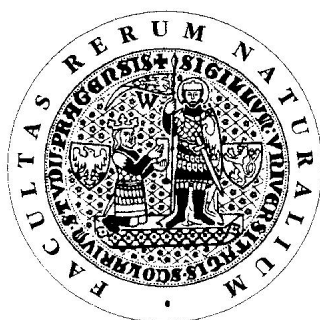


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Adéla Patáková

Elektrochemická redukce dehydrocholové a chenodeoxycholové kyseliny
na stacionárních rtuťových a amalgámových elektrodách

Electrochemical reduction of dehydrocholic and chenodeoxycholic acid at
stationary mercury and amalgam electrodes

Diplomová práce

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

Praha 2016

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti řešení projektu Univerzitního centra excelence UNCE „Supramolekulární chemie“.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

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

V Praze dne 12. května 2016.

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá studiem elektrochemického chování kyseliny dehydrocholové a chenodeoxycholové na stacionárních elektrodách na bázi rtuti – visící rtuťové kapkové elektrodě a rtuťovým meniskem modifikované stříbrné tuhé amalgámové elektrodě.

Dehydrocholová kyselina, pro kterou se jedná o první studii elektrochemického chování, poskytuje tři píky s potenciály kolem -1270 mV, -1450 mV a -1800 mV, kdy poslední redukční pik zřejmě odpovídá redukcii karboxylové skupiny postranního řetězce steroidního skeletu. Elektrodové děje jsou quasireversibilní a jsou významně ovlivněny adsorpcí DHCA na elektrodu a hodnotou pH prostředí určující stupeň disociace karboxylové skupiny. Metodami DC, DP a „square-wave“ voltametrie byla měřena koncentrační závislost DHCA v prostředí BR pufr (pH 7,0) – methanol (9:1), avšak ani jednou z uvedených metod nebylo dosaženo uspokojivých detekčních limitů a širokých lineárních dynamických rozsahů. Opakovatelné odezvy v širokém spektru pH však mohou být použity k elektrochemické charakterizaci látky.

CDCA poskytuje v prostředí $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – methanol (9:1) signál při potenciálu ca -1350 mV. Jeho poloha i výška jsou ovlivněny přítomností methanolu a acetonitrilu: Postupným zvyšováním obsahu organického rozpouštědla dochází ke zhoršení odezvy CDCA. Pro roztok methanolu s obsahem vyšším než 60 % a acetonitrilu nad 30% již nelze signál CDCA identifikovat.

Nejvhodnější metodou pro kvantifikaci CDCA je cyklická voltametrie v prostředí $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – methanol (9:1) při vysoké rychlosti skenu $1000 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ s limitem detekce $1,4 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Metodou adsorpční rozpouštěcí DP voltametrie bylo prokázáno, že adsorpce je spontánní a cílená akumulace odezvu CDCA příliš neovlivňuje. V prostředí BR pufr (pH 4,0) – methanol (9:1), kdy není CDCA zcela v roztoku rozpuštěna, byl pro metodu DPV určen nejširší lineární dynamický rozsah $4 - 40 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ s limitem detekce $0,84 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Abstract

This thesis deals with the study of electrochemical behaviour of dehydrocholic and chenodeoxycholic acid at stationary mercury-based electrodes – hanging mercury dropping electrode and silver solid amalgam electrode modified by a mercury meniscus.

This is the first study of electrochemical behaviour of dehydrocholic acid which offers three peaks with potentials around -1270 mV, -1450 mV and -1800 mV. The last one with the potential -1800 mV is probably the main peak given by reduction of carboxylic group of side chain of steroid skeleton. By cyclic voltammetry was determined that the process is quasireversible and is strongly influenced by adsorption of DHCA on the electrode surface and also by the pH which determines dissociation degree of carboxylic group. In the environment of BR buffer (pH 7.0) – methanol (9:1) was measured concentration dependence by DC, DP and “square-wave” voltammetry. By neither one of these methods have been reached satisfying limits of detection and wide linear dynamic ranges. However, the repeatable signals in wide range of pH can be used for electrochemical characterization of DHCA.

CDCA offers in environment $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ borat buffer (pH 9.1) – methanol (9:1) one signal with potential around -1350 mV. Position of this peak on the potential axe and also its height are influenced by presence of methanol and acetonitrile: As the amount of organic solvent increases the signal of CDCA is getting worse. For amount of methanol 60 % and acetonitrile 30 % the signal of CDCA cannot be identified.

The best method for quantification of CDCA is cyclic voltammetry in the environment of $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ borat buffer (pH 9.1) – methanol (9:1) with very fast scan rate $1000 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ and a limit of detection $1.4 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. By adsorptive stripping DP voltammetry, the process of adsorption was determined to be spontaneous and that the aimed accumulation does not have any influence on signal of CDCA.

In the environment of BR buffer (pH 4.0) – methanol (9:1), where CDCA is not soluble, was for DPV established linear dynamic range $4 - 40 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ s limit of detection $0.84 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Předmětová hesla:

analytická chemie, stacionární elektrody na bázi rtuti, voltametrie, žlučové kyseliny

Klíčová slova:

dehydrocholová kyselina, chenodeoxycholová kyselina, redukce, stříbrná tuhá amalgámová elektroda, visící rtuťová kapková elektroda, voltametrie

Klíčová slova anglicky:

dehydrocholic acid, chenodeoxycholic acid, reduction, silver solid amalgam electrode, hanging mercury drop electrode, voltammetry

Na úvod bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Karolině Schwarzové, Ph.D. za odborné vedení, všestrannou pomoc, trpělivost a cenné připomínky k mé práci.

Dále bych chtěla poděkovat kolektivům laboratoří č. 110 a č. 113, své rodině, svým přátelům a svému příteli za jejich podporu a trpělivost.

1. ÚVOD	10
1.1. CÍL PRÁCE	10
1.2. ŽLUČOVÉ KYSELINY	11
1.3. STUDOVANÉ LÁTKY	12
1.3.1. <i>Dehydrocholová kyselina</i>	12
1.3.2. <i>Analytické metody stanovení dehydrocholové kyseliny</i>	13
1.3.3. <i>Chenodeoxycholová kyselina</i>	14
1.3.4. <i>Analytické metody stanovení chenodeoxycholové kyseliny</i>	16
1.4. VOLTAMETRICKÉ METODY S LINEÁRNÍM NÁRŮSTEM POTENCIÁLU	18
1.4.1. <i>Direct current voltametrie</i>	18
1.4.2. <i>Cyklická voltametrie</i>	19
1.5. PULSNÍ VOLTAMETRICKÉ METODY	19
1.5.1. <i>Diferenční pulsní voltametrie</i>	19
1.5.2. <i>„Square-wave“ voltametrie</i>	19
1.6. ADSORPČNÍ ROZPOUŠTĚCÍ VOLTAMETRIE	20
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
2.1. CHEMIKÁLIE	21
2.2. PŘÍPRAVA ROZTOKŮ	21
2.3. APARATURA	22
2.4. CHARAKTERISTIKA PRACOVNÍCH ELEKTROD	22
2.4.1. <i>Visící rtuťová kapková elektroda</i>	22
2.4.2. <i>Rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgámová elektroda</i>	23
2.5. VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ	23
3. DISKUZE A VÝSLEDKY	25
3.1. STUDIUM ELEKTROCHEMICKÉHO CHOVÁNÍ DEHYDROCHOLOVÉ KYSELINY NA VISÍCÍ RTUŤOVÉ KAPKOVÉ ELEKTRODĚ	25
3.1.1. <i>DC voltametrie dehydrocholové kyseliny</i>	25
3.1.2. <i>Diferenční pulsní voltametrie dehydrocholové kyseliny</i>	33
3.1.3. <i>Cyklická voltametrie dehydrocholové kyseliny</i>	41
3.2. STUDIUM ELEKTROCHEMICKÉHO CHOVÁNÍ DEHYDROCHOLOVÉ KYSELINY NA RTUŤOVÝM MENISKEM MODIFIKOVANÉ STŘÍBRNÉ TUHÉ AMALGÁMOVÉ ELEKTRODĚ	46
3.2.1. <i>Diferenční pulsní voltametrie dehydrocholové kyseliny</i>	46
3.2.2. <i>„Squar-wave“ voltametrie dehydrocholové kyseliny</i>	49
3.3. STUDIUM ELEKTROCHEMICKÉHO CHOVÁNÍ CHENODEOXYCHOLOVÉ KYSELINY NA VISÍCÍ RTUŤOVÉ KAPKOVÉ ELEKTRODĚ	58
3.3.1. <i>Studium vlivu vybraných rozpouštědel</i>	58
3.3.2. <i>Koncentrační závislost chenodeoxycholové kyseliny</i>	64
3.3.3. <i>Adsorpční rozpouštěcí DP voltametrie chenodeoxycholové kyseliny</i>	77
3.4. STUDIUM ELEKTROCHEMICKÉHO CHOVÁNÍ CHENODEOXYCHOLOVÉ KYSELINY NA RTUŤOVÝM MENISKEM MODIFIKOVANÉ STŘÍBRNÉ TUHÉ AMALGÁMOVÉ ELEKTRODĚ	79
3.4.1. <i>„Square wave“ voltametrie chenodeoxycholové kyseliny</i>	79
4. ZÁVĚR.....	86
5. POUŽITÁ LITERATURA.....	89

Seznam použitých zkratek

<i>A</i>	amplituda (mV)
BR pufr	Brittonův – Robinsonův tlumivý roztok
<i>c</i>	molární koncentrace ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
CA	cholová kyselina
C.A.S.	Chemical Abstract Service
CDCA	chenodeoxycholová kyselina
CMC	kritická micelární koncentrace
CV	cyklická voltametrie
DCA	deoxycholová kyselina
DCV	DC voltametrie („direct current“ voltametrie)
DHCA	dehydrocholová kyselina
DPV	diferenční pulsní voltametrie
DSC	diferenční skenovací kalorimetrie
<i>E</i>	potenciál (mV)
<i>E</i> _{acc}	potenciál akumulace (mV)
ED	elektrochemická detekce
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
ELSD	odpařovací detektor rozptylu světla
<i>E</i> _p	potenciál píku (mV)
<i>E</i> _{pa}	potenciál anodického píku (mV)
<i>E</i> _{pk}	potenciál katodického píku (mV)
ESI	ionizace elektrosprejem
<i>E</i> _{step}	potenciálový krok (mV)
<i>f</i>	frekvence (Hz)
GA	glykocholová kyselina
GC	plynová chromatografie
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<i>I</i>	proud (nA)

I_p	proud píku (nA)
I_{pa}	proud anodického píku (nA)
I_{pk}	proud katodického píku (nA)
IR	infračervená spektroskopie
LA	litocholová kyselina
LC	kapalinová chromatografie
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
m-AgSAE	rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgámová elektroda
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MS	hmotnostní detekce
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity vodíkových iontů
pK_a	záporný dekadický logaritmus aciditní disociační konstanty
RSD	relativní směrodatná odchylka (%)
SEM	elektronová mikroskopie
t_{acc}	doba akumulace (s)
TG	termogravimetrie
UDCA	ursodeoxycholová kyselina
UFLC	ultra-rychlá kapalinová chromatografie
UV	ultrafialový
v	rychlost polarizace ($mV \cdot s^{-1}$)
XPRD	rentgenová prášková difraktometrie

1. Úvod

1.1. Cíl práce

Předkládaná diplomová práce vznikla v rámci širšího výzkumného projektu věnovaného studiu supramolekulárních interakcí žlučových kyselin, jejich konjugátů a metodám vhodným pro jejich charakterizaci a analýzu. Zabývá se elektrochemickou redukcí dvou vybraných žlučových kyselin – kyseliny dehydrocholové (DHCA), jejíž elektrochemické chování nebylo dosud studováno, a kyseliny chenodeoxycholové (CDCA), která byla studována jen velmi okrajově s využitím rtuťové kapkové elektrody¹. Teprve tento projekt se zabývá možnostmi využití stacionárních elektrodoých materiálů.

Žlučové kyseliny jsou látky, které mají možnost díky svému amfipatickému charakteru vytvářet supramolekuly. Tyto supramolekuly mohou tvořit jak samotné žlučové kyseliny, tak také jejich konjugáty. Cílem je tedy získat data, která umožní porovnat chování látek samotných a jejich příslušných konjugátů. Výsledné supramolekuly by v budoucnu mohly nacházet uplatnění např. v lékařství jako nosiče určitých typů léčiv.

Tato diplomová práce přímo navazuje na bakalářskou práci², ve které byla studována elektrochemická redukce chenodeoxycholové kyseliny na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné tuhé amalgámové elektrodě a visící rtuťové kapkové elektrodě – byl studován vliv pH prostředí, koncentrační závislost a elektrodoý děj. Tato diplomová práce se pak podrobněji zabývá vlivem organického rozpouštědla na elektrochemickou redukcí a možnost jejího využití k voltametrické detekci CDCA s využitím stacionárních rtuťových elektrod. Za tímto účelem byly použity metody DC a DP voltametrie, cyklické voltametrie (CV), adsorpční rozpouštěcí voltametrie s diferenčním pulsním skenem (AdS-DPV) a „square-wave“ voltametrie.

Dále se tato diplomová práce zabývá studiem elektrochemické redukce kyseliny dehydrocholové. Byl studovaný vliv pH prostředí, koncentrační závislost a elektrodoý děj na již výše jmenovaných stacionárních elektrodách na bázi rtuti.

1.2. Žlučové kyseliny

Žlučové kyseliny jsou produkty metabolismu cholesterolu a jsou pravděpodobně nejdůležitějšími biologickými povrchově aktivními látkami. Jsou vylučovány játry do tenkého střeva, ve kterém se podílejí na trávení mastných kyselin z potravy. Tenkým střechem jsou následně reabsorbovány zpět do oběhu – podléhají tedy tzv. enterohepatálnímu cyklu³.

Jejich struktura je tvořena steroidním jádrem, které se skládá ze tří šestičlenných (A, B, C) a jednoho pětičlenného (D) kruhu, na kterém je navázaný krátký alifatický řetězec. Funkční skupiny jsou nejčastěji dány přítomností hydroxylových a methylových skupin na steroidním jádře. Umístěním těchto skupin a typem postranního řetězce se od sebe jednotlivé kyseliny odlišují³. Podle délky postranního řetězce navázaného na pětičlenný D kruh jsou žlučové kyseliny rozdělovány do dvou hlavních skupin na C₂₇ a C₂₄ žlučové kyseliny. U vyšších obratlovců jsou nejvíce zastoupeny C₂₄ žlučové kyseliny, které tvoří konjugáty nejčastěji s glycinem a taurinem⁴.

Struktura žlučových kyselin je charakteristická hydrofobní β stranou a hydrofilní α stranou³. Tato struktura jim dává jejich charakteristickou amfipatickou vlastnost, díky které se žlučové kyseliny při koncentracích vyšších, než je jejich kritická micelární koncentrace (CMC), shlukují ve vodných prostředích do micel⁵.

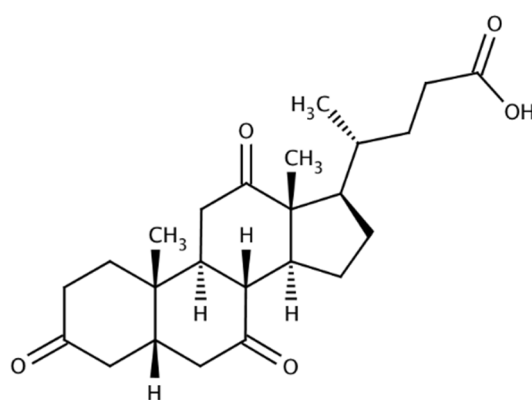
Díky své unikátní struktuře představují jednu z velmi slibných skupin látek, které mohou být použity v oblasti molekulárního rozpoznávání a biomimetiky. Zajímavá je i jejich schopnost začlenit do své struktury jiné cizorodé látky. Některé žlučové kyseliny a jejich analogy se chovají jako želírovací látky jak ve vodném, tak v organickém prostředí, což by mohlo být užitečné při vývoji budoucích biomateriálů⁴.

Využití elektrochemických metod pro charakterizaci nově připravených supramolekulárních systémů založených na steroidních podjednotkách a pro sledování molekulárních interakcí zahrnujících proces spontánní tvorby supramolekul může přinést významné poznatky o stabilitě těchto systémů. Jde také o metody, které jsou vhodné pro sledování vzájemných molekulových interakcí⁶.

1.3. Studované látky

1.3.1. Dehydrocholová kyselina

Dehydrocholová kyselina (dále jen DHCA) není přirozeně se vyskytující žlučovou kyselinou, ale je syntetizována uměle⁷. Jde o velmi jemný bílý prášek, který je za běžných laboratorních podmínek těžce rozpustný ve vodě, dobře se však rozpouští v řadě organických rozpouštědel, jakými jsou methanol, ethanol či acetonitril. Strukturní vzorec DHCA je uveden na **obr. 1**, fyzikálně-chemické vlastnosti jsou shrnuty v **tab. 1**.



Obr. 1 Strukturní vzorec dehydrocholové kyseliny

Struktura DHCA je tvořena steroidním jádrem s krátkým alifatickým řetězcem zakončeným karboxylovou skupinou. Na steroidním jádře jsou v poloze C₃, C₇ a C₁₂ připojeny tři oxoskupiny a v polohách C₁₀ a C₁₃ jsou dvě methylové skupiny.

Dehydrocholová kyselina je průmyslově nejčastěji vyráběna z kyseliny cholové oxidací hydroxylových skupin na uhlících C₃, C₇ a C₁₂. Reakce může probíhat v roztoku chlornanu sodného⁸, chlornanu vápenatého nebo kapalného bromu za současného zahřívání⁹. Čistou DHCA je možné touto cestou získat také ze směsi žlučových kyselin, která zůstává po průmyslové výrobě kyseliny ursodeoxycholové, a byla by jinak nevyužita. DHCA je tedy získávána poměrně snadnou a levnou cestou⁸. Výtěžek DHCA uvedenými metodami je dostačující, ale zahrnuje značné množství vzniklých vedlejších produktů, jejichž separace a likvidace může představovat problém. V nedávné době byla

zaměřena pozornost na syntézu DHCA biotransformací z hovězí žluči. Výtěžek reakce byl však malý a celý proces byl časově náročný⁹.

Další možnou cestu výroby DHCA představuje elektrosyntéza, které umožňuje získání vysokých výtěžků s dobrou selektivitou a minimem vzniklých vedlejších produktů. V tomto případě byla provedena řízená elektrochemická oxidace sekundárních alkoholových skupin kyseliny cholové, které je poměrně snadné oxidovat. Proces byl zkoumán na různých elektrodových materiálech, např. na platině, titanem dopovaném oxidu olovičitém nebo grafitu⁹.

DHCA je hojně využívána ve farmakologii jako cholangoikum a hydrocholeretikum při léčbě řady jaterních chorob a žlučových kamenů. Slouží také jako diuretikum, laxativum a je používána při diagnostice jako kontrastní látka. Podílí se na ochraně hepatocytů a dalších typů buněk proti apoptóze, působí také antimikrobiálně⁷.

Důležitou vlastností žlučových kyselin je jejich schopnost do své struktury částečně začlenit organické molekuly, jakými jsou alifatické a aromatické uhlovodíky, alkoholy, ketony, estery, nitrily, epoxidy, amidy a další. V posledních letech je v této oblasti věnována pozornost především kyselině dehydrocholové pro rozlišení organických racemátů aryl methyl sulfoxidů a cyklických amidů. Inkluzní sloučeniny jsou tvořeny přímou absorpcí organické sloučeniny ve formě roztoku do krystalové struktury pevné DHCA¹⁰.

Oproti přírodním žlučovým kyselinám netvoří DHCA snadno micely s tuky a fosfolipidy⁸.

1.3.2. Analytické metody stanovení dehydrocholové kyseliny

Dehydrocholová kyselina je látka, která je hojně využívána ve farmaceutickém průmyslu. Z tohoto důvodu je potřeba znát její přesnou strukturu a polymorfii, kteréžto určují rozdílné fyzikální a chemické vlastnosti látek¹¹.

DHCA může být získána ve dvou polymorfních formách α a β , přičemž β forma je z termodynamického hlediska více stabilní. Forma α vytváří dimer spojením dvou molekul DHCA prostřednictvím vodíkové vazby mezi dvěma karboxylovými skupinami na uhlíku C₂₄ postranního alifatického řetězce, naproti tomu β forma tvoří

dimer vodíkovou vazbou mezi karboxylovou skupinou na C₂₄ jedné molekuly a karbonylovou skupinou na C₃ druhé molekuly¹¹.

Příprava a kompletní charakterizace β formy DHCA byla provedena pomocí metod elektronové mikroskopie (SEM), infračervené spektroskopie (IR), nukleární magnetické spektroskopie na pevné fázi (NMR), diferenční skenovací kalorimetrie (DSC), termogravimetrie (TG) a rentgenové práškové difraktometrie (XPRD)¹¹.

Mezi metody stanovení DHCA patří micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC), která byla vyvinuta a validována pro stanovení DHCA (a dalších žlučových kyselin) ve farmaceutických výrobcích za účelem ověření jejich kvality. Jde o jednoduchou, rychlou a užitečnou metodu stanovení žlučových kyselin, která vytváří dobrou alternativu HPLC v analýze kvality farmak¹².

Voltametriky byla DHCA spolu s dalšími organickými sloučeninami detekována za pomoci senzoru vyvinutého na bázi monovrstev derivátů β -cyklodextrinu na zlaté elektrodě (β -CD-SME). Tento sensor dobře slouží i jako elektrochemický detektor ve spojení s kapalinovou chromatografií a kapilární elektroforézou¹³.

Stanovení koncentrace DHCA přijaté léky v lidském séru je prováděno enzymaticky za použití 3-oxosteroid- Δ^4 -dehydrogenasy. Principem stanovení je využití tohoto enzymu k převedení DHCA na 3,7,12-trioxo- Δ^4 -steroid za současné redukce nitrotetrazolinové modři na diformazan. Množství vzniklého diformazanu je poté měřeno spektrometricky¹⁴.

1.3.3. Chenodeoxycholová kyselina

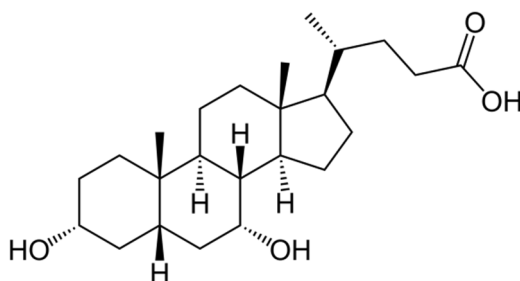
Chenodeoxycholová kyselina (dále jen CDCA) je jemný bílý prášek, který je velmi špatně rozpustný ve vodě, dobře se však rozpouští v organických rozpouštědlech, jakými jsou např. ethanol, methanol či dichroman¹⁵. Patří spolu s kyselinou cholovou mezi dvě hlavní lidské žlučové kyseliny, poprvé byla izolována z husí žluče. Je produkována játry a tvoří důležitou roli v procesu rozkladu cholesterolu a při absorpci řady živin, jakými jsou například vitamíny rozpustné v tucích¹⁶. Její struktura je tvořena steroidním jádrem s krátkým alifatickým řetězcem zakončeným karboxylovou skupinou. Na steroidním jádře jsou v poloze α na C₃ a C₇ dvě hydroxylové skupiny a na

C₁₀ a C₁₃ dvě methylové skupiny. Strukturní vzorec CDCA je na **obr. 2**, fyzikálně-chemické vlastnosti jsou shrnuty v **tab. 1**.

Průmyslová výroba CDCA je založena především na její separaci ze zvířecí či drůbeží žluči celou řadou patentovaných metod. Surová CDCA je z roztoku obvykle získávána okyselením, po kterém dochází k jejímu vysrážení. Další možností je použití vápenaté soli vedoucí ke zmýdelnění, kdy dochází k vzniku esterové vazby mezi CDCA a touto solí. Následuje pak řada dalších kroků jako acetylace, separace vedlejších produktů či krystalizace¹⁷.

CDCA je jednou z nejvíce používaných látek při léčbě žlučových kamenů, protože velmi účinně snižuje množství cholesterolu ve žluči a dokáže rozpouštět cholesterol ve žlučových kamenech¹⁶. Je také prekurzorem pro přípravu další významné žlučové kyseliny používané při léčbě žlučových kamenů – kyseliny ursodeoxycholové (UDCA)¹⁷.

V současné době se CDCA používá nejvíce při léčbě cerebrotendinózní xantomatózy, onemocnění střev a zácpy. Hodnota poměru cholové a chenodeoxycholové kyseliny ve žluči je důležitým ukazatelem řady jaterních onemocnění, má velkou diagnostickou hodnotu¹⁶.



Obr. 2 Strukturní vzorec chenodeoxycholové kyseliny.

Tab. 1 Fyzikálně-chemické vlastnosti DHCA a CDCA (hodnoty v tabulce byly měřeny za atmosférického tlaku a za standardních laboratorních podmínek)^{18,19,20,21,22}.

C.A.S. Name	Dehydrocholová kyselina	Chenodeoxycholová kyselina
C.A.S. Number	81-23-2	474-25-9
Sumární vzorec	C ₂₄ H ₃₄ O ₅	C ₂₄ H ₄₀ O ₄
Relativní molekulová hmotnost	402,52	392,57
Rozpustnost ve vodě	180 mg·l ⁻¹	89,9 mg·l ⁻¹
Teplota tání	238 – 240 °C	168-171 °C
pak	4,74	4,6
hustota	1,196 g·cm ⁻³	1,100 g·cm ⁻³
CMC ^a	–	9 mmol.l ⁻¹

^a kritická micelární koncentrace ve vodě při 25 °C

1.3.4. Analytické metody stanovení chenodeoxycholové kyseliny

Hlavními kvantitativními metodami pro stanovení CDCA v biologických vzorcích a lékových formách jsou především tandemová hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (ESI-MS/MS), vysokoúčinná kapalinová chromatografie s odpařovacím detektorem rozptylu světla (HPLC-ELSD) a ultra rychlá kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (UFLC-MS)¹⁶. Jde tedy především o drahé chromatografické metody ve spojení s hmotnostní detekcí a je potřeba hledat levnější alternativy stanovení, které poskytnou srovnatelné či lepší výsledky. Stanovení těmito metodami je také omezeno tím, že je řada látek ve žluči přítomna ve formě různých izomerů s podobnými retenčními časy a samotnému stanovení tak musí předcházet celá řada složitých derivatizačních kroků. Metody jako HPLC-ELSD nebo UFLC-MS vyžadují několikastupňovou filtraci a čištění, což může být problematické především pro *in vivo* stanovení¹⁶.

S ohledem na tyto skutečnosti byla pro stanovení CDCA vyvinuta metoda ELISA s vázanými monoklonálními protilátkami proti CDCA. Jde o přesnou a citlivou kvalitativní i kvantitativní metodu, která nevyžaduje zdlouhavé předčišťovací kroky a

umožňuje stanovení CDCA v řadě vzorků. Navíc je možné tuto metodu použít i pro sledování hladin CDCA *in vivo*, což představuje nové možnosti pro její studium¹⁶.

Mezi používané chromatografické metody patří také dvoudimenzionální tenkovrstvá chromatografie s reverzní fází s navázaným methyl β -cyklodextrinem. Tato metoda slouží především k rozlišení CDCA vedle deoxycholové kyseliny (DCA), od které se liší pouze v pozici jedné hydroxy skupiny²³.

CDCA byla dále analyzována pomocí metody superkritické fluidní chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí využívající jako zdroj ionizace elektrosprej. Tuto metodu je možno využít především při studiu metabolismu žlučových kyselin a dále v oblasti medicíny a farmakologie²⁴.

Další chromatografickou metodu stanovení CDCA a ostatních žlučových kyselin představuje klasická kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (LC/MS/MS) za použití C₁₈ kolony s mobilní fází složenou z methanolu, acetonitrilu, vody a octanu amonného. Jako iontový zdroj v hmotnostní detekci slouží elektronová ionizace pracující v negativním módu²⁵.

Stanovení CDCA bylo prováděno také pomocí plynové chromatografie v kombinaci s hmotnostní detekcí (GC-MS). Látku je v tomto případě nutné derivatizovat, aby byla její detekce možná. Jednou z možností derivatizace je v prvním kroku oximace a v druhém kroku silanizace²⁶.

Ve spojení s chromatografickými metodami se používá ke stanovení žlučových kyselin také elektrochemická detekce, jelikož jde o levnou a přesnou metodu, která nepotřebuje širokou řadu derivatizačních kroků jako metody výše popsané. V raných studiích byla použita například elektrochemická detekce, která využívala dvou porézních grafitových elektrod, přičemž analyzované látky v tomto případě podléhaly oxidaci. Ve srovnání s do té doby používanou UV detekcí se tato metoda prokázala jako mnohem citlivější a efektivnější²⁷. Žlučové kyseliny totiž absorbují v UV oblasti (kolem 205 nm) pouze velmi slabě a jejich stanovení touto cestou vyžaduje rozsáhlé předčišťování a předkolonovou derivatizaci, při které se do struktury žlučové kyseliny zavede funkční skupina absorbující v UV oblasti²⁸.

Jako další elektrochemická detekce pak byla použita například pulsní amperometrická detekce na zlaté elektrodě ve spojení s gradientovou HPLC²⁸ nebo s aniontově výměnnou chromatografií²⁹.

Samotné elektrochemické metody bez spojení s chromatografií se dosud ke stanovení žlučových kyselin příliš nepoužívaly. Doposud byla použita metoda diferenční pulsní polarografie pro stanovení žlučových kyselin (CA, DCA, UDCA, CDCA, LA) ve farmaceutických výrobcích a v lidské žluči. Jde o levnou, velmi rychlou, dostatečně citlivou a přesnou metodu stanovení, jejíž obrovskou výhodou je, že není potřeba žádná forma předúpravy či derivatizace vzorku¹. Elektrochemicky byla dále studovaná kyselina cholová (CA), která tvoří spolu s CDCA hlavní složku lidské žluči. Pro stanovení byla zvolena metoda katodické rozpouštěcí „square-wave“ voltametrie na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE). Jde o rychlou a levnou metodu vhodnou pro stanovení CA přímo ze vzorku žluči. Výsledky poskytnuté touto metodou mají velkou reprodukovatelnost³⁰.

Elektrochemicky byla CDCA dále detekována ve vzorku komerčně dodávaného léčiva za pomoci senzoru vyvinutého na bázi benzylhexadecyldimethylamonium cholátu³¹.

Pro detekci CDCA a dalších žlučových kyselin v plasmě a extraktu žaludečních šťáv byl vyvinut amperometrický enzymový detektor využívající 3- α -hydroxysteroid dehydrogenasu³². Na rtuťových elektrodách byla také studována interakce žlučových kyselin s ionty kovů (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) přirozeně se vyskytujících ve žluči³³.

