

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
Katedra analytické chemie

Voltametrické stanovení vitamínu D₃ pomocí pevné elektrody
ze skelného uhlíku ve vodně-ethanolickém prostředí

DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Bc. Julie Holubová

VEDOUCÍ PRÁCE: Ing. Radovan Metelka, Ph.D.

KONZULTANT: Ing. Milan Sýs, Ph.D.

2019

UNIVERSITY OF PARDUBICE

FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

Department of Analytical Chemistry

Voltammetric determination of vitamin D₃ using glassy carbon
electrode in water-ethanolic solution

DIPLOMA THESIS

AUTHOR: Bc. Julie Holubová

SUPERVISOR: Ing. Radovan Metelka, Ph.D.

CONSULTANT: Ing. Milan Sýs, Ph.D.

2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Julie Holubová**
Osobní číslo: **C16604**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Voltametrické stanovení vitamínu D3 pomocí pevné elektrody ze skelného uhlíku ve vodně-etanolickém prostředí**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Na základě vámi získaných informací z dostupné literatury vypracujte rešerši, která bude především věnována elektrochemickému chování cholecalciferolu. Dále můžete popsat biologickou aktivitu tohoto vitamínu, vliv na lidské zdraví a standartní metody určené pro jeho monitorování v potravinách.
2. V experimentální části se zaměřte především na výběr optimálních pracovních podmínek pro anodickou diferenčně pulzní voltametrii cholecalciferolu. Pokuste se vámi vyvinutou elektroanalytickou metodou stanovit obsah vitamínu D3 ve vybraných vzorcích potravinových doplňků.
3. Dosažené výsledky kriticky zhodnoťte a diskutujte.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Radovan Metelka, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Milan Sýs, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **20. února 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, 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 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. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Bc. Julie Holubová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce panu Ing. Radovanu Metelkovi, PhD., a konzultantovi panu Ing. Milanu Sýsovi, PhD., za odborné vedení a cenné rady, které byly nezbytné pro zhotovení této diplomové práce. Také chci poděkovat své rodině, která mi umožnila studium na vysoké škole.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá elektrochemickým stanovením vitamínu D. Teoretická část uvádí obecný popis vitamínu D, dále popisuje jeho chemickou strukturu, fyziologické účinky, vlastnosti a výskyt v potravinách. Kromě elektrochemického stanovení je také věnována pozornost dalším možnostem stanovení pomocí chromatografických či spektrofotometrických metod. Experimentální část se zaměřuje na výběr nejvhodnějších podmínek pro měření a optimalizaci samotné voltametrické techniky. V poslední části byla metoda ověřena analýzou modelového a reálných vzorků.

KLÍČOVÁ SLOVA

Cholekalciferol, vitamin D, pevná elektroda ze skelného uhlíku, voltametrie, potraviny

ANNOTATION

This diploma thesis is focused on electrochemical determination of vitamin D. Theoretical parts presents with general description of vitamin D, it's chemical structure, physiological effects, properties and occurrence in food. Beside electrochemical determination also other analytical methods are described with use of chromatographic or spectrophotometric techniques. Experimental part focused on choosing the best measurement conditions and optimization of voltammetric technique itself. Developed method was also verified by analysis of both model and real samples.

KEY WORDS

Cholekalciferol, vitamin D, glassy carbon electrode, voltammetry, food

OBSAH

ÚVOD	15
1 Teoretická část	16
1.1 Historie vitamínu D	16
1.2 Vitamin D	16
1.2.1 Chemická struktura vitamínu D	16
1.2.2 Fyzikální a chemické vlastnosti	18
1.2.3 Metabolismus vitamínu D	18
1.2.4 Funkce vitamínu D ₃ v lidském organismu	19
1.2.5 Hypovitaminóza	20
1.2.6 Hypervitaminóza	20
1.2.7 Výskyt vitamínu D ₃ v potravinách	20
1.3 Možnosti stanovení vitamínu D ₃ v potravinách	22
1.3.1 Chromatografické metody	22
1.3.1.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie	23
1.3.1.2 Plynová chromatografie	23
1.3.1.3 Tenkovrstvá chromatografie	24
1.3.2 Spektrální metody	25
1.3.2.1 Spektrofotometrie	25
1.4 Elektrochemické metody	25
1.4.1 Voltametrie	25
1.4.1.1 Pracovní elektrody	26
1.4.2 Elektrochemie vitamínu D	27
1.4.2.1 Elektrochemické vlastnosti vitamínu D	27
1.4.2.2 Voltametrické stanovení vitamínu D	28
2 Experimentální část	31
2.1 Chemikálie a materiály	31

2.2	Příprava pracovních roztoků	31
2.3	Přístrojové vybavení.....	31
2.4	Pracovní podmínky	32
2.5	Příprava vzorku k analýze	33
3	Výsledky a diskuse	34
3.1	Elektrochemické chování vitamínu D ₃	34
3.2	Optimalizace pracovních podmínek.....	35
3.2.1	Složení pracovního média.....	35
3.2.2	Optimalizace použité voltametrické techniky.....	38
3.2.3	Vliv pH pracovního elektrolytu	40
3.3	Validace vyvinuté voltametrické metody.....	41
3.3.1	Opakovatelnost měření	41
3.3.2	Kalibrační závislost.....	43
3.3.3	Srovnání se stávajícími metodami	45
3.4	Analýza modelového a reálných vzorků	46
3.4.1	Analýza modelového vzorku	46
3.4.2	Analýza reálných vzorků	47
4	Závěr	51
5	Použitá literatura	52

Seznam použitých ilustrací a tabulek

Obrázek 1. Porovnání steroidní a sekosteroidní struktury [2].	17
Obrázek 2. Chemická struktura cholekalciferolu a ergokalciferolu [5].	17
Obrázek 3. Metabolismus vitamínu D ₃ [10].	19
Obrázek 4. Cyklický voltamogram vitamínu D ₃ o koncentraci 7,8.10 ⁻⁴ mol·l ⁻¹ v 90% methanolu s 0,05 mol·l ⁻¹ acetátového pufru za použití elektrody ze skelného uhlíku [39].	27
Obrázek 5. Elektrochemická oxidace vitamínu D ₃ [36].	28
Obrázek 6. Cyklické voltamogramy 1.0 mmol·l ⁻¹ vitamínu D ₂ a D ₃ v acetonitrilu, ethanolu a dichlormethanu [35].	29
Obrázek 7. Adsorpční rozpouštěcí square wave voltametrie vitamínu D ₃ o koncentracích 0, 1, 10, 20, 30, 40 a 50 μmol·l ⁻¹ [40].	30
Obrázek 8. Elektrochemický analyzátor Autolab PGSTAT101 (vlevo), měrný tříelektroodový systém s laboratorním stojanem a magnetickým míchadlem (vpravo).	32
Obrázek 9. Opakovaná cyklická voltametrie (10 cyklů) 0,2 mmol·l ⁻¹ cholekalciferolu na GCE v 50% ethanolu obsahujícím 0,1 mol·l ⁻¹ LiClO ₄ při v = 50 mV·s ⁻¹ .	34
Obrázek 10. Ukázka voltamogramu 100 μmol·l ⁻¹ cholekalciferolu pro obsah ethanolu 50 % a 100 %. Měřeno metodou DPV na GCE při E _{ampl} = 25 mV a v = 50 mV·s ⁻¹ .	36
Obrázek 11. Závislost proudu na množství ethanolu v pracovním elektrolytu obsahujícím vždy 0,1 mol·l ⁻¹ LiClO ₄ . Měřeno pro koncentraci 100 μmol·l ⁻¹ cholekalciferolu metodou DPV na GCE při E _{ampl} = 25 mV a v = 50 mV·s ⁻¹ .	36
Obrázek 12. Ukázka voltamogramu 100 μmol·l ⁻¹ cholekalciferolu pro obsah 0,01 (červená), 0,05 (modrá) a 0,1 mol·l ⁻¹ LiClO ₄ (zelená). Měřeno metodou DPV na GCE při E _{ampl} = 25 mV a v = 50 mV·s ⁻¹ .	37
Obrázek 13. Závislost proudu píku cholekalciferolu na množství LiClO ₄ v pracovním elektrolytu obsahujícím vždy 50% ethanol. Měřeno pro koncentraci 100 μmol·l ⁻¹ cholekalciferolu metodou DPV na GCE při E _{ampl} = 25 mV a v = 50 mV·s ⁻¹ .	38
Obrázek 14. Voltamogramy pro 50 μmol·l ⁻¹ cholekalciferolu při různých amplitudách pulzu. DPV na GCE v 50% ethanolu obsahující 0.05 mol·l ⁻¹ LiClO ₄ pro v = 50 mV·s ⁻¹ .	39
Obrázek 15. Vliv amplitudy na velikost proudu píku 50 μmol·l ⁻¹ cholekalciferolu. DPV na GCE v 50% ethanolu obsahující 0.05 mol·l ⁻¹ LiClO ₄ pro v = 50 mV·s ⁻¹ .	39

Obrázek 16. Vliv rychlosti skenu na velikost proudu píku $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ cholekalciferolu. DPV na GCE v 50% ethanolu obsahující $0.05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ LiClO}_4$, $E_{\text{ampl}} = 50 \text{ mV}$	40
Obrázek 17. Vliv pH základního elektrolytu na proud píku $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ cholekalciferolu. DPV na GCE v $0.05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ BRB pufru obsahujícím 50% ethanol pro $E_{\text{ampl}} = 50 \text{ mV}$ a $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$	41
Obrázek 18. Proud y píku pro deset po sobě jdoucích měření na jednom povrchu GCE pro koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ cholekalciferolu. GCE, $0.05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ LiClO}_4$, 50% ethanol, $E_{\text{ampl}} = 140 \text{ mV}$, $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$	42
Obrázek 19. DPV voltamogramy pro 0 (základní linie), 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 a $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ cholekalciferolu. GCE, $0.05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ LiClO}_4$, 50% ethanol, $E_{\text{ampl}} = 140 \text{ mV}$, $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$	43
Obrázek 20. Graf závislosti výšky píku na koncentraci cholekalciferolu, rozmezí koncentrace cholekalciferolu $1\text{-}500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. GCE, $0.05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ LiClO}_4$, 50% ethanol, $E_{\text{ampl}} = 140 \text{ mV}$, $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$	44
Obrázek 21. Grafy závislosti výšky píku na koncentraci cholekalciferolu v rozmezí koncentrace cholekalciferolu $1\text{-}10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (A) a $1\text{-}100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (B). Výsledky naměřeny za optimálních podmínek.	44
Obrázek 22. Graf závislosti plochy píku na koncentraci cholekalciferolu v rozmezí koncentrace cholekalciferolu $1\text{-}10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (A) a $1\text{-}100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (B). Výsledky naměřeny za optimálních podmínek.	45
Obrázek 23. Graf standardního přídávku ($3\times 10 \mu\text{l}$ přídávky $0.01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zásobního roztoku do 10 ml pracovního média) při analýze modelového vzorku o koncentraci $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ cholekalciferolu. Výsledky zaznamenány za optimálních podmínek: $0.05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ LiClO}_4$, 50% ethanol, $E_{\text{ampl}} = 140 \text{ mV}$, $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$	47
Obrázek 24. DPV voltamogramy cholekalciferolu pro vzorek a přídávky ($3\times 10 \mu\text{l}$ $0.01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zásobního roztoku) při analýze doplňku stravy PRO formula. Výsledky zaznamenány za optimálních podmínek: $0.05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ LiClO}_4$, 50% ethanol, $E_{\text{ampl}} = 140 \text{ mV}$, $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$	48
Obrázek 25. Graf znázorňující metodu standardního přídávku ($4\times 5 \mu\text{l}$ přídávky $0.01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zásobního roztoku do 10 ml pracovního média) při analýze doplňku stravy Optisana. Výsledky zaznamenány za optimálních podmínek: $0.05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ LiClO}_4$, 50% ethanol, $E_{\text{ampl}} = 140 \text{ mV}$, $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$	49
Obrázek 26. Graf znázorňující metodu standardního přídávku ($3\times 10 \mu\text{l}$ přídávky $0.01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zásobního roztoku do 10 ml pracovního média) při analýze doplňku stravy PRO formula.	

Výsledky zaznamenány za optimálních podmínek: $0.05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ LiClO}_4$, 50% ethanol, $E_{\text{ampl}} = 140 \text{ mV}$, $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$	49
Tabulka 1. Obsah vitamínu D v některých potravinách [4-5,16].....	21
Tabulka 2. Přehled naměřených hodnot pro výběr vhodné úpravy elektrody.....	42
Tabulka 3. Porovnání se stávajícími voltametričnými metodami.	46
Tabulka 4. Porovnání vlivu výšky a plochy píku na výtěžnost vyvinuté metody.	47
Tabulka 5. Analýza multivitaminových doplňků.	50

SEZNAM ZKRATEK

AdSV	adsorptivní rozpouštěcí voltametrie
BRB	Britton-Robinsonův pufr
CPE	uhlíková pastová elektroda
CV	cyklická voltametrie
DAD	detektor s diodovým polem
DBP	protein vázající vitamin D
DME	kapající rtuťová elektroda
DPV	diferenční pulzní voltametrie
EtOH	ethanol
FID	plamenově-ionizační detektor
GC	plynová chromatografie
GCE	pevná elektroda ze skelného uhlíku
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MeOH	methanol
NP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s normálními fázemi
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
RSD	relativní směrodatná odchylka
SDS	dodecylsíran sodný
SFE	extrakce nadkritickou tekutinou
SKE	nasyčená kalomelová elektroda
SMDE	statická rtuťová kapková elektroda
SPE	extrakce tuhou fází

SWV	square wave voltametrie
TLC	tenkovrstvá chromatografie
UV	ultrafialové záření

ÚVOD

Vitamin D patří mezi vitaminy rozpustné v tucích, ale narozdíl od ostatních lipofilních vitaminů může být v těle částečně syntetizován a není nutné ho vždy dodávat potravou. Vitamin D je pro lidský organismus nepostradatelný, jelikož reguluje hladinu vápníku a fosforu v krvi, je nezbytný k udržení svalové kontrakce a vedení vzruchu nervy. Bylo však zjištěno, že vitamin D má celou řadu dalších významných účinků a účastní se mnoha patogenetických procesů, proto se v poslední době dostává stále více do centra pozornosti. Obecně analýza lipofilních vitaminů je složitá a časově náročná kvůli jejich lipofilnímu charakteru a nutnosti použít několik kroků přípravy vzorku před vlastní analýzou. V současné době se tyto vitaminy běžně stanovují chromatografickými metodami, zejména HPLC.

Co se týče elektrochemické analýzy lipofilních vitamínů, byl doposud největší počet vědeckých publikací věnován vitaminu E. Voltametrickému stanovení vitaminu D na elektrodách ze skelného uhlíku nebo jakýchkoliv jiných elektrodách nebyla dosud věnována příliš velká pozornost. Cílem této práce bylo zjistit možnosti voltametrického stanovení vitaminu D na elektrodě ze skelného uhlíku. Toto stanovení by mělo představovat jednodušší, rychlejší a podstatně levnější variantu analýzy ve srovnání s chromatografickými technikami bez nutnosti náročného zpracování vzorku.

