

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Marie Anna Matoušková

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Elektrochemická analýza provitaminů

Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Marie Anna Matoušková**
Osobní číslo: **C21036**
Studijní program: **B0531A130012 Farmakochemie a medicínální materiály**
Téma práce: **Elektrochemická analýza provitaminů**
Téma práce anglicky: **Electrochemical analysis of provitamins**
Zadávací katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Zásady pro vypracování

1. V bakalářské práci stručně a výstižně shrňte základní informace o fyzikálních a chemických vlastnostech vitaminů a jejich provitaminů, jejich klasifikaci a výskyt v živé přírodě.
2. Popište tvorbu jednotlivých vitaminů z příslušných prekurzorů a jejich funkci v lidském organismu.
3. Z odborných publikací zpracujte přehledovou rešerši o stanovení provitaminů elektrochemickými metodami. Diskutujte analytické parametry těchto metod, případné interferující látky a možnosti využití při analýze praktických vzorků.
4. Výsledky zpracujte formou závěrečné zprávy.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:
Veškerá dostupná odborná literatura.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Radovan Metelka, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **28. února 2022**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které jsem na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 27. 06. 2024

Marie Anna Matoušková

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu bakalářské práce Ing. Radovanovi Metelkovi, Ph.D., za odborné vedení, ochotu, vstřícnost a cenné rady. Mé poděkování patří také rodině a přátelům za jejich podporu a trpělivost během studia.

ANOTACE

Cílem této bakalářské práce je provedení rešerše literatury týkající se elektrochemické analýzy provitaminů. V první části práce je popsáno, co jsou to vitaminy a provitaminy, jak vypadá jejich metabolická přeměna a jakou úlohu plní v organismu. Dále jsou uvedeny elektroanalytické metody, jejich rozdělení a způsob provedení. Druhá část této práce se zabývá popisem konkrétních elektrochemických stanovení provitaminů v různých typech vzorků.

KLÍČOVÁ SLOVA

Provitamin, elektrochemická analýza, stanovení

ANNOTATION

This bachelor thesis aims to conduct a literature search on the electrochemical analysis of provitamins. The first part of the thesis describes what provitamins are, what their metabolic transformation looks like, and what role they play in the organism. Furthermore, electroanalytical methods are presented, as well as their classification and methods of execution. The second part of the thesis describes specific electrochemical determinations of provitamins in different types of samples.

KEYWORDS

Provitamin, electrochemical analysis, determination

Obsah

Seznam obrázků.....	10
Seznam tabulek.....	11
Seznam zkratek.....	12
Úvod.....	14
1. Rozdělení vitaminů z hlediska rozpustnosti.....	15
2. Vitaminy a jejich prekurzory.....	16
2.1 Vitamin A.....	16
2.1.1 Funkce a výskyt.....	16
2.2 Provitamin β -karoten.....	16
2.2.1 Metabolická přeměna.....	16
2.3 Další prekurzory vitaminu A.....	18
2.4 Vitamin D.....	18
2.4.1 Funkce a výskyt.....	18
2.5 Provitamin 7-dehydrocholesterol.....	19
2.6 Další prekurzory vitaminu D.....	21
3. Elektrochemická analýza.....	22
3.1 Dělení elektroanalytických metod.....	22
3.1.1 Voltametrie a polarografie.....	23
4. Analýza β -karotenu.....	24
4.1 Voltametrická měření na uhlíkových mikroelektrodách.....	24
4.1.1 Elektrooxidace v dichlormethanu.....	24
4.1.2 Elektrooxidace v chlorbenzenu.....	25
4.1.3 Elektrooxidace v tetrahydrofuranu.....	25
4.1.4 Elektrooxidace ve směsi acetonitrilu a chlorbenzenu.....	26
4.2 Elektrochemické vlastnosti látek ze skupiny karotenoidů.....	26
4.3 Voltametrické stanovení β -karotenu v syrové zelenině a bobulích.....	30
4.4 Elektrochemie karotenoidní samouspořádané monovrstvy.....	31
4.4.1 Anodická voltametrie v kyselém prostředí.....	31
4.4.2 Katodická voltametrie bez přístupu kyslíku.....	32
4.4.3 Katodická voltametrie v přítomnosti kyslíku.....	33
4.5 Voltametrické stanovení β -karotenu v zelenině a farmaceutických kapslích pomocí zlaté elektrody.....	33

4.6	Analýza zapouzdření β -karotenu v SWCNT pomocí Ramanovy spektroeletrochemie	36
5.	Analýza sterolových provitaminů.....	38
5.1	Voltametrie 7-dehydrocholesterolu pro diagnostiku Smith-Lemli-Opitzova syndromu.....	38
5.2	Detekce ergosterolu v houbách pomocí elektrochemie v organických rozpouštědlech.....	41
	Závěr	44
	Literatura.....	44

Seznam obrázků

Obrázek 1 - Metabolická přeměna β -karotenu [3].	17
Obrázek 2 – Strukturní vzorce α -karotenu a β -kryptoxanthinu [4].	18
Obrázek 3 – Metabolická přeměna 7-dehydrocholesterolu [3].	20
Obrázek 4 – Štěpení ergosterolu na ergokalciferol působením slunečního záření [3].	21
Obrázek 5 – Dělení elektroanalytických metod [9].	22
Obrázek 6 – Schéma dvouelektrodového (A) a tříelektrodového (B) zapojení [9].	23
Obrázek 7 - Cyklické voltamogramy elektrooxidace β -karotenu v CB a DCM zaznamenané pomocí CFME [10].	25
Obrázek 8 – Struktura dvanácti zkoumaných karotenoidů [11].	26
Obrázek 9 – Simulovaný (přerušovaná čára) a experimentální (plná čára) cyklický voltamogram anodické oxidace (1) a katodického redukčního procesu (2) [11].	28
Obrázek 10 - Simulovaný (přerušovaná čára) a experimentální (plná čára) cyklický voltamogram anodické oxidace (1,2) a katodického redukčního procesu kantaxanthinu (3,4) [11].	28
Obrázek 11 – Schéma vzniku SAM z 4-thioxo- β,β -karoten-4-onu [13].	32
Obrázek 12 – Zaznamenané cyklické voltamogramy β -karotenu na GCE v acetonu (červená), směsi ACN a toluenu (zelená), acetonitrilu (černá) a směsi ACN a MTBE (modrá) [14].	34
Obrázek 13 – SWV voltamogramy β -karotenu zaznamenané na AuE (A) a GCE (B) v acetonu [14].	35
Obrázek 14 – Závislost intenzity Ramanova píku na SWCNT elektrodě v β -karotenu při změně potenciálu z 0,3 (a) na 0,5 (b) [15].	37
Obrázek 15 – Biosyntéza cholesterolu [17; 19].	38
Obrázek 16 – CV 7-DHC na BDD elektrodě v ACN (a) s NaClO_4 , (b) s HClO_4 ihned po přípravě vzorků (A) a hodinu po přípravě vzorků (B) [17].	40
Obrázek 17 – Cyklické voltamogramy ergosterolu v DCM, ACN, DMF a DMSO [22].	42
Obrázek 18 – Voltamogramy pro koncentrační řadu ergosterolu v rozmezí 2-200 μM (graf A) Kalibrační křivka se třemi lineárními rozsahy (graf B) [22].	42

Seznam tabulek

Tabulka 1 - Rozdělení vitaminů z hlediska rozpustnosti [1].....	15
Tabulka 2 - Elektrochemické potenciály přírodních karotenoidů naměřené proti SCE [11]..	29
Tabulka 3 – Obsah β -karotenu v zelenině a bobulích zjištěný metodou kalibračního grafu (a), metodou standardního přídatku (b) a spektrofotometrickým stanovením [12].	31
Tabulka 4 – Obsah β -karotenu v zelenině a farmaceutických kapslích zjištěný pomocí měření SWV a spektrofotometricky [14].....	35
Tabulka 5 – Výsledky elektrochemického stanovení obsahu ergosterolu v extraktu hub a spektrofotometrického testu [22].	43

Seznam zkratek

7-DHC – 7-dehydrocholesterol

ACN – acetonitril

AuE – zlatá elektroda

BDD – borem dopovaná diamantová elektroda

BE – objemová elektrolyza

CB – chlorbenzen

CRBP – protein vázající buněčný retinol

CV – cyklická voltametrie

DCM – dichlormethan

DPV – diferenční pulzní voltametrie

CFME – mikroelektroda z uhlíkového vlákna

CNT – uhlíkové nanotrubičky

CPB – cetylpyridinium bromid

CPE – elektrolyza s řízeným potenciálem

DME – mikroelektroda diskového tvaru z uhlíkových vláken

DMF – dimethylformamid

DMSO - dimethylsulfoxid

FAD – flavinadeninukleotid

GCE – elektroda ze skelného uhlíku

HOPG – vysoce orientovaný pyrolytický grafit

HSA – lidský sérový albumin

k_s – rychlostní konstanta

LSV – lineární voltametrie

NAD⁺ – nikotinamidadeninukleotid (oxidovaná forma)

NADPH – nikotinamidadeninukleotidfosfát

OSWV – Osteryoungova square wave voltametrie

PtE – platinová elektroda

RDE – rotující disková elektroda

RSD – relativní standardní odchylka

SAM – samouspořádaná monovrstva

SCE – nasycená kalomelová elektroda

SDS – dodecylsírán sodný

SLOS – Smith-Lemli-Opitzův syndrom

SWCNT – jednotěnné uhlíkové nanotrubičky

SWV – square wave voltametrie

TBAHFP – tetra-*n*-butylamoniumhexafluorofosfát

TBAP – chloristan tetra-*n*-butylamonný

TBATFB – tetrabutylamonium tetrafluoroborát

TEAP – chloristan tetraethylamonný

THF – tetrahydrofuran

Úvod

Provitaminy jsou organické sloučeniny rostlinného původu, které nevykazují biologickou aktivitu, ale tvoří prekurzory vitaminů vznikajících jejich metabolickou přeměnou v organismu.

Vitaminy jsou nezbytné pro správné fungování organismu, přestože jsou v něm zastoupeny jen v nepatrném množství. Vyskytují se v různých poměrech v rostlinné i živočišné stravě. S jejich příjmem jsou spojeny tyto poruchy:

- Avitaminóza – nepřítomnost vitaminu
- Hypovitaminóza – nedostatek vitaminu
- Hypervitaminóza – přebytek vitaminu

Jejich přítomnost má vliv na metabolismus, kognitivní funkce, smyslové orgány, stavbu kostí, růst svalové hmoty, správnou funkci centrální nervové soustavy, srážlivost krve, antioxidační procesy atd. Správné fungování v organismu zabraňuje vzniku onemocnění spojených s jejich nedostatkem nebo úplnou absencí [1; 2].

Tato práce je zaměřena na výskyt, strukturu, metabolické přeměny a způsoby elektrochemické analýzy provitaminů. V dílčích kapitolách jsou popsány konkrétní metody úpravy vzorků, experimentální stanovení, měření a vyhodnocení elektrochemických vlastností provitaminů.

1. Rozdělení vitaminů z hlediska rozpustnosti

Vitaminy rozpustné v tucích jsou deriváty isoprenu typické dlouhými hydrofobními řetězci s nepolárními skupinami nebo velmi zanedbatelným množstvím skupin polárních. Vzhledem k charakteru molekul mohou být ukládány v tukové tkáni, což je příčinou jejich toxicity při nadbytečném příjmu. Jejich zdrojem jsou především oleje, maso, rybí tuk a mléko.

Vitaminy rozpustné ve vodě mají ve svých různorodých strukturách velké množství polárních vazeb a skupin. Charakter molekul neumožňuje jejich ukládání v organismu a při nadbytečném příjmu jsou vylučovány močí. Jejich zdrojem jsou rostlinné i živočišné produkty [1; 2].

Tabulka 1 - Rozdělení vitaminů z hlediska rozpustnosti [1].

Lipofilní (rozpustné v tucích)	Hydrofilní (rozpustné ve vodě)
Vitamin A (retinol)	Vitamin C (kyselina L-askorbová)
Vitamin E (tokoferol)	Vitamin B ₁ (thiamin)
Vitamin K (fylochinon)	Vitamin B ₂ (riboflavin)
Vitamin D (kalciferol)	Vitamin B ₃ (niacin)
	Vitamin B ₅ (kyselina pantothenová)
	Vitamin B ₆ (pyridoxin)
	Vitamin B ₇ (biotin)
	Vitamin B ₉ (kyselina listová)
	Vitamin B ₁₂ (kobalamin)

Vitaminy jsou vzhledem ke svým strukturám a způsobu vstřebávání velmi rozmanitou skupinou látek. Pro člověka jsou esenciální, a proto musí být přijímány ve stravě v aktivní formě nebo ve formě prekurzorů. Vitaminy přijímané ve formě prekurzorů a vznikající tímto biosyntetickým způsobem jsou vitaminy A a D [1; 2].