1.4. Voltametrické metody s lineárním nárůstem potenciálu

1.4.1. Direct current voltametrie

DC voltametrie je metoda, při níž je na elektrodu vkládán potenciál, který se s časem lineárně mění. Ve srovnání s rychlostí ustavování rovnováhy u elektrody je rychlost změny potenciálu dostatečně malá a lze tedy tuto metodu považovat za stacionární při konstantním potenciálu. Výsledným signálem je voltametrická vlna charakterizována půlvlnovým potenciálem (kvalitativní údaj) a limitním proudem (kvantitativní údaj)³⁴.

1.4.2. Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie je metoda, která se využívá ke studiu elektrodového děje a kinetických parametrů řady elektrochemických systémů³⁵. Jde o metodu, při níž je na stacionární elektrodu vkládán potenciál s trojúhelníkovým průběhem³⁴. Potenciál je lineárně měněn od zvoleného počátečního potenciálu (tzv. forward scan) a zpět (tzv. reverse scan) a umožňuje z polohy katodického a anodického píku usuzovat na reverzibilitu elektrodového děje. Důležitým parametrem této metody je rychlost polarizace $v = dE/dt$, kterou lze měnit ve velmi širokém rozmezí³⁶.

1.5. Pulsní voltametrické metody

1.5.1. Diferenční pulsní voltametrie

Diferenční pulsní voltametrie je metoda, která měla pro oblast elektrochemie obrovský přínos. Vyznačuje se vyšší citlivostí než klasické metody s lineárně se měnícím skenem a dosahuje tedy nižších mezí detekce. Na lineárně se s časem měnící potenciál je vkládán napěťový pulz s amplitudou v rozmezí 10 – 100 mV, který trvá v řádu desítek milisekund. Registrován je pak rozdíl proudů naměřených těsně před vložením pulsu a na konci tohoto pulsu³⁴.

1.5.2. „Square-wave“ voltametrie

„Square-wave“ voltametrie je velmi citlivá elektrochemická metoda, která kombinuje široce ceněnou citlivost diferenční pulsní voltametrie (umožňuje nastavení vysoké rychlosti polarizace lineárního voltametrického skenu) a schopnost cyklické voltametrie nahlédnout na reversibilitu redoxních reakcí. Předchůdcem „square-wave“ voltametrie je Barkerova „square-wave“ polarografie³⁷.

„Square-wave“ voltametrie se vyznačuje čtvercovou vlnou o vysoké amplitudě a vysoké frekvenci se stoupajícím (jako schodiště) průběhem. Může být použita v kombinaci se statickou či visící rtuťovou kapkovou elektrodou či s pevnými elektrodovými materiály³⁷.

Na elektrodu je vkládán potenciál, který se lineárně s časem mění. Vkládaný potenciál je modulován napětím pravoúhlého tvaru o nízké amplitudě a frekvenci zhruba 100 Hz. Proud je měřen na konci každého pulzu a rozdíl mezi proudy měřenými na dvou po sobě jdoucích pulzech je registrován jako odezva³⁴. Jde o metodu, která může být použita jak pro analytická měření, tak i ke sledování kinetických procesů³⁷.

1.6. Adsorpční rozpouštěcí voltametrie

Řada organických látek má povrchově aktivní vlastnosti, díky kterým mají tyto látky schopnost adsorbovat se na povrchu pevných materiálů. Schopnost adsorpce těchto látek dává základ vzniku adsorpční rozpouštěcí voltametrie (AdSV), při které se látka neelektrolyticky akumuluje na povrchu elektrody. Velikost proudu píku voltametrické vlny získané po kompletní době akumulace odpovídá prakticky pouze redukci/oxidaci celého naadsorbovaného množství elektroaktivní látky na povrchu elektrody. Při dané teplotě je množství naadsorbované látky na elektrodovém povrchu závislé pouze na koncentraci látky v roztoku³⁸.

Adsorpce při této metodě probíhá při určitém potenciálu akumulace, který je potřeba nejprve určit v kroku optimalizace. Druhým parametrem, který je třeba optimalizovat, je doba akumulace, za kterou je získán nejvyšší signál.

AdSV je možné kombinovat s lineárním skenem DC voltametrie i s pulsními metodami, jakými jsou „square-wave“ voltametrie či DP voltametrie³⁸.

2. Experimentální část

2.1. Chemikálie

Studované látky: dehydrocholová kyselina, chenodeoxycholová kyselina (obě >99%, Sigma-Aldrich, Praha, ČR).

Organická rozpouštědla: methanol ($\geq 99,9\%$, Merck, Německo), acetonitril (kvalita pro HPLC, Merck, Německo, p.a.).

Pufry: Pro přípravu kyselé složky BR pufru byla použita čistá kyselina octová (Lachema, Brno, ČR), 85% kyselina fosforečná (Lachema, Brno, ČR) a kyselina boritá (čistota p.a., Penta, Chrudim, ČR), všechny o koncentraci $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro přípravu zásadité složky BR pufru byl použit $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ hydroxid sodný (čistota p.a., Penta, Chrudim, ČR). Pro přípravu $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátového pufru o pH 9,1 byla použita kyselina boritá (čistota p.a., Penta, Chrudim, ČR) a tetraboritan disodný dekahydrát (čistota p.a., Lachema, Brno, ČR).

Další použité roztoky: $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl (Lachema, Brno, ČR).

K přípravě pufrů byla použita deionizovaná voda (Milli-Q_{plus} system, Millipore, Billerica, MA, USA), hodnota pH byla měřena pH-metrem Jenway 4330 (Jenway, Staffordshire, UK).

K vážení byly použity analytické váhy Sartorius 2004 MP (Goettingen, Německo).

2.2. Příprava roztoků

Zásobní roztoky DHCA a CDCA byly připraveny o koncentraci $1\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ navážením vypočítaného množství pevné látky a rozpuštěním v odměrné baňce o objemu 50 ml. DHCA byla rozpouštěna pouze v methanolu, CDCA byla připravena rozpuštěním v methanolu a v acetonitrilu. Baňky s roztoky byly obaleny v alobalu a skladovány v lednici.

Analyzované roztoky byly připravovány do 10ml odměrné baňky pipetováním 500 μl studované látky o koncentraci $1\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 500 μl organického rozpouštědla a

baňka byla následně doplněna po rysku pufrém o požadovaném pH. Výsledný poměr pufr – organické rozpouštědlo byl 9:1.

Měření koncentrační závislosti probíhalo vždy pomocí zvlášť připravených roztoků o dané koncentraci se zachováním poměru pufr-methanol 9:1. Obsah methanolu či acetonitrilu tak byl vždy ve všech vzorcích stejný.

Roztok základního elektrolytu byl připraven odměřením 1 ml organického rozpouštědla (methanol, acetonitril) do 10ml baňky a doplněním baňky po rysku příslušným pufrém.

Pro odstranění kyslíku byl každý roztok před vlastním měřením probubláván dusíkem po dobu 5 minut.

2.3. Aparatura

Pro voltametrická stanovení byl použit osobním počítačem ovládaný voltametrický analyzátor Eco-Tribo polarograf pracující se softwarem Polar Pro verze 5.1 (Eco-Trend Plus, Praha, ČR). Pro metodu „square-wave“ voltametrie byl použit analyzátor PalmSens (PalmSens BV, Utrecht, Nizozemsko) pracující se softwarem PSTrace verze 4.5.0. Oba softwary pracovaly v operačním systému Microsoft Windows XP. Rychlost nárůstu potenciálu byla u metody DPV a AdS-DPV nastavena na $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, u metody DCV na $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Výška pulzu byla pro tyto metody nastavena na -50 mV a šířka pulzu na 80 ms . Rychlost polarizace se u metody CV se měnila v rozsahu $10 - 2560 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Jednotlivá měření byla prováděna v tříelektrodovém zapojení. Jako referentní byla použita argenchloridová elektroda ($3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ KCl}$) a jako pomocná byla použita platinová drátková elektroda (Elektrochemické detektory, Turnov, ČR).

2.4. Charakteristika pracovních elektrod

2.4.1. Visící rtuťová kapková elektroda

Pro metody DCV, DPV AdS-DPV a CV byla použita tužková visící rtuťová kapková minielektroda typu UM μ E (Polaro-Sensors, Praha, ČR). Pro výpočet plochy

kapky se postupovalo následujícím způsobem: Do zvážené polarografické nádoby s roztokem $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ chloridu draselného a s trochou rtuti bylo nakapáno 20 kapek rtuti. Poté byla vypočtena hmotnost jedné kapky $m = 0,0159 \text{ g}$. Z ní byla vypočítána plocha kapky $= 0,73 \text{ mm}^2$ za předpokladu, že kapka má tvar ideální koule. Průtoková rychlost kapky byla $3,03 \text{ mg}\cdot\text{s}^{-1}$.

2.4.2. Rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgámová elektroda

Pro metody DP voltametrie a „square-wave“ voltametrie byla použita komerčně dodávaná m-AgSAE č. 20711a s průměrem menisku $0,5 \text{ mm}$ (EcoTrend Plus, Praha, ČR).

Na začátku každého dne byla elektroda aktivována v roztoku $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ chloridu draselného při vloženém potenciálu -2200 mV po dobu 300 sekund za současného míchání roztoku. Amalgamace elektrody ponořením do kapalné rtuti na 10 sekund se prováděla v případě odpadnutí menisku a po delším přerušení práce.

Na elektrodu nebyly v průběhu měření vkládány regenerační pulsy, neboť se prokázalo, že vložení pulsů nemá vliv na analytický signál látky.

2.5. Vyhodnocení výsledků

K vyhodnocení křivek naměřených metodami DCV, DPV AdS-DPV a CV byl použit program Polar Pro verze 5.1. Všechny křivky byly měřeny minimálně 3 krát a k jejich vyhodnocení byla použita metoda prodloužení základní linie před nástupem píku a odečet velikosti proudu píku jako rozdílu mezi proudem odečteným v proudovém maximu píku a proudem odečteném na prodloužení základní linie při potenciálu odpovídajícím potenciálu píku. K vyhodnocení křivek metody „square-wave“ voltametrie byl použit program PStTrace verze 4.5.0.

V programu OriginPro 8 (OriginLab Corporation, Norhampton, USA) byly vytvořeny všechny uvedené grafy a také vyhodnoceny hodnoty směrnic, úseků a korelačních koeficientů regresních rovnic. Tabulky a výpočty hodnot směrodatných odchylek byly tvořeny v programu Microsoft Excel 2013 (Microsoft, USA).

Hodnoty meze detekce LOD byly vypočítány jako trojnásobek a hodnoty meze stanovitelnosti LOQ jako desetinásobek směrodatné odchylky velikosti proudu pro nejnižší naměřenou koncentraci vydělené směrnici příslušné lineární závislosti vždy pro deset po sobě jdoucích měření. Hodnota relativní směrodatné odchylky RSD byla počítána jako podíl směrodatné odchylky a průměru vynásobený stem a vyjádřený v procentech. Směrodatná odchylka a průměr byly počítány pro deset po sobě jdoucích měření nejnižší naměřené koncentrace.

Hodnota opakovatelnosti byla vypočítána pro nejvyšší naměřenou koncentraci jako relativní směrodatná odchylka RSD určená z výšky píku dané rozdílem mezi proudem odečteným v proudovém maximu píku a proudem odečteném na prodloužení základní linie při potenciálu odpovídajícím potenciálu píku.

3. Diskuze a výsledky

3.1. Studium elektrochemického chování dehydrocholové kyseliny na visící rtuťové kapkové elektrodě

Studium elektrochemického chování dehydrocholové kyseliny bylo provedeno metodami direct current voltametrie a diferenční pulsní voltametrie za použití visící rtuťové kapkové elektrody. Uvedenými metodami bylo nejprve zvoleno prostředí o nejvhodnějším pH – tedy prostředí, ve kterém studovaná látka poskytla největší signál s nejvyšší opakovatelností. Po zvolení vhodného prostředí byla proměřena oběma metodami DCV i DPV koncentrační závislost ke zjištění nejnižší meze detekce a meze stanovitelnosti a metodou cyklické voltametrie byl na HMDE studován elektrodový děj.

3.1.1. DC voltametrie dehydrocholové kyseliny

3.1.1.1. Studium pH závislosti

Studium elektrochemického chování dehydrocholové kyseliny bylo nejprve provedeno metodou DC voltametrie v prostředí BR pufr – methanol (9:1) na HMDE v rozsahu pH 3,0 – 12,0. Pro prostředí o pH 2,0 již neposkytlo žádný signál měřené látky díky omezenému katodickému rozsahu danému vylučováním vodíku na elektrodě. Pro prostředí s methanolem bylo zvoleno vzhledem k velmi špatné rozpustnosti DHCA ve vodě ($180 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, viz tab. 1). Roztok DHCA o koncentraci $5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ byl v celém měřeném rozsahu pH čirý bez tvorby sraženin.

DC voltamogramy pH závislosti jsou zobrazeny na **obr. 3A** a **3B**. V **tab. 2** jsou shrnuty hodnoty potenciálu píků a proudu píků DHCA a potenciály úniku základního elektrolytu (ZE) a úniku DHCA. Závislost potenciálu píků DHCA na pH je na **obr. 4**, velikost proudu píků DHCA na pH je na **obr. 5**.

DHCA poskytuje 3 píky s ohledem na hodnotu pH. Píky jsou označeny jako p_1 , p_2 a p_3 v pořadí výskytu na potenciálové ose od nuly k záporným potenciálům. První pík, označený p_1 , se objevuje v rozsahu pH 7,0 – 12,0. Potenciál tohoto píku kolísá mezi hodnotami -1224 až -1281 mV , výška píku roste do pH 9,0 a poté klesá.

Druhý pík, označený p_2 , se vyskytuje v celém rozsahu měřených pH. Výrazný posun potenciálu od -1263 mV do zápornějších oblastí pozorujeme v rozsahu hodnot pH 3,0 – 7,0, poté je potenciál toho píku konstantní s hodnotou ca -1475 mV. Proud píku p_2 s rostoucím pH klesá.

Třetí pík, označený p_3 , je nejvýraznější a vyskytuje se v celém rozsahu měřených pH kromě hodnot pH 6,0 a 12,0. Výrazný posun potenciálu od -1404 mV do zápornějších oblastí pozorujeme v rozsahu pH 3,0 – 5,0, od pH 7,0 je potenciál tohoto píku konstantní s hodnotou ca -1800 mV. Růst výšky píku pozorujeme pouze při hodnotě pH 4,0, od tohoto pH výška píku s rostoucím pH pouze klesá.

Z uvedených závislostí bylo vybráno jako nejvhodnější pH 7,0, ve kterém byla dále měřena koncentrační závislost a cyklická voltametrie. V tomto prostředí byly všechny tři píky DHCA nejvýraznější a změřený signál měl nejvyšší opakovatelnost.

Zvláštní chování je možné pozorovat při pH 6,0, kdy se tvoří pouze pík p_2 , který je však poměrně špatně vyhodnotitelný. V oblasti píku p_3 sice není výrazný pík, ale dochází k nárůstu proudu. Tento trend je zřejmý i pro pH 5,0, kdy je vyhodnocovaný pík p_3 relativně plochý. Tyto změny zřejmě souvisí se změnou ionizace kyseliny (pK_a 4,74). Zároveň u píku p_3 platí, že v oblasti výskytu nedisociované formy kyseliny (pH 3,0 – 5,0) má pík výrazně vyšší výšku a jeho potenciál se posouvá k zápornějším potenciálům s rostoucím pH. Oba tyto trendy platí i pro výrazně nižší pík p_2 . Změna elektrochemického chování tedy evidentně souvisí s disociací karboxylové skupiny postranního řetězce steroidního skeletu. V oblasti pH 5,0 – 6,0 se také mění rozdíl mezi potenciálem úniku základního elektrolytu v přítomnosti a nepřítomnosti kyseliny. Nedisociovaná forma kyseliny se zřejmě adsorbuje na povrch elektrody a inhibuje vývoj vodíku, tj. pro pH 3,0 – 5,0 únik samotného základního elektrolytu předchází úniku v přítomnosti DHCA o ca 100 mV, od pH 6,0 je únik v přítomnosti látky shodný s únikem základního elektrolytu.

Přítomnost katodických signálů u žlučových kyselin zřejmě souvisí s redukcí protonu karboxylové skupiny postranního řetězce a je podmíněna adsorpcí kyseliny na elektrodu. Pro kyselinu glykocholovou bylo v průběhu elektrolýzy na rtuťovém dně při zápornějším potenciálu, než je potenciál její redukce, prokázáno, že nedochází k jejímu rozkladu, což podporuje tuto domněnku³⁹. Pro jiné karboxylové kyseliny byl vznik vodíku prokázán v dimethylsulfoxidu^{40,41} či v iontových kapalinách⁴².

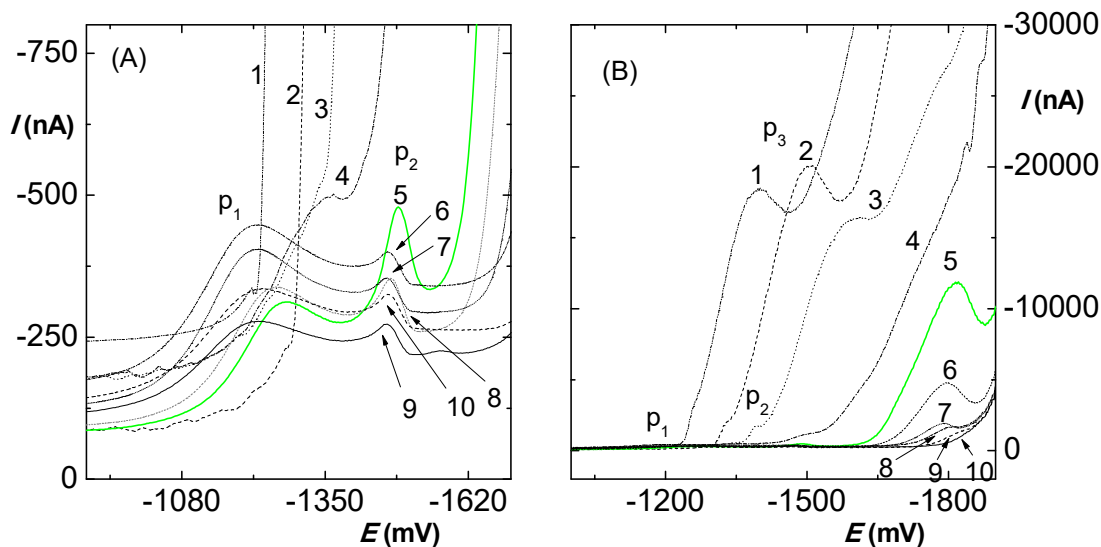
Vzniku vodíku zřejmě odpovídá třetí pík p_3 , jehož výška je významně ovlivněna hodnotou pK_a . Píky p_1 a p_2 jsou zřejmě signály související s adsorpcí DHCA na elektrodu.

Tab. 2 Závislost potenciálu píku E_{p1} , E_{p2} a E_{p3} a proudu píku I_{p1} , I_{p2} a I_{p3} DHCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pH BR pufru měřené metodou DCV na HMDE. Měřeno v prostředí BR pufr – methanol (9:1). Potenciál úniku samotného základního elektrolytu $E_{\text{únik,ZE}}$ a roztoku s DHCA $E_{\text{únik,DHCA}}$ byl odečítán při ca $-30 \mu\text{A}$.

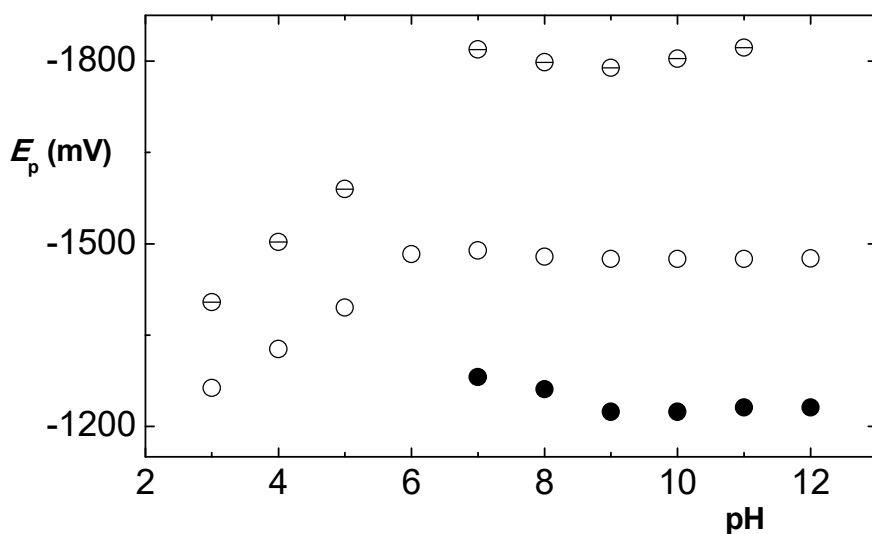
pH	E_{p1} (mV)	E_{p2} (mV)	E_{p3} (mV)	I_{p1} (nA)	I_{p2} (nA)	I_{p3} (nA)	$E_{\text{únik,ZE}}$ (mV)	$E_{\text{únik,DHCA}}$ (mV)
3,0	–	-1263 ^a	-1404	–	-2768 ^a	-17745	-1609	-1713
4,0	–	-1327 ^a	-1503	–	-1845 ^a	-19875	-1690	-1788
5,0	–	-1395	-1590	–	-1477	-15280	-1811	-1926
6,0	–	-1483 ^a	–	–	-1093 ^a	–		
7,0	-1281	-1489	-1819	-214,8	-378,6	-11670		
8,0	-1261	-1479	-1798	-237,6	-245,5	-4629		
9,0	-1224	-1475	-1789	-264,9	-202,2	-1736	↓ ^b	↓ ^b
10,0	-1224	-1475	-1804	-260,4	-211,9	-1461		
11,0	-1231	-1475	-1822 ^a	-155,7	-147,8	-1164 ^a		
12,0	-1231	-1476	–	-192,0	-175,6	–		

^aobtížně vyhodnotitelné

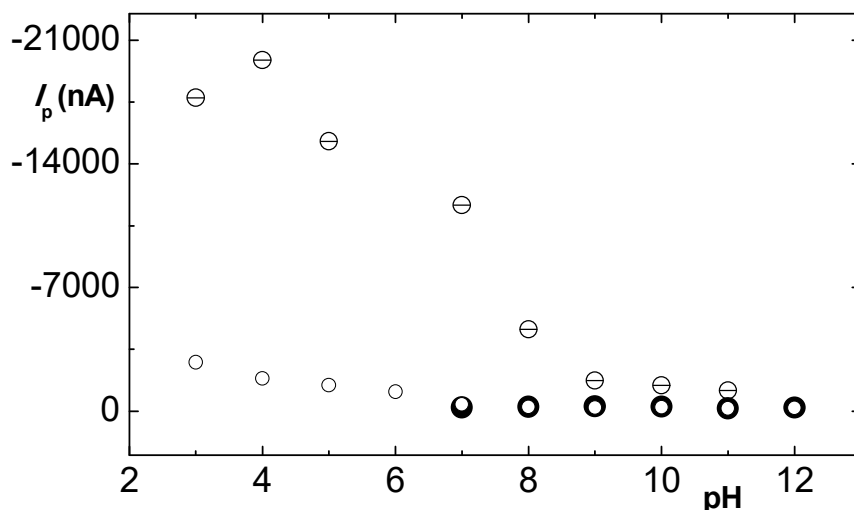
^bšipka označuje shodu potenciálu úniku čistého základního elektrolytu s roztokem DHCA



Obr. 3 DC voltamogramy DHCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) měřené na HMDE při různé hodnotě pH v prostředí BR pufr – methanol (9:1). pH BR pufru: 3,0 (1); 4,0 (2); 5,0 (3); 6,0 (4); 7,0 (5); 8,0 (6); 9,0 (7); 10,0 (8); 11,0 (9); 12,0 (10). (A) je výřez z (B).



Obr. 4 Závislost potenciálu píku E_{p1} (●), E_{p2} (○) a E_{p3} (⊖) DHCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pH BR pufru. Měřeno metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufr – methanol (9:1).



Obr. 5 Závislost proudu píku I_{p1} (●), I_{p2} (○) a I_{p3} (⊖) DHCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pH BR pufru. Měřeno metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufr – methanol (9:1).

3.1.1.2. Koncentrační závislost

Koncentrační závislost DHCA byla měřena ve směsném prostředí BR pufr (pH 7,0) – methanol (9:1) na HMDE metodou DCV. Rozsah měřených koncentrací byl $c = 1 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

DC voltamogramy koncentrační závislosti DHCA jsou na **obr. 6**, závislost potenciálu píku p_1 , p_2 a p_3 na koncentraci DHCA je na **obr. 7**, závislost velikosti proudu píku p_1 , p_2 a p_3 na koncentraci DHCA je na **obr. 8**. V **tab. 3** jsou uvedeny parametry lineární závislosti pro všechny tři píky.

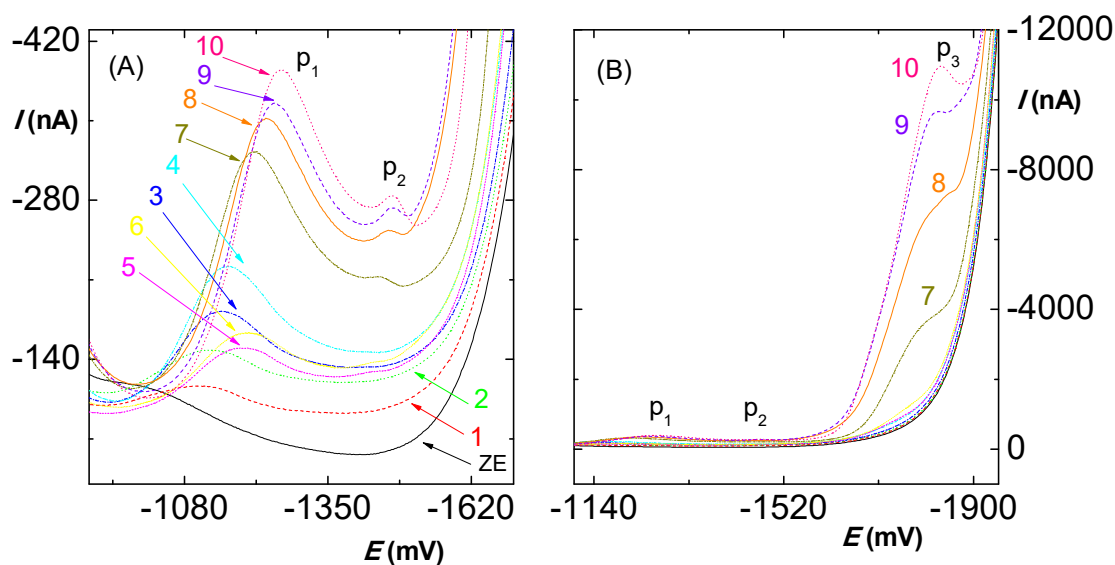
Pík p_1 se tvoří v celém naměřeném koncentračním rozsahu. Potenciál tohoto píku se s rostoucí koncentrací o ca 15 mV posouvá do zápornějších oblastí. Proud píku roste v rozsahu koncentrací $1 \cdot 10^{-5} - 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, při koncentraci $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ klesá a dále s rostoucí koncentrací opět stoupá. Pokles proudu při koncentraci $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ se dá vysvětlit počínající se tvorbou druhého píku p_2 . Metoda DCV však není natolik citlivá, aby tuto skutečnost viditelně zaznamenala. Dobře pozorovatelný je tento přechod u metody DPV (viz kapitola 3.1.2.2.).

Tvorbu píku p_2 pozorujeme až při vyšších koncentracích, a to od koncentrace $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Potenciál tohoto píku se s rostoucí koncentrací mírně posouvá do zápornější oblasti, proud píku s rostoucí koncentrací roste.

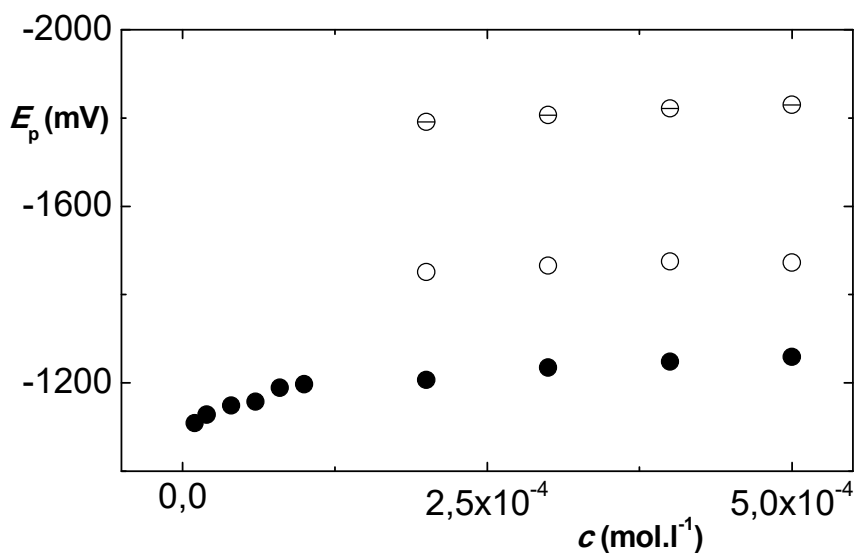
Pík p_3 se stejně jako pík p_2 tvoří až při vyšších koncentracích (od $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). S rostoucí koncentrací dochází k posunu potenciálu tohoto píku do zápornějších oblastí, proud píku s rostoucí koncentrací roste.

Ačkoliv dochází s rostoucí koncentrací k nárůstu výšky proudu všech tří píků, tak lineární dynamické rozsahy jsou poměrně krátké, jak vyplývá z tabulky 3. Pro deset po sobě jdoucích skenů pro nejnižší naměřené koncentrace určeného lineárního dynamického rozsahu dle **tab. 3** byla vypočítána relativní směrodatná odchylka pro výšku píku p_1 ($1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) RSD = 1,5 %, pro pík p_2 ($2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) RSD = 6,7 % a pro pík p_3 ($2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) RSD = 25,0 %. Nejnižší mez detekce LOD a mez stanovitelnosti LOQ byla na HMDE dosažena metodou DCV pro pík p_1 (viz tab. 3).