1 Teoretická část

1.1 Historie vitamínu D

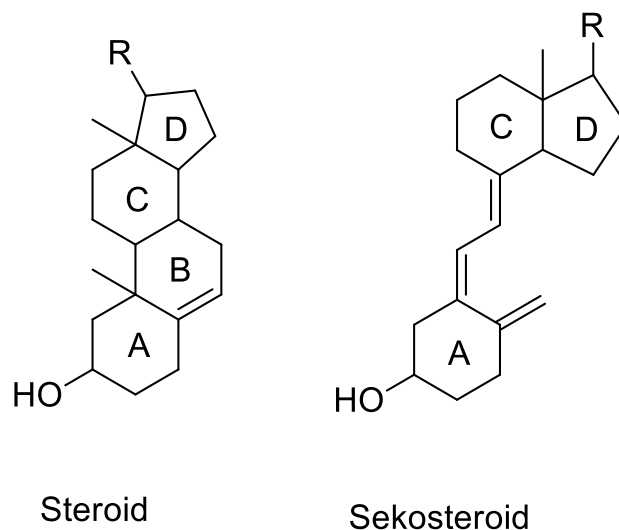
První zmínky o vitamínu D souvisí s nemocí zvanou rachitida. Již v polovině 16. století Whistler a Glisson nezávisle na sobě publikovali vědecké popisy rachitidy v latině. Jejich zveřejnění nijak nezměnilo pohled společnosti na prevenci tohoto onemocnění a rachitida se stala vleklým zdravotním problémem. Souvislost mezi výskytem rachitidy a slunečním světlem byla poprvé popsána v letech 1886 a 1890 Hirschem a Palmem, avšak definitivně byla potvrzena až v roce 1919, kdy Huldschinsky prokázal, že UV paprsky jsou účinné při léčbě rachitidy. V roce 1919 Sir Edward Mellanby po pokusech na štěňatech zjistil, že rachitidě je možné zabránit podáváním oleje z tresčích jater. V roce 1932 byla struktura vitamínu D₂ objasněna současně Windausem a kol. v Německu, který ji označil jako vitamin D₂, a Angusem a spoluautory v Anglii, který ji označil jako cholekalciferol. V roce 1936 Windaus a kol. objasnili strukturu vitamínu D₃, který izolovali z oleje z tresčích jater. Během dalších let byla potvrzena jeho syntéza v ledvinách, jeho přítomnost ve střevní sliznici, byla prokázána přítomnost receptorů kalcitriolu v leukocytech a objevena jeho užitečnost při léčbě lupénky a mnoha dalších nemocích. V poslední době je zkoumána hlavně spojitost mezi koncentrací vitamínu D v krvi a onemocněním kardiovaskulárního systému [1-3].

1.2 Vitamin D

Vitaminy skupiny D označujeme jako kalciferoly. Vitamin D se v přírodě vyskytuje ve dvou formách (cholekalciferol a ergokalciferol), které se liší pouze strukturou postranního řetězce. Na základě jejich rozpustnosti je řadíme mezi vitaminy rozpustné v tucích. Vitaminy skupiny D vznikají ze svých provitaminů účinkem ultrafialového záření a vykazují významnou antirachitickou aktivitu [4].

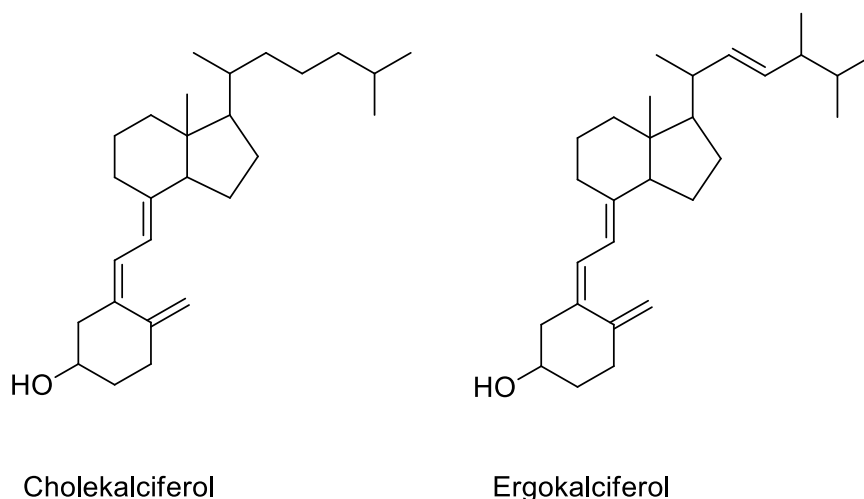
1.2.1 Chemická struktura vitamínu D

Vitaminy skupiny D patří mezi sekosteroidy. Sekosteroidy jsou steroidy podobné cholesterolu, ale s rozštěpeným B kruhem [2]. Rozdíl mezi strukturou steroidu a sekosteroidu je znázorněn na Obrázku 1.



Obrázek 1. Porovnání steroidní a sekosteroidní struktury [2].

Struktury obou forem vitamínu D jsou odvozeny od jejich provitaminů, které jsou tvořeny cyklopentaperhydrofenanthrenem s C-18 a C-19 methylovými skupinami, C-3 hydroxylovou skupinou a C-5(6), C-7(8) systémem konjugovaných dvojných vazeb v kruhu B. Formy vitamínu D se vzájemně liší délkou a uspořádáním postranního řetězce v poloze C-17 [5]. Struktury obou forem vitamínu D jsou znázorněny na Obrázku 2.



Obrázek 2. Chemická struktura cholekalciferolu a ergokalciferolu [5].

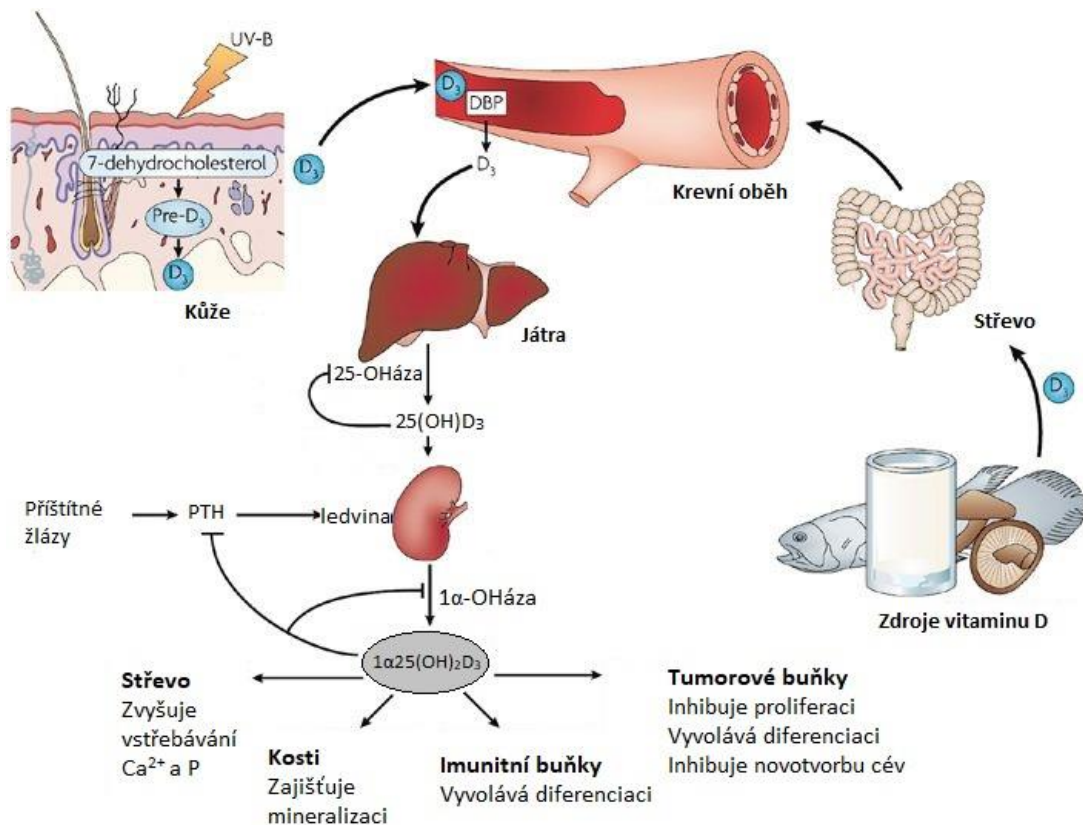
1.2.2 Fyzikální a chemické vlastnosti

Kalciferoly jsou bílé až nažloutlé krystalické látky, které dobře absorbují UV záření díky přítomnosti systému konjugovaných dvojných vazeb. Tyto vitaminy jsou rozpustné v 95% ethanolu, acetonu, tucích a olejích, ale nerozpustné ve vodě. Jsou termolabilní, citlivé na světelné záření a kyselé prostředí. V roztoku u obou vitaminů dochází k reverzibilní tepelné izomeraci na odpovídající provitaminy. Vitamin D je stabilní v alkalickém prostředí, avšak v kyselém prostředí izomeruje za vzniku dvou izomerů: 5,6-*trans* vitaminu D a isotachysterolu. Tyto izomery nemají významnou antirachitickou aktivitu. [3,11] Teplota tání vitaminu D₂ je 114 °C a vitaminu D₃ je 83-86 °C [12].

1.2.3 Metabolismus vitaminu D

Vitamin D₃, označovaný jako cholekalciferol je nejvýznamnější formou vitaminu D. Vzniká působením UV záření o vlnové délce 280-320 nm v buňkách pokožky ze 7-dehydrocholesterolu. Množství takto vzniklého vitaminu je závislé na délce vystavení jedince UV záření, zeměpisné šířce nebo ročním období [6,7]. Druhou formou vitaminu D je vitamin D₂, taky označovaný jako ergokalciferol, který je do těla přijímán s potravou. Ergokalciferol vzniká v rostlinách z ergosterolu. Oba vitaminy mají shodný biologický účinek a vedou ke vzniku kalcidiolu a kalcitriolu [5,8].

Dalším osudem vitaminu D je jeho transport do jater, kde je metabolizován. Vitamin D₃, který vznikne v kůži, je do jater transportován specifickým proteinem krevní plazmy, který váže vitamin D (DBP, vitamin D-Binding Protein). Vitamin D₃ (nebo D₂) přijímaný potravou je absorbován v tenkém střevě a do jater transportován pomocí chylomikronů a DBP vazebného proteinu. Zde dojde k hydroxylaci pomocí 25-hydroxylázy za vzniku 25-hydroxykalciferolu neboli kalcidiolu 25(OH)D₃. To je hlavní cirkulující forma vitaminu D a právě ta se využívá při stanovení hladiny vitaminu D v krvi. Kalcidiol je následně transportován DBP proteinem do proximálních tubulů ledvin, kde je opět hydroxylován 1- α -hydroxylázou na 1,25-dihydrokalciferol neboli kalcitriol 1 α 25(OH)₂D₃. Kalcitriol je nejúčinnější metabolit vitaminu D. Uplatňuje se při resorpci vápníku z potravy a také ovlivňuje strukturu kostní tkáně. Metabolismus vitaminu D je znázorněn podrobněji na Obrázku 3 [4,8,9].



Obrázek 3. Metabolismus vitamínu D₃ [10].

1.2.4 Funkce vitamínu D₃ v lidském organismu

Funkce vitamínu D v lidském organismu jsou velmi různorodé. Jeho hlavní funkcí je regulace hladiny vápníku a fosforu v krvi. Stimulací střevních buněk zvyšuje resorpci vápníku a fosforu ze střeva, tím stoupá hladina vápníku a fosforu v séru. Zajišťuje mineralizaci kostní tkáně a pomáhá tak při správném růstu kostí a zubů. Podle nejnovějších studií vitamin D poskytuje ochranu před rozvojem osteoporózy a hypertenze. Pomáhá také v prevenci nádorového bujení, jelikož inhibuje tvorbu nádorových buněk. Při studiu svalové tkáně bylo prokázáno, že se vitamin D váže na specifické receptory ve svalové tkáni a vyvolává tak syntézu proteinů, které ovlivňují růst buněk svalu. Vitamin D tedy pozitivně ovlivňuje funkci svalu. Vitamin D hraje také významnou roli v imunitním systému, ovlivňuje totiž odolnost organismu vůči bakteriálním infekcím a má schopnost působit například proti *Mycobacterium tuberculosis* [3,13-15].

1.2.5 Hypovitaminóza

Nedostatek vitamínu D vede k nedostatečné absorpci vápníku ze střeva. Časnými příznaky jsou snížená hladina vápníku v séru spolu se zvýšenou hladinou parathormonu, což vede k demineralizaci kostí. U dětí se nedostatek vitamínu D nazývá rachitida (křivice), hlavními projevy jsou deformace páteře, hrudníku a dlouhých kostí. U dospělých se nedostatek vitamínu D projevuje jako osteomalacie, která je charakterizována měknutím kostí [3,8].

Mezi rizikové faktory u nedostatku vitamínu D patří předčasný porod, pigmentovaná kůže, nedostatečná expozice vůči slunečnímu záření a pokročilý věk, protože kůže starších lidí produkuje méně vitamínu D. Nedostatek vitamínu D převládá více v Evropě než v Asii, Austrálii nebo USA. V Evropě se hladiny 25(OH)D₃ vztahují k zeměpisné šířce. Překvapivě nejvyšší hladiny 25(OH)D₃ byly pozorovány ve skandinávských zemích, naopak nejnižší hladiny byly zjištěny v jižní Evropě. To může být způsobeno jejich světlou kůží, častější expozicí kůže slunečnímu záření nebo používáním multivitaminových doplňků [16].

1.2.6 Hypervitaminóza

Vysoké dávky vitamínu D jsou velmi toxické. Intoxikace nemůže nastat přílišným sluněním, nastává pouze po požití kontaminovaného produktu nebo při předávkování vitaminovými doplňky. Intoxikace se obvykle projeví při překročení dávky 250 µg/den. Časná hypervitaminóza se projevuje bolestmi hlavy, nevolnostmi, průjmy nebo zmateností. V akutní fázi se hypervitaminóza projevuje srdeční arytmií, křečemi a může vést až k nevratné kalcifikaci srdce nebo plic [2-3,8].

1.2.7 Výskyt vitamínu D₃ v potravinách

Potraviny rostlinného původu obsahují jen velmi malé množství vitamínu D. Z potravin rostlinného původu jsou dobrým zdrojem zejména hříby nebo kokosové máslo. Významnější jsou zdroje živočišného původu, ty jsou však omezeny jejich malým množstvím. Tučné ryby jako sled', sardinka, tuňák nebo losos jsou bohatým zdrojem vitamínu D. Pozoruhodně vysoké koncentrace však najdeme v jaterních tučných mořských ryb jako halibut, makrela nebo treska. Nižší obsah vitamínu D má maso, hovězí játra, vejce a mléčné výrobky. Koncentrace vitamínu D v mléce je proměnná, souvisí s množstvím slunečního světla, které je k dispozici pro syntézu vitamínu D.

Obsah cholekalciferolu proto bývá v zimním období asi čtyřikrát nižší než v období letním [5,11]. Přehled vybraných potravin je uveden v Tabulce 1.