2. Vitaminy a jejich prekurzory

2.1 Vitamin A

Vitamin A je označení pro skupinu látek tvořenou retinolem, retinalem a kyselinou retinovou, z nichž největší podíl tvoří retinol [2].

2.1.1 Funkce a výskyt

Retinol a retinal se přeměňují navzájem působením koenzymů. Retinol je zapojen do kontroly exprese genů v buněčném jádře podobně jako steroidní hormony a přispívá tak fungování reprodukčních orgánů. Retinal je důležitou složkou rodopsinu, který vzniká vazbou retinalu na zrakový protein opsin a je odpovědný za vidění v šeru. Po vzniku kyseliny retinové už nemůže dojít k opětovné přeměně na retinol nebo retinal a nahrazení jejich funkcí. Kyselina retinová se podílí na syntéze glykoproteinů a je zapojena do tkáňového růstu.

Vitamin A je skladován v jaterních buňkách, při transportu do tkání vychytáván buněčnými receptory a vázán na CRBP protein. V případě přebytku vitamínu dojde k obsazení všech vazeb na CRBP proteinu, přebytečný nenavázaný retinol působí přímo na buňky a dochází k hypervitaminóze. Hypovitaminóza je způsobena nedostatečnou buněčnou aktivitou nebo nízkým příjmem ve stravě. Projevuje se špatným nočním viděním, které může vést k oslepnutí a rohovatění epitelové tkáně. Přírodním zdrojem jsou živočišné produkty např. v podobě rybího tuku a vajec. Z rostlinných je získáván v podobě svého prekurzoru β -karotenu [3].

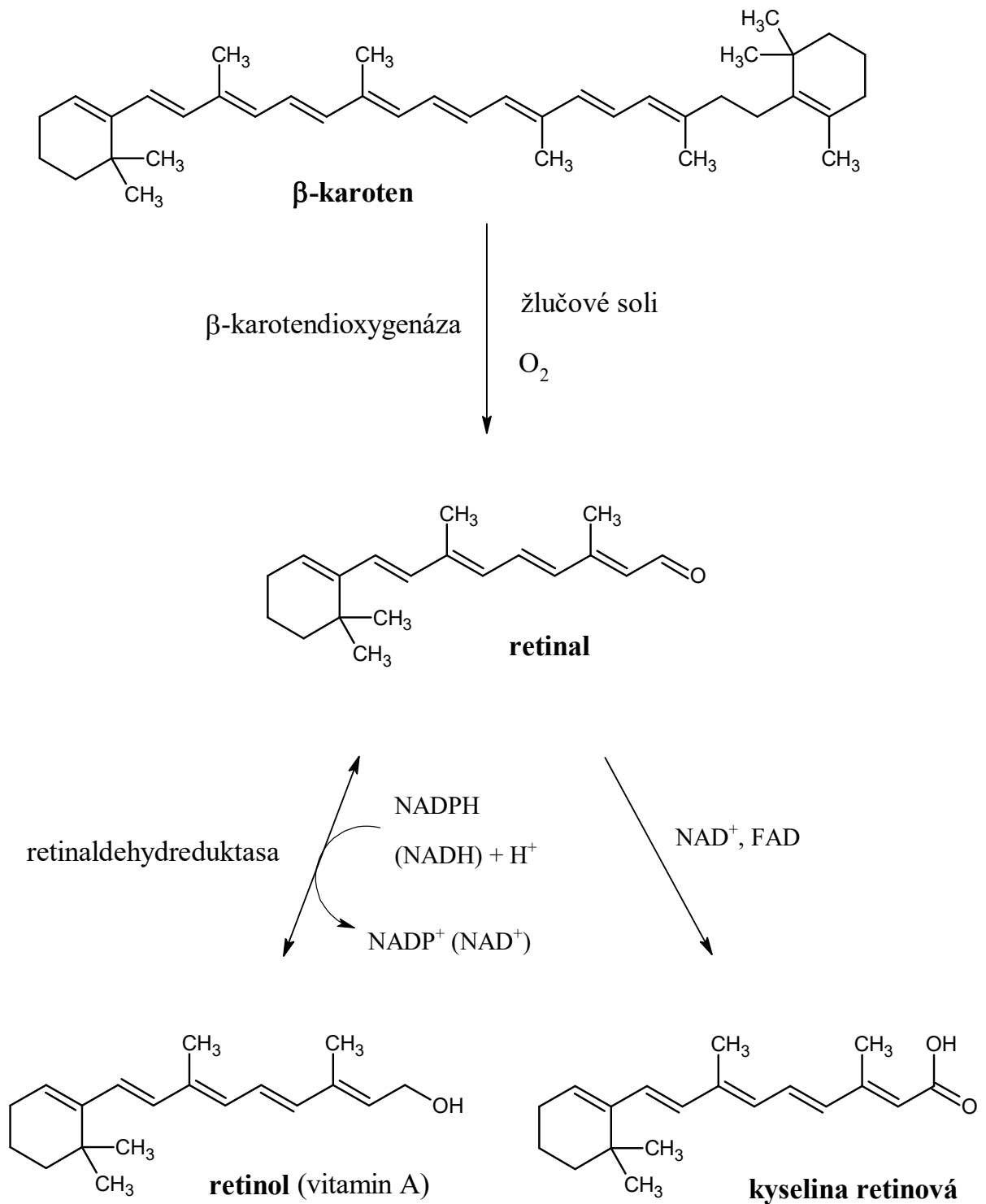
2.2 Provitamin β -karoten

β -Karoten je žlutý pigment, jehož struktura je tvořena tetraterpenem složeným ze dvou molekul retinolu. Jeho metabolizace na vitamin A není dostatečně účinná, aktivita je asi šestkrát menší než u retinolu. Skupina látek strukturně podobných β -karotenu se nazývá karotenoidy [3].

2.2.1 Metabolická přeměna

V lidském organismu se β -karoten štěpí β -karotendioxygenázou s pomocí molekulárního kyslíku a žlučových solí, díky kterým je štěpení účinnější, na dvě molekuly retinalu. Retinal je z větší části redukován enzymem retinaldehydreduktasou na retinol

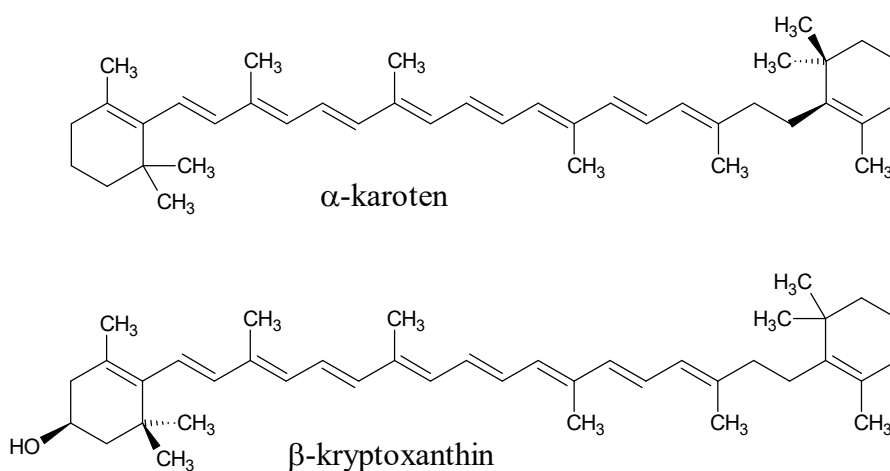
s pomocí NADPH. Malé množství retinalu se oxiduje na kyselinu retinovou s pomocí FAD a NAD^+ [3].



Obrázek 1 - Metabolická přeměna β -karotenu [3].

2.3 Další prekurzory vitamínu A

Skupinu látek nazývanou karotenoidy můžeme rozdělit na karoteny, ke kterým se kromě β -karotenu řadí také α -karoten a β -kryptoxanthin a na xantofyly, ke kterým spadá lutein, zeaxanthin a lykopen. Všechno jsou to barevné pigmenty žluté, oranžové a červené barvy, které vznikají biosyntézou v rostlinách. Ve své skupině, která je tvořena více než sedmi sty druhy karotenoidů, jsou nejhojněji zastoupeny. Pouze zástupci karotenů mohou podobně jako β -karoten podléhat metabolické přeměně na retinol vzhledem k velice podobné struktuře a uspořádání vazeb [4; 5].



Obrázek 2 – Strukturní vzorce α -karotenu a β -kryptoxanthinu [4].

2.4 Vitamin D

Vitamin D, též známý jako kalciferol nebo kalcinol, je soubor steroidních látek označovaných jako vitaminy D_1 – D_7 [1].

2.4.1 Funkce a výskyt

Kalciferol se vyskytuje v živočišných buňkách jako cholekalciferol (vitamin D_3) a v rostlinných buňkách jako ergokalciferol (vitamin D_2). Jsou to prohormony, které jsou v organismu přeměňovány na aktivní formu zvanou kalcitriol [2; 3].

Kalcitriol je významný hormon podílející se na metabolismu vápníku a fosforu. Ve střevě podněcuje syntézu bílkovin, které zprostředkovávají absorpci vápenatých iontů a fosfátů a zároveň reguluje jejich koncentraci. Díky němu je zajištěna stálá dostupnost vápníku

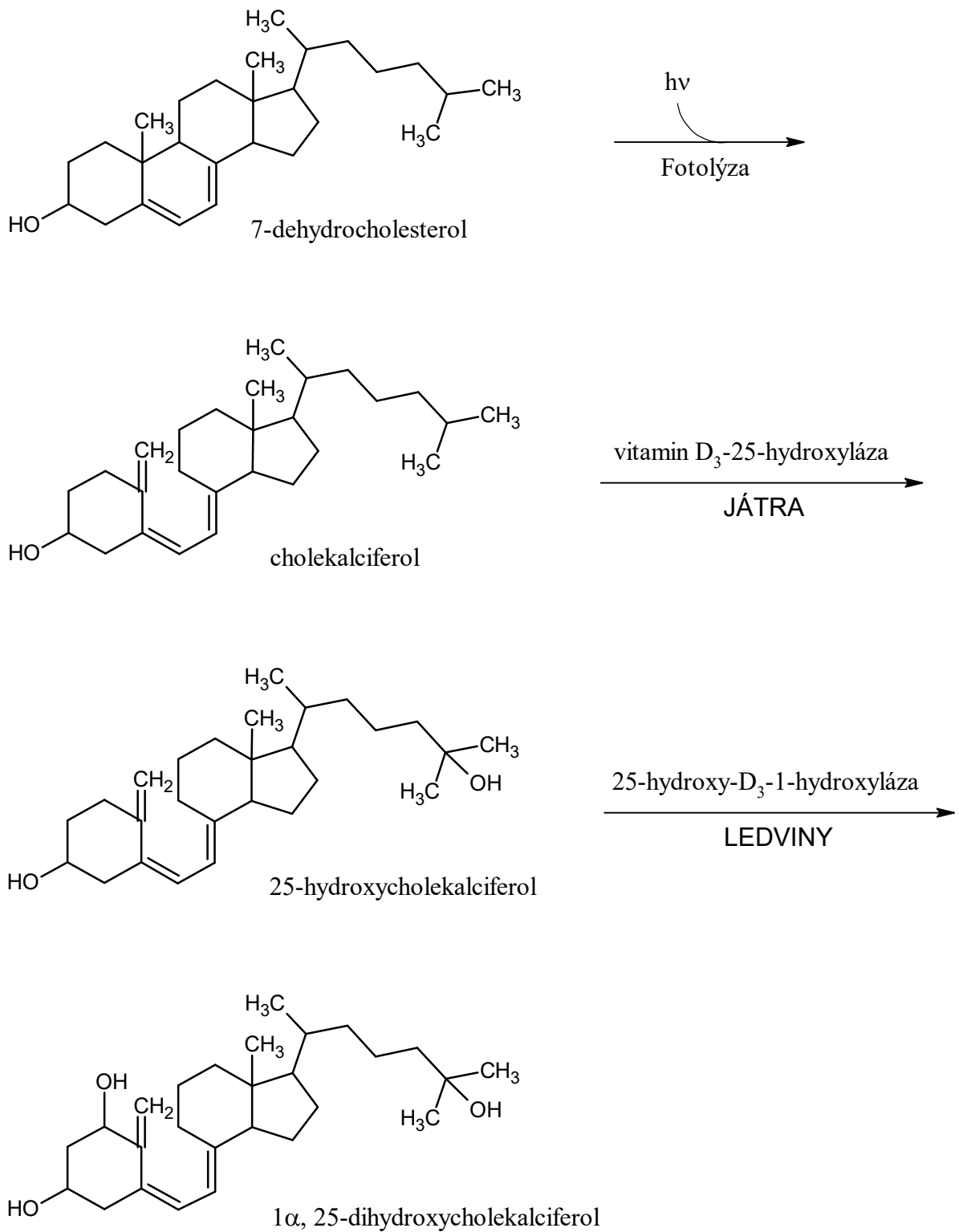
a fosforu pro jejich klíčovou úlohu při stavbě kostí. Jeho produkce je regulována hormonem příštítných tělísek.