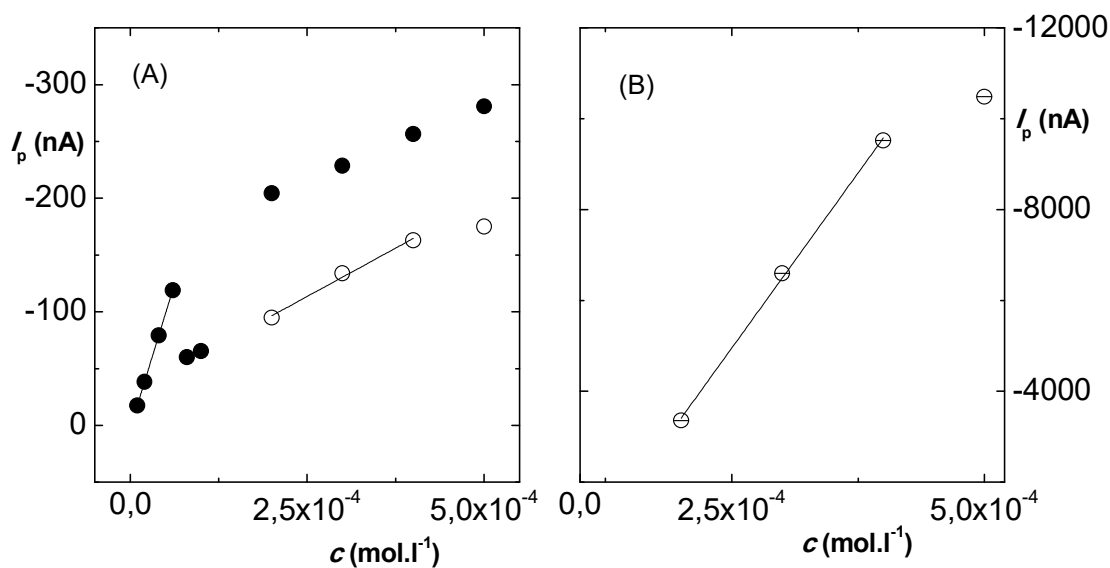
Na **obr. 9** je zobrazena opakovatelnost měření DHCA ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) pro deset následných skenů. Z tohoto měření byla vypočítána relativní směrodatná odchylka výšky píku pro nejvyšší měřené koncentrace $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$: pro pík p_1 je RSD = 7,0 %, pro p_2 je RSD = 5,4 % a pík p_3 je RSD = 30,6 %. Nejlepší opakovatelnost má v nejvyšší naměřené koncentraci druhý pík p_2 .



Obr. 6 DC voltamogramy DHCA měřené na HMDE v prostředí BR pufr (pH 7,0) – methanol (9:1). Koncentrace DHCA ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$): základní elektrolyt (ZE), $1\cdot 10^{-5}$ (1), $2\cdot 10^{-5}$ (2), $4\cdot 10^{-5}$ (3), $6\cdot 10^{-5}$ (4), $8\cdot 10^{-5}$ (5), $1\cdot 10^{-4}$ (6), $2\cdot 10^{-4}$ (7), $3\cdot 10^{-4}$ (8), $4\cdot 10^{-4}$ (9) $5\cdot 10^{-4}$ (10). (A) je výřez z (B).



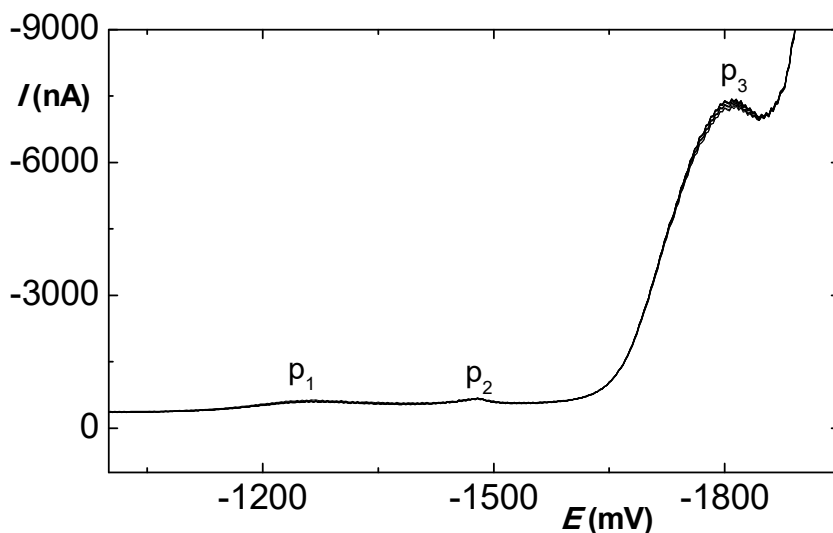
Obr. 7 Závislost potenciálu píku E_{p1} (●), E_{p2} (○) a E_{p3} (⊖) na koncentraci DHCA v rozmezí $c = 1\cdot 10^{-5} - 5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ měřená metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 7,0) – methanol (9:1).



Obr. 8 Závislost proudu píku I_{p1} (●), I_{p2} (○) a I_{p3} (⊖) na koncentraci DHCA v rozmezí $c = 1 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ měřená metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 7,0) – methanol (9:1). Obr. (A) píky p_1 a p_2 , obr. (B) pík p_3 .

Tab. 3 Parametry lineární závislosti pro pík p_1 , p_2 a p_3 DHCA. Měřeno metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 7,0) – methanol (9:1).

pík	lineární dynamický rozsah ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	směrnice ($\text{nA}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$)	úsek (nA)	korelační koeficient	LOD ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
p_1	10 – 60	$2,00 \pm 0,02$	$2,6 \pm 0,6$	0,9998	2,3	7,6
p_2	200 – 400	$0,30 \pm 0,03$	$28,4 \pm 9,0$	0,9854		
p_3	200 – 400	$30,8 \pm 0,9$	2660 ± 280	0,9983		



Obr. 9 DC voltamogramy DHCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) měřené metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 7,0) – methanol (9:1). Deset za sebou jdoucích skenů.

3.1.2. Diferenční pulsní voltametrie dehydrocholové kyseliny

3.1.2.1. Studium pH závislosti

Elektrochemické chování DHCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) bylo studováno také metodou DPV na HMDE ve smíšeném prostředí BR pufr – methanol (9:1) v rozsahu pH 3,0 – 12,0. Při pH 2,0 látka již neposkytla touto metodou signál díky zúžení potenciálového okna v důsledku vylučování vodíku.

Na **obr. 10** jsou voltamogramy DHCA naměřené v daném rozsahu hodnot pH, v **tab. 4** jsou uvedeny hodnoty potenciálů a proudů jednotlivých píků DHCA a potenciály úniku základního elektrolytu a úniku DHCA odečtené při velikosti proudu – 12 μA . Stejně jako u DCV předchází do pH 5,0 únik základního elektrolytu o ca 100 mV únik DHCA, od pH 6,0 jsou potenciály úniku základního elektrolytu a DHCA shodné.

Metoda DPV poskytla stejně jako metoda DCV tři píky DHCA. Hlavní trendy závislosti potenciálů (**obr. 11**) a výšek píků (**obr. 12**) na pH víceméně korelují s výsledky získanými DC voltametří.

První pík DHCA, označený jako p_1 , se tvoří v rozsahu pH 6,0 – 12,0. Jeho potenciál kolísá mezi hodnotami –1206 až –1296 mV. Do pH 9,0 je viditelný posun potenciálu do kladnější oblasti (**obr. 11**), od pH 10,0 je patrný posun k zápornějším potenciálům. Výška píku p_1 je konstantní bez výrazných výkyvů (**obr. 12**).

Pík p_2 se tvoří v rozsahu pH 4,0 – 12,0. Potenciál píku p_2 se s rostoucí hodnotou pH posouvá do zápornějších oblastí, v rozsahu pH 4,0 – 6,0 je viditelný výrazný posun od –1302 do –1434 mV, od pH 7,0 je potenciál tohoto píku konstantní s hodnotou kolem –1435 mV.

Třetí pík, označený p_3 , se netvoří stejně jako v případě metody DCV při pH 6,0 a 12,0. Výrazný posun potenciálu píku od –1251 do –1748 mV pozorujeme v rozsahu pH 3,0 – 7,0, od pH 8,0 je hodnota potenciálu konstantní kolem –1740 mV.

Jako nejvhodnější prostředí bylo pro metodu DPV zvoleno také prostředí o pH 7,0. Všechny tři píky jsou v tomto prostředí nejlépe vykresleny. V tomto prostředí pak byla měřena také koncentrační závislost.

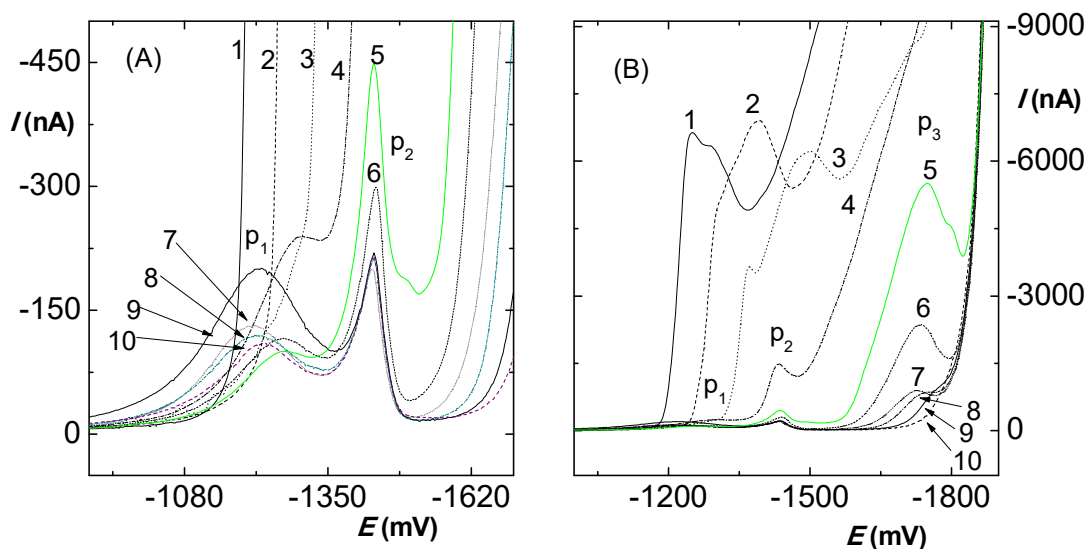
Stejně jako u metody DCV můžeme i u metody DPV pozorovat zvláštní chování DHCA v prostředí o pH 6,0, kdy se tvoří pouze druhý pík p_2 . Oproti metodě DCV je však tento pík mnohem výraznější a nebyl problém s jeho vyhodnocením. Toto zvláštní chování je stejně jako u metody DCV možno připsat změnám v protonizaci karboxylové skupiny postranního řetězce DHCA spojené s hodnotou pK_a 4,74.

Pro rozsah pH 3,0 – 5,0 jsou patrné vyšší hodnoty proudové odezvy pro pík p_3 a také posun potenciálu tohoto píku do záporných potenciálů. Také co se týče úniku samotného základního elektrolytu, i zde platí skutečnosti uvedené pro metodu DCV.

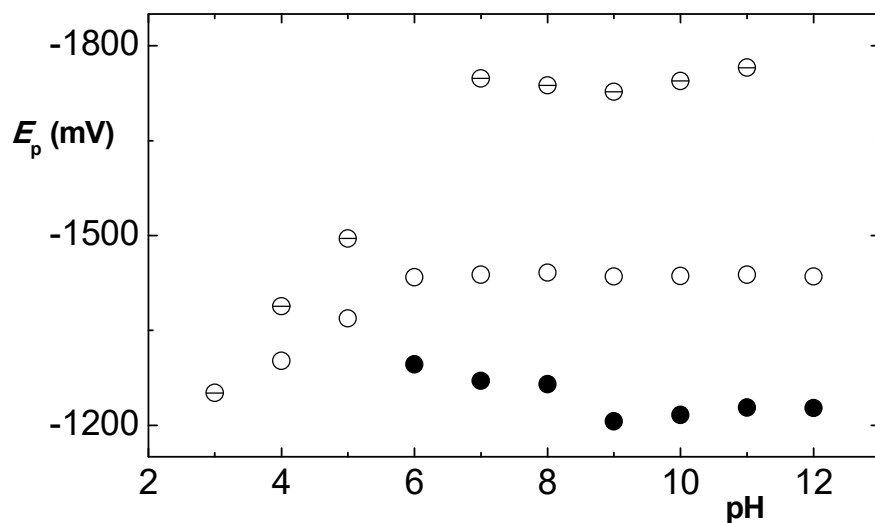
Tab. 4 Závislost potenciálu píku E_{p1} , E_{p2} a E_{p3} a proudu píku I_{p1} , I_{p2} a I_{p3} DHCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pH BR pufru měřené metodou DPV na HMDE. Měřeno v prostředí BR pufr – methanol (9:1). Potenciál úniku samotného základního elektrolytu $E_{\text{únik,ZE}}$ a roztoku s DHCA $E_{\text{únik,DHCA}}$ byl odečítán při ca $-12 \text{ } \mu\text{A}$.

pH	E_{p1} (mV)	E_{p2} (mV)	E_{p3} (mV)	I_{p1} (nA)	I_{p2} (nA)	I_{p3} (nA)	$E_{\text{únik,ZE}}$ (mV)	$E_{\text{únik,DHCA}}$ (mV)
3,0	–	–	-1251	–	–	-6430	-1488	-1591
4,0	–	-1302	-1388	–	-5134	-6946	-1550	-1645
5,0	–	-1369	-1495	–	-3601	-6387	-1703	-1828
6,0	-1296	-1434	–	-161,5	-1441	–	-1866	-1846
7,0	-1270	-1438	-1748	-89,7	-419,5	-5467		
8,0	-1265	-1441	-1737	-106,8	-270,6	-2759		
9,0	-1206	-1435	-1727	-123,3	-179,7	-867,9	↓ ^a	↓ ^a
10,0	-1216	-1436	-1744	-115,8	-191,7	-829,6		
11,0	-1228	-1438	-1765	-178,7	-197,9	-859,9		
12,0	-1227	-1435	–	-91,3	-197,8	–		

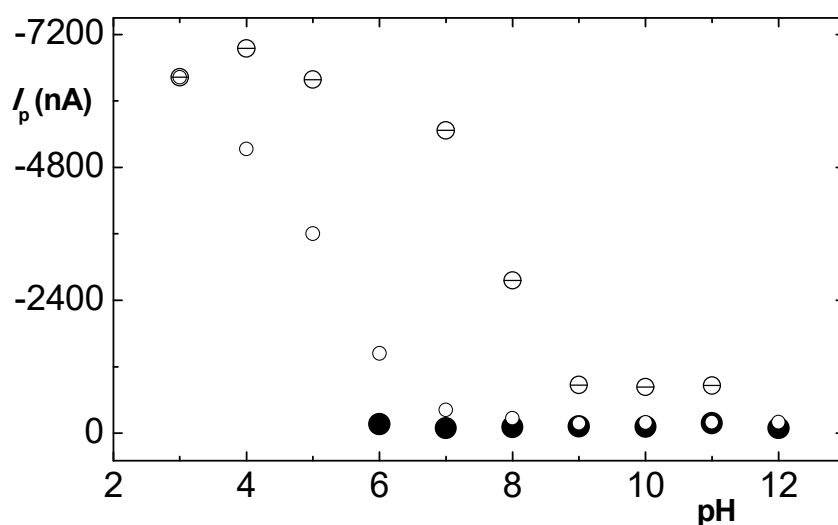
^ašipka označuje shodu potenciálu úniku čistého základního elektrolytu s roztokem DHCA.



Obr. 10 DP voltamogramy DHCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) měřené na HMDE při různé hodnotě pH v prostředí BR pufr – methanol (9:1). pH BR pufru: 3,0 (1), 4,0 (2), 5,0 (3), 6,0 (4), 7,0 (5), 8,0 (6), 9,0 (7), 10,0 (8), 11,0 (9), 12,0 (10). (A) je výřez z (B).



Obr. 11 Závislost potenciálu píku E_{p1} (●), E_{p2} (○) a E_{p3} (⊖) DHCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pH BR pufru. Měřeno metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufr – methanol (9:1).



Obr. 12 Závislost proudu píku I_{p1} (●), I_{p2} (○) a I_{p3} (⊖) DHCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pH BR pufru. Měřeno metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufr – methanol (9:1).

3.1.2.2. Koncentrační závislost

Koncentrační závislost DHCA byla změřena na HMDE metodou DPV v prostředí BR pufr (pH 7,0) – methanol (9:1) v rozsahu koncentrací $1 \cdot 10^{-5}$ – $5 \cdot 10^{-4}$ mol·l⁻¹. Voltamogramy koncentrační závislosti DHCA jsou na **obr. 13**, závislost potenciálu píku p₁, p₂, a p₃ DHCA na koncentraci je na **obr. 14** a závislost velikosti proudu píku p₁, p₂, a p₃ DHCA na koncentraci je na **obr. 15**. V **tab. 5** jsou uvedeny parametry lineární závislosti pro všechny tři píky.

První pík p₁ se u metody DPV (stejně jako u DCV) tvoří v celém rozsahu měřených koncentrací. Jeho potenciál se posouvá od -1100 mV v řádu koncentrací 10^{-5} mol·l⁻¹ o 10 mV do zápornějších oblastí, v řádu koncentrací 10^{-4} mol·l⁻¹ je tento posun o 20 mV. Proud tohoto píku roste do koncentrace $6 \cdot 10^{-5}$ mol·l⁻¹, při koncentraci $8 \cdot 10^{-5}$ mol·l⁻¹ poklesne a od koncentrace $1 \cdot 10^{-4}$ mol·l⁻¹ opět stoupá. Pokles proudu píku p₁ při koncentraci $8 \cdot 10^{-5}$ mol·l⁻¹ je spojený s tvorbou druhého píku p₂, jak bylo předesláno pro DC voltometrii. Pík p₂ se tvoří již při koncentraci $4 \cdot 10^{-5}$ mol·l⁻¹, ale je velmi plochý a špatně vyhodnotitelný. Výrazněji se tento pík začíná tvořit právě až při koncentraci $8 \cdot 10^{-5}$ mol·l⁻¹. Na **obr. 14** vidíme mírný posun potenciálu píku p₂ do záporných hodnot. Proud píku p₂ s rostoucí koncentrací roste.

Třetí pík p₃ se tvoří až při vyšších koncentracích od $1 \cdot 10^{-4}$ mol·l⁻¹. Potenciál se opět posouvá vždy o ca 10 mV do zápornějších oblastí. Proud píku s rostoucí koncentrací roste.

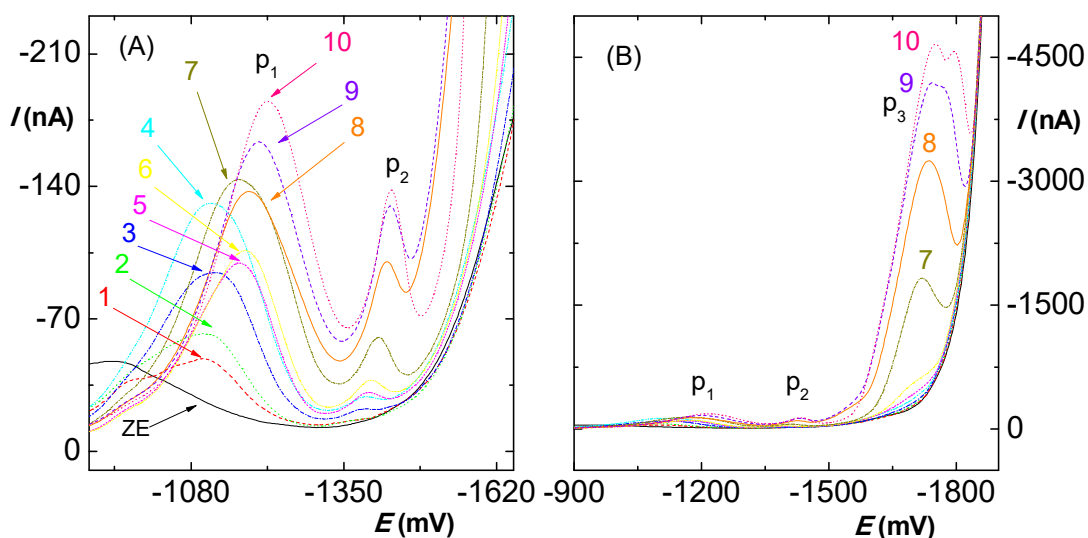
Pro deset po sobě jdoucích skenů pro nejnižší naměřené koncentrace lineárního dynamického rozsahu (viz tab.5) jednotlivých píků byla vypočítána relativní směrodatná odchylka pro pík p₁ ($1 \cdot 10^{-5}$ mol·l⁻¹) RSD = 2,4 %, pro pík p₂ ($4 \cdot 10^{-5}$ mol·l⁻¹) RSD = 1,1 % a pro pík p₃ ($1 \cdot 10^{-4}$ mol·l⁻¹) RSD = 13,9 %.

Na **obr. 16** jsou voltamogramy DHCA deseti po sobě jdoucích skenů. Z tohoto měření byla vypočítána relativní směrodatná odchylka pro nejvyšší naměřenou koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$ mol·l⁻¹: pro pík p₁ je RSD = 9,3 %, p₂ je RSD = 6,7 % a p₃ je RSD = 21,9 %. Nejvyšší opakovatelnosti bylo stejně jako u metody DCV dosaženo pro pík p₂.

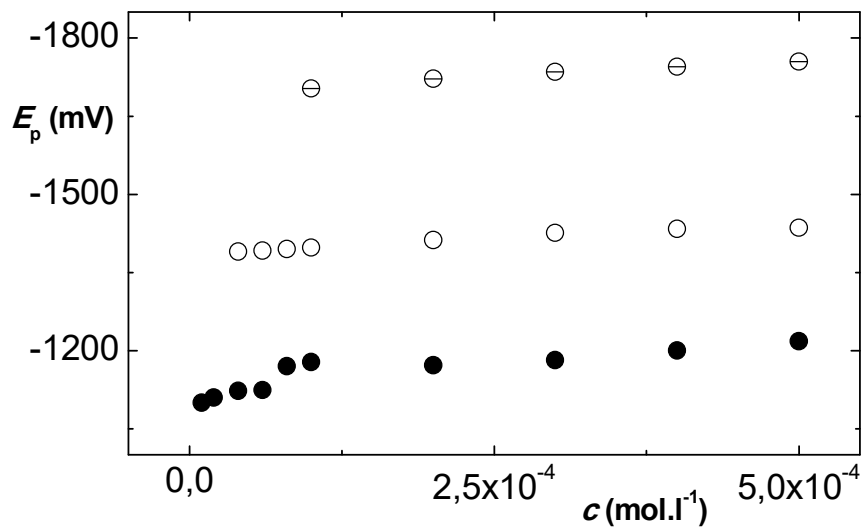
Ve srovnání s metodou DCV poskytuje metoda DPV v případě třetího píku, který pravděpodobně odpovídá redukci karboxylové skupiny, vyšší opakovatelnost pro nejnižší i nejvyšší naměřenou koncentraci, zároveň bylo metodou DPV dosaženo

nižších mezí detekce LOD a stanovitelnosti LOQ (tab. 5), a také lineární dynamické rozsahy jsou oproti metodě DCV širší. Z analytického hlediska je však i využití metody DPV diskutabilní.

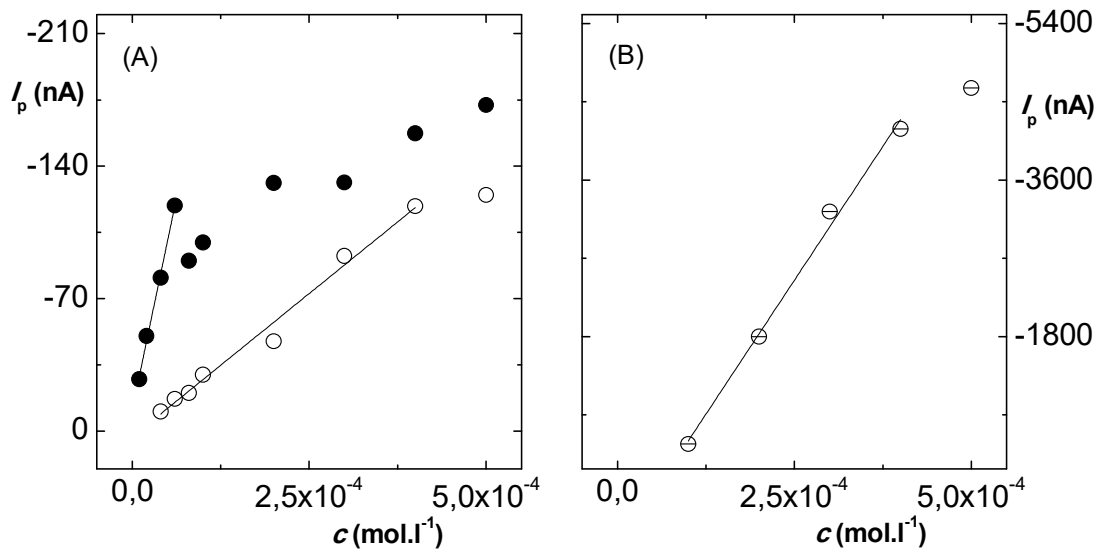
Na **obr. 17** jsou voltamogramy DHCA měřené v čase s dvouměsíčním odstupem. Z obrázku je vidět, že dochází k poklesu proudu všech tří píků, nejzřetelnější je tento pokles v případě píku p_3 , kdy dochází k jeho úplnému vymizení. Z důvodu názornosti jsou uvedeny pouze voltamogramy pro metodu DPV, protože metoda DCV není tolik citlivá a není u ní příliš viditelný pokles proudu druhého píku p_2 . Je tedy evidentní, že zásobní roztok DHCA v methanolu není stálý a při práci s DHCA je třeba důsledně dbát na rychlou časovou následnost jednotlivých měření. Zároveň lze DP voltmetrii doporučit jako metodu vhodnou k měření stability roztoků DHCA, neboť klasickou metodu UV spektrometrii vzhledem k nízké absorbanci roztoku DHCA v UV oblasti nelze použít.



Obr. 13 DP voltamogramy DHCA měřené na HMDE v prostředí BR pufr (pH 7,0) – methanol (9:1). Koncentrace DHCA ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$): základní elektrolyt (ZE), $1\cdot 10^{-5}$ (1), $2\cdot 10^{-5}$ (2), $4\cdot 10^{-5}$ (3), $6\cdot 10^{-5}$ (4), $8\cdot 10^{-5}$ (5), $1\cdot 10^{-4}$ (6), $2\cdot 10^{-4}$ (7), $3\cdot 10^{-4}$ (8), $4\cdot 10^{-4}$ (8) $5\cdot 10^{-4}$ (10). (A) je výřez z (B).



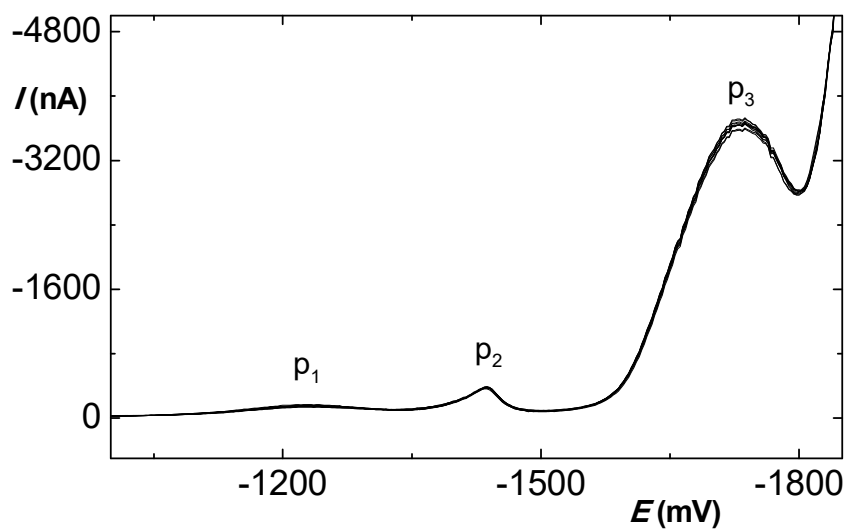
Obr. 14 Závislost potenciálu píku E_{p1} (●), E_{p2} (○) a E_{p3} (⊖) na koncentraci DHCA v rozmezí $c = 1 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ měřená metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 7,0) – methanol (9:1).



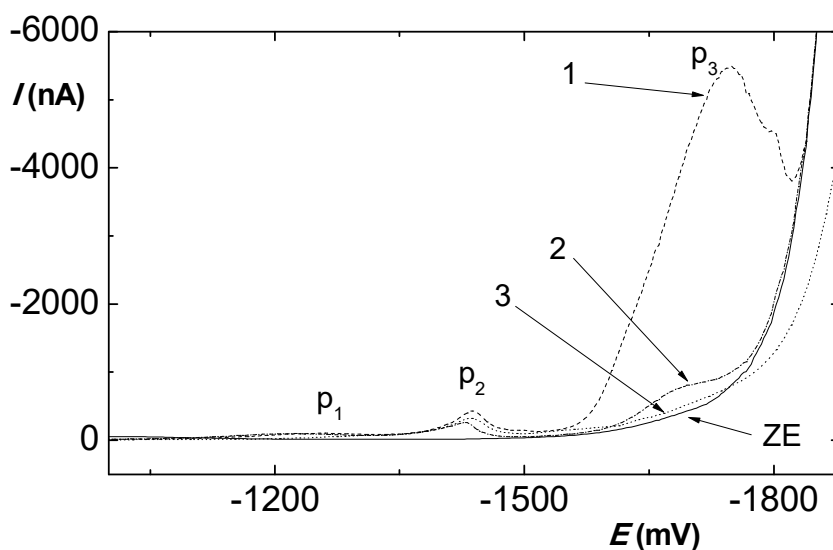
Obr. 15 Závislost proudu píku I_{p1} (●), I_{p2} (○) a I_{p3} (⊖) na koncentraci DHCA v rozmezí $c = 1 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ měřená metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 7,0) – methanol (9:1).

Tab. 5 Parametry lineární závislosti pro pík p₁, p₂ a p₃ DHCA. Měřeno metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 7,0) – methanol (9:1).

pík	lineární dynamický rozsah (μmol·l ⁻¹)	směrnice (nA·μmol ⁻¹ ·l)	úsek (nA)	korelační koeficient	LOD (μmol·l ⁻¹)	LOQ (μmol·l ⁻¹)
p ₁	10 – 60	1,80 ± 0,10	11,3 ± 2,9	0,9945	2,1	6,9
p ₂	40 – 400	0,30 ± 0,02	3,0 ± 3,3	0,9842	20,5	68,3
p ₃	100 – 400	12,3 ± 0,70	627 ± 180	0,9914		



Obr. 16 DP Voltamogramy DHCA (5·10⁻⁴ mol·l⁻¹) měřené na HMDE v prostředí BR pufr (pH 7,0) – methanol (9:1). Deset za sebou jdoucích skenů.



Obr. 17. DP voltamogramy DHCA ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na HMDE v prostředí BR pufr (pH 7,0) – methanol (9:1) zaznamenané první (1), šedesátý (2) a stodvacátý (3) den po přípravě zásobního roztoku.