V USA a Kanadě jsou mléka fortifikována vitaminem D obvykle v množství 400 IU na porci, aby splnila doporučený denní příspěvek vitaminu D 10 µg. Fortifikací rozumíme umělé obohacení potravin. Fortifikace vitaminem D se provádí z důvodu vstřebávání vápníku. Mezi další potraviny, které se běžně obohacují o vitamin D, patří sušené odstředěné mléko, snídaně cereálie, kojenecká výživa nebo sušené polévkové směsi. Vitamin D se přidává buď jako olejový roztok nebo v kombinaci s vitaminem A. Co se týká stability vitaminu D v potravinách, jejich skladování, zpracování nebo vaření obecně neovlivňují aktivitu vitaminu. Vitamin D je odolný při uzení ryb a sterilizaci i pasteraci mléka, je zničen pouze při oxidaci tuků [11]. Denní dávka pro člověka je závislá na jeho věku a na intenzitě ozařování pokožky. Denní potřeba vitaminu D je 2,5 až 10 µg, dávka je vyšší u kojenců a těhotných žen [4-5].

Tabulka 1. Obsah vitaminu D v některých potravinách [4-5,16].

Potravina	Obsah kalciferolů (µg/kg)
Halibut v oleji	35000
Kakaový prášek	750
Rybí tuk	250
Tuňák	50-80
Vaječný žloutek	75
Hříby	21
Máslo	13,4
Hovězí játra	11,3
Sýry	8
Smetana	4
Maso	3
Telecí játra	1,3
Mléko	0,6

1.3 Možnosti stanovení vitamínu D₃ v potravinách

Obecně stanovení vitaminů v potravinách není lehký úkol, jelikož jejich koncentrace jsou vzhledem k ostatním složkám velmi nízké. V dnešní době se stanovení vitaminů v potravinách rutinně provádějí pomocí mikrobiologických nebo analytických metod. Přestože byl dosažen značný pokrok ve vývoji analytických metod, tyto metody obecně postrádají citlivost a selektivitu biologických stanovení. Nicméně tyto fyzikálně-chemické způsoby stanovení mají tu výhodu, že nejsou časově náročné jako zmíněné biologické testy. Mezi biologické metody patří např. biologické testy na zvířatech nebo enzymatické metody. Při instrumentálním stanovení lipofilních vitaminů v potravinách se nejčastěji používají chromatografické a spektrofotometrické metody, které budou podrobněji popsány v následujících podkapitolách [3,11].

1.3.1 Chromatografické metody

Před samotným chromatografickým stanovením vitamínu D v potravinách je nutné zařadit následující kroky, které souhrnně nazýváme příprava vzorku k analýze. Mezi tyto kroky patří homogenizace potraviny, hydrolýza, extrakce analytu, zkoncentrování a čištění finálního vzorku.

Při přípravě vzorku by se měla věnovat největší pozornost jeho homogenizaci, vzorek by neměl přijít do styku se slunečním zářením či vlhkostí. Nejčastěji používanou metodou pro hydrolýzu vzorku potravin obsahující vitamin D je saponifikace s alkoholickým roztokem KOH, pro tučné potraviny je dokonce povinná. Saponifikace zajistí odstranění nadbytku triglyceridů, které by rušili stanovení. Saponifikace je alkalická hydrolýza prováděná za horka, která vede k izomeraci vitamínu D na jeho provitamin. Nicméně bylo zjištěno, že v důsledku tepelné izomerace dochází ke ztrátě vitamínu D o 10 až 20 %; tento problém se nyní řeší studenou alkalickou hydrolýzou [11,18-19].

V dalším kroku pro úspěšné stanovení je velmi důležité, aby byl vitamin D kvantitativně extrahován z potravinové matrice, čímž se odstraní i rušivé látky rozpustné ve vodě. Jelikož vitamin D a jeho metabolity jsou steroly rozpustné v tucích, extrahují se organickými rozpouštědly. Pro extrakci rozpouštědlem se nejčastěji používají například methanol/chloroform (2:1) nebo hexan/isopropylalkohol (1:1). Mezi další metody, které se používají pro extrakci vitamínu D ze vzorku potravin, patří extrakce nadkritickou tekutinou (SFE, Supercritical Fluid Extraction) nebo extrakce tuhou fází (SPE, Solid Phase Extraction) [11,18-19].

Přečistění extrahovaného vzorku se liší podle typu potravinové matrice. Například u fortifikovaného mléka se využívá semipreparativní HPLC. U krmiv je nutné dvoustupňové čišťení sloupcovou chromatografií na alumině, aby se oddělil vitamin D od vitaminu E a karotenoidů, a následně se čistí frakce vitaminu D pomocí semipreparativní HPLC [19].

1.3.1.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, High-Performance Liquid Chromatography) je v současné době nejpoužívanější metoda pro stanovení lipofilních vitaminů v potravinách. Jedná se o referenční metodu pro stanovení vitaminu D v potravinách ČSN EN 12821 (560047). Běžně se využívá při analýze mléčných výrobků, kojenecké výživy nebo masa a masných výrobků [18,20]. Je to nedestruktivní metoda a mezi její výhody patří vysoká selektivita detekce a schopnost oddělit vitaminy bez potřeby derivatizace [11]. Principem metody je rozdělování jednotlivých složek analytu mezi stacionární a mobilní fázi. Dle polarity stacionární fáze rozdělujeme HPLC na normální (NP-HPLC) a reverzní (RP-HPLC). U RP-HPLC je stacionární fáze méně polární (např. C-18) než fáze mobilní (např. voda), u NP-HPLC je stacionární fáze polárnější (např. silikagel) než fáze mobilní (např. hexan) [21].

Obsah vitaminu D₃ a jeho metabolitu 25(OH)D₃ v různých prasečích tkáních metodou HPLC stanovovali Burild a kolektiv. Cílem této studie bylo prozkoumat potenciál zvýšení obsahu vitaminu D₃ v prasečích tkáních zvýšením hladiny vitaminu D₃ a 25(OH)D₃ v krmivech pro prasata. Po homogenizaci byly do testovaného vzorku přidány vnitřní standardy vitaminu D₂ a 25(OH)D₂, vzorky byly zmýdelněny a extrahovány směsí diethyletheru a petroletheru (1:1). V dalším kroku byl vzorek čištěn extrakcí tuhou fází a preparativní NP-HPLC. Pro konečnou separaci byla zvolena RP-HPLC, vitamin D₃ a jeho metabolit byly detekovány UV detektorem a detektorem diodového pole DAD. Tato studie prokázala, že zvýšené množství vitaminu D₃ v krmivu zvyšuje obsah vitaminu D₃ ve vepřovém masu [22].

1.3.1.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC, Gas Chromatography) je analytická metoda, která na rozdíl od HPLC využívá jako mobilní fázi inertní plyn (např. He, N₂, Ar). Zplyněný vzorek je dávkován přímo do proudu nosného plynu, který ho unáší skrze kolonu umístěnou v termostatu, kde nastává dělení na jednotlivé složky. Principem dělení je

rozdílná rozpustnost složek v kapalně stacionární fázi. Jednotlivé složky směsi jsou pak unášeny nosným plynem až k detektoru [21].

Tato metoda není příliš vhodná pro stanovení vitamínu D, jelikož je tepelně nestálý. Pro zvýšení stability a těkavosti vitamínu D je nutné provést derivatizaci polární hydroxylové funkční skupiny, která může během měření způsobovat nelineární odezvu detektoru a adsorpci, ta se projeví na chromatogramu jako široké píky. K derivatizaci hydroxylové skupiny vitamínu D se nejčastěji používá silylace a acylace, nejvhodnějšími derivatizačními činidly jsou trimethylsilylchlorid a trifluoracetanhydrid [18,23].

Nair a kolektiv stanovovali vitamín D₂ a D₃ v krvi a játrech potkanů, kterým byli podávány vysoké dávky těchto vitamínů. Vzorek byl homogenizován s ethanolem a pyrogallolem a rušivé sloučeniny jako provitaminy nebo cholesterol byly vysráženy digitoninem. Následovala hydrolýza 50% ethanolickým roztokem KOH a extrakce hexanem. Extrakt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií s oxidem hlinitým jako stacionární fází. Při analýze oba vitamíny podléhaly tepelné cyklizaci, což vedlo ke vzniku pyro- a isopyro- derivátů. V důsledku této transformace byli na chromatogramu viditelné dvojité píky, u kterých bylo prokázáno, že jsou kvantitativně tvořeny z mateřských sloučenin. Vitamíny a jejich cyklizáty byly derivatizovány hexamethyldisilazanem a trimethylsilylchloridem. Deriváty byly detekovány plamenově-ionizačním detektorem FID [24].

1.3.1.3 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie (TLC, Thin Layer Chromatography) je ideální pro stanovení lipofilních vitamínů, jelikož se jedná o jednoduchou, citlivou a selektivní metodu nenáročnou na úpravu vzorku. Další nespornou výhodou je její ekonomická dostupnost. Samotná separace probíhá na stacionární fázi, která je tvořena např. silikagelem nebo oxidem hlinitým, stacionární fáze je nanesena na pevné desce ze skla či hliníku. Vzorek se nanáší na linii startu sorbentu, poté se podložka vloží do vyvíjecí komory, kde je eluována vhodnými organickými rozpouštědly.

Hossu a kolektiv použili TLC analýzu pro stanovení vitamínu D v doplňcích stravy. Jako stacionární fázi použili silikagel, mobilní fáze byla zvolena směs rozpouštědel cyklohexan/ether/benzen (8:4:1). Vitamin D byl detekován postřikem směsi kyseliny sírové, acetanhydridu a 10% ethanolu a zahřátím na 110 °C po dobu 5 minut. Při TLC jsou vitamín D i jeho provitaminy a estery snadno ovlivněny

podmínkami okolního prostředí, hrozí zde riziko degradace a jejich zničení oxidací. Je tedy doporučováno pracovat ve tmě a v proudu dusíku při teplotě 0 °C [25].

1.3.2 Spektrální metody

1.3.2.1 Spektrofotometrie

Principem spektrofotometrie je schopnost látky absorbovat elektromagnetické záření v ultrafialové (200-400 nm) nebo viditelné (400-750 nm) oblasti světla. Vitamin D stejně jako jeho provitaminy vykazuje poměrně nízkou absorpci v UV oblasti s maximem 265-280 nm. Schopnost vitaminu D absorbovat záření v UV oblasti světla je dána jeho trienovou strukturou a zřejmě proto, že ne všechny dvojné vazby jsou rovinné, je absorbance nižší, než by se dalo očekávat. Samotná UV spektrometrie není příliš vhodná pro rutinní stanovení vitaminu D, ale velmi často je využívána ve spojení s chromatografickými metodami, zejména jako detekce pro HPLC [26].

Byrdwell a kolektiv stanovovali vitamin D₃ ve fortifikovaném pomerančovém džusu metodou HPLC. Vzorky byly extrahovány směsí diethylether a petrolether a poté přečištěny preparativní NP-HPLC. Pro konečnou separaci byla zvolena metoda RP-HPLC, jako mobilní fáze byla použita směs acetonitril/methanol (2:3). Pro detekci vitaminu D₃ byla zvolena UV detekce a kvadrupólová hmotnostní spektrometrie [27].

1.4 Elektrochemické metody

Elektrochemické metody představují možnou alternativu k výše popsaným instrumentálním metodám. Podstatou těchto metod je studium procesů (elektrochemických reakcí) probíhající na rozhraní elektrod a pracovního elektrolytu, který obsahuje stanovovanou látku. Mezi tyto metody lze zařadit voltametrii, potenciometrii a amperometrii. Tato diplomová práce je konkrétně zaměřena na voltametrické metody pro stanovení vitaminu D v potravinách a výživových doplncích.

1.4.1 Voltametrie

Počátky polarografie (resp. voltametrie) se datují do první poloviny 20. století, kdy český vědec a nositel Nobelovy ceny Jaroslav Heyrovský sestavil první polarograf. Polarografie a voltametrie jsou elektrochemické techniky, při kterých je měřen proud, který prochází elektrochemickým článkem v závislosti na vloženém potenciálu. Proud procházející elektrodou je přímo úměrný koncentraci stanovované látky, která podléhá oxidaci nebo redukci [28-29].

Rozdíl mezi polarografií a voltametrií je v typu použitých elektrod. V polarografii se elektrochemická měření provádí pouze na kapající rtuťové elektrodě (DME). U voltametrie převládají pevné elektrodové materiály, jejichž povrch se nemění během měření, jmenovitě visící rtuťová kapková elektroda (HMDE), nejrozšířenější uhlíkové materiály, či ryze kovové elektrody [30-31]. V této diplomové práci byla použita pevná elektroda ze skelného uhlíku (GCE).

1.4.1.1 Pracovní elektrody

Pracovní elektrody představují vodivý elektrický materiál neobsahující žádné příměsi, které by mohli eventuálně rušit stanovení. Mnoho jich je komerčně dostupných či se dají laboratorně připravit. Nejčastěji se vyrábí ve válcovitém tvaru, kdy bývá pracovní plocha definována izolačním materiálem, jako například teflon. V dnešní moderní době se také uplatňují jednorázové planární elektrody, takzvané tištěné elektrody (Screen-Printed Electrodes - SPEs). Hlavní výhodou těchto elektrod je možnost přípravy elektrod o různém tvaru a velikosti [29,31].

Za hlavní nevýhodu pevných elektrod lze považovat složité obnovování povrchu po každé analýze, neboť v mnoha případech dochází k adsorpci stanovované látky či jejich produktů. Stav povrchu určuje opakovatelnost získaných výsledků a je tedy rozhodujícím faktorem. Způsob obnovování se liší na základě typu pracovní elektrody nebo elektrodového materiálu. Nejčastěji se provádí leštění nebo elektrochemická regenerace.

Často používanými materiály pro výrobu pevných elektrod jsou různé modifikace uhlíku, dále pak zlato či platina. Mezi pevné elektrody patří klasické GCE, nebo také pastová uhlíková elektroda (CPE), kterou lze připravit smícháním uhlíkového prášku a pastovací kapaliny. V současné době jsou vyvíjeny stále nové materiály a modifikace elektrod za účelem zvýšení selektivity stanovení [29,32].

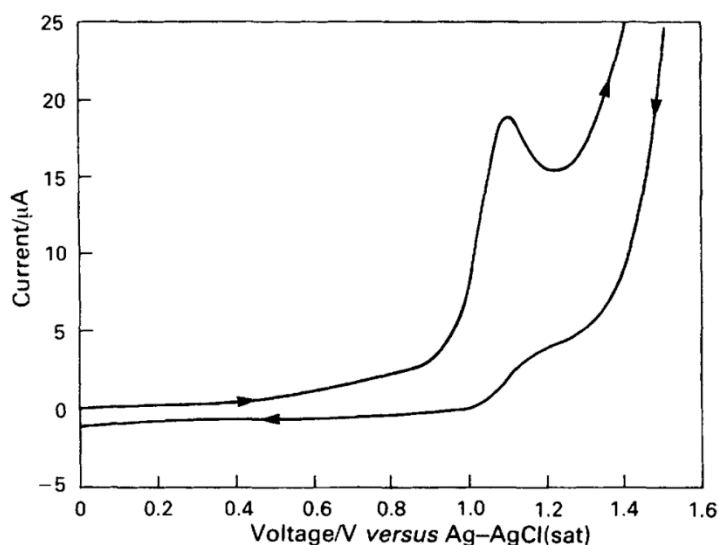
Pro stanovení vitamínu D₃ již byly použity následující elektrody: rotující GCE, klasická GCE, GCE/SiO₂/GO/Ni(OH)₂ (amorfni částice hydroxidu nikelnatého na hybridním materiálu, který se skládá ze silikagelu a GCE modifikované grafenem), GCE/poly(ARS)MWCNTs (GCE modifikovaná alizarinovou červení a uhlíkovými nanotrubicemi) a GCE/AuPd (GCE modifikovaná bimetalickými nanočásticemi zlata a palladia) [33-37].