Nedostatek vitamínu D může být způsoben jeho nízkým příjmem, nedostatkem slunečního záření nebo onemocněním ledvin. Je dán poruchami mineralizace kostí, která se v raném věku projevuje onemocněním pohybového aparátu – rachitidou neboli křivicí. Ta je typická deformací kostí, páteře a hrudníku. V pozdějším věku se vyznačuje měknutím kostí – osteomalácií [3; 6].

Vitamin D je pro lidský organismus dostupný především v podobě živočišných produktů, jako jsou játra, vaječný žloutek a rybí tuk. Může být syntetizován ze svého prekurzoru, kterým je v případě rostlin ergosterol a u živočichů 7-dehydrocholesterol [2].

2.5 Provitamin 7-dehydrocholesterol

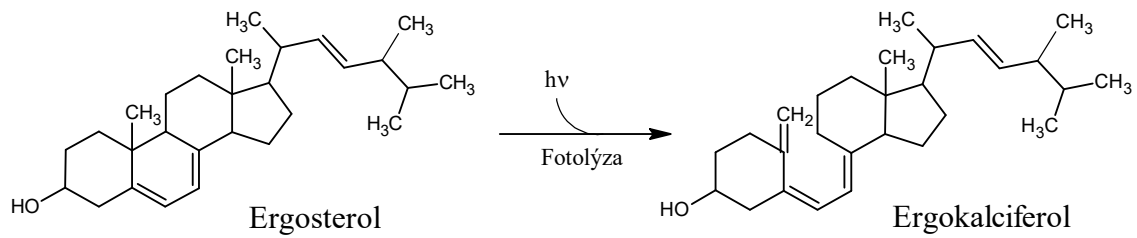
7-Dehydrocholesterol se nachází v kožních buňkách živočichů a vitamin D₃ se z něj tvoří fotolýzou slunečním zářením. Ultrafialová složka záření je zodpovědná za štěpení jádra a vzniku cholekalciferolu. Cholekalciferol se v krvi váže na specifické proteiny a je dopravován do jater, kde probíhá jeho hydroxylace na biologicky neaktivní 25-hydroxycholekalciiferol pomocí enzymu vitamin D₃-25-hydroxylasa. V této formě je organismem skladován v játrech a uvolňován do enterohepatálního oběhu, jehož narušení též způsobuje nedostatek vitamínu D. 25-hydroxycholekalciiferol je dále hydroxylován v ledvinách enzymem 25-hydroxy-D₃-1-hydroxylázou na 1 α ,25-dihydroxycholekalciiferol, neboli kalcitriol, nejúčinnější metabolit vitamínu D [3; 6].



Obrázek 3 – Metabolická přeměna 7-dehydrocholesterolu [3].

2.6 Další prekurzory vitamínu D

Další látkou ze skupiny provitaminů D je ergosterol, který se od 7-dehydrocholesterolu liší nenasyčeným postranním řetězcem a vedlejší methylenovou skupinou. Vyskytuje se v buněčných stěnách hub, plísní a některých mikroorganismů, kde zajišťuje správnou funkci lipidické membrány a také v cytosolu buněk, kde se účastní procesů látkové výměny. Působením slunečního záření je štěpen na ergokalciferol, tedy vitamin D₂ [3; 7].



Obrázek 4 – Štěpení ergosterolu na ergokalciferol působením slunečního záření [3].

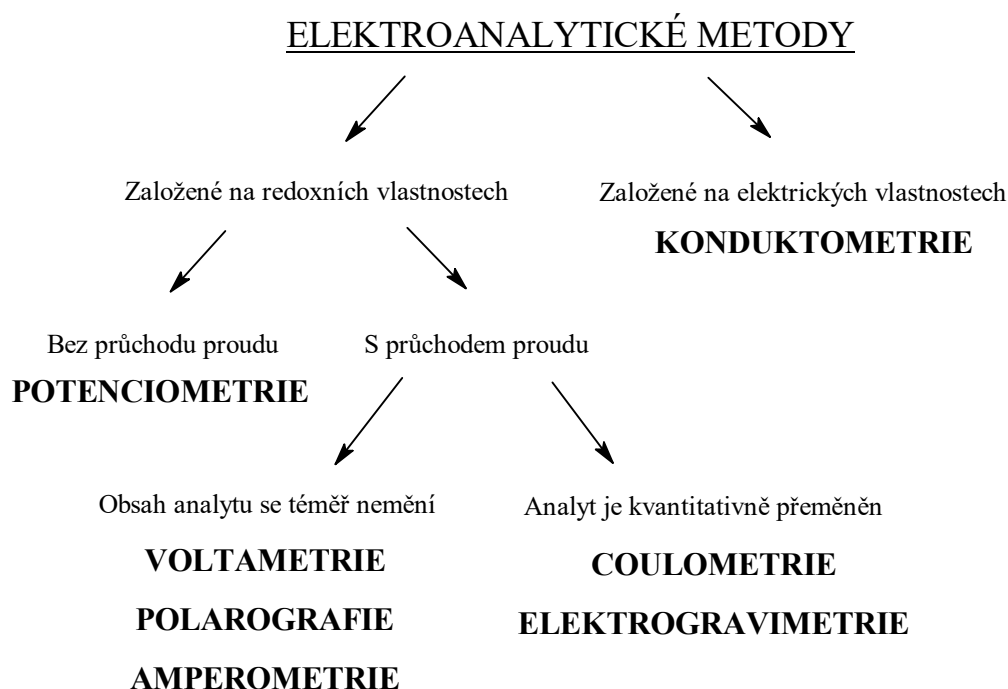
3. Elektrochemická analýza

Elektrochemická analýza využívá pro stanovení a identifikaci látek elektrických vlastností nabitých částic vznikajících mezi elektrodami anebo elektrochemických reakcí probíhajících na fázovém rozhraní elektrody a analyzovaného roztoku nebo taveniny [8; 9].

Aby mohla reakce proběhnout, je třeba sestavit elektrochemický článek ze dvou elektrod ponořených do analyzovaného roztoku. Analyzovaný roztok je charakterizován objemem, koncentrací a hmotností stanovované látky. Elektrochemický článek nabývá hodnot měřené elektrické veličiny, kterou může být proud, náboj, kapacita, vodivost nebo elektrodový potenciál. V některých měřeních se jako proměnná veličina uvádí čas [8].

3.1 Dělení elektroanalytických metod

Elektroanalytické metody jsou děleny na základě svých redoxních a elektrických vlastností, průchodu proudu při analýze a přeměny obsahu analytu.

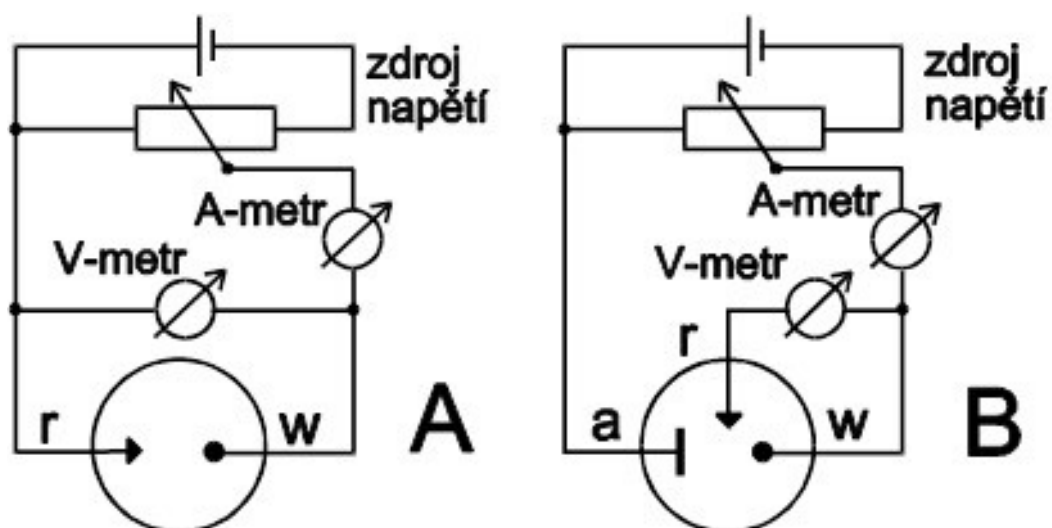


Obrázek 5 – Dělení elektroanalytických metod [9].

3.1.1 Voltmetrie a polarografie

Při voltametrické a polarografické analýze je sledována závislost proudu, jenž prochází pracovní elektrodou ponořenou do měřeného roztoku, na potenciálu, který je na elektrodu vkládán vnějším zdrojem. Analytickým signálem je velikost proudu procházejícího elektrodou při určitém potenciálu. Tuto závislost popisuje polarizační křivka.

Voltametrická cela neboli elektrochemický člunek pro voltametrická měření je složen z měrné elektrody ponořené do analyzovaného roztoku a referentní elektrody, která je s analyzovaným roztokem spojena solným můstkem. Říkáme tomu dvouelektrodové uspořádání. Často se využívá zapojení pomocné elektrody a uspořádání je nazýváno tříelektrodové [9].



Obrázek 6 – Schéma dvouelektrodového (A) a tříelektrodového (B) zapojení [9].

4. Analýza β -karotenu

4.1 Voltametrická měření na uhlíkových mikroelektrodách

Elektrodová kinetika β -karotenu byla popsána na uhlíkových mikroelektrodách v aprotických rozpouštědlech. Zjistilo se, že uhlíkové mikroelektrody jsou vhodné pro voltametrická měření a studie kinetiky a že elektrooxidace β -karotenu závisí na vlastnostech rozpouštědla, přičemž rychlý přenos náboje probíhá v inertních rozpouštědlech a v reaktivnějších rozpouštědlech probíhá nejprve chemická reakce. Byly použity techniky lineární voltametrie (LSV), square-wave voltametrie (SWV) a cyklické voltametrie (CV).

Experiment byl proveden za použití mikroelektrody diskového tvaru z uhlíkových vláken (DME) a válcové mikroelektrody z uhlíkových vláken (CFME) v různých aprotických rozpouštědlech. Jako inertní rozpouštědla byly použity dichlormethan (DCM) a chlorbenzen (CB) a jako reaktivní rozpouštědla tetrahydrofuran (THF) a acetonitril (ACN).

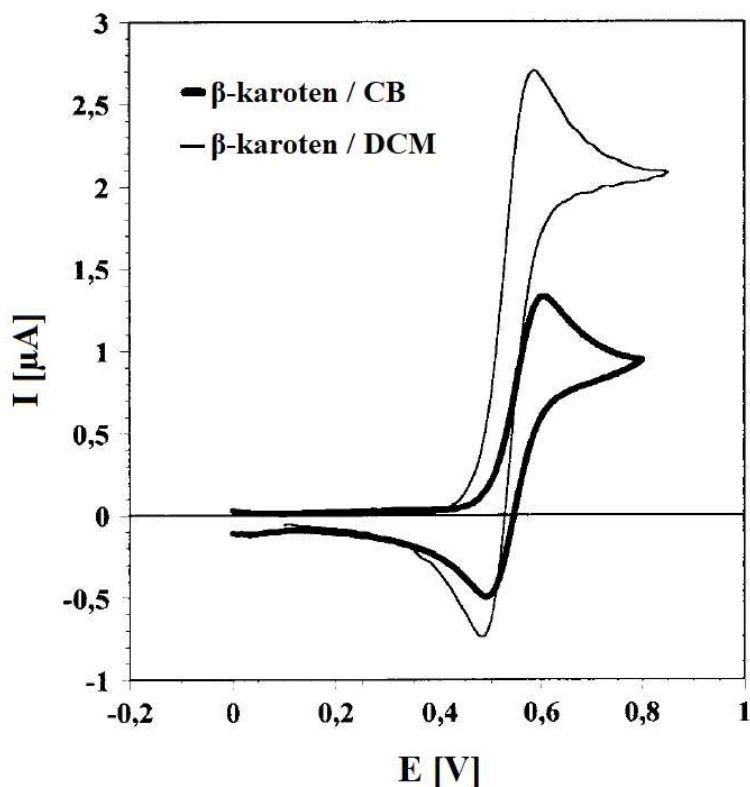
V bezvodých čistých rozpouštědlech byly připraveny následující zásobní roztoky: 0,5 M tetra-*n*-butylamoniumhexafluorofosfát (TBAHFP), 0,5 M chloristan tetraethylamonný (TEAP), 0,1 M β -karoten a 0,1 M ferrocen. Analýza byla provedena pomocí elektrochemického článku s tříelektrodovým uspořádáním: CFME nebo DME jako měrné elektrody, platinovým drátkem coby pomocnou elektrodou a stříbrným drátkem tvořícím srovnávací elektrodu [10].

