μmol l}^{-1}$ ), a cholesterolu (Ch,  $c = 75 \text{ μmol l}^{-1}$ ) z umělého séra určená ze záznamu elektrochemické ( $E_{\text{det}} = +1,8 \text{ V}$ ) a spektrofotometrické detekce (UV,  $\lambda_{\text{det}} = 200 \text{ nm}$ ) vypočtená jako průměr výtěžků tří extrakcí a opakovatelnost extrakce vyjádřená relativní směrodatnou odchylkou RSD ( $n = 3$ ).

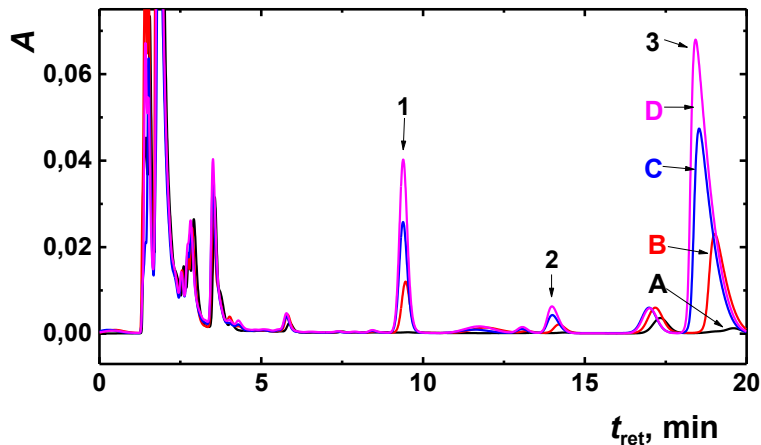
detekce	UV			elektrochemická		
	D <sub>3</sub>	7-DHC	Ch	D <sub>3</sub>	7-DHC	Ch
Výtěžek (%)	73,9	69,6	85,6	67,0	71,9	93,1
RSD (%)	2,5	3,7	2,3	1,6	6,2	8,1

Dále byla ověřena možnost stanovení analytů v umělém séru metodou přidavku standardu pro oba typy detektorů. Koncentrace přidavků standardů jsou uvedeny v kap. 2.4. Na obr. 3.11 zobrazující chromatogramy pro elektrochemickou detekci ( $E_{\text{det}} + 1,8 \text{ V}$ ) je vidět, že modelový roztok umělého séra obsahuje kromě analytů další jednu složku, která je elektroaktivní, má retenční čas přibližně 3,5 min a nepřekrývá signál analytů. Na obr. 3.12 jsou znázorněny chromatogramy pro spektrofotometrickou detekci ( $\lambda_{\text{det}} 200 \text{ nm}$ ). Z těchto záznamů je zřejmé, že tento typ detekce v umělém séru je citlivý pro více složek, obzvláště v prvních 8 minutách separace s dalšími výraznými signály při 12., 13. a 17. minutě, tyto by mohly potenciálně interferovat s analyty za jiných separačních podmínek. I přesto, že extrakcí je část matričních složek ze vzorku odstraněna, je elektrochemická detekce selektivnější než detekce spektrofotometrická.

Koncentrace přidávaných a nalezených koncentrací analytů v umělém séru shrnuje tab. 3.4 včetně parametrů přímek pro metodu přidavku standardu (obr. 3.13). Nalezená koncentrace cholekalciferolu a 7-dehydrocholesterolu dosahuje nižších hodnot ve srovnání s koncentrací přidanou pro oba typy detektoru. Důvodem by mohla být adsorpce části těchto analytů na albumin obsažený v roztoku umělého séra. Nalezená koncentrace cholesterolu ( $c = 75,3 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) při spektrofotometrické detekci odpovídá koncentraci přidané, na rozdíl od elektrochemické detekce, kde je nalezená koncentrace ( $c = 87,3 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) vyšší než přidaná koncentrace.



Obr. 3.11 Chromatogramy po extrakci (1) cholekalciferolu, (2) 7-dehydrocholesterolu a (3) cholesterolu z umělého séra. Elektrochemická detekce (BDDE) při  $E_{\text{det}} = +1,8$  V. Křivka A zobrazuje chromatogram umělého séra po extrakci bez přidavku analytů, chromatogram B zobrazuje vzorek, chromatogramy C a D zobrazují 1. a 2. přidavek standardu. Mobilní fáze: 50 mmol l<sup>-1</sup> chloristan sodný v acetonitrilu ve směsi s vodou (95:5, v/v). Dávkovaný objem 40 μl. Průtoková rychlost MF 1 ml min<sup>-1</sup>.