1.4.2 Elektrochemie vitamínu D

I přes značný biologický význam vitamínu D a jeho derivátů existuje o těchto sloučeninách poměrně málo elektrochemických studií. Bylo vyvinuto pouze několik voltametrických metod pro stanovení tohoto vitamínu. Přitom je nutné připomenout některé výhody, mezi které patří nízké pořizovací náklady, možnost miniaturizace a časová nenáročnost. Tyto metody obvykle nevyžadují kvalifikovaný pracovní personál a složitou úpravu vzorku. Díky těmto výhodám si výroba elektrochemických senzorů, které mohou být použity pro detekci vitamínu D, získala v poslední době velkou pozornost [34-35,38].

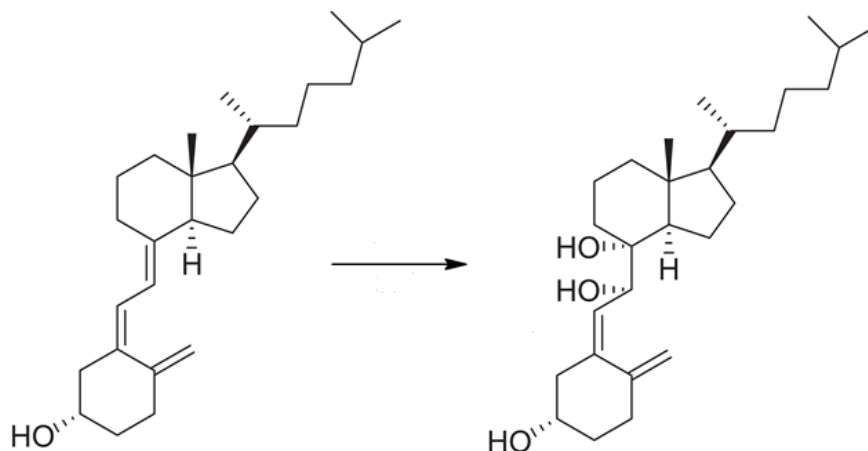
1.4.2.1 Elektrochemické vlastnosti vitamínu D

Elektrochemické vlastnosti vitamínu D shrnul Richard Webster ve své studii z roku 2012, kdy pomocí cyklické voltametrie pozoroval elektrochemické chování vitamínů D₂ a D₃ v prostředí methanolu a acetátového pufru. Jak můžeme vidět na Obrázku 4, vitamin D₃ vykazoval elektrochemickou aktivitu, neboť poskytoval intenzivní oxidační pík. Tento proces je považován za chemicky ireverzibilní, protože při skenování metodou cyklické voltametrie (CV) byl zjištěn pouze oxidační signál bez přítomnosti zpětného redukčního píku. Oxidační potenciál pro oba vitamíny byl přibližně +1,1 V vs. SKE [39]. To znamená, že ve vzorcích potravin nebude možné jednotlivé formy od sebe odlišit. Tudíž voltametricky lze stanovit pouze sumu těchto forem a vztáhnout ji na jednu z nich, eventuálně výsledky uvádět jako celkový obsah vitamínu D.



Obrázek 4. Cyklický voltamogram vitamínu D₃ o koncentraci $7,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v 90% methanolu s $0,05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ acetátového pufru za použití elektrody ze skelného uhlíku [39].

Za elektroaktivitu vitamínu D jsou pravděpodobně zodpovědné trienové skupiny v polohách 5, 7 a 10 a hydroxylové funkční skupiny v poloze 3. Jak je znázorněno na Obrázku 5 k oxidaci dochází v jednom kroku na trienových skupinách molekuly [36].

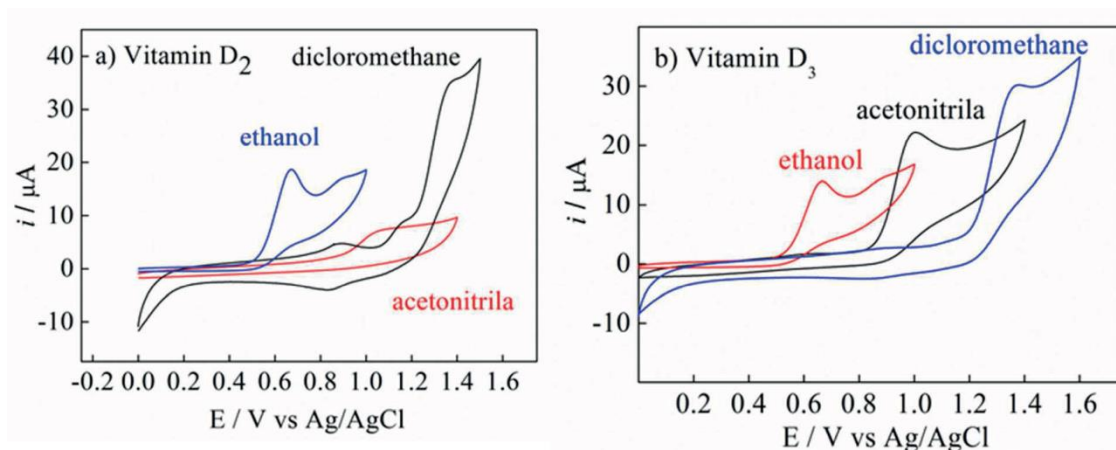


Obrázek 5. Elektrochemická oxidace vitamínu D₃ [36].

Další elektrochemické experimenty týkající se vitamínu D₂ byly provedeny metodou CV v elektrolytu obsahujícím roztok ethanolu a LiClO₄, který zajišťoval jeho elektrickou vodivost. Jako pracovní elektroda byla vybrána GCE a jako referentní chloridostříbrná elektroda (Ag/AgCl). Nevratný oxidační pík byl detekován přibližně při potenciálu +1,4 V. Během oxidačního skenování byla pozorována u obou vitamínů adsorpce produktů oxidace na povrch elektrody, což vedlo ke snížení oxidačního proudu píku při opakovaném skenování [39].

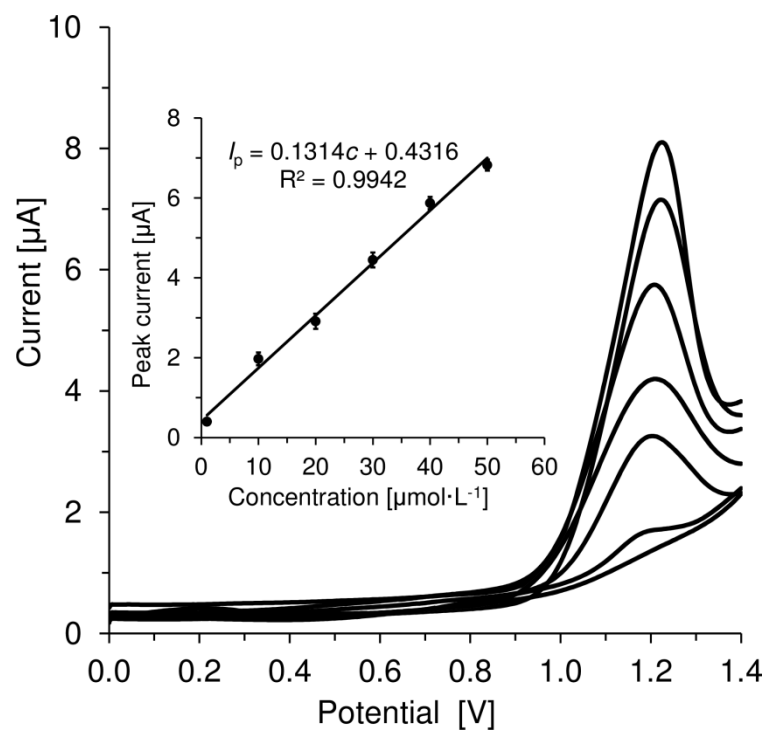
1.4.2.2 Voltametrické stanovení vitamínu D

Cincotto a kolektiv stanovovali vitamin D₃ v různých elektrolytech. Elektrochemický článek byl složen z pracovní elektrody GCE, jako referentní elektroda byla zvolena chloridostříbrná elektroda (Ag/AgCl s KCl) a jako pomocná elektroda byl použit platinový drát. Nejdříve autoři experimentu pomocí CV potvrdili elektrochemickou aktivitu vitamínu D za použitých podmínek. Nejlepší výsledky měření vykazoval vodně-ethanolicke elektrolyt obsahující 0,1 mol·l⁻¹ chloristan lithný, což je ilustrováno na Obrázku 6. Z obrázku je zřejmé, že reakce probíhala opět ireverzibilně. Stanovení vitamínu a interferenční studie probíhala úspěšně pomocí metody diferenční pulzní voltametrie (DPV) [35].



Obrázek 6. Cyklické voltamogramy $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ vitamínu D₂ a D₃ v acetonitrilu, ethanolu a dichlormethanu [35].

Nallbani a kolektiv stanovovali vitamin D₃ pomocí adsorpční rozpouštěcí voltametrie (AdSV, Adsorptive Stripping Voltametry). Principem metody je akumulace analytu na povrch elektrody adsorpcí, následně se elektrochemicky aktivní látky stanoví z výšek píků při jejich oxidaci nebo redukci. Elektrochemický článek byl složen z pracovní elektrody GCE, jako referentní elektroda byla zvolena chloridostříbrná elektroda a jako pomocná elektroda byl použit platinový drát. Nejprve byla provedena adsorpce na povrch GCE ponořením pracovní elektrody do různých vodně-organických roztoků, které obsahovaly $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ vitamínu D₃. Jako optimální byl zvolen 40 % ethanolický roztok, který díky své nízké těkavosti zaručuje konstantní složení vodně-organického roztoku během adsorpce. Poté byl adsorbovaný vitamin D₃ anodicky oxidován metodou square wave voltametrie (SWV) v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Britton-Robinsonově pufru, což je ilustrováno na Obrázku 7. Z obrázku je patrné, že reakce probíhala opět ireverzibilně [40].



Obrázek 7. Adsorpční rozpouštěcí square wave voltametrie vitaminu D₃ o koncentracích 0, 1, 10, 20, 30, 40 a 50 μmol·L⁻¹ [40].

2 Experimentální část

2.1 Chemikálie a materiály

Chemikálie o p.a. čistotě použité pro přípravu roztoků byly zakoupeny od různých výrobců. Pro přípravu zmíněných roztoků byla použita redestilovaná voda, která byla připravena demineralizací destilované vody pomocí přístroje Multi-Q od společnosti MERCK. Jednotlivé chemikálie a jejich výrobci jsou uvedeny níže:

Chloristan lithný	SIGMA ALDRICH, Steinheim, Německo
Kyselina fosforečná 85%	PENTA, Praha, Česká Republika
Kyselina octová 99,8%	MERCK, Darmstadt, Německo
Kyselina boritá	LACHEMA, Neratovice, Česká Republika
Vitamin D ₃ – cholekalciferol	MERCK, Darmstadt, Německo
Ethanol 96%	LACHEMA, Neratovice, Česká Republika

2.2 Příprava pracovních roztoků

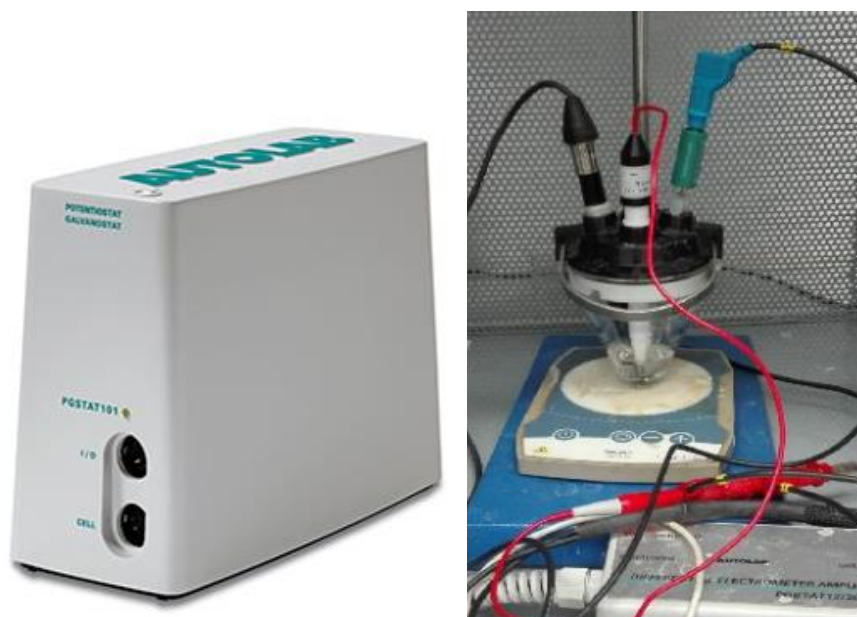
Pro přípravu 50 ml standardního roztoku o koncentraci $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ byl použit cholekalciferol od firmy MERCK. I přes garantovanou stabilitu tohoto vitamínu byl tento zásobní roztok uchováván v lednici při teplotě 5°C . V případě potřeby byl tento roztok dále ředěn 96% ethanolem. Vzniklé roztoky byly taktéž uchovávány v lednici při 5°C . Veškeré elektrochemické experimenty byly prováděny ve vodně-ethanolicích směsích s přidávkem chloristanu lithného. Během přípravy těchto roztoků se odstranil přebytečný vzduch za pomoci ultrazvukové lázně po dobu 20 min.

2.3 Přístrojové vybavení

K navažování bylo použito analytických vah od společnosti BOECO a při odvzdušňování zásobních elektrolytů byla použita ultrazvuková lázeň od firmy BANDELIN ELECTRONIC GmbH.

Voltametrické měření bylo realizováno v tříelektrodovém uspořádání složené z elektrody ze skelného uhlíku (GCE), chloridostříbrnou referentní elektrodou (Ag/AgCl) a pomocnou elektrodou z platinového drátu. Pro ilustraci je celkový set znázorněn na Obrázku 8. Zmíněné elektrody byly připojeny k potenciostatu Autolab PGSTAT101 od společnosti METROHM (Praha, Česká Republika). Během měření byl

pro nastavení parametrů metody, zaznamenání a vyhodnocení výsledků použit software Nova verze 1.11. Statistické údaje byly následně zpracovány v programu Excel.



Obrázek 8. Elektrochemický analyzátor Autolab PGSTAT101 (vlevo), měrný tříelektrodový systém s laboratorním stojanem a magnetickým míchadlem (vpravo).