3.1.3. Cyklická voltametrie dehydrocholové kyseliny

Cyklická voltametrie DHCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) byla měřena v prostředí BR pufr (pH 7,0) – methanol (9:1) na HMDE v rozsahu rychlostí polarizace 10 – 2560 $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Cyklické voltamogramy DHCA jsou zobrazeny na **obr. 18A** a **18B**. V souladu s metodami DCV a DPV se tvoří tři katodické píky a tři anodické protipíky. Jednotlivé katodické píky a anodické protipíky se však netvoří stejně v celém rozsahu měřených rychlostí polarizace. Tato skutečnost je pro názornost uvedena v **tab. 6**. Pro první a druhý katodický pík p_{k1} a p_{k2} se tvoří regulérní protipík obrácený na anodickou stranu. Pro třetí katodický pík p_{k3} se však při nízkých rychlostech polarizace v rozmezí 10 – 320 $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ (obr. 18B) tvoří protipík obrácený na katodickou stranu, při vyšších rychlostech polarizace pak již anodický protipík není zřejmý.

Tvorba zpětného protipíku otočeného do katodické oblasti není výjimečná jen pro dehydrocholovou kyselinu, ale byla pozorována také u dalších žlučových kyselin.

V případě chenodeoxycholové kyseliny se na HMDE i m-AgSAE tvoří protipík otočený do katodické oblasti ve smíšeném prostředí BR pufr (pH 4,0) – methanol (9:1) také při nižších rychlostech polarizace ($20 - 320 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$), pro vyšší rychlosti je pak protipík otočený klasicky do anodické oblasti². Dalšími žlučovými kyselinami, u kterých je toto neobvyklé chování pozorovatelné, jsou kyselina glykocholová (GA) a deoxycholová (DCA), jejichž cyklická voltametrie byla provedena na m-AgSAE také ve smíšeném prostředí BR pufr (pH 4,0) – methanol (9:1)³⁹. Kromě žlučových kyselin byl tento jev pozorován také např. u glukózy, jejíž cyklická voltametrie byla provedena na bórem dopovaném mikrokrytalickém diamantu a nanomikrokrytalickém diamantu, a je přiřítán elektrochemické reakci probíhající v adsorbovaném stavu⁴³.

V **tab. 7** jsou uvedeny rozdíly potenciálu katodických a anodických píků ΔE_{p1} , ΔE_{p2} a ΔE_{p3} a podíly jejich proudů I_{pk1}/I_{pa1} , I_{pk2}/I_{pa2} a I_{pk3}/I_{pa3} . Na **obr. 19A** je závislost potenciálu katodických píků p_{k1} , p_{k2} , p_{k3} a anodických píků p_{a1} , p_{a2} , p_{a3} DHCA na rychlosti polarizace v v lineárním měřítku, na **obr. 19B** je tato závislost v logaritmickém měřítku. Na **obr. 20** je zobrazena závislost proudu katodických píků p_{k1} , p_{k2} a anodických píků p_{a1} , p_{a2} DHCA na rychlosti polarizace v .

Potenciály všech tří katodických píků se s rostoucí rychlostí polarizace mírně posouvají do záporných hodnot potenciálů, potenciály všech anodických píků se mírně s rostoucí rychlostí polarizace posouvají do kladných oblastí potenciálů. Zároveň je evidentní, že rozdíl potenciálů anodických a katodických píků ΔE_p je nízký. To spolu s relativně ostrým a symetrickým tvarem píků napovídá, že elektrochemický děj je ovlivněn adsorpcí DHCA na povrch elektrody. To bylo potvrzeno lineární závislostí proudu katodických píků p_{k1} a p_{k2} a jejich anodických protipíků p_{a1} a p_{a2} na rychlosti polarizace, viz **obr. 20**. Parametry této závislosti jsou uvedeny v **tab. 8**. Jedná se tedy o děj řízený adsorpcí.

Závislost velikosti proudu dvojice třetího katodického p_{k3} a anodického protipíku p_{a3} na rychlosti polarizace není lineární, k linearizaci nedochází ani po vynesení závislosti velikosti proudu na odmocnině rychlosti polarizace \sqrt{v} . Z těchto výsledků vyplývá, že elektrochemické reakce DHCA jsou výrazně ovlivněny její adsorpcí na elektrodu a lze je charakterizovat jako quasireverzibilní.

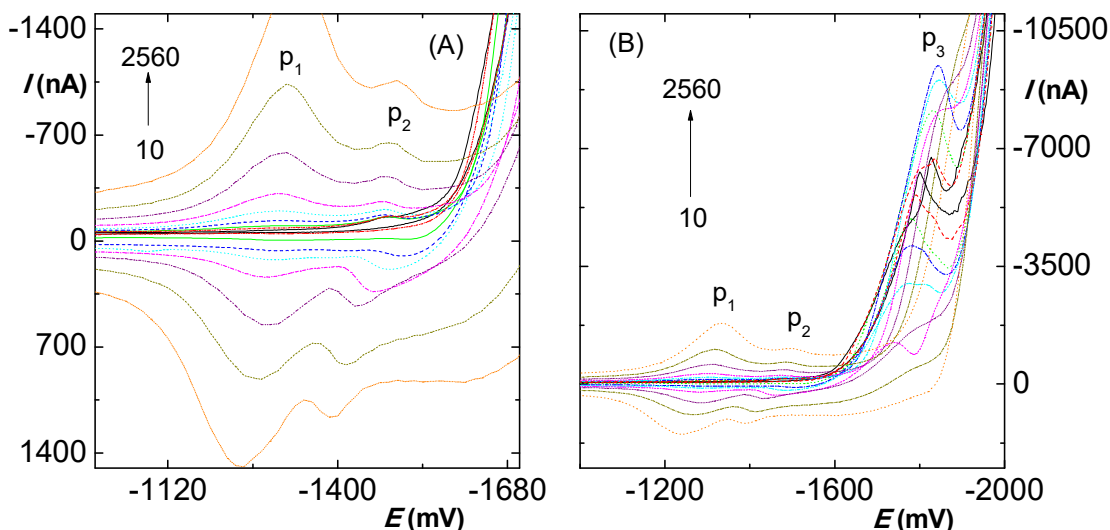
Tab. 6 Rozsah rychlostí polarizace elektrody, při které lze zaznamenat existenci jednotlivých katodických a anodických píků.

pík	p _{k1}	p _{k2}	p _{k3}	p _{a1}	p _{a2}	p _{a3}
v (mV·s ⁻¹)	40 – 2560	10 – 1280	10 – 640	80 – 2560	80 – 1280	10 ^a – 320 ^a

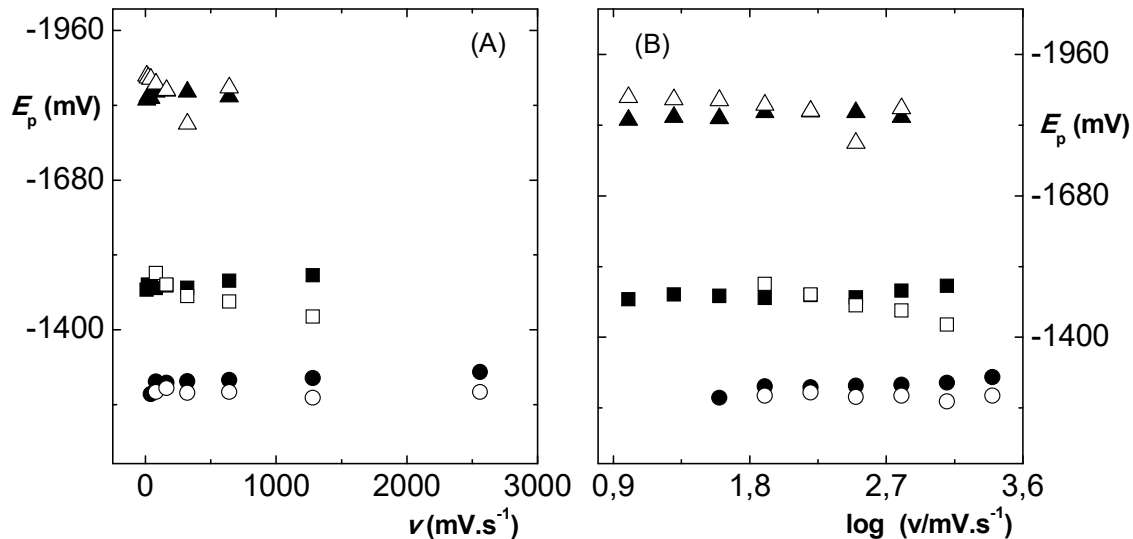
^azpětný anodický protipík otočený do katodické oblasti

Tab. 7 Rozdíl potenciálu katodických píku a anodických píků ΔE_{p1} , ΔE_{p2} a ΔE_{p3} a poměr proudu katodických píku a anodických píků I_{pk1}/I_{pa1} , I_{pk2}/I_{pa2} a I_{pk3}/I_{pa3} pro DHCA ($c = 5 \cdot 10^{-4}$ mol·l⁻¹). Měřeno na HMDE v prostředí BR pufr (pH 7,0) – methanol (9:1) metodou cyklické voltametrie.

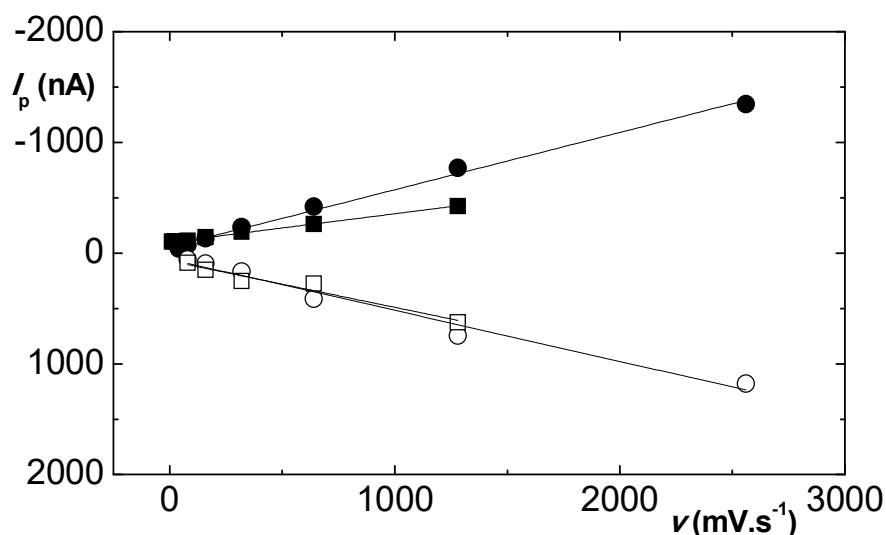
v (mV·s ⁻¹)	ΔE_{p1}	ΔE_{p2}	ΔE_{p3}	I_{pk1}/I_{pa1}	I_{pk2}/I_{pa2}	I_{pk3}/I_{pa3}
10	–	–	45	–	–	6,4
20	–	–	35	–	–	4,4
40	–	–	36	–	–	5,1
80	19	28	15	1,3	1,3	11,5
160	10	2	1	1,4	1,0	31,9
320	22	16	60	1,4	0,8	23,6
640	22	39	17	1,0	1,0	5,5
1280	37	77	–	1,0	0,7	–
2560	37	–	–	1,1	–	–



Obr. 18 Cyklické voltamogramy DHCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) měřené na HMDE v prostředí BR pufr (pH 7,0) – methanol (9:1). Rychlosti polarizace ($\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$): 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280, 2560. (A) je výřez z (B).



Obr. 19. Závislost potenciálu katodických pík p_{k1} (●), p_{k2} (■) a p_{k3} (▲) a anodických pík p_{a1} (○), p_{a2} (□) a p_{a3} (Δ) DHCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na rychlosti polarizace ν v rozmezí 10 – 2560 $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Měřeno na HMDE metodou cyklické voltametrie v prostředí BR pufr (pH 7,0) – methanol (9:1). (A) lineární měřítko (B) logaritmické měřítko.



Obr. 20. Závislost proudu katodických píků p_{k1} (●) a p_{k2} (■) a anodických píků p_{a1} (○) a p_{a2} (□) DHCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na rychlosti polarizace v v rozmezí 10 – 2560 $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Měřeno na HMDE metodou cyklické voltametrie v prostředí BR pufr (pH 7,0) – methanol (9:1).

Tab. 8 Parametry lineární závislosti proudu katodických píků p_{k1} a p_{k2} a anodických píků p_{a1} a p_{a2} DHCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Měřeno na HMDE metodou cyklické voltametrie v prostředí BR pufr (7,0) – methanol (9:1).

pík	rozsah rychlostí ($\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$)	směrnice ($\text{nA} \cdot \text{mV}^{-1} \cdot \text{s}$)	úsek (nA)	korelační koeficient
p_{k1}	10 – 2560	$0,52 \pm 0,02$	55,4	0,9934
p_{k2}	10 – 1280	$0,26 \pm 0,01$	98,6	0,9965
p_{a1}	10 – 2560	$0,46 \pm 0,03$	54,9	0,9733
p_{a2}	10 – 1280	$0,42 \pm 0,05$	70,9	0,9471

3.2. Studium elektrochemického chování dehydrocholové kyseliny na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné tuhé amalgámové elektrodě

3.2.1. Diferenční pulsní voltametrie dehydrocholové kyseliny

3.2.1.1. Studium pH závislosti

Elektrochemické chování DHCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) bylo studováno také na m-AgSAE v prostředí BR pufr – methanol (9:1) metodou DPV. Látka poskytuje signál v rozmezí pH 4,0 – 12,0. Při pH 2,0 a 3,0 nebyl signál zaznamenán a kvůli zúžení potenciálového okna v důsledku vývoje vodíku na elektrodě.

DHCA poskytuje na m-AgSAE při koncentraci $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ dva píky, které svými potenciály odpovídají druhému a třetímu píku viditelnému na HMDE. Píky jsou tedy označeny odpovídajícím způsobem jako p_2 a p_3 v pořadí výskytu na potenciálové ose od nuly k záporným potenciálům.

DP voltamogramy DHCA jsou na **obr. 21**, v **tab. 9** jsou uvedeny hodnoty potenciálu a proudu obou píků, na **obr. 22** je zobrazena závislost potenciálu píku na hodnotě pH a na **obr. 23** je závislost výšky píku na hodnotě pH.

Pík p_2 se tvoří v celém měřeném rozsahu hodnot pH s potenciálem kolem -1450 mV a odpovídá tak píku p_2 , který poskytuje HMDE metodou DPV s potenciálem ca -1435 mV , zároveň vykazuje podobné trendy s chováním píku p_2 na HMDE: Pro nižší hodnoty pH pozorujeme výrazný posun potenciálu píku p_2 do záporných oblastí, od pH 6,0 je pak jeho hodnota víceméně konstantní. Proud píku od pH 4,0 do pH 11,0 výrazně klesá.

Pík p_3 se netvoří při hodnotách pH 5,0, 11,0 a 12,0. Jeho potenciál kolísá mezi hodnotami -1699 mV až -1770 mV a odpovídá tak píku p_3 změřeném metodou DPV na HMDE. Při pH 11,0 a 12,0 se tento pík netvoří patrně kvůli kratšímu potenciálovému oknu m-AgSAE. Při hodnotě pH 5,0 jsou vzhledem k hodnotě pK_a 4,74 v roztoku zastoupeny protonizovaná i neprotonizovaná forma COOH skupiny postranního řetězce DHCA na C_{24} a pík p_3 není zřejmý, při vyšších pH pak jeho výška postupně klesá. Chování DHCA na m-AgSAE je tedy do značné míry obdobné jako na HMDE a je tedy

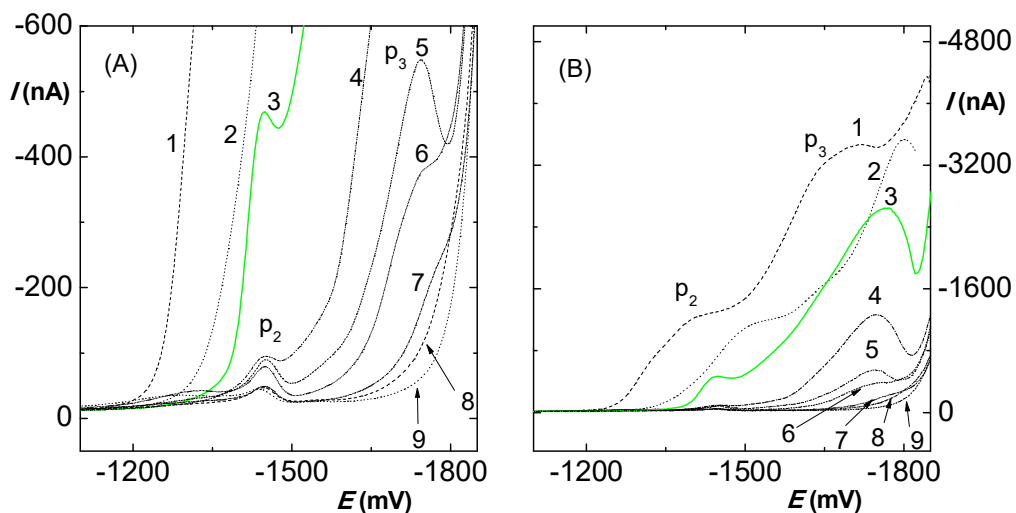
pravděpodobné, že dochází k redukci vodíku karboxylové skupiny COOH uhlíku C₂₄ (pík p₃) a pík p₂ odpovídá adsorpci látky na elektrodu.

Metodou DP voltametrie byla na m-AgSAE dále měřena koncentrační závislost DHCA ve smíšeném prostředí o pH 6,0. Rozsah měřitelných koncentrací je však poměrně krátký s rozsahem $4 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a metoda DPV na m-AgSAE proto není vhodná pro kvantifikaci DHCA v roztoku. Při nižších koncentracích v rozsahu $4 \cdot 10^{-5} - 3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pozorujeme tvorbu píku, který odpovídá prvnímu píku p₁ změřenému na HMDE metodou DPV. Pro tento koncentrační rozsah je tedy možné pozorovat tvorbu tří píků s přibližně stejnými hodnotami potenciálů, jako je tomu na HMDE.

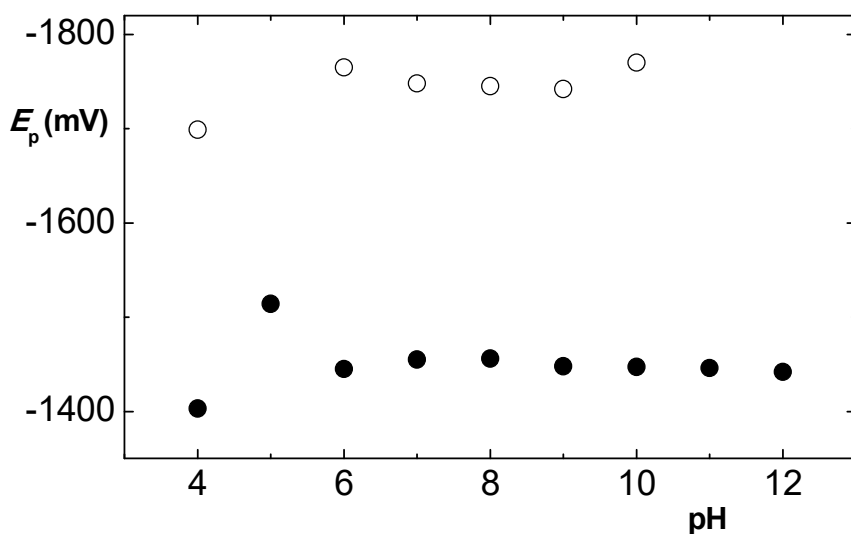
Koncentrační závislost byla na m-AgSAE dále měřena metodou „square-wave“ voltametrie v kapitole 3.2.2.2.

Tab. 9 Závislost potenciálu píku E_{p2} a E_{p3} a proudu píku I_{p2} a I_{p3} DHCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pH BR pufru měřené metodou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufr – methanol (9:1).

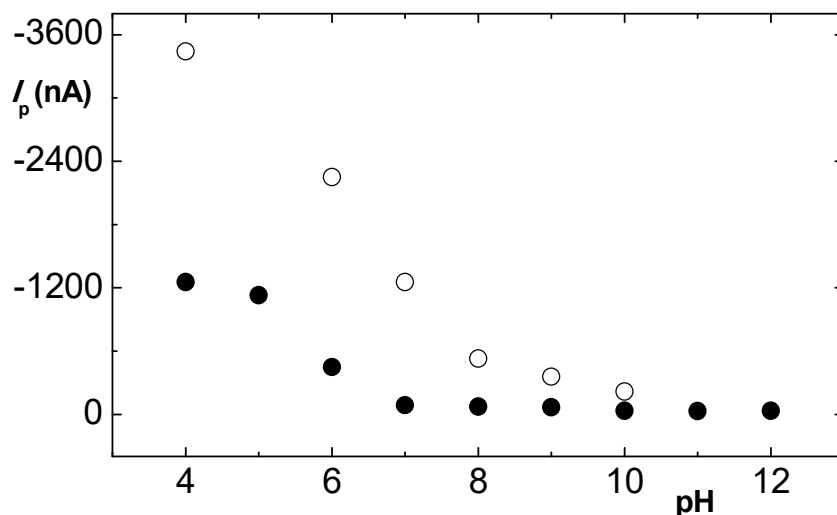
pH	E_{p2} (mV)	E_{p3} (mV)	I_{p2} (nA)	I_{p3} (nA)
4,0	-1403	-1699	-1254	-3442
5,0	-1514	-	-1130	-
6,0	-1445	-1765	-447	-2251
7,0	-1455	-1748	-87,4	-1254
8,0	-1456	-1745	-72,3	-528
9,0	-1448	-1742	-66,9	-358
10,0	-1447	-1770	-33,3	-217
11,0	-1446	-	-31,9	-
12,0	-1442	-	-34,6	-



Obr. 21 DP voltamogramy DHCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) měřené na m-AgSAE při různé hodnotě pH v prostředí pH BR pufr – methanol (9:1). pH BR pufru: 4,0 (1), 5,0 (2), 6,0 (3), 7,0 (4), 8,0 (5), 9,0 (6), 10,0 (7), 11,0 (8), 12,0 (9). (A) je výřez z (B).



Obr. 22 Závislost potenciálu píku E_{p2} (●) a E_{p3} (○) DHCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pH BR pufru. Měřeno metodou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufr – methanol (9:1).



Obr. 23 Závislost proudu píku I_{p2} (●) a I_{p3} (○) DHCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pH BR pufru. Měřeno metodou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufr – methanol (9:1).

3.2.2. „Squar-wave“ voltametrie dehydrocholové kyseliny

Studium elektrochemického chování dehydrocholové kyseliny bylo provedeno také metodou „square-wave“ voltametrie. Přednostmi této metody, která je vhodná obzvláště pro stanovení na základě reverzibilních elektrochemických reakcí, jsou především její velká citlivost, schopnost potlačovat šum pozadí a také značná rychlost oproti metodám DC a DP voltametrie, analýza tak trvá mnohem kratší dobu. „Square-wave“ voltametrie je jedinou metodou, která byla teprve nedávno použita ke kvantifikaci kyseliny cholové na stacionární elektrodě (HMDE) na základě její redukce³⁰.

Na základě pH závislosti z předchozí kapitoly bylo pro m-AgSAE zvoleno prostředí BR pufr (pH 6,0) – methanol (9:1) a koncentrace základního analyzovaného roztoku DHCA $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

3.2.2.1. Optimalizace parametrů měření

Pro metodu „square-wave“ voltametrie je nejprve potřeba zvolit vhodné parametry měření, kterými jsou potenciálový krok E_{step} , amplituda potenciálového pulsu A a frekvence f . V závislosti na hodnotě parametru a koncentraci (blíže popsáno v následující kapitole 3.2.2.2.) poskytuje DHCA opět maximálně tři píky. Potenciál prvního píku p_1 je kolem -1400 mV, potenciál druhého píku p_2 se pohybuje v rozmezí -1480 až -1530 mV a třetí pík p_3 má potenciál kolem -1820 mV. Potenciály těchto jednotlivých píků tedy svými hodnotami pro zvolené pH přibližně odpovídají jednotlivým potenciálům píků popsaným pro metody DCV a DPV jak na HMDE, tak na m-AgSAE. Pouze potenciál prvního píku je posunutý ca o 100 mV do zápornější oblasti.

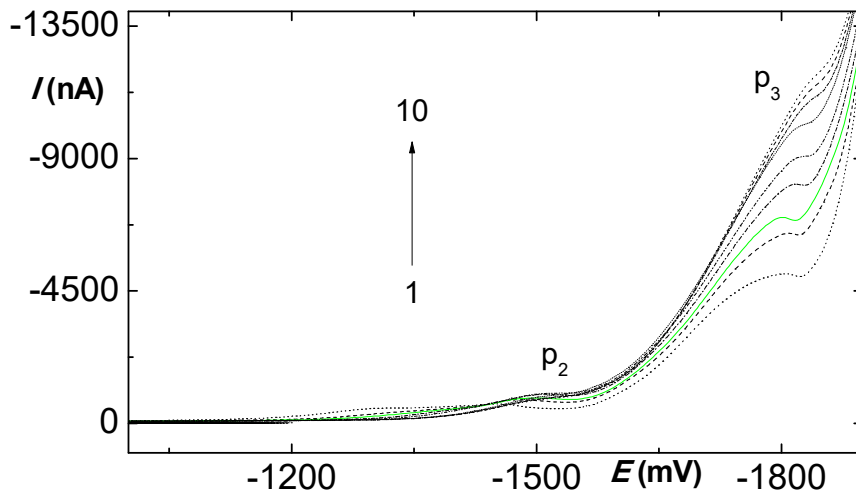
Jako první parametr byl zvolený potenciálový krok E_{step} , který se měnil v rozsahu 1-10 mV. Amplituda A byla nastavena zhruba ve středu rozsahu 10-150 mV, tedy na hodnotu 70 mV a frekvence f byla obdobně volena ve středu měřeného rozsahu 10-100 Hz na 50 Hz. Voltamogramy získané změnou potenciálového kroku jsou uvedeny na **obr. 24**, závislost potenciálu píku na potenciálovém kroku je na **obr. 25A** a závislost výšky píku na potenciálovém kroku je na **obr. 25B**. Na voltamogramech zobrazených na **obr. 24** pozorujeme tvorbu druhého a třetího píku. S rostoucí hodnotou potenciálového kroku nedochází k výrazné změně potenciálu obou píků p_2 a p_3 . Ze závislosti výšky píku p_2 na potenciálovém kroku vidíme na **obr. 25B**, že se výrazně nemění, naopak výška píku p_3 s rostoucí hodnotou potenciálového kroku výrazně stoupá, při 9 mV dosahuje maxima a poté mírně klesá. Z naměřených voltamogramů pak byla vybrána hodnota potenciálového kroku pro další měření 3 mV. Ačkoliv při této hodnotě nebylo dosaženo nejvyšší proudové odezvy, tak byly oba píky nejlépe vykreslené a nejlépe se vyhodnocovaly. Píky DHCA poskytnuté metodou „square-wave“ voltametrie na m-AgSAE jsou dost ploché a je tak obtížné je vyhodnotit.

Druhým optimalizovaným parametrem byla amplituda A . Potenciálový krok byl nastavený na hodnotu 3 mV, frekvence opět ve středu měřeného rozsahu na 50 Hz a amplituda byla měřena v rozsahu 10 – 150 mV. Naměřené voltamogramy jsou na **obr. 26**, závislost potenciálu píku na amplitudě je na **obr. 27A** a výška píku je na **obr. 27B**. V závislosti na hodnotě amplitudy se tvoří jednotlivé píky. První pík p_1 je patrný až při

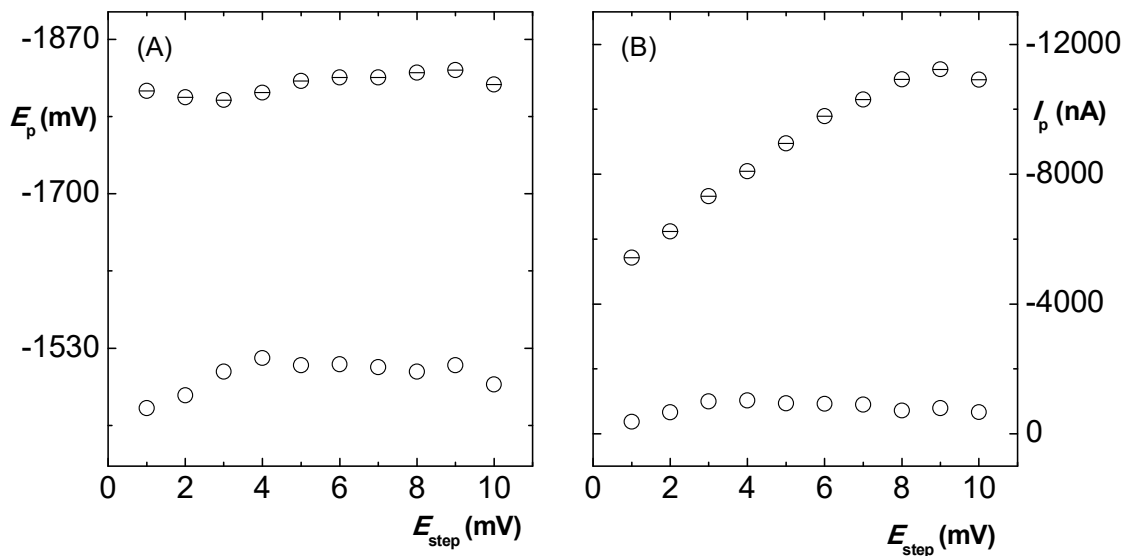
vyšších hodnotách pro rozmezí 110 – 150 mV, je velmi plochý a obtížně vyhodnotitelný. Potenciál tohoto píku se s rostoucí amplitudou posouvá do kladných potenciálů, výška píku roste. Druhý pík se tvoří v celém rozsahu, nejvýrazněji se pak tvoří v rozsahu 30 – 90 mV. Od hodnoty 100 mV se již začíná objevovat náznak píku p_1 , který patrně potlačuje další tvorbu a ostrost vykreslení píku p_2 . Se zvyšující se hodnotou amplitudy dochází k posunu potenciálu píku p_2 do záporných hodnot, výška píku roste. Třetí pík p_3 se opět tvoří pouze v omezeném rozsahu a to pro hodnoty v rozmezí 30 – 100 mV. Potenciál tohoto píku se s rostoucí amplitudou posouvá stejně jako pík p_1 do kladných hodnot, jeho proud výrazně roste v rozsahu 30 – 70 mV a pak se již výrazně nemění. Pro amplitudu pak byla zvolena hodnota 60 mV, opět vzhledem k tvaru píků.

Posledním hledaným parametrem byla hodnota frekvence. Ta byla hledaná v rozsahu 10 – 100 Hz, stejně jako u potenciálového kroku se tvoří pouze druhý a třetí pík. Třetí pík se netvoří pro hodnotu $f = 100$ Hz. Voltamogramy jsou zobrazeny na **obr. 28**, na **obr. 29A** je závislost potenciálu píků na frekvenci na **obr. 29B** je závislost výšky píků na frekvenci. Potenciál píku p_2 se pohybuje kolem hodnoty -1490 mV a výrazně se nemění, výška píku s rostoucí frekvencí mírně roste. Potenciál píku p_3 se také příliš nemění, pohybuje se kolem -1820 mV, jeho výška však s rostoucí frekvencí výrazně roste. Pro frekvenci byla zvolena hodnota 30 mV.