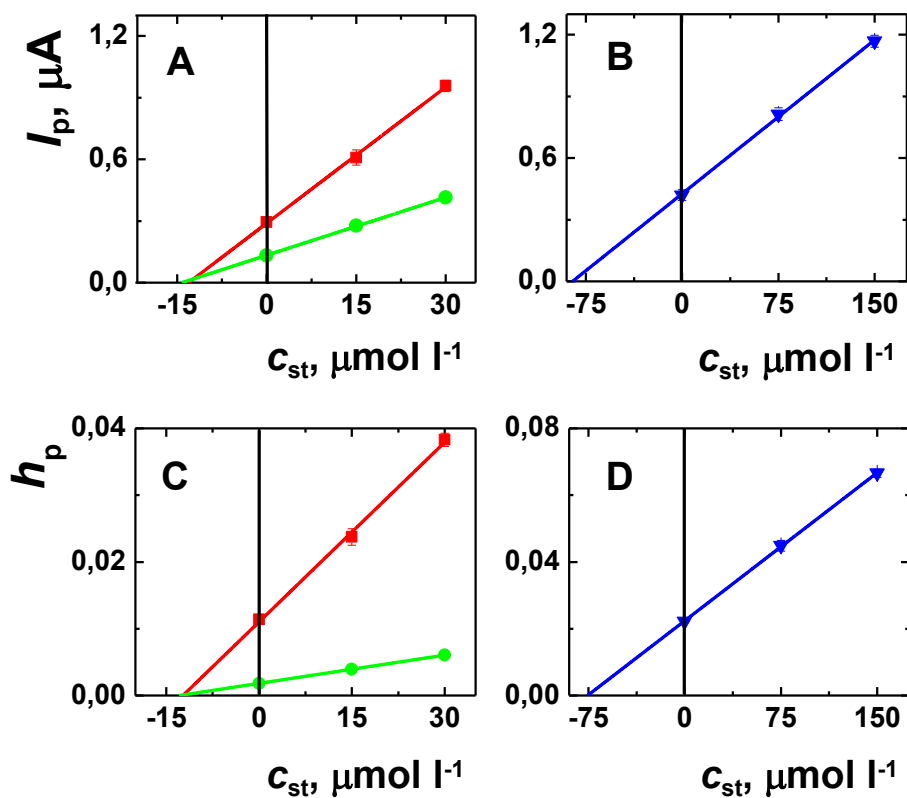
Obr. 3.12 Chromatogramy po extrakci (1) cholekalciferolu, (2) 7-dehydrocholesterolu a (3) cholesterolu z umělého séra. Spektrofotometrická detekce při  $\lambda_{\text{det}} = 200$  nm. Křivka A zobrazuje chromatogram umělého séra po extrakci bez přidavku analytů, chromatogram B zobrazuje vzorek, chromatogramy C a D zobrazují 1. a 2. přidavek standardu. Mobilní fáze: 50 mmol l<sup>-1</sup> chloristan sodný v acetonitrilu ve směsi s vodou (95:5, v/v). Dávkovaný objem 40 μl. Průtoková rychlost MF 1 ml min<sup>-1</sup>.

Tab. 3.4 Parametry přímek pro metodu přidavku standardu cholekalciferolu (D<sub>3</sub>), 7-dehydrocholesterolu (7-DHC) a cholesterolu (Ch) extrahovaných z umělého séra, a hodnoty přidanych a nalezených koncentrací analytů v umělém séru. Detekce elektrochemická (ED,  $E_{\text{det}} = +1,8$  V) a spektrofotometrická (UV,  $\lambda_{\text{det}} = 200$  nm). Mobilní fáze: 50 mmol l<sup>-1</sup> chloristan sodný v acetonitrilu ve směsi s vodou (95:5, v/v).

analyt	detekce	Směrnice · 10 <sup>3</sup> (*)	Úsek · 10 <sup>3</sup> (**)	R	C <sub>přidaná</sub> (μmol l <sup>-1</sup> )	C <sub>nalezená</sub> (μmol l <sup>-1</sup> )	C <sub>rozmezí</sub> (μmol l <sup>-1</sup> )
<b>D<sub>3</sub></b>	<b>ED</b>	22,1 ± 0,7	289 ± 13	0,9995	15,0	13,1	12,9–13,7
	<b>UV</b>	0,896 ± 0,042	11,0 ± 0,8	0,9989	15,0	12,3	11,9–12,6
<b>7-DHC</b>	<b>ED</b>	9,30 ± 0,14	133 ± 3	0,9999	15,0	14,3	14,2–14,4
	<b>UV</b>	0,141 ± 0,004	1,82 ± 0,01	0,9999	15,0	12,9	12,8–12,9
<b>Ch</b>	<b>ED</b>	4,90 ± 0,15	428 ± 15	0,9995	75,0	87,3	86,9–87,7
	<b>UV</b>	0,296 ± 0,004	22,3 ± 0,4	0,9999	75,0	75,3	75,1–75,6

\* ED— μA l μmol<sup>-1</sup>; UV— l μmol<sup>-1</sup>;

\*\* ED— μA;



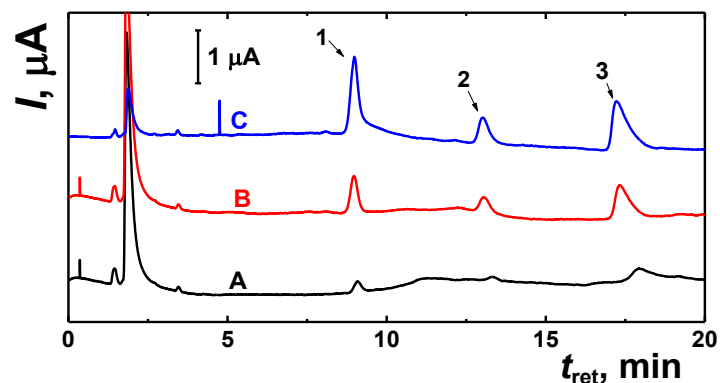
Obr. 3.13 Metoda přidavku standardu (■) cholecalciferolu, (●) 7-dehydrocholesterolu a (▼) cholesterolu v umělém séru. Detekce (A, B) elektrochemická při  $E_{det} = +1,8$  V a (C, D) spektrofotometrická při  $\lambda_{det} = 200$  nm. Mobilní fáze: 50 mmol l<sup>-1</sup> chloristan sodný v acetonitrilu ve směsi s vodou (95:5, v/v). Dávkovaný objem 40  $\mu\text{l}$ . Chybové úsečky odpovídají hodnotě směrodatné odchylky pro 6 měření.