2.4 Pracovní podmínky

Měření se uskutečňovala ve skleněné voltametrické cele, která obsahovala 20 ml pracovního elektrolytu. Před každým měřením bylo nutné obnovit povrch elektrody opláchnutím čistým hexanem s následným leštěním vodnou suspenzí aluminu (velikost částic 1 μm) po dobu 10 s, jelikož produkty elektrochemické oxidace cholekalciferolu zůstávaly po měření adsorbovány na povrchu GCE. Pro studium elektrochemického chování cholekalciferolu na GCE v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ LiClO}_4$ v 50% ethanolu byla zvolena cyklická voltametrie (CV) s následujícími parametry:

Počáteční potenciál	0 V
Koncový potenciál	+1,2 V
Potenciálový krok (E_{step})	5 mV
Rychlost skenu (v)	$50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

Vlastní analýza reálných vzorků (vitaminové doplňky stravy) byla prováděna pomocí diferenční pulzní voltametrie (DPV), která musela být optimalizována. Níže jsou již uvedené optimální parametry DPV. Optimalizace zahrnovala kromě nastavení

těchto parametrů i výběr a složení pracovního roztoku, což je dále diskutováno. DPV cholekalciferolu na GCE byla provedena za následujících podmínek:

Počáteční potenciál	0 V
Koncový potenciál	+1,2 V
Potenciálový krok	5 mV
Hodnota amplitudy (E_{ampl})	140 mV
Doba pulzu (t_{int})	0,5 s
Rychlost skenu (ν)	50 mV·s ⁻¹

2.5 Příprava vzorku k analýze

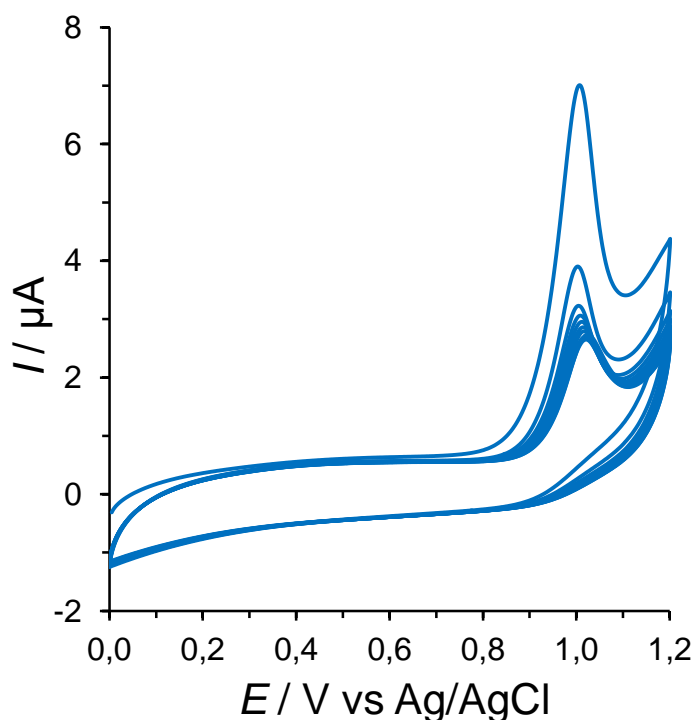
Byly analyzovány dva různé doplňky stravy: Optisana (vápník + vitamin D), který je běžně k dostání v prodejnách Tesco Česká republika ČR a.s., a doplněk stravy PRO formula (vápník + vitamin D₃ + vitamin K) volně prodejný v Lidl Česká republika v.o.s. V 50 ml pracovního elektrolytu (0.05 mol·l⁻¹ LiClO₄ v 50% ethanolu) bylo rozpuštěno vždy 8 tablet jednoho ze vzorku doplňku stravy. Rozpuštění se provádělo vložením do ultrazvukové lázně po dobu 30 min a zbylá usazenina byla zfiltrována na filtračním papíru. Výsledný filtrát o objemu 10 ml byl analyzován voltametriky a vyhodnocen metodou standardního přídatku. Byly použity tři přídatky o koncentraci 0,001 mol·l⁻¹ cholekalciferolu v 96% ethanolu. Analýza každého vzorku byla opakována nejméně třikrát.

3 Výsledky a diskuse

Bylo studováno elektrochemické chování vitamínu D₃ pomocí CV, výsledky jsou diskutovány v následujících kapitolách. Dále je popsána optimalizace DPV, která spočívala v nalezení vhodného obsahu ethanolu a LiClO₄ a parametrů voltametrické techniky. Z důvodu lipofilního charakteru analytu byla veškerá měření prováděna ve vodně-ethanolických směsích, jejichž hodnota pH byla upravena přidávkem 0.1 mol·l⁻¹ Britton-Robinsonova pufru (BRB). Pro zvýšení vodivosti těchto roztoků byla použita lithná sůl v podobě LiClO₄.

3.1 Elektrochemické chování vitamínu D₃

Na Obrázku 9 je patrné, že cholekalciferol vykazoval elektrochemickou aktivitu, neboť poskytuje intenzivní oxidační pík při +1,18 V. Tento proces lze označit jako ireverzibilní, jelikož žádný zpětný redukční signál nebyl zaznamenán. Získaný oxidační signál zřejmě odpovídá hydroxylaci konjugovaného systému dvojných vazeb v molekule vitamínu D₃ [39]. Tento anodický signál byl dále studován a použit pro analytické aplikace.



Obrázek 9. Opakovaná cyklická voltametrie (10 cyklů) 0,2 mmol·l⁻¹ cholekalciferolu na GCE v 50% ethanolu obsahujícím 0,1 mol·l⁻¹ LiClO₄ při $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

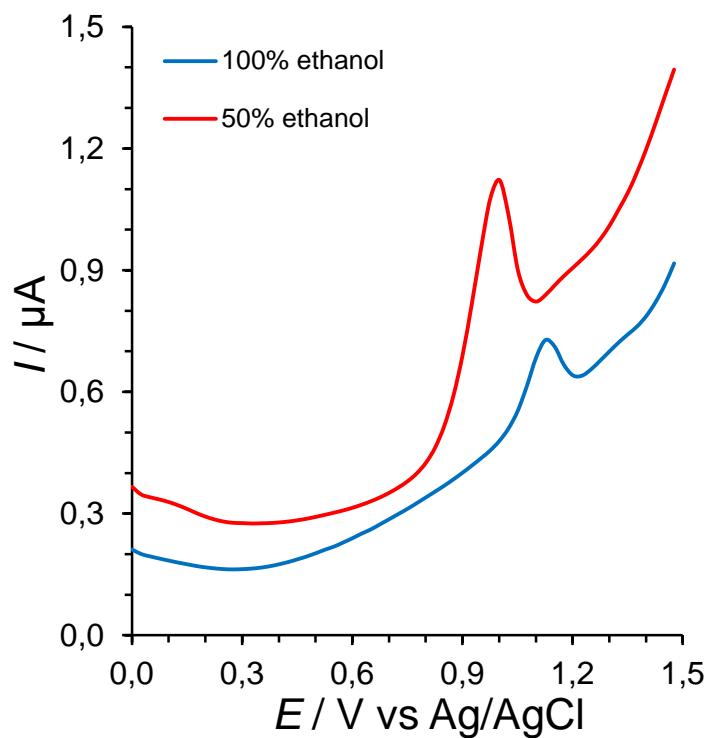
Při studii rychlosti skenování bylo zjištěno, že proud píku lineárně roste s druhou odmocninou rychlosti skenování ($R^2 = 0,9996$). Navíc lze z hodnoty směrnice $k = 0,419$ z lineární závislosti logaritmu proudu píku na logaritmu rychlosti skenování usoudit, že elektrochemická oxidace cholekalciferolu je řízena spíše difúzí ($k = 0,5$), než adsorpcí.

3.2 Optimalizace pracovních podmínek

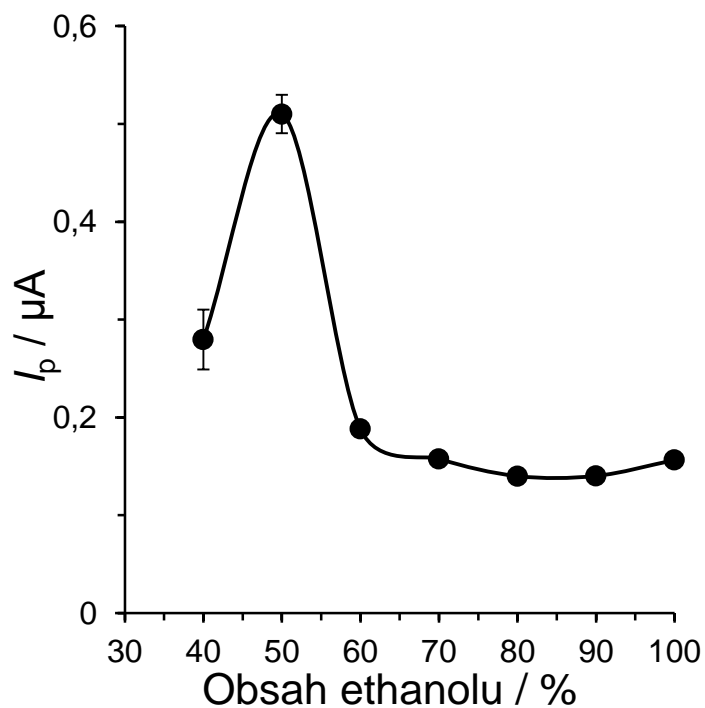
Pro dosažení maximální možné citlivosti vyvinuté voltametrické metody bylo nutné nalézt optimální podmínky jako obsah ethanolu, LiClO_4 , vliv kyselin a zásad, rychlost skenování a velikost amplitudy.

3.2.1 Složení pracovního média

Vzhledem k nerozpustnosti cholekalciferolu v čistě vodných roztocích bylo nutné najít optimální obsah ethanolu a LiClO_4 . Pro zjištění optimálního obsahu ethanolu byl proměřován standardní roztok $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ cholekalciferolu v pracovním elektrolytu, který obsahoval vždy $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ LiClO_4 a různé koncentrace ethanolu. Jak je patrné z Obrázků 10 a 11, nejvyšší hodnota anodického proudu byla získána při použití 50 % obsahu ethanolu. Při vyšším obsahu ethanolu byla pozorována nižší hodnota proudu píku, proto byl jako optimální zvolen 50% ethanol.

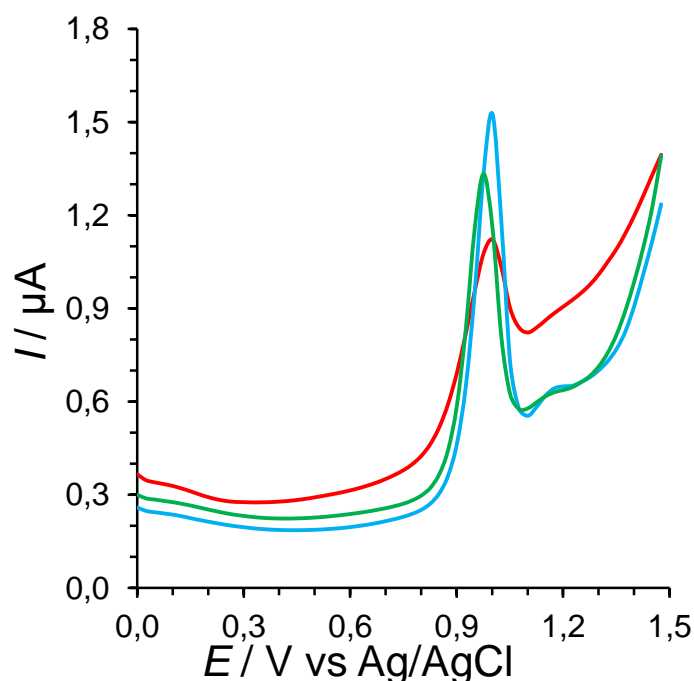


Obrázek 10. Ukázka voltamogramu $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ cholecalciferolu pro obsah ethanolu 50 % a 100 %. Měřeno metodou DPV na GCE při $E_{\text{ampl}} = 25 \text{ mV}$ a $\nu = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

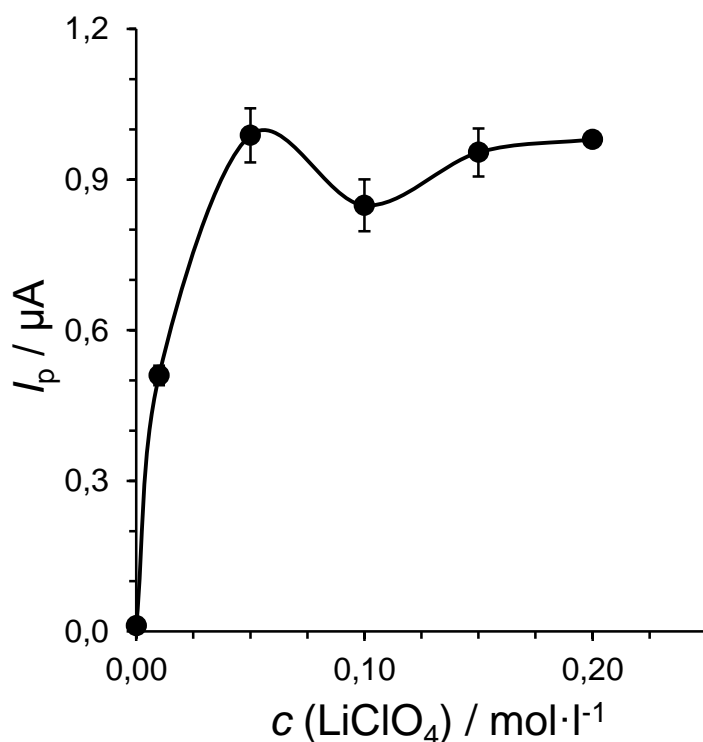


Obrázek 11. Závislost proudu na množství ethanolu v pracovním elektrolytu obsahujícím vždy $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ LiClO_4 . Měřeno pro koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ cholecalciferolu metodou DPV na GCE při $E_{\text{ampl}} = 25 \text{ mV}$ a $\nu = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Pro zjištění optimálního obsahu LiClO_4 byl proměřován standardní roztok $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ cholekalciferolu v pracovním elektrolytu, který obsahoval pokaždé 50% ethanol a různé koncentrace lithné soli. Obecně se rozpustnost lipofilní látky ve směsi voda-organická látka snižuje s vyšším obsahem soli, ale je důležité zmínit, že vodivost nosného elektrolytu se s vyšším obsahem soli zvyšuje. Pokud byla použita koncentrace LiClO_4 nižší než $0.05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, byly zaznamenány nízké a široké oxidační píky, tak jak je zřejmé z Obrázku 12. S rostoucí koncentrací lithné soli už nebyl pozorován významný proudový nárůst, a tudíž lze považovat koncentraci $0.05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ LiClO_4 za optimální (viz. Obrázek 13).



Obrázek 12. Ukázka voltamogramu $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ cholekalciferolu pro obsah 0,01 (červená), 0,05 (modrá) a $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ LiClO_4 (zelená). Měřeno metodou DPV na GCE při $E_{\text{ampl}} = 25 \text{ mV}$ a $\nu = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.