4.1.1 Elektrooxidace v dichlormethanu

β -karoten v DCM podléhá anodické oxidaci, která díky inertnímu rozpouštědлу není ovlivněna chemickými reakcemi. Jedná se tedy pouze o řízený přenos náboje. Se zvyšující se koncentrací základního elektrolytu TBAHFP byla zaznamenána zvyšující se hodnota rychlostní konstanty. Výsledky byly porovnány s hodnotami reverzibilního neboli vratného procesu elektrooxidace a následkem toho bylo potvrzeno, že se vzrůstající rychlostí přenosu náboje se proces stává reverzibilnějším. Tedy čím nižší koncentrace elektrolytu byla použita, tím méně reverzibilní proces elektrooxidace proběhl. Elektrooxidace byla provedena s použitím CFME i DME, přičemž u obou mikroelektrod bylo dosaženo analogického závěru [10].

4.1.2 Elektrooxidace v chlorbenzenu

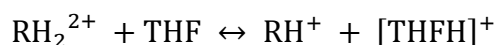
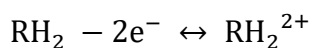
CB je inertní aprotické rozpouštědlo stejně jako DCM a voltametrické měření elektrooxidace β -karotenu v CB s TBAHFP tedy ukázalo obdobný průběh závislosti (obr. 7). Nižší difúzní koeficient β -karotenu v CB způsobil, že hodnota rychlostní konstanty nedosahovala takových hodnot jako při měření v DCM a přenos náboje byl tedy pomalejší [10].



Obrázek 7 - Cyklické voltamogramy elektrooxidace β -karotenu v CB a DCM zaznamenané pomocí CFME [10].

4.1.3 Elektrooxidace v tetrahydrofuranu

V THF je počáteční přenos náboje β -karotenu ovlivněn chemickou reakcí mezi rozpouštědlem a produktem elektrooxidace, který je odebírá z prostoru elektrod. Tvary cyklických voltamogramů zaznamenané pomocí CFME tedy vykazují odlišný počáteční vývoj. Probíhající reakce jsou popsány následujícími chemickými rovnicemi, ve kterých je β -karoten označen jako RH_2 [10]:

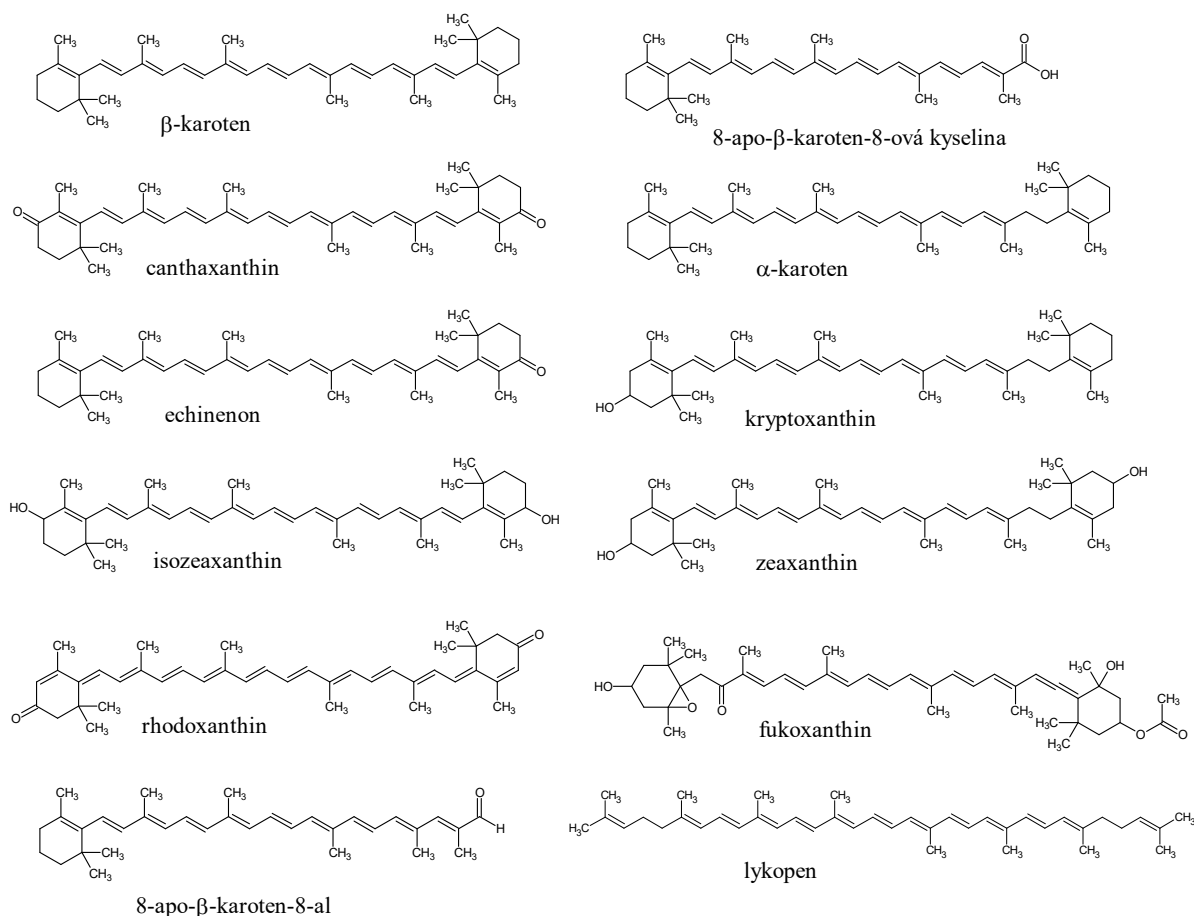


4.1.4 Elektrooxidace ve směsi acetonitrilu a chlorbenzenu

ACN je dalším reaktivním rozpouštědlem, který byl použit ve směsi s CB, na základě toho, že v čistém ACN se β -karoten nerozpouští. Cyklické voltamogramy vykazovaly v závislosti na poměru rozpouštědel ve směsi buď reverzibilní nebo irreverzibilní chování. Pokud je ve směsi přítomen větší podíl ACN, dochází k chemické reakci s produktem elektrooxidace β -karotenu stejně jako v případě THF. Pokud je v nadbytku CB, reakce probíhá minimálně [10].

4.2 Elektrochemické vlastnosti látek ze skupiny karotenoidů

Pro dvanáct přirozeně se vyskytujících karotenoidů byla zaznamenána elektrochemická data v podobě kinetiky rovnovážné konstanty, oxidačního potenciálu a konstanty reakční rychlosti. Elektrochemické vlastnosti byly experimentálně zjištěny a byla odvozena závislost zjištěných parametrů na struktuře karotenoidů [11].

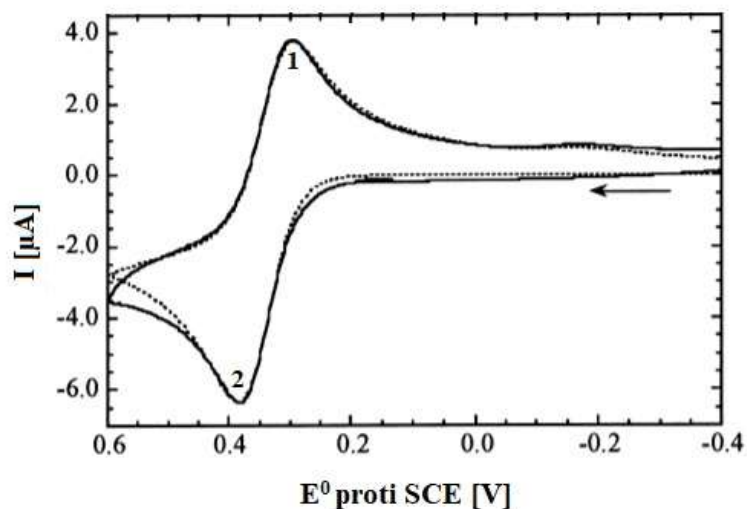


Obrázek 8 – Struktura dvanácti zkoumaných karotenoidů [11].

Na základě charakteru zkoumaných vlastností se pro různé reakce volí vhodné elektroanalytické techniky. K měření rozpadu volných radikálů jsou vhodné elektronová paramagnetická rezonance a absorpční spektroskopie, pro stanovení difúzních koeficientů a heterogenních konstant rychlosti přenosu elektronů cyklická voltametrie (CV) s rotující diskovou elektrodou (RDE) a pro výrobu kationtových radikálů karotenoidů objemová elektrolyza s řízeným potenciálem (BE). CV poskytuje informace o rychlostních konstantách, stabilitě karotenoidů a počtu oxidačních stavů, Osteryoungova square wave voltametrie (OSWV) je užitečná pro kvantitativní stanovení elektroaktivních látek a poskytuje voltamogramy pro Faradayovy procesy. Pro detekci a určení charakteru reakce v redoxních systémech jsou proto CV a OSWV nejužitečnějšími a nejpoužívanějšími technikami.

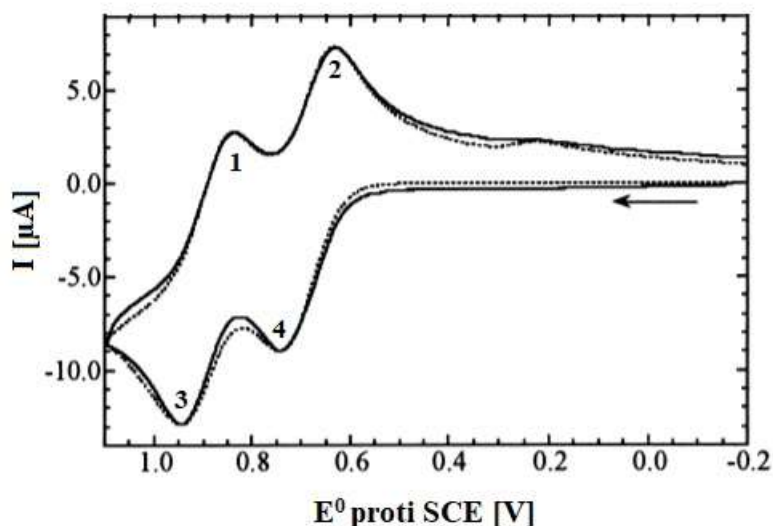
Pro CV a OSWV byly použity články s tříelektrodovým uspořádáním. Platinová disková elektroda byla zvolena jako pracovní, platinový drátek jako pomocná elektroda a nasycená kalomelová jako referenční elektroda. Měřený roztok byl připraven z karotenoidu o koncentraci 0,1 – 1 mmol v DCM, ve kterém je dobře rozpustný s TBAHFP jako základním elektrolytem.

Mechanismus oxidace β -karotenu se ukázal jako závislý na typu rozpouštědla. V inertních rozpouštědlech, např. v DCM nebo CB, se oba elektrony přenáší v téměř stejnou chvíli, reakce tedy probíhá v jednom kroku a je vratná. Naproti tomu reakce v THF nebo ACN probíhá nevratně. CV a OSWV β -karotenu v DCM s TBAHFP byly zaznamenány jako dvojice oxidačních píků, z nichž jeden znázorňuje oxidační potenciál β -karotenu bez náboje a druhý oxidační potenciál jeho kationtových radikálů. Neutrální β -karoten má jen nepatrně nižší hodnotu oxidačního potenciálu E^0_1 než kationtové radikály E^0_2 (tab. 2), a proto se píky zdají být v překryvu (obr. 9). Nižší hodnota E^0_1 oproti E^0_2 značí, že se β -karoten snadněji oxiduje. ΔE lze vyhodnotit simulací. Potenciál deprotonovaných radikálů E^0_3 dosahuje v porovnání s E^0_1 a E^0_2 velmi nízkých hodnot. Stejně jako β -karoten podléhají jedнокrokové dvouelektronové oxidaci i isozeaxanthin, α -karoten, kryptoxanthin, zeaxanthin, lykopen a fucoxanthin [11].