### 3.6. Stanovení analytů v plodové vodě

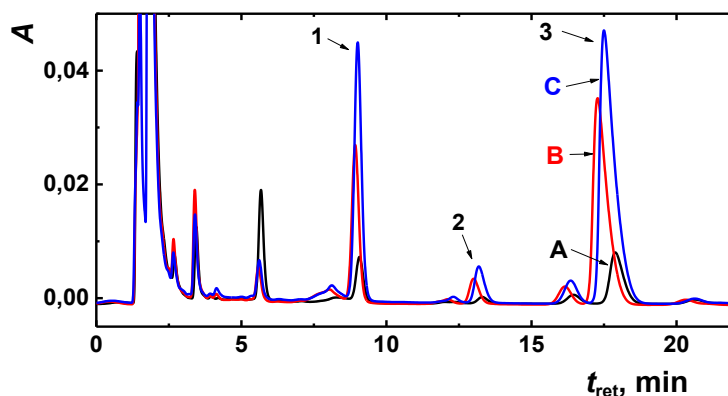
Po stanovení analytů v umělém séru byla ověřena možnost stanovení v biologickém vzorku plodové vody. Kvůli příliš vysokým hodnotám *LOD* cholekalciferolu a 7-dehydrocholesterolu (tab. 3.2) by nebylo možné tyto látky stanovit, a tak byl vzorek naspikován standardy o koncentraci  $14,6 \mu\text{mol l}^{-1}$ , což v případě cholesterolu nutné nebylo, protože je v plodové vodě přirozeně obsažen ve vysokých koncentracích. Analyty byly z plodové vody extrahovány obdobným způsobem jako z umělého séra (postup extrakce kap. 2.4) a bylo použito stejné složení mobilní fáze:  $50 \text{ mmol l}^{-1}$  chloristan sodný v acetonitrilu ve směsi s vodou (95:5, v/v).

Záznamy chromatogramů vzorku plodové vody jsou uvedeny na obr 3.14 pro elektrochemickou detekci a na obr 3.15 pro spektrofotometrickou detekci. Jak je z uvedených chromatogramů vidět, při daném složení mobilní fáze se ani při jednom typu detekce ve vzorku plodové vody nevyskytuje žádná nežádoucí složka, která by interferovala se signály analytů. I přesto chromatogram zaznamenaný se spektrofotometrickou detekcí obsahuje mnohem více potenciálně interferujících složek než chromatogram zaznamenaný elektrochemickou detekcí, a proto tento typ detekce je z pohledu eliminace interferentů v případě analýzy jiných analytů výhodnější.

Koncentrace naspikovaných a nalezených koncentrací, včetně parametrů přímků pro metodu přidavku standardu shrnuje tab. 3.5. Na obr. 3.16 jsou zobrazeny koncentrační závislosti všech analytů pro metodu přidavku standardu pro oba typy detekce. Nalezené koncentrace cholekalciferolu a 7-dehydrocholesterolu jsou o něco menší než koncentrace spíku pro oba typy detektoru podobně jako u vzorku umělého séra. Nalezená koncentrace cholesterolu ve vzorku plodové vody byla  $46,8 \mu\text{mol l}^{-1}$  pro elektrochemickou detekci a  $40,7 \mu\text{mol l}^{-1}$  pro spektrofotometrickou detekci. Tyto získané koncentrace cholesterolu v plodové vodě jsou v porovnání s literaturou menší, než bylo nalezeno u zdravých jedinců metodou GC–MS ( $c = 300 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) [39].



Obr. 3.14 Chromatogramy po extrakci (1) cholekalciferolu, (2) 7-dehydrocholesterolu a (3) cholesterolu z plodové vody. Elektrochemická detekce (BDDE) při  $E_{\text{det}} = + 1,8 \text{ V}$ . Křivka A zobrazuje chromatogram po extrakci analytů z plodové vody se spikem cholekalciferolu a 7-dehydrocholesterolu (bez přidavku cholesterolu), chromatogramy B a C zobrazují 1. a 2. přidavek standardů všech analytů. Mobilní fáze:  $50 \text{ mmol l}^{-1}$  chloristan sodný v acetonitrilu ve směsi s vodou (95:5, v/v). Dávkovaný objem  $40 \mu\text{l}$ . Průtoková rychlost MF  $1 \text{ ml min}^{-1}$ .