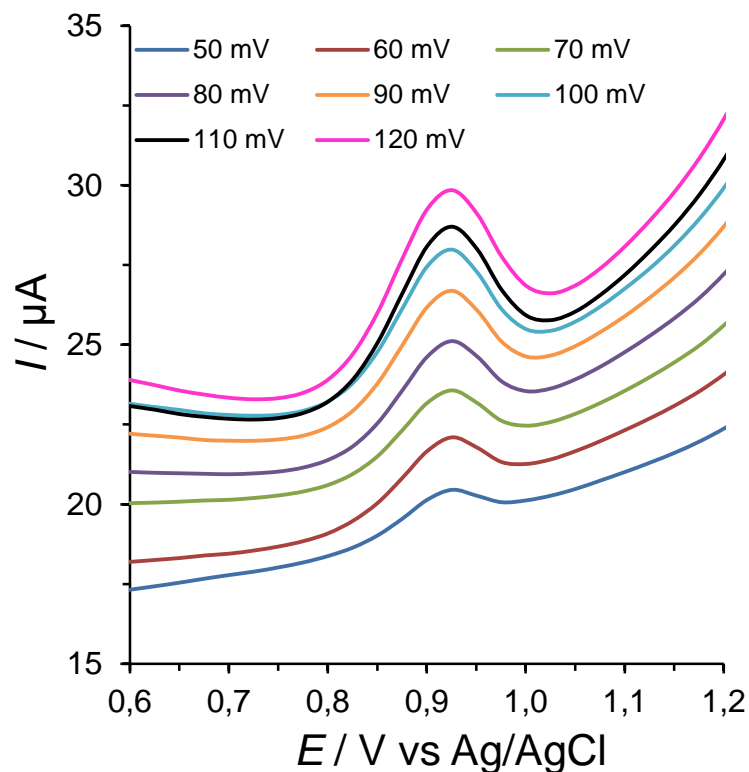
Obrázek 13. Závislost proudu píku cholekalciferolu na množství LiClO_4 v pracovním elektrolytu obsahujícím vždy 50% ethanol. Měřeno pro koncentraci $100 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ cholekalciferolu metodou DPV na GCE při $E_{\text{ampl}} = 25 \text{ mV}$ a $v = 50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

V rámci této optimalizace byla ověřena voltametrická metoda, kterou vyvinuli Cincotto a kolektiv z roku 2014. Tito autoři taktéž použili GCE. Dále ve své vědecké práci uvádějí za optimální složení pracovního média $0.1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ LiClO_4 v 40% ethanolu [35]. Lze se domnívat, že složení pracovního média může mít významný vliv na analytické parametry výsledné DPV metody. Tudiž tato zmíněná práce bude nadále použita pro porovnání s námi vyvinutou.

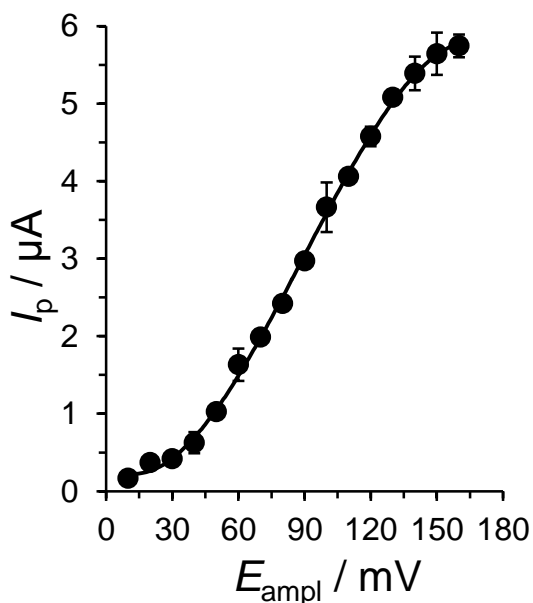
3.2.2 Optimalizace použité voltametrické techniky

Optimalizace diferenční pulzní voltametrie byla zaměřena na nalezení vhodných parametrů, jmenovitě amplitudy a rychlosti skenu. Jak je patrné z Obrázku 14, se zvyšující amplitudou se rovněž zvyšovala proudová odezva cholekalciferolu. Pro hodnoty amplitudy vyšší než 140 mV už nedocházelo k tomuto jevu, a tak lze považovat tuto hodnotu za optimální (viz. Obrázek 15).

Ráda bych zmínila, že s rostoucí amplitudou výrazně rostlo i proudové pozadí (zvýšení základní linie). Ustálení se uskutečnilo až při hodnotě základní linie $\sim 25 \mu\text{A}$. Nicméně tento jev nijak nezapříčinil zhoršení výsledných analytických parametrů, což jen dokazují další naměřené výsledky.



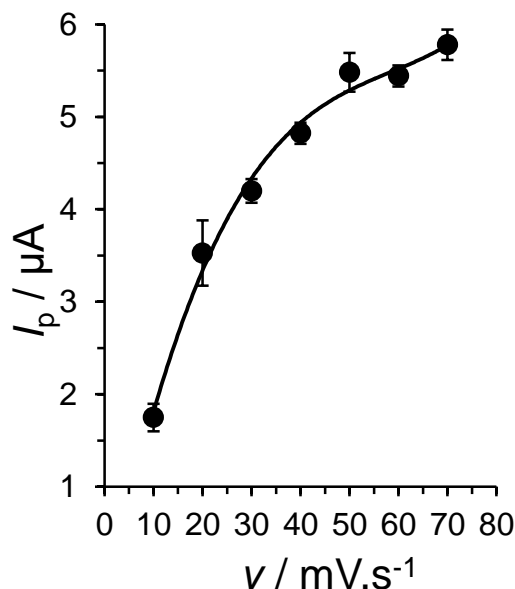
Obrázek 14. Voltamogramy pro $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ cholecalciferolu při různých amplitudách pulzu. DPV na GCE v 50% ethanolu obsahující $0.05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{LiClO}_4$ pro $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.



Obrázek 15. Vliv amplitudy na velikost proudu píku $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ cholecalciferolu. DPV na GCE v 50% ethanolu obsahující $0.05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{LiClO}_4$ pro $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Jako optimální rychlost skenu byla zvolena hodnota $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Jak je vidět na Obrázku 16 rychlost skenu vyšší než $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ nezvyšuje významně proudovou

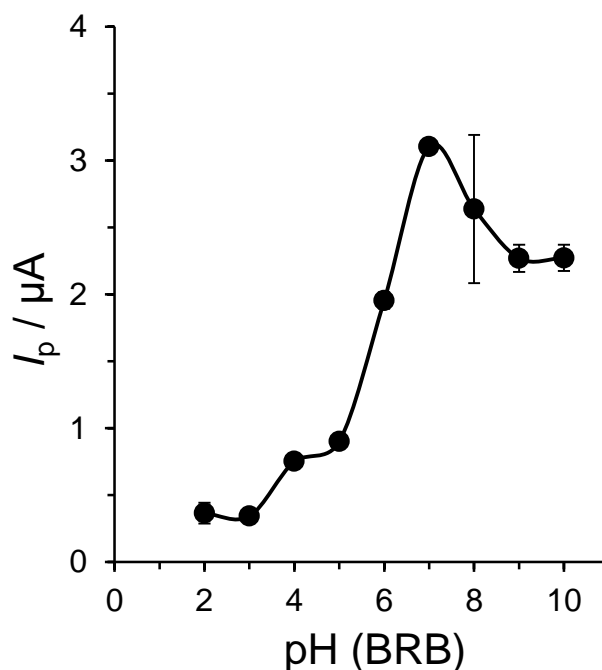
odezvu. Tudiž lze konstatovat, že bylo pozorováno podobné chování jako při hledání optimální amplitudy. Volba rychlosti skenu probíhala v rozsahu 10-140 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Pro ilustraci jsou na Obrázku 16 uvedeny hodnoty od 10 do 70 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.



Obrázek 16. Vliv rychlosti skenu na velikost proudu píku 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ cholecalciferolu. DPV na GCE v 50% ethanolu obsahující 0.05 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ LiClO_4 , $E_{\text{ampl}} = 50 \text{ mV}$.

3.2.3 Vliv pH pracovního elektrolytu

Dalším krokem byla optimalizace pH pracovního elektrolytu. Do měrné cely bylo pipetováno 5 ml 0.1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ BRB pufru o zvolené hodnotě pH, 5 ml 96% ethanolu a 50 μl standardu vitamínu D o koncentraci 0,01 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, aby výsledná koncentrace standardu činila 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Takto připravený pracovní elektrolyt byl proměřován metodou DPV. Jak je patrné z Obrázku 17, cholecalciferol je elektroaktivní v celém proměřeném rozsahu pH a nejvyšší proudovou odezvu poskytuje při neutrálním pH 7. Dále bylo zjištěno, že není rozdíl mezi pufrovaným BRB pufrem při pH 7 či vodně-ethanolickou směsí. Logicky se další měření prováděla v nepufrovaném prostředí.



Obrázek 17. Vliv pH základního elektrolytu na proud píku $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ cholecalciferolu. DPV na GCE v $0.05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ BRB pufru obsahujícím 50% ethanol pro $E_{\text{ampl}} = 50 \text{ mV}$ a $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

3.3 Validace vyvinuté voltametrické metody

3.3.1 Opakovatelnost měření

Hodnota relativní směrodatné odchylky (RSD) pro opakovaná měření ovlivňuje významně přesnost výsledné analytické metody. Pokud vypočtená hodnota RSD (%) je nižší než 5 %, považujeme metodu za velmi přesnou. Opakovatelnost měření ve voltametrických metodách nejčastěji ovlivňuje způsob ošetření povrchu pracovní elektrody. Lze se domnívat, že pokud měříme vždy na stejném povrchu a nedochází-li k jeho pasivaci během měření, lze dosáhnout uspokojivé opakovatelnosti. Pro ověření opakovatelnosti byla nejprve proměřena vždy série pěti měření a to následovně:

- opakované měření na stejném povrchu pracovní elektrody,
- opakované měření vždy na novém povrchu pracovní elektrody,
- opakované měření po omytí v čistém hexanu.

V Tabulce 2 jsou zaznamenány naměřené hodnoty proudu a potenciálu píku, z nichž je určen jejich průměr (\bar{x}), směrodatná odchylka (s) pro Studentovo rozdělení a relativní směrodatná odchylka (RSD), spočítána dle rovnice 1. Vzhledem k nejnižší

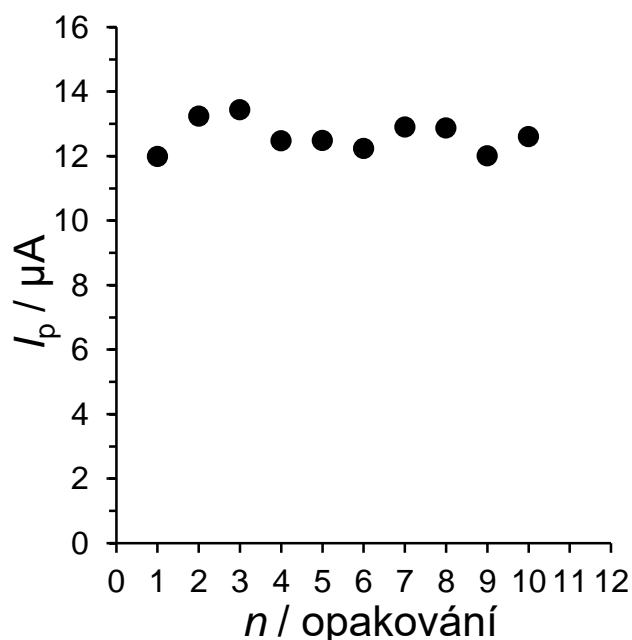
relativní směrodatné odchylce, kterou poskytovalo měření na stejném povrchu, byl tento způsob analýzy zvolen za optimální. Dále byla provedena série deseti měření na stejném povrchu. Závislost proudu píku na počtu opakování je uvedena na Obrázku 18. Opakovatelnost metody činí 3,09 % RSD.

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (1)$$

Tabulka 2. Přehled naměřených hodnot pro výběr vhodné úpravy elektrody.

<i>n</i>	Stejný povrch		Nový povrch		Omytí v hexanu	
	<i>I_p</i> / μA	<i>E_p</i> / V	<i>I_p</i> / μA	<i>E_p</i> / V	<i>I_p</i> / μA	<i>E_p</i> / V
1	7,107	0,901	9,037	0,901	6,779	0,875
2	7,416	0,9	7,796	0,901	7,569	0,876
3	7,293	0,9	9,156	0,901	6,143	0,900
4	7,224	0,9	8,101	0,876	6,817	0,875
5	7,028	0,9	8,880	0,876	7,530	0,875
\bar{x}	7,214	0,900	8,594	0,891	6,968	0,880
<i>s</i>	0,117	0,000	0,516	0,012	0,466	0,008
RSD	1,620	0,036	6,009	1,347	6,681	0,900

Výsledky zaznamenaný za optimálních podmínek pro 50 μmol·l⁻¹ cholekalciferolu: 0.05 mol·l⁻¹ LiClO₄, 50% ethanol, *E_{ampl}* = 140 mV, *v* = 50 mV·s⁻¹.



Obrázek 18. Proudů píku pro deset po sobě jdoucích měření na jednom povrchu GCE pro koncentraci 100 μmol·l⁻¹ cholekalciferolu. GCE, 0.05 mol·l⁻¹ LiClO₄, 50% ethanol, *E_{ampl}* = 140 mV, *v* = 50 mV·s⁻¹.

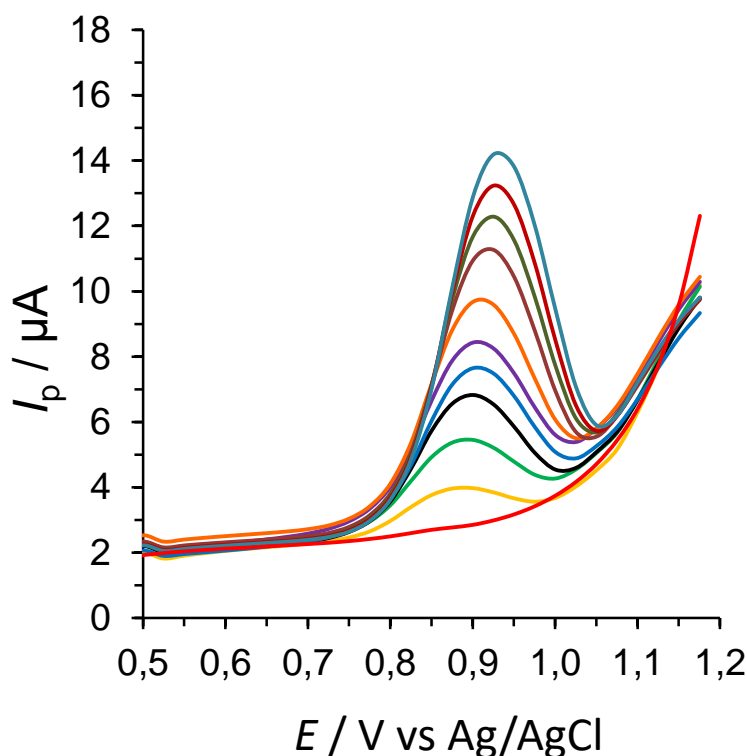
3.3.2 Kalibrační závislost

V dalším kroku byl zjišťován lineární rozsah, ve kterém lze eventuálně provádět reálné analýzy. Ze zjištěné rovnice lineární závislosti, konkrétně z velikosti úseku, je možné usoudit, zda je možné použít pro kvantitativní analýzu metodu standardního přídatku. Nejnižší detekovatelná (LOD) a kvantifikovatelná (LOQ) koncentrace cholekalciferolu byla spočtena pomocí podílu násobku směrodatné odchylky (s) pro $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ cholekalciferol a směrnice již zmíněné rovnice přímky (k), která charakterizuje citlivost vyvinuté metody. Hodnoty LOD a LOQ byly spočítány pomocí rovnic 2 a 3.