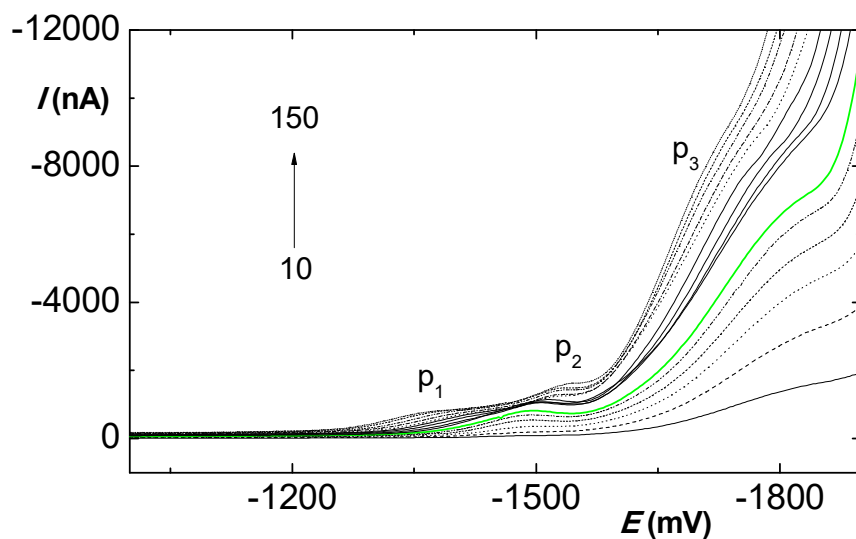
V následující kapitole 3.2.2.2. je se zvolenými parametry zobrazena a diskutována koncentrační závislost DHCA měřená metodou „square-wave“ voltametrie.



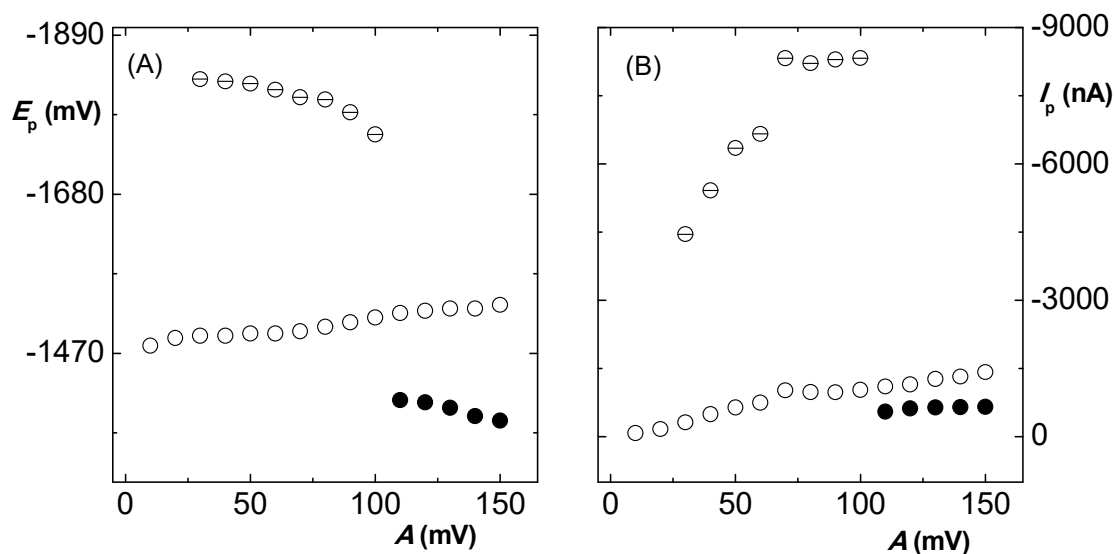
Obr. 24 Voltamogramy DHCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) měřené metodou „square-wave“ voltametrie na m-AgSAE v prostředí BR pufr (pH 6,0) – methanol (9:1). Parametry měření: $A = 70 \text{ mV}$, $f = 50 \text{ Hz}$, E_{step} v rozsahu 1 – 10 mV.



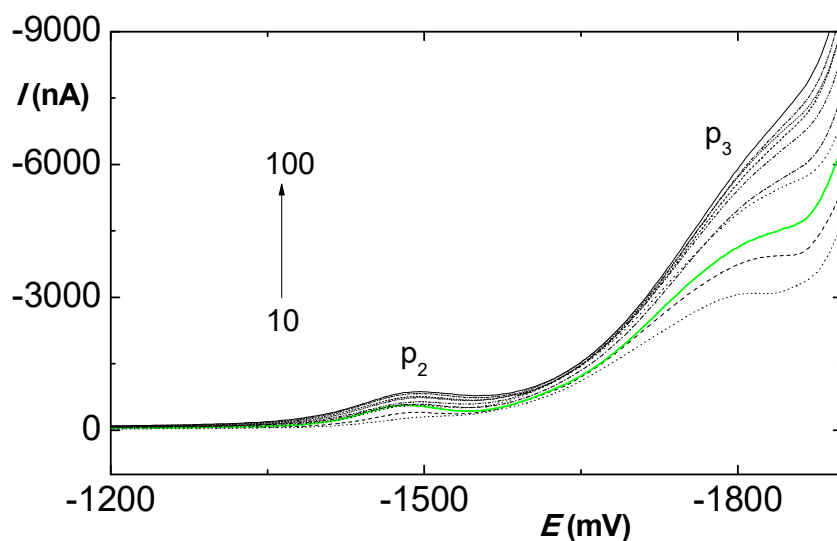
Obr. 25 Závislost potenciálu píku E_{p2} (○) a E_{p3} (⊖) a proudu píku I_{p2} (○) a I_{p3} (⊖) DHCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na potenciálovém kroku E_{step} v rozmezí 1 – 10 mV. Měřeno metodou „square-wave“ voltametrie na m-AgSAE v prostředí BR pufr (pH 6,0) – methanol (9:1). Další parametry měření: $A = 70 \text{ mV}$, $f = 50 \text{ Hz}$.



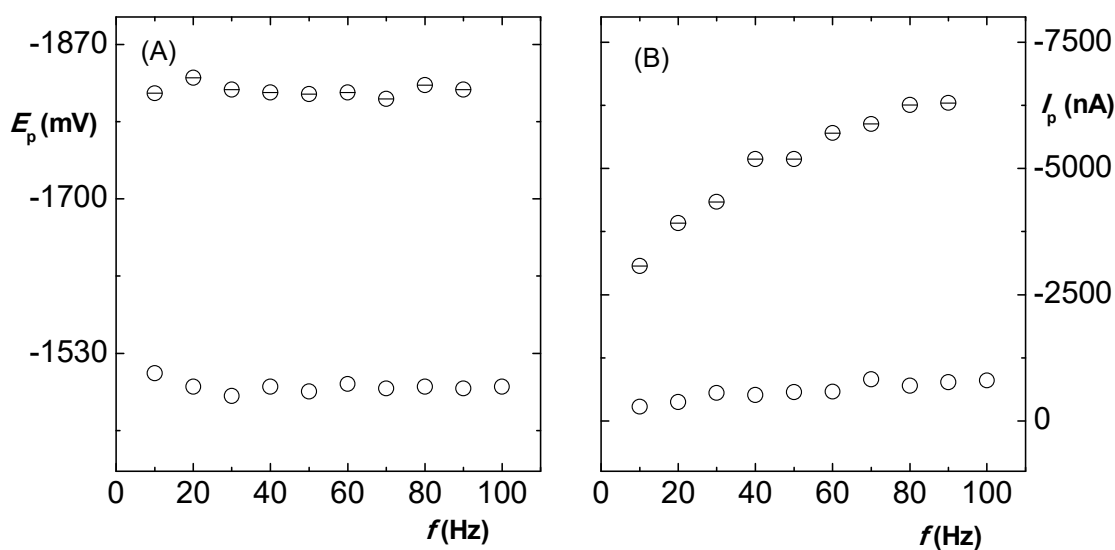
Obr. 26 Voltamogramy DHCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) měřené metodou „square-wave“ voltametrie na m-AgSAE v prostředí BR pufr (pH 6,0) – methanol (9:1). Parametry měření: $E_{\text{step}} = 3 \text{ mV}$, $f = 50 \text{ Hz}$, A v rozsahu 10 – 150 mV.



Obr. 27 Závislost potenciálu píku E_{p1} (●), E_{p2} (○) a E_{p3} (Θ) a proudu píku I_{p1} (●), I_{p2} (○) a I_{p3} (Θ) DHCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na potenciálu amplitudy A v rozmezí 10 – 150 mV. Měřeno metodou „square-wave“ voltametrie na m-AgSAE v prostředí BR pufr (pH 6,0) – methanol (9:1). Další parametry měření: $E_{\text{step}} = 3 \text{ mV}$, $f = 50 \text{ Hz}$.



Obr. 28 Voltamogramy DHCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) měřené metodou „square-wave“ voltametrie na m-AgSAE v prostředí BR pufr (pH 6,0) – methanol (9:1). Parametry měření: $E_{\text{step}} = 3 \text{ mV}$, $A = 60 \text{ mV}$, f v rozsahu 10 – 100 Hz.



Obr. 29 Závislost potenciálu píku E_{p2} (○) a E_{p3} (⊖) a proudu píku I_{p2} (○) a I_{p3} (⊖) DHCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na frekvenci f v rozmezí 10 – 100 Hz. Měřeno metodou „square-wave“ voltametrie na m-AgSAE v prostředí BR pufr (pH 6,0) – methanol (9:1). Další parametry měření: $E_{\text{step}} = 3 \text{ mV}$, $A = 60 \text{ mV}$.

3.2.2.2. Koncentrační závislost dehydrocholové kyseliny

Metodou „square-wave“ voltametrie byla na závěr změřena koncentrační závislost DHCA v rozmezí $2 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Měření probíhalo na m-AgSAE ve směsném prostředí BR pufr (pH 6,0) – methanol (9:1). Roztoky o příslušných koncentracích byly připraveny vždy zvlášť se zachováním poměru pufr : methanol 9:1. Parametry měření pro „square-wave“ voltametrii byly zvoleny optimalizací na $E_{\text{step}} = 3 \text{ mV}$, $A = 60 \text{ mV}$ a $f = 30 \text{ Hz}$.

DHCA opět poskytuje tři píky, které se objevují dle hodnoty koncentrace látky v analyzovaném roztoku. Voltamogramy s označením jednotlivých píků jsou zobrazeny na **obr. 30**, na **obr. 31** je závislost potenciálů píků a na **obr. 32** výšky píků na koncentraci.

Pík p_1 se tvoří pouze při nižších koncentracích v rozsahu $2 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Jeho potenciál se s rostoucí koncentrací posouvá do zápornějších hodnot, výška píku roste do koncentrace $6 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, při hodnotě $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ klesne a dále se výrazně nemění. Stejně trendy v posunu potenciálu a výšce píků vykazuje i pík p_2 , který se tvoří v celém koncentračním rozsahu. Oproti píku p_1 však jeho výška od koncentrace $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ dále roste.

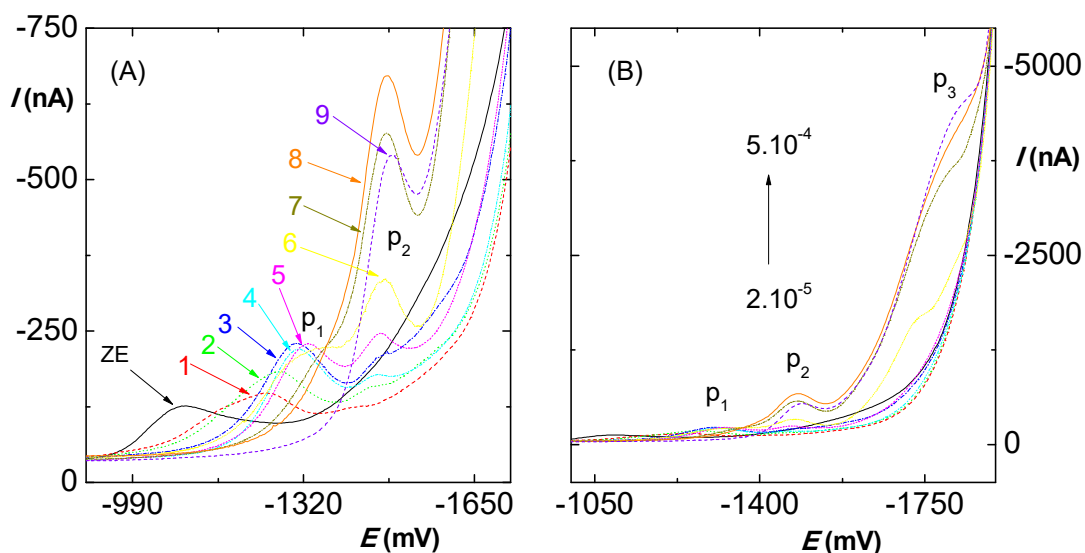
Pík p_3 se stejně jako pík p_1 tvoří pouze v omezeném koncentračním rozsahu – pozorujeme ho při vyšších hodnotách v rozsahu koncentrací $2 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Jeho potenciál je ve velmi záporných hodnotách. Proud píku s rostoucí koncentrací roste, ale vzhledem k umístění ke konci potenciálového okna je obtížně vyhodnotitelný.

Lineární dynamické rozsahy všech tří píků jsou dost krátké (jsou naznačeny na **obr. 32**), meze detekce a meze stanovitelnosti proto nebyly vyhodnocovány.

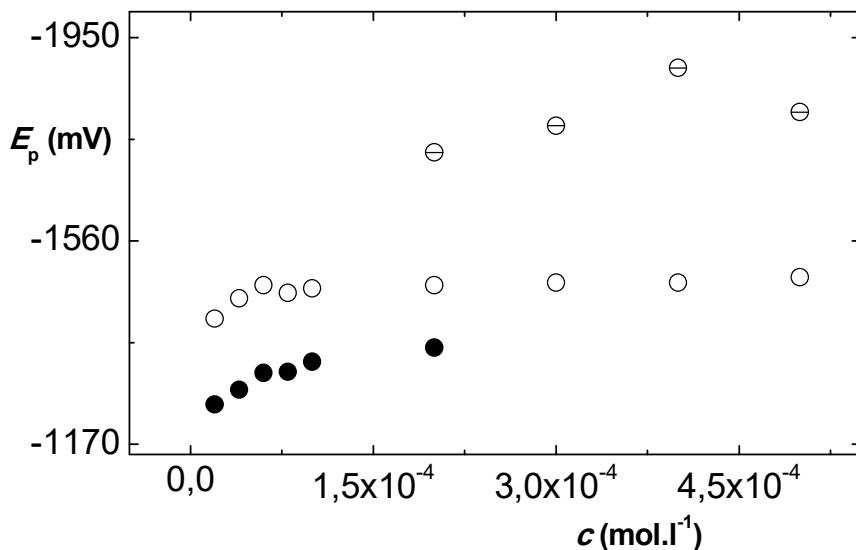
Ani metoda „square-wave“ voltametrie se neprokázala jako vhodná pro stanovení DHCA na m-AgSAE.

Závěrem lze konstatovat, že ani jedna z testovaných voltametrických metod pro HMDE a m-AgSAE není vhodná, i přestože jsou křivky dobře opakovatelné. Nárůst signálu DHCA s koncentrací je obtížně predikovatelný a pro různé hodnoty koncentrace DHCA se tvoří různý počet píků. Lineární dynamické rozsahy jsou krátké a studované metody tak nejsou vhodné ke kvantifikaci.

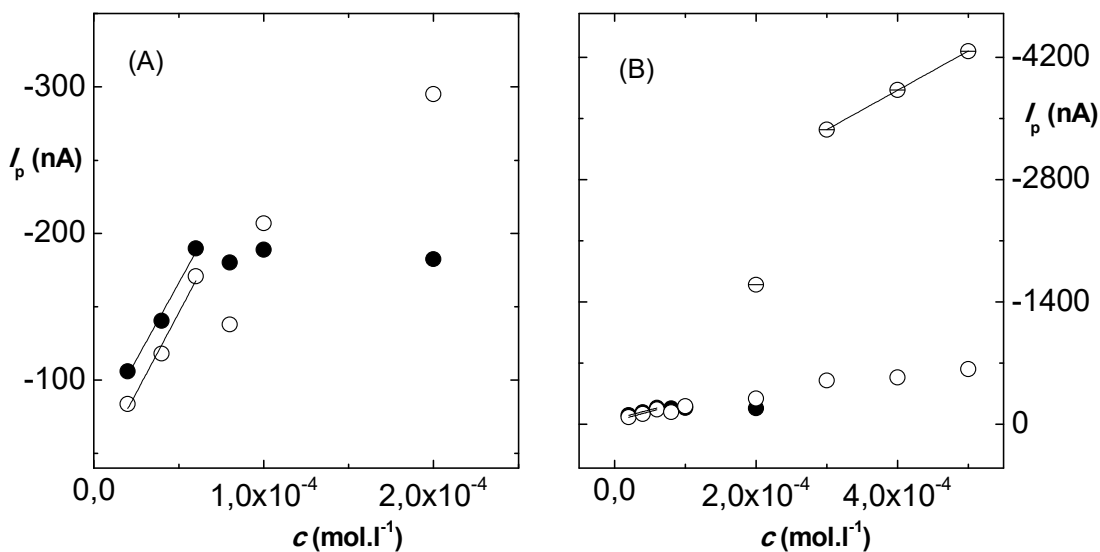
Ačkoliv se ke kvantifikaci ani jedna z použitých metod nehodí, lze předpokládat, že při tvorbě konjugátů s využitím COOH skupiny dojde k výrazné změně elektrochemického chování, tj. studované elektrochemické metody mají potenciál pro charakterizaci nově vzniklých konjugátů a supramolekulárních systémů.



Obr. 30 Voltamogramy DHCA měřené metodou „square-wave“ voltmetrie na m-AgSAE v prostředí BR pufr (pH 6,0) – methanol (9:1). Koncentrace DHCA ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$): základní elektrolyt (ZE), $2\cdot 10^{-5}$, $4\cdot 10^{-5}$, $6\cdot 10^{-5}$, $8\cdot 10^{-5}$, $1\cdot 10^{-4}$, $2\cdot 10^{-4}$, $3\cdot 10^{-4}$, $4\cdot 10^{-4}$, $5\cdot 10^{-4}$. Parametry měření: $E_{\text{step}} = 3 \text{ mV}$, $A = 60 \text{ mV}$, $f = 30 \text{ Hz}$. (A) výřez z (B)



Obr. 31 Závislost potenciálu píku E_{p1} (●), E_{p2} (○) a E_{p3} (⊖) na koncentraci DHCA v rozmezí $2 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Měřeno metodou “square-wave” voltametrie na m-AgSAE v prostředí BR pufr (pH 6,0) – methanol (9:1). Parametry měření: $E_{\text{step}} = 3 \text{ mV}$, $A = 60 \text{ mV}$, $f = 30 \text{ Hz}$.



Obr. 32 Závislost proudu píku I_{p1} (●), I_{p2} (○) a I_{p3} (⊖) na koncentraci DHCA v rozmezí $2 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Měřeno metodou “square-wave” voltametrie na m-AgSAE v prostředí BR pufr (pH 6,0) – methanol (9:1). Parametry měření: $E_{\text{step}} = 3 \text{ mV}$, $A = 60 \text{ mV}$, $f = 30 \text{ Hz}$. (A) je výřez z (B).

3.3. Studium elektrochemického chování chenodeoxycholové kyseliny na visící rtuťové kapkové elektrodě

3.3.1. Studium vlivu vybraných rozpouštědel

Chenodeoxycholová kyselina je látka, která je velmi málo rozpustná ve vodě, dobře se rozpouští v řadě organických rozpouštědel jako je ethanol, methanol nebo acetonitril. Volba rozpouštědla je také důležitá při syntéze konjugátů žlučových kyselin. Využití organických rozpouštědel má však řadu nevýhod – jsou nebezpečná pro člověka a životní prostředí a také zvyšují ekonomickou náročnost analýzy. Je proto dobré volit množství použitého rozpouštědla i s přihlédnutím na tyto faktory.

Elektrochemické chování CDCA bylo studováno nejprve v methanolu, jako druhé organické rozpouštědlo byl pro porovnání zvolený acetonitril. Fyzikálně-chemické vlastnosti obou rozpouštědel jsou uvedeny v **tab. 10**.

Tab. 10 Fyzikálně-chemické vlastnosti methanolu a acetonitrilu^{44,45}.

látka	methanol	acetonitril
funkční vzorec	CH ₃ OH	CH ₃ CN
relativní molekulová hmotnost	32,04	41,05
bod varu	64,5 °C	81,6 °C
bod tuhnutí	-97,7 °C	-43,8 °C
hustota	0,796 g·cm ⁻³	0,777 g·cm ⁻³
viskozita	0,551 cP	0,341 cP
vodivost	1,5·10 ⁻⁹ S·cm ⁻¹	6·10 ⁻¹⁰ S·cm ⁻¹
relativní permitivita	32,7	35,9
rozpustnost ve vodě	neomezeně mísitelný	mísitelný
polarita	amfiprotní	aprotické

3.3.1.1. Vliv methanolu na voltametrickou odezvu chenodeoxycholové kyseliny

Studium vlivu obsahu methanolu v roztoku CDCA a základního elektrolytu bylo provedeno na HMDE v prostředí $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) metodami DC a DP voltametrie. Toto prostředí bylo zvoleno s ohledem na optimalizaci provedenou v bakalářské práci². Množství methanolu v roztoku se zvyšovalo v rozsahu 5 – 95 % se zachováním konstantní koncentrace CDCA $5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

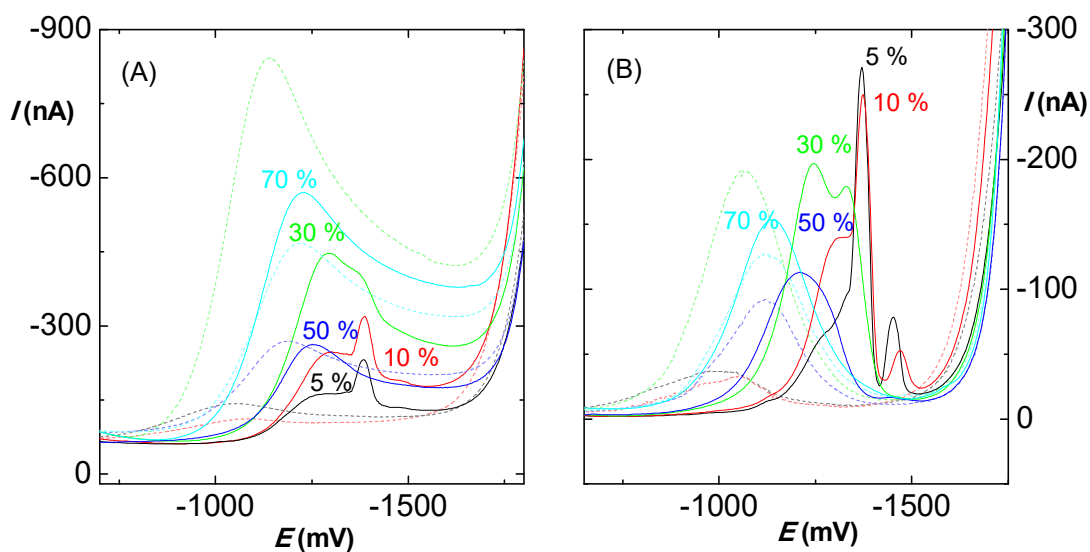
Voltamogramy základního elektrolytu a CDCA jsou zobrazeny pro metodu DCV na **obr. 33A**, pro metodu DPV na **obr. 33B**. Obě tyto metody poskytují analogické výsledky. Základní elektrolyt poskytuje díky přítomnosti methanolu poměrně výrazný signál v oblasti ca -1100 mV . Závislost potenciálu píku základního elektrolytu a CDCA na obsahu methanolu je pro metodu DCV zobrazena na **obr. 34A**, pro metodu DPV na **obr. 34B**. S rostoucím obsahem methanolu v roztoku dochází k posunu potenciálu píku základního elektrolytu do zápornějších oblastí. CDCA vykazuje pro obsah methanolu v rozmezí 5 – 30 % dva píky – první hlavní pík p_1 se pohybuje kolem potenciálu -1300 mV , druhý následný pík (postpík) p_2 má potenciál kolem -1380 mV . Tento postpík se tvoří v roztoku o obsahu methanolu 5 – 30 % u metody DCV i DPV. Přítomnost tohoto druhého píku ukazuje na silnou adsorpci látky na povrch elektrody, která je podporována v prostředí o nižším obsahu methanolu. Adsorpce látky na povrch elektrody může vést ke zlepšení signálu, v případě velmi silné adsorpce pak může dojít k deformaci píku, anebo k rozdělení píku s tvorbou postpíku⁴⁶, k čemuž došlo právě v případě CDCA. Kompetitivní adsorpce CDCA na elektrodu v roztocích o nízkém obsahu methanolu vede ke snížení jeho odezvy.

Rozdíl v potenciálech píku základního elektrolytu a CDCA (viz obr. 34) je patrný pro obsah methanolu 5 – 60 %, maximum v rozdílu ca 224 mV (DCV) a 324 mV (DPV) je pak v prostředí s desetiprocentním obsahem methanolu. S rostoucím obsahem methanolu se k sobě potenciály píků přibližují, při obsahu methanolu 60 % jsou potenciály shodné a dále se již zásadně neliší. Pro vyšší obsah methanolu v roztoku tedy nelze s jistotou říci, zda se jedná o pík CDCA nebo základního elektrolytu.

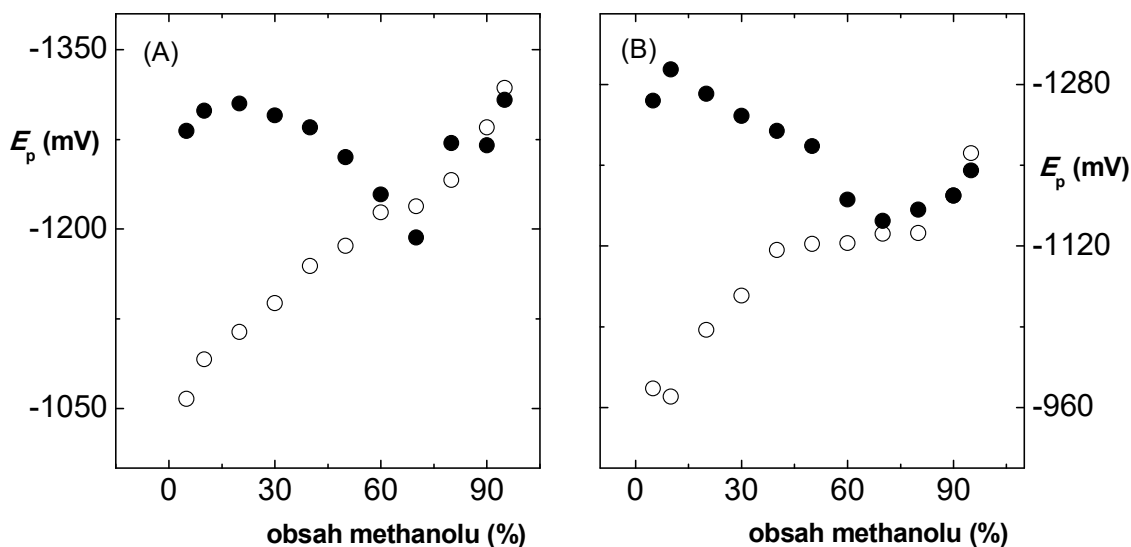
Závislosti proudu píku základního elektrolytu a CDCA na obsahu methanolu jsou pro metodu DCV zobrazeny na **obr. 35A**, pro metodu DPV na **obr. 35B**. Z této

závislosti je vidět, že pro obsah methanolu 30, 60, 80 a 95 % převyšuje proud píku základního elektrolytu pík CDCA.

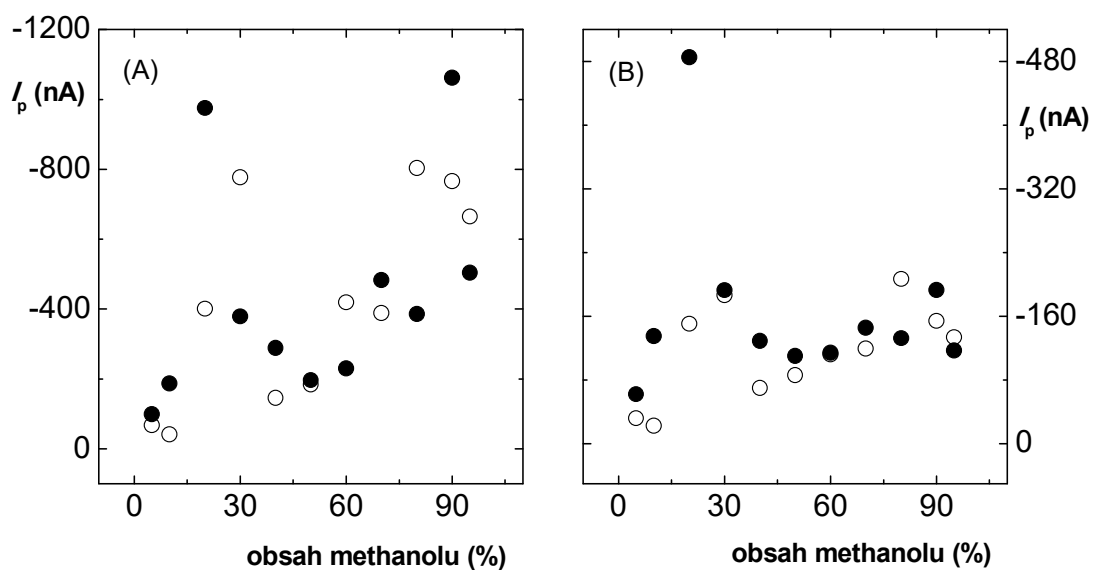
Z uvedených závislostí byl pro obě metody DCV i DPV vybrán jako nejvhodnější obsah methanolu 10 %. Potenciál i proud píku základního elektrolytu a CDCA jsou zde nejvíce rozlišeny. Se zvyšujícím se obsahem methanolu byly křivky základního elektrolytu i CDCA hůře opakovatelné.



Obr. 33 Voltamogramy základního elektrolytu (--) a CDCA (–) o koncentraci $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ měřené na HMDE v prostředí $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – methanol. Obsah methanolu v roztoku v procentech je uveden u jednotlivých křivek. (A) metoda DCV, (B) metoda DPV.



