

УДК 543.552

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ¹

© К. В. Дёрина, Е. И. Короткова, Е. В. Дорожко, О. А. Воронова, И. В. Чулкова²

Статья поступила 15 марта 2016 г.

Исследовано электрохимическое поведение холестерина на химически модифицированном углеродсодержащем электроде (ХМЭ). Показано влияние водородного показателя среды и скорости развертки потенциала на сигнал анодного окисления холестерина. Подобраны рабочие условия его вольтамперометрического определения в модельных средах: pH 6,86, $\nu = 40$ мВ/с. Линейная зависимость тока электроокисления холестерина при потенциале +1,06 В от его концентрации наблюдалась в интервале 0,1 – 50 мкмоль/дм³ (предел обнаружения — 0,07 мкмоль/дм³). Проведено сравнительное определение холестерина в продуктах питания вольтамперометрическим и спектрофотометрическим методами.

Ключевые слова: холестерин; модификатор; бициклические бисмочевины; вольтамперометрия; спектрофотометрия; продукты питания.

Холестерин относится к зоостеринам и является основным стеринном в организме человека (рис. 1).

В организме холестерин выполняет ряд функций: структурную (формирование клеточной мембраны и

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант РФФИ № 16-33-00319 мол_а «Мой первый грант»).

² Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск, Россия; e-mail: derinaksenia@yandex.ru

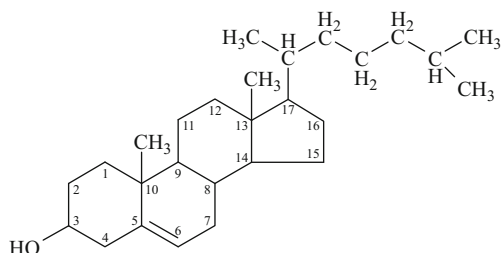


Рис. 1. Структурная формула холестерина

регуляция ее кривизны), защитную (связывание гемолитических ядов), синтетическую (является прекурсором ряда биологически активных веществ, в том числе половых гормонов и желчных кислот) и антиоксидантную [1, 2].

Установлено наличие корреляции между риском развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) и повышенным содержанием холестерина в крови пациента [3]. Согласно прогнозам всемирной организации здравоохранения ССЗ станут причиной порядка 23,3 миллионов смертей к 2030 г. Ввиду особенностей регуляции биосинтеза холестерина [2] необходимым мероприятием в терапии ССЗ является контроль за его содержанием в пищевых продуктах, потребляемых пациентом.

Актуальность проблемы определения холестерина в продуктах питания обуславливает наличие различных аналитических методик. Наибольшее распространение получили хроматографические методы (особенно высокоэффективная жидкостная хроматография) благодаря высокой точности, чувствительности и простоте устранения мешающего влияния основы пробы [4–6]. Однако данный тип методик не лишен недостатков: высокая стоимость оборудования, невозможность миниатюризации, необходимость высокой квалификации персонала. Поэтому в данной работе для определения холестерина были выбраны электрохимические методы, благодаря высокой точности, чувствительности, простоте реализации и относительной дешевизне оборудования.

Большинство биологически активных соединений (БАС), в том числе холестерин, требует высоких значений перенапряжения при электрохимическом определении. В связи с этим необходимо применение электрокатализаторов — соединений, облегчающих перенос электрона с молекулы БАС на электродную поверхность посредством челночного электродного переноса.

Ранее была показана возможность определения витаминов группы В на органомодифицированных (с применением арилдиазониевых солей) электродах [7]. В данной работе в качестве модификатора была выбрана ди-2,6-N-2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-дион-дифосфоновая кислота (ДАГУДФК).

Целью данной работы является разработка методики вольтамперометрического определения холесте-

рина в продуктах питания с использованием доступного, не требующего длительной подготовки к анализу модифицированного стеклоуглеродного электрода. В качестве метода сравнения выбрали спектрофотометрию.