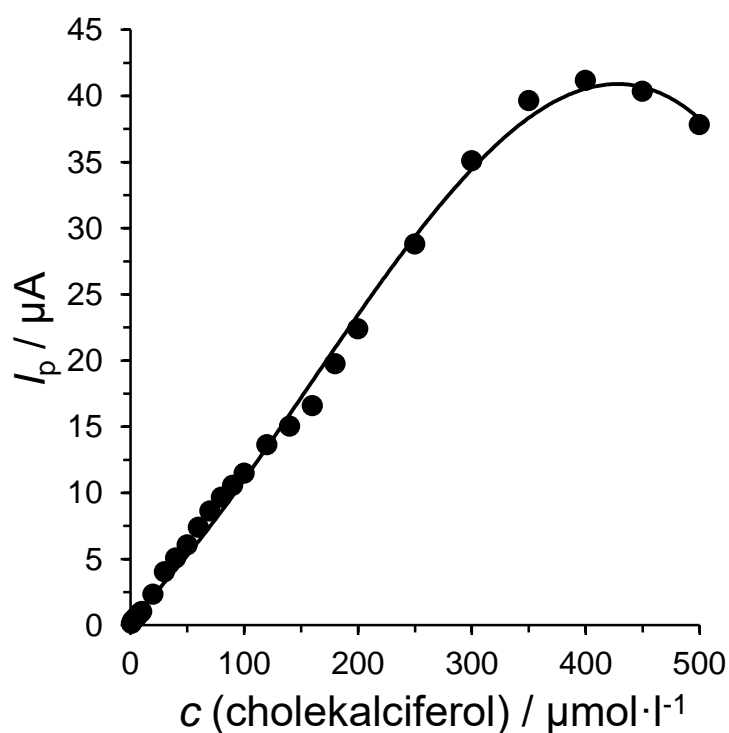
$$LOD = \frac{3 \cdot s}{k} \quad (2)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot s}{k} \quad (3)$$

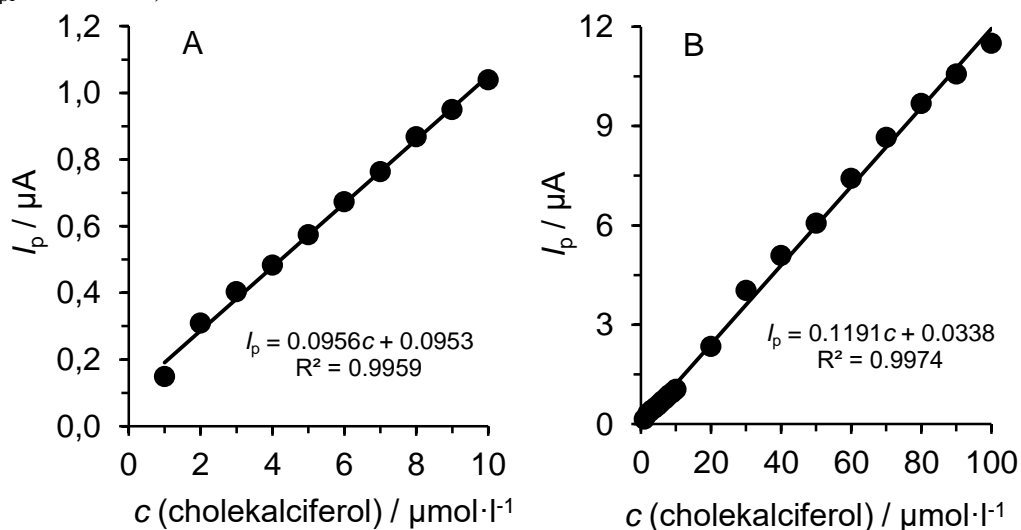
Obrázek 19 ilustruje obdržené anodické voltamogramy cholekalciferolu pro koncentrace od 10 do $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Z těchto měření byly odečteny výšky píků (I_p) a plochy píků (A_p). Ze získaných dat byly zkonstruovány kalibrační závislosti (viz. Obrázek 20, 21 a 22) popsané příslušnými rovnicemi regresní přímky.



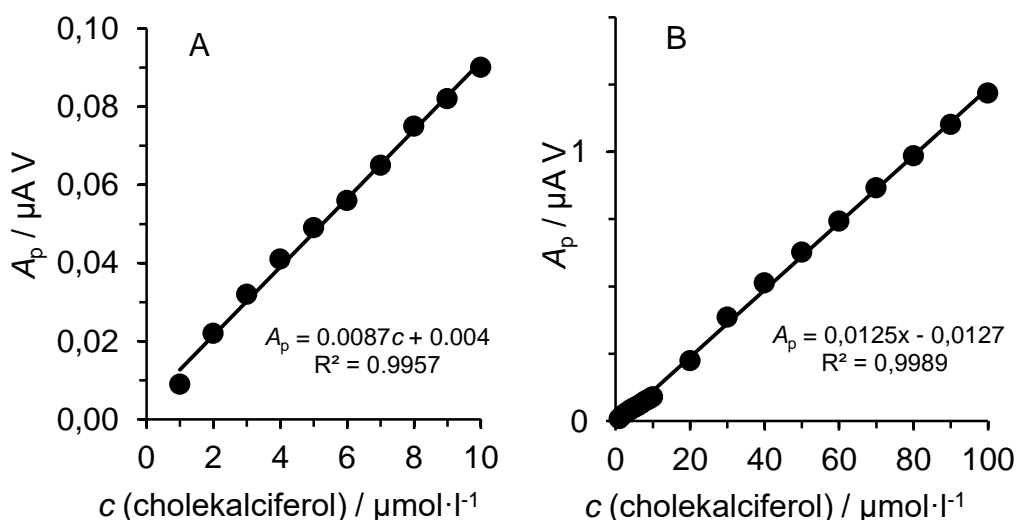
Obrázek 19. DPV voltamogramy pro 0 (základní linie), 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 a $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ cholekalciferolu. GCE, $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ LiClO_4 , 50% ethanol, $E_{\text{ampl}} = 140 \text{ mV}$, $\nu = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.



Obrázek 20. Graf závislosti výšky píku na koncentraci cholekalciferolu, rozmezí koncentrace cholekalciferolu 1-500 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. GCE, $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ LiClO}_4$, 50% ethanol, $E_{\text{ampl}} = 140 \text{ mV}$, $\nu = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.



Obrázek 21. Grafy závislosti výšky píku na koncentraci cholekalciferolu v rozmezí koncentrace cholekalciferolu 1-10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (A) a 1-100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (B). Výsledky naměřeny za optimálních podmínek.



Obrázek 22. Graf závislosti plochy píku na koncentraci cholekalciferolu v rozmezí koncentrace cholekalciferolu 1-10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (A) a 1-100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (B). Výsledky naměřeny za optimálních podmínek.

Na Obrázku 20 je znázorněna kalibrační závislost pro koncentraci vitamínu D₃ od 1 do 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pokud uvažujeme, že lineární rozsah je definován od hodnoty LOQ po hodnotu, kdy dochází k nelinearitě kalibrační závislosti, tak obdržíme interval od 2,4 do 350 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Koncentrační rozsah 1 až 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ cholekalciferolu pro výšku píku je popsán rovnicí $I_p = 0,1191c + 0.0338$ a charakterizován korelačním koeficientem $R^2 = 0.9974$. Z rovnice byly následně vypočítány hodnoty LOD a LOQ pro výšku píku, jmenovitě 0,8 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 2,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro plochu píku je koncentrační rozsah 1 až 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ cholekalciferolu definován rovnicí $A_p = 0,0125c - 0,0127$ a charakterizován korelačním koeficientem $R^2 = 0.9989$. Z rovnice byly následně vypočítány hodnoty LOD a LOQ pro plochu píku, jmenovitě 0,9 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 2,8 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Doporučená hladina vitamínu D v krvi je 75 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ bez ohledu na pohlaví nebo věk člověka, za normu se považuje rozmezí 75–250 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Protože je ale deficit vitamínu D celosvětovým problémem, spokojují se lékaři i s hodnotou alespoň 50 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ [41]. Z výše uvedených hodnot je zřejmé, že vyvinutou přímou voltametrickou metodu není možné aplikovat při analýze krve z důvodu nízké citlivosti.

3.3.3 Srovnání se stávajícími metodami

Ve srovnání s metodami, které byly dosud použity pro voltametrické stanovení cholekalciferolu na GCE, bylo v našem případě dosaženo značného pokroku v lineárním rozsahu kalibrační křivky po nastavení úplně nových pracovních podmínek.

Dosažená citlivost vyvinuté voltametrické metody byla výborná, lepších výsledků dosahují pouze metody, které jsou schopny detekovat cholekalciferol pouze v úzkém kalibračním intervalu. Srovnání všech metod je uvedeno v Tabulce 3.

Tabulka 3. Porovnání se stávajícími voltametrickými metodami.

Elektroda	Metoda	Pracovní elektrolyt	Linearita ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Ref.
rotující GCE	DPV	0,075 mol·l ⁻¹ LiClO ₄ v MeOH	2–200		[38]
GCE/SiO ₂ /GO/ Ni(OH) ₂	DPV	0,1 mol·l ⁻¹ LiClO ₄	5–50	0,003	[33]
GCE	DPV	0,1 mol·l ⁻¹ LiClO ₄ v 40% EtOH	0,3–4,3	0,12	[35]
GCE/poly(ARS) MWCNTs	SWV	0,05% SDS v 1,5 M octanu amonném	8–160	5	[37]
GCE	DPV	0,05 mol·l ⁻¹ LiClO ₄ v 50% EtOH	2,4–350	0,8	Tato práce

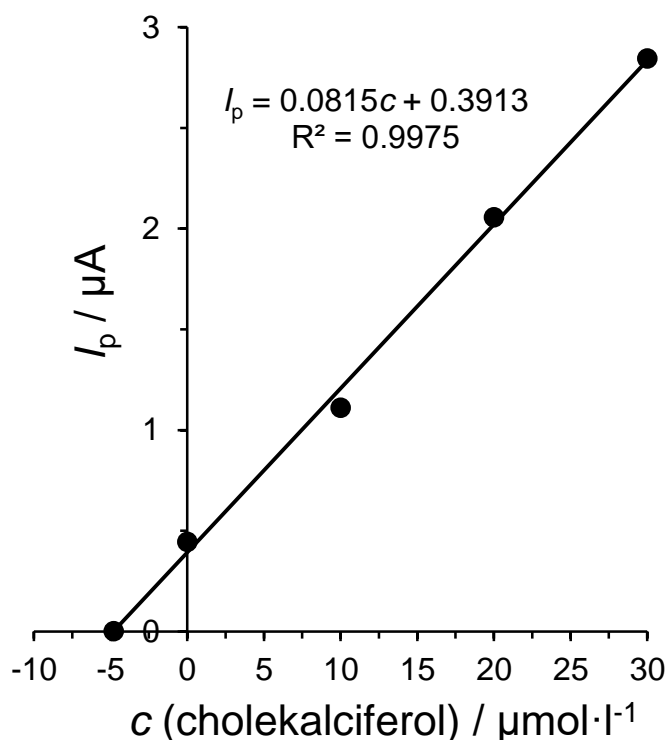
GO – oxid grafenu, poly(ARS)MWCNTs – GCE modifikovaná alizarinovou červení a uhlíkovými nanotrubicemi.

3.4 Analýza modelového a reálných vzorků

Správnost vyvinuté voltametrické metody byla ověřena analýzou modelového vzorku a reálných vzorků vitaminových doplňků. Byl připraven modelový vzorek o koncentraci cholekalciferolu 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Reálné vzorky byly zakoupeny v obchodních řetězcích Tesco Česká republika ČR a.s. a Lidl Česká republika v.o.s., jejich příprava pro měření je popsána v kapitole 2.5. Podmínky, při kterých probíhalo měření vzorku modelového i vzorků reálných jsou uvedeny v kapitole 2.4. Všechna měření byla prováděna pomocí techniky DPV s použitím GCE elektrody. Pro vyhodnocení byla použita metoda standardního přídávku, jako standardní přídavek (10 μl) byl zvolen standardní roztok cholekalciferolu o koncentraci 0,01 mol·l⁻¹.

3.4.1 Analýza modelového vzorku

Modelový vzorek obsahoval roztok standardu cholekalciferolu naředěný ethanolem na koncentraci 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, analyzováno bylo 10 ml vzorku. Pro ilustraci je níže uveden Obrázek 23, který znázorňuje graf použitý při výpočtu. V Tabulce 4, je uvedeno srovnání zjištěné koncentrace cholekalciferolu v roztoku modelového vzorku.



Obrázek 23. Graf standardního přidavku ($3 \times 10 \mu\text{l}$ přidavky $0.01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zásobního roztoku do 10 ml pracovního média) při analýze modelového vzorku o koncentraci $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ cholekalciferolu. Výsledky zaznamenány za optimálních podmínek: $0.05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ LiClO}_4$, 50% ethanol, $E_{\text{appl}} = 140 \text{ mV}$, $\nu = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

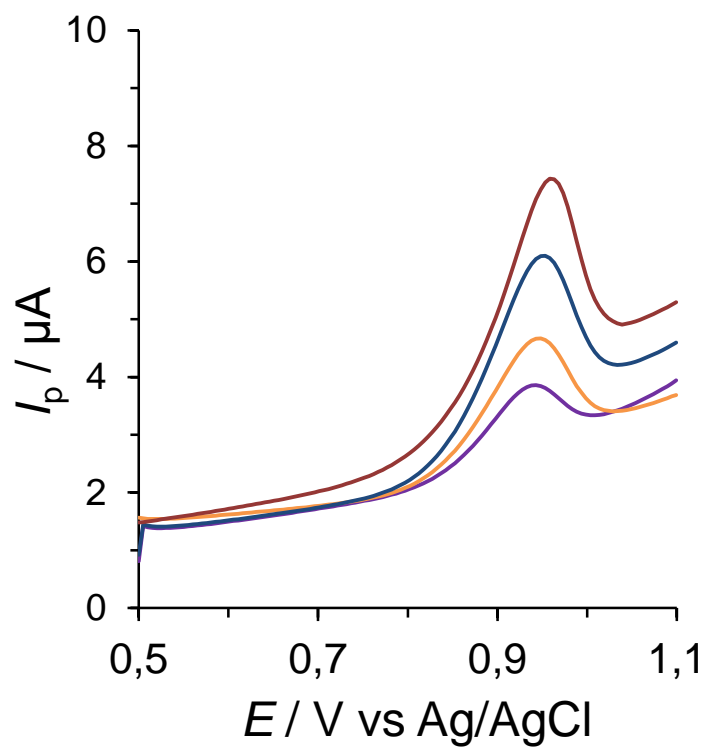
Tabulka 4. Porovnání vlivu výšky a plochy píku na výtěžnost vyvinuté metody.

	Nalezená koncentrace ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Skutečná koncentrace ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Výtěžnost (%)
Výška píku	$4,74 \pm 0,90$	5	95
Plocha píku	$3,03 \pm 0,10$	5	61

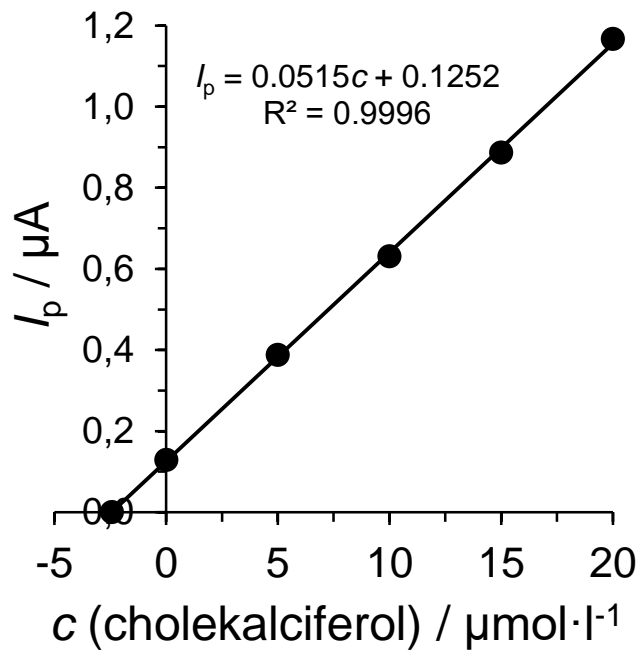
Hodnoty nalezené koncentrace jsou uvedeny jako $\bar{x} \pm s$ (68.3% pravděpodobnost).