Obr. 3.15 Chromatogramy po extrakci (1) cholekalciferolu, (2) 7-dehydrocholesterolu a (3) cholesterolu z plodové vody. Spektrofotometrická detekce při  $\lambda_{\text{det}} = 200 \text{ nm}$ . Křivka A zobrazuje chromatogram po extrakci analytů z plodové vody se spikem cholekalciferolu a 7-dehydrocholesterolu (bez přidavku cholesterolu), chromatogramy B a C zobrazují 1. a 2. přidavek standardů všech analytů. Mobilní fáze:  $50 \text{ mmol l}^{-1}$  chloristan sodný v acetonitrilu ve směsi s vodou (95:5, v/v). Dávkovaný objem  $40 \mu\text{l}$ . Průtoková rychlost MF  $1 \text{ ml min}^{-1}$ .

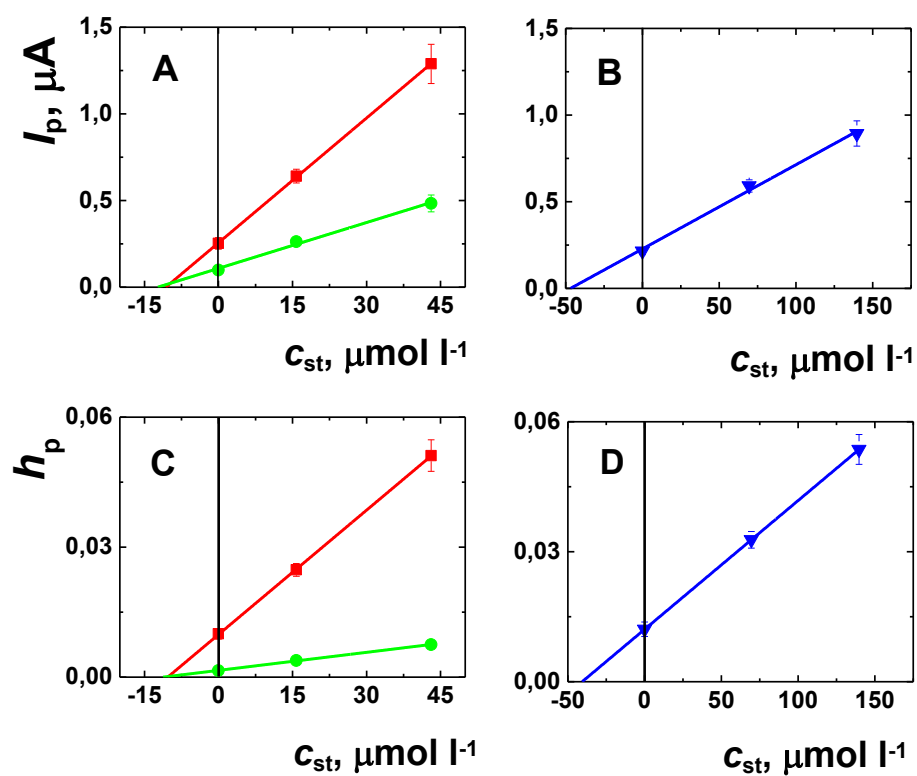


Tab. 3.5 Parametry přímek pro metodu přidavku standardu cholekalciferolu ( $D_3$ ), 7-dehydrocholesterolu (7-DHC) a cholesterolu (Ch) extrahovaných z plodové vody, a hodnoty přidanych a nalezených koncentrací v plodové vodě pro cholekalciferol a 7-dehydrocholesterol, a hodnoty nalezených koncentrací cholesterolu v plodové vodě. Detekce elektrochemická (ED,  $E_{\text{det}} = + 1,8 \text{ V}$ ) a spektrofotometrická (UV,  $\lambda_{\text{det}} = 200 \text{ nm}$ ). Mobilní fáze:  $50 \text{ mmol l}^{-1}$  chloristan sodný v acetonitrilu ve směsi s vodou (95:5, v/v).

analyt	detekce	Směrnice $\cdot 10^3$ (*)	Úsek $\cdot 10^3$ (**)	$R$	$C_{\text{spikovaná}}$ ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	$C_{\text{nalezená}}$ ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	$C_{\text{rozmezí}}$ ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )
<b>D<sub>3</sub></b>	<b>ED</b>	$24,0 \pm 0,2$	$256 \pm 6$	0,9999	14,6	10,7	10,5–10,8
	<b>UV</b>	$0,956 \pm 0,008$	$9,85 \pm 0,21$	0,9999	14,6	10,3	10,2–10,4
<b>7-DHC</b>	<b>ED</b>	$8,82 \pm 0,61$	$109 \pm 16$	0,9976	14,6	12,4	11,3–13,3
	<b>UV</b>	$0,139 \pm 0,002$	$1,56 \pm 0,06$	0,9998	14,6	11,2	11,0–11,8
<b>Ch</b>	<b>ED</b>	$4,86 \pm 0,31$	$228 \pm 28$	0,9979	-	46,8	44,0–49,5
	<b>UV</b>	$0,297 \pm 0,003$	$12,1 \pm 0,1$	1,0000	-	40,7	40,7–40,8

\* ED—  $\mu\text{A l } \mu\text{mol}^{-1}$ ; UV—  $1 \mu\text{mol}^{-1}$ ;

\*\* ED—  $\mu\text{A}$ ;



Obr. 3.16 Metoda přidavku standardu (■) cholekalciferolu, (●) 7-dehydrocholesterolu a (▼) cholesterolu v plodové vodě. Detekce (A, B) elektrochemická při  $E_{det} = +1,8\ V$  a (C, D) spektrofotometrická při  $\lambda_{det} = 200\ nm$ . Mobilní fáze:  $50\ mmol\ l^{-1}$  chloristan sodný v acetonitrilu ve směsi s vodou (95:5, v/v). Dávkovaný objem  $40\ \mu l$ . Chybové úsečky odpovídají hodnotě směrodatné odchylky pro 6 měření.