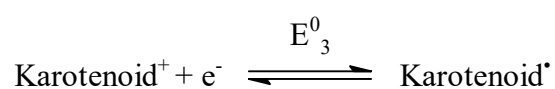
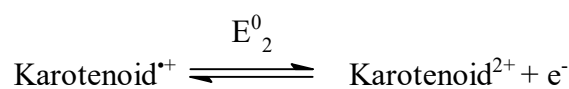
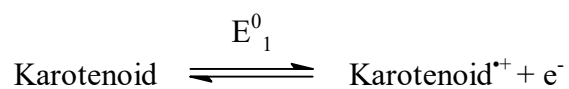
Obrázek 9 – Simulovaný (přerušovaná čára) a experimentální (plná čára) cyklický voltamogram anodické oxidace (1) a katodického redukčního procesu (2) [11].

V případě kantaxanthinu se měření CV a OSWV značně liší od β -karotenu. Dva nezávislé oxidační píky ukazují na dvě jednoelektronové oxidace jdoucí po sobě. První pík znázorňuje oxidaci neutrální molekuly, kterou následuje produkce kationtových radikálů. Druhý pík znázorňuje následnou oxidaci kationtových radikálů. Oxidaci ve dvou krocích podléhá také echinenon, rhodoxanthin, 8-*apo*- β -karoten-8-*al* a 8-*apo*- β -karoten-8-*ová* kyselina.



Obrázek 10 - Simulovaný (přerušovaná čára) a experimentální (plná čára) cyklický voltamogram anodické oxidace (1,2) a katodického redukčního procesu kantaxanthinu (3,4) [11].

Reakce probíhající na elektrodách jsou popsány následujícími chemickými rovnicemi:



Tabulka 2 - Elektrochemické potenciály přírodních karotenoidů naměřené proti SCE [11].

Karotenoid	E^0_1 [mV]	E^0_2 [mV]	ΔE [mV]	E^0_3 [mV]
β -karoten	540	545	5	35
canthaxanthin	689	894	205	264
echinenon	590	690	100	110
isozeaxanthin	550	570	20	80
rhodoxanthin	655	900	245	250
8'-apo- β -karoten-8'-al	720	865	145	75
cryptoxanthin	560	570	10	60
zeaxanthin	530	550	20	90
fucoxanthin	790	820	30	240

Hodnoty rychlostní konstanty (k_s) přenosu elektronů jsou tím vyšší, čím rychlejší je přenos elektronů. Nárůst hodnot k_s může být podpořen zvýšením koncentrace základního elektrolytu TBAHFP. V případě karotenoidů jsou hodnoty k_s poměrně vysoké a rovnováha se rychle ustavuje [11].

4.3 Voltametrické stanovení β -karotenu v syrové zelenině a bobulích

Elektrochemické vlastnosti β -karotenu byly pozorovány po předběžné extrakci v organických rozpouštědlech za přítomnosti povrchově aktivní látky Triton X 100, která zvyšuje jeho rozpustnost a snadnost elektrooxidace. Kvantitativní stanovení β -karotenu pomocí CV ukázalo shodné výsledky s dostupnými nutričními údaji.

Zásobní 0,01 M roztok β -karotenu rozpuštěného v DCM byl použit pro přípravu pracovních roztoků v ethanolu s 0,1 M LiClO_4 . Zásobní 0,1 M roztoky povrchově aktivních, ale elektrochemicky neaktivních látek Triton X 100, dodecylsírany sodného (SDS) a cetylpyridinium bromidu (CPB) byly připraveny rozpuštěním ve vodě.

Elektrochemický článek pro voltametrická měření byl sestaven z elektrody ze skelného uhlíku (GCE) coby pracovní, chloridostříbrné elektrody coby referentní a platinovým drátkem jako pomocné elektrody. Jako základní elektrolyt pro CV byl zvolen LiClO_4 v ethanolu obsahujícím 10 % DCM.

Pro přípravu vzorků byla ze zástupců zeleniny vybrána dýně, mrkev a petržel a z bobulí byly vybrány jeřabiny a šípek. Zelenina byla zbavena slupky, nakrájena na malé kousky, z nichž bylo odváženo 5 gramů vzorku, který byl vytřepán spolu s 8 ml DCM. Pro kvantitativní analýzu byla použita metoda kalibračního grafu a standardního přídatku 500 a 750 mg β -karotenu do extraktu spolu se vzorkem. Pro roztoky o různých koncentracích bylo provedeno pět stanovení. Na základě výsledků měření byl spočítán obsah karotenu na 100 g vzorku. Extrakt byl spolu se základním elektrolytem obsahujícím 0,01 M Triton X 100 v poměru 1:9 převeden do cely a skenován rychlostí 100 mV/s v rozsahu 0-1500 mV. Jako referenční metoda stanovení byla použita spektrofotometrie. Pro kvantitativní analýzu byla použita kalibrační křivka β -karotenu extrahovaného v hexanu s měřením absorpance při 446 nm.

Při CV na GCE v základním elektrolytu byly zjištěny nevratné kroky oxidace β -karotenu při 500 a 920 mV. β -karoten se oxiduje za vzniku radikálů, které reagují s neutrálním β -karotenem za vzniku dvou kationtových radikálů. Povrchově aktivní látky nemají významný vliv na velikost procházejícího proudu, ale při vyšších koncentracích usnadňují elektrooxidaci. Mají vysokou afinitu k β -karotenu jakožto k hydrofobní molekule.

Účinnost DCM pro extrakci β -karotenu byla zjištěna voltametrií. Na vzorcích mrkve a dýně byl zjištěn vliv objemu DCM, času analýzy a pořadí extrakce. Přesnost extrakce byla vyhodnocena porovnáním se známým množstvím β -karotenu v extrahovadle.

Na cyklických voltamogramech byl zachycen signál pro oxidaci β -karotenu při 482 mV. Ten byl porovnán s výsledky metody standardního přídávku, která potvrdila nárůst proudu přímo úměrnému množství analytu. Naměřené hodnoty se v obou případech shodují. Výsledky obou měřících metod byly na závěr potvrzeny spektrofotometrickým stanovením [12].

Tabulka 3 – Obsah β -karotenu v zelenině a bobulích zjištěný metodou kalibračního grafu (a), metodou standardního přídávku (b) a spektrofotometrickým stanovením [12].

Vzorek	Cyklická voltametrie		Spektrofotometrie
	Obsah β -karotenu (mg/100 g vzorku) (a)	Obsah β -karotenu (mg/100 g vzorku) (b)	Obsah β -karotenu (mg/100 g vzorku)
Mrkev	9,9	9,7	9,8
Dýně	2,94	2,95	2,9
Jeřabiny	7,82	7,86	7,9
Šípek	2,9	2,9	2,8
Petržel	5,5	5,6	5,4

4.4 Elektrochemie karotenoidní samouspořádané monovrstvy

K voltametrickému měření byl syntetizován 4-thioxo- β , β -karoten-4-on, ze kterého byl poté připraven 5×10^{-5} M roztok v acetonitrilu bez kyslíku a skladován v dusíkové atmosféře. Zlatá disková elektroda byla sestavena zapaštěním zlatého drátu do skleněné trubice s epoxidovou pryskyřicí. Elektrochemický článek byl sestaven z referenční chloridostříbrné elektrody připojené přes KNO_3 můstek a platinového drátku jako pomocné elektrody. Naměřený potenciál byl vztažen k nasycené kalomelové elektrodě (SCE).

Zlatá elektroda byla ponořena do 5×10^{-5} M roztoku 4-thioxo- β , β -karoten-4-onu a za neustálého proplachování dusíkem byla připravena samouspořádaná monovrstva (SAM) elektrochemicky stabilní při 0,5-0,6 V proti SCE [13].

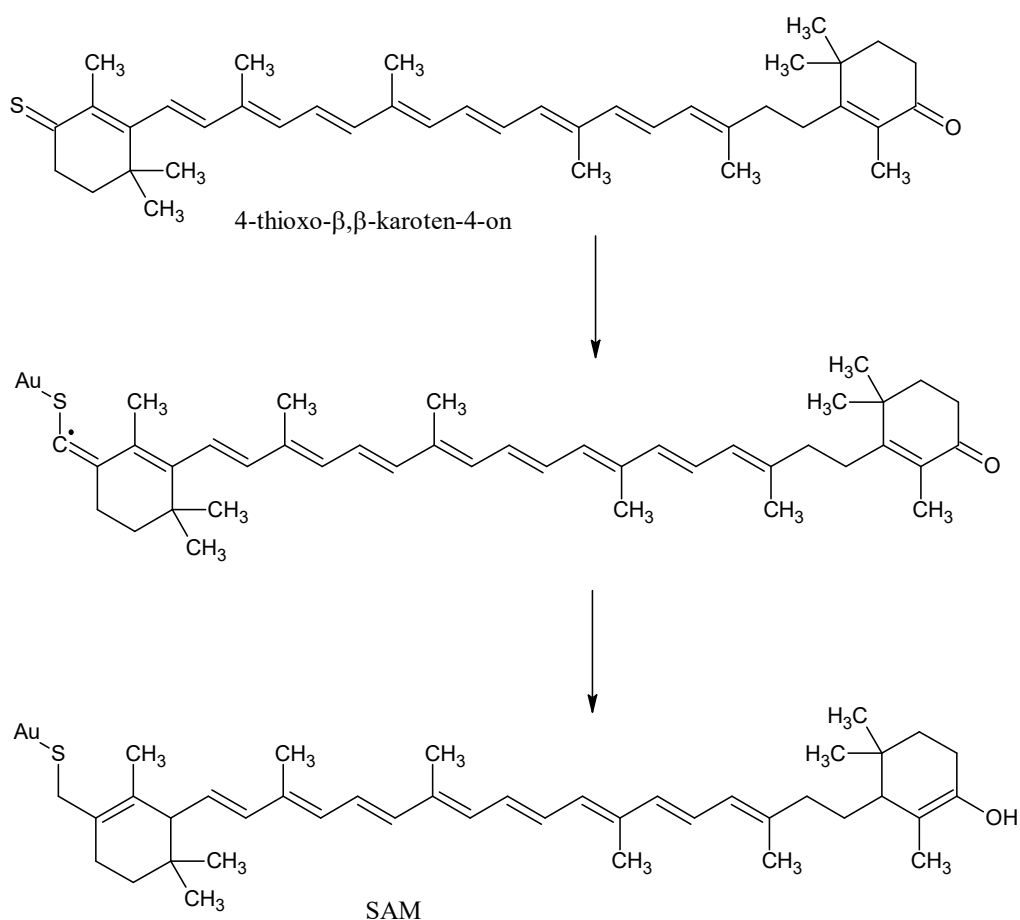
4.4.1 Anodická voltametrie v kyselém prostředí

Reaktivita SAM se projevila vznikem dvou píků v různých oblastech potenciálu při CV v HClO_4 . První zobrazuje oxidaci karotenoidu adsorbovaného díky přítomnosti síry při

0,9 V proti SCE, druhý desorpci produktu oxidace spojenou s oxidací zlata a funkční skupiny při kladnějším potenciálu. Tvorba třetího píku je způsobena procesem redukce oxidu zlata. Pro srovnání byla provedena CV obyčejné zlaté elektrody, která potvrdila nevratnost desorpce SAM [13].

4.4.2 Katodická voltametrie bez přístupu kyslíku

Katodické reakce elektrody pokryté karotenoidem byly zkoumány skenováním potenciálu mezi 0-1,4 V v roztoku KOH a následně vyhodnoceny anodickým skenem v roztoku HClO₄. Opakované skenování v katodické oblasti mělo za následek postupnou desorpci povrchové vrstvy. Velice pomalu probíhající katodická desorpce alkanthiolů byla zakončena po několika skenech se zřetelným vrcholem. Na rozdíl od SAM alkanthiolu je SAM připravený z 4-thioxo- β,β -karoten-4-onu (obr. 11) stabilnější v katodickém procesu, ale méně stabilní v anodickém. Rozdílné chování je způsobeno lokalizací síry v 4-thioxo- β,β -karoten-4-onu a konjugací dvojných vazby. Rozložení náboje v molekule usnadňuje uvolnění elektronů, ale ztěžuje jejich příjem [13].



Obrázek 11 – Schéma vzniku SAM z 4-thioxo- β,β -karoten-4-onu [13].

4.4.3 Katodická voltametrie v přítomnosti kyslíku

Přechodnými radikály vzniklými redukcí kyslíku na H_2O_2 mohou být $\text{O}_2^{\cdot-}$ a $\text{HOO}^{\cdot-}$, ty reagují s adsorbovanou vrstvou 4-thioxo- β,β -karoten-4-onu. Potenciál anodická desorpce s kyslíkovými radikály nabytl v průběhu CV kladnějších hodnot oproti samotnému SAM, u kterého došlo pravděpodobně ke zvýšení stability v důsledku síťovacích reakcí [13].