3.4.2 Analýza reálných vzorků

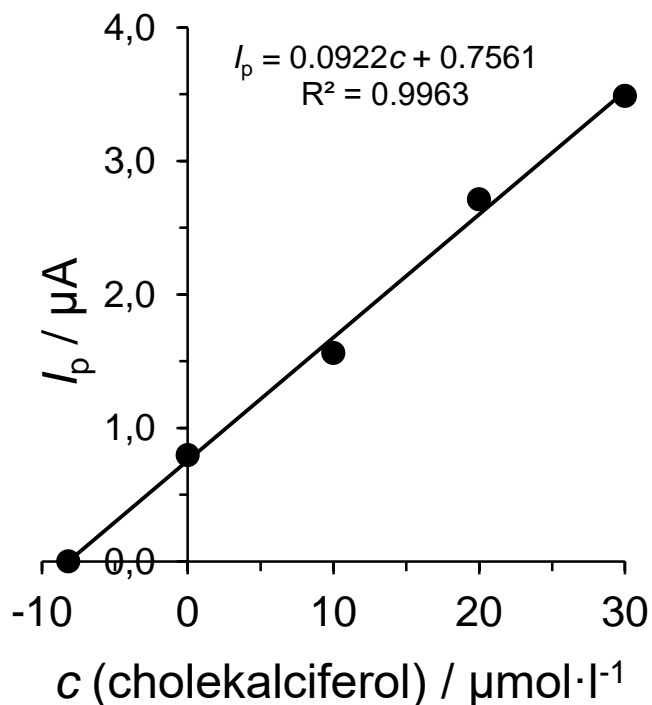
Použitelnost vyvinuté voltametrické metody byla ověřena analýzou dvou vzorků multivitaminových doplňků. Obrázek 24 ilustruje obdržené DPV voltamogramy cholekalciferolu při analýze doplňku stravy PRO formula. Z naměřených dat byly zkonstruovány kalibrační závislosti (viz. Obrázek 25 a 26), které byly použity k výpočtu.



Obrázek 24. DPV voltamogramy cholekalciferolu pro vzorek a přídavky ($3 \times 10 \mu\text{l}$ $0.01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ zásobního roztoku) při analýze doplňku stravy PRO formula. Výsledky zaznamenány za optimálních podmínek: $0.05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ LiClO_4 , 50% ethanol, $E_{\text{ampl}} = 140 \text{ mV}$, $\nu = 50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.



Obrázek 25. Graf znázorňující metodu standardního přídavku ($4 \times 5 \mu\text{l}$ přídavky $0.01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zásobního roztoku do 10 ml pracovního média) při analýze doplňku stravy Optisana. Výsledky zaznamenány za optimálních podmínek: $0.05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ LiClO_4 , 50% ethanol, $E_{\text{ampl}} = 140 \text{ mV}$, $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.



Obrázek 26. Graf znázorňující metodu standardního přídavku ($3 \times 10 \mu\text{l}$ přídavky $0.01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zásobního roztoku do 10 ml pracovního média) při analýze doplňku stravy

PRO formula. Výsledky zaznamenány za optimálních podmínek: $0.05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ LiClO}_4$, 50% ethanol, $E_{\text{ampl}} = 140 \text{ mV}$, $\nu = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 5. Tyto výsledky byly porovnány s deklarovaným množstvím uvedeným výrobcí. Lze konstatovat, že vyvinutá voltametrická metoda poskytuje uspokojivé výsledky a mohla by být použita pro rutinní analýzu takovýchto potravin.

Tabulka 5. Analýza multivitaminových doplňků.

Název vzorku	Nalezená koncentrace ($\mu\text{g}/\text{tableta}$)	Deklarovaná koncentrace ($\mu\text{g}/\text{tableta}$)	Výtěžnost (%)
Optisana	$5,84 \pm 0,9$	5	116
PRO formula	$5,26 \pm 1.2$	5	106

Hodnoty nalezené koncentrace jsou uvedeny jako $\bar{x} \pm 3s$ (99.7% pravděpodobnost).

4 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo studium voltametriického chování cholekalciferolu a optimalizace metody jeho stanovení na elektrodě ze skelného uhlíku ve vodně-ethanolickém prostředí.

V první části byla potvrzena elektroaktivita cholekalciferolu pomocí cyklické voltametrie. Byl zaznamenán intenzivní oxidační pík při +1,18 V. V další části byla provedena optimalizace parametrů elektrochemické detekce cholekalciferolu pomocí diferenční pulzní voltametrie a zjištěny následující optimální podmínky: složení pracovního elektrolytu (50% ethanol a $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ LiClO}_4$), amplituda 140 mV, rychlost skenu $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ a pH 7. Z kalibrační závislosti byla vypočítána mez detekce a mez stanovitelnosti $0,8 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $2,4 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro výšku píku a $0,9 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $2,8 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro plochu píku. Cholekalciferol bylo možné analyzovat v koncentračním rozsahu od $2,4$ do $350 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Pro ověření spolehlivosti byla metoda ověřena na modelovém vzorku. Výtěžnost metody činila 95 % pro výpočet z výšky píku a 61 % pro plochu píku. Další výpočty logicky probíhaly z výšek píků, jelikož vysoká výtěžnost poukazuje na větší spolehlivost metody. Optimalizovaná metoda byla použita k měření reálných vzorků. Konkrétně se jednalo o potravinové doplňky stravy Optisana a PRO formula. Navrhovanou metodou byl zjištěn obsah cholekalciferolu v doplňku stravy Optisana $5,84 \pm 0,9 \text{ }\mu\text{g}$ v tabletě, což se shodovalo s deklarovanými údaji na obale výrobku ($5 \text{ }\mu\text{g}$ cholekalciferolu v tabletě). Ve vzorku PRO formula byla dosažena výborná shoda s deklarovanými údaji na obale výrobku ($5 \text{ }\mu\text{g}$ cholekalciferolu v tabletě). Zjištěný obsah byl $5,26 \pm 1,2 \text{ }\mu\text{g}$ cholekalciferolu v tabletě.

Závěrem lze tedy říci, že byl splněn cíl práce a byla vyvinuta a optimalizována voltametriická metoda pro stanovení cholekalciferolu. Navržená voltametriická metoda poskytuje uspokojivé výsledky a mohla by být použita pro rutinní stanovení cholekalciferolu v potravinách v jednoduše vybavených laboratořích. Nevýhodou však je, že analýzu složitějších vzorků nelze provést bez úpravy vzorku, která spočívá v hydrolýze a následné extrakci do vhodného organického rozpouštědla, jak je tomu v případě standardní analytické metody ČSN EN 12821 (560047) založené na HPLC.

5 Použitá literatura

- [1] NORVAL, Mary. A short circular history of Vitamin D from its discovery to its effects. *Journal of the Royal Medical Society*. 2005, **268**, 1-3.
- [2] FELDMAN, David, Francis GLORIEUX, J. WESLEY PIKE. *Vitamin D*. Academic Press, 2005, ISBN 9780122526879, 0122526872.
- [3] ZEPLÉNI, Janos, Robert G. RUCKER, Donald B. McCORMICK, John W. SUTTIE. *Handbook of vitamins*. CRC Press, 2007, ISBN 0-8493-4022-5.
- [4] DAVIDÉK, Jiří, Gustav JANÍČEK, Jan POKORNÝ. *Chemie potravin: učebnice pro vys. školy chemickotechnologické*. Praha: SNTL, 1983, 629 s. ISBN 04-815-83.
- [5] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Tábor: OSSIS, 1999, 352 s. ISBN 80-902-3914-5.
- [6] MATA-GRANDOS, J. M., LUQUE de CASTRO M. D., QUESADA J. M. Fully automated method for determination of 24,25(OH)₂ and 25(OH)D₃ hydroxyvitamins and Vitamins A and E in human serum by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004, **35**, 575-582.
- [7] COMBS, F. Gerald. *The Vitamins Fundamental Aspects in Nutrition and Health*, Academic Press, 2008, ISBN 978-0-12-183493-7.
- [8] MURRAY, K. Robert, Daryl K. GRANNER, Peter A. MAYES, Victor W. RODWELL. *Harperova biochemie*. Jinočany: H&H, 1998, 872 s. ISBN 80-7319-013-3.
- [9] HAUSSLER, R. Mark, Peter JURUTKA, Mathew MIZWICKI, Anthony W. NORMAN. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 α ,25(OH)₂vitamin D₃: Genomic and non-genomic mechanism. *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011, **25**(4), 543-59.
- [10] DEEB Kristin K., Donald L. TRUMP, Candace S. JOHNSON. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer*. 2007, **7**, 684-700.
- [11] BALL, F. M. George, *Vitamins in food: Analysis, Bioavailability, and Stability*. CRC Press, 2006, ISBN 1-57444-804-8.
- [12] MCDOWELL, Lee Russell. *Vitamins in animal and human nutrition*. Iowa State University Press. 2000, 978-0813826301.

- [13] HOLICK, F. Michael, Vitamin D: Its role in cancer prevention and treatment. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2006, **92**, 49-59.
- [14] ROJAS-RIVERA, Jorge, C. DE LA PIEDRA, Ana RAMOS, Alberto ORTIZ, Jesús EGIDO. The expanding spectrum of biological actions of vitamin D. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2010, **25**(9), 2850-2865.
- [15] BISCHOFF-FERRARI, A. H., Vitamin D and muscle function. *International Congress Series*. 2007, **1297**, 143-147.
- [16] LIPS, P. Vitamin D physiology, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2006, **92**, 4-8.
- [17] HLÚBIK, Pavel, Libuše OPLTOVÁ. *Vitamíny*. Praha: Grada Publishing, 2004, 232 s. ISBN 80-247-0373-4.
- [18] DE LEENHEER, Andre P., Willy LAMBERT. *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins*. 3. New York: CRC Press, 2000, 632 s. ISBN 0-8247-0316-2.
- [19] RIZZOLO, A., S. POLESELLO. Chromatographic determination of vitamins in food. *Journal of Chromatography A*. 1992, **624**, 103-152.
- [20] PERALES, S., A. AMPARO, R. BARBERA, R. FARRÉ. Review: Determination of vitamin D in dairy products by high performance liquid chromatography. *Food Science and Technology International*. 2005, **11**, 451-462.
- [21] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Pavel Klouda-Pavko, 2003, 132 s, ISBN 80-86369-07-2.
- [22] BURILD, Anders, Charlotte LAURIDSEN, Nasrin FAQUIR, Helle M. SOMMER, Jette JACOBSEN. Vitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₃ in pork and their relationship to vitamin D status in pigs, *Journal of Nutritional Science*. 2016, **5**.
- [23] SHEPPARD, A. J., A. R. PROSSER, W. D. HUBBARD. Gas chromatography of the fat-soluble vitamins: A review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1972, **49**(11), 619-633.
- [24] NAIR, P. P., Corazon BUCANA, Stella DE LEON, D. A. TURNER. Gas chromatographic studies of vitamin D₂ and D₃. *Analytical Chemistry*. 1965, **37**(6), 631-636.

- [25] HOSSU, Ana-Maria, Cristiana RADULESCU, Mihaela-Flory MARIA, Mihaela ILIE a Vasile MAGEARU. TLC Applications on separation and quantification of fat-soluble vitamins. *Romanian Society of Biological Sciences*. 2009, **14**(5), 4615-4619.
- [26] PARRISH, Donald B., Earl F. RICHTER. Determination of vitamin D in foods: A review. *Food Science and nutrition*. 1979, **12**(1), 29-57.
- [27] BYRDWELL, William C., Jake EXLER, Susan E. GEBHARDT, James M. HARNLY, Joanne M. HOLDEN, Ronald L. HORST, Kristine Y. PATTERSON, Katherine M. PHILIPS, Wayne R. WOLF. Liquid chromatography with ultraviolet and dual parallel mass spectrometric detection for analysis of vitamin D in retail fortified orange juice. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2011, **24**, 299-306.
- [28] HEYROVSKÝ, Jaroslav. Elektrolysa se rtuťovou kapkovou elektrodou. *Chemické Listy*, 1922, **16**, 255-264.
- [29] BAREK, Jiří, František OPEKAR, Karel ŠTULÍK. *Elektroanalytická chemie*. Praha: Karolinum, 2005, 188 s.. ISBN 80-246-1146-5.
- [30] ZÝKA, Jaroslav. *Analytická příručka*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1988, 678 s.
- [31] OZKAN, Sibel A. *Electroanalytical Methods in Pharmaceutical Analysis and their Validation*. HNB Publishing, New York, 2012, ISBN 978-0-9664286-7-4.
- [32] ŠVANCARA, Ivan, Karel VYTŘAS, Jiří BAREK, Jiří ZIMA. Carbon paste electrodes in modern electroanalysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2001, **31**(4), 311-345.
- [33] CANEVARI, Thiago C., Fernando H. CINCOTTO, Richard LANDERS, Sergio A. S. MACHADO. *Electrochimica Acta*. 2014, **147**, 688-695.
- [34] MEN, Kun, Yu CHEN, Jinbiao LIU, Dianjun WEI. Electrochemical detection of vitamin D2 and D3 based on a Au-Pd modified glassy carbon electrode. *International Journal of Electrochemical Science*. 2017, **12**(10), 9555-9564.
- [35] CINCOTTO, Fernando H., Thiago C. CANEVARI, Sérgio A. S. MACHADO. Highly sensitive electrochemical sensor for determination of vitamin D in mixtures of water-ethanol. *Electroanalysis*. 2014, **26**(12), 2783-2788.

- [36] HART, John P., Michael D. NORMAN, Christopher J. LACEY. Voltammetric behaviour of vitamins D₂ and D₃ at glassy carbon electrode and their determination in pharmaceutical products by using liquid chromatography with amperometric detection. *The Analyst*. 1992, **117**(9), 1441-1445.
- [37] FILIK, H., AVAN A. A. Simultaneous electrochemical determination of vitamin K₁ and vitamin D₃ by using poly(Alizarin red S)/multi-walled carbon nanotubes modified glassy electrode. *Current Analytical Chemistry*. 2017, **13**(5), 350-360.
- [38] HERNÁNDEZ MÉNDES, J., A. SÁNCHEZ PÉREZ, M. DELGANO ZAMARRENO, M. L. HERNÁNDEZ GARCIA. Voltammetric determination of vitamin D₃ with a rotating glassy carbon electrode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1988, **6**(6-8), 737-741.
- [39] WEBSTER, Richard D. Voltammetry of the liposoluble vitamins (A, D, E and K) in organic solvents. *The chemical records*. 2012, **12**(1), 188-200.
- [40] NALLBANI, Arlinda, Amir SHAABAN FARAG, Karel VYTŘAS, Milan SÝS. Adsorptive stripping voltammetry of vitamin D₃ at glassy carbon electrode. *Scientific Papers of the University of Pardubice*. 2018, **24**, 21-30.
- [41] VAN DER WIELEN, R. P. J., L.C.P.G.M. DE GROOT, W. A. VAN STAVEREN, M. R. H. LOWIK, H. VAN DEN BERG, J. HALLER, O. MOREIRAS. Serum vitamin D concentrations among elderly people in Europe. *The Lancet*. 1995, **346**(8969), 207-210.