Экспериментальные исследования проводили с использованием универсального вольтамперометрического анализатора TA-Lab (ООО НПП «Томьяналит», Россия). В работе применяли трехэлектродную ячейку, состоящую из рабочего модифицированного стеклоуглеродного электрода (СУЭ), а также индикаторного и вспомогательного хлоридсеребряных электродов.

Рабочий электрод модифицировали путем адсорбции модификатора на поверхности СУЭ, которую предварительно полировали фильтровальной бумагой до зеркального блеска. Затем рабочий электрод помещали в водный раствор ДАГУДФК с концентрацией 1,0 моль/дм³ и выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем электрод извлекали из раствора модификатора и помещали в сушильный шкаф на 40 мин при температуре 30 °С. Полученный модифицированный электрод был полностью готов к использованию после сушки.

Для приготовления рабочего раствора холестерина ($C = 20$ мкмоль/дм³) использовали стандартный образец с содержанием целевого компонента более 99,0 %, полученный из овечьей шерсти (Sigma Aldrich, Германия). Изопропиловый спирт (чистота более 99,7 %, Sigma Aldrich, Германия) и Triton X-100 (чистота не менее 95 %, Carl Roth, Германия) использовали для приготовления стандартных растворов и пробоподготовки. Применение Triton X-100 обусловлено гидрофобной природой холестерина и необходимостью его эмульгирования в водных средах. В качестве фонового электролита применяли фосфатный буферный раствор (ООО «Уралхиминвест», Россия) с pH 6,86 (KH₂PO₄, Na₂HPO₄). Для оценки влияния pH среды на аналитический сигнал применяли универсальную буферную смесь Бриттона – Робинсона, приготовляемую из реактивов с квалификацией не ниже хч (ЗАО «Вектон», Россия). Хлорид железа (III) гексагидрат (хч, ЗАО «Вектон», Россия), уксусную и серную кислоты (хч, Шаньдун Шэнлу Фармасьютикал Ко., Лтд, Китай) применяли для приготовления окрашивающего агента при спектрофотометрическом определении холестерина.

В качестве объектов исследования были выбраны следующие пищевые продукты: «Деревенское молочко» (молоко питьевое пастеризованное, содержание жира 3,5 %, ООО «Деревенское молочко», Северск, Россия), «Простоквашино» (молоко питьевое пастеризованное, содержание жира 3,2 %, АО «Данон Россия», Московская область, Россия), «Домик в деревне» (молоко питьевое пастеризованное, содержание жира 3,2 %, ООО «ВБД», Москва, Россия), масло сливочное «Деревенское молочко» (содержание жира 72,5 %, ООО «Деревенское молочко», Северск, Рос-

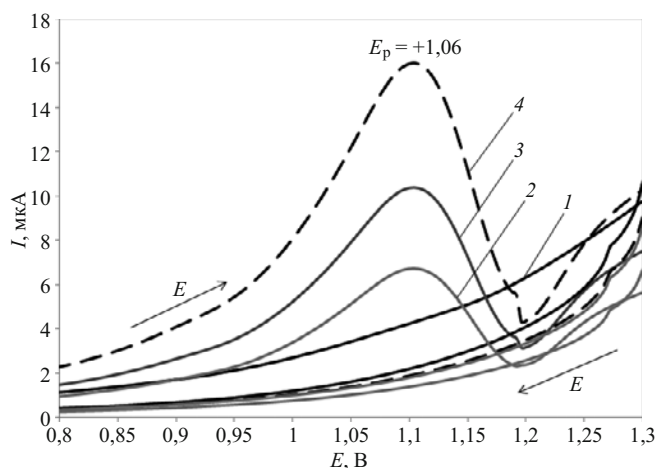


Рис. 2. Циклические вольтамперограммы окисления холестерина на СУЭ, модифицированном ДАГУДФК, при pH 6,86: 1 — холостой опыт; 2 — $C_{\text{хол}} = 5$ мкмоль/дм³; 3 — 10 мкмоль/дм³; 4 — 15 мкмоль/дм³ ($v = 40$ мВ/с)

сия), масло сливочное «Простоквашино» (содержание жира 72,5 %, АО «Данон Россия», Московская область, Россия), содержащие в своем составе холестерин, а также масло растительное рафинированное дезодорированное «Слобода» (ОАО «ЭФКО», Алексеевка, Россия), не содержащее холестерин.