Obr. 34 Závislosti potenciálu píku E_p ZE (\circ) a E_p CDCA (\bullet) na obsahu methanolu v roztoku v rozsahu 5 – 95 %. Měřeno na HMDE v prostředí $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – methanol. (A) metoda DCV, (B) metoda DPV.



Obr. 35 Závislosti proudu píku I_p ZE (\circ) a I_p CDCA (\bullet) na obsahu methanolu v roztoku v rozsahu 5 – 95 %. Měřeno na HMDE v prostředí $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – methanol. (A) metoda DCV, (B) metoda DPV.

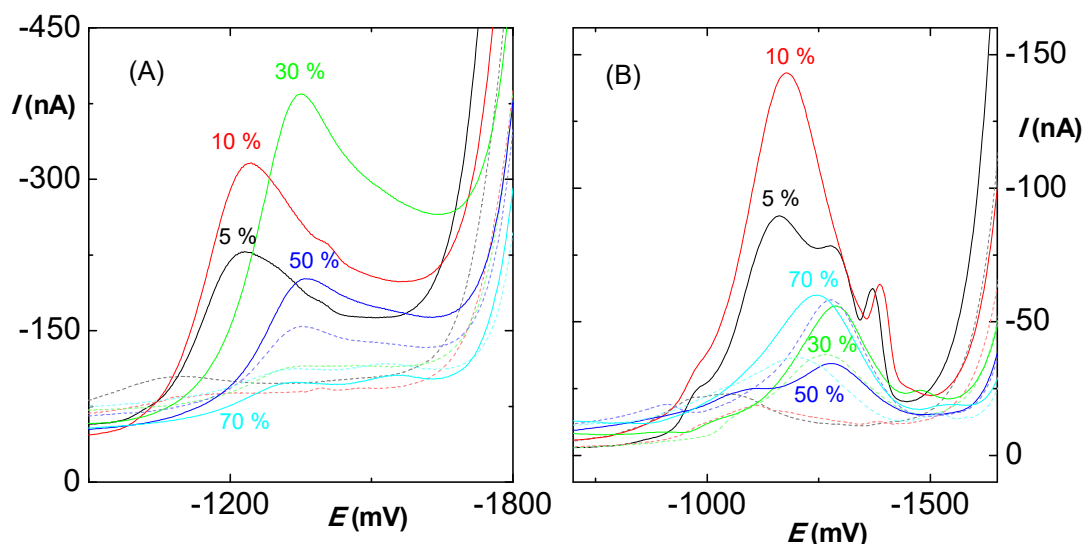
3.3.1.1. Vliv acetonitrilu na voltametrickou odezvu chenodeoxycholové kyseliny

Studium vlivu obsahu acetonitrilu v roztoku CDCA a základního elektrolytu bylo provedeno na HMDE v prostředí $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) metodami DC a DP voltametrie. Množství acetonitrilu v roztoku se zvyšovalo v rozsahu 5 – 95 % se zachováním konstantní koncentrace CDCA $5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

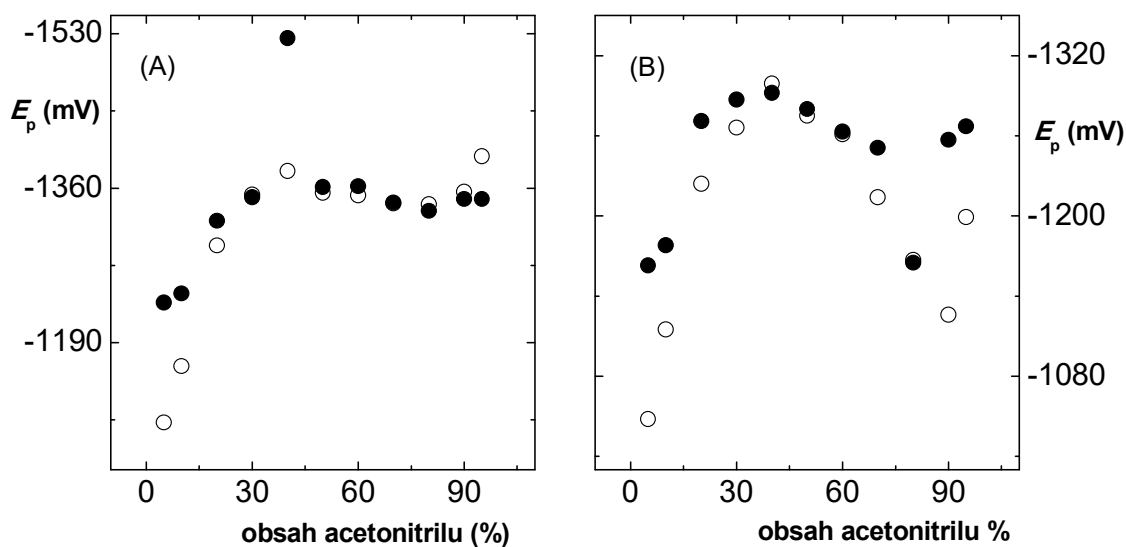
Voltamogramy CDCA a základního elektrolytu jsou pro metodu DCV na **obr. 36A**, pro metodu DPV na **obr. 36B**. V roztoku acetonitrilu poskytuje CDCA metodou DCV jeden pík v rozsahu potenciálů -1234 až -1362 mV s vychýlenou hodnotou -1525 mV pro 40% obsah acetonitrilu. I v prostředí s obsahem acetonitrilu 5 a 10 %, stejně jako u methanolu, dochází k tvorbě postpíku, i když v případě metody DCV jde spíše o náznak, viz mírně patrný oblouček na voltamogramech na **obr. 36A**. U metody DPV je pak tento postpík mnohem výraznější.

Na obrázku voltamogramů i ze závislosti potenciálu na obsahu acetonitrilu na **obr. 37A** a **obr. 37B** v roztoku je vidět, že je pouze minimální rozdíl mezi potenciály píku základního elektrolytu a CDCA, výrazně rozdílné jsou však hodnoty proudu, které se zásadně liší i pro použité voltametrické metody. Velké rozdíly v proudech základního elektrolytu a CDCA jsou zřejmé pro metodu DCV na **obr. 38A**, výška píku CDCA je téměř v každém poměru vyšší než výška píku základního elektrolytu, zároveň základní elektrolyt poskytuje méně výraznou odezvu než v případě methanolu. U metody DPV jsou výrazné rozdíly ve výšce píků pouze pro obsah acetonitrilu 5 a 10 %, viz **obr. 38B**. Bezpečně lze odlišit odezvu látky od základního elektrolytu do obsahu acetonitrilu 30 %, při vyšších poměrech již dochází k překrytí potenciálů píku CDCA s píkem základního elektrolytu, stejně tak se překrývají také výšky píků a v některých případech je u metody DPV výška píku základního elektrolytu vyšší než výška píku CDCA.

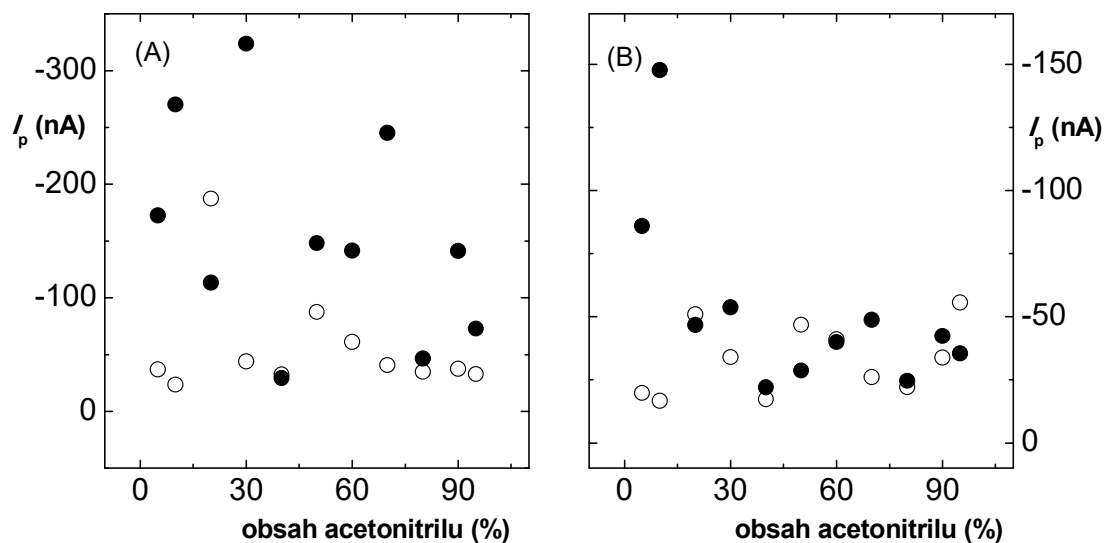
V acetonitrilu byla dále naměřena koncentrační závislost z důvodu možnosti porovnání výsledků s koncentrační závislostí měřenou v methanolu. Obě koncentrační závislosti jsou diskutovány v následující kapitole 3.3.2.1.



Obr. 36 Voltamogramy základního elektrolytu (--) a CDCA (–) o koncentraci $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ měřené na HMDE elektrodě v prostředí $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – acetonitril. Obsah acetonitrilu v roztoku v procentech je uveden u jednotlivých křivek. (A) metoda DCV, (B) metoda DPV.



Obr. 37 Závislosti potenciálu píku E_p ZE (○) a E_p CDCA (●) na obsahu acetonitrilu v roztoku v rozsahu 5 – 95 %. Měřeno na HMDE v prostředí $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – acetonitril. (A) metoda DCV, (B) metoda DPV.



Obr. 38 Závislosti proudu píku I_p ZE (○) a I_p CDCA (●) na obsahu acetonitrilu v roztoku v rozsahu 5 – 95 %. Měřeno na HMDE v prostředí $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – acetonitril. (A) metoda DCV, (B) metoda DPV.

3.3.2. Koncentrační závislost chenodeoxycholové kyseliny

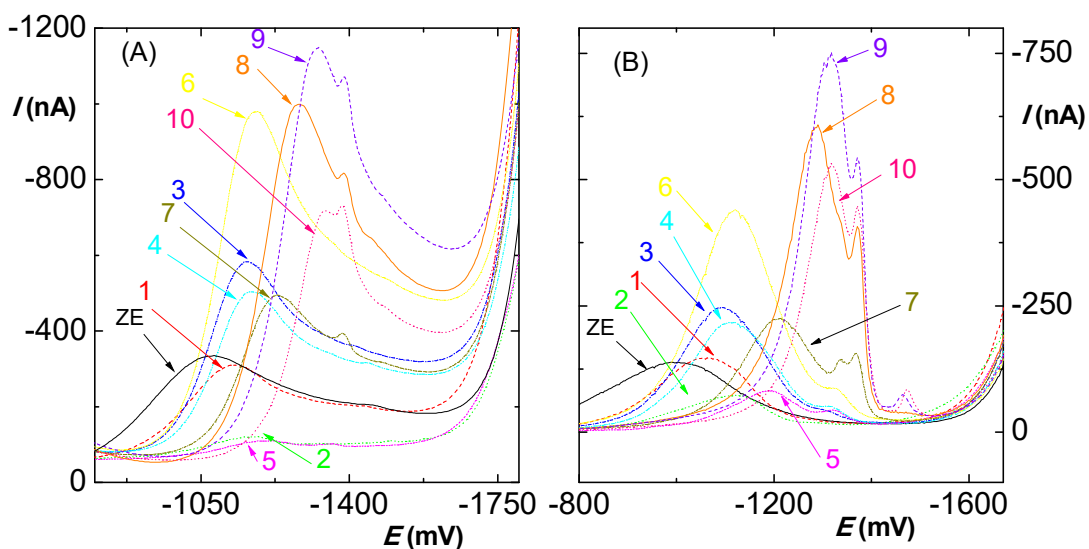
3.3.2.1. Koncentrační závislost měřená v prostředí o pH 9,1 metodami DC a DP voltametrie

Koncentrační závislost CDCA byla změřena metodami DC voltametrie a DP voltametrie v prostředí $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – methanol (9:1) a v prostředí $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – acetonitril (9:1) na HMDE v rozsahu koncentrací CDCA $1\cdot 10^{-5} - 5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

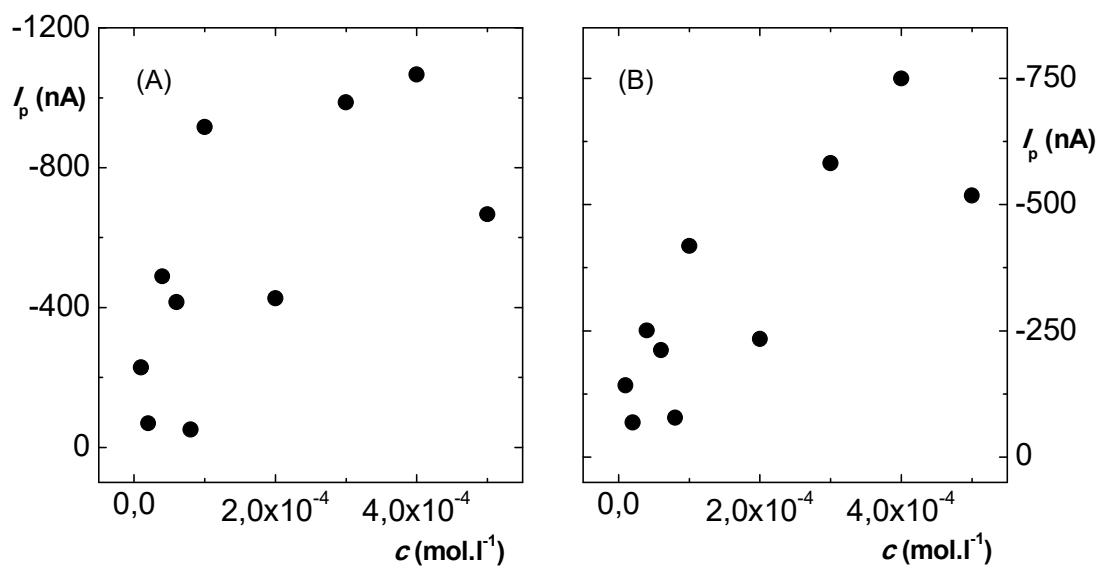
Voltamogramy CDCA měřené v prostředí s methanolem jsou zobrazeny na **obr. 39A** pro metodu DCV, na **obr. 39B** pro metodu DPV. Na těchto voltamogramech je vidět, že se v případě obou metod tvoří jeden hlavní pík CDCA s potenciálem v rozmezí -1100 mV až -1300 mV v celém rozsahu koncentrací. Při vyšších koncentracích cca od $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ se pak tvoří druhý následný pík (postpík) s potenciálem kolem -1400 mV . Závislost výšky píku I_p CDCA na koncentraci je zobrazena pro metodu DCV na **obr. 40A**, pro metodu DPV na **obr. 40B**. Z této závislosti je patrné, že s růstem koncentrace nedochází ani u DCV, ani u DPV k lineárnímu nárůstu proudu píku CDCA.

Koncentrační závislost CDCA byla dále změřena uvedenými metodami také v prostředí $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – acetonitril (9:1). Voltamogramy koncentrační závislosti CDCA měřené v prostředí s acetonitrilem jsou zobrazeny na **obr. 41A** pro metodu DCV a **obr. 41B** pro metodu DPV. Pro obě metody je na **obr. 42** zobrazena závislost výšky píku I_p CDCA na koncentraci měřená v prostředí acetonitrilu. Ani v prostředí acetonitrilu nedochází k postupnému nárůstu proudu píku se zvyšující se koncentrací. Obdobně jako u methanolu lze pro koncentrace vyšší než $3\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pozorovat tvorbu pospíku.

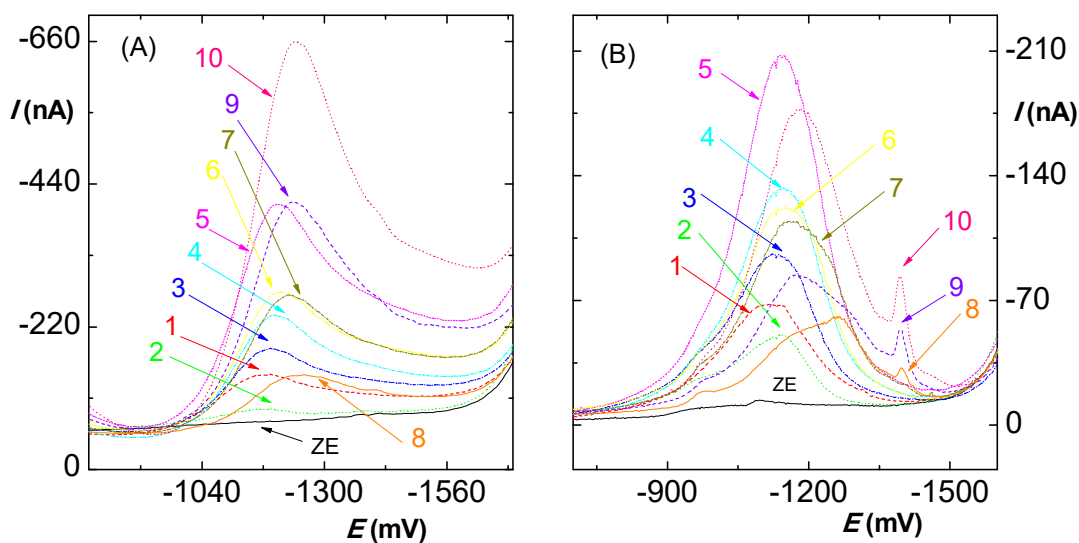
Koncentrační závislost byla dále měřena metodou cyklické voltametrie, o které pojednává následující kapitola 3.3.2.2.



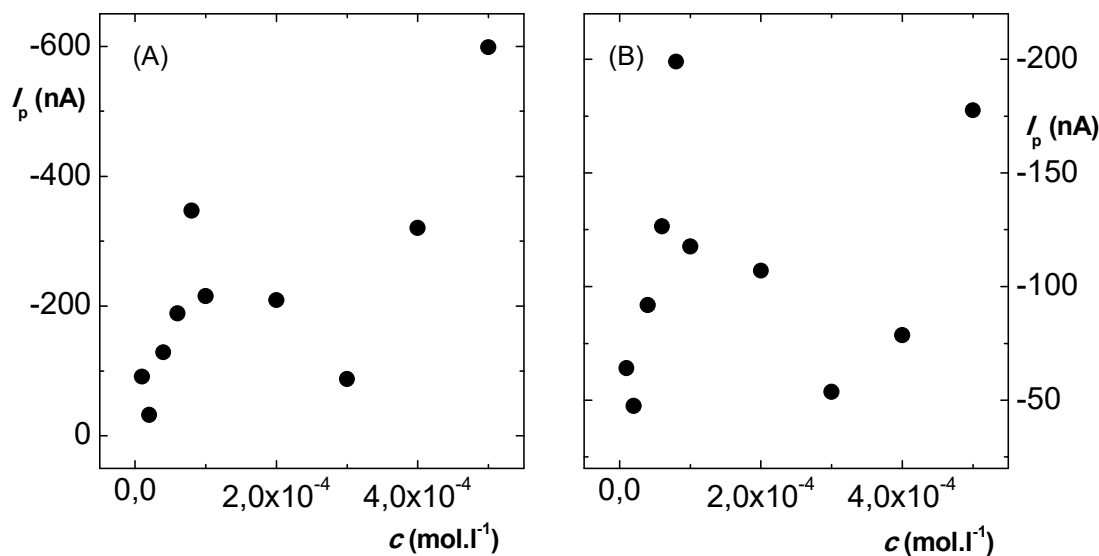
Obr. 39 Voltamogramy CDCA měřené na HMDE v prostředí $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – methanol (9:1). Koncentrace CDCA ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$): základní elektrolyt (ZE), $1\cdot 10^{-5}$ (1), $2\cdot 10^{-5}$ (2), $4\cdot 10^{-5}$ (3), $6\cdot 10^{-5}$ (4), $8\cdot 10^{-5}$ (5), $1\cdot 10^{-4}$ (6), $2\cdot 10^{-4}$ (7), $3\cdot 10^{-4}$ (8), $4\cdot 10^{-4}$ (9) $5\cdot 10^{-4}$ (10). (A) metoda DCV, (B) metoda DPV.



Obr. 40 Závislost proudu píku I_p na koncentraci CDCA v rozmezí $c = 1 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4}$ mol.l⁻¹ měřená HMDE v prostředí 0,04 mol.l⁻¹ borátový pufr (pH 9,1) – methanol (9:1). (A) metoda DCV, (B) metoda DPV.



Obr. 41 Voltamogramy CDCA měřené na HMDE v prostředí 0,04 mol.l⁻¹ borátový pufr (pH 9,1) – acetonitril (9:1). Koncentrace CDCA (mol.l⁻¹): základní elektrolyt (ZE), 1·10⁻⁵ (1), 2·10⁻⁵ (2), 4·10⁻⁵ (3), 6·10⁻⁵ (4), 8·10⁻⁵ (5), 1·10⁻⁴ (6), 2·10⁻⁴ (7), 3·10⁻⁴ (8), 4·10⁻⁴ (9) 5·10⁻⁴ (10). (A) metoda DCV, (B) metoda DPV.



Obr. 42 Závislost proudu píku I_p na koncentraci CDCA v rozmezí $c = 1 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ měřená HMDE v prostředí $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – acetonitril (9:1). (A) metoda DCV, (B) metoda DPV.

3.3.2.2. Koncentrační závislost měřená v prostředí o pH 9,1 metodou cyklické voltametrie

Koncentrační závislost CDCA byla změřena metodou cyklické voltametrie v prostředí $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – methanol (9:1) na HMDE v rozsahu koncentrací CDCA $1 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Rychlost polarizace $\nu = 1000 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ byla zvolena na základě předchozí studie² této látky, při které bylo zjištěno, že při koncentraci CDCA $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ látka poskytuje v prostředí $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – methanol (9:1) katodický pík a anodický protipík. Děj je v tomto případě řízený adsorpcí.

Cyklická voltametrie byla zvolena jako metoda, u které je možné nastavit vysokou rychlost skenu, při které látka poskytuje opakovatelnou odezvu. Díky vysoké rychlosti, tj. krátké době mezi vytvořením kapky a dosažení potenciálu redukce, se minimalizuje množství látky, která se adsorbuje na povrch elektrody. Díky silné adsorpci CDCA na povrch elektrody nebylo možné ve stejném prostředí při nízkých

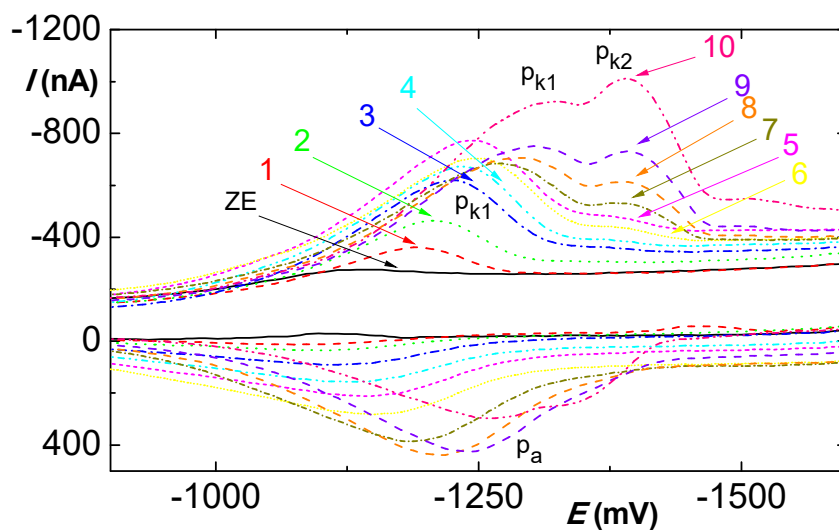
rychlostech skenu do $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ naměřit koncentrační závislost metodami DC a DP voltametrie.

Cyklické voltamogramy koncentrační závislosti CDCA jsou zobrazeny na **obr. 43**. CDCA poskytuje při nižších koncentracích jeden katodický pík p_{k1} a jeden anodický pík p_a . Od koncentrace $8\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ výše se pak tvoří druhý následný katodický pík p_{k2} , tzv. postpík. Přítomnost tohoto postpíku v případě cyklické voltametrie ukazuje na silnou adsorpci látky na povrch elektrody, kdy adsorpční postpík odpovídá redukci naadsorbované látky, která probíhá při negativnějších potenciálech než redukce volných molekul, protože pro jejich desorpci musí být dodána energie⁴⁷. Podobné postpíky byly pozorovány ve stejném prostředí pro další žlučové kyseliny – deoxycholovou kyselinu (DCA) a ursodeoxycholovou kyselinu (UDCA)⁴⁸.

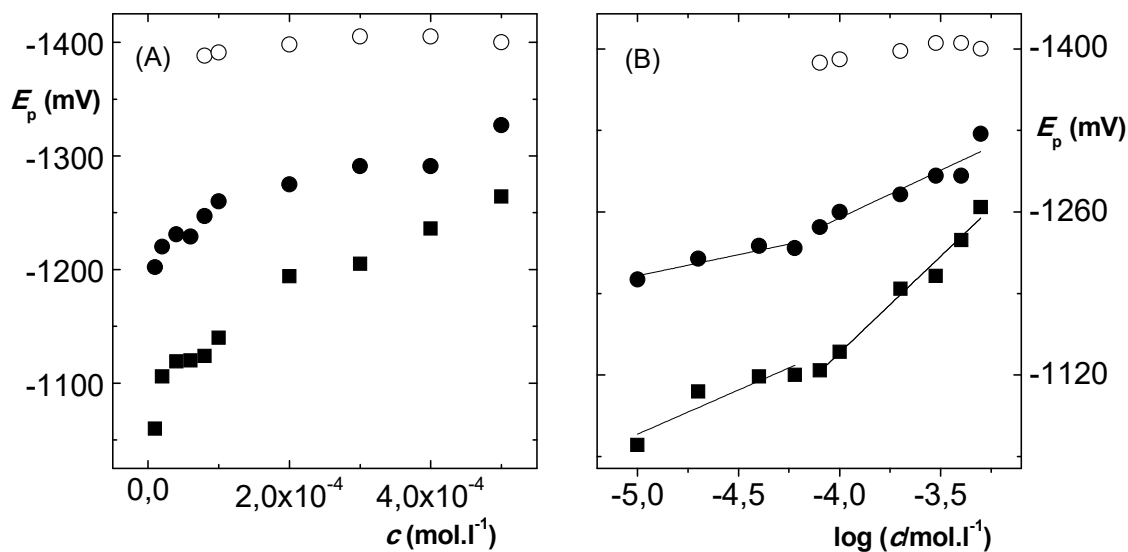
Závislosti potenciálů katodických píků p_{k1} , p_{k2} a anodického píku p_a na koncentraci CDCA jsou zobrazeny na **obr. 44A** v lineárním a **obr. 44B** v logaritmickém měřítku. Potenciál katodického píku p_{k1} se pohybuje s rostoucí koncentrací CDCA směrem k zápornějším hodnotám v rozmezí -1202 až -1327 mV , katodický pík p_{k2} má potenciál kolem -1400 mV a potenciál anodického píku p_a se pohybuje směrem k zápornějším potenciálům v rozmezí hodnot -1051 až -1264 mV . Směrnice posunu potenciálu dvojice píků p_{k1} a p_a se mění při koncentraci $8\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, od které se zároveň objevuje pík p_{k2} , což je patrné z grafu v logaritmickém měřítku na **obr. 44B**. Závislosti proudu katodických píků p_{k1} , p_{k2} a anodického píku p_a na koncentraci CDCA jsou zobrazeny na **obr. 45**. Proud katodického píku p_{k1} roste do koncentrace $8\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, při vyšší koncentraci se jeho výška už výrazně nemění. Od koncentrace $8\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ se začíná také objevovat druhý katodický pík p_{k2} , jehož výška s rostoucí koncentrací také roste. Proud anodického píku p_a s rostoucí koncentrací roste lineárně až do koncentrace $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (parametry viz tab. 11), další mírný nárůst lze sledovat až do koncentrace $3\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, kdy zřejmě dochází k postupnému pokrytí povrchu elektrody látkou.

Parametry lineární závislosti pro všechny tři píky p_{k1} , p_{k2} a p_a jsou uvedeny v **tab. 11**. Hodnoty meze detekce LOD a meze stanovitelnosti LOQ byly vypočítány z deseti po sobě jdoucích měření pro nejnižší koncentraci příslušného píku. Hodnota relativní směrodatné odchylky pro pík p_{k1} je $\text{RSD} = 1,8 \%$, pro pík p_{k2} $\text{RSD} = 7,7 \%$ a pro pík p_a $\text{RSD} = 8,2 \%$. Nejširší lineární rozsah byl naměřen pro anodický pík p_a a to

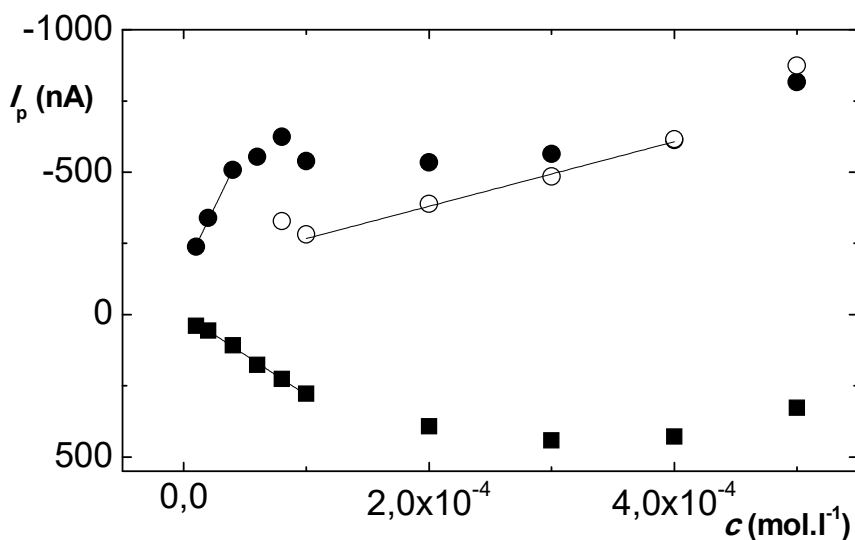
$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Nejnižší meze detekce i meze stanovitelnosti bylo dosaženo pro katodický pík p_{k1} viz **tab. 11**.



Obr. 43 Cyklické voltamogramy CDCA měřeny na HMDE ($\nu = 1000 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$) v prostředí $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – methanol (9:1). Koncentrace CDCA ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$): základní elektrolyt (ZE), $1 \cdot 10^{-5}$ (1), $2 \cdot 10^{-5}$ (2), $4 \cdot 10^{-5}$ (3), $6 \cdot 10^{-5}$ (4), $8 \cdot 10^{-5}$ (5), $1 \cdot 10^{-4}$ (6), $2 \cdot 10^{-4}$ (7), $3 \cdot 10^{-4}$ (8), $4 \cdot 10^{-4}$ (9), $5 \cdot 10^{-4}$ (10).