## 4. Závěr

Tato práce se zabývala možností simultánního stanovení tří biologicky aktivních látek – cholekalciferolu, 7-dehydrocholesterolu a cholesterolu. Určení jejich koncentračních hladin ve vybraných matricích (sérum, plodová voda) může sloužit například pro diagnostiku autosomálně recesivního onemocnění SLOS. Separace analytů byla prováděna pomocí vysokoúčinného kapalinového chromatografu s reverzními fázemi následovaná detekcí na elektrochemickém a spektrofotometrickém detektoru, které byly následně porovnávány. Jako pracovní elektroda byla zvolena BDDE, na které mohl být díky jejímu širokému potenciálovému oknu v anodické oblasti detegován cholesterol.

V první části této práce byla provedena optimalizace metody stanovení – množství vody v mobilní fázi a detekční potenciál elektrochemické detekce. Bylo zjištěno, že pokud se v mobilní fázi zvyšuje procentuální zastoupení vody (oproti acetonitrilu), zvyšuje se retenční faktor všech studovaných látek a v rozsahu obsahů vody (0–10 %) jsou analyty separovány až na základní linii.

Na základě hydrodynamických voltamogramů, které byly zaznamenány pro obsah vody 0–10 % v MF, byl jako optimální detekční potenciál zvolen + 1,8 V. Při vyšších procentech vody v MF byly sice největší odezvy získány při + 1,9 a + 2,0 V, ale byly také zaznamenány mnohem vyšší proudy pozadí zapříčiněné anodickým rozkladem vody na hydroxylový radikál na BDDE.

Ve druhé části této práce byla naměřena koncentrační závislost všech studovaných látek pro elektrochemický detektor při optimálním detekčním potenciálu + 1,8 V a spektrofotometrický detektor o vlnových délkách detekce 200 a 270 nm v prostředí mobilní fáze o složení 50 mmol l<sup>-1</sup> chloristan sodný v acetonitrilu ve směsi s vodou (95:5, v/v). Oba typy spektrofotometrické detekce měly nižší hodnoty *LOD* oproti elektrochemické detekci. V případě cholekalciferolu (*LOD* = 0,6 μmol l<sup>-1</sup>) a 7-dehydrocholesterolu (*LOD* = 1,4 μmol l<sup>-1</sup>) pro elektrochemickou detekci byly hodnoty vyšší, než je potřeba pro spolehlivou kvantifikaci těchto látek v plodové vodě nebo krevní plazmě. Cholesterol dosahoval hodnoty *LOD* 2,3 μmol l<sup>-1</sup>, což vzhledem k jeho vysokým koncentracím ve výše uvedených biologických vzorcích postačuje. Totéž

platí pro spektrofotometrickou detekci cholesterolu ( $LOD = 0,4 \mu\text{mol l}^{-1}$ ). Pro spolehlivou kvantifikaci 7-dehydrocholesterolu pacientů trpících SLOS jsou díky vysokým koncentracím hodnoty  $LOD$  dostatečné pro oba typy detekce jak elektrochemickou ( $LOD = 1,4 \mu\text{mol l}^{-1}$ ), tak spektrofotometrickou ( $1,0 \mu\text{mol l}^{-1}$  při 200 nm a  $0,3 \mu\text{mol l}^{-1}$  při 270 nm).

Ve třetí části této práce byla ověřena možnost simultánního stanovení všech studovaných látek v modelovém roztoku umělého séra a biologického vzorku plodové vody po předchozí extrakci metodou Bligh-Dyera. Výtěžek extrakce byl kolem 90 % pro cholesterol a 70 % pro 7-dehydrocholesterol a cholekalciferol. Byl připraven roztok umělého séra o známé přidané koncentraci analytů. Nalezené koncentrace cholekalciferolu a 7-dehydrocholesterolu byly menší než přidané koncentrace pro oba typy detekce. Přidaná koncentrace cholesterolu při spektrofotometrické detekci odpovídala nalezené, při elektrochemické detekci byla nalezená o něco vyšší.

Z chromatogramů vzorků plodové vody je očividné, že spektrofotometrická detekce zaznamenává odezvy mnoha látek nacházející se v biologickém vzorku, které by mohly potencionálně interferovat s analyty. Elektrochemická detekce je tedy více selektivní, a i přes vyšší limity detekce může být pro jiné analyty výhodnější. Kvůli příliš nízkým koncentracím cholekalciferolu a 7-dehydrocholesterolu nebylo možné tyto látky v plodové vodě stanovit. Cholesterol, který se v plodové vodě přirozeně vyskytuje ve vyšších koncentracích, se nacházel v plodové vodě o koncentraci  $46,8 \mu\text{mol l}^{-1}$  při elektrochemické detekci a o koncentraci  $40,7 \mu\text{mol l}^{-1}$  při spektrofotometrické detekci.