4.5 Voltametrické stanovení β -karotenu v zelenině a farmaceutických kapslích pomocí zlaté elektrody

Voltametrické stanovení je založeno na anodické oxidaci β -karotenu na zlaté elektrodě v čistém acetonu, který v tomto případě slouží jako extrahovadlo první volby v porovnání s ostatními mnohdy velice toxickými organickými rozpouštědly.

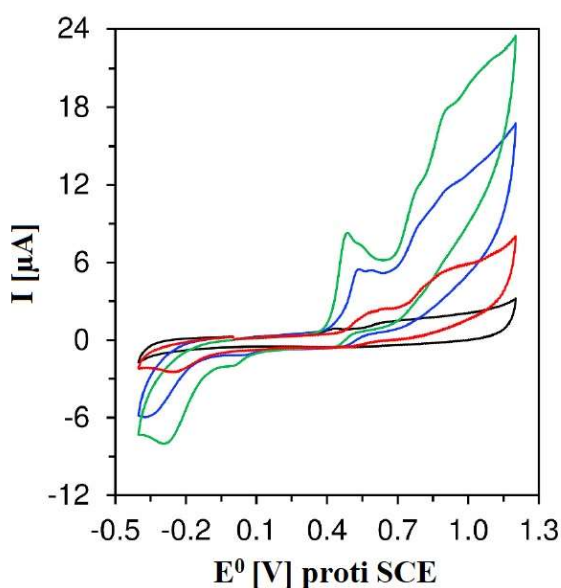
Voltametrická měření byla uskutečněna v tříelektrodovém uspořádání. Jako pracovní elektrody byly testovány zlatá pracovní elektroda (AuE), GCE a platinová elektroda (PtE). SCE byla vybrána jako referenční elektroda a pro srovnání výsledků byla na závěr provedena UV-VIS spektrofotometrie.

Ke sledování elektrochemie β -karotenu byl připraven 0,5 mmol/l roztok β -karotenu měřený CV v rozsahu potenciálu $-0,4$ až $+1,2$ V proti SCE. Měření probíhalo v organických rozpouštědlech obohacených o LiClO_4 na vybrané pracovní elektrodě. Pro měření SWV s AuE byl nastaven rozsah potenciálu 0 až 1,2 V proti SCE. Kvantitativní analýza β -karotenu byla vyhodnocena v rozmezí koncentrací 0,02 – 0,7 mmol/l metodou kalibrační křivky a pětkrát zopakována. Pro srovnání výsledků byla použita spektrofotometrická zkouška s maximální absorpcí při 452 nm. Metoda je založena na kalibraci a lineární regresi pro koncentraci 0,05 – 300 mmol/l β -karotenu v acetonu.

Jako vzorek zeleniny byly vybrány mrkev a batáty, které byly pokrájeny na malé kousky a sušením v peci zbaveny vody. Vysušené vzorky byly naváženy a homogenizovány. Oddělení β -karotenu z 1 g každého vzorku bylo provedeno několikanásobnou extrakcí v acetonu s LiClO_4 . Jednotlivé frakce byly smíchány v odměrné baňce a doplněny po rysku. Obsah β -karotenu byl vyhodnocen v mg/100 g vzorku zeleniny. Z farmaceutických produktů byly vybrány kapsle Betakaroten Forte® a Nutricius Betakaroten Extra®. Obě kapsle byly jemně namlety a z každé navážen 1 g vzorku, který byl rozpuštěn v acetonu s LiClO_4 , převeden do

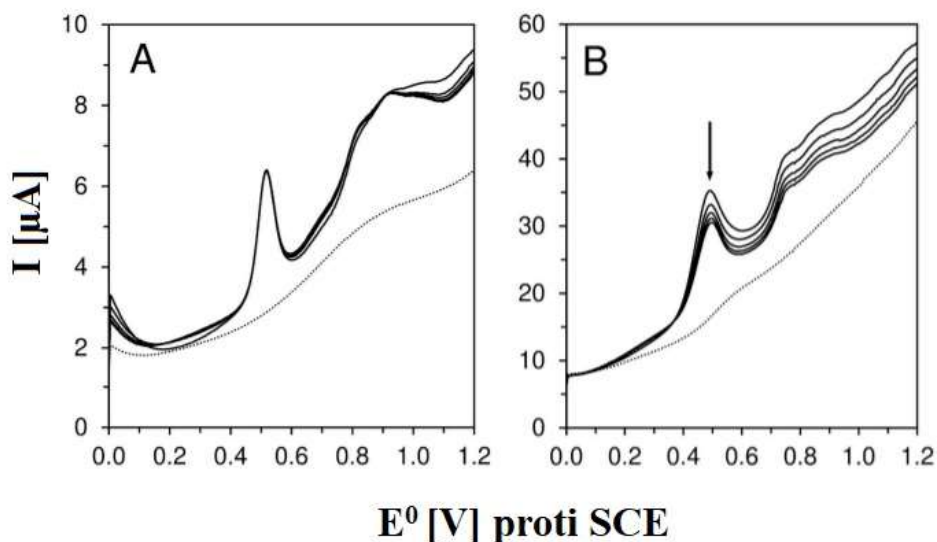
odměrné baňky a doplněn po rysku. Pro voltametrickou analýzu byla připravena kalibrační řada roztoků o různých koncentracích.

Elektrochemická oxidace 0,18 mmol/l roztoku β -karotenu na GCE byla provedena v ACN, směsi ACN s toluenem v poměru 1:1, směsi ACN s MTBE také v poměru 1:1 a v acetonu. Každé z rozpouštědel bylo obohaceno o LiClO_4 . Měření proběhlo pomocí CV v rozmezí $-0,4$ až $+1,2$ V. Voltamogramy ukázaly 4 píky odpovídající nevratným krokům během oxidace β -karotenu (obr. 12). I přesto, že největší účinnost byla prokázána ve směsi ACN s toluenem, byl upřednostněn aceton vzhledem k jeho účinnosti při extrakci ze vzorků zeleniny a nízké toxicitě [14].



Obrázek 12 – Zaznamenané cyklické voltamogramy β -karotenu na GCE v acetonu (červená), směsi ACN a toluenu (zelená), acetonitrilu (černá) a směsi ACN a MTBE (modrá) [14].

Při stanovení SWV byly pracovní elektrody porovnány a na základě naměřených hodnot v roztocích β -karotenu byla pro voltametrické měření vybrána AuE, která poskytla zřetelný pík při 0,503 V proti SCE. Naproti tomu měření s GCE poskytlo pík s dvakrát širším vrcholem při 0,499 V (obr.13) [14].



Obrázek 13 – SWV voltamogramy β -karotenu zaznamenané na AuE (A) a GCE (B) v acetonu [14].

Z naměřených hodnot byl vypočítán obsah β -karotenu ve vzorcích zeleniny a farmaceutických kapslích. Vzhledem k malým odchylkám od uváděného množství β -karotenu obsaženého v kapslích a při porovnání s dříve publikovanými údaji o obsahu v zelenině, byla voltametrická metoda označena za jednu z možných pro analýzu potravin [14].

Tabulka 4 – Obsah β -karotenu v zelenině a farmaceutických kapslích zjištěný pomocí měření SWV a spektrofotometricky [14].

Vzorek zeleniny	SWV [mg/100 g vzorku]	Spektrofotometrie [mg/100 g vzorku]	Skutečný obsah β -karotenu [mg/100 g vzorku]
Mrkev	7,32	7,38	-
Batáty	6,53	6,67	-
Vzorek kapsle	SWV [mg/kapsle]	Spektrofotometrie [mg/kapsle]	Skutečný obsah β -karotenu [mg/kapsle]
Betakaroten Forte®	14,75	14,87	15
Nutricius Betakaroten Extra®	12,34	12,35	15

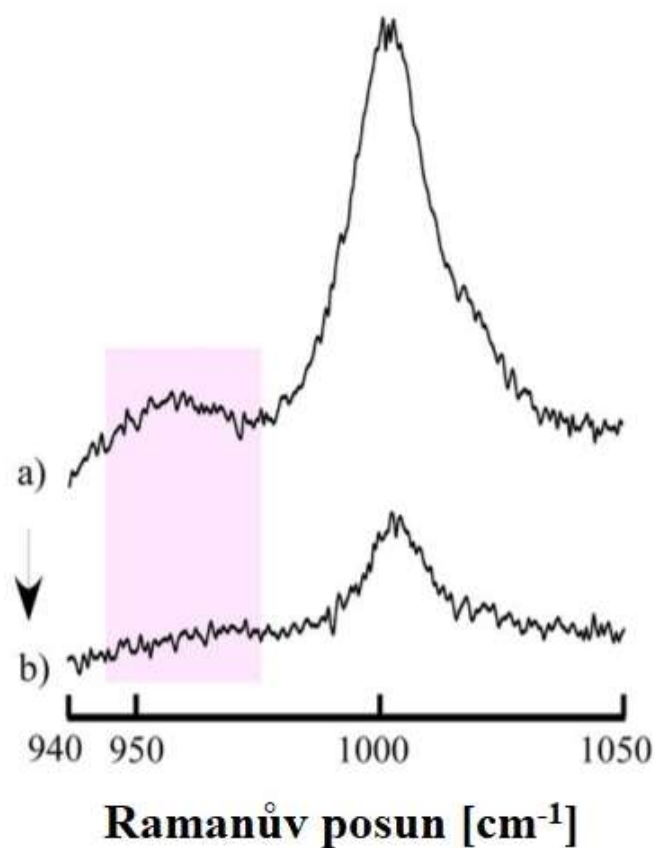
4.6 Analýza zapouzdření β -karotenu v SWCNT pomocí Ramanovy spektroeletrochemie

V této studii byl zjištěn vliv elektrochemického potenciálu jednostěnných uhlíkových nanotrubic (SWCNT) na zapouzdření a chování β -karotenu uvnitř dutin SWCNT, který byl následně zkoumán Ramanovou spektroeletrochemií schopnou získat informace o struktuře a vlastnostech materiálu a chemických reakcích [15; 16].

Zlatý drát byl upraven katalytickým inkoustem s dimerem acetátu molybdenitého a tetrahydrátem octanu kobaltnatého. Na povrch zlatého drátu byly pomocí chemického napařování syntetizovány jednostěnné uhlíkové nanotrubic (SWCNT) v křemenné trubici, až byl celý drát pokryt SWCNT. Kvůli zapouzdření β -karotenu bylo nutné odstranit konce SWCNT, k čemuž se ukázala jako užitečná elektrolýza s řízeným potenciálem (CPE). Vhodný potenciál k odstranění konců SWCNT byl zjištěn aplikací řady potenciálů na elektrody SWCNT v ACN s chloristanem tetra-*n*-butylamonium (TBAP).

Na GCE a vysoce orientovaného pyrolytického grafitu (HOPG) byl při oxidaci β -karotenu pozorován pouze jeden oxidační pík při 0,55 V, což potvrdilo jednokrokový dvouelektronový přenos. Na SWCNT elektrodě byl oxidační pík pozorován při negativnějším potenciálu, konkrétně při 0,48 V. Takový rozdíl naměřených potenciálů ukazuje, že došlo pouze ke slabé absorpci β -karotenu na SWCNT.

SWCNT elektroda byla umístěna do Ramanovy měřicí cely naplněné elektrolytem ACN s TBAP. Poté byla provedena CPE při 1,4 V, aby se odstranily konce SWCNT. Nejprve byla testována elektroda se SWCNT, která nebyla vystavena aplikovanému potenciálu. Poté byl navýšen potenciál a po určité době přidán β -karoten. Na základě měření bylo zjištěno, že zapouzdření β -karotenu uvnitř SWCNT závisí nejen na potenciálu, ale také na čase. Další zkoumání zapouzdření β -karotenu uvnitř elektrody bylo provedeno při 0,4 a 0,5 V, avšak intenzita píku byla nižší než při 0,3 V. Pro zjištění potenciální závislosti intenzity píku bylo po přidání β -karotenu aplikováno na SWCNT 0,3 V. Poté byl potenciál posunut na 0,5 V, přičemž se intenzita píku značně snížila (obr. 14) [15].



Obrázek 14 – Závislost intenzity Ramanova píku na SWCNT elektrodě v β -karotenu při změně potenciálu z 0,3 (a) na 0,5 (b) [15].