Пробоподготовку проводили посредством жидкостной экстракции. Образец объемом 1 мл (в случае масла сливочного — после предварительного перевода в жидкое состояние) помещали в пробирку типа Эппендорф, куда также вносили изопропиловый спирт (в соотношении 1:1), после чего центрифугировали при 4000 мин⁻¹ в течение 30 мин. Полученный раствор декантировали и анализировали полученный декантат.

Для подтверждения чистоты лабораторной посуды проводили «холостой» опыт: в ячейку помещали 10 мл буферного раствора и регистрировали вольтамперную кривую. Отсутствие на кривой пиков служило доказательством чистоты фонового раствора, используемой посуды и отсутствия посторонних веществ на поверхности электродов. После «холостого» опыта дозатором вносили 20 мкл исследуемого раствора (декантата) и регистрировали значение тока электроокисления холестерина. Содержание холестерина в исследуемом образце определяли по градуировочному графику, для построения которого готовили серию растворов, содержащих от 0,1 до 50,0 мкмоль/дм³ холестерина с шагом 0,1 мкмоль/дм³. Для этого отбирали навеску лиофилизированного порошка холестерина, при этом предварительно рассчитав по формуле необходимую массу сухого вещества. Полученную навеску вносили в 1 мл изопропилового спирта и тщательно перемешивали, после чего добавляли 1 мл Triton X-100. Полученный раствор после перемешивания применяли в качестве стандартного.

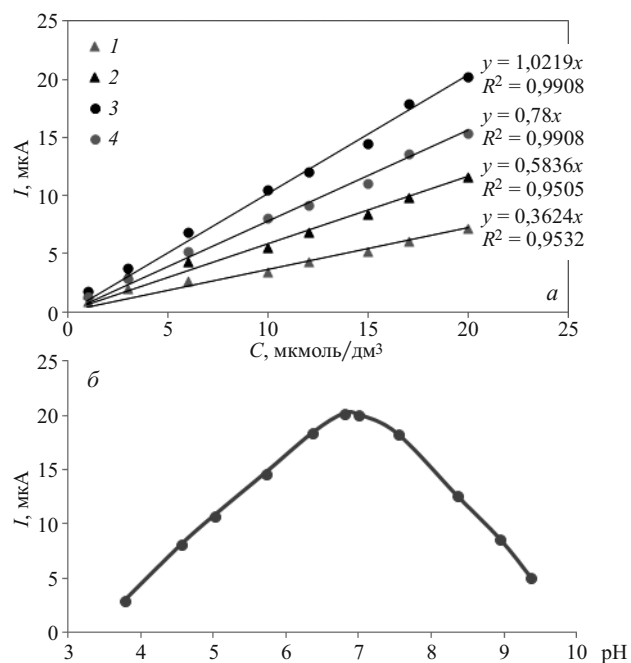


Рис. 3. Зависимости предельного тока электроокисления холестерина от его концентрации в ячейке (1 — pH = 6,59; 2 — pH = 6,09; 3 — pH = 6,86; 4 — pH = 7,00) (а) и от pH $C_{\text{хол}} = 20$ мкмоль/дм³) (б)

Холестерин также определяли в полученных после пробоподготовки декантатах с использованием спектрофотометра Agilent Technology Cary 60 UV-Vis при следующих условиях: время интегрирования — 1 с, спектральная пропускная способность канала — 2 нм, шаг сканирования — 0,1 с. Определение проводили по реакции Златкиса – Зака с гексагидратом хлорида железа (III). Для построения градуировочного графика применяли стандартные растворы холестерина с концентрациями 0,1 – 1,0 мкмоль/дм³.

Для исследования электрохимического поведения холестерина на модифицированном СУЭ регистрировали циклические вольтамперограммы в режиме постоянноточковой линейной развертки потенциала. На вольтамперограмме в анодной области потенциалов от +0,8 до +1,3 В наблюдался один пик, соответствующий окислению холестерина. В катодной области сигнал отсутствовал (рис. 2).

Выбор рабочих условий определения холестерина. Для изучения влияния pH применяемого фонового электролита [8] на аналитический сигнал регистрировали вольтамперограммы в дифференциальном режиме при разных значениях pH с целью построения калибровочных кривых (рис. 3, а) и графика зависимости аналитического сигнала от pH фонового электролита (рис. 3, б). Применение универсальной буферной смеси Бриттона – Робинса позволяет исключить влияние природы электролита на регистрируемый ток.

Показано, что при увеличении pH с 3,87 до 6,80 наблюдается рост тока электроокисления, его максимальное значение соответствует pH = 6,86, затем

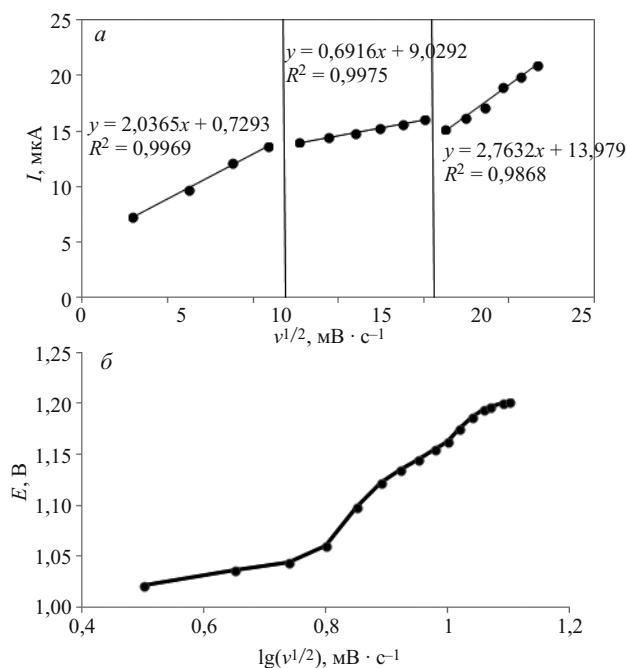


Рис. 4. Зависимость тока электроокисления холестерина от $v^{1/2}$ (а) и зависимость потенциала электроокисления холестерина от $\lg(v^{1/2})$ (б) на модифицированном СУЭ ($C_{\text{хол}} = 20$ мкмоль/дм³)

аналитический сигнал снижается. Таким образом, в качестве рабочего электролита был выбран фосфатный буфер с pH = 6,86.

Характер зависимости тока от скорости развертки потенциала позволяет судить о механизме процесса [8, 9]. Варьирование данного параметра позволяет эффективно управлять процессом на рабочем электроде. В диапазоне скоростей развертки потенциала от 10 до 200 мВ/с получили зависимости тока от $v^{1/2}$ и потенциала от $\lg(v^{1/2})$ (рис. 4). Из рис. 4, а видно, что зависимость I от $v^{1/2}$ нелинейна: можно выделить три области линейности этой зависимости — от 10 до 40 мВ/с, от 50 до 100 мВ/с и от 110 до 200 мВ/с, что указывает на квазиобратимый характер процесса [9]. Кроме того, наблюдается нелинейная зависимость по-

тенциала пика от скорости развертки со смещением потенциала электроокисления пика в более электроположительную область.

Таким образом, предположительно электроокисление холестерина на СУЭ носит квазиобратимый характер и лимитируется как непосредственно электрохимической реакцией, так и диффузией электроактивного вещества в приэлектродное пространство. Поскольку повышение скорости развертки приводит как к увеличению аналитического сигнала, так и к повышению потенциала пика, в качестве оптимального было выбрано значение скорости развертки 40 мВ/с.

Мешающее влияние на сигнал нецелевых компонентов основы пробы. Для исследования мешающего влияния матрицы на аналитический сигнал регистрировали вольтамперограмму без введения в ячейку сопутствующих компонентов в виде стандартных растворов. Для проверки их влияния на сигнал после получения пика холестерина в ячейку вносили исследуемый компонент основы пробы в концентрации, соответствующей его содержанию в продуктах питания. После внесения мешающего компонента регистрировали изменения тока электроокисления холестерина. Полученные результаты представлены в табл. 1. Выбор представленных в таблице аналитов обусловлен их присутствием в объектах анализа (продукты пищевой промышленности) и сложности их удаления посредством предварительной пробоподготовки. Изучение влияния холекальциферола проводилось с целью оценки мешающего влияния компонентов, сходных по структуре с холестерином.

Показано, что наиболее существенное влияние на аналитический сигнал холестерина оказывает введение в раствор фонового электролита ретинола ацетата (падение значения регистрируемого тока на 1,64 %). Введение токоферола ацетата, напротив, приводит к повышению значения регистрируемого тока электроокисления на 0,6 %. Добавление остальных мешающих компонентов приводило к понижению значения регистрируемого тока не более чем на 1,1 %. Следовательно, показано, что существенного влияния на ток электроокисления холестерина вводимые в ячейку мешающие компоненты не оказывают.

Таким образом, были подобраны следующие рабочие условия определения холестерина в модельных растворах: модифицированный СУЭ, дифференциальный режим постоянноточковой вольтамперометрии, pH = 6,86, $v = 40$ мВ/с.

Градуировочная зависимость описывается уравнением $I_p = 1,0219C + 0,015$ (I_p , мкА; C , мкмоль/дм³); $r = 0,9908$, линейный динамический диапазон — от 0,1 до 50 мкмоль/дм³. Предел обнаружения холестерина, рассчитанный по 3S-критерию [10], составил 0,07 мкмоль/дм³. Относительное стандартное отклонение не превышало 6 % во всем диапазоне определяемых содержаний.

Таблица 1. Значения тока электроокисления холестерина в присутствии основных нецелевых компонентов, содержащихся в объектах анализа*

Мешающий компонент	Концентрационное соотношение определяемого и мешающего компонентов	Значение тока электроокисления холестерина на модифицированном электроде после внесения мешающего компонента, мкА
Холекальциферол	1:0,05	$18,2 \pm 0,3$
Ретинола ацетат	1:0,1	$18,0 \pm 0,4$
Токоферола ацетат	1:0,1	$18,4 \pm 0,2$
Альбумин бычий	1:0,1	$18,1 \pm 0,3$
Лактоза	1:250	$18,2 \pm 0,5$

* Значение тока электроокисления холестерина на модифицированном электроде без добавки мешающих компонентов $I = (18,3 \pm 0,4)$ мкА.

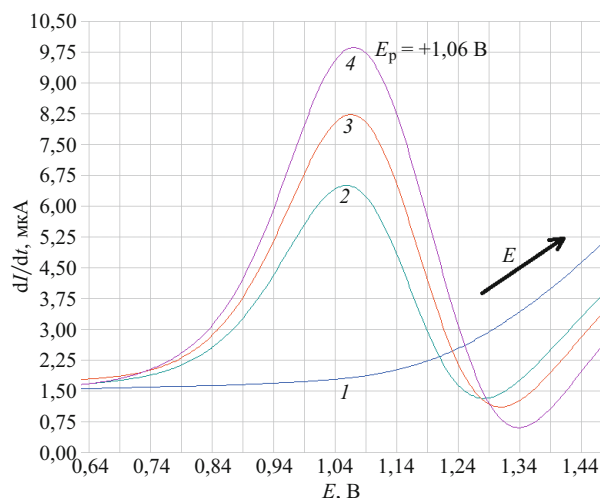


Рис. 5. Вольтамперограммы электроокисления холестерина: 1 — фоновая кривая; 2 — 0,1 мл образца молока питьевого пастеризованного «Деревенское молочко»; 3 — добавка 0,1 мл стандартного образца холестерина $C = 0,01$ ммоль/дм³; 4 — добавка 0,1 мл стандартного образца холестерина $C = 0,01$ ммоль/дм³ (рН 6,86, $v = 40$ мВ/с)

С помощью предложенной методики определяли холестерин в ряде продуктов питания. На рис. 5 показана анодная вольтамперограмма окисления холестерина, содержащегося в образце молока с содержанием жира 3,5 % (ООО «Деревенское молочко», Северск, Россия). Добавление стандартного раствора холестерина приводит к росту полученного при потенциале +1,06 В аналитического сигнала, который, следовательно, обусловлен электроокислением холестерина. Концентрацию холестерина в исследуемых образцах продуктов питания находили по градуировочному графику.

В качестве метода сравнения использовали классический спектрофотометрический метод с применением реакции Златкиса – Зака, заключающийся в измерении оптической плотности раствора, содержащего окрашенный комплекс холестерина с хлоридом железа (III) при характеристической длине волны. Для определения длины волны, соответствующей максимуму светопоглощения, зарегистрировали спектры стандартного раствора холестерина и образцов продуктов питания в интервале длин волн 400 – 650 нм (рис. 6). Как видно из рисунка, максимум поглощения как для стандартного раствора, так и для исследу-

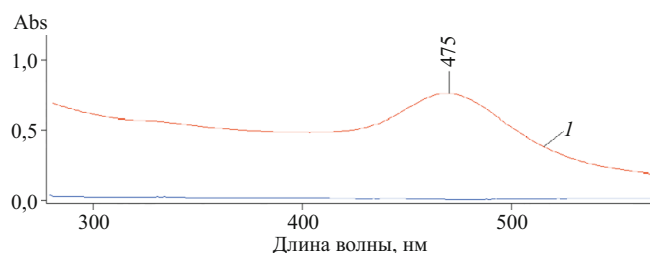


Рис. 6. Спектр поглощения окрашенного комплекса холестерина с железом (III): 1 — образец молока питьевого пастеризованного «Деревенское молочко» (нижняя кривая — спектр «холостой» пробы)

емого продукта соответствует 475,0 нм, что совпадает с литературными данными [11 – 13].

Для определения холестерина проводили предварительную пробоподготовку образца продукта питания в соответствии с ранее описанной процедурой. Поскольку в продуктах питания холестерин содержится в значительно более высоких количествах, чем возможно определить по полученному градуировочному графику (согласно закону Бугера – Ламберта – Бэра), образцы молока дополнительно разбавляли изопропанолом в объемном соотношении 1:15, а образцы сливочного масла — 1:60.

После этого разбавленный декантат смешивали с гексагидратом хлорида железа (III), растворенным в смеси кислот, по методике [10, 11]. Затем проводили регистрацию спектра поглощения и по градуировочному графику ($Abs = 0,0158C - 0,011$, $R = 0,994$) определяли концентрацию холестерина в образце с учетом разбавления. Результаты определения холестерина двумя методами представлены в табл. 2.

При сопоставлении результатов вольтамперометрического и спектрофотометрического определения холестерина можно сделать вывод об их удовлетворительной сходимости. Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными по содержанию холестерина в сходных объектах [12 – 15].

Таким образом, проведенные исследования показывают, что процесс электроокисления холестерина на модифицированном СУЭ сильно зависит от водородного показателя фонового электролита, причем наибольшее значение аналитического сигнала соответствует рН = 6,86. На основании данных циклической вольтамперометрии и характера зависимостей тока и

Таблица 2. Результаты определения холестерина (мкмоль/дм³) в продуктах питания вольтамперометрическим и спектрофотометрическим методами ($n = 6$; $p = 0,95$; $t_{\text{таб}} = 2,57$)

Образец	Вольтамперометрия	S_r	Спектрофотометрия	S_r	$t_{\text{эксп}}$
Молоко «Деревенское молочко»	$9,03 \pm 0,54$	0,06	$10,08 \pm 0,51$	0,05	1,65
Молоко «Простоквашино»	$8,58 \pm 0,43$	0,05	$13,6 \pm 0,54$	0,04	2,08
Молоко «Домик в деревне»	$4,09 \pm 0,08$	0,02	$4,37 \pm 0,13$	0,03	1,87
Масло сливочное «Деревенское молочко»	$44,15 \pm 1,64$	0,04	$43,87 \pm 1,31$	0,03	1,75
Масло сливочное «Простоквашино»	$43,26 \pm 1,73$	0,04	$43,20 \pm 2,14$	0,05	2,03
Масло растительное «Слобода»	<0,1	—	<0,1	—	—

потенциала от $v^{1/2}$ и $\log(v^{1/2})$ соответственно установлено наличие двух лимитирующих стадий процесса: диффузии вещества в приэлектродное пространство и непосредственно электрохимической реакции. По результатам определения холестерина в модельных средах выбраны рабочие условия его определения в продуктах питания методом вольтамперометрии. Проведено сравнительное определение холестерина в ряде продуктов питания с применением вольтамперометрической и спектрофотометрической методик. Полученные результаты согласуются между собой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Róg T., Vattulainen I. Cholesterol, sphingolipids, and glycolipids: what do we know about their role in raft-like membranes? / *Chem. Phys. Lipids*. 2014. Vol. 184. P. 82 – 104.
2. McNamara D. J. *Encyclopedia of Human Nutrition* (Third Edition). — New York: Academic Press, 2013. — 652 p.
3. Roth G. A., Fihn S. D., Mokdad A. H., et al. High total serum cholesterol, medication coverage and therapeutic control: an analysis of national health examination survey data from eight countries / *Bull. World Health Org.* 2011. Vol. 89(2). P. 92 – 101.
4. Kamelska A. M., Jarmolowska B., Bryl K. A simplified enzymatic method for total cholesterol determination in milk / *Int. Dairy J.* 2015. Vol. 50. P. 50 – 57.
5. Mikkelsen S. R., Corton E. *Bioanalytical chemistry*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2004. — 361 p.
6. Gonçalves Albuquerque T., Oliveira M. B. P. P., Sanches-Silva A., Costa H. S. Cholesterol determination in foods: Comparison between high performance and ultra-high performance liquid chromatography / *Food Chem.* 2016. Vol. 193. P. 18 – 25.
7. Слепченко Г. Б., Мартынюк О. А., Постников П. С. и др. Новые возможности вольтамперометрического определения фармацевтических препаратов на органомодифицированных электродах / *Сиб. мед. журн.* 2009. Т. 24. № 2-2. С. 21 – 24.
8. Комpton Р., Бэнкс К. Постигая вольтамперометрию. — Томск: Изд. ТПУ, 2015. — 508 с.
9. Oldham K. B., Myland J. C., Bond A. M. *Electrochemical Science and Technology: Fundamentals and applications*. — New York: John Wiley & Sons, 2011. — 456 p.
10. Ankush Parmar, Shweta Sharma. Derivative UV-vis absorption spectra as an invigorated spectrophotometric method for spectral resolution and quantitative analysis: Theoretical aspects and analytical applications / *TrAC. Trends Anal. Chem.* 2016. Vol. 77. P. 44 – 53.
11. Rajeev K. Thakur, Villette C., Aubry J. M., Delaplace G. Spectrophotometric method associated with formulation scans for application of hydrophilic-lipophilic deviation concept in food emulsions / *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2007. Vol. 301. N 1 – 3. P. 469 – 474.
12. Yi-Jae Lee, Jae-Yeong Park. Nonenzymatic free-cholesterol detection via a modified highly sensitive macroporous gold electrode with platinum nanoparticles / *Biosensors and Bioelectronics*. 2010. Vol. 26. N 4. P. 1353 – 1358.
13. Jinu John, Ankit Reghuwanshi, Usha K. Aravind, Aravindakumar C. T. Development and validation of a high-performance thin layer chromatography method for the determination of cholesterol concentration / *J. Food Drug Anal.* 2015. Vol. 23. N 2. P. 219 – 224.
14. Yan-Zong Chen, Shih-Yao Kao, Hao-Cheng Jian, et al. Determination of cholesterol and four phytosterols in foods without derivatization by gas chromatography-tandem mass spectrometry / *Journal of Food and Drug Analysis*. 2015. Vol. 23. N 4. P. 636 – 644.
15. Narsingh R. Nirala, Shiju Abraham, Vinod Kumar, et al. Colorimetric detection of cholesterol based on highly efficient peroxidase mimetic activity of graphene quantum dots / *Sens. Actuat. B: Chemical*. 2015. Vol. 218. P. 42 – 50.

REFERENCES

1. Róg T., Vattulainen I. Cholesterol, sphingolipids, and glycolipids: what do we know about their role in raft-like membranes? / *Chem. Phys. Lipids*. 2014. Vol. 184. P. 82 – 104.
2. McNamara D. J. *Encyclopedia of Human Nutrition* (Third Edition). — New York: Academic Press, 2013. — 652 p.
3. Roth G. A., Fihn S. D., Mokdad A. H., et al. High total serum cholesterol, medication coverage and therapeutic control: an analysis of national health examination survey data from eight countries / *Bull. World Health Org.* 2011. Vol. 89(2). P. 92 – 101.
4. Kamelska A. M., Jarmolowska B., Bryl K. A simplified enzymatic method for total cholesterol determination in milk / *Int. Dairy J.* 2015. Vol. 50. P. 50 – 57.
5. Mikkelsen S. R., Corton E. *Bioanalytical chemistry*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2004. — 361 p.
6. Gonçalves Albuquerque T., Oliveira M. B. P. P., Sanches-Silva A., Costa H. S. Cholesterol determination in foods: Comparison between high performance and ultra-high performance liquid chromatography / *Food Chem.* 2016. Vol. 193. P. 18 – 25.
7. Slepchenko G. B., Martynyuk O. A., Postnikov P. S., Trusova M. E., Bondarev A. A., Smirnov I. V., Bystritskii E. L. Novye vozmozhnosti vol'tamperometricheskogo opredeleniya farmatsevticheskikh preparatov na organomodifitsirovannykh élektrodakh [New features of voltammetric determination of pharmaceuticals with the organically modified electrodes] / *Sib. Med. Zh.* 2009. Vol. 24. N 2-2. P. 21 – 24 [in Russian].
8. Kompton R., Banx K. Postigaya vol'tamperometriyu [Comprehending voltammetry]. — Tomsk.: Izd. TPU, 2015. — 508 p. [Russian translation].
9. Oldham K. B., Myland J. C., Bond A. M. *Electrochemical Science and Technology: Fundamentals and applications*. — New York: John Wiley & Sons, 2011. — 456 p.
10. Ankush Parmar, Shweta Sharma. Derivative UV-vis absorption spectra as an invigorated spectrophotometric method for spectral resolution and quantitative analysis: Theoretical aspects and analytical applications / *TrAC. Trends Anal. Chem.* 2016. Vol. 77. P. 44 – 53.
11. Rajeev K. Thakur, Villette C., Aubry J. M., Delaplace G. Spectrophotometric method associated with formulation scans for application of hydrophilic-lipophilic deviation concept in food emulsions / *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2007. Vol. 301. N 1 – 3. P. 469 – 474.
12. Yi-Jae Lee, Jae-Yeong Park. Nonenzymatic free-cholesterol detection via a modified highly sensitive macroporous gold electrode with platinum nanoparticles / *Biosensors and Bioelectronics*. 2010. Vol. 26. N 4. P. 1353 – 1358.
13. Jinu John, Ankit Reghuwanshi, Usha K. Aravind, Aravindakumar C. T. Development and validation of a high-performance thin layer chromatography method for the determination of cholesterol concentration / *J. Food Drug Anal.* 2015. Vol. 23. N 2. P. 219 – 224.
14. Yan-Zong Chen, Shih-Yao Kao, Hao-Cheng Jian, et al. Determination of cholesterol and four phytosterols in foods without derivatization by gas chromatography-tandem mass spectrometry / *Journal of Food and Drug Analysis*. 2015. Vol. 23. N 4. P. 636 – 644.
15. Narsingh R. Nirala, Shiju Abraham, Vinod Kumar, et al. Colorimetric detection of cholesterol based on highly efficient peroxidase mimetic activity of graphene quantum dots / *Sens. Actuat. B: Chemical*. 2015. Vol. 218. P. 42 – 50.