Tato práce ukázala možnost elektrochemické a spektrofotometrické detekce cholesterolu, 7-dehydrocholesterolu a cholekalciferolu pro analýzu séra a plodové vody po HPLC separaci. V dalším výhledu bude nutná optimalizace extrakčního kroku pro vyšší výtěžek a získání správných výsledků.

## 5. Seznam použité literatury

- [1] J. Koolman, K.H. Röhm, Color atlas of biochemistry, 2. vydání, Thieme, Stuttgart, **2005**.
- [2] D.R. Arnold, P.O. Kwiterovich, CHOLESTEROL | Absorption, Function, and Metabolism, in: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, Elsevier, **2003**: pp. 1226–1237.
- [3] V.W. Rodwell, D.D. Bender, K.M. Botham, Harper's Illustrated Biochemistry, 31. vydání, McGraw Hill, **2018**.
- [4] J.M. Risley, Cholesterol Biosynthesis Lanosterol to Cholesterol, Journal of Chemical Education. 79 (**2002**) 377–384.
- [5] D.W. Russell, Cholesterol Biosynthesis and Metabolism, Cardiovascular Drugs and Therapy. 6 (**1992**) 103–110.
- [6] A. Honda, A.K. Batta, G. Salen, G.S. Tint, T.S. Chen, S. Shefer, Screening for Abnormal Cholesterol Biosynthesis in the Smith-Lemli-Opitz Syndrome: Rapid Determination of Plasma 7-Dehydrocholesterol by Ultraviolet Spectrometry, American Journal of Medical Genetics. 68 (**1997**) 288–293.
- [7] J.P. Rossiter, K.J. Hofman, R.I. Kelley, Smith-Lemli-Opitz Syndrome: Prenatal Diagnosis by Quantification of Cholesterol Precursors in Amniotic Fluid, American Journal of Medical Genetics. 56 (**1995**) 272–275.
- [8] F.D. Porter, Smith-Lemli-Opitz syndrome: Pathogenesis, diagnosis and management, European Journal of Human Genetics. 16 (**2008**) 535–541.
- [9] D. Voet, J.G. Voet, C.W. Pratt, Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level, 5. vydání, John Wiley & Sons, New York, **2006**.
- [10] M.F. Holick, Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease, The American Journal of Clinical Nutrition. 80 (**2004**) 1678–1688.

- [11] J. Klouda, J. Barek, K. Nesměrák, K. Schwarzová-Pecková, Non-Enzymatic Electrochemistry in Characterization and Analysis of Steroid Compounds, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 47 (2017) 384–404.
- [12] J. Kowalski, J. Płoszyńska, A. Sobkowiak, J.W. Morzycki, A.Z. Wilczewska, Direct electrochemical acetoxylation of cholesterol at the allylic position, *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 585 (2005) 275–280.
- [13] L. Benešová, J. Klouda, E. Bláhová, K. Nesměrák, P. Kočovský, J. Nádvorníková, P. Barták, J. Skopalová, K. Schwarzová-Pecková, Non-enzymatic electrochemical determination of cholesterol in dairy products on boron-doped diamond electrode, *Food Chemistry*. 393 (2022) 133278.
- [14] J. Klouda, L. Benešová, P. Kočovský, K. Schwarzová-Pecková, Voltammetry of 7-dehydrocholesterol as a new and useful tool for Smith-Lemli-Opitz syndrome diagnosis, *Talanta*. 229 (2021) 122260.
- [15] J.W. Morzycki, A. Sobkowiak, Electrochemical oxidation of cholesterol, *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 11 (2015) 392–402.
- [16] P. Yershova, Vývoj voltametrických metod pro detekci cholesterolu na bórem dopované diamantové elektrodě, *Bakalářská práce, Univerzita Karlova*, 2018.
- [17] E. Bláhová, Voltametrické chování cholesterolu na elektrodě ze skelného uhlíku, *Bakalářská práce, Univerzita Karlova*, 2019.
- [18] L. Benešová, Vývoj elektroanalytických metod pro detekci cholesterolu a 7-dehydrocholesterolu, *Diplomová práce, Univerzita Karlova*, 2018.
- [19] K. Paskerová, Elektrochemická analýza cholesterolu, 7-dehydrocholesterolu a cholecalciferolu, *Diplomová práce, Univerzita Palackého*, 2021.
- [20] A. Nallbani, J. Holubová, M. Sýs, T. Arbnesi, K. Vytřas, Voltammetric determination of cholecalciferol at glassy carbon electrode performed in water ethanol mixture, *Potravinářstvo Slovak Journal of Food Sciences*. 12 (2018) 166–172.
- [21] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cholesterol>, staženo 13.2.2023