Optická absorpce neutrálního β -karotenu mizí, když se vytvoří kationtový radikál. Klesající intenzita vrcholu byla očekávána vzhledem k tomu, že oxidované formy β -karotenu jsou pro Ramanovo měření mimo rezonanční stav. β -Karoten byl oxidován už při 0,5 V na povrchu SWCNT, což odpovídá výsledkům získaným z voltametrických měření.

Organické molekuly se dají zapouzdřit a stabilizovat uvnitř uhlíkových nanotrubic (CNT). Zjistilo se, že oxidovaný β -karoten ve formě svých kationtových radikálů je nestabilní, i když je zapouzdřen, vzhledem k pozorované slabé adsorpci β -karotenu na povrchu SWCNT a potenciálovému posunu při oxidaci [15].

V případě voltametrického stanovení cholesterolu je možné využít elektrochemickou oxidaci 7-DHC v základních elektrolytech jako např. v ACN nebo anorganických kyselinách, které podporují strukturální změny molekul steroidů. Pro voltametrické měření byly použity diskové elektrody s chloridostříbrnou referenční elektrodou v ACN a platinovým drátkem jako pomocnou elektrodou.

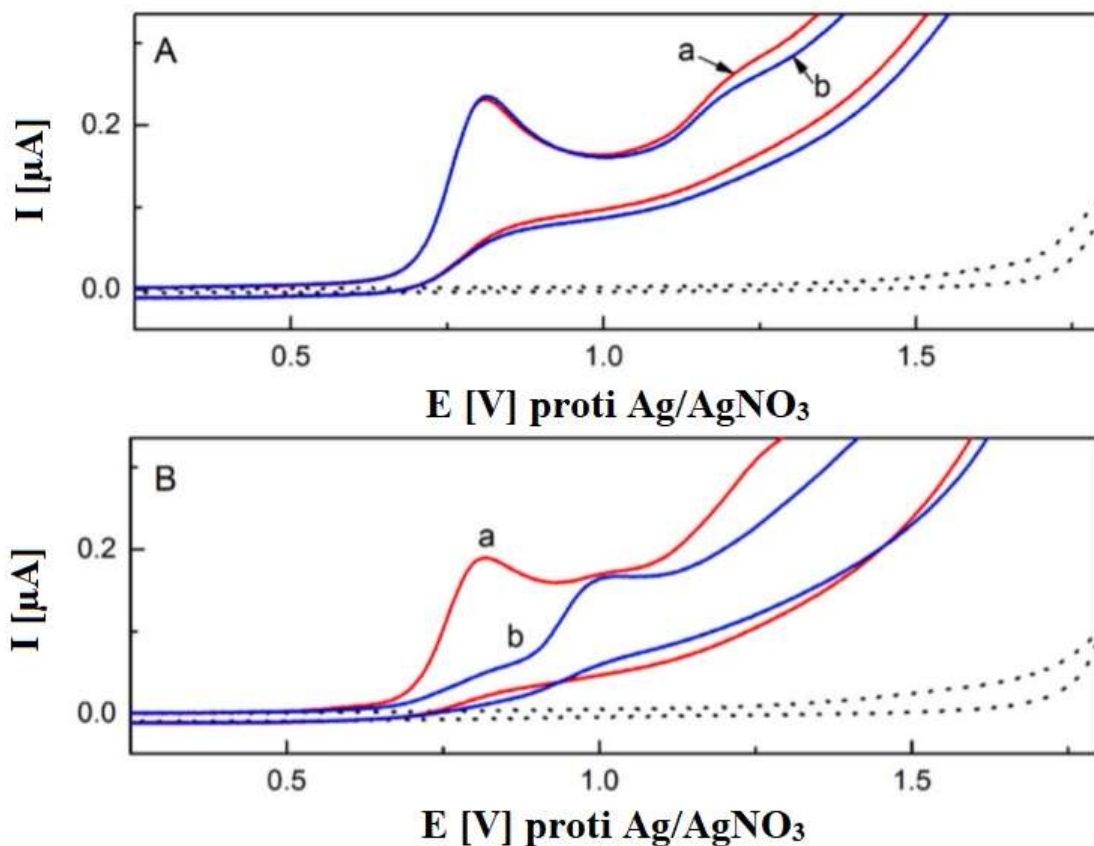
K přípravě vzorku 7-DHC v umělém séru byl použit zásobní roztok 7-DHC v ACN. Část vzorku byla smíchána s určitým objemem základního elektrolytu ACN. Aby se vysrážené proteiny oddělily, byl roztok centrifugován. Voltametrická měření proběhla v kapalině nad sedimentovaným proteinem neboli supernatantu [17].

Bligh-Dyerova extrakce je standardní postup izolace lipidové frakce z biologického materiálu. Směs methanolu, chloroformu a vody je schopná fázové separace rozpouštědel, přičemž se lipidy shlukují v chloroformové fázi. Pro tuto studii byl postup částečně upraven. K přípravě roztoku vzorku 7-DHC v umělém séru byl použit zásobní roztok 7-DHC v methanolu. Vzorek byl smíchán s chloroformem, methanolem a deionizovanou vodou, ve které byly obsaženy KCl, CaCl₂, NaCl, D-glukóza, močovina a HSA. Po promíchání tvořil roztok jednu fázi, opětovného vzniku dvoufázového systému bylo docíleno přidávkem chloroformu a deionizované vody, čímž se lipidy uzavřely do chloroformové fáze a fáze bylo možné oddělit. Struktura extraktu byla obnovena v NaClO₄ s ACN a voltametricky změřena [17; 20].

7-DHC je možné oxidovat v ACN s NaClO₄ na BDD, při potenciálu 0,8 V vzniká zřetelný pík, který je na rozdíl od roztoku s HClO₄ jako základním elektrolytem viditelný i po několika desítkách minut stání (obr. 16). Kromě NaClO₄ lze jako základní elektrolyt použít TBAHFP nebo tetrabutylamonium tetrafluoroborát (TBAHFP). Pro výpočet vyměněných elektronů a koeficient přenosu anodického náboje lze použít následující rovnici:

$$b = \frac{R \cdot T}{2 \cdot \alpha_a \cdot n \cdot F}$$

kde F = Faradayova konstanta, R = molární plynová konstanta, T = teplota, n = počet elektronů, α_a = koeficient přenosu anodického náboje. Po vyhodnocení vlivu obsahu vody na intenzitu elektrochemického signálu byl pro další měření vybrán bezvodý ACN, ve kterém byly zjištěny nejnižší hodnoty RSD pro několik po sobě jdoucích měření [17].



Obrázek 16 – CV 7-DHC na BDD elektrodě v ACN (a) s NaClO₄, (b) s HClO₄ ihned po přípravě vzorků (A) a hodinu po přípravě vzorků (B) [17].

Jako základní elektrolyty, které mohou způsobit strukturální změny 7-DHC stejně jako žlučové kyseliny, byly otestovány H₂SO₄, HClO₄, H₃PO₄ a HNO₃. V případě HClO₄ byla při měření v UV-VIS pozorována změna absorpčních maxim a přechodné zbarvení měřeného roztoku, které ukazuje na kyselé katalyzovanou hydrataci molekuly 7-DHC a také by mohlo znamenat možnost kolorimetrického stanovení. H₂SO₄ vykazovala podobné chování na rozdíl od H₃PO₄ a HNO₃, které nejsou dostatečně silné, aby vyvolaly chemickou přeměnu 7-DHC. Elektroanalýza 7-DHC s kyselinami nebyla shledána přínosnou vzhledem k vysokému oxidačnímu potenciálu a časové nestabilitě signálu.

Jako základní elektrolyt byl použit NaClO₄ v ACN a mimo BDD elektrody byly pro oxidaci 7-DHC použity také GCE a platinové diskové elektrody. BDD elektrody měly v porovnání s GCE zřetelnější signál a účinnější eliminaci nabíjecího proudu. Platinové elektrody poskytly dobrý signál při měření diferenční pulzní voltametrií (DPV) s chloridostříbrnou elektrodou, která stabilizovala potenciál oxidace. Nejnižší mez detekce byla

pozorována na BDD elektrodě, díky čemuž byla vybrána pro stanovení v umělém séru. Použití platinové elektrody poskytlo druhou nejnižší mez detekce, a proto byla zvolena pro stanovení v mikroobjemu umělého séra.

Možnosti elektrochemické analýzy 7-DHC byly nejprve hodnoceny detekcí v umělém séru. První možnost zahrnovala srážení proteinu s přídatkem ACN do umělého séra, druhá spočívala v aplikaci upraveného postupu extrakce podle Bligh-Dyera. Jednoduchou metodou eliminace proteinů je jejich vysrážení pomocí ACN a následná centrifugace. Při použití směsi ACN a umělého séra v poměru 9:1 bylo dosaženo nejvyššího signálu v DPV na BDD elektrodě. Při poklesu poměru směsi na 7:3 signál zkoumaného 7-DHC zmizel. Limit detekce se ukázal dostatečně nízký pro předběžný screening SLOS, jelikož koncentrace 7-DHC jsou u pacientů znatelně vyšší. Při Bligh-Dyerova extrakci byly lipidy po odpaření chloroformu rozpuštěny v NaClO₄ s ACN pro stanovení 7-DHC. Měření bylo provedeno na platinové a BDD elektrodě v koncentracích roztoku 7-DHC očekávaných u pacientů se SLOS. Pro stanovení diagnózy je znalost rozsahu měření 7-DHC jednou ze zásadních informací [17].

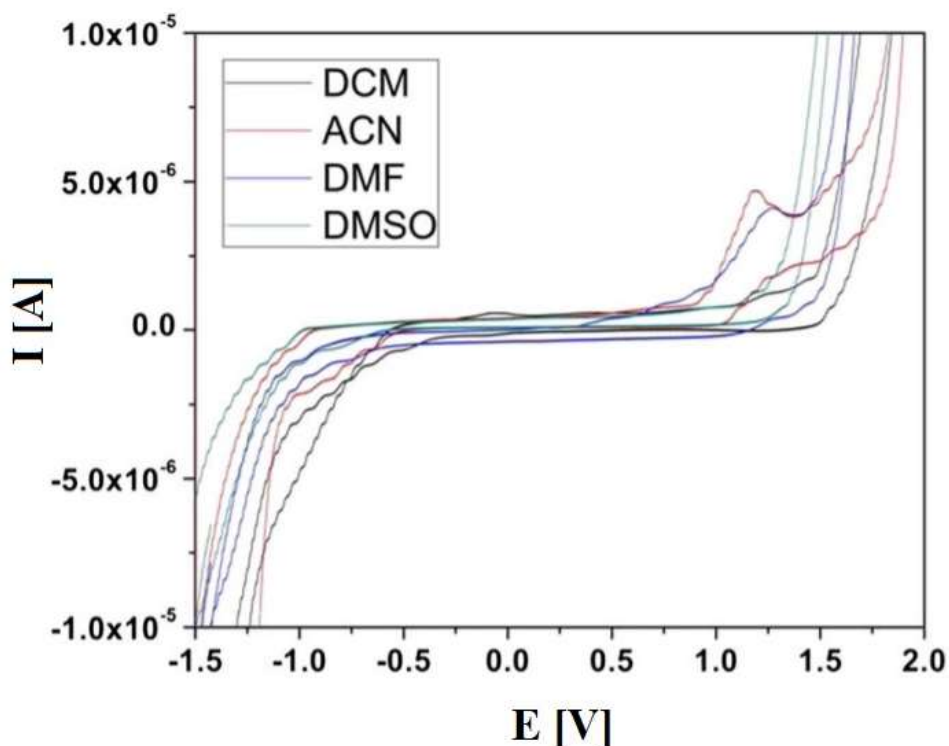
5.2 Detekce ergosterolu v houbách pomocí elektrochemie v organických rozpouštědlech

Ergosterol je dalším prekurzorem vitamínu D a vyskytuje se v plazmatických membránách hub a prvoků. Pro jeho detekci byla aplikována BDD elektroda v ACN, dimethylformamidu (DMF), dimethylsulfoxidu (DMSO) a DCM, přičemž pro analýzu se ukázal jako nejvhodnější ACN se základním elektrolytem TBAHFP [21; 22].

Zásobní roztoky byly připraveny rozpuštěním přesného množství ergosterolu ve všech uvedených rozpouštědlech. Ředěním zásobních roztoků TBAHFP byly připraveny kalibrační řady. Voltametrická měření proběhla na tříelektrodovém systému složeném z pracovní bórem dopované diamantové elektrody, chloridostříbrné referentní elektrody a platinovým drátkem jako pomocné elektrody. Vzorky hub byly vysušeny a rozdrceny na prášek, který byl použit k extrakci ve směsi methanolu s DCM v poměru 3:1, ve které byl poměr pevné a kapalné fáze 1:25. Pro spektrofotometrické stanovení byl vzorek rozpuštěn v ethanolu v poměru 1:10. Ethanol byl použit pro slepý pokus a absorbance byla měřena při $\lambda = 282$ nm. Na základě vzniklé kalibrační křivky byl vypočten obsah ergosterolu ve vzorku v mg/kg houby [22].