Obr. 44 Závislost potenciálu katodických píků E_{pk1} (●) a E_{pk2} (○) a anodického píku E_{pa} (■) CDCA na koncentraci c a na logaritmu koncentrace $\log c$ v rozmezí $1 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$. Měřeno metodou cyklické voltametrie ($\nu = 1000 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$) na HMDE v prostředí $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – methanol (9:1).



Obr. 45 Závislost proudu katodických píků I_{pk1} (●), I_{pk2} (○) a anodického píku I_{pa} (■) CDCA na koncentraci c v rozmezí $1 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Měřeno metodou cyklické voltametrie ($\nu = 1000 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$) na HMDE v prostředí $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – methanol (9:1).

Tab. 11 Parametry lineární závislosti proudu katodických píků I_{pk1} , I_{pk2} , a anodického píku I_{pa} CDCA na koncentraci c . Měřeno metodou cyklické voltametrie ($v = 1000 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$) na HMDE v prostředí $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – methanol (9:1).

pík	lineární dynamický rozsah ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	směrnice ($\text{nA}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$)	úsek (nA)	korelační koeficient	LOD ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
p_{k1}	10 – 40	$8,9 \pm 0,2$	$152,4 \pm 5,3$	0,9979	1,4	4,7
p_{k2}	100 – 400	$1,10 \pm 0,01$	$153,8 \pm 4,7$	0,9846	77,0	257,0
p_a	10 – 100	$2,80 \pm 0,04$	–	0,9865	3,6	12,2

3.3.2.3. Koncentrační závislost měřená v prostředí o pH 4,0

Koncentrační závislost CDCA byla změřena na HMDE elektrodě v prostředí BR pufr (pH 4,0) – methanol (9:1) metodami DC a DP voltametrie, kdy byla použita nízká rychlost polarizace – pro metodu DCV $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, pro metodu DPV $v = 20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Rozsah měřených koncentrací je $1\cdot 10^{-5} - 5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Roztoky o příslušných koncentracích byly připravovány vždy zvlášť se zachováním konstantního obsahu methanolu v roztoku. Směsné prostředí o pH BR pufru 4,0 bylo zvoleno na základě předchozí studie této látky².

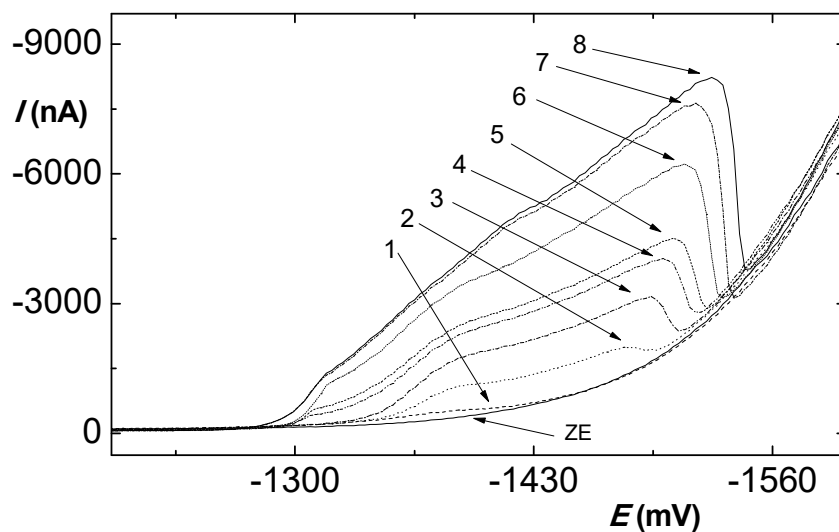
CDCA má v prostředí pH 4,0 atypický tvar píku. Výška proudu tohoto píku je v prostředí o pH 4,0, oproti hodnotám pH 5,0 a výše v případě metody DCV 100x vyšší, v případě metody DPV 40x vyšší². CDCA se ve vyšších koncentracích (specifikováno níže) při tomto pH sráží, což má souvislost s protonizací karboxylové skupiny CDCA na uhlíku C₂₄ postranního řetězce steroidního jádra. Hodnota pK_a CDCA je 4,6. Srážení CDCA pozorujeme v rozsahu koncentrací $2\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} - 5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, od koncentrace $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ níže je roztok čirý bez sraženin.

Srážení CDCA ve vyšších koncentracích má vliv na naměřenou koncentrační závislost, jelikož nedochází ke kvantitativnímu rozpuštění analytu v roztoku.

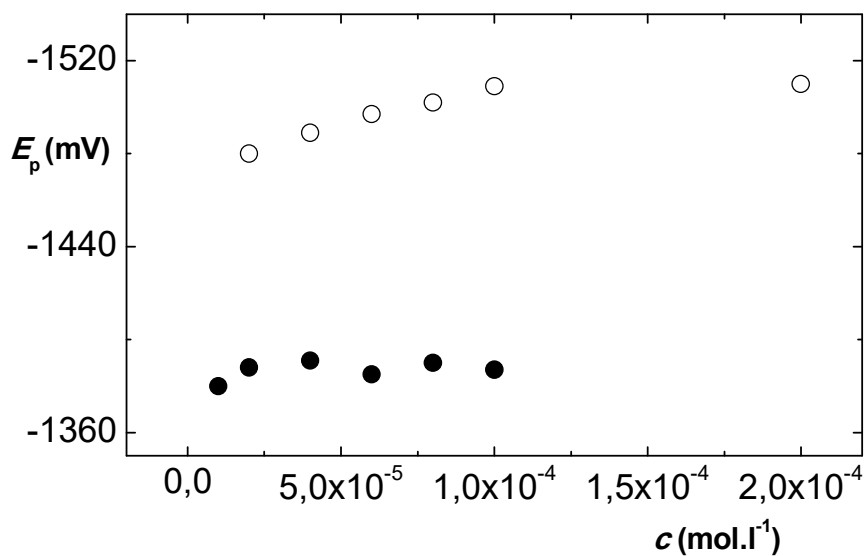
Voltamogramy koncentrační závislosti pro metodu DCV jsou na **obr. 46**. Na těchto voltamogramech je vidět jeden jasný pík označený p_2 kolem potenciálu

-1500 mV, kterému předchází kolem potenciálu -1390 mV málo výrazný pík označený jako p_1 . Závislost potenciálu obou píků na koncentraci CDCA je na **obr. 47**. Pro oba píky p_1 i p_2 platí, že s rostoucí koncentrací dochází k posunu potenciálu do zápornějších oblastí. Na **obr. 48** je zobrazena závislost velikosti proudu píku p_1 a p_2 na koncentraci CDCA. Pík p_1 se tvoří v rozsahu koncentrací $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, při vyšších koncentracích není příliš zřetelný. Výška tohoto píku s rostoucí koncentrací roste. Pík p_2 se tvoří v celém naměřeném koncentračním rozsahu, ale nárůst proudu tohoto píku pozorujeme pouze pro koncentrační rozmezí $1 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Od koncentrace $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ již k nárůstu proudu nedochází v důsledku vysrážení CDCA z roztoku. Parametry lineární závislosti jsou pro oba píky uvedeny v **tab. 12**.

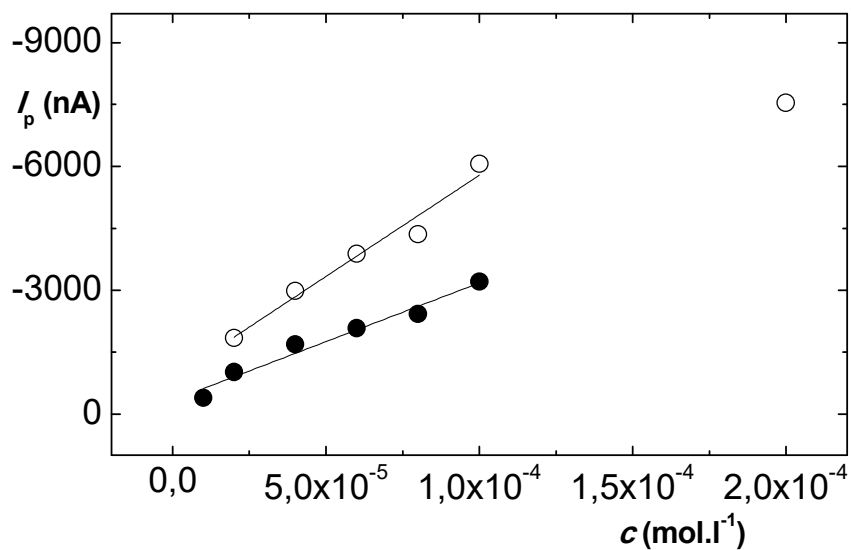
V případě metody DPV je situace poměrně komplikovanější, protože tato metoda poskytuje tři píky v různém rozsahu koncentrací. Pulsní potenciálový režim tedy výrazně ovlivňuje voltametrickou odezvu CDCA v porovnání s lineárním nárůstem potenciálů při metodě DCV. DP voltamogramy jsou zobrazeny na **obr. 49**. Hlavník pík označený jako p_2 se vyskytuje v rozsahu nižších koncentrací $4 \cdot 10^{-6} - 8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ s potenciálem kolem -1330 mV. Píky označené jako p_1 a p_3 se shodně vyskytují až při vyšších koncentracích. Pík p_1 se objevuje od koncentrace $6 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ s potenciálem kolem -1265 mV, pík p_3 se objevuje od koncentrace $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ s potenciálem kolem -1330 mV. Závislosti potenciálu píků p_1 , p_2 , a p_3 na koncentraci CDCA jsou na **obr. 50**, závislosti proudu píků p_1 , p_2 a p_3 na koncentraci CDCA jsou na **obr. 51**. Z **obr. 51** je vidět, že s rostoucí koncentrací roste i proud všech tří píků, dokud nedojde k vysrážení látky z roztoku. Parametry lineární závislosti jsou uvedeny v **tab. 13**.



Obr. 46 Voltamogramy CDCA měřené na HMDE metodou DCV v prostředí BR pufr (4,0) – methanol (9:1). Koncentrace CDCA ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$): základní elektrolyt (ZE) $1\cdot 10^{-5}$ (1), $2\cdot 10^{-5}$ (2), $4\cdot 10^{-5}$ (3), $6\cdot 10^{-5}$ (4), $8\cdot 10^{-5}$ (5), $1\cdot 10^{-4}$ (6), $2\cdot 10^{-4}$ (7), $5\cdot 10^{-4}$ (8).



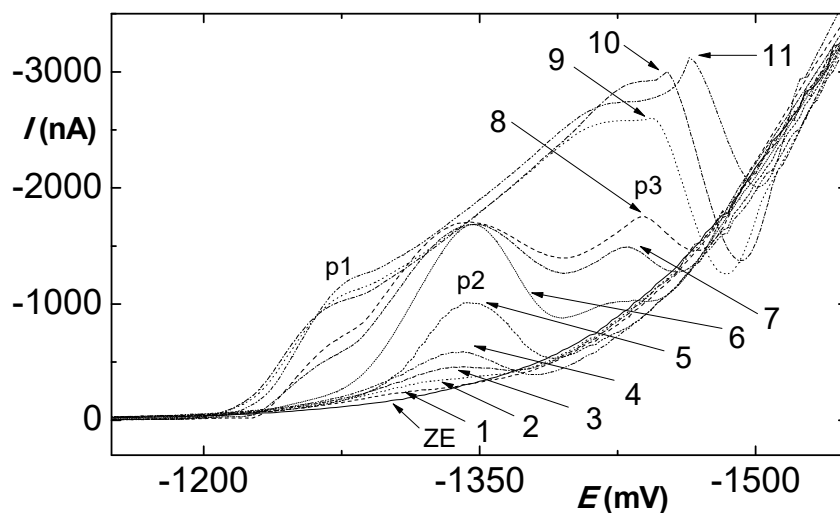
Obr. 47 Závislost potenciálu píku E_{p1} (●) a E_{p2} (○) CDCA na koncentraci c v rozmezí $1\cdot 10^{-5}$ – $2\cdot 10^{-4}$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Měřeno metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufr (4,0) – methanol (9:1).



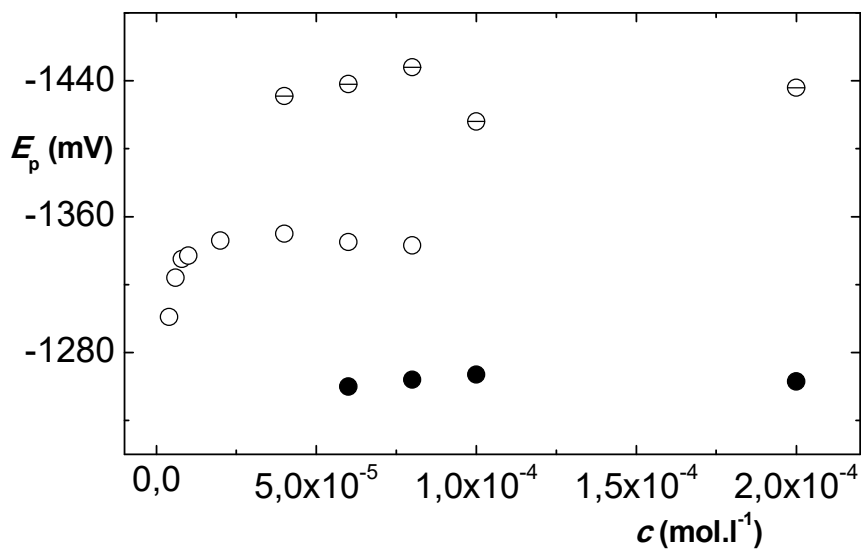
Obr. 48 Závislost proudu píku I_{p1} (●) a I_{p2} (○) CDCA na koncentraci c v rozmezí $1 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Měřeno metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufr (4,0) – methanol (9:1).

Tab. 12 Parametry lineární závislosti píku p_1 a p_2 CDCA. Měřeno metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufr (4,0) – methanol (9:1).

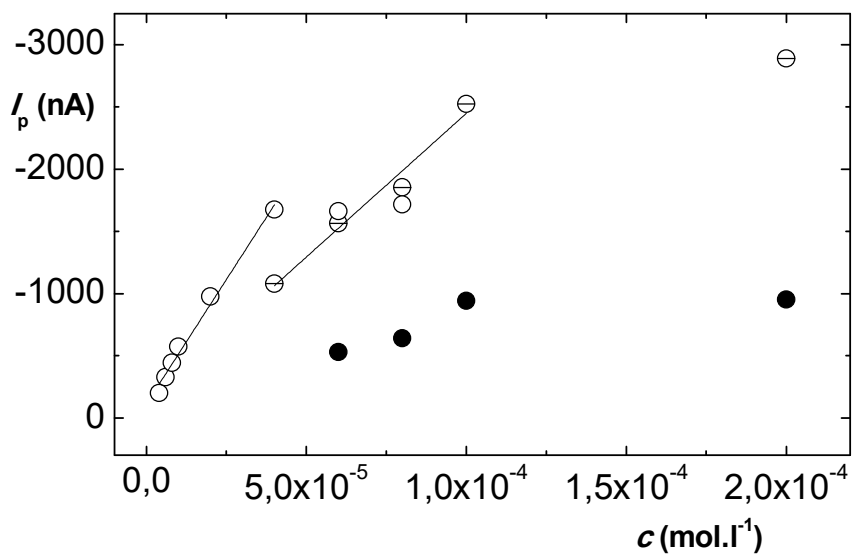
pík	lineární dynamický rozsah ($\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)	směrnice ($\text{nA} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$)	úsek (nA)	korelační koeficient	LOD ($\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)
p_1	10 – 100	$28,4 \pm 2,5$	$332,0 \pm 149,4$	0,9636	1,4	4,6
p_2	20 – 100	$49,1 \pm 5,0$	$882,3 \pm 333,1$	0,9594	6,0	20,1



Obr. 49 Voltamogramy CDCA měřené na HMDE metodou DPV v prostředí BR pufr (4,0) – methanol (9:1). Koncentrace CDCA ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$): základní elektrolyt (ZE), $4\cdot 10^{-6}$ (1), $6\cdot 10^{-6}$ (2), $8\cdot 10^{-6}$ (3), $1\cdot 10^{-5}$ (4), $2\cdot 10^{-5}$ (5), $4\cdot 10^{-5}$ (6), $6\cdot 10^{-5}$ (7), $8\cdot 10^{-5}$ (8), $1\cdot 10^{-4}$ (9), $2\cdot 10^{-4}$ (10), $5\cdot 10^{-4}$ (11).



Obr. 50 Závislost potenciálu píku E_{p1} (●), E_{p2} (○) a E_{p3} (⊖) CDCA na koncentraci c v rozmezí $4\cdot 10^{-6}$ – $2\cdot 10^{-4}$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Měřeno metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufr (4,0) – methanol (9:1).



Obr. 51 Závislost proudu píku I_{p1} (●), I_{p2} (○) a I_{p3} (⊖) CDCA na koncentraci c v rozmezí $4 \cdot 10^{-6} - 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Měřeno metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufr (4,0) – methanol (9:1).

Tab. 13 Parametry lineární závislosti píku p_2 a p_3 CDCA. Měřeno metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufr (4,0) – methanol (9:1).

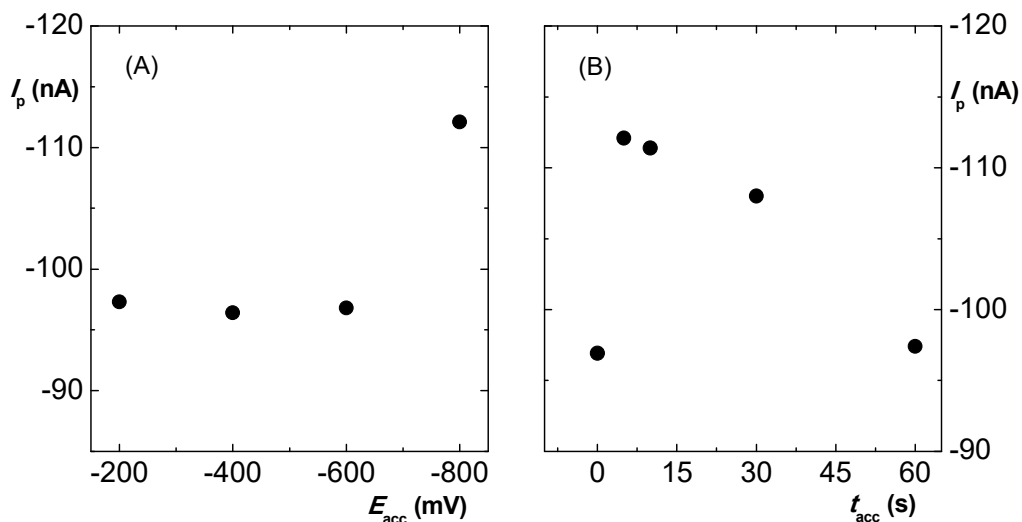
pík	lineární dynamický rozsah ($\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)	směrnice ($\text{nA} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$)	úsek (nA)	korelační koeficient	LOD ($\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)
p_2	4 – 40	$39,9 \pm 2,0$	$112,9 \pm 38,9$	0,9873	0,84	2,8
p_3	40 – 100	$23,1 \pm 2,5$	–	0,9648	5,8	19,3

3.3.3. Adsorpční rozpouštěcí DP voltametrie chenodeoxycholové kyseliny

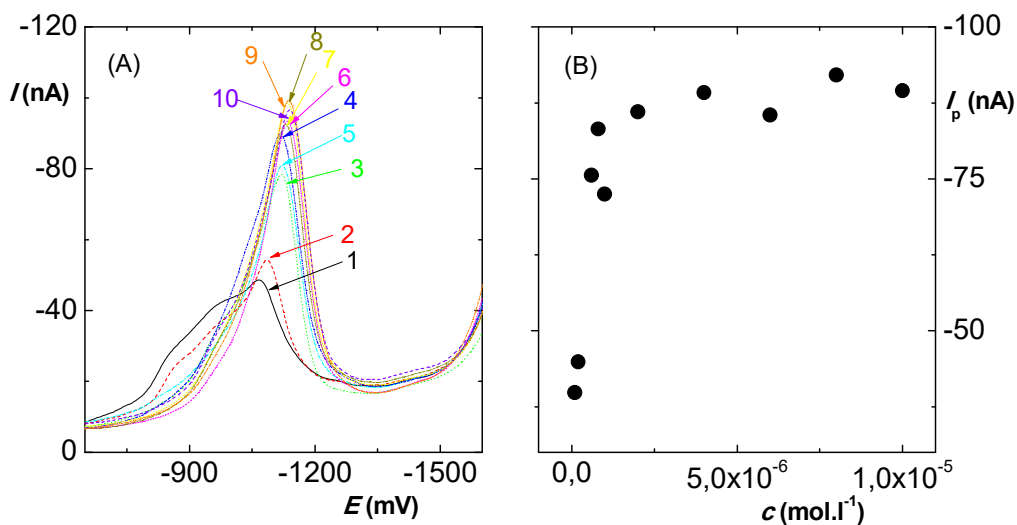
Adsorpční rozpouštěcí voltametrie je velmi citlivá voltametrická metoda, která využívá schopnost řady organických látek neelektrolyticky se adsorbovat na elektrodu. Množství naadsorbované látky odpovídá pouze koncentraci látky v roztoku a je tak možno dosáhnout nižších limitů detekce než v případě klasické DC či DP voltametrie.

Vzhledem k předpokládané rychlé adsorpci CDCA na elektrodu i při nižších koncentracích byla adsorpční rozpouštěcí voltametrie s diferenčním pulsním skenem (AdS-DPV) optimalizována při koncentraci CDCA $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v prostředí $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – methanol (9:1) na HMDE.

Vliv potenciálu akumulace na výšku píku CDCA byl měřen pro potenciály akumulace E_{acc} : -200 , -400 , -600 a -800 mV v míchaném roztoku po dobu akumulace t_{acc} 5 s, kdy k nevýraznému zvýšení píku CDCA došlo pouze při vloženém potenciálu akumulace -800 mV. Závislost výšky píku CDCA na potenciálu akumulace je zobrazena na **obr. 52A**. Dále byla optimalizována doba akumulace pro časy t_{acc} 0, 5, 10, 30 a 60 s s potenciálem akumulace -800 mV. Závislost výšky píku CDCA na době akumulace je uvedena na **obr. 52B**. Nejvyšší odezvy bylo dosaženo při době akumulace 5 s, poté výšky píku pozvolna klesaly. Nárůst ve výše proudu píku CDCA při době akumulace 5 s je oproti nulové době akumulace 15,7 % a nejde tedy o analyticky významný rozdíl. K době akumulace 5 s je potřeba přičíst dobu klidu, která byla 5 s a dobu, při které probíhá sken, ale nedochází k redukci CDCA. Pro rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ s počátečním potenciálem -600 mV činila tato doba 10 s, celkový čas pro adsorpci před nástupem píku CDCA byl 20 s. Je tedy zřejmé, že k adsorpci CDCA na elektrodu dochází rychle i bez cílené akumulace, která výšky píku příliš neovlivňuje. Metoda AdS-DPV však umožňuje detekci nižších koncentrací CDCA než samotná DPV, jak je zřejmé z **obr. 53A**, na kterém je zobrazena koncentrační závislosti CDCA v rozsahu koncentrací $1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, závislost proudu píku na koncentraci CDCA je pak na **obr. 53B**.



Obr. 52 Závislost proudu píku I_p CDCA ($c = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na za (A) potenciálu akumulace E_{acc} při době akumulace t_{acc} 5 s a za (B) na době akumulace t_{acc} při potenciálu akumulace $E_{acc} -800 \text{ mV}$. Měřeno v prostředí $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – methanol (9:1) metodou AdS-DPV na HMDE.



Obr. 53A Voltamogramy CDCA měřené metodou AdS-DPV na HMDE v $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – methanol (9:1). Potenciál akumulace -800 mV , doba akumulace 5 s. Koncentrace CDCA ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$): $1 \cdot 10^{-7}$ (1), $2 \cdot 10^{-7}$ (2), $6 \cdot 10^{-7}$ (3), $8 \cdot 10^{-7}$ (4), $1 \cdot 10^{-6}$ (5), $2 \cdot 10^{-6}$ (6), $4 \cdot 10^{-6}$ (7), $6 \cdot 10^{-6}$ (8), $8 \cdot 10^{-6}$ (9), $1 \cdot 10^{-5}$ (10).

Obr. 53B Závislost proudu píku I_p na koncentraci CDCA v rozmezí $c = 1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ s potenciálem akumulace -800 mV a dobou akumulace 5 s.

3.4. Studium elektrochemického chování chenodeoxycholové kyseliny na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné tuhé amalgámové elektrodě

3.4.1. „Square wave“ voltametrie chenodeoxycholové kyseliny

3.4.1.1. Optimalizace parametrů měření

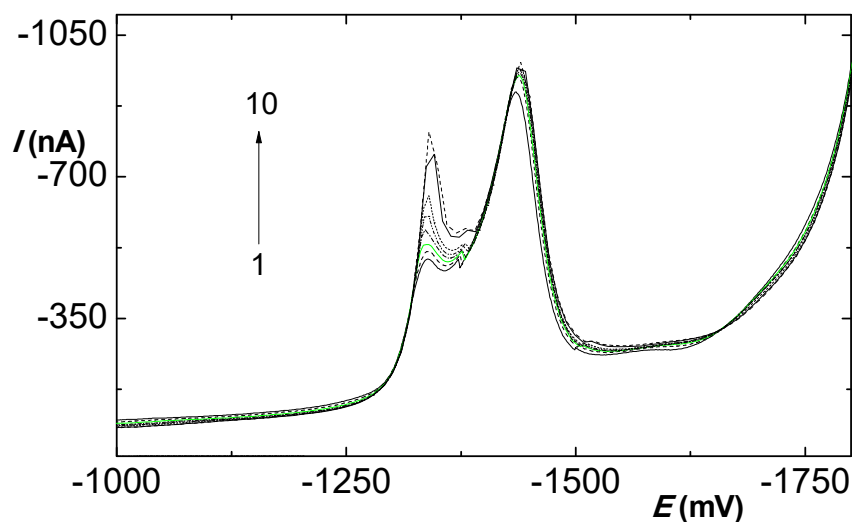
Metodami DC a DP voltametrie nebylo možné naměřit koncentraci CDCA nižší než $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, metoda AdS-DPV se ukázala pro CDCA jako analyticky nevýznamná. Zároveň z předchozí studie CDCA na m-AgSAE metodou cyklické voltametrie vyplývá, že se jedná o děj řízený adsorpcí s malými rozdíly v ΔE_p . V prostředí $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – methanol (9:1) se pak tvoří ostrý katodický pík a anodický protipík otočený klasicky do anodické oblasti². Z těchto důvodů byla vybrána metoda „square-wave“ voltametrie, která je obzvláště vhodná pro reversibilní elektrochemické reakce.

Optimalizace parametrů metody „square-wave“ voltametrie byla provedena v prostředí $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – methanol (9:1) o koncentraci CDCA $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Jako pracovní elektroda byla pro tuto metodu zvolena m-AgSAE.

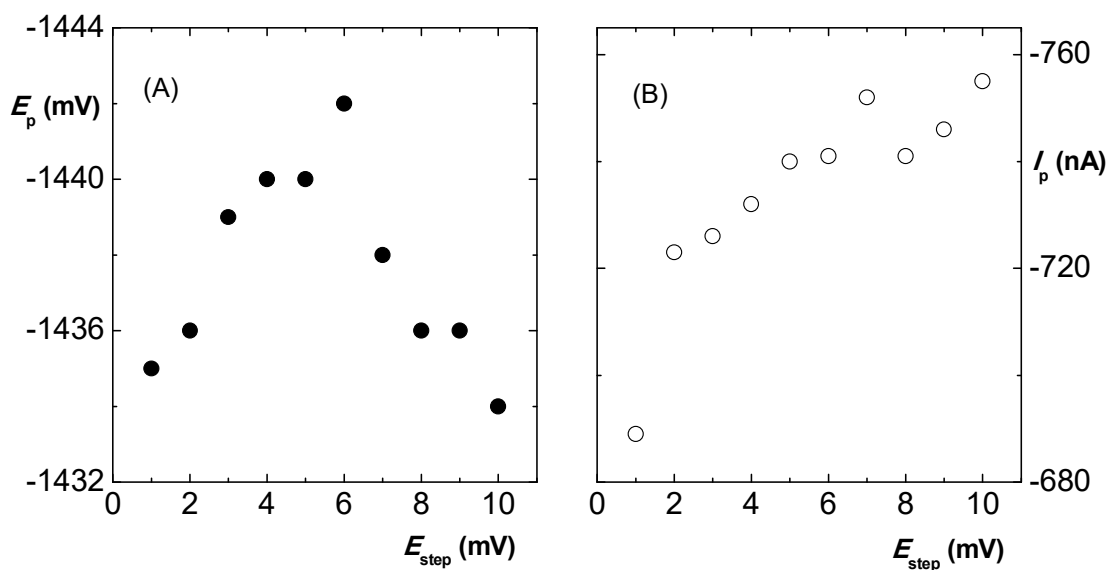
Jako první proběhla optimalizace potenciálového kroku E_{step} , kdy byla amplituda A nastaven na 70 mV a frekvence f na 50 Hz, tedy zhruba ve středu rozsahu měřených parametrů. Potenciálový krok byl měřený v rozsahu 1 – 10 mV, příslušné voltamogramy jsou zobrazeny na **obr. 54**. Na **obr. 55A** je zobrazena závislost potenciálu píku E_p CDCA, na **obr. 55B** je zobrazena závislost proudu píku I_p CDCA na potenciálovém kroku. Nejvyššího proudu píku CDCA bylo dosaženo při $E_{\text{step}} = 7 \text{ mV}$ (viz obr. 55B), ale vzhledem k tvaru křivky CDCA byla zvolena hodnota 3 mV.

Dále byla volena hodnota amplitudy A v rozmezí 10 – 150 mV při potenciálovém kroku $E_{\text{step}} = 3 \text{ mV}$ a frekvenci $f = 50 \text{ mV}$. Příslušné voltamogramy CDCA jsou zobrazeny na **obr. 56**. Na **obr. 57A** je zobrazena závislost potenciálu píku E_p CDCA, na **obr. 57B** je zobrazena závislost proudu píku I_p CDCA na amplitudě A . Vzhledem k výrazné tvorbě „předpíku“ při vyšších hodnotách amplitudy byla zvolena hodnota $A = 70 \text{ mV}$.