- [22] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7-dehydrocholesterol>,  
staženo 23.2.2023
- [23] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/cholecalciferol>, staženo 13.2.2023
- [24] L.H. Li, E.P. Dutkiewicz, Y.C. Huang, H.B. Zhou, C.C. Hsu, Analytical methods for cholesterol quantification, *Journal of Food and Drug Analysis*. 27 (2019) 375–386.
- [25] L.L. Abell, B.B. Levy, B.B. Brodie, F.E. Kendall, A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity, *Journal of Biological Chemistry*. 195 (1952) 357–366.
- [26] Y. Huang, J. Tan, L. Cui, Z. Zhou, S. Zhou, Z. Zhang, R. Zheng, Y. Xue, M. Zhang, S. Li, N. Zhu, J. Liang, G. Li, L. Zhong, Y. Zhao, Graphene and Au NPs co-mediated enzymatic silver deposition for the ultrasensitive electrochemical detection of cholesterol, *Biosensors and Bioelectronics*. 102 (2018) 560–567.
- [27] S. Nantaphol, O. Chailapakul, W. Siangproh, Sensitive and selective electrochemical sensor using silver nanoparticles modified glassy carbon electrode for determination of cholesterol in bovine serum, *Sensors and Actuators B: Chemical*. 207 (2015) 193–198.
- [28] A. Álvarez-Sala, G. Garcia-Llatas, R. Barberá, M.J. Lagarda, Determination of cholesterol in human milk: An alternative to chromatographic methods, *Nutricion Hospitalaria*. 32 (2015) 1535–1540.
- [29] V. Narwal, R. Deswal, B. Batra, V. Kalra, R. Hooda, M. Sharma, J.S. Rana, Cholesterol biosensors: A review, *Steroids*. 143 (2019) 6–17.
- [30] J. Maclachlan, A.T.L. Wotherspoon, R.O. Ansell, C.J.W. Brooks, Cholesterol oxidase: sources, physical properties and analytical applications, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 72 (2000) 169–195.
- [31] K. Hojo, H. Hakamata, A. Ito, A. Kotani, C. Furukawa, Y.Y. Hosokawa, F. Kusu, Determination of total cholesterol in serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Journal of Chromatography A*. 1166 (2007) 135–141.

- [32] A. Kotani, H. Hakamata, N. Nakayama, F. Kusu, Picomole level determination of cholesterol by HPLC with electrochemical detection using boron-doped diamond electrode after performance assessment based on the FUMI theory, *Electroanalysis*. 23 (2011) 2709–2715.
- [33] R. Singh, M. Ajagbe, S. Bhamidipati, Z. Ahmad, I. Ahmad, 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, *Journal of Chromatography A*. 1073 (2005) 347–353.
- [34] J.J. Palmgrén, A. Töyräs, T. Mauriala, J. Mönkkönen, S. Auriola, Quantitative determination of cholesterol, sitosterol, and sitostanol in cultured Caco-2 cells by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 821 (2005) 144–152.
- [35] K. Lian, P. Zhang, W. Wang, Ti. Dai, L. Li, Determination of total cholesterol in serum by gas chromatography-mass spectrometry, *Asian Journal of Chemistry*. 26 (2014) 2646–2648.
- [36] D. Al-Balaa, A. Rajchl, A. Grégrová, R. Ševčík, H. Čížková, DART mass spectrometry for rapid screening and quantitative determination of cholesterol in egg pasta, *Journal of Mass Spectrometry*. 49 (2014) 911–917.
- [37] C. Rizzo, C. Dionisi-Vici, M. D’ippoliti, F. Fina, G. Sabetta, G. Federici, A simple and rapid HPLC method for simultaneous determination of plasma 7-dehydrocholesterol and vitamin E: its application in Smith-Lemli-Opitz patients, *Clinica Chimica Acta*. 291 (2000) 97–102.
- [38] J.P. Moody, C.A. Hljmphries, S.M. Allan, C.R. Paterson, Determination of 7-dehydrocholesterol in human skin by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography*. 530 (1990) 19–27.
- [39] R.I. Kelley, Diagnosis of Smith-Lemli-Opitz syndrome by gas chromatography/mass spectrometry of 7-dehydrocholesterol in plasma, amniotic fluid and cultured skin fibroblasts, *Clinica Chimica Acta*. 236 (1995) 45–58.



- [40] A. Honda, A.K. Batta, G. Salen, G.S. Tint, T.S. Chen, S. Shefer, Screening for Abnormal Cholesterol Biosynthesis in the Smith-Lemli-Opitz Syndrome: Rapid Determination of Plasma 7-Dehydrocholesterol by Ultraviolet Spectrometry, *American Journal of Medical Genetics*. 68 (1997) 288–293.
- [41] B. Ruan, W.K. Wilson, J. Pang, N. Gerst, F.D. Pinkerton, J. Tsai, R.I. Kelley, F.G. Whitby, D.M. Milewicz, J. Garbern, G.J. Schroepfer, W.K. Wilson, J. Pang, N. Gerst, F.D. Pinkerton, J. Tsai, R.I. Kelley, F.G. Whitby, D.M. Milewicz, J. Garbern, G.J. Schroepfer, J. Sterols, Sterols in blood of normal and Smith-Lemli-Opitz subjects The overall findings advance the understanding of SLOS and provide a methodological model for studying other metabolic disorders of cholesterol synthesis, *Journal of Lipid Research*. 42 (2001) 799–812.
- [42] M. Gelzo, S. Clericuzio, R. Barone, O. D’Apolito, A. Dello Russo, G. Corso, A routine method for cholesterol and 7-dehydrocholesterol analysis in dried blood spot by GC-FID to diagnose the Smith-Lemli-Opitz syndrome, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 907 (2012) 154–158.
- [43] A. Đurović, Z. Stojanović, S. Kravić, J. Kos, L. Richtera, Electrochemical Determination of Vitamin D3 in Pharmaceutical Products by Using Boron Doped Diamond Electrode, *Electroanalysis*. 32 (2020) 741–748.
- [44] K. Men, Y. Chen, J. Liu, D. Wei, Electrochemical detection of vitamin D2 and D3 Based on a AuPd modified glassy carbon electrode, *International Journal of Electrochemical Science*. 12 (2017) 9555–9564.
- [45] D. Blanco, M.P. Fernández, M.D. Gutiérrez, Simultaneous determination of fat-soluble vitamins and provitamins in dairy products by liquid chromatography with a narrow-bore column, *Analyst*. 125 (2000) 427–431.
- [46] H.J. Jeong, M.H. Lee, K.W. Hur, J.W. Kim, Determination of panthenol, cholecalciferol and tocopherol in cosmetic products by gas chromatography-mass spectrometry in SIM mode, *International Journal of Cosmetic Science*. 21 (1999) 41–50.

- [47] S. Perales, M.M. Delgado, A. Alegría, R. Barberá, R. Farré, Liquid chromatographic determination of Vitamin D3 in infant formulas and fortified milk, *Analytica Chimica Acta*. 543 (2005) 58–63.
- [48] R.K. Saini, P. Prasad, X. Shang, Y.S. Keum, Advances in lipid extraction methods—a review, *Journal of Molecular Sciences*. 22 (2021) 13643.
- [49] L. Drévillon, M. Koubaa, J.M. Nicaud, E. Vorobiev, Cell disruption pre-treatments towards an effective recovery of oil from *Yarrowia lipolytica* oleaginous yeast, *Biomass Bioenergy*. 128 (2019) 105320.
- [50] Q. Wang, K. Oshita, M. Takaoka, K. Shiota, Influence of water content and cell disruption on lipid extraction using subcritical dimethyl ether in wet microalgae, *Bioresource Technology*. 329 (2021) 101353.
- [51] G. Jin, F. Yang, C. Hu, H. Shen, Z.K. Zhao, Enzyme-assisted extraction of lipids directly from the culture of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*, *Bioresource Technology*. 111 (2012) 378–382.
- [52] J. Folch, M. Lees, G.H. Sloane, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *Journal of Biological Chemistry*. 221 (1957) 497–509.
- [53] E.G. Bligh, W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37 (1959) 911–917.
- [54] F. Smedes, Determination of total lipid using non-chlorinated solvents, *Analyst*. 124 (1999) 1711–1718.
- [55] P. Manirakiza, A. Covaci, P. Schepens, Comparative Study on Total Lipid Determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer Extraction Methods, *Journal of Food Composition and Analysis*. 14 (2001) 93–100.
- [56] K. Retra, O.B. Bleijerveld, R.A. van Gestel, A.G.M. Tielens, J.J. van Hellemond, J.F. Brouwers, A simple and universal method for the separation and identification of phospholipid molecular species, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 22 (2008) 1853–1862.

- [57] N. Yang, S. Yu, J. V. MacPherson, Y. Einaga, H. Zhao, G. Zhao, G.M. Swain, X. Jiang, Conductive diamond: Synthesis, properties, and electrochemical applications, *Chemical Society Reviews*. 48 (2019) 157–204.
- [58] J.H.T. Luong, K.B. Male, J.D. Glennon, Boron-doped diamond electrode: Synthesis, characterization, functionalization and analytical applications, *Analyst*. 134 (2009) 1965–1979.
- [59] A. Kraft, Doped Diamond: A Compact Review on a New, Versatile Electrode Material, *Journal of Electrochemical Science*. 2 (2007) 355–385.
- [60] J. V. Macpherson, A practical guide to using boron doped diamond in electrochemical research, *Physical Chemistry Chemical Physics*. 17 (2015) 2935–2949.
- [61] K. Muzyka, J. Sun, T.H. Fereja, Y. Lan, W. Zhang, G. Xu, Boron-doped diamond: Current progress and challenges in view of electroanalytical applications, *Analytical Methods*. 11 (2019) 397–414.
- [62] M. Panizza, G. Cerisola, Application of diamond electrodes to electrochemical processes, *Electrochimica Acta*. 51 (2005) 191–199.
- [63] I. Duo, C. Levy-Clement, A. Fujishima, C. Comninellis, Electron transfer kinetics on boron-doped diamond Part I: Influence of anodic treatment, *Journal of Applied Electrochemistry*. 34 (2004) 935–943.
- [64] R. Hoffmann, H. Obloh, N. Tokuda, N. Yang, C.E. Nebel, Fractional surface termination of diamond by electrochemical oxidation, *Langmuir*. 28 (2012) 47–50.
- [65] J. Zavazalova, K. Prochazkova, K. Schwarzova-Peckova, Boron-doped Diamond Electrodes for Voltammetric Determination of Benzophenone-3, *Analytical Letters*. 49 (2016) 80–91.
- [66] J. Musilová, J. Barek, K. Pecková, Použití diamantových filmových elektrod dopovaných borem, *Chemické Listy*. 103 (2009) 469–478.

- [67] S. Tago, T. Ochiai, S. Suzuki, M. Hayashi, T. Kondo, A. Fujishima, Flexible boron-doped diamond (BDD) electrodes for plant monitoring, *Sensors*. 17 (2017) 1638.