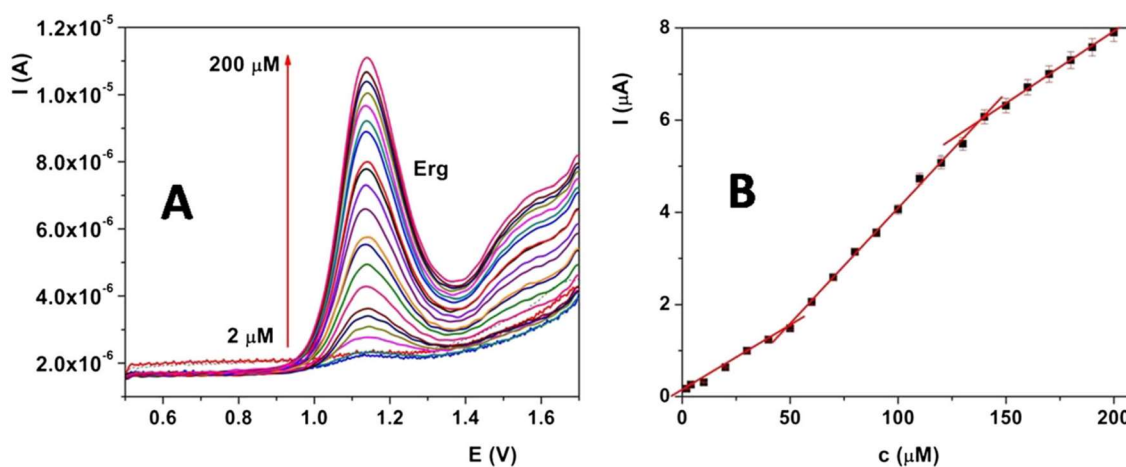
Ve všech rozpouštědlech poskytuje ergosterol ve sledované oblasti voltametrického měření jeden oxidační pík při vyšším potenciálu než 1 V. Elektrochemická odezva byla

sledována pouze v oblasti pozitivních hodnot potenciálu. Nejlepší oxidační odezva byla viditelně získána při měření v ACN, který byl na tomto základě vybrán pro další experimenty.



Obrázek 17 – Cyklické voltamogramy ergosterolu v DCM, ACN, DMF a DMSO [22].

Ze získaných voltamogramů pro koncentrační řadu ergosterolu v rozmezí 2-200 μM byla vytvořena kalibrační křivka se třemi lineárními rozsahy, které byly způsobeny povahou reakce na elektrodě. Ze začátku měření může být reakce řízena difúzí, pokračovat adsorpcí a v poslední řadě při vyšší koncentraci opět řízena difúzí [22].



Obrázek 18 – Voltamogramy pro koncentrační řadu ergosterolu v rozmezí 2-200 μM (graf A) Kalibrační křivka se třemi lineárními rozsahy (graf B) [22].

Výsledky měření byly porovnány s již zavedenými postupy pro stanovení ergosterolu. (Tab. 5) V porovnání s chromatografickými metodami byl zjištěn obdobný pracovní lineární rozsah a mez detekce. Hodnoty RSD měření potvrdily značnou přesnost navržené elektrochemické metody [22].

Tabulka 5 – Výsledky elektrochemického stanovení obsahu ergosterolu v extraktu hub a spektrofotometrického testu [22].

Vzorek	Elektrochemická metoda [mg/kg houby]	Spektrofotometrická metoda [mg/kg houby]
1	1240	1233
2	860	850
3	400	406

Přítomnost některých dalších sloučenin v přírodních produktech může působit interferenčně, a proto byla jejich případná aktivita testována pomocí SWV. Nejméně rušivý účinek byl zaznamenán u kyseliny askorbové, tu následoval kofein, který vykazuje elektrochemické vlastnosti při potenciálu 1,5 V na rozdíl od ergosterolu, který je elektroaktivní už při 1 V. Silný rušivý účinek byl zaznamenán v případě kyseliny gallové, u které došlo při zvýšení její koncentrace ke změně signálu oxidace ergosterolu. Na základě těchto výsledků byla potvrzena selektivita stanovení ergosterolu [22].

Závěr

V této práci je elektrochemická analýza využívající elektrických vlastností látek zaměřena na hlavními zástupce provitaminů, β -karoten a 7-dehydrocholesterol, které se metabolicky přeměňují na aktivní formu vitaminů. β -karoten patří do skupiny karotenoidů, štěpí se a následně redukuje enzymaticky katalyzovanou reakcí na retinol neboli vitamin A. Ze 7-dehydrocholesterolu vzniká fotolýzou a následnou přeměnou v játrech a ledvinách cholekalciferol neboli vitamin D.

Část věnovaná elektrochemickým analýzám je zaměřena na voltametrická měření a stanovení. Dle charakteru zkoumaných vlastností jsou pro jednotlivé analýzy voleny různé techniky s charakteristickým výběrem a uspořádáním elektrod. Analýza je provedena ze vzorků léčiv, potravin a roztoků s přidavkem rozpouštědel, která svými chemickými vlastnostmi ovlivňují průběh reakce a míru detekce.

Obsah této práce pojednává především o technikách cyklické voltametrie, diferenční pulzní voltametrie, lineární voltametrie a square wave voltametrie. Naměřené hodnoty a výsledky stanovení jsou vyhodnoceny v závislosti na použitém rozpouštědle, porovnány se vzorky o známém obsahu a s výsledky spektrofotometrického stanovení.

Literatura

- [1] KEDROVÁ, Kateřina. *MojeChemie: Biochemie: Vitamíny* [online]. [cit. 2021-03-30]. Dostupné z: <https://www.mojechemie.cz/Biochemie:Vitam%C3%ADny>
- [2] PETRA, Lavříková, Josef FONTANA a Jan TRNKA. *Funkce buněk a lidského těla: Vitamíny a výživa* [online]. [cit. 2021-03-30]. Dostupné z: <http://fbt.cz/skripta/ix-travici-soustava/7-vitaminy-a-vyziva/>
- [3] MURRAY, Robert K. *Harperova Biochemie*. 23. vyd., (4. české vyd.), v H & H 3. Jinočany: H & H, 2002. Lange medical book. ISBN 80-7319-013-3.
- [4] HIGDON, Jane. Carotenoids. *Oregon State University* [online]. Linus Pauling Institute [cit. 2021-06-14]. Dostupné z: <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/carotenoids>
- [5] ANTHONY, Kiara. Carotenoids: Everything You Need to Know. *Healthline* [online]. San Francisco: Healthline Media Inc., 2005 [cit. 2021-06-15]. Dostupné z: <https://www.healthline.com/health/carotenoids>
- [6] TOPOLČAN, Ondřej. *Vitamin D*. Brno: Tribun EU, 2012. ISBN 978-80-263-0321-2.
- [7] DOHNAL, Vlastimil, Ježková ALENA a Skládanka JIŘÍ. Ergosterol: Klíčový steroid hub. *Kontakt* [online]. 449-454 [cit. 2021-06-15]. Dostupné z: doi:10.32725/kont.2008.066
- [8] ČŮTA, František a Milan POPL. *Instrumentální analýza*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1986.
- [9] BAREK, Jiří, František OPEKAR a Karel ŠTULÍK. *Elektroanalytická chemie*. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-1146-5.
- [10] SUÁREZ-FERNÁNDEZ, Avelino L., Gabriel ALARNES-VARELA a Agustín COSTA-GARCÍA. Electrode kinetic studies of β -carotene in aprotic solvents with carbon fiber microelectrodes. *Electrochimica Acta* [online]. 1999, **44**(25), 4489-4498 [cit. 2021-05-20]. ISSN 00134686. Dostupné z: doi:10.1016/S0013-4686(99)00107-3
- [11] LIU, Dezhong, Yunlong GAO a Lowell D. KISPERT. Electrochemical properties of natural carotenoids. *Journal of Electroanalytical Chemistry* [online]. 2000, **488**(2), 140-150 [cit. 2022-01-29]. ISSN 15726657. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-0728(00)00205-9
- [12] ZIYATDINOVA, Guzel, Endzhe ZIGANSHINA a Herman BUDNIKOV. Voltammetric determination of β -carotene in raw vegetables and berries in Triton X100

- media. *Talanta* [online]. 2012, **99**, 1024-1029 [cit. 2022-01-29]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2012.07.093
- [13] ION, Ana, Vassilia PARTALI, Hans-Richard SLIWKA a Florinel GABRIEL BANICA. Electrochemistry of a carotenoid self-assembled monolayer. *Electrochemistry Communications* [online]. 2002, **4**(9), 674-678 [cit. 2022-01-29]. ISSN 13882481. Dostupné z: doi:10.1016/S1388-2481(02)00430-7
- [14] JASHARI, Granit, Sali MURIQI, Tahir ARBNESHI, Radovan METELKA, Ivan ŠVANCARA a Milan SÝS. A new voltammetric approach for the determination of β -carotene in vegetables and pharmaceutical capsules using a gold electrode. *Talanta* [online]. 2021, **227** [cit. 2022-01-30]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2021.122088
- [15] TOMINAGA, Masato, Noriaki WATANABE a Yuto YATSUGI. In situ Raman spectroelectrochemical study of potential-induced molecular encapsulation of β -carotene inside single-walled carbon nanotubes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* [online]. 2017, **800**, 156-161 [cit. 2022-01-30]. ISSN 15726657. Dostupné z: doi:10.1016/j.jelechem.2016.11.042
- [16] BLACHA-GRZECHNIK, Agata, Krzysztof KARON a Przemyslaw DATA. Raman and IR Spectroelectrochemical Methods as Tools to Analyze Conjugated Organic Compounds. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2018, (140) [cit. 2022-02-08]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/56653
- [17] KLOUDA, Jan, Lenka BENEŠOVÁ, Pavel KOČOVSKÝ a Karolina SCHWARZOVÁ-PECKOVÁ. Voltammetry of 7-dehydrocholesterol as a new and useful tool for Smith-Lemli-Opitz syndrome diagnosis. *Talanta* [online]. 2021, **229** [cit. 2022-02-06]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2021.122260
- [18] MARTA, Ježová. Fetopatologie a vývojová patologie embrya a plodu: Smith-Lemli-Opitz syndrom (SLOS). *Atlases* [online]. [cit. 2022-02-07]. Dostupné z: https://atlases.muni.cz/atlases/feto/atl_cz/smithlemliopitz.html
- [19] CERQUEIRA, Nuno M. F. S. A., Eduardo F. OLIVEIRA, Diana S. GESTO, Diogo SANTOS-MARTINS, Cátia MOREIRA, Hari N. MOORTHY, Maria J. RAMOS a P. A. FERNANDES. Cholesterol Biosynthesis: A Mechanistic Overview. *Biochemistry* [online]. 2016, **55**(39), 5483-5506 [cit. 2022-02-08]. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biochem.6b00342
- [20] BREIL, Cassandra, Maryline ABERT VIAN, Thomas ZEMB, Werner KUNZ a Farid CHEMAT. “Bligh and Dyer” and Folch Methods for Solid–Liquid–Liquid Extraction of Lipids from Microorganisms. Comprehension of Solvation Mechanisms and towards Substitution with Alternative Solvents. *International Journal of Molecular Sciences*

[online]. 2017, **18**(4) [cit. 2022-02-08]. ISSN 1422-0067. Dostupné z:
doi:10.3390/ijms18040708

- [21] PAPOUTSIS, Konstantinos, Simona GRASSO, Ajay MENON, Nigel P. BRUNTON, James G. LYNG, Jean-Christophe JACQUIER a Deep Jyoti BHUYAN. *Recovery of ergosterol and vitamin D2 from mushroom waste - Potential valorization by food and pharmaceutical industries* [online]. 2020, **99**, 351-366 [cit. 2022-02-08]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2020.03.005
- [22] VUKOJEVIĆ, Vesna, Sladjana DJURDJIĆ, Lubomír ŠVORC, Tanja Ćirković VELIČKOVIĆ, Jelena MUTIĆ a Dalibor M. STANKOVIĆ. Analytical Approach for Detection of Ergosterol in Mushrooms Based on Modification Free Electrochemical Sensor in Organic Solvents. *Food Analytical Methods* [online]. 2018, **11**(9), 2590-2596 [cit. 2022-02-06]. ISSN 1936-9751. Dostupné z: doi:10.1007/s12161-018-1249-3