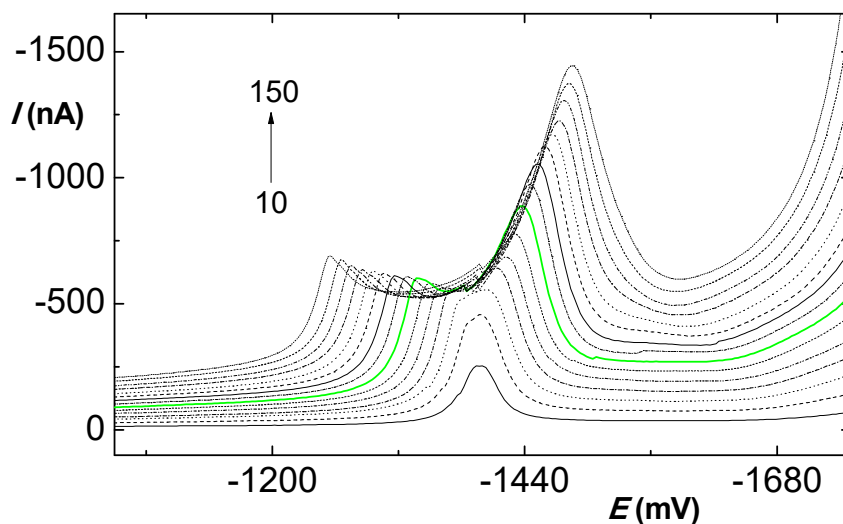
Jako poslední byla nastavena hodnota frekvence f v rozmezí 10 – 100 Hz, při $E_{\text{step}} = 3$ mV a $A = 70$ mV. Voltamogramy CDCA jsou zobrazeny na **obr. 58**. Na **obr. 59A** je zobrazena závislost potenciálu píku E_p CDCA, na **obr. 59B** je zobrazena závislost proudu píku I_p CDCA na frekvenci f . Pro frekvenci byla vzhledem k charakteru křivky CDCA zvolena hodnota 60 Hz.



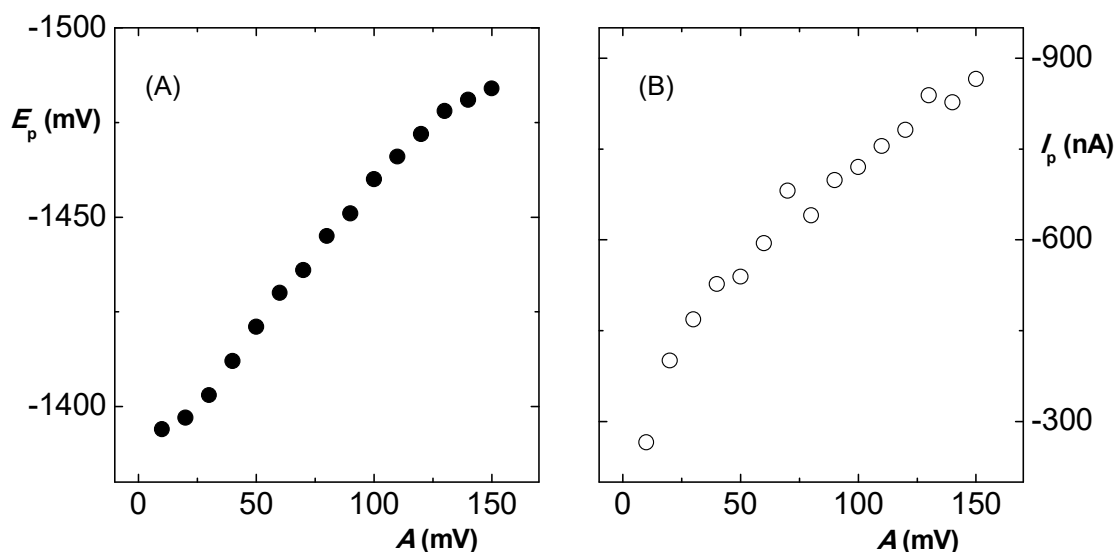
Obr. 54 Voltamogramy CDCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) měřené metodou „square-wave“ voltametrie na m-AgSAE v prostředí $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – methanol (9:1). Parametry měření: $A = 70$ mV, $f = 50$ Hz, E_{step} v rozsahu 1 – 10 mV.



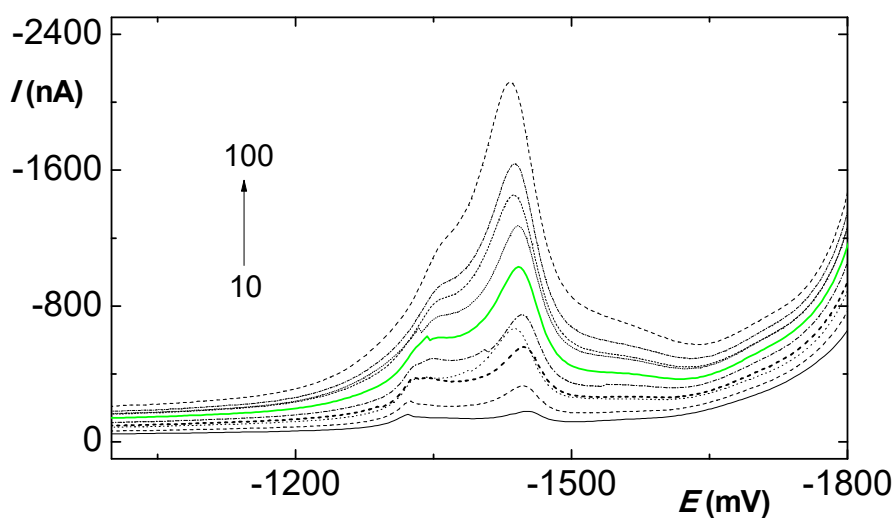
Obr. 55 Závislost potenciálu píku E_p (●) a proudu píku I_p (○) CDCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na potenciálovém kroku E_{step} v rozmezí 1 – 10 mV. Měřeno metodou „square-wave“ voltmetrie na m-AgSAE v prostředí $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – methanol (9:1). Další parametry měření: $A = 70 \text{ mV}$, $f = 50 \text{ Hz}$.



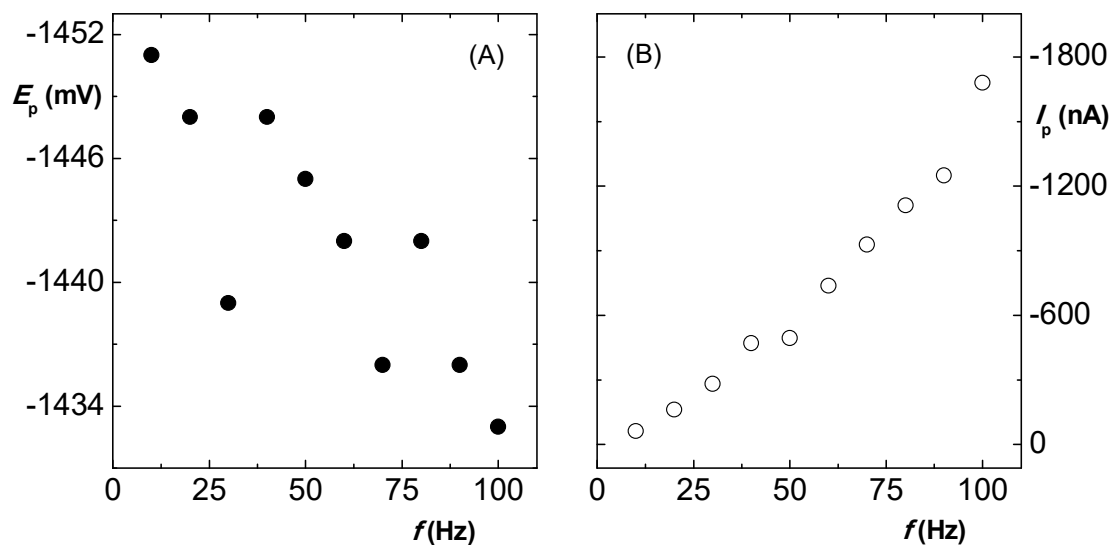
Obr. 56 Voltamogramy CDCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) měřené metodou „square-wave“ voltmetrie na m-AgSAE v prostředí $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – methanol (9:1). Parametry měření: $E_{\text{step}} = 3 \text{ mV}$, $f = 50 \text{ Hz}$, A v rozsahu 10 – 150 mV.



Obr. 57 Závislost potenciálu píku E_p (●) a proudu píku I_p (○) CDCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na amplitudě A v rozmezí 10 – 100 mV. Měřeno metodou „square-wave“ voltametrie na m-AgSAE v prostředí 0,04 mol·l⁻¹ borátový pufr (pH 9,1) – methanol (9:1). Další parametry měření: $E_{\text{step}} = 3 \text{ mV}$, $f = 50 \text{ Hz}$.



Obr. 58 Voltamogramy CDCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) měřené metodou „square-wave“ voltametrie na m-AgSAE v prostředí 0,04 mol·l⁻¹ borátový pufr (pH 9,1) – methanol (9:1). Parametry měření: $E_{\text{step}} = 3 \text{ mV}$, $A = 70 \text{ mV}$, f v rozsahu 10 – 100 Hz.



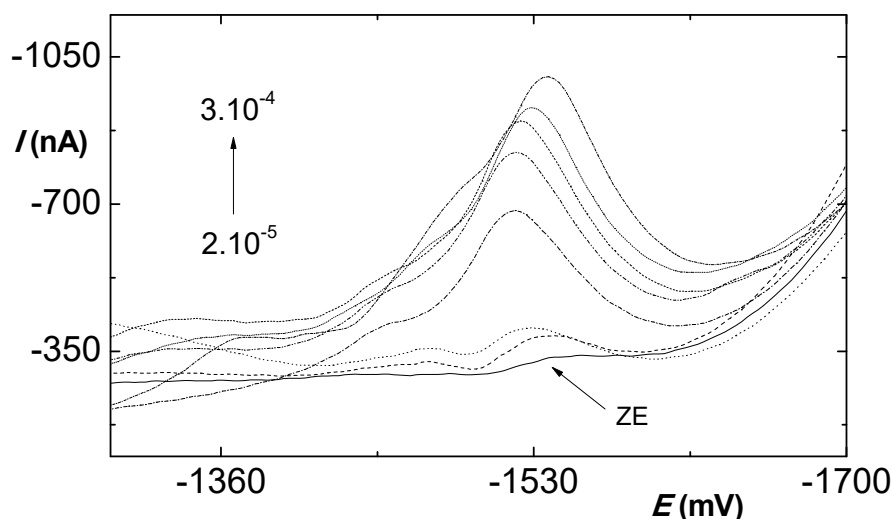
Obr. 59 Závislost potenciálu píku E_p (●) a proudu píku I_p (○) CDCA ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na frekvenci f v rozmezí 10 – 100 Hz. Měřeno metodou „square-wave“ voltametrie na m-AgSAE v prostředí $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – methanol (9:1). Další parametry měření: $E_{\text{step}} = 3 \text{ mV}$, $A = 70 \text{ mV}$.

3.4.1.2. Koncentrační závislost

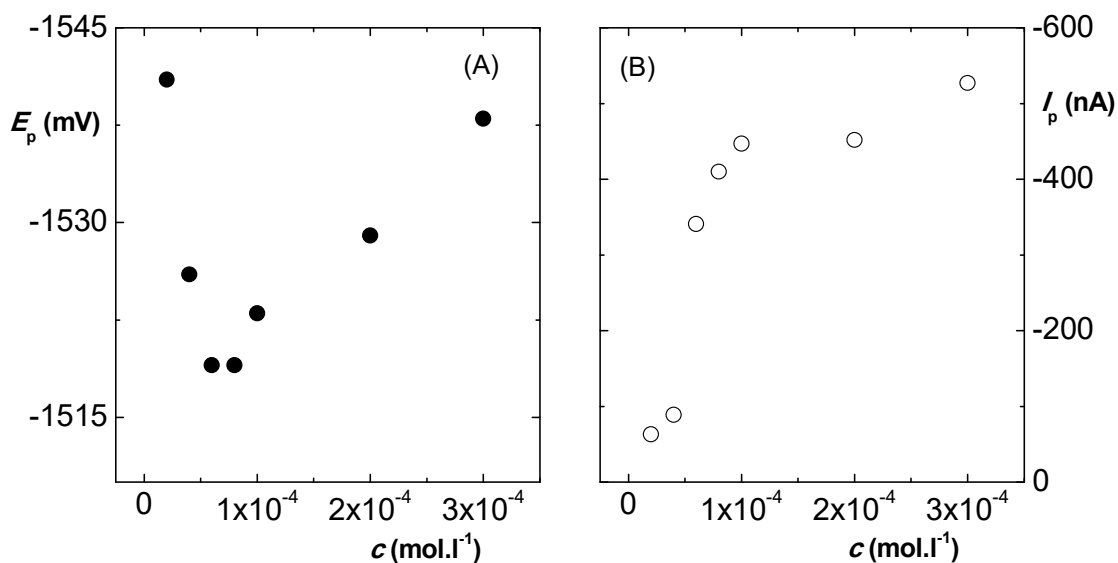
Metodou „square-wave“ voltametrie byla změřena koncentrační závislost CDCA v rozsahu koncentrací $2 \cdot 10^{-5} - 3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v prostředí $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – methanol (9:1) na m-AgSAE. Měření probíhalo při následujících parametrech: $E_{\text{step}} = 3 \text{ mV}$, $A = 70 \text{ mV}$, $f = 60$, které byly vybrány na základě optimalizace pro tuto metodu.

Voltamogramy koncentrační závislosti CDCA jsou zobrazeny na **obr. 60**. CDCA poskytuje v celém koncentračním rozmezí jeden pík s potenciálem kolem -1530 mV . Potenciál píku se při nižších koncentracích posouvá do kladnějších oblastí viz **obr. 61A**, od koncentrace $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ je pak patrný posun zpět k zápornějším hodnotám. Závislost proudu píku CDCA na koncentraci je zobrazena na **obr. 61B**. Z této závislosti je vidět, že s růstem koncentrace v rozmezí $2 \cdot 10^{-5} - 3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ sice dochází k růstu proud píku CDCA, tento nárůst však nelze proložit jednoduchou matematickou funkcí,

navíc dochází k fluktuacím potenciálu. Od koncentrace CDCA $4 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ došlo k deformaci píku a nárůst proudu píku zde nebyl patrný, vyšší koncentrační rozmezí proto již nebylo vyhodnocováno. Na druhé straně bylo touto metodou možno na m-AgSAE dosáhnout nižších koncentrací, kdy se pík CDCA tvoří již při koncentraci $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Při použití DP voltametrie na m-AgSAE byl ve stejném směsném prostředí patrný pík CDCA až od koncentrace $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1(2)}$. I přes quasireversibilní charakter elektrodového děje prokázaný cyklickou voltametrií² se však metoda „square-wave“ voltametrie neprokázala jako vhodná pro stanovení CDCA. Stejně jako u dehydrocholové kyseliny je rozsah měřitelných koncentrací jen velmi úzký.



Obr. 60 Voltamogramy CDCA měřené metodou „square-wave“ voltametrie. Měřeno na m-AgSAE v prostředí $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – methanol (9:1). Koncentrace CDCA ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$): základní elektrolyt (ZE), $2 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-5}$, $6 \cdot 10^{-5}$, $8 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-4}$, $2 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$. Parametry měření: $E_{\text{step}} = 3 \text{ mV}$, $A = 70 \text{ mV}$, $f = 60 \text{ Hz}$.



Obr. 61 Závislost potenciálu píku E_p (●) a proudu píku I_p (○) CDCA ($c = 5 \cdot 10^{-4}$ mol.l⁻¹) na koncentraci CDCA v rozmezí $2 \cdot 10^{-5} - 3 \cdot 10^{-4}$ mol.l⁻¹. Měřeno metodou “square-wave” voltametrie na m-AgSAE v prostředí 0,04 mol.l⁻¹ borátový pufr (pH 9,1) – methanol (9:1). Parametry měření: $E_{\text{step}} = 3$ mV, $A = 70$ mV, $f = 60$ Hz.

4. Závěr

Tato práce se zabývala vůbec první elektrochemickou studií kyseliny dehydrocholové za použití stacionárních rtuťových elektrod a dále prohlubuje výsledky získané pro chenodeoxycholovou kyselinu, která již byla okrajově elektrochemicky studovaná v bakalářské práci².

Elektrochemické studium redukce kyseliny dehydrocholové a chenodeoxycholové bylo provedeno moderními voltametričnými metodami za použití visící rtuťové kapkové elektrody (HMDE) a rtuťovými meniskem modifikované stříbrné tuhé amalgámové elektrody (m-AgSAE). Obě tyto elektrody byly zvoleny jako alternativa ke klasické rtuťové kapce.

Dehydrocholová kyselina poskytuje tři píky v závislosti na hodnotě pH prostředí a na koncentraci látky v roztoku. Rozsah měřených pH byl 3,0 – 12,0, pro HMDE a metody DCV a DPV, na m-AgSAE byl měřený rozsah 4,0 – 12,0 metodou DPV. Hodnoty potenciálů jednotlivých píků naměřených oběma elektrodami si přibližně odpovídají a vykazují podobné trendy v chování posunu potenciálu a změně výšky píků. Potenciál prvního píku se pohybuje kolem -1230 mV, potenciál druhého píku je kolem -1450 mV a potenciál třetího píku -1800 mV, který zřejmě odpovídá redukcí karboxylové skupiny postranního řetězce steroidního jádra.

Zajímavé chování pozorujeme v prostředí o pH 6,0, ve kterém nedochází k tvorbě v pořadí třetího píku p_3 . Toto chování patrně souvisí s disociací karboxylové skupiny na C_{24} postranního řetězce DHCA (pK_a 4,74), čemuž odpovídají i vysoké hodnoty proudů píku p_3 při nižších hodnotách pH (3,0 – 5,0), kdy se nedisociovaná forma DHCA více adsorbuje na povrch elektrody, čímž dochází ke zvýšení proudové odezvy.

Koncentrační závislost DHCA byla měřena metodami DCV a DPV na HMDE a metodou „square-wave“ voltametrie na m-AgSAE. Nejnižší meze detekce $2,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a meze stanovitelnosti $6,9 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ bylo dosaženo pro DHCA metodou DPV na HMDE. Metoda „square-wave“ voltametrie měla pouze velmi krátký koncentrační rozsah a byla tak vyhodnocena jako nevýznamná. Metoda DPV umožňuje také sledovat úbytek látky v roztoku v čase. I přesto, že ani jednou z uvedených metod nebylo dosaženo příliš širokých lineárních dynamických rozsahů a nízkých limitů detekce, je možno především

metodu DPV použít k charakterizaci nově vzniklých konjugátů a supramolekulárních systémů.

Elektroodový děj DHCA byl studovaný metodou cyklické voltametrie. Jedná se o děj quasireverzibilní, který je v případě prvního a druhého píku řízený adsorpcí.

Elektrochemické studium chenodeoxycholové kyseliny bylo zaměřeno na vliv organického rozpouštědla na elektrochemickou odezvu CDCA a dále byl sledován charakter křivek při koncentračních závislostech

Pro studium vlivu organického rozpouštědla byl vybrán methanol a acetonitril v prostředí $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1), měření probíhala za použití HMDE. Obsah organického rozpouštědla se v analyzovaném vzorku zvyšoval v rozsahu 5 – 95 %. Pro roztoky s obsahem methanolu vyšším než 60 % již nešlo bezpečně prokázat, zda se jedná o pík CDCA či o pík methanolu, protože došlo k překrytí jak potenciálů píků, tak v mnoha poměrech převýšil proud píku methanolu pík CDCA. Obdobné závěry pak platí také pro výsledky získané z měření v roztoku s acetonitrem s tím rozdílem, že rozlišení látky od acetonitrilu je možné pouze do obsahu acetonitrilu 30 %. Z naměřených závislostí bylo nakonec vybráno jako nejvhodnější prostředí o obsahu methanolu 10 %. Potenciál i proud píku základního elektrolytu a CDCA jsou zde nejvíce rozlišeny.

V prostředí $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – methanol (9:1) byla měřena koncentrační závislost CDCA metodami DC a DP voltametrie, cyklické voltametrie a adsorpční rozpouštěcí voltametrie s diferenčním pulsním skenem (AdS-DPV) na HMDE a „square-wave“ voltametrie na m-AgSAE. Metodou cyklické voltametrie s vysokou rychlostí polarizace $1000 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ bylo dosaženo v prostředí $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátový pufr (pH 9,1) – methanol (9:1) na HMDE pro první katodický pík meze detekce $1,4 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a meze stanovitelnosti $4,6 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Nejnižší koncentrace a nejširšího lineárního dynamického rozsahu bylo dosaženo v prostředí BR pufr (pH 4,0) – methanol (9:1) metodou DPV na HMDE. V tomto prostředí se CDCA sráží a vykazuje atypické chování s tvorbou tří píků. Nejnižší meze detekce $0,84 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a meze stanovitelnosti $1,8 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ bylo dosaženo pro pík p_2 .

Metodou AdS-DPV bylo prokázáno, že je adsorpce CDCA na elektrodu spontánní děj a cílená akumulace tedy příliš neovlivňuje získanou odezvu. Metodou „square-wave“ voltametrie byl změřen krátký koncentrační rozsah s velmi úzkým

lineárním dynamickým rozsahem a tato metoda tedy není pro elektrochemické studium CDCA vhodná.

Ze získaných výsledků lze jak pro DHCA, tak pro CDCA a další žlučové kyseliny^{39,48,49} konstatovat, že pro analytické využití nejsou voltametrické metody na stacionárních rtuťových elektrodách příliš citlivé a tedy vhodné, ale je možno je využít pro detekci látky v roztoku. Elektrochemický signál je velmi ovlivněn hodnotou pH analyzovaného roztoku a výsledné křivky se tedy liší pro disociovanou a nedisociovanou formu karboxylové skupiny žlučové kyseliny danou hodnotou jejího pKa. Voltametrické metody tedy mají potenciál pro porovnání chování volné žlučové kyseliny a jejího konjugátu a jimi vytvořených supramolekulárních systémů.

5. Použitá literatura

- 1 Ferri T.; Campanella L.; De Angelis G.: Differential-pulse polarographic determination of cholic acids. *Analyst* 109, 923-925 (1984).
- 2 Patáková A.: Studium elektrochemické redukce kyseliny chenodeoxycholové na stacionárních elektrodách na bázi rtuti. *Bakalářská práce*, Univerzita Karlova v Praze, Praha 2013.
- 3 Alvarez, M.; Jover A.; Carrazana J.; Meijde F.; Soto V. H.; Vázquez Tato J.: Crystal structure of chenodeoxycholic acid, ursodeoxycholic acid and their two $3\beta,7\alpha$ - and $3\beta,7\beta$ -dihydroxy epimers. *Steroids* 72, 545-544 (2007).
- 4 Mukhopadhyay S.; Maitra U.: Chemistry and biology of bile acids. *Current Science* 87, 1666-1683, (2004).
- 5 Coello A.; Meijde F.; Nunez E. R.; Tato J. V.: Aggregation behavior of bile salts in aqueous solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85, 9-15 (1996).
- 6 Pecková K.; Nesměrák K.: Electrochemistry of bile acids, cholesterol, and related compounds. In: *Sensing in Electroanalysis*, Vol. 7. Kalcher K.; Metelka R.; Švancara I.; Vytrás K. (Eds.), University Press Centre, Pardubice (2012), 87 – 96.
- 7 Mohamed A. A.; Matijevic E.: Preparation and characterization of uniform drug particles: dehydrocholic acid. *Journal of Colloid and Interface Science* 386, 625-628 (2012).
- 8 Cravotto G.; Binello A.; Boffa L.; Rosati O.; Boccalini M.; Chimichi S.: Regio- and stereoselective reduction of dehydrocholic acid. *Steroids* 71, 469-475 (2006).
- 9 Bonafatti F.; De Battisti A.; Ferro S.; Medici A.; Pedrini P.: Electrosynthesis of dehydrocholic acid from cholic acid. *Journal of Applied Electrochemistry* 30, 995-998 (2000).
- 10 Fogagnolo M.; Fantin G.; Bortolin O.: Inclusion compounds of dehydrocholic acid with solvents. *International Journal of Molecular Science* 8, 662-669 (2007).
- 11 Fantin G.; Fogagnolo M.; Bortolini O.; Masciocchi N.; Galli S.; Sironi A.: Polymorphism of dehydrocholic acid: crystal structure of the β -phase and guest-mediated solid phase conversion. *Journal of Chemistry* 27, 1794-1800 (2003).

- 12 Rodriguez V. G.; Lucangioli S. E.; Otero G. C. F.; Carducci C. N.: Determination of bile acids in pharmaceutical formulations using micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 23, 375-381 (2000).
- 13 Pingang H.; Jiannong Y.; Yuzhi F.; Suzuki I.; Tetsuo O.: Voltammetric responsive sensors for organic compounds based on organized self-assembled lipoyl- β -cyclodextrin derivate monolayer on gold electrode. *Analytical Chimica Acta* 337, 217-223 (1997).
- 14 Yoneda M.; Makino I.; Tamasawa N.; Takebe K.; Sakuraba K.; Goto J.; Nambara T.: The biotransformed metabolite profiles in blood after intravenous administration of dehydrocholic acid. *The American Journal of Gastroenterology* 84, 290-295 (1989).
- 15 Český lékopis 2009. Grada Publishing, vydáno na CD.
- 16 Zhang Y.; Qu H.; Feng H.; Wang X.; Shan W.; Zeng W.; Wang Q.; Zhao Y.: Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for chenodeoxycholic acid using an anti-chenodeoxycholic acid monoclonal antibody. *Analytical Methods* 7, 4583-4589 (2015).
- 17 Wan J.; He J.; Cao X.: A novel process for preparing pure chenodeoxycholic acid from poultry bile. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 18, 65-71 (2012).
- 18 http://www.chemicalbook.com/ProductMSDSDetailCB0704485_EN.htm (staženo 14.8.2015)
- 19 <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.6422.html> (staženo 14.8.2015)
- 20 <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.9728.html> (staženo 19.8. 2015)
- 21 <https://www.sigmaaldrich.com> (staženo 19.8. 2015)
- 22 <http://www.drugbank.ca/drugs/DB06777> (staženo 19.8. 2015)
- 23 Momose T.; Mure M.; Iida T.; Goto J.; Nambara T.: Method for separation of the unconjugates and conjugates of chenodeoxycholic acid and deoxycholic acid by two-dimensional reversed-phase thin-layer chromatography with methyl β -cyclodextrin. *Journal of Chromatography A* 811, 171-180 (1998).

- 24 Taguchi K.; Fukusaki E.; Bamba T.: Simultaneous and rapid analysis of bile acids including conjugates by supercritical fluid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1299, 103-109 (2013).
- 25 Qiao X.; Ye M.; Pan D. L.; Miao W. J.; Xiang C.; Han J. A.; Guo D. A.: Differentiation of various traditional Chinese medicines derived from animal bile and gallstone: Simultaneous determination of bile acids by liquid chromatography coupled with quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218, 107-117 (2011).
- 26 Sebok A.; Sezer K.; Vasanits-Zsigrai A.; Helenkar A.; Zaray G.; Molnar-Perl I.: Gas chromatography-mass spectrometry of the trimethylsilyl (oxime) ether/ester derivatives of cholic acids: Their presence in the aquatic environment. *Journal of Chromatography A* 1211, 104-112 (2008).
- 27 Scalia S.; Tirendi S.; Pazzi P.; Bousquet E.: Assay of free bile acids in pharmaceutical preparations by HPLC with electrochemical detection. *International Journal of Pharmaceutics* 115, 249-253 (1995).
- 28 Dekker R.; van der Meer R.; Olieman C.: Sensitive pulsed amperometric detection of free and conjugated bile acids in combination with gradient reversed-phase HPLC. *Chromatographia* 31, 549-553 (1991).
- 29 Chaplin M. F.: Analysis of bile acids and their conjugates using high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography B* 664, 431-434 (1995).
- 30 Yilmaz U. T.; Uzun D.; Yilmaz H.: A new method for rapid and sensitive determination of cholic acid in gallbladder bile using voltammetric techniques. *Microchemical Journal* 122, 159-163 (2015).
- 31 Campanella L.; Sorrentino L.; Tomassetti M.: Cholate liquid membrane ion-selective electrode for drug analysis. *Analyst* 108, 1490-1494 (1983).
- 32 Armstrong D.; Dowling H.; Murphy G. M.: An amperometric enzyme electrode for bile acids. *Analytica Chimica Acta* 281, 655-661 (1993).
- 33 Zuman P.: Role of mercury electrodes in contemporary analytical chemistry. *Electroanalysis* 12, 1187-1194 (2000).
- 34 Barek J.; Opekar F.; Štulík K.: *Elektroanalytická chemie*, Univerzita Karlova v Praze, Karolinum, Praha 2005.

- 35 Bard A. J.; Faulkner L. R.: *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. 2nd edition. New York City, Wiley 2001.
- 36 Kalvoda R.; Kůta J.: Moderní polarografické a voltametrické metody. *Chemické Listy* 74, 674-693 (1980).
- 37 Vargus E. P.: *New research on electrochemistry*. New York, Nova Science Publishers 2007.
- 38 Kalvoda R.; Kopanica M.: *Contemporary Electroanalytical Chemistry*. New York City, Springer US 1990.
- 39 Hulová D.: Využití elektrodových materiálů na bázi rtuti ke studiu elektrochemické redukce vybraných žlučových kyselin. *Diplomová práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2015.
- 40 Tiribilli Ch.; Sokolová R.; Giannarelli S.; Valášek M.: On reduction of the drug diflunisal in non-aqueous media. *Monatshefte für Chemie* 146, 807-812 (2015).
- 41 Treimer S. E.; Evans D. H.: Electrochemical reduction of acids in dimethyl sulfoxide. Comparison of weak C-H, N-H and O-H acids. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 455, 19-28 (1998).
- 42 Meng Y.; Norman S.; Hardacre C.; Compton R. G.: The electroreduction of benzoic acid: Voltammetric observation of absorbed hydrogen at a platinum microelectrode in room temperature ionic liquids. *Physical Chemistry Chemical Physics* 15, 2031-2036 (2013).
- 43 Zhao J.; Wu L.; Zhi J.: Non-enzymatic glucose detection using as-prepared boron-doped diamond thin film electrodes. *Analyst* 134, 794-799 (2009).
- 44 http://ach.upol.cz/user-files/files/nevodna_rozpoustedla2.pdf (staženo 25.7.2015)
- 45 https://web.natur.cuni.cz/~analchem/nesmerak/1415_nevoda_01.pdf (staženo 25.7.2015)
- 46 Van Leeuwen H. P.; Buffle J.; Lovric M.: Reactant adsorption in analytical pulse voltammetry: Methodology and recommendations. *Pure and Applied Chemistry* 64, 1015-1028 (1992).
- 47 Pletcher D.; Greff R.; Peat R.; Peter L.; Robinson J.: *Instrumental methods in electrochemistry*. Cambridge, Horwood Publishing Limited 2001.

- 48 Rákosníková Š.: Studium elektrochemické redukce kyseliny deoxycholové a ursodeoxycholové na rtuťové visící kapkové elektrodě. *Bakalářská práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2014.
- 49 Pišnová K.: Využití rtuťových elektrod ke stanovení kyseliny tauroursodeoxycholové. *Bakalářská práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2013.