

Abstrakt

Steroly patří mezi obtížně elektrochemicky detekovatelné látky. Diplomová práce se věnuje studiu voltametričkého chování oxysterolů 25-hydroxycholesterolu a 7-ketocholesterolu na borem dopované diamantové elektrodě a vývoji separační HPLC metody pro směs sterolů se spektrofotometrickou a elektrochemickou detekcí. Studium voltametričkého chování zmíněných látek bylo prováděno pomocí cyklické voltametrie a diferenční pulzní voltametrie. Jako nejvhodnější prostředí pro oxidaci obou oxysterolů byla po provedení měření v různých základních elektrolytech zvolena 0,1 mol l⁻¹ kyselina chloristá v acetonitrilu (obsah vody 0,55 %), protože v tomto prostředí poskytují oba oxysteroly nejvyšší a stabilní proudové odezvy. Při potenciálu +1500 mV 25-hydroxycholesterol a při potenciálu +1900 mV 7-ketocholesterol. Tuto látku lze i elektrochemicky redukovat, ale odezva není v prostředí 0,1 mol l⁻¹ kyseliny chloristé reprodukovatelná. Stabilita oxysterolů v tomto prostředí byla potvrzena pomocí UV-VIS spekter. Metodou diferenční pulzní voltametrie byl získán limit detekce 0,82 μmol l⁻¹ pro 25-hydroxycholesterol a 0,66 μmol l⁻¹ pro 7-ketocholesterol. Ve druhé části práce byla vyvinuta metoda pro dělení směsi sterolů na reverzní C18 fázi v mobilní fázi obsahující 50 mmol l⁻¹ chloristan sodný v acetonitrilu s obsahem vody 0 % nebo 6 %. Touto metodou lze separovat cholesterol, lanosterol, 7-ketocholesterol, 25-hydroxycholesterol, 27-hydroxycholesterol, a 7α-hydroxycholesterol a 7β-hydroxycholesterol ve směsi. Separace posledních dvou sterolů je podmíněna dehydratací kyselinou chloristou před nástřikem, čímž dojde ke vzniku dehydratačních produktů 7α-hydroxycholesterol a 7β-hydroxycholesterolu s delším retenčním časem, než měly původní látky a oddělení od ostatních sterolů. Limity detekce pro amperometrickou detekci při +2,0 V na borem dopované diamantové elektrodě byly v rozmezí 0,82 až 29,33 μmol l⁻¹ a pro spektrofotometrickou detekci při 200 nm v rozmezí 0,13 až 4,99 μmol l⁻¹.

Vyvinuté metody jsou instrumentálně nenáročnou a citlivou alternativou pro detekci cholesterolu, jeho prekurzorů a oxidačních produktů k běžně používaným separačním metodám s MS detekcí

Klíčová slova

25-hydroxycholesterol, 7-ketocholesterol, borem dopovaná diamantová elektroda, cholesterol oxysteroly, voltametrie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie.